

多途径介导的小胶质细胞间钙波传递*

吴 限 潘雷霆** 刘 颖 邢梦溪 张心正 许京军

(南开大学物理科学学院, 泰达应用物理研究院, 弱光非线性光子学教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要 利用微局域机械力刺激, 快速实时观察机械力引起的细胞间钙波传递, 系统地研究了 BV-2 小胶质细胞间钙通讯机制. 结果表明, 在细胞种植密度较小且彼此未接触的情况下, 旁分泌途径可介导 BV-2 小胶质细胞间钙波传递. 在细胞密度较大且相互接触的情况下, 旁分泌和间隙连接两种途径可共同介导胞间钙波传递. 更为有趣的是, 在体外发现 BV-2 小胶质细胞间存在通道纳米管类似物连接, 也可介导小胶质细胞间钙波传递. 综上所述, 小胶质细胞间钙波传递可通过旁分泌、间隙连接和通道纳米管类似物连接三种途径介导.

关键词 BV-2 小胶质细胞, 细胞间钙波, 间隙连接, 旁分泌, 通道纳米管类似物

学科分类号 Q632, Q274

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00007

钙离子是细胞内重要的第二信使分子, 参与调控细胞运动、形变、分化、增殖、转录等各种生理病理过程^[1-2]. 细胞间钙波 (intercellular calcium waves) 作为一种有效的钙通讯机制^[3], 广泛存在于平滑肌细胞^[4]、骨细胞^[5]、神经元细胞^[6]、星型胶质细胞^[7-9]等细胞中. 细胞间钙波传递的经典途径有两种, 即旁分泌 (paracrine) 介导的胞间钙通讯^[10-11]和间隙连接 (gap junction) 介导的胞间钙通讯^[7, 12]. 但 2004 年, Rustom 等^[13]在大鼠嗜铬细胞瘤细胞之间发现一种微小的丝状连接, 直径 50~200 nm 之间, 取名为通道纳米管 (tunneling nanotubes, TNTs), 可传递线粒体. 随后, 更多研究表明, 巨噬细胞^[14]、星型胶质细胞^[15]、内皮祖细胞^[16]等诸多细胞中也存在通道纳米管类似物 (TNT-like structures)^[17-19], 可传递病毒^[20]、细菌^[14]、细胞器^[17], 甚至介导钙波传递^[21-22].

小胶质细胞作为一种神经胶质细胞存在于脑和脊髓中, 是中枢神经系统的第一道也是最主要的一道免疫防线, 参与帕金森病、阿尔兹海默病、多发性硬化等神经系统紊乱疾病的发生. 其在体内主要功能是清除损伤、退化的神经细胞及脑部肿瘤细胞等^[23]. 研究发现, 当脑部受到创伤或感染时, 小胶质细胞可迅速动员并聚集, 在正常细胞和受损细胞间形成一个保护屏障^[23-24], 但其实现快速有效通讯

的机制目前仍不明确. BV-2 小胶质细胞系是反转录病毒感染原代培养的小鼠小胶质细胞而获得的永生细胞系, 基本具备了原代培养的小胶质细胞的形态学、表型以及各项功能特点, 且易于培养, 作为原代小胶质细胞替代模型已被广泛应用于小胶质细胞生理病理功能的研究中^[25]. 本文应用快速钙荧光显微成像方法, 在体外分别研究了稀疏培养和密集培养的 BV-2 小胶质细胞在微局部机械力刺激下钙波传递, 发现有三种途径可介导细胞间钙波传递.

1 材料与方法

1.1 BV-2 小胶质细胞的培养

6 孔板内放入厚度为 0.17 mm, 直径为 25 mm 的无菌圆形盖玻片. 经胰酶消化处理的 BV-2 小胶质细胞吹散打匀, 种植于含有 10% 胎牛血清 DMEM 培养基的 6 孔板内, 在 CO₂ 孵箱中培养 24 h, 待细胞稳定贴片后即可用于实验.

* 国家自然科学基金 (11204142), 国家重点基础研究发展计划 (2010CB934101), 高等学校博士学科点专项科研基金 (20110031120004), 国家基础科学人才培养基金 (J1103208) 和高等学校学科创新引智计划 (B07013) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 022-66229610, E-mail: plt@nankai.edu.cn

收稿日期: 2013-04-15, 接受日期: 2013-07-30

1.2 BV-2 小胶质细胞质钙监测

钙荧光探针 Fluo-3 AM 溶于 DMSO, 再用 HBSS 稀释至浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$, 37°C 负载细胞 40 min. 负载结束后再用 HBSS 冲洗 2 次以除去胞外残余的 Fluo-3 AM. 将玻片转移到特制的培养池(含 1 ml HBSS)中, 放置于显微镜载物台以备观察. 荧光成像系统主要由倒置荧光显微镜(蔡司, 型号 Axio observer D1)和电子倍增式电子耦合器件(electron multiplying charge coupled device, EMCCD; 英国 Andor 公司, 型号 DU-897D)组成. 激发波长为 488 nm, 发射波长为 540 nm, 连续采集速度约为 10 帧/秒. 荧光强度变化采用 MetaMorph 7.1 进行感兴趣区域定性分析.

1.3 机械力刺激

使用拉针仪制作的玻璃针对细胞进行机械力刺激. 为了实现微局域刺激, 且避免细胞膜破裂导致

细胞死亡, 玻璃针尖外径控制在 $2 \mu\text{m}$ 左右^[9]. 玻璃针与三维显微操作系统(日本 NARISHIGE 公司, 型号 MMO-202ND)相连, 固定在倒置荧光显微镜上.

2 结 果

2.1 旁分泌介导的胞间钙波传递

利用三维微操作器控制玻璃针, 对稀疏种植培养池中的一个 BV-2 小胶质细胞进行触碰, 如图 1f 白色箭头所示区域. 结果显示机械力刺激引起该细胞胞质钙浓度(cytosolic calcium concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_i$)显著升高, 并进一步诱发周围细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 先后升高(图 1a~e 和视频 1). 计算发现胞间钙波传递速度约为 $15 \mu\text{m/s}$. 由于发生钙波传递细胞间并未全部接触, 则旁分泌途径必然参与介导胞间钙波传递.

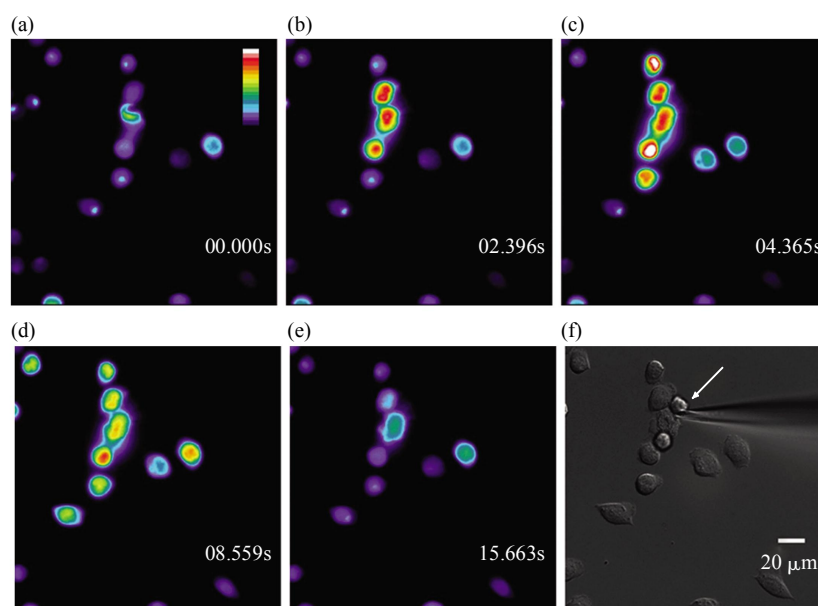


Fig. 1 Mechanical stimulus induces propagations of intercellular calcium waves through paracrine pathway in isolated BV-2 microglial cells

The white arrow represents the region of mechanical stimulus. (a~e) Pseudocolor representations of cytosolic calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were expressed as the emission of Fluo-3 caused by the excitation at 488 nm. The color range was divided in the spectral sequence from high concentration (white) to low concentration (black). (f) The image of BV-2 microglial cells visualized by differential interference contrast microscopy.

2.2 间隙连接介导的胞间钙波传递

在显微镜视野下, 选取细胞密度较大彼此接触的区域, 利用微操作器带动玻璃针尖触碰其中一个细胞, 如图 2a 白色箭头所示区域. 结果显示机械力刺激引起的胞间钙波沿着被触碰细胞向外传递

(图 2a~d 和视频 2). 由于细胞彼此几乎全部接触连接, 则钙波传递有可能是通过间隙连接途径介导的, 但不排除旁分泌途径参与. 为了确定间隙连接是否参与该过程, 选取两个与刺激源细胞成直线且接触的细胞进行 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 监测, 如图 2b 红色方框内

区域. 有趣的是, 如图 2b, e 中所示, 细胞 2 与刺激源细胞较近, 细胞 1 与刺激源细胞较远, 但细胞 1 的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高时间先于细胞 2(图 2f), 与单一的旁分泌途径介导钙波传递的情况不符, 因此, 间隙连接必然参与此钙波传递过程.

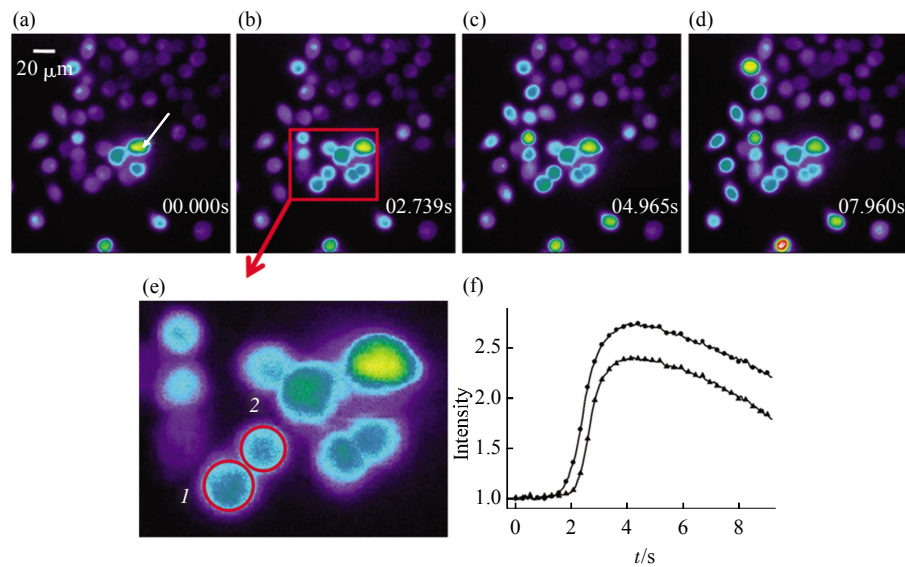


Fig. 2 Gap junction is involved in mechanically-induced intercellular calcium waves in BV-2 microglial cells
The white arrow indicates the region of mechanical stimulus. (a~d) A sequence of pseudocolor images were taken during propagations of intercellular calcium waves. (e) Image is obtained from the red rectangular region. (f) Time-course of $[Ca^{2+}]_i$ changes detected from the two labeled cells exhibiting propagations of intercellular calcium waves. ●—●: Cell 1; ▲—▲: Cell 2.

2.3 TNTs 类似物连接介导的胞间钙波传递

细胞培养过程中, 发现两个 BV-2 小胶质细胞

之间也会形成 TNTs 类似物连接(图 3f 蓝色箭头所示). 使用玻璃针尖(图 3b 白色箭头所示)对其中之

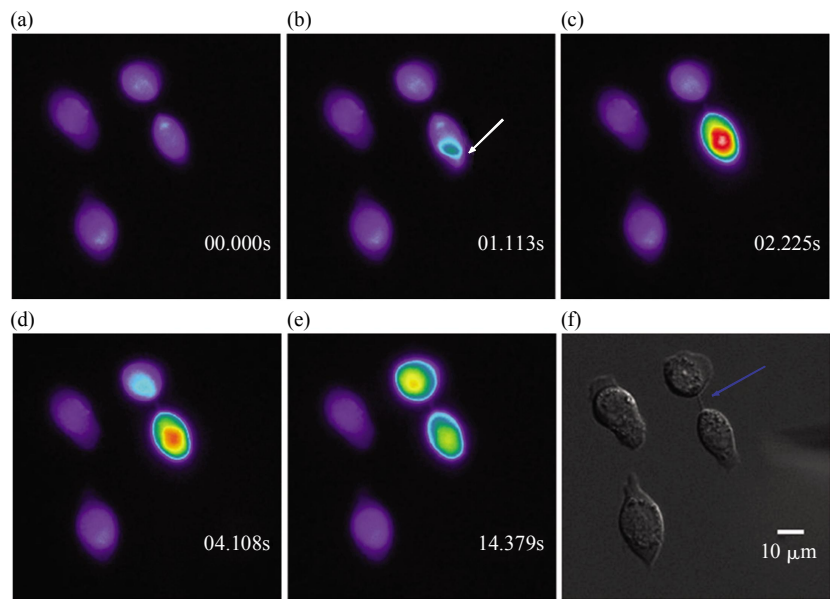


Fig. 3 Active propagation of intercellular calcium wave along a TNTs-like structure which evokes a response in the connected cell

Application of mechanical stimulus (white arrow) to a cell induced a calcium signaling response. (a~e) Pseudocolor images exhibiting the propagation of intercellular calcium wave through a TNTs-like structure. (f) A TNTs-like structure (blue arrow) between two cells was shown by differential interference contrast microscopy.

一进行机械力刺激. 结果显示钙波从被刺激细胞传递到与之相连的另一个细胞中(图 3a~e 和视频 3). 由于左下两个细胞并未发现 $[Ca^{2+}]_i$ 升高现象, 因此可以排除旁分泌途径的参与. 同时 2 个细胞并未接触, 只是通过 TNTs 类似物相连, 因此不难判断此胞间钙波传递是通过 TNTs 类似物连接途径介导的.

3 讨 论

胞间钙波传递是指单个细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高后, 引起周围细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 随之升高, 从而形成传递, 其发生传递机制目前还不完全清楚. 旁分泌作为诱发胞间钙波一种常见机制^[10-11], 主要是通过激素、成长因子、神经传递素等旁分泌分子引起第二信使(如钙)的改变来触发细胞内通讯以及激活信号传导. 目前微局域机械力刺激是研究胞间钙波传递的一个有效方法^[5, 10], 但机械力刺激力度掌控很重要, 如果刺激后细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高后未能降低, 则说明细胞膜破裂, 细胞中的内容物可能分散到周围环境中, 这时观察到的胞间钙传递现象并不是通过旁分泌机制引起的. 控制玻璃针尖大小在 2 μm 左右, 可以有效防止破坏细胞膜^[9]. 本文所有实验结果显示被刺激细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高后都可降低, 说明细胞膜完整, 排除了细胞内容物外泄引起周围细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的可能. 因此, 在 BV-2 小胶质细胞种植密度较小且彼此未接触的情况下, 局域的机械力刺激引发 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 并传递给附近未相连的细胞(图 1), 旁分泌途径必然介导此胞间钙波传递.

此外, 研究表明, 释放 ATP 激活周围细胞的 P2 受体是旁分泌途径介导的胞间钙通讯常见机制之一, 如星形胶质细胞^[26]、胰腺 β 细胞^[27]、人骨髓间充质干细胞^[28]都可通过分泌 ATP 将信息传给其他细胞. 小胶质细胞中存在 P2 受体, ATP 可激活小胶质细胞快速应激反应^[24], 且 P2 受体参与 ATP 介导的星形胶质细胞与小胶质细胞之间的钙通讯^[10]. 判断细胞是否通过分泌 ATP 激活 P2 受体诱导胞间钙波传递, 常规药理学方法之一是预先加入较高浓度的 ATP, 使 P2 受体失敏, 阻断其再对后续 ATP 产生响应^[29]. 因此, 我们用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATP 对 BV-2 小胶质细胞孵育处理 5 min, 此时 P2 受体处于“失敏”状态. 结果显示, 在机械力刺激下, 旁分泌途径介导的钙波传递现象被明显抑制, 不难推测机械力刺激导致的旁分泌因子有 ATP 参与.

间隙连接是相邻细胞形成小孔或通道, 让信号小分子或离子在细胞之间自由通过的地方, 是胞间钙信号传递的主要机制之一^[7, 12]. 间隙连接蛋白(connexin)的抑制剂通常被用来研究观察间隙连接, 如用 0.1 mmol/L 的 gap27 可以特异性阻断间隙连接, 另外, 10 mmol/L 的甘草次酸(α -glycyrrhetic acid)也可以抑制间隙连接机制, 阻断间隙连接机制介导的钙涌入^[21]. 本文中我们换了一个角度讨论钙波传递. 正常情况下, 旁分泌途径介导的细胞钙波传递的空间顺序必然是由近到远(相对刺激源), 然而图 2 红色方框内两个相互接触细胞并不符合这样的规律, 距离源细胞较远的细胞 1 先于距离源细胞较近的细胞 2 的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 与单一的旁分泌途径情况不符. 我们分析认为, 细胞 1 与细胞 2 处于不同的旁分泌响应状态, 源细胞分泌的信号分子虽然先到达细胞 2, 但不足以引起其 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 反而引起后到达的细胞 1 $[Ca^{2+}]_i$ 升高. 由于细胞 1 和 2 彼此相互接触, 存在间隙连接, 细胞 1 $[Ca^{2+}]_i$ 升高再引起细胞 2 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 于是呈现图 2 所观察到空间顺序与时间矛盾的情况. 因此, 间隙连接是参与介导 BV-2 小胶质细胞间钙波传递的. 但此过程中两种介导机制的信号通路不同: 间隙连接介导的胞间钙波可能是通过 IP_3 分子的扩散直接导致的; 而旁分泌介导的胞间钙波的信号通路则更为复杂, 如胞外配体激活 G 蛋白偶联受体, 进而激活磷脂酶 C 产生 IP_3 和 DG, 前者诱导胞内钙升高实现改变传递, 后者可以激活蛋白激酶 C 导致下游事件的发生^[30].

TNTs 连接是新发现的一种可有效介导胞间通讯的机制^[13]. 目前认定 TNTs 的标准主要基于形态学, 随后在很多其他细胞中发现与 TNTs 类似的结构, 有些结构并不完全与 Rostom 等的定义一致, 如有的结构膜并未联通^[20], 有的直径在微米量级^[14], 因此研究者将这些相似结构统称为 TNTs 类似物^[17-19]. 体外培养过程中, 我们发现, 部分 BV-2 小胶质细胞会形成伪足样突出, 少量空间距离较近的细胞伪足样突出会发生两两相连, 形成直径约为 1 μm 连丝(图 3f), 因此称其为 TNTs 类似物. 我们的研究还发现脂多糖激活处理的细胞形态多发生极化而形成伪足样突出, 生成 TNTs 类似物的细胞对数量也相对较多. 分析认为可能跟 BV-2 细胞的状态有关, 激活态的细胞可能更容易形成 TNTs 类似物, 具体原因和机制还需进一步探讨. 本文结果显示, TNTs 类似物连接也可以介导 BV-2 小胶质细

胞间钙波的传递(图 3a~e), 与他人结果类似^[21-22]。但此过程并未激活旁分泌途径(图 3 左下角两个细胞没有变亮), 我们推测是与机械力刺激强度不同有关。在此次实验中, 使用了相对低强度的机械力刺激细胞, 该刺激不能达到使细胞产生旁分泌因子的响应阈值, 导致此过程没有产生旁分泌因子, 则与被刺激细胞空间离散的两个细胞并未发生 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高, 而左上角的细胞与被刺激细胞之间存在 TNTs 类似物连接, 从而实现钙波传递而变亮。

综上所述, 通过对 BV-2 细胞进行机械力刺激引起的胞间钙信号通讯的观察与分析, 发现 BV-2 小胶质细胞间钙波传递可通过旁分泌、间隙连接以及 TNTs 类似物连接三种机制介导。只有结构相同或极其相似的连接小体才能在细胞之间建立间隙连接, 因此间隙连接只能介导彼此接触同种细胞间的信号通讯。而旁分泌机制可介导远程细胞间通讯, 甚至介导不同种类细胞间的通讯, 弥补了间隙连接机制的不足。TNTs 类似物介导相对远程连接的两个细胞间通讯, 仅限制于同种细胞间, 但其不仅可传递钙^[21]等小信号分子, 还可以传播蛋白质、病毒、细胞器等物质^[17, 20]。三种机制的相辅相成, 对于小胶质细胞来说可能更有利于其快速有效地实现免疫防御保护功能。神经组织主要是由星型胶质细胞、小胶质细胞等细胞组成的一个复杂系统^[10], 胞间钙波在其正常行使生理功能起到重要作用, 以前对星型胶质细胞关注较多^[7-11, 15], 而本文对小胶质细胞间钙波传递机制的研究, 可能有益于正确认识并阐明小胶质细胞快速有效保护中枢神经系统的机制。

附件 视频 1~3, 见论文网络版 http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20130007&flag=1

参 考 文 献

- [1] Berridge M J, Bootman M D, Lipp P. Calcium - a life and death signal. *Nature*, 1998, **395**(6703): 645-648
- [2] Berridge M J, Lipp P, Bootman M D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, **1**(1): 11-21
- [3] Leybaert L, Sanderson M J. Intercellular Ca^{2+} waves: mechanisms and function. *Physiol Rev*, 2012, **92**(3): 1359-1392
- [4] Halidi Nadia, Boittin F, Bény J, *et al.* Propagation of fast and slow intercellular Ca^{2+} waves in primary cultured arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 2011, **50**(5): 459-467
- [5] Adachi T, Aonuma Y, Taira K, *et al.* Asymmetric intercellular communication between bone cells: propagation of the calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **389**(3): 495-500
- [6] Charles A C, Kodali S K, Tyndale R F. Intercellular calcium waves in neurons. *Mol Cell Neurosci*, 1996, **7**(5): 337-353
- [7] Giaume C, Venance L. Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*, 1998, **24**(1): 50-64
- [8] Kuchibhotla K V, Lattarulo C R, Hyman B T, *et al.* Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in alzheimer mice. *Science*, 2009, **323**(5918): 1211-1215
- [9] 柳浦青, 竺可青. 星形胶质细胞的兴奋对神经元树突运动的调节机制. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(7): 626-632
- [10] Liu P Q, Zhu K Q. *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(7): 626-632
- [10] Verderio C, Matteoli M. ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *J Immunol*, 2001, **166**(10): 6383-6391
- [11] Hassinger T D, Guthrie P B, Atkinson P B, *et al.* An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(23): 13268-13273
- [12] Schumacher J A, Hsieh Y W, Chen S, *et al.* Intercellular calcium signaling in a gap junction-coupled cell network establishes asymmetric neuronal fates in *C. Elegans*. *Development*, 2012, **139**(22): 4191-4201
- [13] Rustom A, Saffrich R, Markovic I, *et al.* Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, 2004, **303**(5660): 1007-1010
- [14] Önfelt B, Nedvetzki S, Benninger R K, *et al.* Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol*, 2006, **177**(12): 8476-8483.
- [15] Zhu D, Tan K S, Zhang X, *et al.* peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *J Cell Sci*, 2005, **118**(Pt 16): 3695-3703
- [16] Koyanagi M, Brandes R P, Haendeler J, *et al.* Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes?. *Circ Res*, 2005, **96**(10): 1039-1041
- [17] Gurke S, Barroso J F V, Hodneland E, *et al.* Tunneling nanotube (TNT)-like structures facilitate a constitutive, actomyosin-dependent exchange of endocytic organelles between normal rat kidney cells. *Exper Cell Res*, 2008, **314**(20): 3669-3683
- [18] Gurke S, Barroso J F V, Gerds H. The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochem Cell Biol*, 2008, **129**(5): 539-550
- [19] Gerdes H H, Bukoreshtliev N V, Barroso J F. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett*, 2007, **581**(11): 2194-2201
- [20] Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, *et al.* Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol*, 2008, **10**(2): 211-219
- [21] Smith I F, Shuai J, Parker I. Active generation and propagation of Ca^{2+} signals within tunneling membrane nanotubes. *Biophysical J*, 2011, **100**(8): L37-L39

- [22] Watkins S C, Salter R D. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity*, 2005, **23**(3): 309–318
- [23] Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science*, 2005, **308**(5726): 1314–1318
- [24] Davalos D, Grutzendler J, Yang G, *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci*, 2005, **8**(6): 752–758
- [25] Petrova T V, Akama K T, Van Eldik L J. Selective modulation of BV-2 microglial activation by prostaglandin E-2 - Differential effects on endotoxin-stimulated cytokine induction. *J Biol Chem*, 1999, **274**(40): 28823–28827
- [26] Guthrie P B, Knappenberger J, Segal M, *et al.* ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neuroscience*, 1999, **19**(2): 520–528
- [27] Hellman B, Dansk H, Grapengiesser E. Pancreatic beta-cells communicate *via* intermittent release of ATP. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*, 2004, **286**(5): E759–E765
- [28] Kawano S, Otsu K, Kuruma A, *et al.* ATP autocrine/paracrine signaling induces calcium oscillations and NFAT activation in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium*, 2006, **39**(4): 313–324
- [29] Pascual O, Casper K B, Kubera C, *et al.* Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*, 2005, **310**(5745): 113–116
- [30] Jorgensen N R, Henriksen Z, Brot C, *et al.* Human osteoblastic cells propagate intercellular calcium signals by two different mechanisms. *J Bone Miner Res*, 2000, **15**(6): 1024–1032

Multi-Pathways-Mediated Propagations of Intercellular Calcium Waves in Microglial Cells*

WU Xian, PAN Lei-Ting**, LIU Ying, XING Meng-Xi, ZHANG Xin-Zheng, XU Jing-Jun

(The Key Laboratory of Weak-Light Nonlinear Photonics, Ministry of Education, School of Physics and TEDA Applied Physics Institute, Nankai University, Tianjin 300457, China)

Abstract In the present work, we applied mechanical stimulus to study the propagations of intercellular calcium waves among BV-2 microglial cells by the fast fluorescence microscopy imaging system *in vitro*. The results showed that calcium signaling responded to mechanical stimulus and propagated to neighboring cells in isolated BV-2 microglial cells, suggesting that the paracrine pathway mediated intercellular calcium waves. Further data indicated that gap junction was involved in mechanically-induced intercellular calcium waves when the cells had physical contact with each other. More importantly, tunneling nanotubes (TNTs)-like structure between BV-2 microglial cells was found *in vitro* and mediated the propagation of intercellular calcium wave. Taken together, our studies demonstrated that three distinct pathways, including paracrine, gap junction and TNTs-like structures, could mediate the intercellular calcium waves in BV-2 microglial cells.

Key words BV-2 microglial cells, intercellular calcium waves, gap junction, paracrine, TNTs-like structure

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00007

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (11204142), The National Basic Research Program of China (2010CB934101), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (New Teachers) (20110031120004), The National Science Fund for Talent Training in Basic Sciences (1103208) and 111 Project (B07013).

**Corresponding author.

Tel: 86-22-66229610, E-mail: plt@nankai.edu.cn

Received: April 15, 2013 Accepted: July 30, 2013