

EB 病毒潜伏膜蛋白 1 在鼻咽癌细胞中通过 STAT3 促进 VEGF 表达*

谭运年 陶永光 李力力 刘素芳 唐 敏 顾焕华 曹 亚**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 探讨了 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 (LMP1) 是否通过 STAT3 调控诱导血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的表达. 利用蛋白质印迹的方法对 HNE2、HNE2-LMP1 以及瞬时转染 STAT3 显性负性突变体 STAT3 β 的 HNE2-LMP1 细胞中 VEGF 含量进行检测, 发现 LMP1 可以上调 VEGF 的表达, 而 STAT3 β 可以抑制 VEGF 的上调; 利用 LMP1 可控表达细胞系 tet-on-LMP1-HNE2 进行 LMP1 时间和剂量诱导表达研究, 发现 VEGF 可以随 LMP1 的动态表达而表达; 将 VEGF 野生型报告基因和 VEGF 潜在的 STAT3 转录因子突变体报告基因与 LMP1 表达载体分别共转染研究发现, LMP1 可以激活 VEGF 的转录, 这种转录通过 VEGF 启动子区 STAT3 转录因子的结合位点发挥作用; 电泳迁移率变动分析 (EMSA) 确证了 STAT3 的这种 DNA 位点的特异性活性. 结果表明: EB 病毒编码的 LMP1 在鼻咽癌细胞中可以增加 VEGF 的转录和表达, 并能通过 VEGF 启动子区 STAT3 转录因子结合位点发挥作用.

关键词 EB 病毒, 潜伏膜蛋白 1 (LMP1), STAT3, 血管内皮细胞生长因子 (VEGF), 鼻咽癌

学科分类号 R734

潜伏膜蛋白 1 (LMP1) 是 EB 病毒编码的一种重要膜结合蛋白, 在体外能够转化成纤维细胞, 参与 B 细胞的永生, 是已被确证具有瘤基因功能的蛋白质. 有证据认为 LMP1 可能与鼻咽癌的侵袭与转移相关. Hu 等^[1]发现 LMP1 阳性的鼻咽癌细胞比 LMP1 阴性的鼻咽癌细胞更容易转移, LMP1 在 70% 的鼻咽癌组织和几乎所有的 EBV 感染的侵袭性前鼻咽癌病变组织中存在^[2]. 这些结果提示, LMP1 可能在鼻咽癌的侵袭与转移过程中起重要作用.

肿瘤侵袭与转移过程中的一个重要分子事件是血管新生, 肿瘤的生长与转移依赖于新生血管的形成. 血管内皮细胞生长因子 (vascular epithelial growth factor, VEGF), 亦称血管通透因子 (vascular permeability factor, VPF), 是迄今鉴定出来的最重要的血管生长因子^[3], VEGF 可以作为肿瘤代谢及转移的标志^[4].

我们前期的研究发现 LMP1 在鼻咽癌细胞中可以激活 JAK (Janus kinase) /STAT (signal transducer and transcription factor) 信号传导途径^[5]. 而 Niu 等^[6]的研究发现 VEGF 启动子上存在 STAT3 的结合位点, 活化的 STAT3 能够通过该结合位点调控 VEGF 的表达. 这些结果提示我们, LMP1 可能在鼻咽癌细胞中通过 JAK/STAT 信号途径介导 VEGF 的表达. 我们首先利用蛋白质印迹的

方法对 HNE2, HNE2-LMP1 以及瞬时转染 STAT3 显性负性突变体 STAT3 β 的 HNE2-LMP1 细胞中 VEGF 的含量进行检测. 随后利用 LMP1 可控表达的细胞系 tet-on-LMP1-HNE2 进行 LMP1 时间和剂量的诱导表达, 探讨 VEGF 是否可以随 LMP1 的动态表达而表达. 继之利用 VEGF 野生型报告基因和 VEGF-848 位潜在的 STAT3 转录因子结合位点突变体报告基因, 对 LMP1 在基因转录水平对 VEGF 是否具有调控作用进行研究, 并且结合电泳迁移率变动分析 (electrophoresis mobility supershift assay, EMSA) 探讨 LMP1 对 VEGF 的这种调控机制.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系: HNE2 细胞系为 EB 病毒阴性的低分化鳞癌细胞系, HNE2-LMP1 是在 HNE2 细胞的基础上导入 B95-8 来源的全长 LMP1 cDNA 表达质

* 国家重点基础研究发展规划 (973) “恶性肿瘤发生发展的基础研究”项目 (G1998051201), 国家自然科学基金 (30000087 和 30100005) 和自然科学基金杰出青年基金 (39525022) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805448, Fax: 0731-4470589

E-mail: Yeao98@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2003-10-23, 接受日期: 2003-12-28

粒 pSG5LMP1 和新霉素筛选标志建立的稳定表达细胞系。tet-on-LMP1-HNE2 鼻咽癌细胞系为一株 LMP1 (B95-8 来源) 表达受四环素及其衍生物剂量性诱导的鼻咽癌细胞系, 经过两轮转染, 先后将 pTet-on 调节质粒及 pTRE-LMP1 重组质粒导入 EB 病毒阴性的鼻咽低分化鳞癌细胞系 HNE2 中, 经 G418 及潮霉素筛选获得稳定克隆 tet-on-LMP1-HNE2 细胞系, 细胞呈上皮样, 贴壁生长, 经四环素衍生物 Dox 诱导表达^[7]。细胞均维持在 10% 的小牛血清 1640 培养基中。添加含有青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 g/L, 在此基础上, HNE2-LMP1 和 Tet-on-LMP1-HNE2 用 G418 100 mg/L 维持培养。

1.1.2 质粒: pSG5 空白对照, pSG5-LMP1 由英国 Wales 医学院感染与免疫室 Brennan 博士惠赠。pGL3-VEGF-wild, 在 pGL3 空白载体中插入 2.4 kb VEGF 启动子序列。pGL3-VEGF-mut, 在 pGL3-VEGF-野生型载体基础上对-848 位 STAT3 结合位点 TTCCCAAA 突变成 gcgTCAAA, 由美国南佛罗里达州立大学医学院 Moffitt 癌症研究所 Hua 博士赠送。pSG5-STAT3 β 由美国南佛罗里达州立大学医学院 Moffitt 癌症研究所 Jove 博士赠送。

1.1.3 试剂和抗体: 0.45 μ m 硝酸纤维素膜购自 Schleicher & Schuell 公司; 核蛋白提取盒, BCA 蛋白测定试剂, 凝胶滞留生物素试剂盒, 化学发光试剂均购自 Pierce Chemical Co. Rockford 公司; 荧光素酶报告基因测定试剂、 β -gal 酶检测试剂购自 Promega 公司; 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司; RPMI 1640 培养基、钒酸钠购自 Sigma 公司。VEGF 抗体 (SC-152G), 能够与 VEGF121, 165, 189 反应。 α -tubulin (B-7, SC-5286), 抗鼠 IgG-HRP (2005), 抗羊 IgG-HRP 标记抗体 (SC-2000) 均购自 Santa Cruz 公司。STAT3 抗体 (#9132) 购自 Cell Signaling 公司。LMP1 抗体 (CS1-4, M0897) 购自 DAKO 公司, 针对 LMP1 羧基端。

1.1.4 凝胶滞留 (EMSA) 引物: VEGF (-848) -wild, 5' TGG ACA CTT CCC AAA GGA CC 3', 5' GG TCC TTT GGG AAG TGT CCA 3'。3' 末端用 biotin 生物素标记, 由美国 Lee 博士合成并惠赠。将两条互补引物变性退火, 每次反应使用的量为 20 fmol。

1.2 方法

1.2.1 脂质体介导的瞬间转染: 按照说明, 转染前 24 h 将 HNE2, HNE2-LMP1 细胞置于 24 孔细胞

培养板培养, 待细胞生长至 50% ~ 80% 的融合度时弃培养基, 在 Eppendorf 管分别加入 pSG5, pSG5-STAT3 β 补加无血清培养基至 60 μ l, 加入 5 μ l 脂质体室温下静置 5 ~ 10 min 后, 再添加完全培养基 350 μ l 混合, 立即加入到 24 孔板中, 置 5% CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 2 ~ 3 h 后, 用 PBS 洗一次, 再加入含 15% 小牛血清的 RPMI-1640 完全培养基孵育 36 h。同样, 在对数生长期的 HNE2 细胞中分别将 pSG5 空白对照, pSG5-LMP1 质粒与 pGL3-VEGF-wild, pGL3-VEGF-mut 质粒和转染效率校正 pRSV β -gal 报道质粒瞬时共转染。

1.2.2 Dox 处理 tet-on-LMP1-HNE2 细胞: 取对数生长期的 tet-on-LMP1-HNE2 细胞, 用含 0.02% EDTA 和 0.25% 胰酶消化计数, 10⁵/ml 细胞接种于培养瓶中, 贴壁生长后, 分别加入 0, 0.006, 0.06, 0.6 和 6 mg/L Dox 诱导处理 24 h。选择 0.6 mg/L Dox 的剂量诱导处于对数生长期的细胞处理时间为 0, 6, 12, 24, 36, 48 h。

1.2.3 蛋白质提取和蛋白质印迹分析: 转染 pSG5 空白对照, pSG5-STAT3 β 质粒的 HNE2, HNE2-LMP1 细胞孵育 36 h, 以及 Dox 处理的各组 tet-on-HNE2-LMP1 细胞, 用 1 $\times$ PBS 洗 3 ~ 4 次, 细胞裂解液 (radioimmunoprecipitation buffer) RIPA (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 1 $\times$ 蛋白酶抑制剂, 1 mmol/L 钒酸钠) 冰上裂解 30 ~ 60 min。13 000 r/min 离心去细胞碎片, 留含全蛋白质的上清液, 用 BCA 试剂测定蛋白质浓度。

取各组细胞 50 μ g 总蛋白进行不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电转移至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉加 PBST 在室温下封闭 1 ~ 2 h, 加入单抗, 过夜孵育, 洗膜, 加入相应 IgG-HRP 二抗, 孵育 1 h, ECL 化学发光法检测, 以 α -tubulin 作为参照检测 VEGF 的表达。

1.2.4 VEGF、 β -gal 报告基因活性检测: 报告基因组细胞瞬间转染 36 h 后, 用 1 $\times$ PBS 洗一次, 每孔加入 1 $\times$ 细胞裂解液 (RLB) 100 μ l, 在室温下作用 30 min, 用细胞刮子刮下裂解物置于 Eppendorf 管, 12 000 g 离心 20 s, 收集上清液。取 20 μ l 上清加入 100 μ l 荧光素酶报告基因测定试剂, 迅速推入单光子检测仪, 延迟 10 s, 测定 30 s 间隔萤火虫荧光酶相对活性值, 即 VEGF 报告基因的相对活性。

取 20 μ l 上清液加入 30 μ l 1 $\times$ RLB 后, 再加入 50 μ l 2 $\times$ 测定试剂, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h, 加入碳酸钠 150 μ l 终止反应, 在 ELISA 酶标仪上测 420 nm 吸光度值, 检测 β -gal 的活性, 以此校正 VEGF 报告基因活性.

1.2.5 核蛋白抽提和 EMSA: 按试剂盒提供的操作规程提取对数生长期的 HNE2, HNE2-LMP1 细胞核蛋白, BCA 测定蛋白质浓度, 取等量 10 μ g 核抽提物与生物素标记的 VEGF-848 位 STAT3 结合位点的寡聚双链 DNA (5' TGG ACA CTT CCC AAA GGA CC 3', 下划线为核心结合位点) 室温孵育 20 min, 凝胶滞留反应在加入寡聚双链 DNA 探针前, 先与 1 μ l STAT3 抗体在室温孵育 20 min, 然后用非变性 5% 聚丙烯酰胺高电压分离, 转正电荷尼龙膜, 紫外 120 mJ/cm² 交联, 按试剂盒 ECL 化学发光法检测.

2 结 果

2.1 STAT3 β 可抑制 LMP1 诱导的 VEGF 表达

利用稳定细胞系的研究发现, HNE2-LMP1 细胞中表达的 VEGF 量比 LMP1 阴性的 HNE2 细胞要高, 在 HNE2-LMP1 细胞中瞬时转染 STAT3 显性负性突变体 STAT3 β , 可以抑制 VEGF 的表达 (图 1).

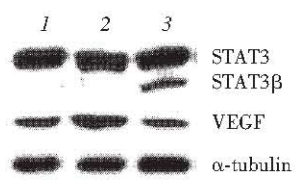


Fig. 1 Western blotting analysis of VEGF expression in HNE2, HNE2-LMP1 cell line and HNE2-LMP1 cell line transiently transfected with STAT3 dominant negative plasmid STAT3 β
1: HNE2; 2: HNE2-LMP1; 3: HNE2-LMP1 + STAT3 β .

2.2 VEGF 表达随 LMP1 呈剂量和时间变化

tet-on-LMP1-HNE2 细胞经不同浓度的 Dox (0, 0.006, 0.06, 0.6 和 6 mg/L) 诱导 24 h 后, VEGF 均可表达, 并随 Dox 所诱导的 LMP1 的增加而增加. 选择 0.6 mg/L Dox 诱导 0, 6, 12, 24, 36, 48 h 发现 VEGF 的表达在 24 h 达到最高, 然后逐渐下降. 这表明 LMP1 在鼻咽癌细胞系中可诱导 VEGF 表达, 并呈剂量和时间依赖性诱导效应 (图 2).

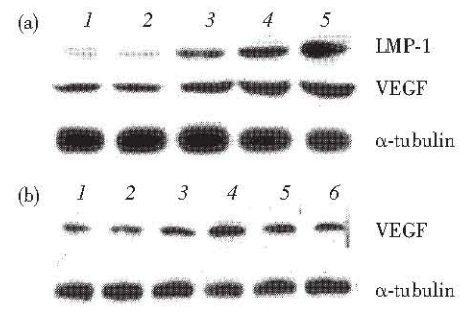


Fig. 2 Western blotting analysis of VEGF expression in time and dose dependent fashion in tet-on-LMP1-HNE2 cell line
(a) dose dependent fashion induced 24 h. 1: Dox 0 mg/L; 2: Dox 0.006 mg/L; 3: Dox 0.06 mg/L; 4: Dox 0.6 mg/L; 5: Dox 6 mg/L.
(b) time dependent fashion induced by Dox 0.6 mg/L. 1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: 36 h; 6: 48 h.

2.3 LMP1 通过诱导 STAT3 活化调控 VEGF 表达

在 HNE2 细胞中瞬时转染 LMP1 和 VEGF 报告基因以及 STAT3 结合位点的突变 VEGF 报告基因, 发现 LMP1 能够激活 VEGF, 并且这种激活通过 VEGF-848 STAT3 结合位点起作用. LMP1 能够使 VEGF 报告基因的活性升高 3 倍之多. 但对 VEGF-848 STAT3 结合位点突变并不能完全抑制 VEGF 的报告基因活性, 提示有别的机制参与其中作用 (图 3).

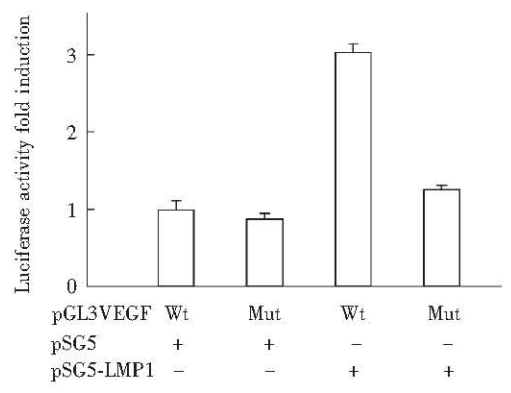


Fig. 3 LMP1 can activate VEGF luciferase reporter gene via STAT3 binding site

2.4 LMP1 可以增强 STAT3 与 VEGF 启动子的结合能力

电泳迁移率变动分析 (EMSA) 表明, LMP1 可以增强 STAT3 与 VEGF-848 位的 DNA 结合能力, STAT3 抗体可以识别这种结合并导致凝胶滞留 (图 4).

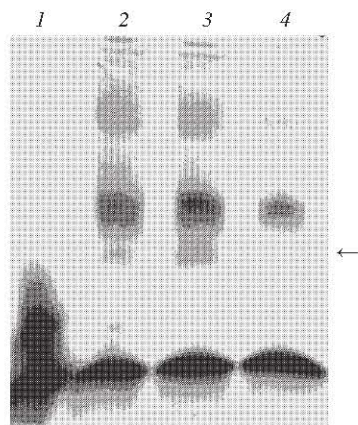


Fig. 4 Electrophoresis mobility shift assay results show that LMP1 can enhance STAT3 binding ability in VEGF -848 promoter region

1: FP; 2: HNE2; 3: HNE2-LMP1; 4: HNE2-LMP1 + STAT3 Ab.

3 讨 论

EB病毒编码的 LMP1 是重要的致癌蛋白, 目前被认为是一种不需要配体起作用的 CD40 模拟分子, 其自身通过在细胞膜脂筏上聚集^[8], 即可激活其下游信号分子, 我们前期的工作发现, 在鼻咽癌细胞中 LMP1 可以通过其胞浆段两个功能结构区 (CTAR1, CTAR2) 激活 NF- κ B, AP-1 信号途径参与 MMP9, cyclin D1^[9, 10] 的调控, 目前有报道, 在 B 细胞的研究中发现 LMP1 可能存在第三个功能区 (CTAR3)^[11], 我们最近的工作发现, LMP1 在鼻咽癌细胞中可以激活 JAK/STAT 信号途径^[5]. 免疫组化研究表明, 在鼻咽癌细胞中有活化的 STAT1、STAT3、STAT5 存在^[12]. 在 STAT 家族中, STAT3 的作用引人注目, 目前倾向认为 STAT3 是一种癌基因, 可能在肿瘤的发生中起重要作用^[13]. 目前认为 JAK/STAT 参与调控与细胞增殖、分化和凋亡相关的多种基因的表达, 如细胞周期素 cyclin D1, Bcl-2, Mcl-1, VEGF 等多种基因^[14, 15].

我们利用稳定细胞系和 tet-on-LMP1-HNE2 细胞系进行的研究表明, LMP1 无论是在稳定细胞系还是可控表达细胞系, VEGF 能够随 LMP1 的表达而表达, 从而证实 LMP1 在鼻咽癌细胞中可以调控 VEGF 的表达.

对 VEGF 基因启动子上游利用生物信息学分析研究发现, 在 2.4 kb 长的启动子区, 转录起始位

点 630 和 848 区两个位点的碱基结构, 类似于已经发现并确定的 C-反应蛋白启动子区 STAT3 结合位点. 但 630 位点有两个碱基与 CRP 的不同, 848 位点仅仅只有一个不同. Niu 等^[6] 发现仅 848 位起作用, 我们利用野生型的 VEGF 报告基因和 848 位突变型报告基因与 LMP1 表达载体瞬时共转染的方法研究发现, LMP1 能够使 VEGF 报告基因的活性升高 3 倍之多, 这种作用主要是通过 848 位 STAT3 结合位点发挥作用的. EMSA 的研究发现, LMP1 可以增强 STAT3 在 VEGF 启动子区 848 位的结合能力.

因此, 我们认为 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 LMP1 能够通过 STAT3 调控 VEGF 的表达, 从而参与鼻咽癌细胞的侵袭与转移. 我们的研究从一个新的途径对 LMP1 这一重要的致癌蛋白功能进行了拓展, 为 EB 相关肿瘤的分子治疗提供了新的实验依据.

参 考 文 献

- 1 Hu L F, Chen F, Zhen Q F, *et al.* Differences in the growth pattern and clinical course of EBV-LMP1 expressing and non-expressing nasopharyngeal carcinomas. *Eur J Cancer*, 1995, **31A** (5): 658 ~ 660
- 2 Pathmanathan R, Prasad U, Sadler R, *et al.* Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med*, 1995, **333** (11): 693 ~ 698
- 3 Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, 1995, **333** (26): 1757 ~ 1763
- 4 Uter E R, Nesbit M, Watson J C, *et al.* Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res*, 1999, **5** (4): 775 ~ 782
- 5 谭运年, 陶永光, 宋鑫, 等. JAK3 蛋白在鼻咽癌细胞中参与 STAT 活化并受 EB 病毒潜伏膜蛋白 1 调控. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (4): 560 ~ 565
- 6 Tan Y N, Tao Y G, Song X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (4): 560 ~ 565
- 7 Niu G, Wright K L, Huang M, *et al.* Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 2002, **21** (13): 2000 ~ 2008
- 8 廖伟, 易红, 曹亚, 等. 一株受四环素及其衍生物诱导表达的 Tet-on 鼻咽癌细胞系. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15** (1): 132 ~ 135
- 9 Liao W, Yi H, Cao Y, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 1999, **15** (1): 132 ~ 135
- 10 Kaykas A, Worringer K, Sugden B, *et al.* CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex. *EMBO J*, 2001, **20** (11): 2641 ~ 2654
- 11 赵晓荣, 王承兴, 翁新宪, 等. 鼻咽癌细胞中 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1 活化 cyclin D1 的表达. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (5): 704 ~ 710
- 12 Zhao X Y, Wang C X, Weng X X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (5): 704 ~ 710
- 13 王承兴, 邓锡云, 李晓艳, 等. 病毒 LMP1 在鼻咽癌细胞系中通过 NF- κ B、AP-1 促进 MMP9 表达. *中华肿瘤杂志*, 2002, **24**

- (1): 9 ~ 13
Wang C X, Deng X Y, Li X Y, *et al.* Chin J Onc, 2002, **24** (1): 9 ~ 13
- 11 Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, *et al.* Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. EMBO J, 1999, **18** (11): 3064 ~ 3073
 - 12 Chen H, Lee J M, Zong Y, *et al.* Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. J Virol, 2001, **75** (6): 2929 ~ 2937
 - 13 Bowman T, Garcia R, Turkson J, *et al.* STATs in oncogenesis. Oncogene, 2000, **19** (21): 2474 ~ 2488
 - 14 Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, *et al.* Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. Oncogene, 2000, **19** (48): 5419 ~ 5427
 - 15 Gesbert F, Griffin J D. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. Blood, 2000, **96** (6): 2269 ~ 2276

Regulation of Human VEGF by Expression Latent Membrane Protein 1 Encoded by EB Virus Via STAT3 in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line*

TAN Yun-Nian, TAO Yong-Guang, LI Li-Li, LIU Su-Fang, TANG Min, GU Huan-Hua, CAO Ya**

(Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to identify whether EB virus latent membrane protein 1 (LMP1) can regulate vascular epithelial growth factor (VEGF) expression via STAT3 in nasopharyngeal carcinoma cell line, Western blotting was used to detect VEGF expression in HNE2, HNE2-LMP1 and HNE2-LMP1 transiently transfected with STAT3 dominant negative plasmid STAT3 β . VEGF is up-regulated by LMP1 and STAT3 dominant negative STAT3 β can down-regulate VEGF expression. In tet-on-HNE2-LMP1 cell line, in which LMP1 can be tightly regulated, VEGF is expressed in dose and time dependent fashion. After cotransfected LMP1 with VEGF wild promoter luciferase reporter and 848 mutated luciferase reporter respectively, luciferase assay results indicated that LMP1 can up-regulate wild promoter luciferase activity and not that of 848 mutated luciferase reporter. Electrophoretic mobility shift assay results in HNE2 and HNE2-LMP1 cell line indicated that LMP1 enhances STAT3 binding ability in VEGF promoter. In conclusion, latent membrane protein 1 encoded by EB virus can enhance VEGF transcription and expression in nasopharyngeal carcinoma cell line via activating STAT3 binding ability in VEGF 848 promoter binding site.

Key words Epstein-Barr virus, latent membrane protein 1 (LMP1), STAT3, vascular epithelial growth factor (VEGF), nasopharyngeal carcinoma

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1998051201), The National Natural Sciences Foundation of China (30000087, 30100005) and The National Science Fund for Distinguished Young Scholars (39525022).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805448, Fax: 86-731-4470589, E-mail: Ycao98@public.cs.hn.cn

Received: October 23, 2003 Accepted: December 28, 2003