

可溶性 Jagged-1/Fc 嵌合蛋白诱导淋巴结细胞 向 CD4⁺CD25⁺ T 细胞分化^{*}

邢飞跃^{1)**} 刘 静²⁾ 于 哲¹⁾ 季煜华¹⁾

(¹暨南大学组织移植与免疫研究中心; ²暨南大学医学院, 广州 510632)

摘要 直接用可溶性 Jagged-1/Fc 嵌合蛋白(Jagged-1/Fc)在体外诱导小鼠淋巴结细胞向 CD4⁺CD25⁺ T 细胞分化。通过荧光标记单克隆抗体染色结合流式细胞术, 观察不同剂量 Jagged-1/Fc 在不同时间对淋巴结细胞向 CD4⁺CD25⁺ T 细胞分化的影响, 观察 Jagged-1/Fc 诱导 T 细胞内细胞因子的变化; 藉 ELISA 法检测 Jagged-1/Fc 诱导分化的 T 细胞分泌 TGF-β1、IL-4 和 IL-10 的水平。结果显示, 超过 500.0 μg/L 剂量的 Jagged-1/Fc 使 CD4⁺CD25⁺ T 细胞百分比明显增高, 诱导时间需要 4~6 天, 抗 Jagged-1 单抗能抵消 Jagged-1/Fc 的诱导作用, 用 DAPT 阻断 Notch 信号通路的活化也能抑制 Jagged-1/Fc 的诱导作用, Jagged-1/Fc 诱导分化的 T 细胞培养上清中 IL-4 和 IL-10 的水平明显增高, TGF-β1 无明显变化, 胞内 IL-4, IL-10, IL-2 和 TNF-α 的水平也呈增高趋势。上述结果表明, 可溶性 Jagged-1/Fc 嵌合蛋白在体外可诱导小鼠淋巴结细胞向 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞分化。

关键词 Jagged-1, 淋巴结细胞, 调节性 T 细胞, 分化

学科分类号 Q26, R392

Jagged-1 是存在于哺乳动物细胞膜上 Notch 受体的主要配体之一, 为单次跨膜糖蛋白, 表达于骨髓、胎儿肝基质和胸腺上皮等多种细胞, 参与调控许多组织的生长发育, 维持正常造血干细胞的更新和分化。Jagged-1 在 T 细胞、抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)表面表达丰富, 介导树突状细胞(dendritic cells, DC)的成熟和分化^[1]。已发现 Jagged-1 与相应的 Notch 受体结合, 激活 Jagged-1-Notch 信号通路, 能够诱导外周 T 淋巴细胞向 2 型辅助 T 细胞(helper T cell 2, Th2)^[2]和调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)^[3, 4]分化, 可能在诱导免疫耐受中发挥重要作用, 虽然可供参考的文献有限, 但预示其潜在的良好应用前景。这些研究主要采用 Jagged-1 的表达载体导入细胞的手段, 或与固有高表达 Jagged-1 的细胞共培养的手段, 新发现直接利用大鼠的 Jagged-1 胞外结构域与人的 IgG1 Fc 段的融合蛋白, 即可溶性 Jagged-1/Fc 嵌合蛋白(Jagged-1/Fc), 能抑制人的 T 细胞增殖及其细胞因子的生成, 加强 T 细胞的低反应性^[5]。因此, 本文试图探讨直接利用可溶性 Jagged-1/Fc 嵌合蛋白在

体外诱导淋巴结细胞向 CD4⁺CD25⁺ Treg 分化的可能性。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠, 8 周龄, 体重 (20.0±2.2 g), 购自广东省医学实验动物中心。

1.2 淋巴结细胞悬液的制备

颈髓脱位处死 BALB/c 小鼠, 无菌分离双侧腋窝、锁骨下、腹股沟浅表淋巴结和肠系膜淋巴结, 去除被膜, 轻柔机械研磨, 经 200 目不锈钢网筛过滤, 收集细胞, 用冷 PBS 离心(300 g, 5 min)洗涤细胞 2 次, 细胞重悬于含 10% 胎牛血清 RPMI1640(GibcoBRL)完全培养基中, 调细胞密度

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30471635)和广东省自然科学基金资助项目(04010451, 5006033)。

^{**} 通讯联系人。

Tel: 020-33010358, E-mail: tfyxing@jnu.edu.cn

收稿日期: 2007-10-28, 接受日期: 2007-12-27

至 2×10^9 /L.

1.3 CD4⁺CD25⁺ Treg 的诱导

取淋巴结细胞悬液接种于 24 孔细胞培养板上, 每孔 1 ml, 设为 Jagged-1/Fc(a soluble Jagged-1/Fc chimera protein)(R & D Systems)组和 PBS 对照组. 根据量效试验, 加入有效剂量为 500.0 μ g/L Jagged-1/Fc, 在 37.0 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养, 分别于第 0、1、2、3、4、5、6 天离心(300 g, 5 min)去上清, PBS 洗涤细胞(300 g, 5 min)1 次, 收集细胞备用. 另取淋巴结细胞悬液接种于 24 孔培养板上, 每孔 1 ml, 设 0.1、1.0、2.5、5.0、10.0 μ mol/L DAPT {N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester}(Sigma 公司)加 500.0 μ g/L Jagged-1/Fc 各组, 10.0、50.0、100.0、500.0、1 000.0 μ g/L anti-Jagged-1 单抗(R&D Systems)加 500.0 μ g/L Jagged-1/Fc 各组, 500.0 μ g/L Jagged-1/Fc 组和 PBS 对照组. 给药时间为第 0 天和第 3 天, 先加入 DAPT, 2 h 后分别加入 anti-Jagged-1 和 Jagged-1/Fc, 置 37.0 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱中培养共 4 天, 同上方法离心、洗涤及收集细胞.

1.4 流式细胞术

取如上收集的细胞, 每 10^6 细胞分别加入 0.5 μ g anti-CD3-APC、0.125 μ g anti-CD4-PE 和 0.25 μ g anti-CD25-FITC(eBioscience), 混匀后 4.0 $^{\circ}$ C 下避光放置 30 min. 经 PBS 离心(300 g, 5 min)洗涤细胞 2 次, 在 FACSCalibur 流式细胞仪(Becton Dickinson)上分析. 检测前先用相应的同型抗体染细胞作阴性对照以确定统计学区分, 每管样品检测 5 000~10 000 个细胞, 所获数据通过 CELLQuest 软件(Becton Dickinson)分析, 确定 CD4⁺CD25⁺ Treg 占 CD4⁺T 细胞的百分率.

1.5 上清细胞因子的检测

取密度为 2×10^9 /L 淋巴结细胞悬液接种于 24 孔培养板中, 每孔 1 ml, 设 500.0 μ g/L Jagged-1/Fc 处理组和 PBS 对照组. 给药时间为第 0 天和第 3 天, 置 37.0 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱中培养 4 天, 同上方法离心收集细胞上清. 采用双抗夹心 ELISA 试剂盒(JINGMEI BIOTECH)检测细胞培养上清中细胞因子 TGF- β 1、IL-4 和 IL-10 的水平, 具体操作步骤按说明书进行, 最后经 680 型酶标仪(BIO-RAD)在 450 nm 处读取 A 值, 并在标准曲线上查出其浓度值.

1.6 胞内细胞因子的染色

收获淋巴结细胞, 设 500.0 μ g/L Jagged-1/Fc、

5.0 μ mol/L DAPT+500.0 μ g/L Jagged-1/Fc、500.0 μ g/L anti-Jagged-1+500.0 μ g/L Jagged-1/Fc 和 PBS 对照组. 给药时间为第 0 天和第 2 天, 先加入 DAPT, 2 h 后分别加入 anti-Jagged-1 和 Jagged-1/Fc. 按照 eBioscience 说明书操作, 不同时间加入刺激剂 5.0 mg/L ConA、10.0 mg/L anti-CD3、2.0 mg/L anti-CD28 和 200 μ g/L LPS, 混匀后置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养, 于染色前 5 h 加 2 μ mol/L 莫能菌素. 每 10^6 细胞加入 0.5 μ g anti-CD3-PE, 混匀后 4.0 $^{\circ}$ C 下避光放置 30 min. 经 PBS 离心(500 g, 5 min)洗涤细胞 2 次, 用固定液在室温下避光作用 20 min. 加透膜缓冲液, 室温下避光作用 10 min, 离心(500 g, 5 min)弃上清, 重复透膜 1 次. 每 10^6 细胞分别加入 0.5 μ g anti-IL-2-FITC, 0.5 μ g anti-IL-4-FITC, 0.5 μ g anti-IL-10-FITC 和 0.125 μ g anti-TNF- α -FITC 抗体, 混匀后室温下避光孵育 30 min, 用透膜缓冲液洗涤, 离心(500 g, 5 min)弃上清, PBS 重悬细胞, 在 FACSCalibur 流式细胞仪上分析.

1.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 Oneway-ANOVA 分析, 两组间比较用 Student's t 检验.

2 结 果

2.1 不同时间 Jagged-1/Fc 诱导 CD4⁺CD25⁺ Treg 分化

初始淋巴结 T 细胞少量表达 CD4 和 CD25, 随着时间从第 1 天推移至第 6 天, 对照组和 Jagged-1/Fc 组 CD4⁻CD25⁻T 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞百分比降低, CD4⁻CD25⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁺Treg 百分比均逐渐增高, 以 Jagged-1/Fc 组更为明显. 其中, Jagged-1/Fc 组 CD4⁺CD25⁺Treg 百分比在第 4、5、6 天与对照组之间有显著差异 ($P < 0.05$)(图 1). 以上提示, Jagged-1/Fc 能在体外诱导小鼠淋巴细胞向 Treg 分化, 诱导时间超过 4 天. 此外, 小鼠淋巴结细胞在体外培养过程中, CD4⁺CD25⁺Treg 百分比也明显增高, 这可能与 RPMI1640 完全培养基含有刺激淋巴细胞分化的成分有关, 事实上, 其他研究组和我们都曾观察到从体内分离的造血干细胞或树突状细胞在体外培养条件下均出现不同程度的分化或成熟的类似现象, 这并不掩盖本实验处理组与对照组之间存在的差异.

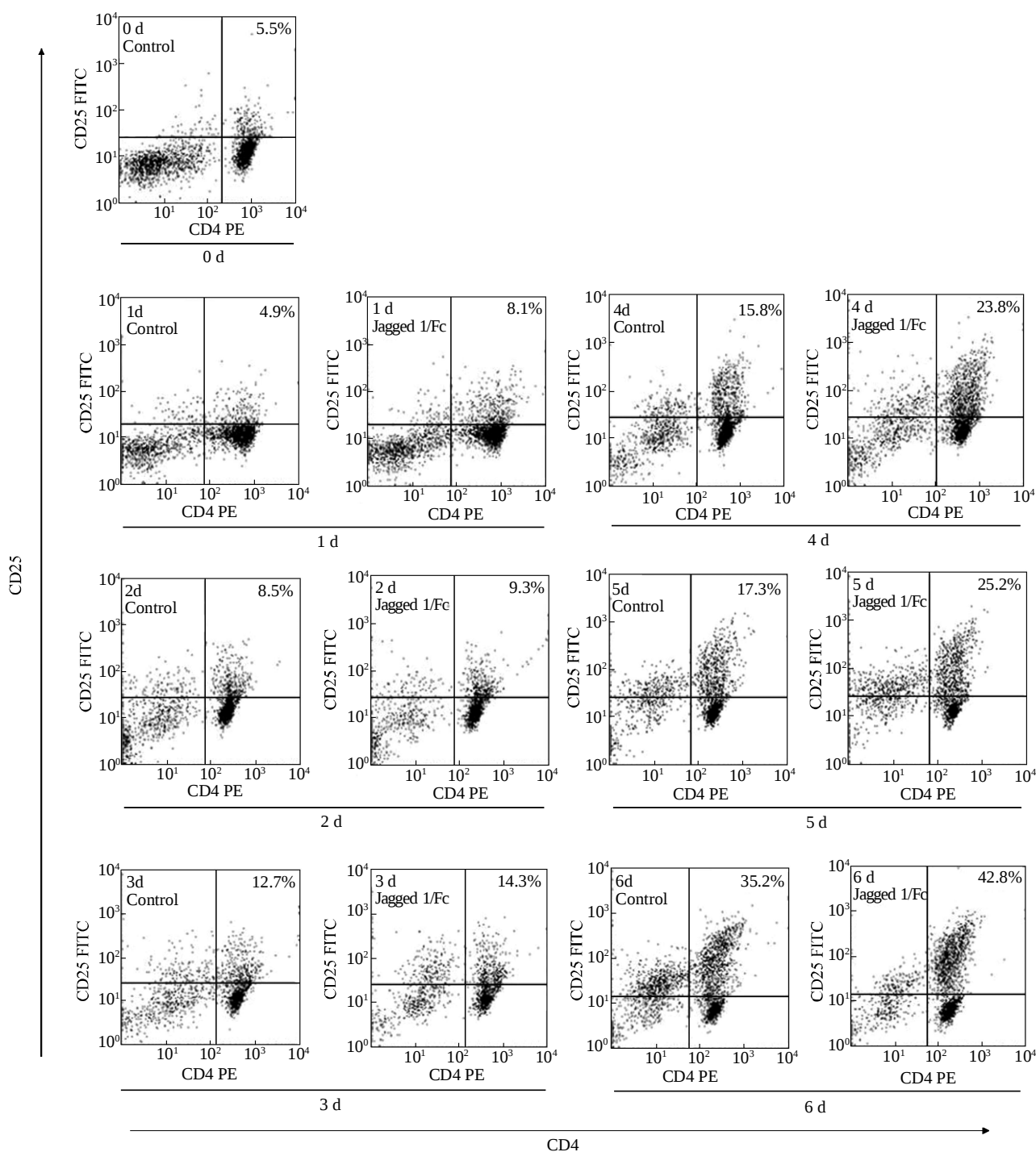


Fig. 1 The expression of CD4 and CD25 molecules on the surface of T cells induced by Jagged-1/Fc at the different time

2.2 不同剂量 Jagged-1/Fc 诱导 CD4⁺CD25⁺ Treg 分化

如图 2 所示, 在 100.0~1 000.0 $\mu\text{g/L}$ 剂量范围内, 随着 Jagged-1/Fc 用量的增加, 小鼠 CD4⁺CD25⁺ Treg 百分比逐渐增高。其中, 250.0、500.0 和

1 000.0 $\mu\text{g/L}$ Jagged-1/Fc 组 CD4⁺CD25⁺ Treg 百分比与对照组之间有显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 以超过 500.0 $\mu\text{g/L}$ 剂量的 Jagged-1/Fc 的作用更为明显, 提示 250.0 $\mu\text{g/L}$ 以上剂量的 Jagged-1/Fc 能在体外明显诱导小鼠淋巴结细胞向 Treg 分化。

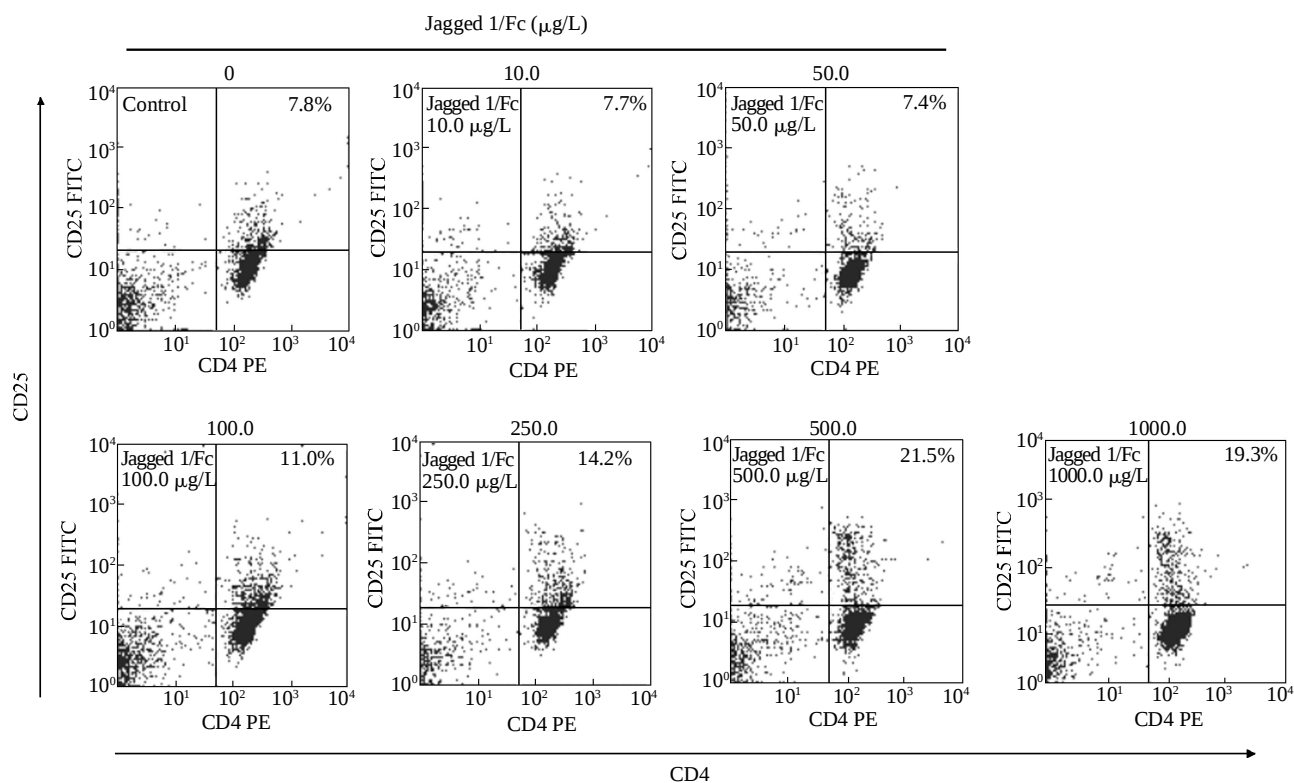


Fig. 2 The expression of CD4 and CD25 molecules on the surface of T cells induced by the different doses of Jagged-1/Fc

2.3 抗 Jagged-1 单抗阻止 Jagged-1/Fc 诱导 CD4⁺CD25⁺ Treg

给小鼠淋巴结细胞加入 Jagged-1/Fc, CD4⁺

CD25⁺ Treg 百分比对照组明显升高($P < 0.05$), 如果在加入 Jagged-1/Fc 同时加入抗 Jagged-1 单抗, 随着后者浓度从 10.0 μg/L 增至 1 000.0 μg/L,

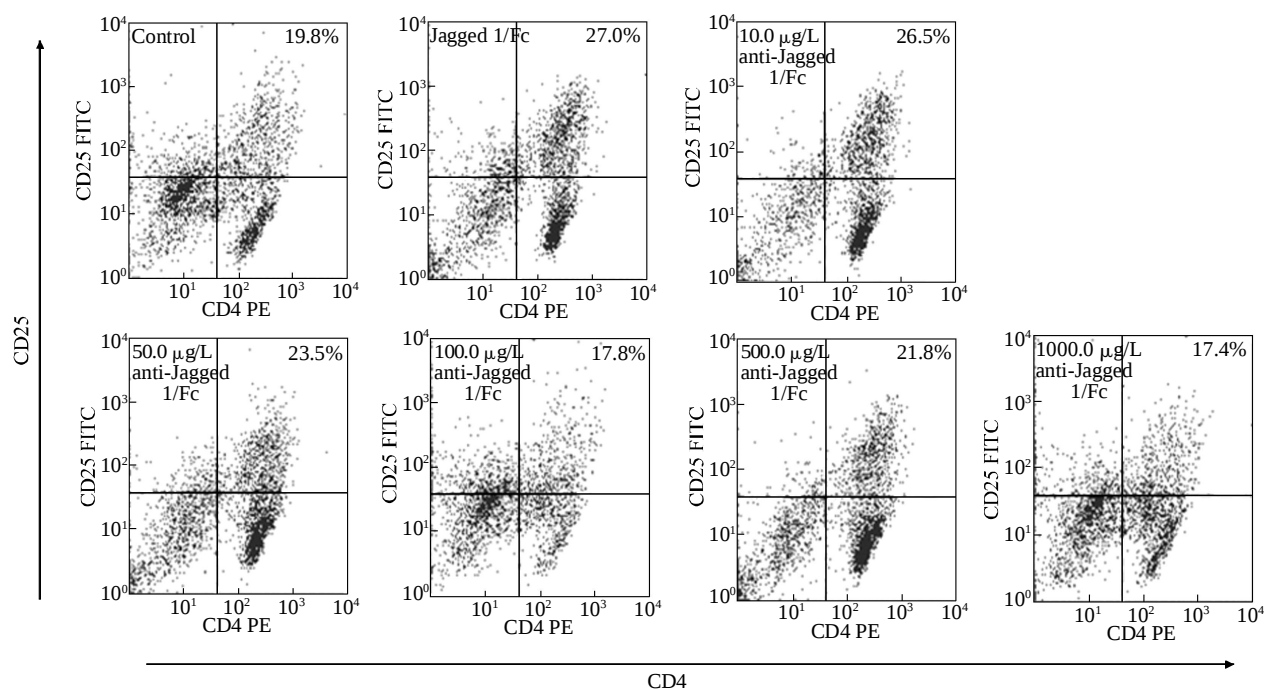


Fig. 3 An anti-Jagged-1 monoclonal antibody blocks the expression of CD4 and CD25 molecules on the surface of T cells induced by Jagged-1/Fc

CD4⁺CD25⁺ Treg 百分比逐渐降低, 其中, 100.0 ~ 1 000.0 $\mu\text{g/L}$ 抗 Jagged-1 单抗组与 Jagged-1/Fc 组之间存在明显差异($P < 0.05$)(图 3). 这些结果提示, 抗 Jagged-1 单抗能够取消 Jagged-1/Fc 诱导小鼠淋巴细胞向 Treg 分化的作用.

2.4 抑制 Notch 信号通路对 Jagged-1/Fc 诱导 CD4⁺CD25⁺ Treg 的影响

给小鼠淋巴结细胞加入 Jagged-1/Fc, CD4⁺

CD25⁺ Treg 百分比对照组明显升高($P < 0.05$). 如果在给小鼠淋巴结细胞加入 Jagged-1/Fc 之前先加 Notch 信号通路抑制剂 DAPT, 浓度从 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 逐渐递增至 5.0~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 小鼠 CD4⁺CD25⁺ Treg 百分比比较 Jagged-1/Fc 组明显降低($P < 0.05$)(图 4). 这些提示阻断 Notch 信号通路的活化能够抑制 Jagged-1/Fc 诱导小鼠淋巴结细胞向 Treg 分化.

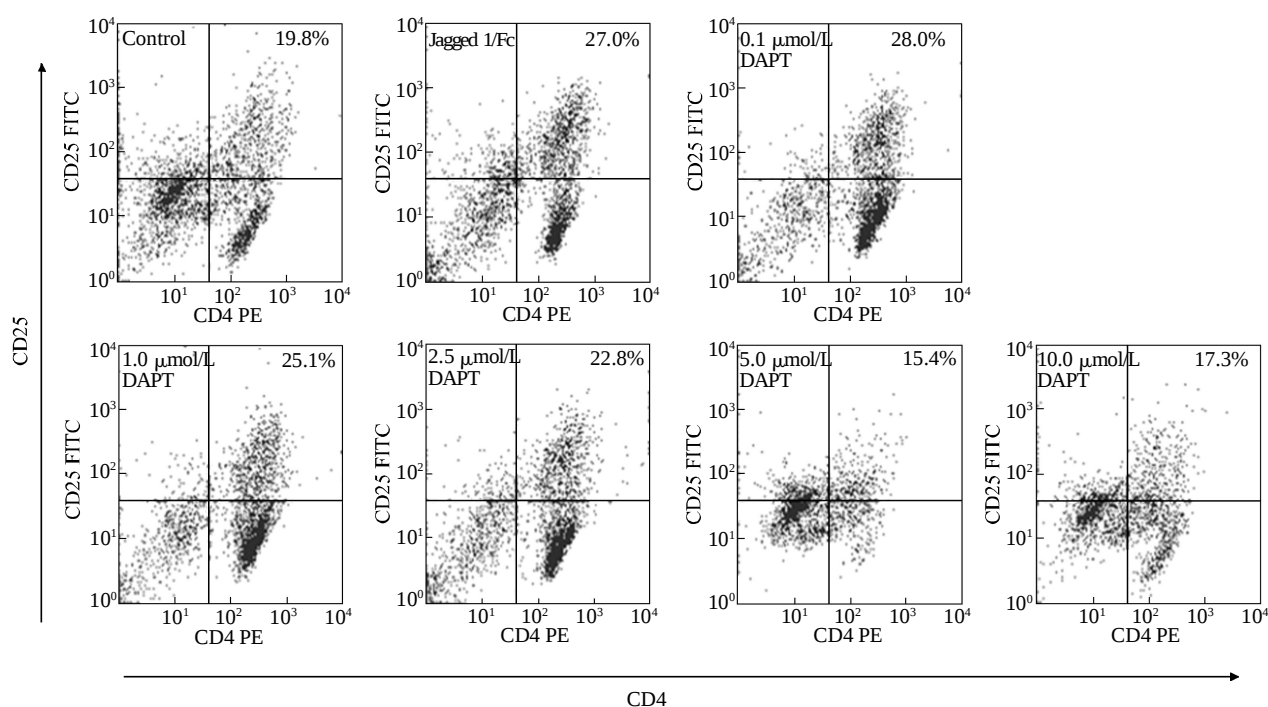


Fig. 4 DAPT, an inhibitor for the Notch signaling pathway, abrogates the expression of CD4 and CD25 molecules on the surface of T cells induced by Jagged-1/Fc

2.5 Jagged-1/Fc 诱导 T 细胞产生抑制性细胞因子

收集经 Jagged-1/Fc 诱导的 T 细胞的培养上清, 测定上清中 TGF- β 1、IL-4 和 IL-10 的表达水平, 进一步寻找 Jagged-1/Fc 诱导淋巴结细胞向 CD4⁺CD25⁺ Treg 分化的证据. 与对照组比较, Jagged-1/Fc 能促进 T 细胞分泌抑制性细胞因子 IL-4 和 IL-10 ($P < 0.05$), TGF- β 1 的表达水平在两组之间无统计差异(表 1). 胞内染色也显示 Jagged-1/Fc 诱导组 IL-4⁺和 IL-10⁺ T 细胞百分比有所增加, IL-2⁺和 TNF- α ⁺ T 细胞百分比也增高(图 5).

Table 1 Change of the T cell-secreted cytokines induced by Jagged-1/Fc

Group	ng/L		
	TGF- β 1	IL-4	IL-10
Control	689.63 $\pm$ 153.12	2.27 $\pm$ 1.10	38.11 $\pm$ 9.05
Jagged-1/Fc	732.35 $\pm$ 182.68	5.57 $\pm$ 1.37 ¹⁾	69.81 $\pm$ 7.79 ¹⁾

¹⁾ $P < 0.05$, compared with the control, $\bar{x} \pm s$.

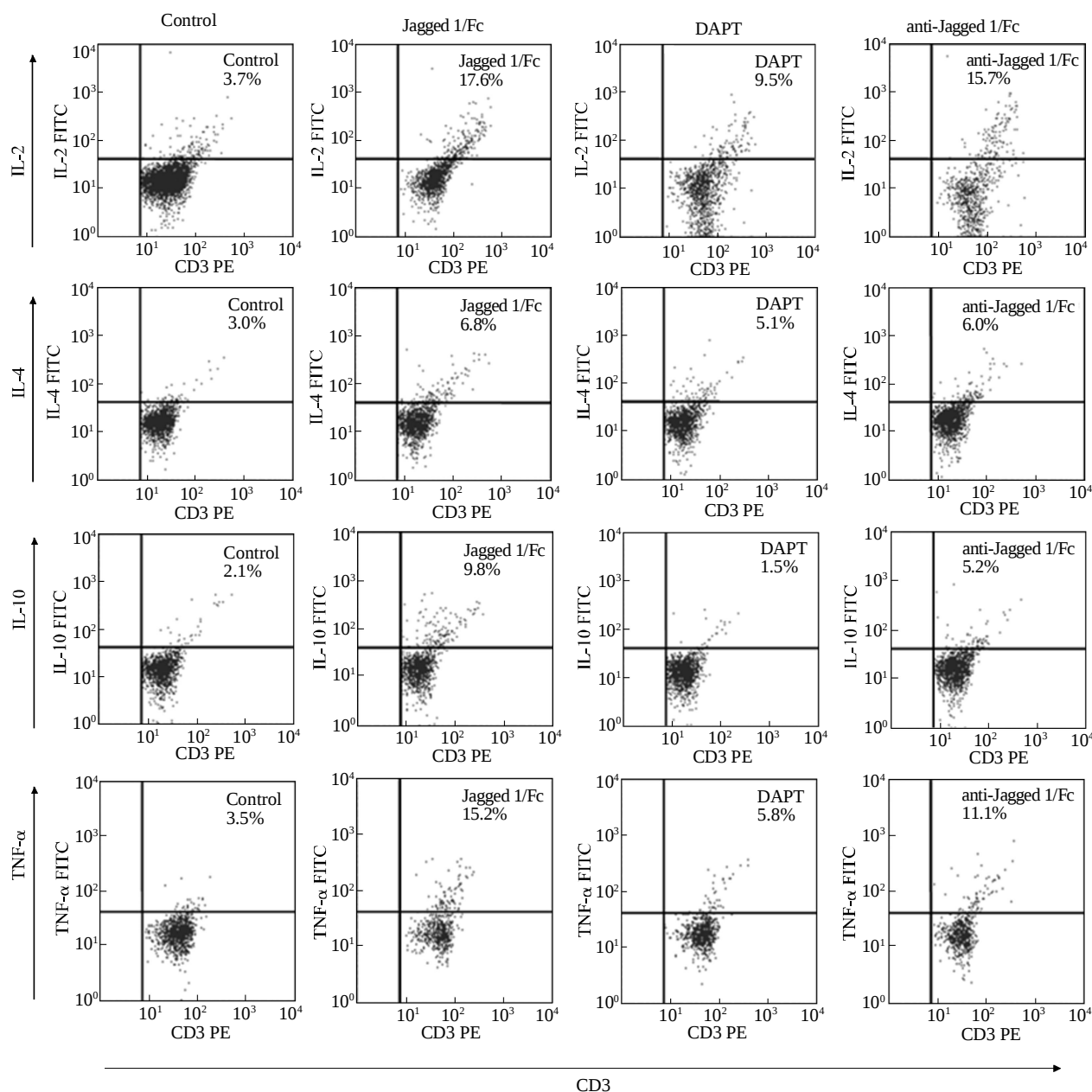


Fig. 5 Change of some intracellular cytokines of T cells induced by Jagged1/Fc

3 讨 论

在哺乳动物, Notch 配体包括 Delta-1、Delta-3、Delta-4 和 Jagged-1、Jagged-2 两类. 单独敲除这些配体, 小鼠呈现不同的表型, 提示这两类配体具有非重叠效应. 在外周免疫系统, T 细胞和 APC 表面丰富表达 Jagged-1 和 Delta-1, 它们激活的 Notch 信号是否介导外周淋巴细胞分化? 很诱人的发现是: Delta-1 可以诱导外周 T 细胞向 Th1 和 CD8⁺ 调节性 T 细胞(CD8⁺ regulatory T cells, CD8⁺ Tr)分化, 而 Jagged-1 与 Notch 受体结合, 激活 Notch 信号, 诱导外周成熟 T 细胞分化成为 Th2 或产生高水平 IL-10 的 1 型调节性 T 细胞(regulatory T cell 1,

Tr1)或产生高水平 TGF-β 的 Th3 细胞^[2~4]. 另有研究表明, Delta 主要涉及 T 细胞、B 细胞去向和外周 T 细胞的成熟, Jagged-1 则与 γδ 淋巴细胞和 NK 细胞的发育以及外周 T 细胞的分化有关^[6]. 可见, 不同 Notch 配体介导不同的 Notch 信号, 决定着外周淋巴细胞生成和分化的不同命运. 因此, Jagged-1 与 Delta-1 对 Th 和 Tr 分化的不同影响, 可能为诱导 Th 和 Tr 不同细胞亚群定向分化提供新的药物靶点.

目前, 涉及 Jagged-1-Notch 1 信号通路在 T 细胞分化中作用的报道极其有限, 主要采用含有 Jagged-1 基因全长或胞外段的表达载体转染细胞的

策略, 或与固有高表达 Jagged-1 的细胞共培养的手段来展开^[7~10], 而直接利用可溶性 Notch 配体研究 Notch 信号通路活化诱导中枢和外周淋巴细胞分化的报道更是寥寥无几. 新发现直接利用大鼠的 Jagged-1 胞外结构域与人的 IgG1 Fc 段的融合蛋白, 即可溶性 Jagged-1/Fc 嵌合蛋白, 可抑制人的 T 细胞增殖及其细胞因子的生成, 加强 T 细胞的低反应性^[5]. 本研究直接利用可溶性 Jagged-1/Fc 嵌合蛋白, 在体外诱导淋巴结细胞分化, 结果发现, Jagged-1/Fc 能够诱导淋巴结细胞向 CD4⁺CD25⁺Treg 分化, 并应用 anti-Jagged-1 单抗中和 Jagged-1/Fc, 利用 DAPT 阻断 Notch 信号通路进一步证实 Jagged-1/Fc 具有此种生物学效应. 另一方面, 从 Jagged-1/Fc 诱导分化的 T 细胞分泌的细胞因子来看, 抑制性细胞因子 IL-4 和 IL-10 的水平增高, TGF- β 无明显变化, 同样支持 Jagged-1/Fc 诱导淋巴结细胞向 Treg 分化. 以上结果也说明, 采用此种体外诱导方法是可行的, 为其临床开发和应用提供了重要的理论依据. 与树突状细胞不同, 目前 Treg 尚无经典成熟的体外诱导方法, 主要通过磁珠分选或流式细胞术分选技术获取以用于研究, 但这些方法成本很高, 而且细胞来源非常有限, 如胸腺, 骨髓, 脾脏, 淋巴结和外周血 T 细胞中 Treg 的百分比大约占 3%~10%. 最新报道用 TGF- β 在体外诱导外周初始 T 细胞向 CD4⁺CD25⁺Treg 分化取得进展.

Ng 等^[11]早就发现 CD4⁺CD25⁺Treg 高表达 Deltex-1 和 HES-1, 因它们是 Notch 信号的转录调节者, 这无疑也为上述 Jagged-1-Notch 信号参与调控 CD4⁺CD25⁺Treg 分化提供了佐证, 但其详细调控机制有待阐明. 此外, 利用 Jagged-1 的表达载体作研究, 无法控制其表达水平的高低以及所表达的量是否足以发挥其生理和药理作用, 如果是病毒作为其载体, 体内应用还存在一定的潜在危险, 利用与固有高表达 Jagged-1 细胞共培养的策略同样无法控制其表达水平的高低, 也无法排除共培养细胞所分泌的其他细胞因子对靶细胞的影响. 而直接利用可溶性 Jagged-1/Fc 蛋白探讨 Jagged-1-Notch 信号的作用及其机制有利于 Jagged-1 剂量的严格

控制和其生理、药理及毒理效应的正确评价, 而且基于 Jagged-1 配体的胞外结构域是其激活 Notch 受体的活性部位, 因此, 它的胞外段分子质量小, 更具有安全性, 并且用 IgG Fc 段与之融合可以减小用 IgG 融合所带来的免疫原性, 就其临床开发应用而言更具有可操作性.

参 考 文 献

- 1 Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, et al. Expression of Notch ligands, Jagged-1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice. *Immunol Lett*, 2002, 81(5): 59~64
- 2 Amsen D, Blander J M, Lee G R, et al. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different Notch ligands on antigen presenting cells. *Cell*, 2004, 117(4): 515~526
- 3 Vigouroux S, Yvon E, Wagner H, et al. Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes. *J Virol*, 2003, 77(20): 10872~10880
- 4 Yvon E S, Vigouroux S, Rousseau R F, et al. Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood*, 2003, 102(10): 3815~3821
- 5 Kostianovsky A M, Maier L M, Baecher-Allan C, et al. Up-regulation of gene related to anergy in lymphocytes is associated with Notch-mediated human T cell suppression. *J Immunol*, 2007, 178(10): 6158~6163
- 6 de La Coste A, Freitas A A. Notch signaling: Distinct ligands induce specific signals during lymphocyte development and maturation. *Immunol Lett*, 2006, 102(1): 1~9
- 7 Jaleco A C, Neves H, Hooijberg E, et al. Differential effects of notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med*, 2001, 194 (7): 991~1001
- 8 DeHart S L, Heikens M J, Tsai S. Jagged 2 promotes the development of natural killer cells and the establishment of functional natural killer cell lines. *Blood*, 2005, 105 (9): 3521~3527
- 9 Lehar S M, Dooley J, Farr A G, et al. Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 transmit distinct signals to T-cell precursors. *Blood*, 2005, 105 (4): 1440~1447
- 10 Neves H, Weerkamp F, Gomes A C, et al. Effects of Delta1 and Jagged-1 on early human hematopoiesis: correlation with expression of Notch signaling-related genes in CD34⁺ cells. *Stem cells*, 2006, 24(5): 1328~1337
- 11 Ng W F, Duggan P J, Ponchel F, et al. Human CD4⁺CD25⁺ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*, 2001, 98(9): 2736~2744

Soluble Jagged-1/Fc Chimera Protein Induces The Differentiation of Lymphonode Cells Into CD4⁺CD25⁺ T Cells*

Xing Fei-Yue^{1)**}, Liu Jing²⁾, Yu Zhe¹⁾, Ji Yu-Hua¹⁾

(¹⁾ Institute of Tissue Transplantation and Immunology, (²⁾ Department of Stomatology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract A soluble Jagged-1/Fc chimera protein (Jagged-1/Fc) was directly used to induce the differentiation of lymphonode cells in mice into CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in vitro. A fluorescein-labeled monoclonal antibody staining combined with flow cytometry was applied to detect the effect of different doses of Jagged-1/Fc on the differentiation of the lymphonode cells into CD4⁺CD25⁺ T cells at different time, and to measure intracellular cytokine changes of the T cells induced by Jagged-1/Fc. The level of TGF- β 1, IL-4 and IL-10 secreted by the T cells that were induced by Jagged-1/Fc was determined by ELISA. The results showed that over 500.0 μ g/L of Jagged-1/Fc led to the obvious enhancement of the proportion of CD4⁺CD25⁺ T cells within the day 4 to 6 of induction, which was abrogated with an anti-Jagged-1/Fc monoclonal antibody. This induction action of Jagged-1/Fc on CD4⁺CD25⁺ T cells was also inhibited by the block of a Notch signal pathway with N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT). The level of IL-4 and IL-10 in the supernatant of T cell culture and their intracellular level were elevated by the induction of Jagged-1/Fc, and the level of TGF- β 1 in the supernatant was not altered. These findings suggest that a soluble Jagged-1/Fc chimera protein may induce the differentiation of mouse lymphonode cells into CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in vitro.

Key words Jagged-1, lymphonode cell, regulatory T cell, differentiation

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30471635) and The Natural Science Foundation of Guangdong Province in China (04010451, 5006033).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-33010358, E-mail: tfyxing@jnu.edu.cn

Received: October 28, 2007 Accepted: December 27, 2007