

Mash2 基因在体细胞克隆牛肺脏中 DNA 甲基化状态分析*

陈洁¹⁾ 李冬杰²⁾ 张萃¹⁾ 李宁²⁾ 李世杰^{1, 2, 4)**}

(¹⁾ 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; (²⁾ 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;

(³⁾ 河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018; (⁴⁾ 河北省牛羊胚胎工程技术研究中心, 保定 071001)

摘要 体细胞核移植(体细胞克隆)技术在动物生产、医药工业、治疗性克隆以及对珍稀濒危动物的拯救有重要意义, 然而克隆效率低下以及克隆动物发育异常, 严重制约了克隆技术的发展和應用。在体细胞核克隆中, 供体核来自高度分化的体细胞, 发生在核移植后几小时内供体核的重编程, 决定了克隆胚胎的发育能力。印记基因是由等位基因表观遗传修饰的不对称导致的基因表达具有亲本选择性, 而 DNA 甲基化是调控印记的一个主要方式。印记基因 *Mash2* 在胚胎发育和器官形成过程中起着非常重要的作用。为了探求核移植过程中 *Mash2* 基因 DNA 甲基化的表观重编程是否充分, 利用亚硫酸氢盐测序法对出生 48 h 内死亡的体细胞核移植牛和正常对照牛肺脏中 *Mash2* 基因的 DNA 甲基化状态进行分析。结果显示, 尽管位于 *Mash2* 基因启动子和第一个外显子处的 CpG 岛在正常牛和克隆牛中甲基化水平都不高(20.04%, 5.55%), 但克隆组的甲基化水平仍显著低于正常对照组 ($P < 0.05$)。甲基化模式正常组中 9N3 有 5 种不同的形式, 9N4 仅 1 种; 而克隆组 9C3 和 9C5 也分别是 1 种。推测 *Mash2* 基因的异常 DNA 甲基化很可能是导致克隆牛肺脏发育异常的一个重要原因。

关键词 DNA 甲基化, *Mash2*, 体细胞克隆, 牛

学科分类号 Q38, Q341

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00121

自从 1997 年第一个体细胞克隆动物“多莉”诞生以来^[1], 目前应用体细胞核移植技术已经相继得到了包括绵羊^[2]、牛^[3]、小鼠^[4]、山羊^[5]、猪^[6]、兔^[7]、猫^[8]、大鼠^[9]、马^[10]、骡子^[11]、狗^[12]、雪貂^[13]和野牛^[14]在内的 13 个物种的体细胞克隆个体, 应用这一技术还得到了猕猴的全能胚胎干细胞系^[15], 体细胞克隆将一个崭新的世界呈现在我们面前。这一技术的发展与应用不仅对动物生产、医药工业、治疗性克隆以及对珍稀濒危动物的拯救有重要意义, 而且涉及到“克隆人”的理论和伦理问题^[16], 然而克隆效率低下以及克隆动物发育异常严重制约了克隆技术的发展和應用。

在体细胞核克隆中, 供体核来自高度分化的体细胞, 在分化过程中, 体细胞核获得了高度特异的 DNA 和组蛋白的表观遗传修饰, 而发生在克隆后几小时内供体核的表观遗传修饰重编程, 决定了克

隆胚胎的发育能力, 然而目前对这些重编程过程了解较少^[17]。印记基因是由等位基因表观遗传修饰的不对称导致的基因表达具有亲本选择性^[18], DNA 甲基化是调控印记的一个主要方式^[19]。印记基因在哺乳动物胚胎和胎盘生长发育过程起十分重要的作用^[20], 而印记基因异常表达的遗传病人和印记基因定点敲除的小鼠中, 存在着和体细胞克隆动物类似的表型异常^[21-23], 所以印记基因在体细胞克隆动物中的重编程更引人关注。

Mash2 (mammalian achaete-scute complex

* 国家高技术研究发展计划(863)(2008AA101003)和国家自然科学基金资助项目(30972098)。

** 通讯联系人。

Tel: 0312-7528251, E-mail: lishijie20005@163.com

收稿日期: 2010-03-16, 接受日期: 2010-06-07

homologue-like 2)是父源印记母源表达基因,其编码构象为螺旋-环-螺旋的转录因子,刺激单核滋养层细胞增殖和抑制双核细胞形成^[24]。该基因的缺失会使成胶质细胞缺失及绒毛膜发育不完全,从而导致胎儿早期的子宫内死亡^[25]。我们在研究中发现,多数新生死亡的体细胞克隆牛表现出肺脏发育异常^[26],本试验运用亚硫酸氢盐测序法对印记基因 *Mash2* 在出生 48 h 内死亡的克隆牛和正常对照牛肺脏中的 DNA 甲基化状态进行检测,试图揭示 *Mash2* 基因 DNA 甲基化修饰的重编程与体细胞克隆动物肺脏发育异常的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物。

以 4 岁的优质荷斯坦母牛的皮肤成纤维细胞作为供体细胞进行核移植生产克隆牛,过程参见文献[27]。将出生 48 h 内死亡的体细胞核移植牛死后立即进行解剖,来自人工授精的正常对照牛在出生 48 h 内也被屠宰取样,采集的所有内脏器官样本放入液氮备用。

本实验选择 2 头出生死亡的体细胞核移植牛 9C3 和 9C5 的肺脏为实验材料:前者肺脏未充起并且肺泡壁肥厚;后者肺脏瘀血且六片肺叶互不相连。同时以 2 头正常母牛 9N3, 9N4 为对照。

1.1.2 主要试剂。 PMD18-T 载体、*EcoR* I 购自大连 TaKaRa 公司; Taq DNA 聚合酶购自北京 TianGen 公司; DNA 甲基化试剂盒购自北京 Zymo 公司; UNIQ-10 胶回收试剂盒、D2000marker 购自上海 Sagon 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取。 取少量肺脏组织剪碎于 1.5 ml 离心管中,加入 600 μ l DNA 提取液和 20 μ l 蛋白酶 K,混合物于 37℃ 消化过夜,次日通过传统的酚氯仿异戊醇法抽提,于无水乙醇中沉淀,最后再用 TE 溶解。

1.2.2 亚硫酸氢盐处理。 约 200 ng 的基因组 DNA 经 *EcoR* I 消化后,按照说明书用 DNA 甲基化试剂盒进行亚硫酸氢盐处理。

1.2.3 引物设计。 从 NCBI 数据库中获得牛 *Mash2* (DQ381723)基因序列,使用 Oligo 6.0 软件和在线软件 (<http://www.urogene.org/methprimer>), 针对 *Mash2* 基因亚硫酸氢盐转换后的 DNA 序列设计特

异性引物,要求引物中没有 CpG 位点并且转换的序列中引物序列要多于 2 个胞嘧啶^[11]。半巢式 PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,分别为,外(内)正向: 5' AAGGGGAGGTAAG-GGAAAGAG 3', 外反向: 5' ACCCCAAATTCAC-CAACTTCA 3', 内反向: 5' CTACCAAACTCC-CCCTAATAC 3'。

1.2.4 PCR 扩增及检测。 半巢式 PCR 扩增 *Mash2* 基因的 247 bp 片段,反应体系为 25 μ l: 17 μ l 双蒸水, 2.5 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液, 2 μ l dNTP, 2 μ l 亚硫酸氢盐转换后的 DNA 模板, 0.5 μ l 上游引物 (10 μ mol/L), 0.5 μ l 下游引物 (10 μ mol/L) 和 0.5 μ l Taq 酶。第一轮 PCR 程序如下: 94℃ 预变性 10 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。第一次 PCR 产物稀释 10 倍后取 2 μ l 作为第二轮模板,体系同上,程序如下: 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。二次 PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.2.5 克隆和 DNA 测序。 二次扩增产物通过 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳后在紫外灯下显影,切胶后利用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化凝胶,纯化后的片段与 PMD18-T 载体连接,涂板转化后每一个体各挑取 9 个单一的阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.6 数据分析。 依据文献[28-29],按甲基化的 CpG 含量将获得的序列结果分为两类:定义每一条链 mCpGs $\geq$ 50% 的为甲基化链, mCpGs < 50% 的为非甲基化链。计算每一个体中 mCpG 占全部 CpG 的百分比,通过 SPSS10.0 统计分析软件确定核移植个体和正常对照个体组间甲基化的差异显著性,当 $P < 0.05$ 时,差异显著; $P > 0.05$ 时,差异不显著。另外,还观测正常牛和体细胞核移植牛这两组个体中不同的甲基化模式,在被检测的 28 个 CpG 位点中,被测序的克隆中甲基化的 CpG 位点完全相同的为一种甲基化模式。

2 结果与分析

2.1 *Mash2* 基因 CpG 岛的分析

通过 MethPrimer 网站对该基因进行 CpG 岛预测分析,扩增其启动子和第一个外显子的部分序列共 246 bp,其中包括 28 个 CpG 位点(图 1)。

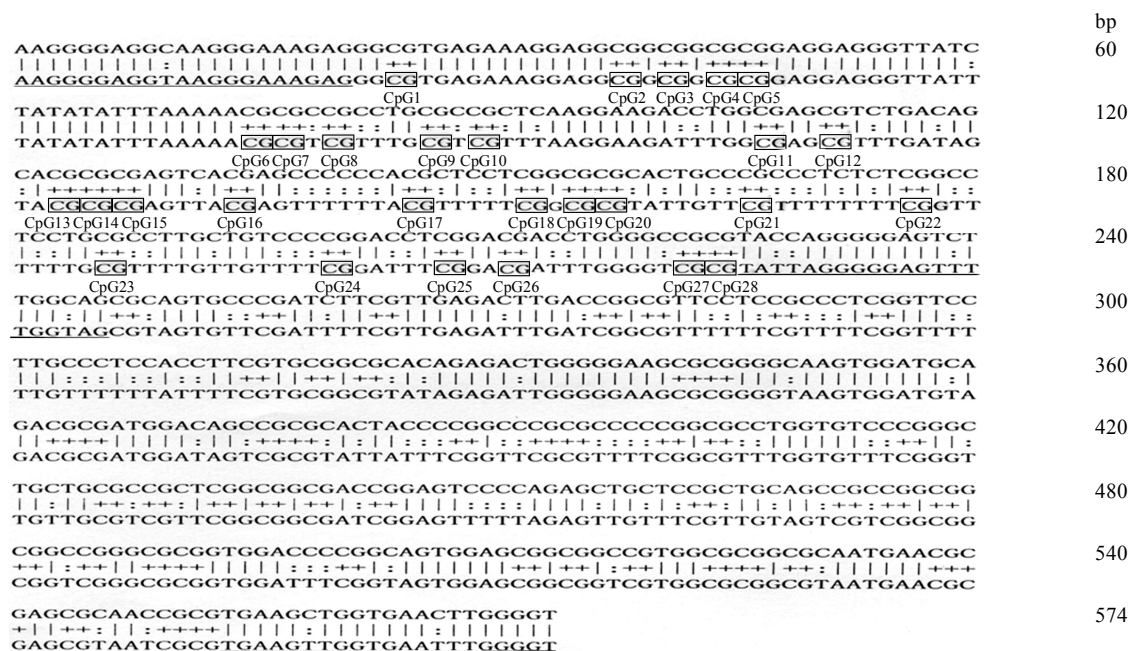


Fig. 1 Nucleotide sequences for a 247 bp *Mash2* fragment

DNA sequence of 5' regulatory region of *Mash2* gene (upper strands) and the sequence of bisulfite-converted DNA (lower strands), primer sequences are underlined, each CpG is numbered and shown in box.

2.2 PCR 扩增

以亚硫酸氢盐处理后的 DNA 为模板, 利用图 1 中所示引物(下划线)进行半巢式 PCR 扩增, 得到 *Mash2* 基因一段 247 bp 的片段, 电泳图见图 2, 其中包括图 1 中标出的 28 个 CpG 位点.

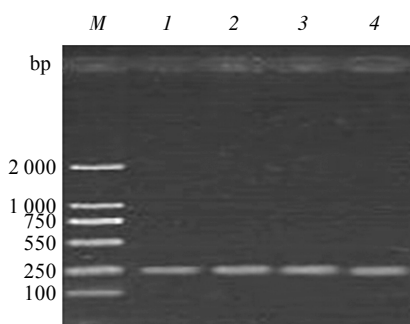


Fig. 2 Photographs of representative gels of *Mash2* gene from PCR analysis

M: DL2000 marker; 1~4: The PCR product of 9N3, 9N4, 9C3 and 9C5.

2.3 Mash2 基因甲基化状态

利用亚硫酸氢盐测序法, 检测了 *Mash2* 基因启动子和第一个外显子处 28 个 CpG 位点在两头正常对照牛和核移植牛的肺脏中的甲基化状态, 结果见图 3, 观察发现, 在正常对照和克隆牛中 *Mash2* 基因的 DNA 甲基化状态是不同的, 正常组 9N3 个体有 5 种不同的甲基化模式, 9N4 仅 1 种, 而克隆组 9C3 和 9C5 分别是 1 种甲基化模式. 全部的 mCpGs 占总 CpGs 百分比及平均甲基化水平的数据见表 1, 核移植组与正常对照组的甲基化水平分别为 5.55% 和 20.04%, 核移植显著低于正常对照组 ($P < 0.05$, 图 4), 克隆个体 9C5 甲基化水平极低, 被检测的 28 个 CpG 位点中甲基化程度仅为 0.4%.

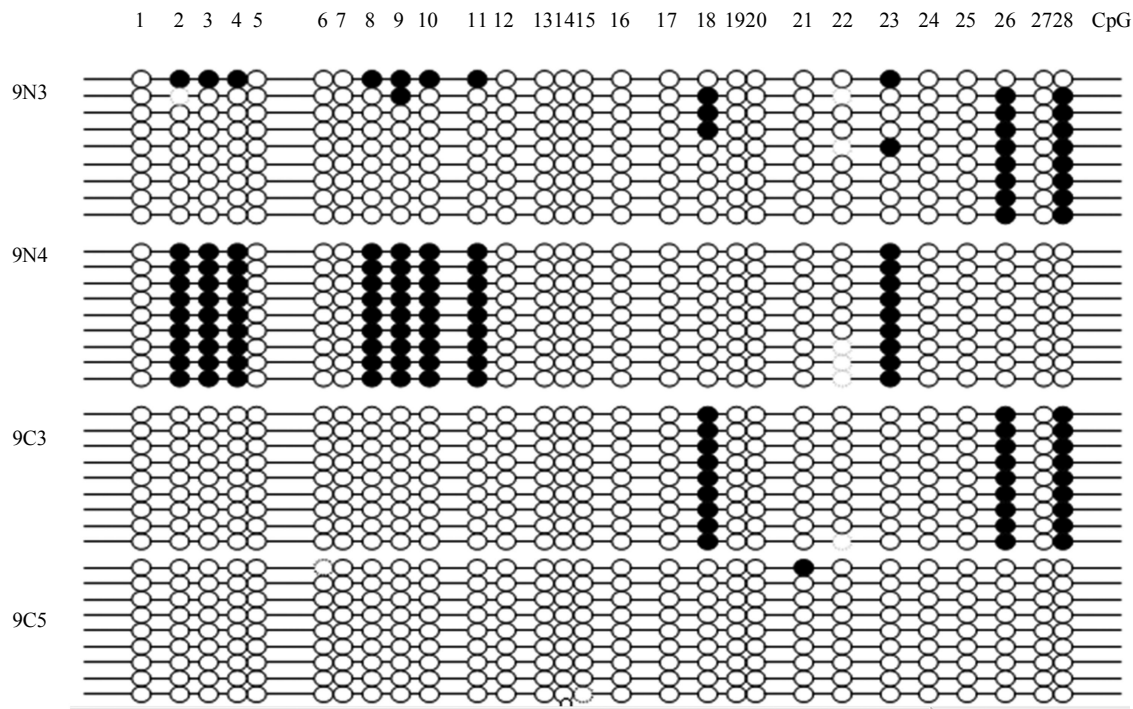


Fig. 3 Methylation profiles of 28 CpGs of *Mash2* in controls and clones

Opened and closed circles represent unmethylated and methylated CpGs. Dotted circles represent CpGs missing. 9N3 and 9N4 are normal controls which were killed within 48 h after birth, and 9C3 and 9C5 are clones which died within 48 h of birth.

Table 1 Summary of DNA methylation in the bovine *Mash2* gene

Gene	Sample	Number of clones analyzed	Percentage of strands with $\geq 50\%$ mCpGs/%	Percentage of mCpGs overall/%	Mean methylation levels/% ($n=18, \bar{x} \pm s$)/%
<i>Mash2</i>	N	9N3	0	11.65	20.04 $\pm$ 9.99
		9N4	0	28.92	
	C	9C3	0	10.76	5.55 $\pm$ 5.36*
		9C5	0	0.40	

N: Normal control; C: Clone group. * $P < 0.05$.

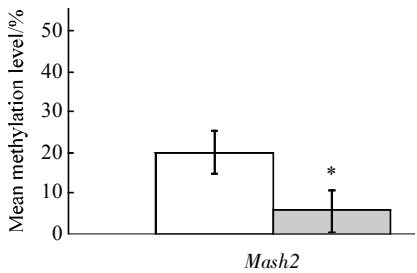


Fig. 4 Mean methylation levels of bovine *Mash2* gene

□: N(Normal control). ■: C(Clone group). * $P < 0.05$.

3 讨 论

哺乳动物体细胞克隆的成功, 使现代生物技术翻开了崭新的一页, 体细胞克隆与分子育种相结合, 可以迅速、大量地扩增优秀的畜禽资源. 与胚胎干细胞技术相结合, 可为人类器官移植提供所需的供体器官. 与转基因技术相结合, 可制备能生产重要医药蛋白的转基因动物, 应用于发育生物学和人类医学领域, 将为研究胚胎发育、核质关系、去分化和人类健康等基础理论的发展和完善提供试验基础.

因此, 高效的体细胞克隆技术和制备健康的体细胞克隆动物成为必需. 然而克隆技术的低效率和克隆动物的发育异常严重阻碍了克隆技术的应用和发展. 印记基因重编程紊乱在体细胞克隆动物中普遍存在^[30-32], 由于发生在 DNA ‘CG’ 二核苷酸上的甲基化是调控印记的一个主要方式, 所以关于印记基因甲基化在体细胞克隆动物的研究备受关注, 研究克隆小鼠胚胎和胎盘中印记基因的甲基化, 发现印记基因 *H19*^[31, 33]、*IGF2R*^[31]、*IGF2*^[33]、*Snprn*^[33] 存在异常甲基化状态. 在克隆牛胚胎中发现 *Snprn* 基因的 DMR 甲基化严重缺失, 并且在被检组织中呈双等位基因表达^[34]. 在克隆牛组织中 *H19* 基因^[35] 和 *Igf-2r*^[36] 的甲基化水平异常. 本研究利用亚硫酸氢盐测序法对印记基因 *Mash2* 在正常牛和克隆牛肺脏中的甲基化状态进行分析, 结果显示, 尽管位于 *Mash2* 基因启动子和第一个外显子处的 CpG 岛在正常牛和克隆牛中甲基化水平都不高(20.04%、5.55%), 但克隆组的甲基化水平仍显著低于正常对照组 ($P < 0.05$), 而且克隆个体 9C5 甲基化水平极低, 被检测的 9 个克隆 252(9×28)个 CpG 位点中只有一个 CpG 位点是甲基化的, 甲基化程度仅为 0.4%. 我们选取的 2 个克隆牛的肺脏都是发育有严重缺陷的, 其中 9C5 肺脏瘀血且六片肺叶互不相连, 尽管目前还没有研究证实 *Mash2* 调控肺脏的发育, 但 *Mash2* 基因编码构象为螺旋-环-螺旋的转录因子^[18], 调控众多的下游靶基因, 仍然可以推测 *Mash2* 基因的低甲基化水平可能是造成克隆动物肺脏发育缺陷的原因之一. 鉴于 *Mash2* 基因在正常牛中甲基化程度也不是很高, 而且同一个体不同测序克隆间甲基化水平变化不大, 提示 DNA 甲基化修饰在 *Mash2* 基因印记的机制中可能有其他的 CpG 岛位点.

目前供体核的表观重编程除了包括 DNA 甲基化修饰外, 还涉及组蛋白修饰(如乙酰化甲基化等)、染色质重塑及非编码 RNA 的调控等, 因此想全面了解克隆动物供体核的表观遗传重编程, 必须从多方面进行综合分析, 才能彻底解决克隆效率低下问题.

参 考 文 献

- [1] Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A, *et al.* Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, **380**(6569): 64-67
- [2] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385** (6619): 810-813
- [3] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, *et al.* Eight calves cloned from somatic cells of single adult. *Science*, 1998, **282**(5396): 2095-2098
- [4] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, *et al.* Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394**(23): 369-374
- [5] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**(5): 456-461
- [6] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, **407**(6800): 86-90
- [7] Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, *et al.* Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(4): 366-369
- [8] Shin T, Kraemer D, Pryor J, *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, **415**(6874): 859
- [9] Zhou Q, Renard J P, Le Friec G, *et al.* Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 2003, **302** (5648): 1179
- [10] Galli C, Lagutina I, Crotti G, *et al.* Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 2003, **424**(6949): 635
- [11] Woods G L, White K L, Vanderwall D K, *et al.* A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 2003, **301**(5636): 1063
- [12] Lee B C, Kim M K, Jang G, *et al.* Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 2005, **436**(7051): 604
- [13] Li Z, Sun X, Chen J, *et al.* Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol*, 2006, **293**(2): 439-448
- [14] Shi D, Lu F, Wei Y, *et al.* Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol Reprod*, 2007, **77**(2): 285-291
- [15] Cram D S, Song B, Trounson A O. Trounson Genotyping of Rhesus SCNT pluripotent stem cell lines. *Nature*, 2008, **450**(7169): E12-14
- [16] Yang X, Smith S L, Tian X C, *et al.* Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, 2007, **39**(3): 295-302
- [17] Surani M A. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*, 2001, **414**(6859): 122-128
- [18] Ferguson-Smith A C, Surani M A. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science*, 2001, **293** (5532): 1086-1089
- [19] Kaneda M, Okano M, Hata K, *et al.* Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, 2004, **429**(6994): 900-903
- [20] Bartolomei M S, Zemel S, Tilghman S M. Parental imprinting of mouse H19 gene. *Nature*, 1991, **351**(6322):153-155
- [21] Young L E, Fairburn H R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology*, 2000, **53**(2):627-648
- [22] Reik W, Maher E R. Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet*, 1997, **13**(8): 330-334
- [23] Reik W. Genomic imprinting and genetic disorders in man. *Trends Genet*, 1989, **5**(10): 331-336

- [24] Arnold D R, Lefebvre R, Smith L C. Characterization of the placenta specific bovine mammalian achaete scute-like homologue 2 (*Mash2*) gene. *Placenta*, 2006, **27**(11-12): 1124-1131
- [25] Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, *et al.* Essential role of *Mash2* in extraembryonic development. *Nature*, 1994, **371**(6495): 333-336
- [26] Li S J, Li Y X, Du W H, *et al.* Aberrant gene expression in organs of bovine clones that die within two days after birth. *Biol Reprod*, 2005, **72**(2): 258-265
- [27] Gong G C, Dai Y P, Fan B L, *et al.* Production of transgenic blastocysts by nuclear transfer from different types of somatic cells in cattle. *Science in China, Ser. C*, 2004, **47**(2): 183-189
- [28] Lucifero D, Suzuki J, Bordonon V, *et al.* Bovine Snrpn methylation imprint in oocytes and day 17 *in vitro*-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod*, 2006, **75**(4): 531-538
- [29] Imamura T, Kerjean A, Heams T, *et al.* Dynamic CpG and non-CpG methylation of the *Peg1/Mest* gene in the mouse oocyte and preimplantation embryo. *J Biol Chem*, 2005, **280**(20): 20171-20175
- [30] Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, *et al.* Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, 2001, **293**(5527): 95-97
- [31] Ogawa H, Ono Y, Shimosawa N, *et al.* Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction*, 2003, **126**(4): 549-557
- [32] 王建春, 李冬杰, 杜卫华, 等. *GTL2* 基因在体细胞核移植牛中的印记状态分析. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(10):1183-1187
- Wang J C, Li D J, Du W H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(10):1183-1187
- [33] Mann M R, Chung Y G, Nolen L D, *et al.* Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, 2003, **69**(3): 902-914
- [34] Lucifero D, Suzuki J, Bordonon V, *et al.* Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 *in vitro* produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod*, 2006, **75**(4): 531-538
- [35] Chen J, Li D J, Liu Y Q, *et al.* DNA methylation status of *H19* and *Xist* genes in lungs of somatic cell nuclear transfer bovines. *Chinese Science Bulletin*, 2008, **53**(13): 1996-2001
- [36] Long J E, Cai X. Igf-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. *Gene*, 2007, **388**(1-2): 125-134

DNA Methylation Status of *Mash2* in Lungs of Somatic Cell Cloning Bovines*

CHEN Jie¹⁾, LI Dong-Jie³⁾, ZHANG Cui¹⁾, LI Ning²⁾, LI Shi-Jie^{1, 2, 4)**}

¹⁾ College of Life Science, Hebei Agriculture University, Baoding 071001, China;

²⁾ State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

³⁾ College of Life Science and Life Engineering, Hebei Science and Technology University, Shijiazhuang 050018, China;

⁴⁾ Cattle & Sheep Embryo Engineering Center of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract Somatic cell nuclear transfer (SCNT, Somatic cloning) has been succeeded in some species, but the low cloning efficiency limits its application in many areas, including medicine industry, therapeutic cloning and the propagation of rare animals. In somatic cell nuclear transfer process, the donor nucleus requires epigenetic reprogramming to a totipotent ground state. Although molecular events within hours of nuclear transfer determine the fate of cloned embryos, it is disappointing that so little is known about these events during the early development of cloned embryos. Genomic imprinting is the differential expression of a gene based upon parental inheritance. DNA methylation is a known regulator of major genomic imprinting, and many imprinted genes are associated with DMRs that play a role in regulating their allele specific expression. *Mash2* is an imprinted gene that plays important role in embryo development and organogenesis. Aberrations were often observed in the lungs of most deceased cloned calves died around birth. In an effort to determine whether the DNA methylation reprogramming of *Mash2* is efficient in somatic cloning animals, the DNA methylation status of *Mash2* was analyzed in lungs of deceased somatic cloning bovines that died within 48 h of birth using bisulfite sequencing analysis. The results demonstrated that cloned bovines showed significantly lower DNA methylation of *Mash2* than controls ($P < 0.05$), and both showed low methylation (20.04% and 5.55%), and the percentage of overall mCpG in 9C5 was only 0.4%; the types of methylation patterns were five in 9N3 and one in 9N4, while only one type were found in cloned cow. The abnormal DNA methylation of *Mash2* may contribute to the lung development defects and the low efficiency of somatic cloning.

Key words DNA methylation, *Mash2*, somatic cloning, bovines

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00121

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2008AA101003) and The National Natural Science Foundation of China (30972098).

**Corresponding author.

Tel: 86-312-5016895, E-mail: lishijie20005@163.com

Received: March 16, 2010 Accepted: June 7, 2010