

水稻新基因 *OsRwp34* 在大肠杆菌中表达的毒害作用

陈志军, 李辉, 朱英国, 李阳生*

(植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要: 在水稻高温诱导 cDNA 文库中克隆了一个新的水稻基因 *OsRwp34*, 同源性分析表明 *OsRwp34* 是一典型的孤儿基因。为了研究 *OsRwp34* 的功能, 构建了 *OsRwp34* 的表达载体 pET-28(a) *OsRwp34*, 并转化大肠杆菌菌株 BL21(DE3), 用 IPTG 诱导并定时从培养液中取样以检测 OD600 值和用平板记数法测定活菌数, 结果发现在诱导 30 min 后宿主菌开始大量死亡, 表明 *OsRwp34* 的表达产物使宿主菌死亡。随后构建了 1 个 N 末端缺失 15 个氨基酸残基和 2 个 C 末端分别缺失 12 和 47 个氨基酸残基的 *OsRwp34* 缺失体, IPTG 诱导后都没有出现毒性作用, 推测 N 和 C 末端氨基酸残基的同时存在是 *OsRwp34* 的毒性作用所必须的。其详细机理有待进一步研究。

关键词: 水稻; *OsRwp34*; 孤儿基因; 毒性蛋白; 缺失体

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)01-0017-05

OsRwp34, a New Rice Gene Which Expresses a Toxic Product to *E. coli* Growth

CHEN Zhi-Jun, LI Hui, ZHU Ying-Guo, LI Yang-Sheng*

(Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: *OsRwp34* was isolated in a cDNA library which was constructed from rice (*Oryza sativa*) seedling under high temperature (45°C) stress. In order to study the function of *OsRwp34*, we constructed an expression vector pET-28(a) *OsRwp34* which included *OsRwp34* gene and transformed it into the *E. coli* strain BL21(DE3). The bacteria was incubated in LB medium and induced by IPTG, and the host bacteria was found to be dying rapidly in 30 min through the OD600 monitor and quantitative plating. The result suggested that the expression product of *OsRwp34* caused the death of the bacteria. Continuously, three deletion mutants, one of them deleted 15 aa of N terminate, the other two deleted 12 aa and 47 aa of C terminate respectively, were constructed. But the toxic effect to the bacteria growth was not found after the induction of IPTG. It indicates that the exist of both N and C terminates are necessary for the toxic effect of *OsRwp34*. A further study will be required on the toxic mechanism of *OsRwp34*.

Key words: *Oryza sativa*; *OsRwp34*; Orphan gene; Toxic protein; Deletion mutants

随着基因组全序列的完成和公布, 重要基因功能的鉴定已经成为当前研究的主要方向和竞争目标, 建立高效、准确的研究方法将为重要基因的克隆奠定坚实的基础。克隆和鉴定基因的研究方法较多, 归纳起来可分为两类, 即: 正向遗传学 (forward genetics, 从一个突变体的表型开始, 研究其“基因是什么”) 和反向遗传学 (reverse genetics, 从一个基因的序列开始, 研究引起什么样的表型改变)。终极目的都是为了克隆、鉴定重要基因, 为更好地阐述生命活动的奥秘和利用这些基因。在水稻高温诱导 cDNA 文库的构建和测序过程中, 我们发现一个新的水稻基因 *OsRwp34*, 同源性分析表明 *OsRwp34* 没

有同源基因, 也没有保守的功能结构域, 为一典型的孤儿基因。孤儿基因的研究方法就是要综合各种实验手段去发现它的功能, 更多的是利用反向遗传学的方法。为研究它在水稻中的功能, 我们构建了 pET-28(a) *OsRwp34* 重组表达质粒, 以期望在原核细胞中表达 *OsRwp34* 蛋白制备抗体作为研究工具。结果发现重组菌株在 IPTG 的诱导下, 细菌的生长受到强烈抑制, 进一步测定诱导过程中的 OD 值和活菌数的实验, 说明 *OsRwp34* 是一细菌毒性蛋白。为阐明 *OsRwp34* 的毒性机理, 进一步利用该基因, 我们构建了 3 个缺失突变体做缺失突变分析, 确定 *OsRwp34* 的 N 和 C 末端是维持蛋白毒性必不可少的。

收稿日期: 2005-07-05, 修回日期: 2005-08-05。

基金项目: 国家 973 计划项目 (2001CB1008-05); 国家 863 计划项目 (2002AA207001) 资助。

作者简介: 陈志军 (1971-), 男, 汉族, 湖北人, 硕士。研究方向为植物遗传学。李阳生 (1963-), 男, 汉族, 湖南人, 教授, 研究方向为植物遗传学。

* 通讯作者 (E-mail: yangshengl@yahoo.com.cn)。

1 材料与方法

1.1 测序和序列分析

水稻高温诱导 cDNA 文库是由本实验室构建, cDNA 克隆送交中科开瑞生物技术有限公司测序, 用 BLASTN 在 NCBI、EMBL-EBI、RPG 数据库中进行核酸同源性比较, 用 GENERUNR、ORF finder 分析开放阅读框, 用 BLASTP、FASTA3 在 NCBI、EMBL-EBI、RPG 数据库中搜索蛋白同源序列, 用 SAPS、SOSUI、HMMTOP^[1,2]、PSORT II 分析蛋白的结构和功能。

1.2 pET-28(a) OsRwp34 的重组表达质粒的构建

1.2.1 PCR 引物设计 5' 端引物: 5' ATATAC-CATGGATCAACTGTTCTCCTG 3'; 3' 端引物: 5' CTT-GTCGACTGGTAGGTACAAATTC 3'。在 5' 和 3' 端引物分别引入 *Nco* I 酶切位点和 *Sal* I 酶切位点。

1.2.2 PCR 扩增 以噬菌体克隆 P34 为模板进行 PCR 扩增 *OsRwp34* 的 ORF。反应体积 20 μ L: 2.0 μ L 10 $\times$ PCR buffer、1.0 μ L dNTPs Mixture (2.5 mmol/L each)、10 μ mol/L 的 5' 端和 3' 端引物各 0.5 μ L、1 U Taq 酶 (PROMEGA 公司)、模板为 2 μ L 噬菌体原液。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 26 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 质粒的制备、限制性酶切、片段的连接、连接产物的转化、酶切鉴定 均按照文献[3]进行。

1.2.4 重组质粒的构建 PCR 产物用 *Nco* I 和 *Sal* I 酶切后与同样用 *Nco* I、*Sal* I 酶切后的质粒 pET (28a) 产物连接, 连接后转化菌株 *DH5 α* , 在含卡那霉素 (35 μ g/mL) 的 LB 平板上筛选阳性菌株, 并用菌落 PCR 方法和抽提质粒后酶切鉴定阳性菌株, 最后委托上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司测序验证。

1.2.5 重组质粒的筛选 用阳性重组子的质粒转化表达宿主菌株 BL21 (DE3), 在含卡那霉素 (35 μ g/mL) 的平板上筛选阳性菌落, 用菌落 PCR 方法鉴定阳性菌落。

1.3 诱导表达和检测

在含 35 μ g/mL 卡那霉素的 50 mL LB 培养基中接入一新鲜重组的 BL21 (DE3) pET-28(a) *OsRwp34* 单菌落, 250 r/min 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 4 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 沉淀细菌, 弃上清后用 50 mL LB 培养液重悬细菌。取 5 mL 接种到 250 mL 三角瓶中, 每瓶装 50 mL 含 35 μ g/mL 卡那霉素 LB 培养基, 250 r/min 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 2 h 后, 用 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达,

同时用不加 IPTG 的 BL21 (DE3) pET-28(a) 作为对照 1, 用 0.5 mmol/L IPTG 诱导 BL21 (DE3) pET-28(a) 作为对照 2, 定时取 1 mL 菌液测定 OD600 值和用平板记数法^[4]测定活菌数目。

1.4 缺失体的构建、诱导表达和检测

1.4.1 PCR 引物设计 缺失体 I 5' 端引物: 5' ATA TAC CAT GG A TC A AG C TG C TA T TT T TG 3'; 缺失体 I 3' 端引物: 5' CTT GTC GAC TGG TAG GTA CAA ATT C 3'。在 5' 和 3' 端引物分别引入 *Nco* I 酶切位点和 *Sal* I 酶切位点。缺失 *OsRwp34* 的 1-15 氨基酸残基。缺失体 II 5' 端引物: 5' ATA TAC CAT GGA TCA ACT GTT CCT G 3'; 缺失体 II 3' 端引物: 5' TGG TGC TCG AGC AAG ATC TTT GC A CT G 3'。在 5' 和 3' 端引物分别引入 *Nco* I 酶切位点 *Xho* I 酶切位点。缺失 *OsRwp34* 的 78-125 氨基酸残基。缺失体 III 5' 端引物: 5' ATA TAC CAT GGA TCA ACT GTT CCT G 3'; 缺失体 III 3' 端引物: 5' AGCTT-GTCGACGAGGAAGGTTCCG ACG 3'。在 5' 和 3' 端引物分别引入 *Nco* I 酶切位点和 *Sal* I 酶切位点。缺失 *OsRwp34* 的 114-125 氨基酸残基。3 种缺失体的缺失部分见图 1。

1.4.2 缺失体的构建和筛选 参照 1.2.2、1.2.3、1.2.4、1.2.5 的方法进行。

1.4.3 诱导表达和检测 在含 35 μ g/mL 卡那霉素的 50 mL LB 培养基中分别接入 I、II、III 新鲜单菌落, 250 r/min 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 4 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 沉淀细菌, 弃上清后用 50 mL LB 培养液重悬细菌。分别取 5 mL 接种到 3 个 250 mL 三角瓶中, 每瓶装 50 mL 含 35 μ g/mL 卡那霉素 LB 培养基, 250 r/min 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 2 h 后, 用 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达, 同时用 0.5 mmol/L IPTG 诱导 BL21 (DE3) pET-28(a) 作为对照 1, 用 0.5 mmol/L IPTG 诱导 BL21 (DE3) pET-28(a) *OsRwp34* 作为对照 2, 定时从培养液中取 1 mL 培养液测定 OD600 值。

2 结果与分析

2.1 *OsRwp34* cDNA 片段的分离和测序

经过对文库测序, 得到一个孤儿基因 *OsRwp34*, cDNA 全长 659 bp (已向 GeneBank 提交, 登陆号 AY723295), 全长序列见图 1。

2.2 *OsRwp34* 的同源性分析

在 NCBI、EMBL、MIPS、RPG 数据库中用 Blast 搜索, 发现 *OsRwp34* cDNA 和 P0463G11、P0463D04 序列相似性为 100%, 与 Contig3080、Contig1388 相

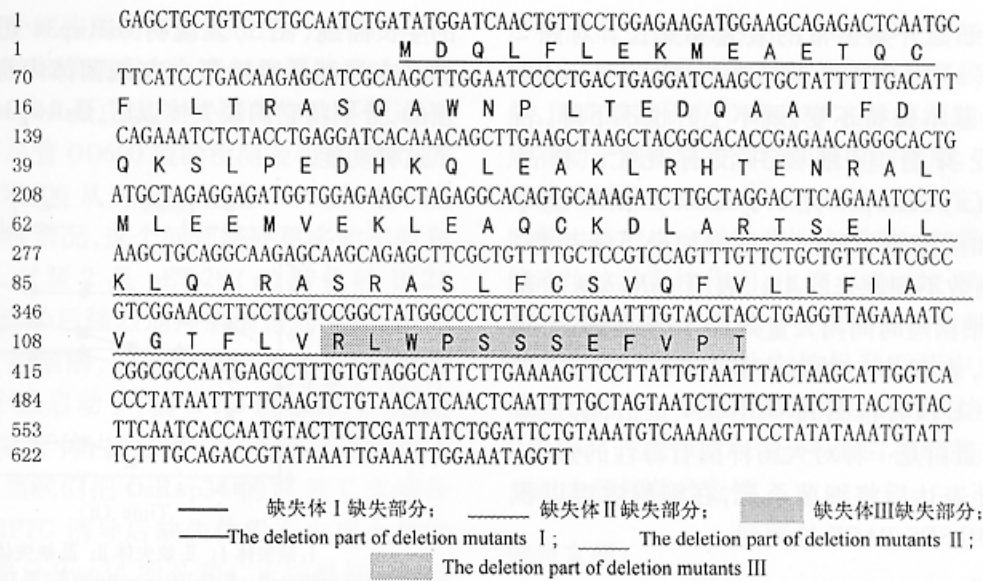


图 1 全长 *OsRwp34* cDNA 序列和蛋白序列
Fig. 1 The full-length *OsRwp34* cDNA sequence and protein sequence

似性为 99%。P0463G11、P0463D04 是 *Oryza sativa* nipponbare (GA3) 基因组 PAC 文库当中的 PAC 克隆,位于同一 Contig 中,定位于 *Oryza sativa* nipponbare (GA3) 第 9 号染色体 68.2 cM 处,包含 RFLP 标记 C846,为单拷贝。Contig3080、Contig1388 来源于 *Oryza sativa indica* (9311) 的基因组序列,*OsRwp34* 在 *Oryza sativa indica* (9311) 中为两个拷贝。

在 EMBL、RPG 搜索 EST 序列,发现 *OsRwp34* cDNA 和 3 个水稻的 EST 序列 BM420537、CB648697、CA754590 相似性在 95% 以上,其中两个来自 *japonica* cultivar-group,一个来自 *Oryza sativa*,但这 3 个 EST 序列都不包含 *OsRwp34* 的全长序列,并且没有注释。BLAST 也没有找到其他物种有 *OsRwp34* 的同源片段。

用 GENERUNR 和 ORF finder 分析发现 *OsRwp34* 包含一 378 bp 的开放阅读框,没有 intron,ORF 编码一个 125 个氨基酸的多肽。用 BLASTP 分析蛋白的结构和同源性,发现它没有保守的功能结构域,但和一个功能未知的水稻蛋白的相似性为 64%。发现 *OsRwp34* 不属于任何一个基因家族和基因超家族。因此 *OsRwp34* 为一孤儿基因^[5]。用 SOSUI 软件分析 *OsRwp34* 蛋白为一可溶蛋白,等电点为 5.19;用 HMMTOP 软件分析发现 *OsRwp34* C 端 94-113 氨基酸组成一个跨膜的疏水性螺旋结构,N 端位于细胞基质;用 PSORT II 软件分析 *OsRwp34* 定位于内质网的概率为 66.7%。

2.3 pET(28a) *OsRwp34* 表达载体的构建

PCR 产物用 *Nco* I 和 *Sal* I 酶切后与同样用 *Nco*

I、*Sal* I 酶切后的质粒 pET-28(a) 产物连接后转化菌株 *DH5α*,在含卡那霉素 (35 μg/mL) 的 LB 平板上筛选阳性菌株,并用菌落 PCR 方法选。抽提质粒后酶切鉴定阳性菌株 (图 2),并由上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司测序验证无误。

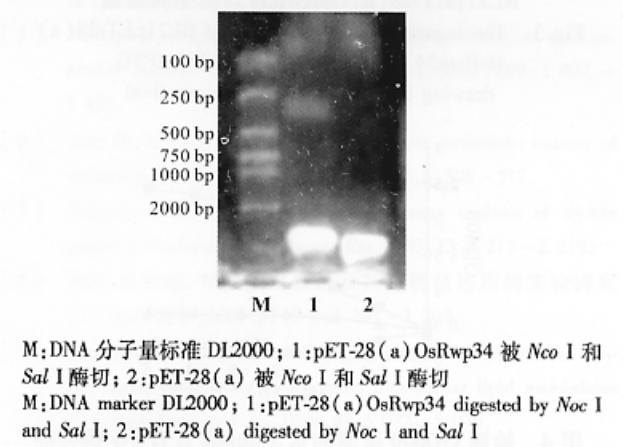


图 2 pET-28(a) *OsRwp34* 双酶切验证
Fig. 2 Identification of pET-28(a) *OsRwp34* by the two enzyme digestion

2.4 *OsRwp34* 在大肠杆菌中的表达产物引起宿主死亡,是一种对宿主菌有毒的毒蛋白

将重组质粒 pET-28(a) *OsRwp34* 转化表达宿主菌株 BL21 (DE3),用 0.5 mmol/L IPTG 诱导并测量生长过程中培养液的 OD600 值,同时用平板记数法统计培养过程中活菌数的变化。

从图 3 和图 4 中我们可以看到:对照 1 的 OD600 和活菌数目从 0~4 h 随时间的增加呈上升趋势,直到 4 h 后才有下降趋势,而这是由于细菌浓

度达饱和后细菌开始正常的衰老和死亡。对照 2 BL21pET-28(a) 的 OD600 和活菌数在 0.5 mmol/L IPTG 诱导后基本保持不变,既不上升也不下降,表现为生长受抑制,但细菌并没有死亡。样品 BL21pET-28(a) OsRwp34 用 0.5 mmol/L IPTG 诱导时,OD600 和活菌数目随时间的增加呈下降趋势,0.5 h 后活菌数不到原来的 4%,表明 *OsRwp34* 的表达产物引起细菌短时间内大量死亡,细胞崩解,引起 OD600 下降,表现为一种对大肠杆菌有毒性的蛋白。SDS-PAGE 没有检测到 *OsRwp34* 蛋白,这是因为 *OsRwp34* 蛋白是一种对大肠杆菌有毒性的蛋白,被 IPTG 诱导表达后将细菌杀死,在细胞内难以积累以至无法用 SDS-PAGE 检测到。

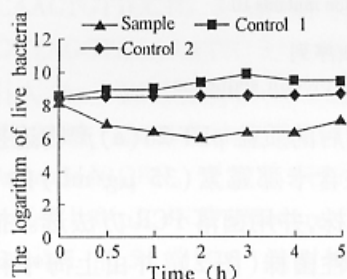


图3 用平板计数法绘制的 0.5 mmol/L IPTG 诱导的 BL21pET-28(a) *OsRwp34* 对数生长曲线

Fig. 3 The logarithmic growth curve of BL21pET-28(a) *OsRwp34* induced by 0.5 mmol/L IPTG drawing by quantitative plating method

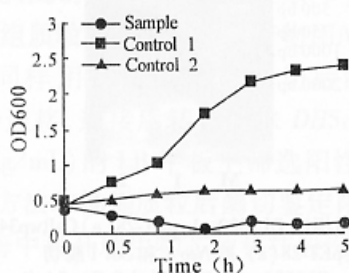


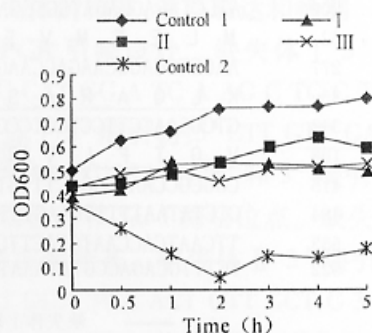
图4 检测 OD600 绘制的 0.5 mmol/L IPTG 诱导的 BL21pET-28(a) *OsRwp34* 生长曲线

Fig. 4 The growth curve of BL21pET-28(a) *OsRwp34* induced by 0.5 mmol/L IPTG drawing by the OD600 monitor method

2.5 *OsRwp34* 缺失体分析表明 *OsRwp34* 蛋白的 N 末端和 C 末端的同时存在是维持蛋白毒性不可缺少的

3 个突变体构建完成后,经 PCR 筛选和测序鉴定读码框正确无误,重组菌株用 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达,通过测定 OD600 来分析 *OsRwp34* 蛋白的毒性功能结构。结果发现 3 个突变体在经过 IPTG 诱导后细菌的数目都没有下降,表现和对照 1 一样

的生长曲线(图 5)。说明 *OsRwp34* 蛋白的 N 末端和 C 末端都是维持蛋白在细菌体内毒性功能所必须的,分别将它们缺失掉以后,*OsRwp34* 蛋白就失去了这种功能。



I:缺失体 I; II:缺失体 II; III:缺失体 III
I: Deletion mutants I; II: Deletion mutants II; III: Deletion mutants III

图5 0.5 mmol/L IPTG 诱导的 3 个缺失体的生长曲线
Fig. 5 The growth curve of the three deletion mutations induced by 0.5 mmol/L IPTG

3 讨论

“孤儿基因”是指根据已有知识,还未了解其功能和生物学意义的基因。酵母基因组的全序列测完以后,人们发现酵母当中 40% 蛋白是功能未知的,在 GENE database 中没有同源蛋白,不属于任何基因家族和基因超家族,人们将它们形象的称为孤儿基因。对于孤儿基因,大多数学者认为它们不是执行基本生命活动的基因,因而承受的进化压力小,是一类进化速度很快的基因,以至在亲缘关系非常近的物种之间有非常大的差异^[6]。同时由于孤儿基因不属于任何一个家族和超基因家族,使得阐明孤儿基因功能变得非常困难^[7]。

pET-28(a) 是诱导表达型质粒,表达产物形成包涵体,对宿主菌表面结构影响小,该质粒 T7 启动子下游有 T7lac 操纵子。lacE 可作用于宿主菌上 lacUV5 启动子,阻遏 T7RNA 聚合酶转录,同时也作用于 T7lac 操纵子,阻断重组质粒上目的基因被任何形式 T7RNA 聚合酶转录,这样有毒性的基因在 T7lac 载体上就会稳定。当加入诱导剂如 IPTG 时,阻遏蛋白和 IPTG 结合后脱离操纵子,启动目的基因的表达。为了研究 *OsRwp34* 的功能,我们构建了表达型质粒 pET-28(a) *OsRwp34* 并转化大肠杆菌菌株 BL21 (DE3)。当我们用 0.5 mmol/L IPTG 诱导重组菌株时,发现细菌在 30 min 内大量死亡,活菌数目只有处理前的 4%,而未经 IPTG 诱导的对照活菌数目在 30 min 内增加了一倍,这说明 *OsRwp34* 蛋

白使细菌在一个细胞周期内大量死亡。是 *OsRwp34* 蛋白毒性太强使细菌细胞在一个细胞周期的时间内死亡还是 *OsRwp34* 蛋白表达使细菌细胞不能通过细胞周期呢? 尽管 OD600 值的检测表明在 IPTG 诱导 30 min 后 OD600 从 0.366 降到 0.238, 但也不能说明是属于哪种情况, 这个问题需要更多的实验和数据来解答。对照 2 是 pET-28(a) 转化的 BL21(DE3), IPTG 诱导后强烈地抑制细菌的生长, 但细菌并没有死亡和崩解, 活菌数维持不变, 这是因为 T7 启动子是个强启动子, 被 IPTG 诱导后, T7 启动子启动的合成占了体内的 70% 以上, 这样就抑制了细菌的生长。当我们把 *OsRwp34* 的 N 和 C 末端分别缺失掉, 经 IPTG 诱导后缺失体没有出现大量的死亡事件, 说明 *OsRwp34* 的 N 和 C 末端都是维持毒性作用所不可缺少的。

很多真核基因在原核中表达的时候往往产生毒性, 如白细胞介素 2、人 B 淋巴细胞表面标志物 CD19^[8], 各种来源于真核细胞中的抗菌肽等, 这种毒性产生的原因不是完全清楚, 其中在抗菌肽方面前人做了很多工作, 但仍然存在争议。Christensen^[9] 认为抗菌肽通过静电作用被吸引到膜表面, 然后疏水尾巴插入细胞膜中的疏水区域, 通过改变膜的构象, 多个抗菌肽聚合在膜上形成离子通道, 造成物质泄漏和细菌死亡。Lockey^[10] 观察到天蚕素 (cecropin) A 结合到大肠杆菌膜上, 形成一个 916 nm 直径的病灶, 形成的孔洞直径 412 nm, 孔洞导致细胞内容物外泄, 细菌死亡。而 Silvestro^[11] 研究发现天蚕素 A 在低浓度时可改变脂质体的膜电化学离子梯度, 同样浓度下也可改变革兰氏阴性菌的膜离子梯度, 但在更高浓度下才会引起细胞内容物的释放。所以他认为天蚕素 A 是通过改变膜离子梯度来杀死细菌的。Park^[12] 却发现蛙的一种抗菌肽 buforin 与昆虫抗菌肽的抗菌机理不同, 没有裂解细胞膜, 而是穿过膜, 结合到 DNA、RNA 上, 快速导致细菌死亡。而 *OsRwp34* 蛋白和这些抗菌肽一样也有一个跨膜的疏水螺旋结构, 暗示 *OsRwp34* 蛋白也是通过作用于细胞膜而导致细胞死亡, 其详细机理有待进一步的研究。

我们将其在原核中表达的目的只是得到蛋白以制备抗体, 但在表达过程中却发现 *OsRwp34* 的表达

产物使宿主菌大量死亡, *OsRwp34* 蛋白在原核细胞内的这种生理作用可能暗示着它在真核细胞中的功能, 因此继续研究 *OsRwp34* 在原核细胞中的毒理作用有助于阐明它在真核细胞中的作用。*OsRwp34* 的毒性作用是在细胞内表达观察到的, 它是不是在细胞外也能产生这样的毒性作用呢? 如果在细胞外也能产生这种毒性作用, 也许 *OsRwp34* 可以作为一种新的抗原提高水稻对一些水稻细菌性病害的抗性, 也有作为一种抗菌肽在植保和医药中应用的可能性。我们下一步就是要选择合适的表达系统来表达 *OsRwp34*, 以研究 *OsRwp34* 蛋白在细胞外是否能产生对大肠杆菌的毒性。

参考文献:

- [1] Tusnady G E, Simon I. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction[J]. *J Mol Biol*, 1998, **283**: 489 - 506.
- [2] Tusnady G E, Simon I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server[J]. *Bioinformatics*, 2001, **17**: 849 - 850.
- [3] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1 - 488.
- [4] 曹渊泽, 董国雄. 兽医微生物学与免疫学实验技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992. 54 - 57.
- [5] Philippe B, Pierre R, Marie F S. Orphan gene finding: an exon assembly approach[J]. *Theor Comput Sci*, 2003, **290**: 1 407 - 1 431.
- [6] Alex M, Lisa K, Siv A. Microbial genome evolution: sources of variability[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2002, **5**: 506 - 512.
- [7] Tomislav D L, Diethard T. An evolutionary analysis of orphan genes in *Drosophila*[J]. *Genome Res*, 2003, **13**: 2 213 - 2 219.
- [8] 朱旦, 蒋纪恺. 毒性蛋白表达及其工程菌选用的实验研究[J]. *重庆医学*, 2003, **32**(9): 1 201 - 1 203.
- [9] Christensen B. Channel forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, **85**: 5 072 - 5 076.
- [10] Lockey T D. Formation of pores in *Escherichia coli* cell membranes by a cecropin isolated from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae[J]. *Eur J Biochem*, 1996, **236**(1): 263 - 271.
- [11] Silvestro L. The concentration-dependent membrane activity of cecropin A[J]. *Biochemistry*, 1997, **36**(38): 11 452 - 11 460.
- [12] Park C B. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions[J]. *Biochem Biophys Res Co*, 1998, **244**(1): 253 - 257.