

抑癌基因 *Pdcd4* 的表达调控及产物泛素化研究进展

曹春明 孙震晓*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要 程序性细胞死亡因子 4 (programmed cell death 4, *Pdcd4*) 基因是近年新发现的一种抑癌基因, 它的表达产物通过抑制相关基因的转录和翻译抑制肿瘤生成。 *Pdcd4* 在多种人肿瘤组织细胞中表达缺失或低表达。 有研究发现, 5' CpG 岛的甲基化可能是脑胶质瘤中 *Pdcd4* 基因沉默的主要原因之一。 另外, 在多种肿瘤细胞中发现 microRNA-21 的表达水平与 *Pdcd4* 蛋白的表达呈负相关性, microRNA-21 在转录后水平调控 *Pdcd4*, 其作用位点位于 *Pdcd4* mRNA 的 3'-UTR 区。 肿瘤细胞中 *Pdcd4* 的表达水平与细胞对抗肿瘤药物的敏感性有关, 上调 *Pdcd4* 表达会增加细胞对某些抗肿瘤药物的敏感性, 反之, 下调 *Pdcd4* 表达则会引起某些药物细胞毒活性的减弱。 有些药物本身也可以影响细胞中 *Pdcd4* 的表达水平。 *Pdcd4* 可以抑制 p53 的乙酰基化。 *Pdcd4* 蛋白能被蛋白激酶 Akt/PKB 磷酸化, 引起 *Pdcd4* 的核易位, 并减弱 *Pdcd4* 对转录激活因子 AP-1 的抑制作用。 *Pdcd4* 可以被蛋白激酶 S6K1 磷酸化并在泛素连接酶 SCF^{TRCP} 介导下经泛素化途径降解。

关键词 *Pdcd4*, DNA 甲基化, microRNA-21, Akt, 泛素化

学科分类号 R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00597

程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death 4, *Pdcd4*)是近年新发现的一种肿瘤抑制因子, 最初发现其在致癌性转化小鼠表皮细胞模型 JB6(P-)中能抑制由致癌物质诱发的致癌性转化^[1]。 *Pdcd4* 可与真核细胞翻译起始复合物中的 eIF4A 起始因子等直接作用, 通过封闭 eIF4A 的解旋酶活性以及 eIF4A 与 eIF4G 的结合而抑制与细胞增殖有关的转录因子的合成^[2]。

目前已经发现 *Pdcd4* 在多种肿瘤组织中表达下调或缺失, 其中包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤和肝细胞癌等多种恶性肿瘤^[3-10]。 *Pdcd4* 作为一个新的抑癌基因开始引起人们的关注, *Pdcd4* 的研究也成为癌症研究领域的新的热点。 国内该领域研究刚刚起步, 尚未发现有关 *Pdcd4* 研究进展的文献报道。 本文主要报告有关 *Pdcd4* 基因表达调控及产物泛素化途径方面的研究进展。

1 *Pdcd4* 基因的转录及其调控

Shibahara 等^[11]最初克隆到小鼠 *MA-3* 基因(即 *Pdcd4* 基因), 并且发现在小鼠胸腺细胞、T 细胞、B 细胞和嗜铬细胞瘤细胞等细胞系中 *Pdcd4* mRNA

均被诱导表达。 RNA 印迹分析结果显示, 小鼠 *Pdcd4* mRNA 长约 2.2 kb, 但是在睾丸组织中却检测到了一个 1.9 kb 大小的额外转录物^[12]。 *Pdcd4* mRNA 几乎在小鼠所有组织中均有表达, 其中在胸腺组织中表达最强^[13], 其次是肝脏、睾丸、肺、脑、肾、脾, 在心脏和骨骼肌中表达量较低^[12]。 以上这些结果说明 *Pdcd4* 基因的表达存在组织特异性。

有研究发现逆转录病毒原癌基因 *v-myb* 编码的转录因子 v-Myb 能诱导鸡 *Pdcd4* 基因的表达。 并且还发现在鸡 DT40 B 细胞中 v-Myb 的靶向断裂能够降低 *Pdcd4* 基因的表达。 在 *Pdcd4* 启动子区存在着 Myb 结合部位, 并且经实验证明这些结合部位具有功能活性^[13]。 Murakami 等^[14]发现, 在鼠表皮细胞 JB6(P+)中 13-HOA (1.6~40 μmol/L, 亚油酸的一种代谢产物)会明显地诱导 *Pdcd4* mRNA 的表达, 而 LA(亚油酸)却不能, 而且 13-HOA (8~40 μmol/L)呈浓度依赖性地抑制由佛波酯 (Phorbol-12-myristate-13-acetate, TPA)诱导的细胞集落形成,

* 通讯联系人。

Tel: 010-84738646, E-mail: sunzxcn@hotmail.com

收稿日期: 2009-10-13, 接受日期: 2009-12-21

这是首次在食物化学领域发现有物质能够诱导细胞中 *Pdcd4* 的表达。

Gao 等^[15]在对神经胶质瘤的研究中发现 *Pdcd4* 基因 5' CpG 岛的甲基化作用阻断了 *Pdcd4* 在 mRNA 水平的表达, 它是 *Pdcd4* 基因沉默的主要原因. 通过使用一种 DNA 甲基转移酶抑制剂, 5-氮杂-2'-脱氧胞苷酸, 阻断神经胶质瘤细胞中的甲基化作用, 可以恢复 *Pdcd4* 基因的表达, 抑制细胞增殖, 并且降低细胞集落形成能力. 研究发现, 在 47% (14/30) 的神经胶质瘤组织中存在 *Pdcd4* 基因的 5' CpG 岛的甲基化作用, 同时还明显地伴随着 *Pdcd4* mRNA 表达的缺失。

2 *Pdcd4* 基因的转录后水平调控

MicroRNA(miRNA)是一类内生的、长度约 20~24 个核苷酸的单链小 RNA. 通过与靶 mRNA 3'-UTR 区完全或部分互补结合, 导致靶 mRNA 降解或转录后翻译抑制, 从而调控靶基因的表达. MicroRNA-21(miR-21)是在肺癌、乳腺癌、胃癌、前列腺癌、结肠直肠癌、脑瘤、头颈癌、恶性胶质瘤、食道癌和胰腺癌等实体瘤中唯一检出的普遍上调的 miRNA, 所以它与肿瘤的发生有着密切的关系。

Frankel 等^[16]对乳腺癌 MCF-7 细胞的研究中发现, *Pdcd4* 是 miR-21 的一个重要的功能靶点. 通过在细胞中导入 LNA-miR-21(miRNA 抑制剂)来抑制内源 miR-21, 阻止其靶标 RNA 因与 miR-21 结合而引起的降解, 结果发现, *Pdcd4* 蛋白表达量高于未导入 LNA-miR-21 的细胞中的表达量, 说明 *Pdcd4* mRNA 是 miR-21 的有效靶标. 此外, 在结肠直肠癌、恶性胶质瘤、食道鳞状上皮癌和心肌细胞中也发现 *Pdcd4* 蛋白的表达与 miR-21 呈负相关性^[17-20]. 抑制 miR-21 的表达会增加恶性胶质瘤 T98G 细胞中内源性 *Pdcd4* 的量, 而过表达 miR-21 却会抑制 *Pdcd4* 依赖的细胞凋亡^[18]. 研究还发现, 在转染了 anti-miR-21 的细胞中, *Pdcd4* 蛋白水平增加而其 mRNA 水平却不发生变化, 这说明 miR-21 对 *Pdcd4* 的调节作用发生在转录后水平^[17].

Asangani 等^[17]发现, 在 *Pdcd4*-3'-UTR 中的 228~249 nt 处含有一个保守的 miR-21 作用位点. 结肠直肠癌 Colo206F 细胞中转染 miR-21 能明显地抑制含有 *Pdcd4*-3'-UTR 的荧光酶报告基因, 然而转染 anti-miR-21 后 *Pdcd4*-3'-UTR 的荧光酶标记活性增强, 当 miR-21/nt228~249 靶点发生突变时, 此

功能也会消失。

3 *Pdcd4* 蛋白的合成与修饰

Jansen 等^[21]对 NCI 体外药物筛选体系包含的 60 种各类肿瘤细胞系中的 *Pdcd4* 蛋白表达情况做了分析, 结果发现, 5/6 的来源于中枢神经系统的肿瘤细胞系显示 *Pdcd4* 蛋白的完全缺失, 8/9 的非小细胞肺癌细胞系和 5/7 的肾癌细胞系中 *Pdcd4* 的蛋白水平低于平均水平. 然而, 7/8 的黑色素瘤细胞系中的 *Pdcd4* 蛋白水平高于平均水平. 因此, *Pdcd4* 蛋白表达普遍减少的细胞系有肺、神经胶质瘤、中枢神经系统肿瘤、肾癌等. Chen 等^[2]通过免疫组化研究了 124 例包含不同亚型的原发性肺癌标本, 结果显示, 83% 的肿瘤标本有 *Pdcd4* 蛋白表达缺失, 对比原发性肺癌及肺正常组织中 *Pdcd4* mRNA 的表达, 发现肺腺癌组织中 *Pdcd4* mRNA 的表达水平比正常肺组织中的显著降低. 但 Kalinichenko 等^[22]研究了人肺癌中 *Pdcd4* 在蛋白质水平和 mRNA 水平的相关性, 发现 *Pdcd4* 基因 mRNA 表达的减少并不会伴随着相应比例的 *Pdcd4* 蛋白的减少。

Cmarik 等^[1]通过使用 anti-H731(即抗人 *Pdcd4*) 抗体做 Western blot 分析发现, 小鼠 JB6 细胞中 *Pdcd4* 蛋白的分子条带有 54 ku 和 64 ku 两条, Jansen 等^[21]在对多种人细胞系中的 *Pdcd4* 的研究后最终确定 *Pdcd4* 的蛋白条带在 54 ku。

Palamarchuk 等^[23]研究发现, Akt/PKB 能磷酸化 *Pdcd4* 蛋白并且调控 *Pdcd4* 蛋白在细胞中的定位. Akt/PKB 能够在体内外特异性地使 *Pdcd4* 的 Ser⁶⁷ 和 Ser⁴⁵⁷ 磷酸化, 进一步研究表明 Akt/PKB 引起的 *Pdcd4* 磷酸化导致了 *Pdcd4* 的核易位. *Pdcd4* 蛋白在正常生长情况下大多数是核内蛋白, 但是当正常组织细胞周围环境发生改变时, 细胞核中的 *Pdcd4* 蛋白会通过核输出信号(NES)转移到细胞浆中^[24].

4 *Pdcd4* 蛋白与某些药物及其他抑癌基因的相互关系

癌细胞中的 *Pdcd4* 蛋白表达水平与药物对其作用的敏感程度有一定的关联. 转染反义 *Pdcd4* 会明显减弱肾癌 UO-31 细胞对格尔德霉素的敏感性, 说明细胞中 *Pdcd4* 的表达下调会引起格尔德霉素细胞毒性的减弱^[25]. 此外, 我们采用脂质体转染法将带有全长 *Pdcd4* cDNA 的质粒转入人胃腺癌 BGC-823 细胞中, 增强了细胞中 *Pdcd4* 蛋白的表

达, 结果发现亦能增强 BGC-823 细胞对羟基喜树碱(HCPT)的敏感性^[25].

研究发现, 有些药物本身可以诱导 *Pdcd4* 的表达. 如视黄酸受体(RAR)激动药、抗雌激素药和 HER-2/neu 拮抗剂能诱导乳腺癌 T-47D 细胞中 *Pdcd4* 的表达, 实验结果发现, T-47D 细胞中 *Pdcd4* 基因的表达在 RAR- α 类激动剂 Am580 处理后升高了至少 3 倍^[26]. 我们采用 80 μ mol/L 羟基喜树碱(HCPT)作用人胃癌 BGC-823 细胞 72 h 后, Western blot 法检测发现细胞中 *Pdcd4* 蛋白表达量明显升高, 说明羟基喜树碱能显著上调 BGC-823 细胞中 *Pdcd4* 蛋白表达量^[25]. 用转化生长因子 β (TGF- β)处理人肝癌 Huh7 细胞也会增加 *Pdcd4* 的表达并且引起细胞凋亡^[27]. 此外, 用环氧化酶 2 (COX-2)抑制剂 NS-398 能显著提高直肠癌 NS-398 细胞中 *Pdcd4* mRNA 的表达水平^[28]. 我们在实验中发现, 与其他抗肿瘤药物不同, 去甲斑蝥素和紫杉醇反而引起 BGC-823 细胞中 *Pdcd4* 蛋白量显著减少, 尚不清楚是阻断了 *Pdcd4* 蛋白的表达还是诱导了 *Pdcd4* 的泛素化途径, 亦不清楚 *Pdcd4* 蛋白量的减少在去甲斑蝥素诱导肿瘤细胞凋亡中的意义, 但增加 BGC-823 细胞中 *Pdcd4* 蛋白的表达也可以增加细胞对去甲斑蝥素的敏感性(未发表资料).

Bitomsky 等^[29]研究发现, 下调 *Pdcd4* 会引起 p21(Waf1/Cip1)和其他受 p53 调控的基因表达增加, *Pdcd4* 的这一功能与 p53 的参与有关: *Pdcd4* 能抑制 p53 的活性却不改变 p53 的表达量, 进一步研究发现, *Pdcd4* 抑制 p53 的活性是通过抑制其乙酰化而实现的.

5 *Pdcd4* 蛋白的泛素化降解途径

Dorrello 等^[30]详细研究并阐明了 *Pdcd4* 的泛素化降解途径, 发现在 S6K1 和 β^{TRCP} 介导下 *Pdcd4* 会经泛素化途径发生降解. 在促细胞分裂素的刺激下, S6K1 被激活, 然后激活的 S6K1 使 *Pdcd4* 在 Ser⁶⁷ 处迅速磷酸化, 随后磷酸化的 *Pdcd4* 与泛素连接酶 SCF ^{β^{TRCP}} 结合被泛素化, 最后被蛋白酶体降解. 而 Ser⁶⁷ 突变的 *Pdcd4* 变异体却不能磷酸化, 所以不能被降解. 最近 Carayol 等^[31]研究结果显示, mTOR/p70 S6K 途径在 BCR-ABL- 转化的细胞中被组成性激活, 并且用甲磺酸伊马替尼(一种抗肿瘤药)抑制 BCR-ABL 激酶的活性会消除这种激活. 此外, 在转染了 BaF3/BCR-ABL 的 K562 细胞中抑制 BCR-ABL 激酶会上调 *Pdcd4* 蛋白的量, 所以慢

性髓细胞样白血病细胞中融合致癌基因 *bcl-abl* 的蛋白质表达产物 BCR-ABL, 参与了 p70 S6K 介导的 *Pdcd4* 泛素化途径的激活.

6 展 望

程序性细胞死亡因子 4 (*Pdcd4*)蛋白有多种生理功能, 作为一种肿瘤抑制因子, 它的缺失或下调与多种癌症的发生发展有密切的关系. *Pdcd4* 蛋白的缺失或下调可能与 *Pdcd4* 的转录调控有关(如 DNA 甲基化), 也可能发生在转录后水平, 还可以是 *Pdcd4* 蛋白泛素化降解途径的激活所致. 进一步阐明 *Pdcd4* 的表达与泛素化途径及其与癌症发生发展的关系, 特别是各种抗肿瘤药物对这些过程的影响, 有利于最大限度地提高现有化疗药物的治疗指数, 并为新的抗癌药物的发现提供新思路.

参 考 文 献

- [1] Cmarik J L, Min H Z, Hegamyer G, *et al.* Differentially expressed protein *Pdcd4* inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (24): 14037-14042
- [2] Yang H S, Jansen A P, Komar A A, *et al.* The transformation suppressor *Pdcd4* is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(1): 26-37
- [3] Chen Y, Knosel T, Kristiansen G, *et al.* Loss of *Pdcd4* expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *J Pathol*, 2003, **200**(5): 640-646
- [4] Wang Q, Sun Z, Yang H S. Downregulation of tumor suppressor *Pdcd4* promotes invasion and activates both beta-catenin/Tcf and AP-1- dependent transcription in colon carcinoma cells. *Oncogene*, 2008, **27**(11): 1527-1535
- [5] Wen Y H, Shi X, Chiriboga L, *et al.* Alterations in the expression of *Pdcd4* in ductal carcinoma of the breast. *Oncol Rep*, 2007, **18**(6): 1387-1393
- [6] 马 刚, 刘 江, 张 浩, 等. 程序性细胞死亡因子 4 在胃癌组织中的表达及临床病理学意义. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, **13** (7): 481-484
Ma G, Liu J, Zhang H, *et al.* *Chin J Cancer Prev Treat*, 2006, **13**(7): 481-484
- [7] 马 刚, 郭克建, 张 浩, 等. 程序性细胞死亡因子 4 在胰腺癌组织中的表达及临床病理学意义. *中国医学科学院学报*, 2005, **27** (5): 597-600
Ma G, Guo K J, Zhang H, *et al.* *Acta Acad Med Sin*, 2005, **27** (5): 597-600
- [8] Wang X, Wei Z, Gao F, *et al.* Expression and prognostic significance of *Pdcd4* in human epithelial ovarian carcinoma. *Anticancer Res*, 2008, **28**(5B): 2991-2996
- [9] Gao F, Zhang P, Zhou C, *et al.* Frequent loss of *Pdcd4* expression in

- human glioma: possible role in the tumorigenesis of glioma. *Oncol Rep*, 2007, **17**(1): 123–128
- [10] Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, *et al.* Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2006, **25**(45): 6101–6112
- [11] Shibahara K, Asano M, Ishida Y, *et al.* Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death. *Gene*, 1995, **166**(2): 297–301
- [12] Onishi Y, Hashimoto S, Kizaki H, *et al.* Cloning of the TIS gene suppressed by topoisomerase inhibitors. *Gene*, 1998, **215**(2): 453–459
- [13] Schlichter U, Burk O, Worpenberg S, *et al.* The chicken Pdc4 gene is regulated by v-Myb. *Oncogene*, 2001, **20**(2): 231–239
- [14] Murakami A, Nishizawa T, Yasuda M, *et al.* Linoleic acid metabolite suppresses skin tumor promotion in mice and induces programmed cell death protein 4 in mouse epidermal JB6 cells. *Carcinogenesis*, 2009, **30**(7): 1209–1216
- [15] Gao F, Wang X, Zhu F, *et al.* Pdc4 gene silencing in gliomas is associated with 5' CpG island methylation and unfavorable prognosis. *J Cell Mol Med*, 2009, **13**(10): 4089–4282
- [16] Frankel L B, Christoffersen N R, Jacobsen A, *et al.* Programmed cell death 4 (Pdc4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2008, **283**(2): 1026–1033
- [17] Asangani I A, Rasheed S A, Nikolova D A, *et al.* MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 2008, **27**(15): 2128–2136
- [18] Chen Y, Liu W, Chao T F, *et al.* MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor Pdc4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett*, 2008, **272**(2): 197–205
- [19] Lu Z, Liu M, Stribinskis V, *et al.* MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*, 2008, **27**(31): 4373–4379
- [20] Cheng Y H, Liu X J, Zhang S, *et al.* MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes *via* its target gene Pdc4. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, **47**(1): 5–14
- [21] Jansen A P, Camalier C E, Stark C, *et al.* Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity. *Mol Cancer Ther*, 2004, **3**(2): 103–110
- [22] Kalinichenko S V, Kopantzev E P, Korobko E V, *et al.* Pdc4 protein and mRNA level alterations do not correlate in human lung tumors. *Lung Cancer*, 2008, **62**(2): 173–180
- [23] Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, *et al.* Akt phosphorylates and regulates Pdc4 tumor suppressor protein. *Cancer Res*, 2005, **65**(24): 11282–11286
- [24] Bohm M, Sawicka K, Siebrasse J P, *et al.* The transformation suppressor protein Pdc4 shuttles between nucleus and cytoplasm and binds RNA. *Oncogene*, 2003, **22**(31): 4905–4910
- [25] 王汉卿, 孙震晓. 抑癌基因 Pdc4 的表达对羟基喜树碱细胞毒活性的影响. *世界华人消化杂志*, 2009, **17**(7): 647–651
Wang H Q, Sun Z X. *World Chinese J Digestology*, 2009, **17**(7): 647–651
- [26] Afonja O, Juste D, Das D, *et al.* Induction of Pdc4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis. *Oncogene*, 2004, **23**(49): 8135–8145
- [27] Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, *et al.* Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2006, **25**(45): 6101–6112
- [28] Zhang Z, DuBois R N. Detection of differentially expressed genes in human colon carcinoma cells treated with a selective COX-2 inhibitor. *Oncogene*, 2001, **20**(33): 4450–4456
- [29] Bitomsky N, Wethkamp N, Marikkannu R, *et al.* siRNA-mediated knockdown of Pdc4 expression causes upregulation of p21 (Waf1/Cip1) expression. *Oncogene*, 2008, **27**(35): 4820–4829
- [30] Dorrello N V, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, *et al.* S6K1- and β TRCP-mediated degradation of Pdc4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, 2006, **314**(5798): 467–471
- [31] Carayol N, Katsoulidis E, Sassano A, *et al.* Suppression of programmed cell death 4 (Pdc4) protein expression by BCR-ABL-regulated engagement of the mTOR/p70 S6 kinase pathway. *J Biol Chem*, 2008, **283**(13): 8601–8610

Proceedings on The Expression of Tumor Suppressor Gene *Pdcd4* and Ubiquitin Pathway of *Pdcd4* Protein

CAO Chun-Ming, SUN Zhen-Xiao*

(College of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Programed cell death 4 (*Pdcd4*) is a newly discovered tumor suppressor gene, which was found to inhibit oncogenesis by suppressing transcription and translation related genes. Expression of *Pdcd4* has been found loss or low in several types of human tumors. It is reported that 5' CpG island methylation is the predominant cause of *Pdcd4* mRNA silencing in gliomas. MicroRNA-21 regulates *Pdcd4* in post-transcription by binding *Pdcd4*, and the target site is at the *Pdcd4* mRNA 3'-UTR region. The mean *Pdcd4* protein levels in cells is correlated with the antitumor activity of some drugs, upregulation of *Pdcd4* expression may increase cytotoxicity of certain antitumor drugs and downregulation of *Pdcd4* expression may reduce cytotoxicity of certain antitumor drugs. Some antitumor drug may affect the expression of *Pdcd4*. *Pdcd4* interferes with the acetylation of p53. Phosphorylation of *Pdcd4* by Akt/PKB (protein kinase B) causes nuclear translocation of *Pdcd4* and a decreased ability to function as an inhibitor of AP-1(activator protein-1)-mediated transcription. Phosphorylated *Pdcd4* by protein kinase S6K1 can be degraded *via* the ubiquitin pathway by SCF^{βTRCP} ligase.

Key words *Pdcd4*, DNA methylation, microRNA-21, Akt, ubiquitination

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00597

*Corresponding author.

Tel: 86-10-84738646, E-mail: sunzxcn@hotmail.com

Received: October 13, 2009 Accepted: December 21, 2009