

10 种 ABC 转运蛋白在鼻咽癌顺铂 耐药细胞系中的表达 *

谢思明 ** 杜莎莎 方唯意 姚开泰 ***

(南方医科大学肿瘤研究所, 广州 510515)

摘要 为研究鼻咽癌细胞 CNE2 中顺铂耐药与 10 种 ABC 转运蛋白的关系, 分别用顺铂、顺铂+5- 氟脲嘧啶来诱导 CNE2 耐药, 在脱药培养 2 个月通过 MTT 法测定细胞的生长曲线及其与顺铂的量效关系和耐药指数, 同时, 通过荧光定量 PCR 法检测耐药细胞与敏感细胞中 10 种 ABC 转运蛋白 mRNA 表达的差异, 并通过免疫细胞化学法验证. MTT 法结果提示, 成功诱导出两株分别对顺铂、顺铂+5- 氟脲嘧啶耐药的细胞株(分别命名为 CNE2/DDP、CNE2/DDP+5Fu), 耐药指数分别为 2.58 和 5.31, ABCC2 在两株耐药细胞株中表达均上调, 分别为 2.50 和 4.08 倍, 免疫细胞化学法结果表明, ABCC2 在两株耐药细胞中表达均增强, 同时 ABCC2 还可在 CNE2/DDP+5Fu 细胞核中表达. 上述结果表明 ABCC2 在 CNE2 细胞对顺铂的耐药性中可能发挥着重要的作用.

关键词 鼻咽癌, 顺铂, 多药耐药, ABC 转运蛋白

学科分类号 R739.6, R730.5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00592

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方常见的鼻咽部的恶性上皮性肿瘤. 由于 NPC 原发部位隐蔽, 不易被早期发现, 因此确诊的患者 60%以上都是中、晚期, 常伴转移^[1, 2]. 对这类患者除了采用常规的放疗外, 化疗也是必不可少的一种辅助治疗方法. 临床上对 NPC 的化疗首选以顺铂(cisplatin, DDP)为基础的联合化疗, 常用的联用方案是 DDP+5- 氟脲嘧啶(5-Fu). 但是由于肿瘤多药耐药性的产生, 往往容易导致患者复发, 因此对化疗药物耐药机制的研究具有重要的临床意义. 在众多的耐药机制中, 能把毒性药物泵出细胞外而使药物蓄积减少的 ABC(ATP binding cassette, ABC)转运蛋白家族越来越引起人们的关注. 目前发现的 ABC 转运蛋白家族共有 48 个基因, 其中与耐药密切相关的基因有 10 种^[3, 4]. 为探讨 ABC 转运蛋白与鼻咽癌顺铂(DDP)耐药性之间的关系, 本研究以鼻咽癌细胞 CNE2 为研究对象, 分别用 DDP、DDP 及 5-Fu 联合诱导 CNE2 细胞耐药, 检测细胞中 10 种 ABC 转运蛋白表达变化的情况.

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

DDP 为山东齐鲁制药厂产品; 5-Fu 为江苏南通精华制药有限公司产品; RPMI-1640 培养基为 Hyclon 公司产品; 小牛血清为 ExCell 公司产品; 胰蛋白酶为 Gibco 公司产品; Trizol RNA 抽提试剂、PrimeScript™ 逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Ta™ 荧光定量 PCR 试剂盒均为 Takara 公司产品; 二甲基四氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)为 Sigma 公司产品. 酶标仪为美国 Bio Rad 公司产品 (Modle 680); 荧光定量 PCR 仪为美国 Stratagene

* 广州市科技计划项目(2006z3-E4051)和广东省自然科学基金(05004718)资助项目.

** 作者现为暨南大学临床医学博士后流动站在站博士后. E-mail: xsming@sina.com

*** 通讯联系人.

Tel: 020-62789100, E-mail: ktyao@fimmu.com

收稿日期: 2008-08-26, 接受日期: 2008-10-13

公司产品(Mx3000P); ABCC2 兔抗人多克隆抗体为武汉博士德生物技术有限公司产品, 经预实验确定其抗体稀释浓度为 1 : 75; 链霉素抗生物素蛋白 - 过氧化酶(streptavidin - peroxidase, SP)试剂盒、内源性生物素阻断试剂盒及 DAB 显色液均购自福州迈新生物技术开发公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞系、细胞培养及耐药诱导. 人鼻咽癌低分化细胞系 CNE2 由南方医科大学肿瘤研究所冻存保藏. 培养液为含 10%小牛血清的 RPMI -1640 培养基, 置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养. 0.25%胰蛋白酶消化传代. 耐药细胞采用药物大剂量冲击、间歇作用法^[9]诱导产生. 取呈对数生长的 CNE2 细胞, 分别用含 1 mg/L 的 DDP、1 mg/L 的 DDP 及 5-Fu 的培养基培养 24 h, 次日更换正常培养基, 待细胞回复生长后再加药. 如此反复诱导、换液、传代, 诱导 1 年左右, 直至获得能在含 0.5 mg/L DDP 以及含 0.5 mg/L DDP 和 5-Fu 的培养基中生长良好的 CNE2/DDP 及 CNE2/DDP+5Fu 细胞系, 然后再脱药培养 2 个月后进行实验.

1.2.2 MTT 法测定细胞的增殖能力. 将 CNE2、CNE2/DDP、CNE2/DDP+5Fu 3 种细胞以 1 000 个 / 孔接种于 7 块 96 孔板中, 每孔 200 μl, 设置 5 个复孔. 每天检测一块板, 加入 10 g/L 的 MTT 20 μl, 继续培养 4 h 后弃掉培养基, 每孔加入 150 μl DMSO, 结晶溶解后在酶标仪上检测 570 nm 波长的吸光度值(A), 计算平均值, 并绘制生长曲线图.

1.2.3 MTT 法测定药物对细胞的敏感性. 将 CNE2、脱药培养的 CNE2/DDP 及 CNE2/DDP+5Fu

3 种细胞以 5 000 个 / 孔接种于 96 孔板中, 每孔 200 μl. 第二天待细胞贴壁后加入药物浓度呈 2 倍递增的 DDP, 共设 7 个浓度梯度、一个不加药物的对照孔, 各种药物浓度做 4 个平行孔. 培养 48~72 h 后, 按照步骤 1.2.2 的方法检测 A 值, 并计算出抑制率, 其计算公式为: (对照孔的 A 值-实验孔的 A 值)/ 对照孔 A 值×100%, 通过 SPSS 11.5 软件中的 Probit 法计算出药物作用 50%的抑制浓度 (IC₅₀). 以上实验重复 3 次.

1.2.4 总 RNA 的抽提及 cDNA 的合成. 取对数生长期的 CNE2、CNE2/DDP、CNE2/DDP+5-Fu 细胞各 2×10⁶, 加入 1 ml Trizol, 用氯仿抽提, 异丙醇沉淀, 75%乙醇洗涤沉淀, 晾干后用灭活的 DEPC 水溶解沉淀, 测定纯度、浓度及电泳检测 RNA 有无降解. 对经检测完好的 RNA 进行逆转录反应, 按照 PrimeScript™ 逆转录试剂盒说明书进行 cDNA 的合成.

1.2.5 实时荧光定量 RT-PCR. 用在线引物设计软件 PRIMER3 设计 10 种 ABC 转运蛋白以及 β-actin 的引物(表 1), 采用荧光定量 PCR 法检测各基因 mRNA 的表达, 检测方法同前^[9]. 以上实验均重复 3 次, 结果以 Ct 值显示(Ct 值为每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数). 采用相对定量法来比较 mRNA 表达的差异: 以敏感细胞为对照, β-actin 为内参, 计算耐药细胞和敏感细胞的 ΔCt 值(目的基因与内参基因的差值)及 ΔΔCt 值(耐药细胞和敏感细胞 ΔCt 值的差值), 通过 2^{-ΔΔCt} 法分析耐药细胞与敏感细胞之间 10 种 ABC 转运蛋白的表达有无差异.

Table 1 Gene-specific PCR primer sequences (5'~3')

Gene name	Forward primer	Reverse primer	Size/bp
ABCA2	agatggacaagatgatcgag	gctgttacttcaggatgagg	201
ABCB1	taatcgacaggagatagg	aagaacaggactgatggc	212
ABCC1	gaggaagggagttcagttctt	acaagacgagctgaatgagt	182
ABCC2	ctcacttcagcgagaccg	ccagccagttcagggttt	285
ABCC3	ctcttcactgtgtgcatcct	tggagatgatgtagggtag	247
ABCC4	tcaatcatactcaggaacc	accagttgtctttgtccaac	203
ABCC5	acctgccagaattaagaaca	tccagataactcaccagac	223
ABCC6	gcaactggacagacntagag	gagctcaggtcggatctta	173
ABCC11	ctgaggttcagagaacaag	actcagagacttcacgcatt	192
ABCG2	acctgaaggcatttactgaa	tctttccttcagctaagac	214
β-Actin	caccagcacaatgaagat	caataaagccatgccaat	255

1.2.6 免疫细胞化学. 根据荧光定量 PCR 结果, 挑选在两株耐药细胞中表达均上调的 ABC 转运蛋

白, 进一步通过免疫细胞化学法验证. 取对数期生长的 3 种细胞制备成细胞爬片, 用内源性生物素阻

断试剂盒加以封闭, 然后按照 SP 法试剂盒说明进行, DAB 显色 1~2 min, 苏木素复染, 常规脱水、透明, 中性树胶封片. 用 PBS 代替一抗作为空白对照, 结果在光学显微镜下进行观察、判定.

1.3 统计学处理

用 SPSS11.5 统计软件分析数据, 采用独立样本 *t* 检验分析各细胞的 IC_{50} , 用单因素方差分析检验 ABC 转运蛋白在各细胞间表达的差异.

2 结果

2.1 细胞增殖能力的测定

通过 MTT 法检测 3 种细胞的增殖能力, 并绘制生长曲线(图 1). 该生长曲线结果显示 3 种细胞在增殖能力上没有统计学差异(经单因素方差分析, $F=0.19$, $P=0.83 > 0.05$).

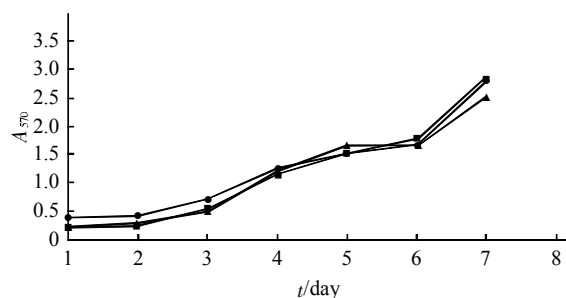


Fig. 1 Cell growth curve of three cells

●—●: CNE2; ■—■: CNE2/DDP; ▲—▲: CNE2/DDP+5Fu.

2.2 对 DDP 耐药性测定的结果

通过 SPSS 统计软件中的 Probit 法计算出 3 种细胞的 IC_{50} 及耐药指数(图 2). 经单因素方差分析, 3 组细胞的 IC_{50} 相比, 有显著统计学差异($F=41.25$, $P=0.000\ 31 < 0.01$). 组间多重比较采用 LSD 检验, 与 CNE2 相比, CNE2/DDP、CNE2/DDP+5Fu 的耐药性显著增加(P 值分别为 0.000 11、0.015, 均 < 0.01), 同时 CNE2/DDP+5Fu 与 CNE2/DDP 相比, 耐药性也显著增加($P=0.001\ 4 < 0.01$). 耐药指数分别为 2.58(CNE2/DDP)、5.31(CNE2/DDP+5Fu), 即 CNE2/DDP 对 DDP 的耐药性增加了 2.58 倍, 而联合诱导耐药的 CNE2/DDP+5Fu 的耐药性增加了 5.31 倍.

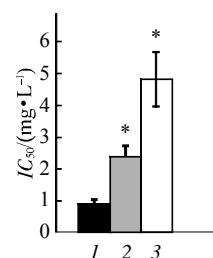


Fig. 2 Comparison of IC_{50} of three cells against cisplatin

1: CNE2; 2: CNE2/DDP; 3: CNE2/DDP+5Fu. * $P < 0.05$ vs CNE2.

2.3 总 RNA 的抽提

3 种细胞的总 RNA 电泳图见图 3. 从电泳图可以看出 3 种细胞的 RNA 完整未降解, A_{260}/A_{280} 比值均介于 1.8~2.0 之间, 能够满足下一步检测需要.

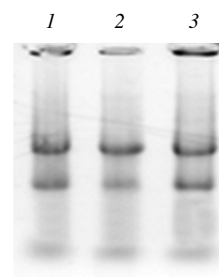


Fig. 3 RNA electropherogram of total RNA for three cells

1: CNE2; 2: CNE2/DDP; 3: CNE2/DDP+5Fu.

2.4 荧光定量 RT-PCR 结果

荧光定量 RT-PCR 结果显示, 所有样品的扩增曲线均到达平台期, 每个产物的融解曲线均呈单一的峰. 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值分析在耐药细胞中上调的差异表达蛋白(表 2, 图 4). 统计结果表明, 与 CNE2 相比, 10 种蛋白质中只有 ABCC2 在两株耐药细胞中表达均上调(P 均小于 0.01). 在 CNE2/DDP 细胞中 ABCC2 的表达上调了 2.50 倍, CNE2/DDP+5Fu 上调了 4.08 倍. 在 CNE2/DDP+5Fu 细胞中表达上调的还有 ABCC5(1.53 倍)和 ABCG2(2.73 倍).

Table 2 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ value of 10 ABC transporters in three cells

	A2	B1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C11	G2
1	1.21±0.17	0.84±0.18	0.72±0.06	2.50±0.27*	0.62±0.14	0.36±0.87	0.44±0.05	0.90±0.06	1.22±0.08	1.21±0.60
2	1.11±0.17	1.27±0.22	0.42±0.11	4.08±0.43*	1.03±0.17	1.80±0.31	1.53±0.19*	0.11±0.06	1.35±0.42	2.73±0.31*

1: CNE2/DDP vs. CNE2; 2: CNE2/DDP+5Fu vs. CNE2. * $P < 0.05$.

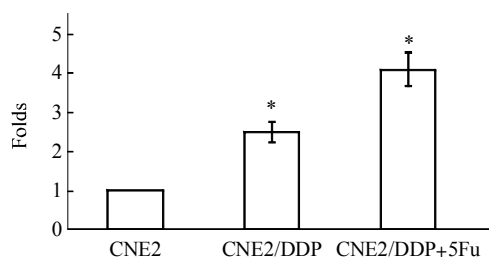


Fig. 4 Comparison of ABCC2 expression in three cells

* $P < 0.05$ vs. CNE2.

2.5 免疫细胞化学结果

各组细胞 ABCC2 免疫组化的结果见图 5。从图 5 中可以看到, 未经处理的 CNE2 细胞可见细胞浆有淡黄色颗粒(图 5a, 黑色箭头)着色, 未见胞核着色, 而 CNE2/DDP 及 CNE2/DDP+5Fu 细胞的胞浆中可见棕黄到棕褐色着色, 染色强度较 CNE2 强, 表明耐药细胞 ABCC2 的表达增加(图 5b, c)。CNE2/DDP+5Fu 的细胞中还可可见少数细胞核着色的细胞(图 5c, 红色箭头所指)。

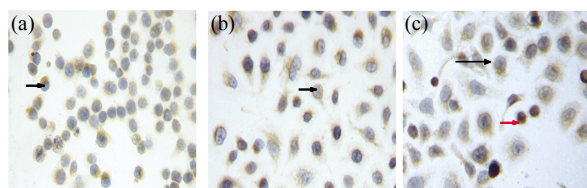


Fig. 5 Immunocytochemistry results

(SP method, DAB staining, $\times 200$)

(a) CNE2. (b) CNE2/DDP. (c) CNE2/DDP+5Fu.

3 讨 论

DDP 是临床上鼻咽癌化疗最有效的药物之一, 以 DDP 为基础的联合化疗在鼻咽癌的治疗中具有重要的地位, 最常用的联用药物之一是 5-Fu。目前已有关于鼻咽癌顺铂耐药细胞的报道^[7], 但未考虑联合诱导对细胞耐药性的影响。因此, 结合临床用药的规律, 本研究采用大剂量药物冲击的方式, 分别以 DDP 及 DDP+5-Fu 来诱导细胞耐药。经过 1 年的诱导, 得到两株细胞增殖能力与正常细胞较一致的耐药株, 分别为 CNE2/DDP, CNE2/DDP+5-Fu 耐药株, 耐药指数分别为 2.58 和 5.31, 联合诱导耐药的 CNE2 比单独用 DDP 诱导的 CNE2 对 DDP 表现出更强的耐药性。耐药指数是评价新建耐药细胞系的重要标准, 耐药指数小于 5 为低度耐

药, 5~15 为中度耐药, 大于 15 为高度耐药^[8]。

许多研究均表明 ABCB1, 即多药耐药基因 1 (multidrug resistant gene 1, MDR1)、糖蛋白 P-gp, 以及 ABCC1, 即多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistant protein 1, MRP1) 与大多数肿瘤的耐药性相关^[4,9]。但有研究表明在鼻咽癌中这两个蛋白质的表达与 DDP 的敏感性无关^[10]。这些蛋白质都属于 ABC 转运蛋白家族。目前认为与肿瘤耐药密切相关的 ABC 转运蛋白有 10 种^[4,9]。为进一步探讨这些 ABC 转运蛋白与 DDP 耐药的关系, 我们对这两株耐药细胞 10 种 ABC 转运蛋白的 mRNA 表达水平进行荧光定量 PCR 检测, 结果发现与未处理的 CNE2 相比, 在两株耐药细胞中只有 ABCC2 的表达均上调。ABCC2 的 mRNA 表达在 CNE2/DDP 细胞中上调了 2.50 倍, 在 CNE2/DDP+5FU 中上调了 4.08 倍。结合耐药指数 (CNE2/DDP 为 2.63, CNE2/DDP+5Fu 为 5.35), 我们发现, ABCC2 表达较高的细胞对 DDP 的耐药性也较高, 这就提示 ABCC2 有可能在鼻咽癌 DDP 耐药的过程中发挥着重要的作用。

进一步通过细胞免疫化学法, 我们发现, ABCC2 在两株耐药细胞株中的表达强度均强于敏感的 CNE2, 同时联合诱导耐药的 CNE2/DDP+5Fu 中有的细胞为核表达。有研究表明, ABCC2 的表达与卵巢癌的耐药性相关, 并且 ABCC2 不但可在细胞膜中表达, 也可在细胞核膜中表达^[11], 而对耐 DDP 的卵巢癌细胞的 ABCC2 进行 RNA 干扰后, 发现干扰后细胞核 ABCC2 的表达显著降低^[12]。DDP 主要作用的靶点正是细胞核内的 DNA, 那么就有可能在鼻咽癌细胞 CNE2 中, 由于 ABCC2 表达的上调, 使进入细胞内特别是细胞核内的 DDP 被排出细胞外, 从而导致细胞核内的 DDP 达不到能够损伤 DNA 的浓度, 从而引起细胞的耐药性。这可能就是 CNE2/DDP+5Fu 比 CNE2/DDP 更加耐药的原因。至于为什么 ABCC2 会在 CNE2/DDP+5Fu 的细胞核中表达, 具体机制还有待进一步探讨。

我们还发现, 在 CNE2/DDP+5Fu 的细胞中, ABCC5 及 ABCG2 的表达也有一定程度的上调。Susan 等^[13]通过对 HEK 细胞中进行 ABCC5 的转染, 发现转染的细胞对 5-Fu 的耐药性增加了 9 倍。这提示 ABCC5 的表达可能与 5-Fu 有关。有关这方面的报道尚不多, 还需进一步的研究。目前 ABCG2 基因作为干细胞表面标志物的意义受到关注^[14], 我们的结果发现, 在联合诱导的细胞中

ABCG2 的表达上调,这就引伸出一个问题:在联合用药过程中干细胞的数量是否会增加? ABCG2 与鼻咽癌耐药性尤其是鼻咽癌干细胞耐药性之间的关系值得进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 刘华英,彭淑平,周 鸣,等.鼻咽癌的表现遗传学研究进展.生物化学与生物物理进展,2007, **34**(7): 673~681
Liu H Y, Peng S P, Zhou M, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(7): 673~681
- 2 李子煌,李先明.局部晚期鼻咽癌放疗加化疗研究的进展.中国肿瘤临床,2006, **33**(18): 1076~1079
Li Z H, Li X M. Chin J Clin Onco, 2006, **33**(18): 1076~1079
- 3 Michael D, Andrey R, Rando A. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Genome Res, 2001, **11**: 1156~1166
- 4 Michael D, Tito Fojo, Susan Bates. Tumor stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer, 2005, **5**: 275~284
- 5 曹漫明,张积仁,汪森明,等.卵巢癌 DDP 耐药细胞中 DNA 转录与修复相关基因的表达.第一军医大学学报,2005, **25**(12): 1478~1481
Cao M M, Zhang J R, Wang S M, *et al.* J First Mil Med Univ, 2005, **25**(12): 1478~1481
- 6 杜莎莎,姚开泰.鼻咽癌中 ABC 转运蛋白基因表达的研究.南方医科大学学报,2008, **28**(3): 449~452
Du S S, Yao K T. J South Med Univ, 2008, **28**(3): 449~452
- 7 姜润德,张立新,岳 文,等.人鼻咽癌顺铂耐药细胞系(CNE2/DDP)的建立及耐药相关基因的筛选.癌症,2003, **22**(4): 337~345
Jiang R D, Zhang L X, Yue W, *et al.* Chin J Cancer, 2003, **22**(4): 337~345
- 8 Snow K, Judd W. Characterization of adriamycin and amsacrine resistant human leukaemic T cell lines. Br J Cancer, 1991, **63**(1): 17~28
- 9 AM Calcagno, IW Kim, CP Wu, *et al.* ABC drug transporters as molecular targets for the prevention of multidrug resistance and drug-drug interactions. Curr Drug Deliv, 2007, **4**(4): 324~333
- 10 陶仲强,刘时才,司勇锋,等.鼻咽癌组织多药耐药基因的表达及其与化疗敏感性的关系.中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2005, **40**(3): 203~207
Tao Z Q, Liu S C, Si Y F, *et al.* Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2005, **40**(3): 203~207
- 11 Pawel Surowiak, Verena Materna, Irina Kaplenko, *et al.* ABCC2 (MRP2, cMOAT) can be localized in the nuclear membrane of ovarian carcinomas and correlates with resistance to cisplatin and clinical outcome. Clin Cancer Res, 2006, **12**: 7149~7158
- 12 Verena Materna, Alexandra Stege, Pawel Surowiak, *et al.* RNA interference-triggered reversal of ABCC2-dependent cisplatin resistance in human cancer cells. Biochem Biophys Res Commun, 2006, **348**: 153~157
- 13 Susan Pratt, Robert L. Shepard, Ramani A. Kandasamy. The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. Mol Cancer Ther, 2005, **4**: 855~863
- 14 Zhou S, Morris J J, Barnes Y, *et al.* Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99**(19): 12339~12344

Expression of Ten ABC Transporters in Cisplatin-resistant Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines*

XIE Si-Ming**, DU Sha-Sha, FANG Wei-Yi, YAO Kai-Tai****

(Cancer Research Institute, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Ten ATP binding cassette (ABC) transporters are confirmed to be associated with resistance against anticancer drugs. To investigate the relationship between these ten ABC transporters and the nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2 resistant to cisplatin, cisplatin and cisplatin with 5-fluorouracil were used to induce the CNE2 cell to acquire the drug-resistance for 1 year. After these cells were cultured without drugs for 2 months, the MTT assay method was used to determine the dose-effect relationship of cisplatin and resistant index. Quantitative real time polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expression of ten ABC transporters in CNE2 and the drug-resistant CNE2 cells, and the result was confirmed by immunocytochemical method. The results of MTT method showed that two cell lines resistant to cisplatin (named as CNE2/DDP) and cisplatin with 5-fluorouracil (named as CNE2/DDP+5Fu) were established, with resistant index 2.58 and 5.31, respectively. Of ten ABC transporters, only ABCC2 was found to be up-regulated both in CNE2/DDP and CNE2/DDP+5Fu cells, for increasing about 2.50 and 4.08 folds, respectively. The results of immunocytochemical method also confirmed

that the expression of ABCC2 in CNE2/DDP and CNE2/DDP+5Fu cells were stronger than that in CNE2 cell. Furthermore, ABCC2 protein was found to be located at nuclear membrane of CNE2/DDP+5Fu cell but not at nuclear membrane of CNE2 cell. The results suggest that ABCC2 may play an important role in cisplatin-resistance of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2.

Key words nasopharyngeal carcinoma, cisplatin, multidrug resistant, ABC transporters

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00592

*This work was supported by grants from Guangzhou Municipal Science and Technology Bureau Scientific and Technological Project(2006z3-E4051) and Natural Science Foundation of Guangdong Province (05004718).

**Postdoctoral fellow in postdoctoral station of clinical medicine, Jinan University. E-mail: xsming@sina.com

***Corresponding author.

Tel: 86-20-62789100, E-mail: ktyao@fimmu.com

Received: August 26, 2008 Accepted: October 13, 2008