

利用 LightCycler 研究食管鳞状细胞癌与 *MTHFR* C677T 多态性的关系

张健慧* 李 琰 郭 炜 王 瑞¹⁾ M. SARBIA²⁾ S. KIEL²⁾
温登瑰 魏丽珍 陈志峰 何 明¹⁾ 邝 钢 张立玮¹⁾ 吴明利¹⁾ 王士杰¹⁾
(河北省肿瘤研究所, 石家庄 050011)

摘要 亚甲基四氢叶酸还原酶 (*MTHFR*) 在叶酸代谢中起重要作用. *MTHFR* 基因第 677 位核苷酸的多态性 (C→T) 能影响其酶活性并与肿瘤易感性有关. 为比较中国北方人群 *MTHFR* C677T 多态性与食管鳞状细胞癌 (ESCC) 易感性之间的关系, 通过高速实时聚合酶链反应 (real-time PCR) 和解链曲线 (melting curve) 方法分析了 189 名 ESCC 患者和 141 名健康对照的 *MTHFR* C677T 多态性位点的基因型. 结果显示, 健康对照组的 *MTHFR* C/C (纯合野生)、C/T 和 T/T (纯合突变) 基因型的频率分别为 17.7%、38.3% 和 44.0%. ESCC 患者的 T/T 基因型频率 (42.3%) 与健康对照组无显著差异 ($\chi^2 = 0.089$, $P > 0.05$), 其 C/T 基因型频率 (49.2%) 仅略高于对照组 ($\chi^2 = 3.890$, $P < 0.05$), 而患者组的 C/C 基因型频率 (8.5%) 显著低于健康对照组 (17.7%) ($\chi^2 = 6.37$, $P = 0.012$). 与 C/T 和 T/T 基因型相比, C/C 基因型可显著降低 ESCC 的发病风险 (相对风险度的比值比 (OR) = 0.43, 95% 可信区间 (CI) = 0.22~0.84), 在吸烟者和有上消化道肿瘤家族史的患者中这一倾向更加明显. 研究提示, 在中国北方人群中, *MTHFR* C677T 纯合野生基因型对 ESCC 的发病起保护作用.

关键词 食管鳞状细胞癌, 亚甲基四氢叶酸还原酶, 多态性, 肿瘤易感性

学科分类号 R394.3

DNA 甲基化异常与癌基因活化和抑癌基因失活有关. 叶酸缺乏可引起 DNA 甲基化的异常并影响损伤 DNA 的修复, 从而导致肿瘤的发生. 亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*) 是叶酸代谢中的关键酶之一. *MTHFR* 可催化 5,10-亚甲基四氢叶酸还原为 5-亚甲基四氢叶酸. 后者作为叶酸在血浆中存在的主要形式, 参与同型半胱氨酸转化为 S-腺苷甲硫氨酸的过程. 而 S-腺苷甲硫氨酸可作为甲基供体, 在机体代谢的 DNA 甲基化过程中起重要作用^[1]. *MTHFR* 基因在人群中具有多态性, 其第 677 位核苷酸 C→T 的单核苷酸置换可导致丙氨酸突变为缬氨酸而影响酶的活性^[2]. 纯合突变基因型 (T/T) 编码蛋白的酶活性仅相当于纯合野生基因型 (C/C) 的 30%, 而杂合基因型 (C/T) 编码蛋白的酶活性则相当于 C/C 编码酶活性的 65%^[1]. 此 C677T 多态性与一些肿瘤如恶性淋巴瘤^[3]、卵巢癌^[4]和结直肠癌^[5]的易感性有关.

一般认为, 食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 主要由环境致癌因素如酗酒、吸烟、营养缺乏、食管损伤、环境及饮食中的亚硝胺等引起^[6~9], 但越来越多的证据显示, 环境危险因素和遗传因素的相互作用可促进食

管癌的发生. 流行病学研究表明, 发展中国家的食管癌发病风险与叶酸缺乏有关^[9,10]. 由于 *MTHFR* 在叶酸代谢中的重要作用, 本研究应用实时荧光 PCR-解链曲线分析方法, 观察了中国北方人的 ESCC 易感性与 *MTHFR* C677T 多态性的关系.

1 材料和方法

1.1 研究对象

189 例患者为于 2001 年 9 月至 2002 年 7 月在河北医科大学第四医院住院治疗的 ESCC 患者, 所有患者经该院病理科组织学证实; 141 例对照为河北医科大学第四医院、河北省肿瘤研究所健康志愿者和河北省血站健康献血员. 所有患者及健康对照来自石家庄市或相邻县市并均为汉族. ESCC 患者的年龄、性别、吸烟状态、家族史等资料来自住院病历; 健康对照组的以上信息于采血后由 2 名研究人员询问并记录. 现吸烟或曾吸烟每天 5 支以上并持续 2 年以上者被定义为吸烟个体. 家族中 1 名以

* 通讯联系人.

¹⁾ 河北医科大学第四医院, 石家庄 050011

²⁾ Institute of Pathology, University of Duesseldorf

Tel: 0311-6033511, Fax: 0311-6077634

E-mail: jianhui2002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-11-25, 接受日期: 2003-02-28

上一级亲属和/或 2 名以上二级亲属患食管癌/贲门癌/胃癌者被定义为上消化道肿瘤 (upper gastrointestinal cancers, UGIC) 家族史阳性。

1.2 标本采集及外周血单个核细胞 DNA 提取

所有研究个体均采集静脉血 5 ml, 经枸橼酸钠抗凝, 置 4℃ 保存, 并于采血后 1 周内, 以蛋白酶 K 消化-饱和氯化钠盐析法^[11] 提取外周血单个核细胞染色体 DNA。

1.3 *MTHFR* C677T 多态性位点基因分型

MTHFR 基因型检测应用 LightCycler 仪 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 采用实时荧光聚合酶链反应 (real-time fluorescence PCR) 和解链曲线 (melting curve) 分析方法进行。该方法在 30 min 左右可完成对 48 份标本的基因分型, 并具有特异性强、操作中模板污染可能性小等优点。PCR 反应体积为 20 μ l, 其中模板 DNA 100 ng, LightCycler-DNA 杂交混合液 2 μ l, MgCl₂ 1.5 mmol/L, *MTHFR* 上游引物 (5'-CG-AAGCAGGGAGCTTTGAGGCTG-3') 和下游引物 (5'-AGGACGGTGC GG TGAGAGTG-3') 各 0.25 μ mol, 荧光标记的 *MTHFR* 杂交探针

(TGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGCTGTC-F 及 LCRed640-CGGGAGCCGATTTCATCAT-P) 0.2 μ mol。PCR 反应液加入 LightCycler 仪专用毛细管, 按文献 [12] 的反应程序进行扩增, 并根据解链曲线进行 *MTHFR* 基因型判定。如图 1a 所示, 较低解链温度 (50℃) 者为纯合突变基因型, 较高解链温度 (60℃) 者为纯合野生基因型, 双峰者则为杂合基因型^[13]。

为进行基因型检测的质量控制, 随机选取 30% 经 LightCycler 分析的样本进行了聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性 (PCR-RFLP) 分析。从毛细管中取出 8 μ l PCR 产物转移到 1.5 ml 管中, 以 20 U 的 *Hinf*I 酶 (Boehringer, Mannheim, Germany) 于 37℃ 酶切 3 h 后进行 2.5% 的琼脂糖电泳, 紫外灯下观察结果。由于 *MTHFR* 基因第 677 位核苷酸由 C 置换为 T 之后产生了特异的 *Hinf*I 酶切位点, 无 *Hinf*I 位点的野生型等位基因显示为 233 bp 的 PCR 产物片段, 而突变型等位基因经 *Hinf*I 消化后产生 176 bp 和 57 bp 的 DNA 片段 (图 1b)。由 PCR-RFLP 方法检测结果与 LightCycler 方法有 100% 的吻合性。

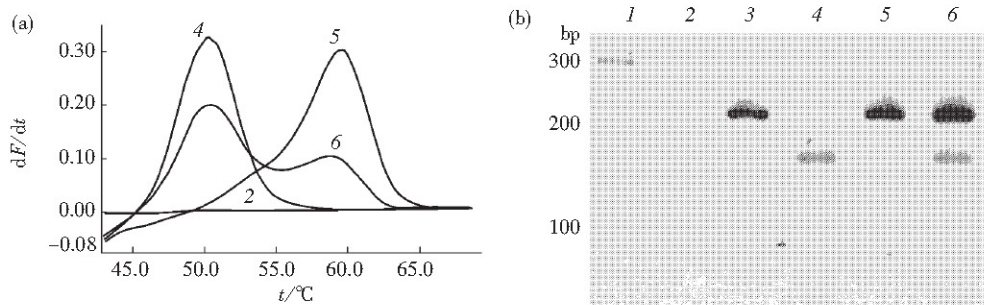


Fig. 1 The *MTHFR* C677T genotyping by LightCycler analysis and PCR-*Hinf*I digestion

(a) DNAs were amplified with *MTHFR*-specific primers in glass capillaries (LightCycler) and fluorescence was monitored using *MTHFR*-specific hybridization probes. The melting peaks were converted by plotting the negative derivative of the fluorescence with respect to temperature ($-dF/dt$) against temperature. (b) The *MTHFR* PCR products were digested with *Hinf*I restriction enzyme and subjected to electrophoresis on 2.5% agarose gel. 1: 100 bp DNA molecular marker; 2: negative control (H_2O instead of DNA template); 3: *MTHFR* fragment amplified by PCR; 4: homozygous mutant genotype (T/T); 5: homozygous wild type (C/C); 6: heterozygous genotype (C/T).

1.4 统计学分析

经比较基因型频率的观察值与预期值并进行卡方检验进行 Hardy-Weinberg 平衡分析。患者组与对照组的 *MTHFR* 基因型分布比较采用四格表卡方检验。以非条件 Logistic 回归法计算表示相对风险度的比值比 (odds ratio, OR) 及其 95% 可信区间 (confidence interval, CI)。数据统计分析采用 SPSS 软件包 (10.0 版) 进行。

2 结 果

2.1 研究对象特征

ESCC 患者组中男性 131 例, 女性 58 例, 年龄分布为 38~72 岁; 健康对照组中男性 95 例, 女性 46 例, 年龄分布为 33~67 岁。两组间的性别、年龄构成比无显著差异 ($P > 0.05$)。ESCC 患者组的吸烟者比例 (54.0%) 与健康对照组 (51.1%)

相比也无显著性差异 ($P>0.05$). 86 名 (45.5%) ESCC 患者呈 UGIC 家族史阳性, 而所有健康对照个体均无 UGIC 家族史.

2.2 MTHFR C677T 多态性分布

所有 DNA 标本均经实时荧光 PCR 成功地进行 *MTHFR* C677T 的基因型分析. 对照组及 ESCC 患者组的 *MTHFR* 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P>0.05$). 对照组及 ESCC 组中的基因型分布均与年龄、性别无关, 健康对照组中吸烟者与非吸烟者的基因型分布也无显著性差异 ($P>0.05$).

2.3 纯合野生基因型可降低 ESCC 的发病风险

健康对照组的 C/C、C/T 和 T/T 基因型频率分别为 17.7%、38.3% 和 44.0%. ESCC 患者组的 C/C、C/T 和 T/T 基因型频率分别为 8.5%、49.2% 和 42.3%, 与对照组的 *MTHFR* C677T 基因型分布相比有显著性差异 ($P<0.05$). *MTHFR* C677T 野生型 (C) 及突变型 (T) 等位基因频率在健康对照组与 ESCC 患者组中分别为 36.9%, 63.1% 及 32.8%, 67.2%, 两组间等位基因分布无显著性差异 ($P>0.05$).

如表 1 所示, ESCC 患者组 *MTHFR* T/T 的基因型频率与健康对照相似 ($P>0.05$), 其 C/T 基因型频率略高于对照组 ($P<0.05$), 而患者组的 C/C 基因型频率显著低于健康对照组 ($P<0.05$). 与 C/T 和 T/T 基因型相比, *MTHFR*

C/C 基因型可显著降低 ESCC 的发病风险 (经年龄、性别、吸烟状况校正后的 $OR=0.43$, 95% $CI=0.22\sim0.84$).

虽然在 ESCC 患者中 *MTHFR* C677T C/T 基因型频率略高于健康对照组, 但据个体吸烟状况进行的分层分析表明 (表 1), 吸烟患者与非吸烟患者的 C/T 基因型频率与相应对照组相比均无显著性差异 ($P>0.05$). 虽然非吸烟 ESCC 患者的 C/C 基因型频率 (9.2%) 低于非吸烟健康对照 (17.4%), 但差异未达统计学意义 ($P>0.05$). 而 ESCC 吸烟患者中的 C/C 基因型频率 (7.8%) 与健康吸烟者 (18.1%) 相比有显著性差异 ($P<0.05$). 进一步分析表明, 与 C/T 和 T/T 基因型相比, *MTHFR* C677T C/C 基因型可明显降低吸烟者 ESCC 的发病风险 (经年龄和性别校正后 $OR=0.26$, 95% $CI=0.09\sim0.77$), 且在非吸烟者中显示出相同趋势 (经年龄和性别校正后 $OR=0.49$, 95% $CI=0.20\sim1.19$).

为比较 UGIC 家族史对 ESCC 易感性与 *MTHFR* C677T 多态性关系的影响, 我们根据 ESCC 患者 UGIC 家族史的有无进行了分层分析. 由表 1 可见, UGIC 家族史阳性患者的 *MTHFR* C/C 基因型频率 (7.0%) 显著低于对照组 ($P<0.05$), 在无 UGIC 家族史的肿瘤患者中 C/C 基因型频率 (9.7%) 也低于对照组, 但统计学无显著性意义 ($P>0.05$). 与 C/T 及 T/T 基因型相

Table 1 Distribution of MTHFR C677T genotype among ESCC patients and healthy controls

Group	MTHFR genotype			aOR (95%CI) ¹⁾
	n (T/T) (%)	n (C/T) (%)	n (C/C) (%)	
Healthy controls	62 (44.0)	54 (38.3)	25 (17.7)	
Smoker	31 (43.0)	28 (38.9)	13 (18.1)	
Non-smoker	31 (44.9)	26 (37.7)	12 (17.4)	
ESCC patients	80 (42.3)	93 (49.2) ²⁾	16 (8.5) ³⁾	0.43 (0.22~0.84)
Smoker	40 (39.2)	54 (53.0)	8 (7.8) ⁴⁾	0.26 (0.09~0.77)
Non-smoker	40 (46.0)	39 (44.8)	8 (9.2)	0.49 (0.20~1.19)
Familial history of UGIC				
Positive	37 (43.0)	43 (50.0)	6 (7.0) ⁵⁾	0.36 (0.14~0.90)
Negative	45 (43.7)	48 (46.6)	10 (9.7)	0.68 (0.38~1.23)

ESCC; esophageal squamous cell carcinoma; MTHFR; methylenetetrahydrofolate reductase. UGIC; upper gastrointestinal cancer. n (%); number of individuals (percentage in each group). ¹⁾ The adjusted relative risk of the C/C genotype for ESCC development against the combination of the C/T and T/T genotypes. ²⁾ The marginal difference of the C/T genotype frequency between ESCC patients and healthy controls ($\chi^2=3.89$, $P=0.049$). ^{3),4),5)} The significant difference of the C/C genotype frequency in ESCC patients and health controls, ³⁾ $\chi^2=6.37$, $P=0.012$; ⁴⁾ $\chi^2=4.15$, $P=0.042$; ⁵⁾ $\chi^2=5.24$, $P=0.022$.

比,有 UGIC 家族史的 ESCC 患者中 C/C 基因型可明显降低 ESCC 的发病风险(经年龄、性别和吸烟状况校正后 $OR=0.36$, $95\% CI=0.14\sim0.90$),而在无 UGIC 家族史的肿瘤患者中此关联性虽无显著性意义,但存在相同的趋势(经年龄、性别和吸烟状况校正后 $OR=0.68$, $95\% CI=0.24\sim1.23$).

3 讨 论

本研究显示,与纯合突变基因型及杂合基因型相比, *MTHFR* C677T 的纯合野生基因型可降低中国北方人 ESCC 的发病风险,提示此基因型可能对 ESCC 的发生起保护作用. 此保护作用似乎与个体的吸烟状态及上消化道肿瘤的家族史无明显关系,因为分层分析表明, C/C 基因型的保护作用仅在吸烟人群及 UGIC 家族史阳性群体中有显著意义,但在非吸烟及无 UGIC 家族史人群中也有相同趋势. 为明确 *MTHFR* C/C 基因型的保护作用与吸烟状态及 UGIC 家族史的关系,尚需扩大标本量进行研究. 另外,由于 *MTHFR* 在叶酸代谢中起重要作用,而本研究缺乏相关个体的叶酸摄入及体内叶酸水平的资料,故无法明确叶酸、*MTHFR* 基因型及 ESCC 发病之间的相互关系. *MTHFR* 纯合野生基因型在 ESCC 发病中的保护作用可能直接与此基因型编码蛋白的较强酶活力有关. 由于 *MTHFR* C677T 杂合子及突变纯合子携带个体的 *MTHFR* 酶活力仅分别为纯合野生基因型的 65% 及 30%,且此酶的热稳定性也相应降低^[1],因此,相对于杂合子及突变纯合子携带个体来说,纯合野生基因型携带者可能会通过保证肿瘤相关基因的正常甲基化和损伤 DNA 的正常修复而具有生物学优势.

与 Song 等^[13]的最近报道不同,本研究结果不支持 *MTHFR* C677T 突变等位基因可增加对 ESCC 的易感性. 他们的研究结果显示,与纯合野生基因型相比, *MTHFR* 纯合突变基因型可使中国北方人对 ESCC 的发病风险增加 6 倍. 此分歧产生的主要原因为两健康对照组的 *MTHFR* 纯合突变基因型频率有显著差异(在本研究为 44.0%, Song 等的研究为 17.2%),而 ESCC 患者的纯合突变基因型频率相似(本研究为 42.3%, Song 等^[13]的研究为 38.8%). 有趣的是,在 Song 等^[13]的研究中, ESCC 患者的 *MTHFR* C677T 纯合野生基因型的频率(12.0%)比对照组低将近 35%,提示在他们的研究群体中,纯合野生基因型也可能对

ESCC 的发生起保护作用. 由于本研究的对照组选自与患者来源地区相同的健康个体,其基因型分布未偏离 Hardy-weinberg 平衡,由 LightCycler 基因分型的结果与 PCR-RFLP 方法有很好的吻合性,因此可基本排除系统误差导致的基因型分布偏性. 健康人群基因型分布的差异可能主要由于本研究与 Song 等研究的对照群体来源不同所致. 这种分歧进一步提示基于人群的病例-对照研究的重要性.

MTHFR C677T 纯合突变基因型与一些肿瘤的发病风险增加有关^[3~5,14,15],且依赖于叶酸的摄入^[14]或血浆中的叶酸水平^[15],而体内充足的叶酸可弥补 *MTHFR* 酶活性的不足^[4],因此,增加叶酸的摄入量可能弥补由携带 *MTHFR* C677T 突变等位基因导致的肿瘤发病风险的增加. 本研究虽未提示 *MTHFR* 突变等位基因与 ESCC 发病风险有关,但对照组中携带该纯合突变基因型的个体比例较高,提示此人群患叶酸缺乏相关肿瘤的危险性可能较大. 本研究人群来自石家庄市及相邻市县,由于此地区 ESCC、贲门癌等上消化道肿瘤的发病率较高,此人群中增加叶酸的摄入量显得尤为重要.

参 考 文 献

- 1 Bailey L B, Gregory J F. Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes; metabolic significance, risk and impact on folate requirement. *J Nutr*, 1999, **129** (5): 919~922
- 2 Goyette P, Sumner J S, Milos R, *et al.* Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping, and mutation identification. *Nat Genet*, 1994, **7** (2): 551~554
- 3 Matsuo K, Suzuki R, Hamajima N, *et al.* Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood*, 2001, **97** (10): 3205~3209
- 4 Gershoni-Baruch R, Dagan E, Israeli D, *et al.* Association of the C677T polymorphism in the *MTHFR* gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women. *Eur J Cancer*, 2000, **36** (18): 2313~2316
- 5 Kiyohara C. Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of colorectal cancer. *J Epidemiol*, 2000, **10** (5): 349~360
- 6 Launoy G, Milan C H, Faivre J, *et al.* Alcohol, tobacco and oesophageal cancer: effects of the duration of consumption, mean intake and current and former consumption. *Br J Cancer*, 1997, **75** (9): 1389~1396
- 7 Yang C S. Vitamin nutrition and gastroesophageal cancer. *J Nutr*, 2000, **130** (2S Suppl): 338S~339S
- 8 Ghadirian P, Vobecky J, Vobecky J S. Factors associated with cancer of the oesophagus: an overview. *Cancer Detect Prev*, 1988, **11** (3~6): 225~234
- 9 Yokokawa Y, Ohta S, Hou J, *et al.* Ecological study on the risks of esophageal cancer in Ci-Xian, China: the importance of nutritional status and the use of well water. *Int J Cancer*, 1999,

- 83 (5): 620~624
- 10 Prasad M P R, Krishna T P, Pasricha S, *et al.* Esophageal cancer and diet: a case-control study. *Nutr Cancer*, 1992, **18** (1): 85~93
 - 11 Miller S A, Dybes D D, Polesky H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*, 1988, **16** (3): 1215
 - 12 Aslanidis C, Nauck M, Schmitz G. High-speed prothrombin G $\rightarrow$ A 20210 and the methylenetetrahydrofolate reductase C $\rightarrow$ T 677 mutation detection using real-time fluorescence PCR and melting curves. *Biotechniques*, 1999, **27** (2): 234~238
 - 13 Song C, Xing D, Tan W, *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res*, 2001, **61** (8): 3272~3275
 - 14 Piyathilake C J, Macaluso M, Johanning G, *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increase the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res*, 2000, **20** (3A): 1751~1758
 - 15 Levine A J, Siegmund K D, Ervin C M, *et al.* The methylenetetrahydrofolate reductase 677 C $\rightarrow$ T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol & Biomark Prev*, 2000, **9** (7): 657~663

The Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Esophageal Squamous Cell Carcinoma Analyzed by LightCycler

ZHANG Jian-Hui*, LI Yan, GUO Wei, WANG Rui¹⁾, M. SARBIA²⁾, S. KIEL²⁾,
WEN Deng-Gui, WEI Li-Zhen, CHEN Zhi-Feng, HE Ming¹⁾,
KUANG Gang, ZHANG Li-Wei¹⁾, WU Ming-Li¹⁾, WANG Shi-Jie¹⁾

(Hebei Cancer Institute, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is one of the important enzymes involved in folate metabolism. A single (C $\rightarrow$ T) substitution at nucleotide 677 of *MTHFR* gene influences the enzyme activity and is correlated with susceptibility to several tumour types. In order to compare the association of the *MTHFR* C677T polymorphism with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in a Northern Chinese population, high-speed real-time PCR and melting curve analysis were used. The *MTHFR* C677T genotypes were determined in 189 patients with ESCC and 141 unrelated healthy controls. The results showed that the *MTHFR* C677T C/C, C/T and T/T genotype frequencies among healthy controls were 17.7%, 38.3%, and 44.0%, respectively. There was no significant difference in *MTHFR* T/T genotype frequency between ESCC patients (42.3%) and healthy controls ($\chi^2 = 0.089$, $P > 0.05$) whereas the C/T genotype frequency among ESCC patient (49.2%) was only slightly higher than that among healthy controls ($\chi^2 = 3.890$, $P < 0.05$). However, the frequency of the C/C genotype among ESCC patients (8.5%) was significantly lower than that among healthy controls (17.7%) ($\chi^2 = 6.37$, $P < 0.05$). The C/C genotype significantly reduced the risk for developing ESCC compared to the combination of the C/T and T/T genotypes ($OR = 0.43$, 95% $CI = 0.22 \sim 0.84$). The reduced risk was more evident among smokers and patients with family history of upper gastrointestinal cancers. It can be concluded that the *MTHFR* C677T homozygous wild type may play a protective role in the ESCC development in the Northern Chinese population.

Key words esophageal squamous cell carcinoma, methylenetetrahydrofolate reductase, polymorphism, tumor susceptibility

* Corresponding author.

¹⁾ The Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

²⁾ Institute of Pathology, University of Duesseldorf

Tel: 86-311-6033511, Fax: 86-311-6077634, E-mail: jianhuizh2002@yahoo.com.cn

Received: November 25, 2002 Accepted: February 28, 2003