

亮氨酸拉链提高小鼠血浆中 剪接的凝血因子VIII凝血活性*

朱甫祥** 刘泽隆 缪 静 屈慧鸽 迟晓艳

(鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025)

摘要 培养细胞实验表明, 亮氨酸拉链通过改善内含肽(intein)的蛋白质剪接效率, 提高双载体转 B 区缺失型凝血因子VIII(BDD-FVIII)基因细胞剪接 FVIII蛋白的分泌量和活性. 本文从 C57BL/6 小鼠门静脉注射含亮氨酸拉链和 *Ssp* DnaB 内含肽融合的 BDD-FVIII的重链和轻链基因双表达载体, 48 h 后, 检测到血浆的重链分泌量和 FVIII活性分别为(298 ± 67) $\mu\text{g/L}$ 和(1.15 ± 0.29) U/mL, 明显高于不含亮氨酸拉链的双载体转 BDD-FVIII基因对照小鼠((179 ± 59) $\mu\text{g/L}$ 和(0.58 ± 0.19) U/mL). 结果表明, 亮氨酸拉链通过改善蛋白质反式剪接, 提高基于蛋白质剪接的双载体转 BDD-FVIII基因小鼠血浆的凝血活性, 为进一步双腺相关病毒(AAV)载体转 BDD-FVIII基因的甲型血友病基因治疗研究提供了依据.

关键词 B 区缺失型凝血VIII因子, 亮氨酸拉链, 双载体转基因, 蛋白质反式剪接, 血浆凝血活性

学科分类号 Q5, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00202

双载体转人工断裂的凝血因子VIII(FVIII)重链和轻链基因是克服腺相关病毒(AAV)载体容量限制、进行甲型血友病基因治疗研究的常用方法^[1-2]. 但重链(HC)固有的低分泌性使重链淤积胞内, 影响细胞的稳定性, 甚至诱导细胞凋亡^[3]; 且血浆中过多的轻链(LC)可能引起机体的免疫反应. 我们运用蛋白质反式剪接的双载体转 FVIII基因研究表明, 重、轻链在细胞内、外均可通过内含肽(intein)的蛋白质反式剪接作用, 产生肽键连接的活性 FVIII蛋白, 且轻链表现出对重链的顺式促分泌作用^[4-5].

蛋白质剪接为包埋于宿主蛋白的内含肽自催化去除内含肽并伴随宿主蛋白肽键连接的反应^[6]. 蛋白质剪接分为顺式剪接和反式剪接两种, 基于内含肽双载体转基因运用的是分子间的反式剪接, 虽然反式剪接依赖于内含肽本身的分子互作, 但剪接效率不如顺式剪接高. 为提高反式剪接效率, 我们最近将具有强相互作用的亮氨酸拉链(leucine zippers)融合到内含肽, 培养细胞双载体转 B 区缺失型凝血因子VIII(BDD-FVIII)基因证明, 剪接 BDD-FVIII的分泌量和活性得到明显提高^[7]. 本文对小鼠体内门静脉注射人 BDD-FVIII重链和轻链双表达载体表明,

亮氨酸拉链可提高小鼠血浆的重链分泌水平和 FVIII凝血活性, 为进一步运用双 AAV 载体的甲型血友病基因治疗研究提供了依据.

1 材料和方法

1.1 材料

含有人 BDD-FVIII重链、轻链与 split *Ssp* DnaB 内含肽的融合基因表达载体 pCMV-HCIntN、pCMV-IntCLC 为我们以前工作中构建^[8]. 高保真 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶购自 Stratagene 公司; DNA 连接酶试剂盒购自 New England Biolabs 公司; Spin Miniprep Kit 和 HiSpeed Plasmid Midi Kit 为 Qiagen 公司产品; 重组 FVIII为 BioChain 公司产品; 人 FVIII重链单抗 ESH-5 和 FVIII轻链单抗 ESH8 购自 American Diagnostica 公司; HRP 标记的兔抗人

* 山东省自然科学基金(ZR2010CM061), 烟台市科技计划项目(2008152), 教育部留学回国人员科研启动基金(20071108)和鲁东大学学科建设经费资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

收稿日期: 2012-04-25, 接受日期: 2012-05-24

FVIII多抗购自 Novus 公司; 人正常参比血浆和去 FVIII 血浆为 George King Biomedical 公司产品; FVIII 活性检测的 COATEST SP FVIII 试剂盒购自 Chromogenix 公司; C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 真核重组表达质粒的构建

先用 PCR 方法破坏 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 的骨架中含有的 2 个 *Mfe* I 位点; 选择具有较强相互结合作用的亮氨酸拉链^[8], 酸性卷曲螺旋结构 AAQLEKELQALEKENAQLWELQALE KELAQ, 碱性卷曲螺旋结构为 AQLKKKLQA-LKKKNAQLKWKLQALKKLAQG. 合成互补编码寡核苷酸链 5' AA TTG GCT GCT CAA CTT GAA AAA GAA CTT CAA GCT CTT GAT AAA GAA AAT GCT CAA CTT GAA TGG GAA CTT CAA GCT CTT GAA AAA GAA CTT GCT CAA 3' 与 5' AATTA TTG AGC AAG TTC TTT TTC AAG AGC TTG AAG TTC CCA TTC AAG TTG AGC ATT TTC TTT ATC AAG AGC TTG AAG TTC TTT TTC AAG TTG AGC AGC C 3'、5' AATTG GCT CAA CTT AAA AAA AAA CTT CAA GCT CTT AAA AAA AAA AAT GCT CAA CTT AAA TGG AAA CTT CAA GCT CTT AAA AAA AAA CTT GCT CAA GGT 3' 与 5' AATTG ACC TTG AGC AAG TTT TTT TTT AAG AGC TTG AAG TTT CCA TTT AAG TTG AGC ATT TTT TTT TTT AAG AGC TTG AAG TTT TTT TTT AAG TTG AGC C 3', 退火后两端均含有 *Mfe* I 的粘性末端, 与经 *Mfe* I 酶切线性化的 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 连接, 得到一对含有亮氨酸拉链的 split *Ssp* DnaB 内含肽与 BDD-FVIII 重链和轻链融合基因表达载体 pCMV-HCIntNLZ 和 pCMV-LZIntCLC。

1.3 小鼠体内转基因

参照文献[9]的方法, 将 C57BL/6 小鼠麻醉后, 打开腹腔, 门静脉注射混合于 2 ml 生理盐水的双质粒载体各 200 μ g. 48 h 后尾静脉采血, 加入含 0.38% (w/v) 枸橼酸钠抗凝剂的离心管中, 4 $^{\circ}$ C 下 9 000 r/min 离心 10 min, 取上层血浆分析。

1.4 血浆 FVIII 抗原的定量分析

按照我们以前建立的链特异性 ELISA 法检测转基因小鼠血浆中人 HC 和 LC 浓度^[9], 以重组人 FVIII 为标准品, 封闭液作倍比稀释, 浓度范围为 10~320 μ g/L. 用人 HC 单抗 ESH5 或人 LC 单抗 ESH8 包被酶标板, 洗板后加封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,

洗板后加稀释的标准品或小鼠血浆, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 洗板后加 HRP 标记人 FVIII 多抗, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后洗板, 加反应底物 OPD 溶液 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min 进行显色, 用 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 读板. 由标准品测得的吸光值和 FVIII 浓度建立标准曲线, 由血浆样品吸光值从标准曲线读得的浓度值即为血浆中人 HC 和 LC 多肽的浓度。

1.5 血浆凝血生物活性的分析

参照文献[9]的方法分析血浆凝血活性. 转基因小鼠血浆 FVIII 活性由小鼠自身的鼠 FVIII 活性和转基因产生的人 FVIII 活性共同产生. 血浆总 FVIII 活性与鼠 FVIII 活性之差为人 FVIII 活性. 用抗人 FVIII 抗体吸附、抑制小鼠血浆中的人源 FVIII 活性. 以正常人血浆为标准品(FVIII 含量为 200 μ g/L, 活性为 1 U/mL), 用不含 FVIII 的人血浆倍比稀释, 活性范围为 6.25 μ g/L(活性 0.0313 U/mL)~200 μ g/L(未稀释, 活性 1 U/mL), 每个标准品取 10 μ l, 分别加和不加 2 μ l 人 FVIII 轻链单抗 ESH8(浓度 1 g/L) 于 37 $^{\circ}$ C 温育 15 min, 按试剂盒说明书序列反应后 405 nm 处读取吸光值, 以二者吸光值的差值与对应的标准品活性制备标准工作曲线. 取 10 μ l 小鼠血浆样品, 分别加和不加 ESH8, 由测得的吸光值分别从标准曲线读得活性值, 二者之差为人 FVIII 生物活性。

1.6 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 融合亮氨酸拉链和内含肽的 BDD-FVIII 重链和轻链基因表达载体的构建

FVIII 的分子结构为 A1-A2-B-A3-C1-C2, 去掉 B 区 Ile⁷⁶¹~Asn¹⁶³⁹ 即为 BDD-FVIII. 于 Ser1657 密码子前将 BDD-FVIII cDNA 断裂为重链(HC)和轻链(LC), 在 HC 的 C 端和 LC 的 N 端分别融合 split *Ssp* DnaB 内含肽的 N 端(IntN)和 C 端(IntC)编码序列, 并在 IntC 前添加 FVIII 的信号肽编码序列(SS)使其具有分泌性, 插入载体 pcDNA3.1(+), 得到一对内含肽与 HC 和 LC 融合基因表达载体 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC. 在 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 的内含肽 C 端和 N 端分别融合亮氨酸拉链编码序列, 得到一对含亮氨酸拉链的内含肽融合 HC 和 LC 表达载体 pCMV-HCIntNLZ 和 pCMV-LZIntCLC. 所构建的融合基因结构见图 1。

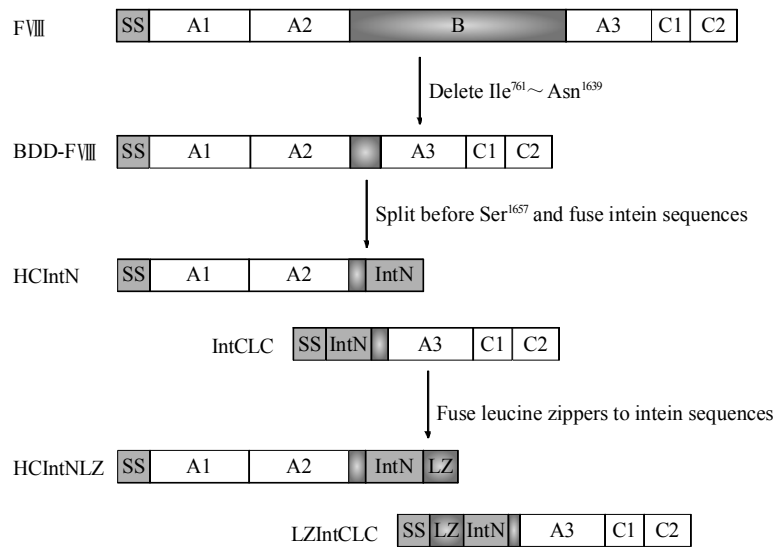


Fig. 1 Schematic illustration of BDD-FVIII and derivatives of its heavy and light chains

The heavy and light chains are produced by severing BDD-FVIII before Ser¹⁶⁵⁷. IntN, IntC: The N- and C-terminus of split *S_{sp}* DnaB intein; LZ: Leucine zippers; SS: Signal sequence.

2.2 亮氨酸拉链促进转基因小鼠血浆 HC 分泌不影响 LC 分泌

血浆 HC 检测结果显示(图 2), 含亮氨酸拉链的共转基因小鼠血浆 HC 浓度((298 ± 67) μg/L)明显高于无亮氨酸拉链时的血浆 HC 浓度((179 ± 59) μg/L); 单独转 HC 基因时血浆 HC 浓度, 有或无亮氨酸拉链均很低, 分别为(20 ± 11) μg/L 和(27 ± 12) μg/L; 转 BDD-FVIII 基因小鼠的血浆 HC 浓度为(489 ± 108) μg/L. 表明, HC 本身的分泌性极低, 但共转基因时 LC 可明显提高重链的分泌性. 由于蛋白质剪接介导 HC 和 LC 肽键共价连接作用, 此为 LC 对 HC 的顺式促分泌作用, 而亮氨酸拉链通过提高剪接效率, 产生更多的 HC 和 LC 共价结合

体, 使 HC 分泌量进一步增多.

血浆 LC 检测结果显示(图 3), 血浆 LC 水平不受共转基因的影响, 亮氨酸拉链也不影响 LC 的分泌, 有亮氨酸拉链时, 与 HC 共转基因和单独转 LC 基因 LC 血浆水平分别为(823 ± 168) μg/L 和(739 ± 182) μg/L; 无亮氨酸拉链时, 与 HC 共转基因和单独转 LC 基因 LC 血浆水平分别为(716 ± 131) μg/L 和(805 ± 196) μg/L, 但均明显高于相应的血浆 HC 水平, 表明 LC 的分泌性远高于 HC. 转 BDD-FVIII 基因时, 血浆 LC 浓度为(465 ± 123) μg/L, 与 HC 分泌量相近. 共转基因小鼠血浆 HC 和 LC 的比率, 有亮氨酸拉链时为 1 : 2.8, 而无亮氨酸拉链时

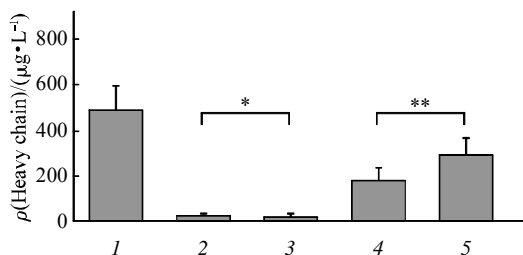


Fig. 2 Heavy chain secretion in plasma

The data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$. 1: BDD-FVIII; 2: HCIntN; 3: HCIntNLZ; 4: HCIntN + IntCLC; 5: HCIntNLZ + LZIntCLC.

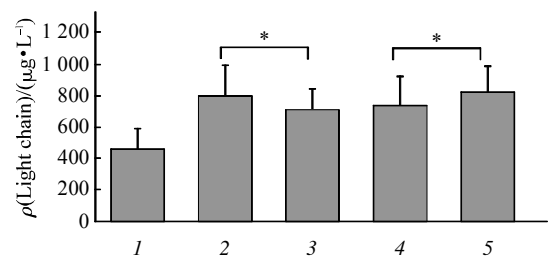


Fig. 3 Light chain in plasma

The data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P > 0.05$. 1: BDD-FVIII; 2: HCIntN; 3: HCIntNLZ; 4: HCIntN + IntCLC; 5: HCIntNLZ + LZIntCLC.

为 1:4, 血浆 HC 分泌量的提高使其与 LC 分泌的不均衡性得到缓解。

2.3 亮氨酸拉链增加转基因小鼠血浆凝血活性

血浆凝血活性分析结果显示(图 4), 与不含亮氨酸拉链的双载体转基因小鼠血浆相比, 含亮氨酸拉链的双载体转基因小鼠血浆凝血活性有明显改善, 前者为 (0.58 ± 0.19) U/mL, 后者为 (1.15 ± 0.29) U/mL, 二者间差异显著, 但不如转 BDD-FVIII 基因对照小鼠血浆凝血活性高, 为 (2.32 ± 0.53) U/mL. 以转 BDD-FVIII 基因小鼠血浆所分泌的 HC 全部(100%)参与凝血活性计算, 含亮氨酸拉链的双载体转基因小鼠血浆中所分泌 HC 的 81% 贡献于凝血活性, 而不含亮氨酸拉链转基因小鼠为 68%, 表明在亮氨酸拉链增强的蛋白质剪接作用下, HC 与 LC 共价剪接产生更多的 BDD-FVIII 分泌入血。

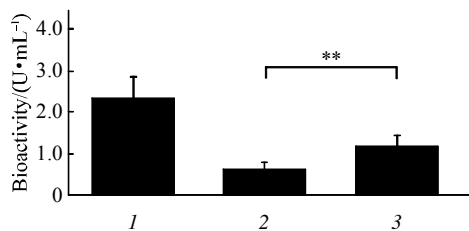


Fig. 4 FVIII bioactivity in plasma

The data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.05$. 1: BDD-FVIII; 2: HCIntN + IntCLC; 3: HCIntNLZ + LZIntCLC.

3 讨 论

AAV 可介导肝脏和骨骼肌靶向凝血因子 IX 基因的血浆持续、稳定表达, 被视为血友病基因治疗的理想载体^[10-11]. 在甲型血友病基因治疗中, AAV 的容量限制使其难以承载较大的 FVIII 基因. 解决策略之一是利用双载体共转 FVIII 的重链和轻链基因, 但重、轻链功能性异源二聚体形成需在细胞内进行, 且重链分泌低下, 转基因功效受到靶细胞共转基因效率等影响. 本实验室采用蛋白质剪接的双载体转 FVIII 基因, 证明细胞内、外皆进行剪接, 产生完整的功能性 FVIII 分子, 且轻链可顺式促进重链的分泌^[4-5].

反式剪接效率决定剪接 BDD-FVIII 蛋白的量及其活性, 体外培养细胞实验显示, 在内含肽中融合具有强相互作用的亮氨酸拉链, 借助于亮氨酸拉链间的强相互作用, 增强内含肽间的作用, 使反式剪

接变得类似于效率更高的顺式剪接^[7]. 本文进一步在小鼠体内转基因显示, 单独注射有或无亮氨酸拉链融合的重链基因时, 血浆重链分泌水平均很低, 我们以前的工作证明, 基因工程改造的重链虽然可促进整体 BDD-FVIII 的分泌性, 但重链自身的分泌性甚至远不如野生型重链, 提示重链结构对分泌的影响^[9]. 当与轻链基因共注射时, 血浆的重链分泌量明显增加, 其中以亮氨酸拉链融合的双链共转基因更为显著, 说明蛋白质剪接下与重链以肽键相连的轻链可顺式促进重链分泌, 亮氨酸拉链通过改善反式剪接效率形成更多的剪接体, 在轻链顺式作用下分泌更多的重链. 血浆的轻链分泌不受影响, 单独转轻链基因或与重链共转基因, 均呈现较高的血浆轻链分泌水平, 说明轻链分泌的高效性, 因此, 轻链对重链的顺式促分泌作用或可解释为重链在高效分泌轻链的带动下分泌. 从转 BDD-FVIII 基因小鼠血浆的重链分泌量也得到验证, 因为分泌的 BDD-FVIII 分子中重链和轻链是 1:1 的化学计量关系. 比较血浆重、轻链分泌量间的比率, 有亮氨酸拉链时, 该比率为 1:2.8, 而无亮氨酸拉链时的比率为 1:4, 表明亮氨酸拉链融合后剪接效率的改善, 可减轻重、轻链分泌量的不均衡性. 与双载体转 BDD-FVIII 基因时血浆的轻链分泌水平较重链高 10~100 倍相比, 基于蛋白质剪接的双载体转基因时链不平衡性得到缓解^[2,9]. 由于亮氨酸拉链对剪接效率的改善和由此引起的重链分泌水平提高, 小鼠血浆凝血活性得到提升, 计算凝血活性占血浆分泌重链的比率, 即分泌的重链中与轻链剪接产生 BDD-FVIII 的比率达到 81%, 明显高于无亮氨酸拉链的 68%, 反映血浆中无功能的蛋白质前体水平降低. 而且, 重链分泌量的提高减少其在细胞内淤积对细胞稳定性的不利影响.

FVIII 重链中存在与内质网分子伴侣蛋白的结合位点, 其释放、分泌依赖较高的细胞内 ATP 浓度^[12]. 本实验室通过点突变此结合位点, 证明可提高剪接 FVIII 的分泌量^[13]. 具有 FVIII 生理性载体功能的 von Willebrand 因子(vWF) 可结合分泌的 FVIII, 防止其快速降解, 还可促进 FVIII 的分泌, 由于 vWF 可聚集、活化血小板, 引起血栓形成, 而其前肽缺失突变体 vWF(vWF-ΔPro) 失去聚集血小板的功能, 但不影响与 FVIII 的结合^[14]. 共转 vWF-ΔPro 基因时, vWF-ΔPro 可促进剪接 BDD-FVIII 的分泌^[15]. 本文中亮氨酸拉链增强的蛋白质剪接形成更多地剪接 BDD-FVIII, 血浆的分泌量和凝血活性均得到提高.

迄今已发现 100 多种内含肽, 大小在 130 个氨基酸左右, 其自催化的蛋白质剪接作用具有精确、无需辅因子、不消耗能量且不依赖细胞机制等特点, 被开发为有力的分子生物学技术应用于蛋白质连接、蛋白质标记和修饰、多肽环化等领域^[6]. 本文的体内实验证明, 反式剪接效率的提高可增加血浆分泌的 FVIII 凝血活性, 提高双载体转基因效果, 为进一步双 AAV 转基因的血友病基因治疗研究提供了依据.

参 考 文 献

- [1] Sarkar R, Mucci M, Addya S, *et al.* Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia a dogs and mice. *Hum Gene Ther*, 2006, **17**(4): 427-439
- [2] Scallan C D, Liu T, Parker A E, *et al.* Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light chains of FVIII. *Blood*, 2003, **102**(12): 3919-3926
- [3] Zhang K, Shen X, Wu J, *et al.* Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*, 2006, **124**(3): 587-599
- [4] Zhu F X, Liu Z L, Chi X Y, *et al.* Protein trans-splicing based dual-vector delivery of the coagulation factor VIII gene. *Sci Chin Life Sci*, 2010, **53**(6): 683-689
- [5] Chen L X, Zhu F X, Li J, *et al.* The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene. *Mol Ther*, 2007, **15**(10): 1856-1862
- [6] Perler F B. The ins and outs of gene expression control. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(7): 824-826
- [7] 朱甫祥, 杨树德, 刘泽隆, 等. 亮氨酸拉链促进蛋白质剪接介导的双载体转凝血 VIII 因子基因. *药学学报*, 2012, **47**(1): 39-44
Zhu F X, Yang S D, Liu Z L, *et al.* *Acta Pharm Sin*, 2012, **47**(1): 39-44
- [8] Pederson H, Holder S, Sutherlin D P, *et al.* A method for directed evolution and functional cloning of enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(18): 10523-10528
- [9] Burton M, Nakai H, Colosi P, *et al.* Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(22): 12725-12730
- [10] Niemeyer G P, Herzog R W, Mount J, *et al.* Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood*, 2009, **113**(4): 797-806
- [11] Arruda V R, Stedman H H, Haurigot V, *et al.* Peripheral transvenular delivery of adeno-associated viral vectors to skeletal muscle as a novel therapy for hemophilia B. *Blood*, 2010, **115**(23): 4678-4688
- [12] Swaroop M, Moussalli M, Pipe S W, *et al.* Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J Biol Chem*, 1997, **272**(39): 24121-24124
- [13] Zhu F X, Yang S D, Liu Z L, *et al.* The effect of a secretion-enhanced heavy chain on improving intein-based dual-vector co-delivery of a full-length factor VIII gene. *Chinese Sci Bull*, 2011, **56**(2): 158-163
- [14] De Meyer S F, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. von Willebrand factor to the rescue. *Blood*, 2009, **113**(21): 5049-5057
- [15] 朱甫祥, 杨树德, 刘泽隆, 等. vWF-ΔPro 改善基于蛋白质剪接的双载体 BDD-FVIII 基因转移. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, **26**(8): 720-726
Zhu F X, Yang S D, Liu Z L, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2010, **26**(8): 720-726
- [16] Vila-Perello M, Muir T W. Biological applications of protein splicing. *Cell*, 2010, **143**(2): 191-200

Intein-Fused Lucine Zippers Increase Plasma Coagulation Activity by Improving Protein *Trans*-Splicing in Dual-Vector Factor VIII Gene Delivered Mice*

ZHU Fu-Xiang**, LIU Ze-Long, MIAO Jing, QU Hui-Ge, CHI Xiao-Yan

(Life Science College of Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract We previously demonstrated that leucine zippers fused to intein could increase secretion of spliced B-domain-deleted coagulation factor VIII (BDD-F VIII) protein and activity by dual-vector based BDD-F VIII gene transfected cell *in vitro* through improving protein *trans*-splicing. In this study, a pair of plasmid vectors expressing human BDD-F VIII heavy and light chain fused with lucine zipper and split *Ssp* DnaB intein was co-injected into C57BL/6 mice *via* the portal vein. Forty-eight hours post-injection, the level of heavy chain and F VIII coagulation activity in collected plasma were determined and shown as $(298 \pm 67) \mu\text{g/L}$ and $(1.15 \pm 0.29) \text{U/ml}$ respectively, greater than that of control mice injected with both vectors without leucine zippers ($(179 \pm 59) \mu\text{g/L}$ and $(0.58 \pm 0.19) \text{U/ml}$). It demonstrated that leucine zippers fused intein could increase F VIII coagulation activity in plasma of mice with intein-based dual-vector BDD-F VIII gene delivery through improved protein *trans*-splicing. It provided evidence for ongoing hemophilia A gene therapy using dual-AAV vectors.

Key words B-domain-deleted coagulation factor VIII, leucine zippers, dual-vector gene delivery, protein *trans*-splicing, plasma coagulation activity

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00202

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2010CM061), Science and Technology Program of Yantai City (2008152), The Scientific Research Foundation from Education Ministry for The Returned Overseas Chinese Scholars (20071108) and The Discipline Construction Funds of Ludong University.

**Corresponding author.

Tel: 86-535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

Received: April 25, 2012 Accepted: May 24, 2012