

E1A 激活基因阻遏子过表达诱导体外培养大鼠平滑肌细胞分化*

韩雅玲^{1)**} 闫承慧¹⁾ 刘海伟¹⁾ 胡叶¹⁾ 康建¹⁾ 王效增¹⁾ 李少华²⁾

(¹⁾ 沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科, 沈阳 110016;

(²⁾ Department of Pathology, Robert Wood Johnson Medical School, New Jersey 08854, USA)

摘要 为探讨 E1A 激活基因阻遏子蛋白 (CREG) 对血管平滑肌细胞表型转换的调控机制, 应用 pRC/CMV-hCREG 真核表达载体转染体外培养的大鼠血管平滑肌细胞 (VSMCs), 观察了转染前后细胞的表型改变。结果发现, pRC/CMV-hCREG 质粒转染后, 大鼠平滑肌细胞增殖受抑, 细胞分化标志蛋白 SM α -actin 表达显著增加。免疫共沉淀分析发现, CREG 与血清反应因子 (SRF) 发生相互作用形成复合体, 在 CREG 基因过表达时, 与 CREG 结合的 SRF 蛋白增加。凝胶迁移阻滞分析 (GSM) 和抗体凝胶迁移阻滞分析 (supershift) 显示, 过表达的 CREG 蛋白与 SRF 蛋白共同结合到 SM α -actin 基因启动子区 CarG 位点上, 可能参与 SM α -actin 表达的调控。构建 SM α -actin promoter- pCAT[®] 3 报告基因载体并与 pRC/CMV-hCREG 质粒共转染 VSMCs 也证实, CREG 蛋白过表达可增强 SM α -actin 基因表达。上述研究提示, CREG 蛋白可能是调控 VSMCs 表型转换的重要分子。

关键词 CarG, 阻遏蛋白, E1A, 表型, 细胞, 血管平滑肌, 大鼠

学科分类号 Q555.7, R34

血管损伤后平滑肌细胞 (SMCs) 由分化表型转换为去分化表型是导致细胞增殖和迁移的起始步骤, 也是增生性血管疾病的共同病理基础^[1]。血管平滑肌细胞 (VSMCs) 增殖迁移能力的获得与 VSMCs 表型转换密切相关。E1A 激活基因阻遏子 (cellular repressor of E1A-stimulated genes, CREG) 是一个新近克隆的转录调控相关基因。它可直接与腺病毒 E1A 蛋白和转录因子 E2F 竞争结合靶基因的启动子区, 阻遏它们对靶基因的转录调控^[2]。有研究表明^[3], CREG mRNA 在成熟分化的组织细胞中广泛表达, 但在去分化的鼠胚胎干细胞和人畸胎瘤细胞系中表达较低, 提示 CREG 蛋白表达与组织或细胞的分化状态密切相关。本室研究发现^[4], 去血清能够诱导体外培养的人 VSMCs 从合成表型逆转为分化表型, 同时 CREG 蛋白表达明显增加。但是, 作为一个转录调控相关基因, CREG 蛋白是否参与 VSMCs 表型转换调控? 目前尚无相关研究报道。本研究用 pRC/CMV-CREG 真核表达载体瞬时转染原代培养大鼠 VSMCs, 观察 CREG 蛋白过表达与 VSMCs 表型转换的关系, 探讨 CREG 蛋白调控 VSMCs 表型转换的机制, 以期进一步阐明 VSMCs 表型调控的分子机理。

1 材料和方法

1.1 材料

原代培养大鼠腹主动脉平滑肌细胞模型由本室建立。E1A 激活基因真核表达载体 pRC/CMV-hCREG 由 Gill 博士惠赠。兔抗人 CREG 蛋白抗血清由本研究室刘海伟博士制备。蛋白质印迹 (Western blot), 化学发光试剂 (ECL, RPN2106) 和 HRP 标记第二抗体购自 Amersham 公司。平滑肌 α -肌动蛋白 (SM- α -actin) 单抗, 血清反应因子 (SRF) 单抗购自 Santa Cruz 公司。DMEM 和小牛血清 (FCS) 购自 GIBCO BRL 公司。³²P-ATP 购自北京福瑞生物工程公司。CarG * I, CarG * II 寡核苷酸由上海生工生物工程公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠平滑肌细胞原代培养: 取体重 200 g 左右 SD 大鼠, 分离腹主动脉, 撕去动脉内膜, 将中膜纵轴剪碎成小块, 常规胶原酶消化法原代培养

* 国家自然科学基金资助项目 (30070280)。

** 通讯联系人。

Tel: 024-23056238, Fax: 024-23922184

E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

收稿日期: 2004-07-01, 接受日期: 2004-08-30

大鼠血管平滑肌细胞. 细胞培养条件为含 10% FCS 的 DMEM 培养基, 37℃, 5% CO₂ 恒温培养.

1.2.2 hCREG 基因转染: 原代培养大鼠 VSMCs 贴壁生长到培养瓶底面积 50 % 时, 磷酸钙沉淀法转染 pRC/CMV-hCREG 和 pRC/CMV-GFP 真核表达载体, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 20 h 后, 弃去转染试剂, 加入含 10% FCS 的 DMEM 培养基继续培养 72 h, 收获转染细胞或进行指标检测.

1.2.3 细胞增殖分析: a. 细胞计数. 24 孔平底板中每孔加入 1×10^4 个 pRC/CMV-CREG、pRC/CMV-GFP 瞬时转染细胞和正常 VSMCs, 于 1、3、5~13 天取每种细胞各两个复孔, 台盼蓝染色计数活细胞数, 绘制细胞生长曲线. b. BrdU 掺入实验.

6 孔板中每孔分别加入 1×10^4 个 pRC/CMV-CREG、pRC/CMV-GFP 瞬时转染细胞和正常 VSMCs, 每组细胞平行做两个复孔. 细胞贴壁后换液, 加入 10 g/L BrdU, 37℃ 孵育 2 h, Hanks 液洗 3 次, 进行常规免疫组化, DAB 染色后, 显微镜下观察细胞核着色情况. 每孔计数 10 个视野, 计算着色细胞比例.

1.2.4 免疫组化分析: 细胞接种于盖玻片上生长至对数生长期, 用冷却的 PBS 缓冲液洗 3 次, 4% 冷多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1% Triton X-100 溶液通透细胞 15 min, PBS 缓冲液洗 3 次, 5% 山羊血清封闭 30 min. 加入抗 SM α -actin 抗体和抗 CREG 抗体 (1:100), 4℃ 过夜. PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的 IgG 抗体 (1:100), 室温 2 h, PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 每次 5 min, DAB 显色 10 min. 封片, 光镜观察, 不加一抗做阴性对照.

1.2.5 蛋白质印迹分析: 按文献 [5] 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、转膜、抗体结合及显色. 分离胶浓度为 12%, 一抗分别为抗 SM α -actin 单抗和抗 CREG 抗血清. 经 HRP 标记的二抗孵育后, 按 ECL 试剂盒说明书进行曝光.

1.2.6 免疫共沉淀分析: 将全细胞提取物加入事先与抗 CREG 抗体孵育的 Protein A Sepharose B 珠中, 室温孵育 1.5 h, 用 TBS 缓冲液洗 3 次, 95℃ 变性 10 min, 离心 5 min 使沉淀的蛋白质分离, 12% SDS-PAGE 电泳后, 蛋白质印迹检测目标蛋白和 SRF 蛋白表达.

1.2.7 凝胶迁移阻滞分析 (GMSA) 和抗体凝胶

迁移阻滞分析 (supershift): 细胞核蛋白的分离方法同文献 [6]. 二可辛酸比色法 (BCA) 检测核蛋白浓度. 4 μ g 细胞核提取物和 50 pmol ³²P 标记 CArG * I, CArG * II 探针室温分别连接 15 min. 6% PAGE, 180 V, 电泳 3 h, 干胶, -70℃ X 光片曝光 24 h. Supershift 分析: 在细胞核提取物中分别加入 2 μ g 抗 SRF 抗体和抗 CREG 抗体, 室温孵育 20 min 后与上述标记探针进行连接反应. 6% PAGE, 180 V, 电泳 3 h, 干胶, -70℃ X 光片曝光 24 h 检测反应产物. CArG * I 序列: 5' GGC-TGCGCGGGACCATATTTAGTCAGGG 3'; CArG * II 序列: 5' GCGCCTGG CCTTTTGGGTTGTCTCCG-GC 3'.

1.2.8 SM α -actin promoter-pCAT® 3 构建和 pRC/CMV-hCREG 共转染: PCR 扩增带有 *Mlu* I 和 *Xho* I 位点的 SM α -actin 基因启动子区片段 1 486 bp, 将扩增产物插入 pCAT® 3 报告基因载体. 引物序列和反应条件如下: 上游引物 5' ACGCGTGA-ACAGCTGGTCATGG 3'; 下游引物 5' CTCTGAG-TTACCCTGACAGTGCTTGG 3'. 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 90 s, 40 个循环; 72℃ 10 min. 应用磷酸钙沉淀法共转染 SM α -actin promoter-pCAT® 3 和 pRC/CMV-CREG 于大鼠 VSMCs, 72 h 收获细胞, 5 × CAT 裂解液提取蛋白, 蛋白质印迹检测 CAT 蛋白表达.

2 结 果

2.1 CREG 基因转染诱导 VSMCs 表型改变

pRC/CMV-hCREG 基因转染后原代培养大鼠 VSMCs 形态明显改变. 正常大鼠原代 VSMCs 为多边形, 少数呈梭形, 细胞体积较大. pRC/CMV-CREG 基因转染后细胞变长为长梭形, 细胞体积减小并呈多层重叠排列, 细胞环绕出现明显的管腔样生长趋势. pRC/CMV-GFP 基因转染组与正常细胞比较无明显的形态改变 (图 1).

2.2 CREG 基因过表达抑制 VSMCs 细胞增殖

细胞计数实验发现, 与 pRC/CMV-GFP 转染组和正常 VSMCs 比较, pRC/CMV-CREG 转染组细胞生长明显受抑. 同时 BrdU 掺入实验也提示, pRC/CMV-CREG 转染组细胞内 DNA 合成能力明显下降 (图 2).

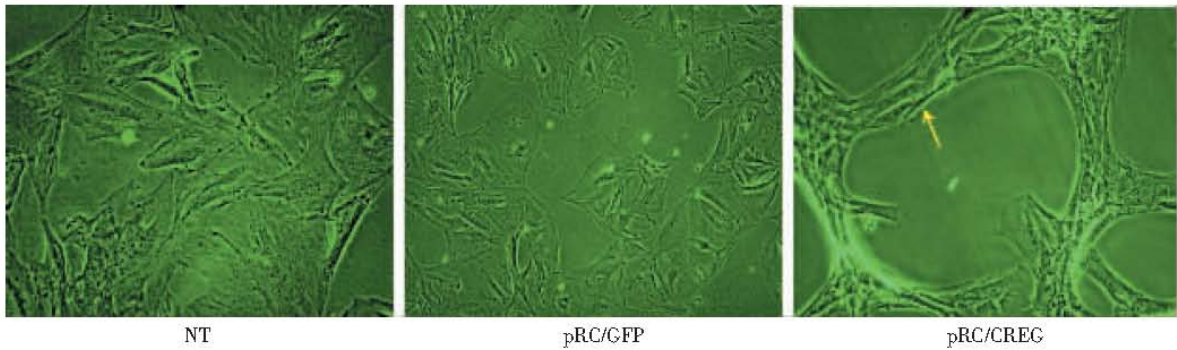


Fig. 1 Phase-contrast photomicrographs of rat primary VSMCs before and after transfection

NT: Normal VSMCs in DMEM with 10% FCS; pRC/GFP: Cells with pRC/CMV-GFP plasmid transfection; pRC/CREG: Cells with pRC/CMV-hCREG plasmid transfection. Magnification is 400, yellow arrow heads to the edge of the tube-like structure.

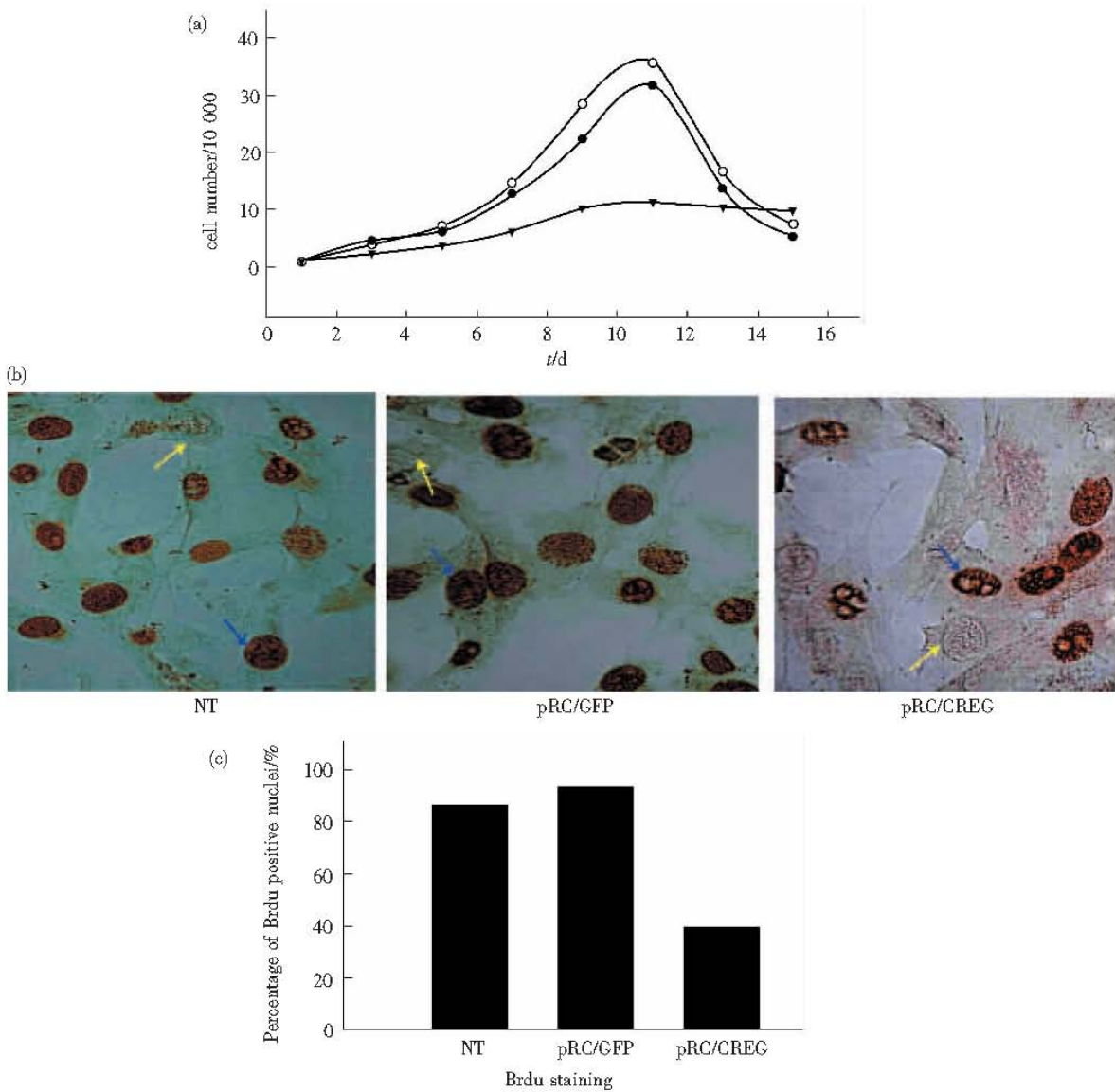


Fig. 2 Effected of CREG protein overexpression on VSMCs proliferation

(a) Cell count analysis. Normal VSMCs and pRC/CMV-GFP control group were incubated in DMEM with 10 % FCS after 4 days, during which time they initiated logarithmic growth. After transfected with pRC/CMV-hCREG plasmid, rat VSMCs proliferation was inhibited obviously. ●—●: NT; ○—○: pRC/GFP; ▼—▼: pRC/CREG. (b) The study of DNA production with BrdU incorporation. The rate of DNA synthesis in VSMCs was decreased after overexpression of CREG protein contrast with normal cells and GFP transfected group. Yellow arrows head to the negative cells with BrdU staining, blue arrows head to the positive cells with BrdU staining. (c) The rate of staining positive cells were analyzed by cell counting.

2.3 CREG 基因转染诱导 VSMCs 分化标志基因表达改变

免疫组化和蛋白质印迹检测发现, CREG 基因

过表达后, 原代培养大鼠平滑肌细胞中 CREG、SM α -actin 基因表达均明显增加, 同时 CREG 蛋白表达由核周向细胞核迁移 (图 3).

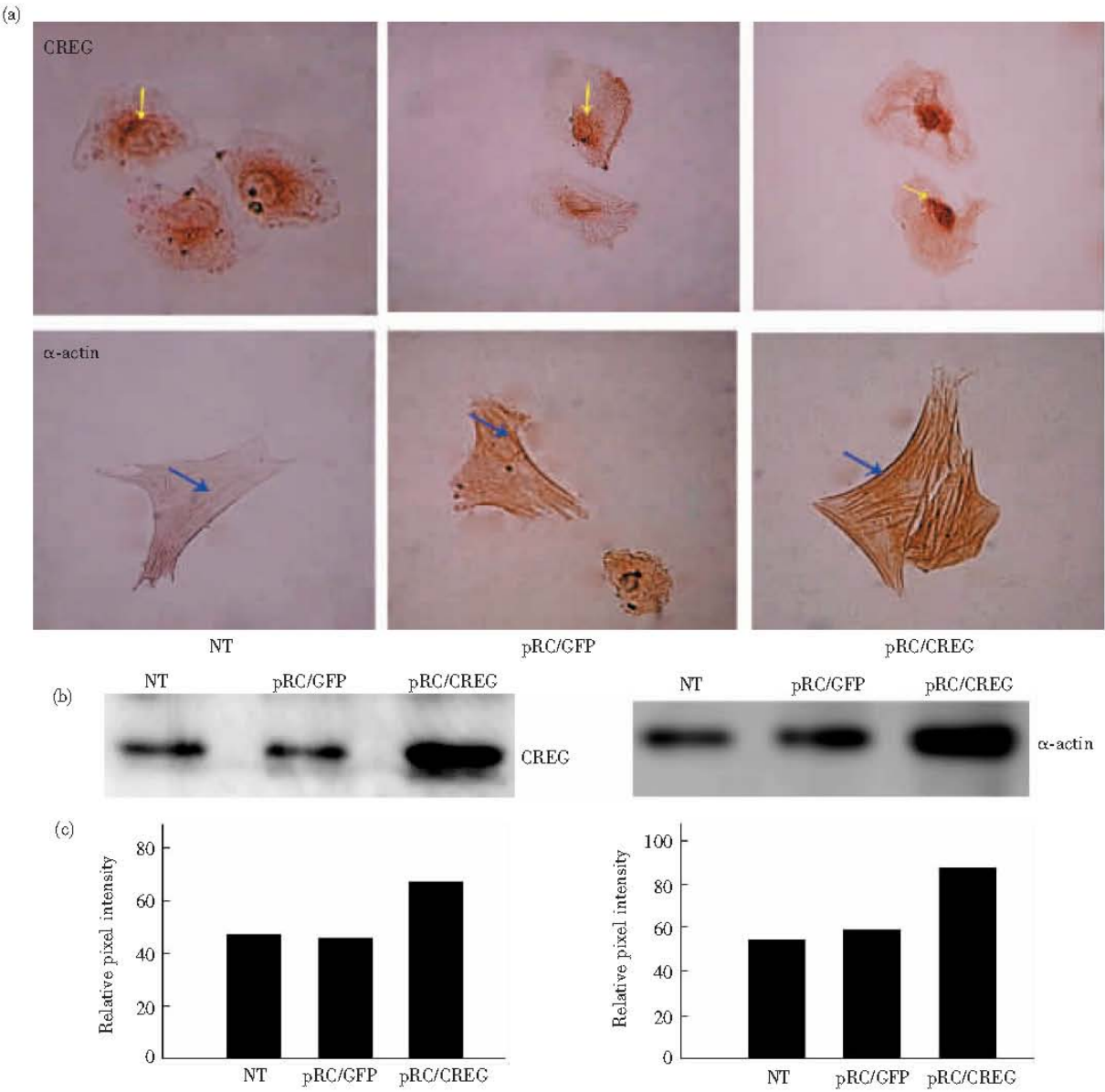


Fig. 3 Expression of smooth muscle-specific markers in VSMCs before and after transfection

(a) Expression of CREG and SM α -actin proteins were detected by immunohistochemical staining. Yellow arrows head to the anti-CREG staining, and blue arrows head to the anti-SM α -actin staining. (b) Cellular proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gel, and Western blot analysis was performed using specific antibodies for CREG and SM α -actin. Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system, and band density was quantified by image analysis software.

2.4 CREG 蛋白与 SRF 蛋白的直接作用研究

免疫共沉淀分析发现, 与正常对照组相比, CREG 蛋白过表达引起 VSMCs 中 SRF 蛋白表达明显增加. 提示 SRF 蛋白与 CREG 蛋白可以直接相互作用 (图 4).

2.5 CREG 蛋白调控 CarG 位点启动细胞分化

本研究选择 SM α -actin 基因启动子区的两个 CarG 调控位点进行 CREG 基因转染前后 VSMCs 的 GMSA 分析, 发现 pRC/CMV-hCREG 质粒转染后, VSMCs 核提取物与 CarG * I、CarG * II 位点的结

合能力均较感染前明显增加, 提示 CREG 基因可能通过调控 CArG 位点启动 VSMCs 中 SM α -actin 基因转录. 同时, supershift 分析发现, 分别在核提取物中加入抗 SRF 抗体和抗 CREG 抗体后, 部分核

蛋白迁移率减慢. 结果证实, CREG 蛋白过表达后, 细胞中 CREG 蛋白和 SRF 蛋白均通过 CArG 位点参与对 SM α -actin 基因的转录调控 (图 5).

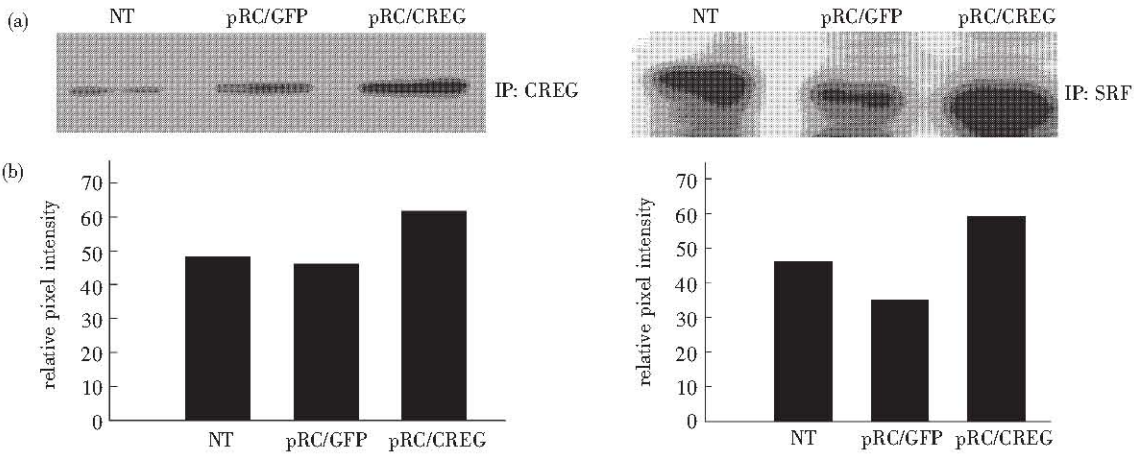


Fig. 4 Immunoprecipitate results showing the interaction of CREG and SRF
(a) Cell lysates from VSMCs transfected with pRC/CMV-hCREG, pRC/CMV-GFP and normal cells were immunoprecipitated with anti-CREG antisera and separated by SDS-PAGE. Western blot analysis was performed for CREG and SRF. (b) Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system, and band density was quantified with image analysis software.

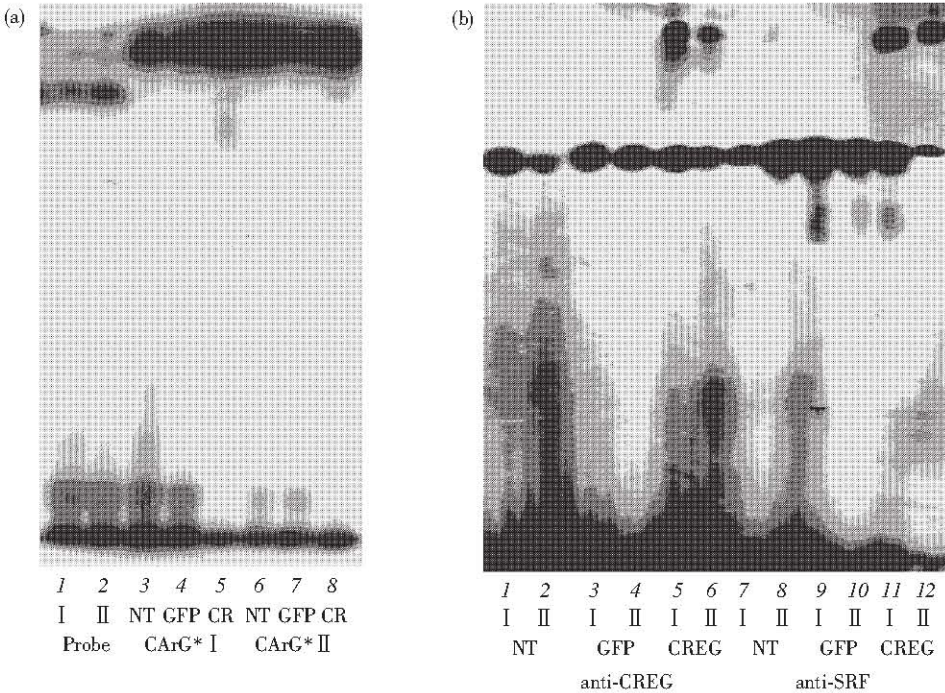


Fig. 5 EMSA and supershift analysis of VSMCs nuclear protein-DNA complexes before and after CREG transfection
(a) VSMCs nuclear extract before and after transfection was incubated for 20 min with radiolabeled CArG * I and CArG * II (lanes 3 through 8), the radiolabeled probe markers were incubated without nuclear extract (lanes 1, 2). (b) nuclear extract of VSMCs before and after transfection added by antibody was incubated for 20 min. Antibodies to the CREG and SRF were added as follows: anti-CREG, lanes 1 ~6; anti-SRF, lanes 7 ~12. Incubation was continued for 15 min with radiolabeled CArG * I and CArG * II, and then samples were loaded on a 5% nondenaturing polyacrylamide gel and electrophoresed at 180 V for 3 h.

2.6 CREG 基因转染诱导 CAT 基因表达

蛋白质印迹分析发现, 与 SM α -actin promoter-pCAT® 3 质粒转染相比, SM α -actin

promoter-pCAT® 3 和 pRC/CMV-CREG 质粒共转染后, VSMCs 中 CAT 基因表达明显增加, 提示 CREG 蛋白过表达启动 SM α -actin 基因转录 (图 6).

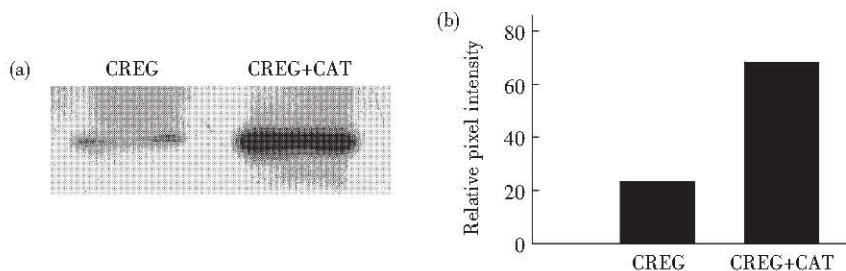


Fig. 6 Western blot showing the expression of CAT protein after co-transfection

(a) Cellular proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gel, and Western blot analysis was performed using specific monoclonal antibody for CAT.

(b) Blots were scanned with a biologic Doc2000 gel analysis system, and band density was quantified with image analysis software.

3 讨 论

近年研究发现, 与心肌和骨骼肌的终末分化不同, 成体 VSMCs 仍维持高度可塑性^[7]. 血管内膜损伤后, 部分 VSMCs 表型改变, 由收缩表型去分化转换为合成表型, 细胞进入分裂周期. 此种状态的 VSMCs 可从血管中膜游走到内膜, 在内膜下进一步分裂增殖, 合成和分泌大量细胞外基质, 形成新生内膜. 内膜迁移和 VSMC 增殖成为动脉粥样硬化和血管腔内介入治疗后再狭窄发生的重要病理生理改变^[8]. VSMCs 表型转化机制的阐明对动脉粥样硬化和临床血管再狭窄的防治至关重要.

CREG 是近年新发现的一种分泌型糖蛋白, 可直接与 E1A 及 E2F 家族蛋白竞争性结合在靶基因的启动子上, 从而阻遏 E1A 和 E2F 对靶基因的激活, 抑制细胞增殖^[9]. 我室研究发现, 在分化表型和去分化表型的 VSMCs 中, CREG 蛋白表达有明显差异. 同时, 大鼠颈动脉拉伤实验证实^[10], CREG 基因表达与血管平滑肌细胞增殖能力呈负相关, 推测其可能参与了 VSMCs 表型调控. 本研究以原代培养大鼠 VSMCs 为模型, 进行 CREG 蛋白对 VSMCs 表型转化调控机制的研究. 研究发现, pRC/CMV-hCREG 质粒转染后, 原代培养大鼠 VSMCs 表型改变极其显著, 细胞由原来的多边形转变为长梭形, 环绕排列呈明显的管腔样生长, 细胞增殖能力下降, 平滑肌特异性分化标志蛋白 SM α -actin 表达上调, 说明细胞由合成表型逆转为分化表型. SM α -actin promoter-pCAT® 3 报告质粒的构建及与 pRC/CMV-hCREG 质粒共转染研究证实,

CREG 蛋白过表达可以直接调控 SM α -actin 基因的转录. 上述研究表明, 作为一个细胞内转录调控分子, CREG 基因能够通过启动 SM α -actin 基因的转录参与 VSMCs 表型转换的调控.

SRF 蛋白是目前研究较多的细胞内转录调控因子, SRF 不仅可以广泛调控细胞内细胞增殖因子的转录, 而且可以调控平滑肌分化特异性标志蛋白的转录^[11]. CarG 作用元件是 SRF 蛋白进行转录调控的主要 DNA 结合位点, SRF-CarG 二聚体复合物的形成目前被认为是调控 VSMCs 分化特异性蛋白表达的关键途径^[12]. 但许多研究发现^[13], SRF 蛋白单独作用于 CarG 位点并不能调控特异性基因的转录, 提示 SRF 可能必须与某些尚不明确的转录分子协同作用才能调控平滑肌细胞特异性基因的表达. 本研究发现, CREG 蛋白过表达诱导 VSMCs 中 SRF 蛋白表达明显增加, 同时 IP 实验证实, CREG 蛋白与 SRF 蛋白存在直接相互作用. 为进一步阐明 CREG 蛋白调控平滑肌细胞分化的机制, 我们选择 SM α -actin 启动子区 2 个 CarG 调控元件, 进行了 GMSA 和 supershift 分析. 结果发现, CREG 过表达可以作用于 SM α -actin 启动子区的 CarG 元件以调控 SM α -actin 基因的表达. 进一步的 supershift 分析表明, SRF 蛋白也参与了 CREG 蛋白对 SM α -actin 启动子区 CarG 作用元件的调控. 由此推测, CREG 蛋白可能与 SRF 蛋白协同作用于 CarG 位点, 从而启动平滑肌分化特异性蛋白 SM α -actin 的表达, 进而影响平滑肌细胞的表型转换.

CREG 作为一个新基因, 目前对其蛋白质功能研究的报道还很少. 其参与细胞内基因转录调控的

详尽作用机制也有待进一步研究发现。但是本研究及其本室既往有关 CREG 的研究工作提示, 对 CREG 基因调控 VSMC 表型转化作用的研究, 将为临床血管再狭窄和动脉粥样硬化的防治提供一个新的思路 and 方向。

参 考 文 献

- Kudrjashova E, Bashtrikov P, Bochkov V, *et al.* Expression of adhesion molecule T-cadherin is increased during neointima formation in experimental restenosis. *Histochem Cell Biol*, 2002, **84** (11): 281 ~ 290
- Veal E, Eisenstein M, Tseng A H, *et al.* A cellular repressor of E1A-stimulated genes that inhibits activation by E2F. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (9): 5032 ~ 5041
- Veal E, Groisman R, Eisenstein M, *et al.* The secreted glycoprotein CREG enhances differentiation of NTERA-2 human embryonal carcinoma cells. *Oncogene*, 2000, **19** (17): 2120 ~ 2128
- 韩雅玲, 康 建, 张 剑, 等. 对去血清后 HITB5 细胞分子表达及表型分析. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (6): 868 ~ 873
Han Y L, Kang J, Zhang J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (6): 868 ~ 873
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1860
- Dignam J D, Lebovitz R M, Roeder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11** (5): 1475 ~ 1489
- Manabe I, Nagai R. Regulation of smooth muscle phenotype. *Curr Atheroscler Rep*, 2003, **5** (3): 214 ~ 222
- Faries P L, Rohan D I, Wyers M C, *et al.* Vascular smooth muscle cells derived from atherosclerotic human arteries exhibit greater adhesion, migration and proliferation than venous cells. *J Surg Res*, 2002, **104** (1): 22 ~ 28
- Fujita N, Furukawa Y, Itabashi N, *et al.* Differences in E2F subunit expression in quiescent and proliferating vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 2002, **283** (1): H204 ~ H212
- 韩雅玲, 王效增, 康 建, 等. 大鼠颈动脉球囊损伤后血管平滑肌细胞 E1A 激活基因阻遏子的表达变化. *中华心血管病杂志*, 2004, **32** (1): 53 ~ 58
Han Y L, Wang X Z, Kang J, *et al.* *Chin J Cardiol*. 2004, **32** (1): 53 ~ 58
- Shore P, Sharrocks A D. The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem*, 1995, **229** (1): 1 ~ 13
- Owens G K. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation. *Acta Physiol Scand*, 1998, **164** (4): 623 ~ 635
- Li L, Liu Z, Mercer B, *et al.* Evidence for serum response factor-mediated regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (4): 2266 ~ 2278

Overexpression of The Cellular Repressor of E1A-Stimulated-genes Regulate The Rat Primary VSMCs Differentiation *In vitro**

HAN Ya-Ling^{1)*}, YAN Cheng-Hui¹⁾, LIU Hai-Wei¹⁾,

HU Ye¹⁾, KANG Jian¹⁾, WANG Xiao-Zeng¹⁾, LI Shao-Hua²⁾

¹⁾ Department of Cardiology of Shenyang General Hospital, PLA, Shenyang 110016, China;

²⁾ Department of Pathology, Robert Wood Johnson Medical School, New Jersey 08854, USA)

Abstract To elucidate the role of cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG) in the phenotype modulation of vascular smooth muscle cells (VSMCs), human CREG (hCREG) was overexpressed in primary rat VSMCs by using a mammalian expression vector pRC/CMV-hCREG. Transient transfection of VSMCs with hCREG inhibited cell proliferation and DNA synthesis as evidenced by decrease in BrdU incorporation. Moreover, CREG overexpression increased SM α -actin protein level in VSMCs. Co-transfection of VSMCs with SM α -actin promoter reporter gene with hCREG enhanced SM α -actin promoter activity, suggesting that elevated SM α -actin protein production resulted from increased gene transcription. The mechanism by which CREG regulates VSMC phenotype conversion was further investigated by analysis of interaction of CREG with serum response factor (SRF), an important transcriptional factor involved in VSMC differentiation. CREG co-immunoprecipitated with SRF and CREG overexpression increased the SRF bound to CREG. In addition, gel mobility shift assay and supershift assay showed that CREG bound together with SRF to the CARG site of SM α -actin promoter. These results suggest that CREG acts as a transcriptional factor and interacts with SRF to promote VSMC differentiation.

Key words CARG, repressor protein, E1A, phenotype, cells, vascular smooth muscle, rat

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30070280).

** Corresponding author. Tel: 86-24-23056238, Fax: 86-24-23922184, E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

Received: July 1, 2004 Accepted: August 30, 2004