

研究报告

斜纹夜蛾核多角体病毒抑制苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒诱导的斜纹夜蛾细胞凋亡*

张萍¹⁾ 杨凯¹⁾ 代小江¹⁾ 庞义^{1)**} 苏德明²⁾¹⁾中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275; ²⁾复旦大学生命科学学院病毒学研究室, 上海 200433)

摘要 野生型苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 感染斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 细胞系 Sf-zsurl, 可引起典型的细胞凋亡; 但可以在草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞 Sf-9 中复制并形成多角体。比较了 AcMNPV p35 基因在病毒感染两种细胞的复制和转录情况, 认为 p35 在非受纳细胞中及时有效的表达能阻止细胞发生凋亡; 共感染实验结果表明, 斜纹夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SpltMNPV) 可以抑制 AcMNPV 诱导的细胞凋亡并可帮助病毒进行复制, 推测 SpltMNPV 基因组中与 p35 同源的 p49 基因挽救了细胞的自杀行为。

关键词 斜纹夜蛾核多角体病毒, 细胞凋亡, p35 基因

学科分类号 Q255

细胞凋亡 (apoptosis), 又称细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD), 是多细胞生物为适应不良环境所采用的一种策略。凋亡细胞的形态学特征为核固缩、胞质浓缩、细胞体急剧变小、细胞骨架解体; 其生化特征表现为染色质片段化, 形成长度为 180~200 bp 整数倍的寡聚核苷酸片段, 琼脂糖凝胶电泳时呈现“梯状”条带 (DNA ladder)。诱导细胞发生凋亡的因子非常广泛, 包括激素、辐射、单链 DNA 或受损 DNA、血清或生长因子的去除等^[1], 另外病毒感染也经常诱发宿主细胞发生凋亡, 以限制病毒粒子的复制和传播。在腺病毒科、疱疹病毒科和杆状病毒科都发现了能调节细胞凋亡的基因^[2~4]。

杆状病毒是一类重要的无脊椎动物病毒, 具囊膜包被, 基因组为闭合环状双链 DNA, 其分子大小在 80~180 kb 之间^[5]。目前已发现 p35, iap 基因具有抗细胞凋亡的功能; 其中 p35 可抑制 caspase 蛋白酶家族的活性, 迄今已报道它可抑制该家族中 ICE、CPP32、ICH-1、ICH-2 和 CED-3, 而它们代表了 caspase 蛋白酶家族三个亚族^[6,7]。尽管多种杆状病毒能诱导体外细胞系发生凋亡, 但还没有证据表明某个病毒基因在杆状病毒诱导的凋亡途径中直接启动信号的发生。

我们先前的研究发现: AcMNPV 可诱导斜纹夜蛾细胞 Sf-zsurl 发生典型的细胞凋亡, 出现于感

染后 10~12 h, 24 h 达到高峰 (95%~100%)^[8]; 而 AcMNPV 可在 Sf-9 等多种细胞中正常复制, 并形成多角体。为了研究 AcMNPV 的 p35 基因在 Sf-zsurl 细胞中究竟是因为病毒 DNA 的复制受到宿主细胞因子限制, 还是其 P35 蛋白本身无法抑制 Sf-zsurl 细胞中的 caspase 活性, 从而不能抑制 AcMNPV 诱发的细胞凋亡, 本文比较了 p35 基因在 AcMNPV 的受纳细胞、非受纳细胞中的复制和转录情况; 共感染实验发现, SpltMNPV 可以抑制 AcMNPV 诱发的细胞凋亡, 并拯救了 AcMNPV 在非受纳细胞中的复制及传播。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒: 野生型 AcMNPV 引自美国加州大学河滨分校 Federici 教授实验室。野生型斜纹夜蛾核多角体病毒 (SpltMNPV) G-2 株由本室分离和保存。

1.1.2 细胞: Sf-9 细胞引自英国自然环境研究委员会病毒研究所; 斜纹夜蛾细胞 Sf-zsurl 由本实验室建立^[9]。细胞培养基为 TC-100 (GIBCO), 补加

* 国家自然科学基金资助项目 (39730030, 39800092)。

** 通讯联系人。

Tel: 020-84113860, E-mail: ls12@zsu.edu.cn

收稿日期: 2002-02-04, 接受日期: 2002-03-31

终浓度为 10% 胎牛血清 (GIBCO), 培养温度为 27℃.

1.1.3 主要试剂: Taq 酶, dNTP, RNAase A 购自华美生物工程公司; 蛋白酶 K 购自 Sigma 公司; DNA 地高辛标记及检测试剂盒、mRNA 提取试剂盒和 cDNA 合成试剂盒购自 Roche 公司; 核酸分子质量标准购自 Takara 公司. 其他试剂为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 芽生型病毒粒子的制备及感染: 取感染病毒三天后的幼虫血淋巴稀释于无血清培养基中, 3 000 r/min 离心去沉淀后用滤器 (0.45 μm) 过滤除菌, 4℃ 保存备用. 在弃去正常细胞的培养基后, 加入适量含该病毒的培养基, 室温吸附 1 h, 弃病毒液, 加入新鲜培养基. 细胞感染病毒后不同时间, 显微镜观察记录形态变化, 并用 0.08% 台盼蓝染色计数.

1.2.2 病毒 DNA 的提取: 取病毒多角体悬液, 加入等体积的碱解液, 37℃ 作用 30 min 至悬液澄清, 加入 SDS (终浓度为 2%) 和蛋白酶 K (终浓度为 10 g/L), 50℃ 温育 30 min. 用酚, 酚/氯仿, 氯仿/异戊醇依次抽提, 95% 乙醇沉淀后, 70% 乙醇洗涤, 适量 TE 溶解, 4℃ 保存.

1.2.3 *p35* 基因的 PCR 扩增: PCR 按常规方法进行^[10]. 以 AcMNPV 病毒 DNA 为模板, 应用一对引物 P1 (5'-GTAGAAATCGACGTGTCCCAGA-3') 和 P2 (5'-TAATATTACATTTTGTGAGTG-3') 进行 PCR 扩增.

1.2.4 DNA 点杂交: 提取细胞总 DNA, 印迹于尼龙膜上, 80℃ 固定 2 h. 之后按照 DNA 杂交试剂盒说明, 以 PCR 扩增的 AcMNPV *p35* 基因片段标记物为探针, 进行杂交显色.

1.2.5 反转录 PCR: 收集 2×10^6 个细胞, 用 PBS 洗涤三次, 按照 mRNA 提取试剂盒说明进行 mRNA 的提取, 之后反转录. 将反转录混合物置入 42℃ 温育 2 h; 95℃ 煮沸 5 min, 冰浴 5 min 后作为 PCR 模板, 进行 PCR 反应 (第 1 个循环: 95℃, 4 min; 第 2~30 个循环为: 94℃, 60 s; 55℃, 60 s; 72℃, 90 s; 第 31 个循环: 72℃, 10 min).

1.2.6 细胞片段化 DNA 的提取: 参照文献 [11] 进行, 略加修改. 收集细胞和细胞凋亡小体, PBS (pH=7.2) 洗涤 3 次, 裂解缓冲液 (1% NP-40, 20 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)

处理 2 min, 1 600 r/min 离心 5 min, 收集上清, 加入 SDS (终浓度为 1%) 和 RNase A (终浓度为 5 g/L), 56℃ 水浴 2 h, 再加入蛋白酶 K (终浓度为 2.5 g/L), 37℃ 处理 2 h, 2 倍体积 95% 乙醇沉淀后 70% 乙醇洗涤. DNA 溶于适量 TE 中, 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳.

2 结果

2.1 *p35* 在不同细胞系中的复制水平

野生型 AcMNPV ($MOI = 1$) 分别感染 1×10^6 个 Sf-zsrf-1 和 Sf-9 细胞后, 分别在感染 0、12、24、48 和 72 h 收集细胞, 提取总 DNA 进行点杂交. 实验结果如图 1a, AcMNPV *p35* 基因在 Sf-zsrf-1 细胞中一直保持低水平的量: 感染后 12 h 没有检测到信号, 48 h 达到最高峰, 72 h 水平又有所降低; 在 AcMNPV 感染后的非受纳细胞 Sf-zsrf-1 及受纳细胞 Sf-9 中, 可以发现 *p35* 的 DNA 量前者明显普遍低于后者 (图 1b).

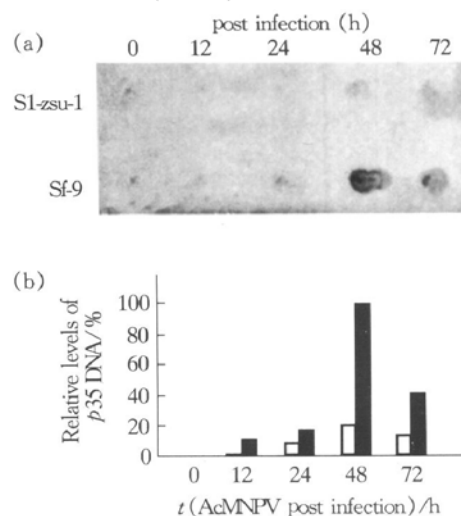


Fig. 1 Comparison of AcMNPV *p35* synthesis in AcMNPV-infected cells (Sf-zsrf-1 and Sf-9)

(a) Southern dot blot results; (b) Relative levels of *p35* DNA, setting the quantity of *p35* gene in Sf-9 at 48 h post infection as 100%, analyzed by ImageStar software after scanning. □—□: Sf-zsrf-1; ■—■: Sf-9.

2.2 *p35* 在不同细胞系中的转录

在感染 AcMNPV 2、12、24、48 和 72 h 后, 提取 Sf-zsrf-1 和 Sf-9 细胞 mRNA 进行反转录反应. 结果如图 2, 在感染 AcMNPV 2 h 后, Sf-zsrf-1 细胞中不能检测到 *p35* mRNA 的存在, 之后的时间该基因均发生了转录; 在 Sf-9 细胞中一直都可以检测到 *p35* mRNA, 而且 PCR 反应得到的 DNA 量也较 Sf-zsrf-1 中所得到的多.

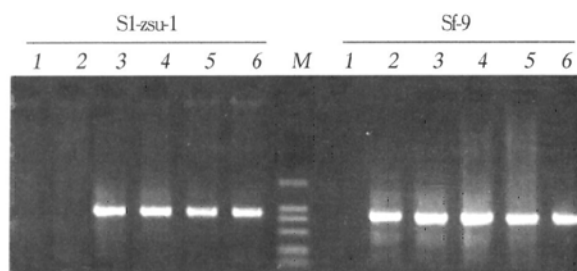


Fig. 2 Comparison of AcMNPV p35 transcription in AcMNPV-infected cells

M: DNA standard marker, molecular mass are 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp respectively; 1: using mRNA extracted from mock-infected cells; 2 ~ 6: using mRNA extracted from AcMNPV-infected cells respectively at 2 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h post infection (p. i.).

2.3 SpltMNPV 可抑制 AcMNPV 诱导的细胞凋亡

在感染 SpltMNPV ($MOI = 1$) 的 Sf-zsurl 细胞中采用了不同的时间间隔 (0、6、12、24 和 48 h), 以同样感染复数的 AcMNPV 感染细胞. 感染 AcMNPV 24 h 后观察细胞形态, 台盼蓝染色并计数, 并提取细胞片段化 DNA. 当共感染时间间隔为 0 h 和 6 h 时 (图 3d 和图 3e), 几乎所有细胞发生凋亡, 形成凋亡小体 (apoptotic bodies), 与野生型 AcMNPV 感染情况基本一致 (图 3b); 当时时间间隔为 12 h (图 3f), SpltMNPV 能部分抑制细胞凋亡 (细胞死亡率为 40%); 在感染 SpltMNPV 24 h、48 h 后再感染 AcMNPV 可基本抑制凋亡

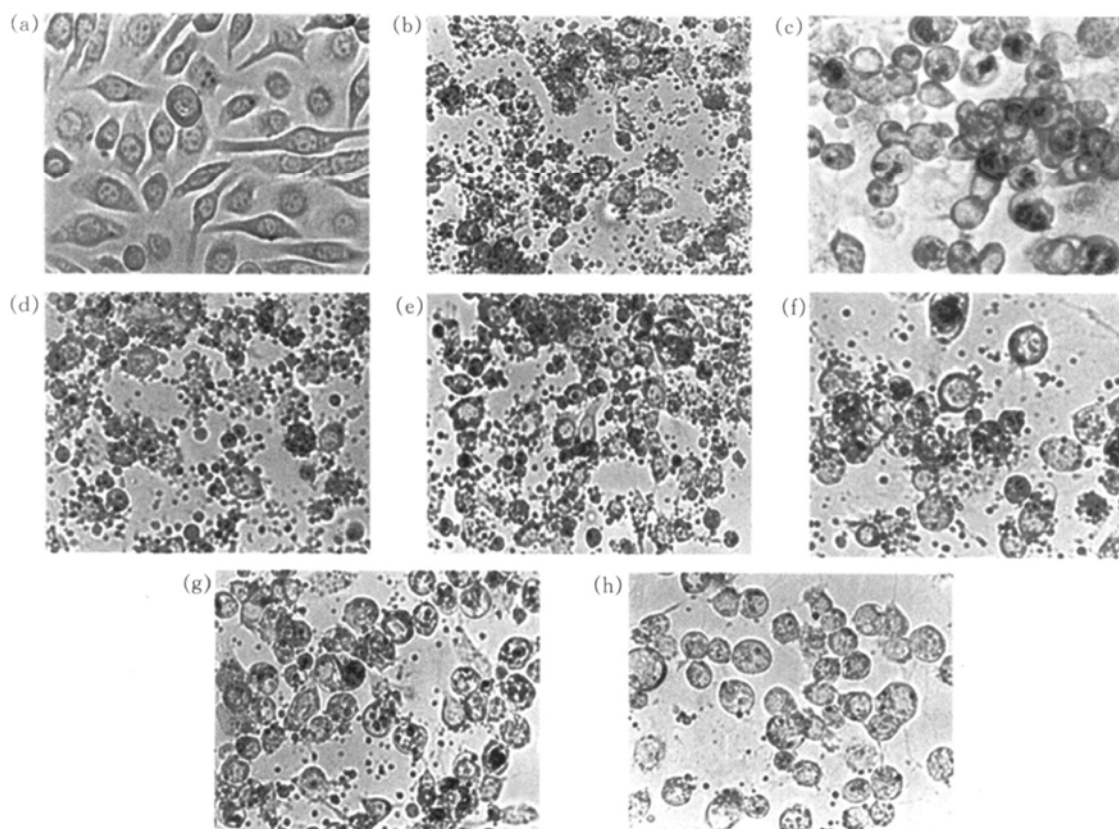


Fig. 3 Microphotographs of Sf-zsurl cells

(a) normal cells; (b) infected with wild-type AcMNPV alone; (c) infected with wild-type SpltMNPV alone; (d) ~ (h) co-infected with SpltMNPV and AcMNPV, the infection interval times were 0, 6, 12, 24 and 48 h respectively.

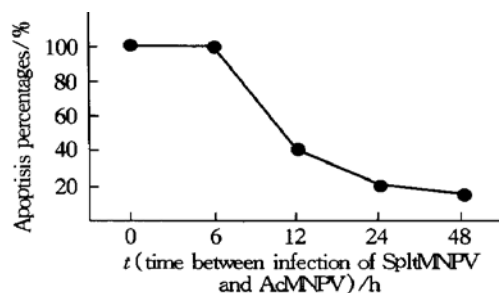


Fig. 4 Apoptosis percentages of Sf-zsurl cells co-infected by SpltMNPV and AcMNPV

(细胞凋亡率为 20%) (图 3g 和图 3h), 凋亡小体的量非常少, 部分细胞形成了多角体. 共感染时间间隔与细胞凋亡率的具体关系如图 4 所示.

提取这些细胞或者凋亡小体的片段化 DNA, 电泳情况与显微镜观察结果基本一致 (图 5). 野生型 AcMNPV 感染、共感染时间间隔为 0 和 6 h 时 DNA 呈现典型的梯状条带 (DNA ladder); 而共感染间隔为 12、24 和 48 h, 梯状 DNA 量条带较弱.

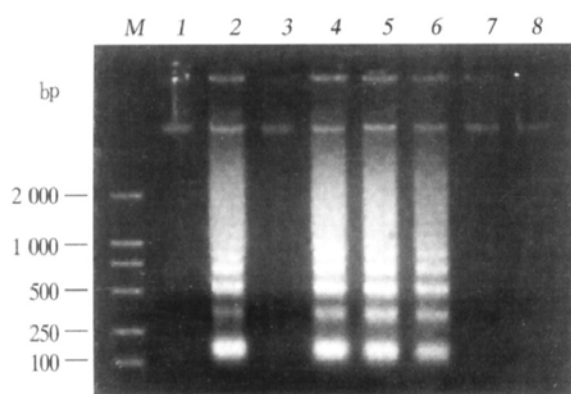


Fig. 5 Apoptotic DNA fragments extracted from Sf-zsrf-1 cells

M: DNA standard marker; 1: normal cells; 2: infected with wild-type AcMNPV alone; 3: infected with wild-type SpltMNPV alone; 4 ~ 8: co-infected with SpltMNPV and AcMNPV, the infection interval times were 0, 6, 12, 24 and 48 h respectively.

取 SpltMNPV 和 AcMNPV 共感染 (共感染时间间隔大于 12 h) Sf-zsrf-1 后的细胞上清, 离心后继续感染 Sf-zsrf-1 细胞或 Sf-9 细胞, 结果发现: 前者大部分能形成多角体, 因为单独的 AcMNPV 不能在该细胞中形成多角体, 推测这些多角体是 SpltMNPV 或者两种病毒共包埋形成的, 少数细胞发生凋亡; 部分 Sf-9 细胞也可形成多角体 (图略). 单独 AcMNPV 感染 Sf-zsrf-1 细胞的上清继续感染 Sf-9 细胞后, 细胞没有出现任何病理变化. 因为 SpltMNPV 不能感染 Sf-9 细胞, 说明 AcMNPV 在 SpltMNPV 的帮助下在 Sf-zsrf-1 细胞中进行了复制, 从而可以成功地感染 Sf-9 并形成多角体.

3 讨 论

野生型 AcMNPV 可以在 Sf-9 细胞中复制和传播, 但是诱导 Sf-zsrf-1 细胞发生典型的细胞凋亡. AcMNPV 的 *p35* 基因是一个具有广泛抗细胞凋亡的基因, 为什么它不能有效阻止后者的凋亡呢? Gershburg 等^[12] 研究发现, *p35* 基因在非受纳细胞 SL2 中仍然具有该功能, 但是因为该基因不能及时有效地转录和复制从而导致抑制过程失败. 如果大量表达该基因, 则可以挽救这个死亡过程. 本研究通过点杂交实验来检测在 AcMNPV 感染的 Sf-zsrf-1 细胞中 *p35* 的量, 结果说明: 它的水平非常低, 并且合成的时间也较凋亡发生的时间晚. RT-PCR 结果证实 AcMNPV 感染 Sf-zsrf-1 细胞早期 (感染后 2 h), *p35* 基因没有发生转录, 而晚期的转录水

平也较 Sf-9 细胞低. Dai 等^[13] 证实, 早期低水平表达的 P35 蛋白足以抑制病毒感染所致的细胞凋亡, 而晚期超量表达的 P35 蛋白也不能阻止细胞凋亡. 在 SpltMNPV 的基因组中发现有 *p35* 同源基因 *p49*, P49 蛋白与 P35 蛋白具有较高的同源性^[14, 15]; 而野生型 SpltMNPV 可以在 Sf-zsrf-1 细胞中复制并形成多角体, 暗示 P49 可以抑制 SpltMNPV 诱导的 Sf-zsrf-1 细胞凋亡并使基因组复制得以正常进行. *p49* 基因与 *p35* 基因的 C 端和 N 端具有很高的同源性 (45% 以上), 在推导的 P49 蛋白 91~95 处有一个与 P35 类似的 caspase 作用保守基序 (D-G 序列), 是 caspase 的酶切位点. 这些暗示 *p49* 基因与 *p35* 基因可能是同一类基因, 作用机理类似^[14, 15]. 由此我们推测, 如果 *p35* 能在 Sf-zsrf-1 细胞中得到及时足量的表达和复制, 它同样可以抑制 Sf-zsrf-1 细胞 caspase 蛋白酶家族的活性.

点杂交和 RT-PCR 结果非常有趣: 虽然绝大多数 Sf-zsrf-1 细胞 (95% ~ 100%) 在病毒感染后 24、48 和 72 h 发生了凋亡, 但是 *p35* 基因在细胞 (或凋亡小体) 中仍有一定量的复制和转录. 目前已经有研究发现^[16] 某些病毒获得了在凋亡细胞中复制和传播能力, 而在杆状病毒尚无报道. 为什么 AcMNPV 的基因在凋亡细胞里保持一定复制和转录的能力, 但病毒粒子不能进行有效的复制和传播, 这个问题值得深入研究.

将 SpltMNPV 与 AcMNPV 共感染 Sf-zsrf-1 细胞, 当两者感染间隔超过 12 h 时, 可以有效地抑制 Sf-zsrf-1 细胞的凋亡. 这个结果进一步说明 SpltMNPV 的 P49 或者 IAP 蛋白可以代替或者补充 P35 抑制 AcMNPV 诱导的细胞凋亡, 深入的分子机理研究正在进行中. 那么, 为什么同步感染不能有效抑制这个凋亡过程? 从我们先前的研究发现, AcMNPV 诱导的凋亡是在病毒基因组进入细胞后迅速发生的一个过程, *ie-1* 基因 (一个极早期基因) 在进入细胞后立即转录并调控其他基因, 我们证实单独表达 *ie-1* 基因可以诱导 Sf-zsrf-1 细胞凋亡 (未发表). 因此, 很可能 *ie-1* 基因通过调控其他病毒或者宿主基因, 破坏细胞的生长周期而启动了凋亡过程. 因 SpltMNPV 的抗细胞凋亡基因的转录与复制远没有 *ie-1* 基因快, 所以在同步感染时, AcMNPV 的 *ie-1* 基因尚能启动凋亡过程. 而 12 h 后, SpltMNPV 已经克服了宿主细胞的各种屏障, 在细胞中积累了多种基因转录或者表达产物,

包括足量的抗细胞凋亡的 P49 或者 IAP.

即使到了 48 h 后感染第二种病毒, 也不能完全拯救细胞凋亡 (细胞死亡率 15%). 这可能是由于 Sfzsr-1 细胞的感染率不高之故, 野生型病毒粒子感染 Sfzsr-1 细胞后可形成多角体的细胞只能达到 60%, 部分细胞没有发生病变. 因此, 这些未被感染的细胞无法遏止 AcMNPV 诱导的凋亡.

从本研究结果可以见到, 同一种病毒感染不同离体细胞系, 不同病毒感染同一细胞系都可以引起不同的细胞反应. 另外, 体内感染实验结果表明: 野生型 SpltMNPV 可以 100% 使感染的斜纹夜蛾幼虫致死, 而野生型 AcMNPV 尽管能杀死多种幼虫, 但斜纹夜蛾幼虫却对该病毒的口服感染不敏感, 与离体实验结果相一致 (本文已显示). 细胞凋亡也是一个宿主范围决定因子, 在病毒基因组侵入受纳细胞时, 它们可以成功瓦解细胞的防御策略; 但是非受纳细胞却令病毒复制受阻, 正如采用主动凋亡这种自杀行为. 因此, 研究细胞凋亡的分子机制对于进一步阐明病毒与宿主之间的关系将有重要意义.

参 考 文 献

- Clem R J, Fechheimer M, Miller L K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 1991, **254** (5036): 1388~ 1390
- Clem R J, Miller L K. Apoptosis reduces both the *in vitro* replication and the *in vivo* infectivity of a baculovirus. *J Virol*, 1993, **67** (7): 3730~ 3738
- Henderson S, Rowe M, Gregory C, *et al.* Induction of bcl-2 expression by Epstein Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, 1991, **65** (7): 1107~ 1115
- Crook N E, Clem R J, Miller L K. An apoptosis inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 1993, **67** (4): 2168~ 2174
- Volkman L E, Blissard G W, Friesen P, *et al.* Baculoviridae: taxonomic of structure and properties of the family. *Arch Virol*, 1995, **10** (Suppl): 104~ 113
- Bump N J, Hackett M, Hugunin M, *et al.* Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p 35. *Science*, 1995, **269** (5232): 1885~ 1888
- Xue D, Horvitz H R. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell death protease CED-3 cleavage site in baculovirus p 35 protein. *Nature*, 1995, **377** (6546): 248~ 251
- 代小江, 庞 义, 农 广, 等. 杆状病毒 gp64 基因可能是细胞凋亡诱导因子? 中山大学学报 (自然科学版), 1998, **37** (3): 7~ 12
- Dai X J, Pang Y, Nong G, *et al.* *Acta Scientiarum Naturalium University Sunyatseni*, 1998, **37** (3): 7~ 12
- 谢伟东, 曲士芮, 庞 义, 等. 斜纹夜蛾传代细胞系的建立和病毒感染研究. 中山大学学报 (自然科学版), 1988, **4**: 113~ 116
- Xie W D, Qu S R, Pang Y, *et al.* *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1988, **4**: 113~ 116
- 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1999. 458~ 482
- Lu S D. *Current Protocols for Molecular Biology*. 2nd. Beijing: High Education Press, 1999. 458~ 482
- Herrmann M, Lorenz H M, Voll R, *et al.* A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (24): 5506~ 5507
- Gershburg E, Rivkin H, Chejanovsky N. Expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus apoptotic suppressor gene p 35 in nonpermissive *Spodoptera littoralis* cells. *J Virol*, 1997, **71** (10): 7593~ 7599
- Dai X J, Shi X Z, Pang Y, *et al.* Prevention of baculovirus-induced apoptosis of BT-T₁₀5B1-4 (Hi5) cells by the p 35 gene of *Trichoplusia ni* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*, 1999, **80** (7): 1841~ 1845
- 李 镇, 龙繁新, 张余光, 等. SpltNPV p 49 基因的克隆和序列分析. 中山大学学报 (自然科学版), 2000, **39** (6): 73~ 76
- Li Z, Long Q X, Zhang Y G, *et al.* *Acta Scientiarum Naturalium University Sunyatseni*, 2000, **39** (6): 73~ 76
- Pang Y, Yu J, Wang L, *et al.* Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology*, 2001, **287** (2): 391~ 404
- Ubol S, Tucker P C, Griffin D E, *et al.* Neurovirulent strains of Alphavirus induce apoptosis in bcl-2-expressing cells: role of a single amino acid change in the E2 glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (11): 5202~ 5206

Spodoptera litura Multicapsid Nucleopolyhedrovirus Blocks *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus-induced *Spodoptera litura* Cell Apoptosis^{*}

ZHANG Ping¹⁾, YANG Kai¹⁾, DAI Xiao-Jiang¹⁾, PANG Yi^{1)**}, SU De-Ming²⁾

¹⁾ State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

²⁾ Virology Research Unit, College of Life Science Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract Wild-type AcMNPV (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus) induced *Spodoptera litura* (Sfzsr-1) cells apoptosis at 10~ 12 h post infection, but it could undergo productive replication in *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) cells. The AcMNPV antiapoptotic gene, p 35 gene replication and transcription in different cell lines (Sfzsr-1 and Sf-9) were investigated by Southern dot blot and RT-PCR respectively. Differences for p 35 gene to synthesize and transcribe in these two cell lines suggested that it could not

significantly function in the non-permissive cell line due to its untimely and insufficient expression. Inoculation of Sfzsr-1 cells with wild-type SpltMNPV (*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus) 12 h prior to AcMNPV infection blocked the apoptosis and rescued the AcMNPV productive replication. It is deduced that P49 protein, a P35 homolog encoded by *p49* gene in SpltMNPV genome, might accumulate a certain level at 12 h post infection enough to counteract the caspases effect.

Key words *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus, apoptosis, *p35* gene

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (3970030, 39800092).

** Corresponding author. Tel: 86-20-84113860, E-mail: ls12@zsu.edu.cn

Received: February 4, 2002 Accepted: March 31, 2002