

氧化磷酸化抑制剂对光滑球拟酵母糖酵解速度的影响*

刘立明^{1,2)} 陈 坚^{1,2)} 李华钟^{1,2)} 李 寅^{1,2)**}

(¹⁾江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036; ²⁾江南大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 研究了不同浓度电子传递链抑制剂(鱼藤酮和抗霉素 A)和 F_0F_1 -ATPase 抑制剂(寡霉素)对光滑球拟酵母胞内 ATP 水平、葡萄糖消耗速度、糖酵解途径关键酶的影响. 在培养液中添加 10 mg/L 鱼藤酮和抗霉素 A, 相对于对照组, 胞内 ATP 分别下降了 43%和 27.7%, 使糖酵解关键酶磷酸果糖激酶(PFK)的活性分别提高 340%和 230%, 从而导致葡萄糖消耗速度增加 360%和 240%, 丙酮酸生成速度提高了 17%和 8.5%. 改变胞内 ATP 水平并不影响糖酵解途径其他关键酶 HK、PK 活性. 微量的寡霉素(0.05 mg/L)可使胞内 ATP 含量下降 64.3%, 当培养液中寡霉素浓度达到 0.4 mg/L 时, 细胞不能继续生长, 葡萄糖消耗速度和丙酮酸的生成速度却随着寡霉素浓度(小于 0.6 mg/L)的增加而增加. 表明氧化磷酸化途径中, ATPase 决定着 ATP 的生成. 降低胞内 ATP 含量能显著提高 PFK 活性($r^2 = 0.9971$), 葡萄糖消耗速度($r^2 = 0.9967$)以及丙酮酸生产速度($r^2 = 0.965$), 葡萄糖消耗速度的增加是糖酵解途径中关键酶 PFK 活性($r^2 = 0.9958$)和 PK 活性($r^2 = 0.8706$)增加所导致的. 这一结果有利于揭示真核微生物细胞中氧化磷酸化与中心代谢途径(酵解)的关系.

关键词 光滑球拟酵母, 氧化磷酸化抑制剂, 酵解, ATP

学科分类号 Q93

在工业发酵研究中, 为提高目标代谢产品的生产强度, 需要强化中心代谢途径(如酵解途径)的代谢速率^[1]. 酵解途径是研究最为透彻的生化途径之一, 己糖激酶、磷酸果糖激酶和磷酸烯醇式丙酮酸激酶已被证实是多种微生物酵解途径中的限速酶. 但是, 在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中过量表达磷酸果糖激酶, 并不能显著提高酵解速度^[2]. 这是因为酵解速率不仅与酵解途径本身的因素(酶学)有关, 也与细胞的能量状态有关^[3]. 如酿酒酵母在好氧(呼吸状态)下, 葡萄糖的代谢速度低于厌氧(发酵状态)的情况, 其实质是好氧下的高能荷抑制了酵解.

作者在利用光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)的多重维生素营养缺陷型菌株, 发酵生产丙酮酸的前期研究中发现, 当相对溶氧(DO)较高时(如 85%), 该菌株以葡萄糖为底物生产丙酮酸的得率可高达 0.73 g/g^[4]. 但由于胞内能荷较高, 使得丙酮酸生产强度只有 0.91 g/(L·h). 如将 DO 从 85%降低至 50%, 酵解速度可从 1.14 g/(L·h)提高到 1.97 g/(L·h), 但此时大约有 11%的 NADH 通过形成甘油而氧化, 由此不可避免地导致丙酮酸得率下降^[4]. 理想的状态是使 *T. glabrata* 在高溶氧下实现快速酵解, 这样可获得丙酮酸生产过程高得率和高生

产强度的统一. 为实现这一目标, 作者希望通过适当降低胞内 ATP 的产生水平, 以解除高 DO 下高能荷对酵解途径的抑制.

酵母细胞在有氧呼吸的条件下, 胞内 ATP 绝大部分来源于线粒体内的氧化磷酸化^[5]. 在氧化磷酸化过程中, H^+ 通过电子传递链在 ATP 合成酶的作用下生成 ATP(图 1). 若要降低细胞的能量水平, 必须考虑如何削弱氧化磷酸化的活性. 作者进行的第一个尝试是选育光滑球拟酵母的呼吸缺陷型突变株^[6]. 结果发现, 由于缺失了细胞色素 aa_3 和细胞色素 b, 呼吸缺陷型突变株线粒体复合体 I、I+III、II+III、IV 的活性不同程度下降, 导致 NADH 的氧化和 H^+ 的传递受到抑制, ATP 的产生减少, 但糖酵解速度提高了 30.7%^[6]. 这表明降低细胞能量水平以加速酵解的思路是可行的. 在此基础上, 作者希望利用一系列化学物质, 如鱼藤酮(rotenone)、抗霉素 A(antimycin A)和寡霉素(oligomycin), 在

*江苏省自然科学基金资助项目(BK2002072), 江苏省高等学校研究生创新计划, 留学回国人员科研启动基金和教育部高等学校博士点建设专项资金(20040294003)资助项目.

**通讯联系人.

Tel: 0510-5868439, Fax: 0510-5888301

E-mail: yinli@sytu.edu.cn

收稿日期: 2004-09-27, 接受日期: 2004-10-28

细胞生长状态下对氧化磷酸化的不同部位进行专一性的抑制,以期全面了解光滑球拟酵母中氧化磷酸化对酵解的影响,并为下一步对产能途径进行代谢工程研究提供生理学依据。

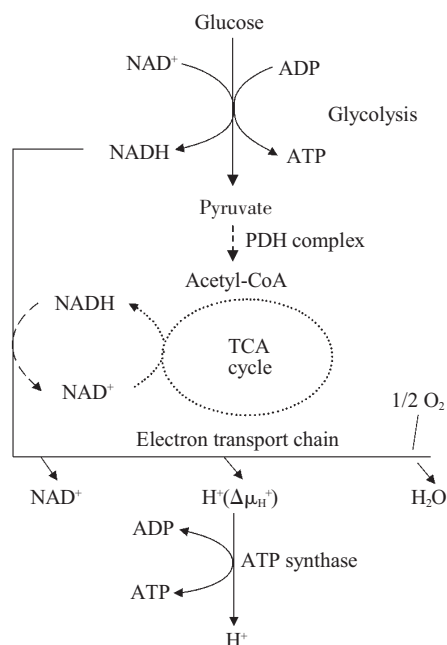


Fig.1 Relationship between oxidative phosphorylation and glycolytic pathway

1 材料和方法

1.1 菌株

光滑球拟酵母 CCTCC M202019, 烟酸、生物素、硫胺素、盐酸吡哆醇 4 种维生素营养缺陷型,且丙酮酸脱羧酶活性组成型降低,由本研究室选育^[7]。

1.2 培养基

1.2.1 斜面 and 种子培养基. 参见文献[7]

1.2.2 发酵培养基. 参见文献[7]

1.3 培养方法

从新鲜斜面上接一环菌入种子培养基(每 500 ml 锥形瓶装 50 ml 培养基),于 30℃、200 r/min 摇瓶培养 24 h 后,以 10%接种量(体积比)接入发酵培养基(每 500 ml 锥形瓶装 50 ml 培养基)于 30℃、200 r/min 培养 48 h. 将细胞培养至 24 h 依据实验要求添加氧化磷酸化抑制剂,以未添加抑制剂的培养液为对照,每一组设 3 个平行实验。

1.4 葡萄糖、有机酸、细胞浓度 (dry cell weight, DCW) 测定

具体操作参见文献[7]。

1.5 胞内 ATP 含量的测定

取 5 ml 处于对数生长期的细胞发酵液,置于已加热煮沸的 5 ml 50 g/L 的三氯乙酸中,共同煮沸 5 min,迅速置于冷水中冷却,加 50 g/L 三氯乙酸定容到 10 ml,然后用高效液相色谱法测定^[8,9]。测定条件为柱子: Stable-C₁₈ 反向柱;流动相: 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0),流速 1.2 ml/min;检测器: 260 nm;柱温: 25℃;进样: 10 μl;洗脱时间: 10 min。

1.6 糖酵解关键酶活性的测定

将在 30℃ 下培养了 30 h 的细胞用无菌生理盐水离心洗涤 3 次,然后悬浮在 pH 为 7.5 的 0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲液中,用玻璃珠于 4℃ 下振荡 5 min,使细胞在悬浮液中混合均匀,于 4℃ 超声波破碎 2 min,工作强度为 30%,工作 1 s 间隔 0.5 s;随后在 4℃,10 000 r/min 下离心 3 min,除去细胞碎片,取上清液测定。酶活测定在 25℃ 恒温下进行。用分光光度计于 340 nm 下隔 30 s 读取光吸收值(A),共读取 3 min. 以 A 对时间作图,取反应最初线性部分计算酶活性。

己糖激酶 (HK)、磷酸果糖激酶 (PFK) 和丙酮酸激酶 (PK) 活性的测定参见文献[10]。

1.7 蛋白质含量的测定

参见文献[11]。

2 结 果

2.1 鱼藤酮对 *T. glabrata* 糖酵解和能量状态的影响

鱼藤酮是电子传递链中复合体 I 的专一抑制剂,能阻断电子由 NADH 向 CoQ 传递. 当培养液中含有 10 mg/L 鱼藤酮时,相应的细胞干重为对照组(未添加鱼藤酮)的 77.6%。随着鱼藤酮浓度的增加,胞内 ATP 水平(每克干细胞含有 ATP 的量,DCW)从对照组的 25.3 mmol/g 下降至 14.3 mmol/g,下降了 43% (图 2)。而单位细胞的葡萄糖消耗速度和丙酮酸生成速度比对照组分别提高了 360% 和 17% (图 2),此时磷酸果糖激酶 (PFK) 和丙酮酸激酶 (PK) 的活性分别提高了 340% 和 32% (图 2)。然而,鱼藤酮的添加使得己糖激酶 (HK) 的活性略有降低 (图 2)。图 2 表明,由于 PFK 的活性显著提高,导致葡萄糖消耗速度相应地成倍提高。但由于 PK 活性提高幅度不大,导致了丙酮酸生成速度并没有特别明显的提高。

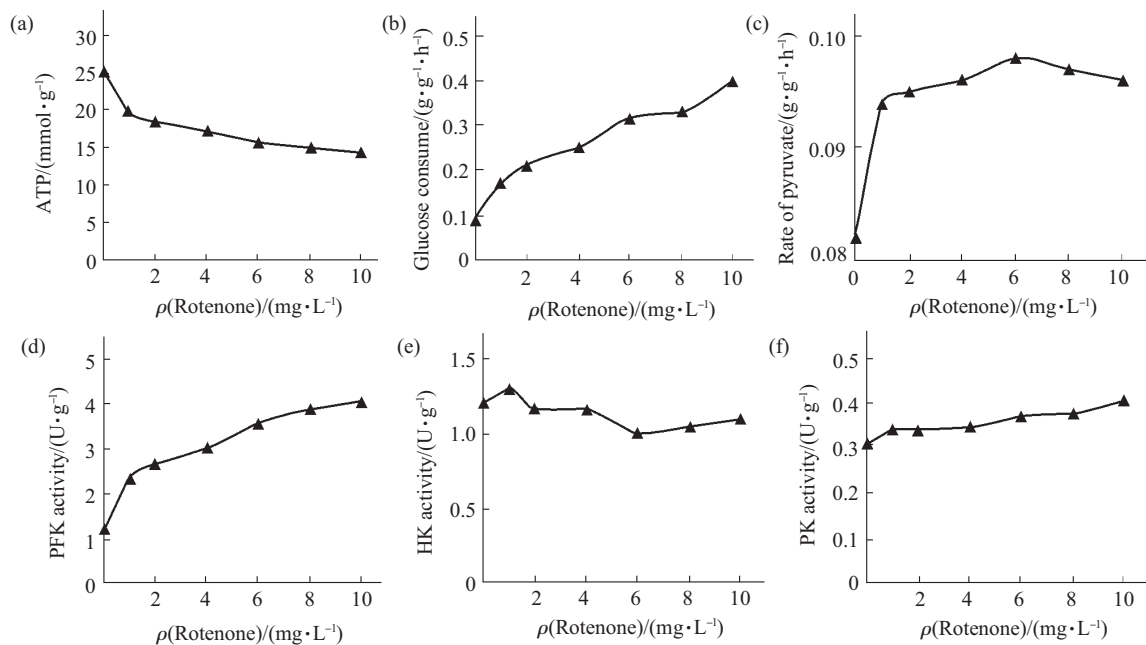


Fig.2 Effect of rotenone on glycolytic pathway and level of ATP

Rotenone was added to the medium at 24 h of fermentation.

2.2 抗霉素 A 对 *T. glabrata* 糖酵解和能量状态的影响

抗霉素 A 是电子传递链中复合体 III 的专一抑制剂, 抑制电子从细胞色素 b 向细胞色素 c 传递, 使 ATP 合成受阻. 随着发酵液中抗霉素 A 浓度的增加, 细胞生长减弱了 22.3%, 胞内 ATP 含量下降了 27.7% (图 3), 而且胞内 ATP 的含量随着培养

液中抗霉素 A 浓度的增加而降低. 胞内 ATP 含量的下降, 使葡萄糖消耗速度提高了 240% (图 3), 但丙酮酸生成速度仅增加了 8.5% (图 3). 当培养液抗霉素 A 的浓度为 10 mg/L 时, PFK 的活性增加了 233% (图 3), 改变培养液中抗霉素 A 的浓度并不影响糖酵解途径中的其他关键酶 HK 和 PK 活性 (图 3).

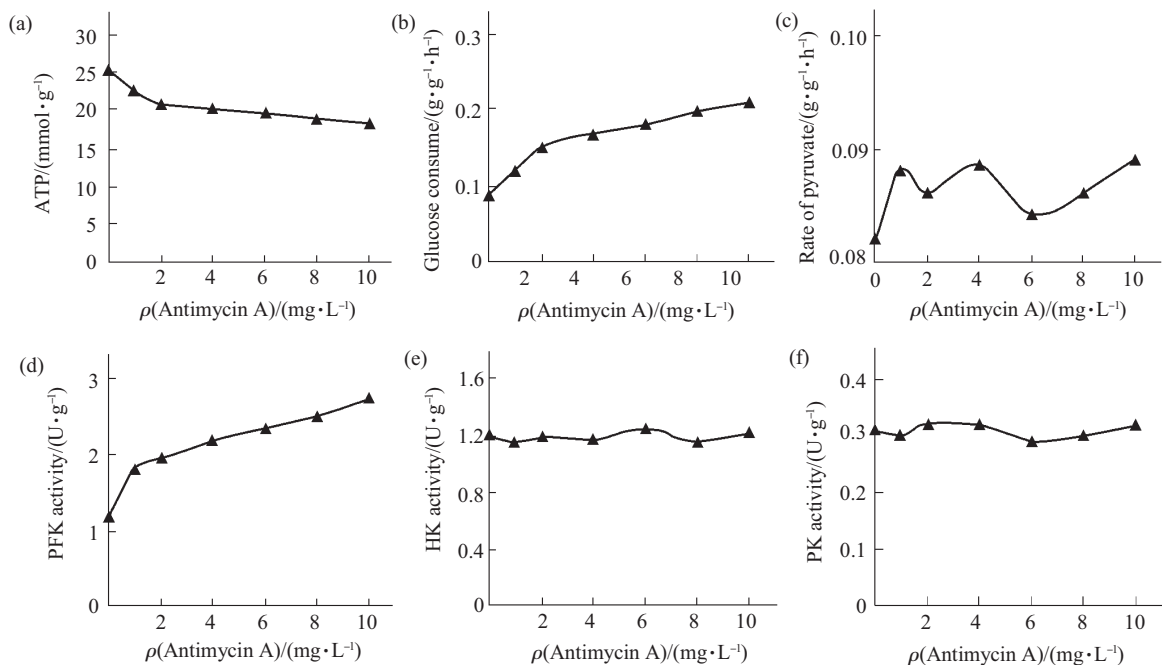


Fig.3 The effect of antimycin A on glycolytic pathway and the level of ATP

Antimycin A was added to the medium at 24 h of fermentation.

2.3 寡霉素对 *T. glabrata* 糖酵解和能量状态的影响

寡霉素是磷酸化抑制剂, 可与 F_0F_1 -ATPase 中 F_0 部分的寡霉素敏感蛋白 (OSCP) 结合, 阻塞氢离子通道, 从而抑制磷酸化的进行, 使 ATP 的合成受到抑制. 当培养液中含有 0.05 mg/L 寡霉素时, 胞内 ATP 含量下降为对照组的 64.3% (图 4). 当培养液中寡霉素浓度达到 0.4 mg/L 时, 胞内 ATP 浓度 (DCW) 下降为 9.6 mmol/g, 此时, 细胞不能继续生长 (DCW 维持在 9.1 g/L). 而葡萄糖消耗速度

和丙酮酸的生成速度却随着寡霉素浓度 (小于 0.6 mg/L) 的增加而增加 (图 4). 在培养液中含有 0.6 mg/L 寡霉素时的 PFK 活性为对照的 670%, 改变培养液中寡霉素的浓度并不影响 HK 和 PK 的活性 (图 4). 图 4 表明, 当培养液中寡霉素浓度超过 0.6 mg/L 时, 继续增加寡霉素的浓度并不改变胞内 ATP 含量和糖酵解关键酶的活性, 也不影响葡萄糖消耗速度和丙酮酸的生产速度.

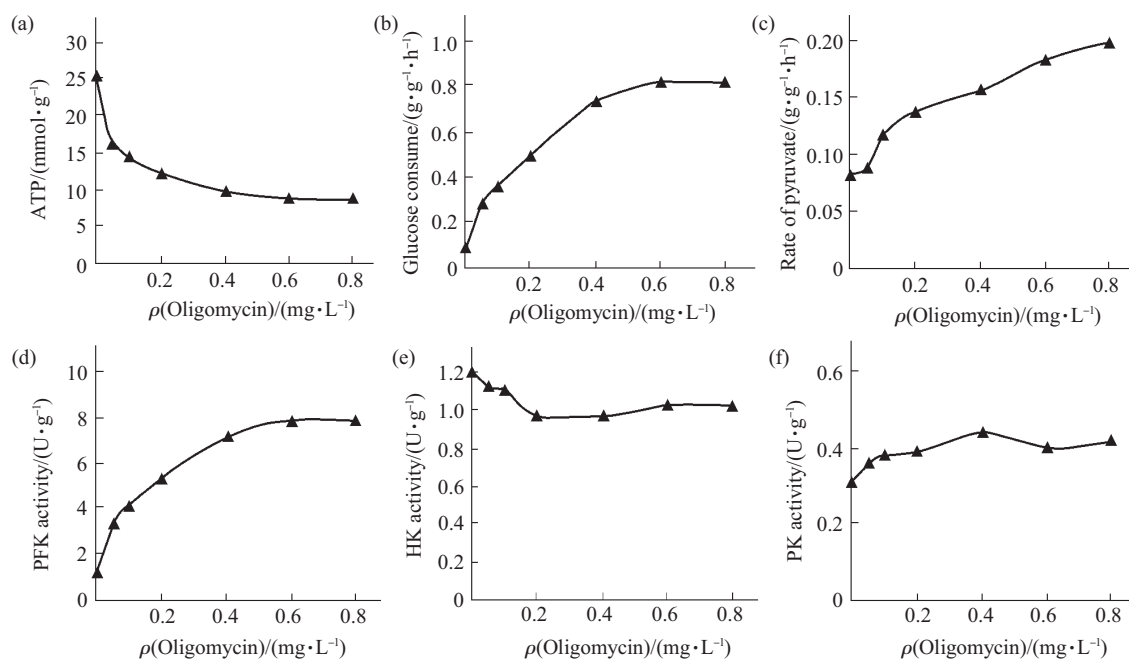


Fig. 4 The effect of oligomycin on glycolytic pathway and the level of ATP

Oligomycin was added to the medium at 24 h of fermentation.

2.4 ATP 水平对糖酵解途径和糖酵解速度的影响

在研究 3 种氧化磷酸化抑制剂对 *T. glabrata* 糖酵解和胞内能量影响的基础上, 建立了胞内 ATP 含量与糖酵解速度和关键酶活性之间的关系 (图 5). 图 5 表明, 葡萄糖消耗速度和丙酮酸生成速度随着胞内 ATP 含量的增加而降低, 呈现负相关 (图 5). 光滑球拟酵母中 PFK 活性的增加可以明显提高葡萄糖消耗速度 ($r^2=0.9958$, 图 5), 这一结果表明, 在光滑球拟酵母的酵解途径中, PFK 的活性可能是影响糖酵解速度的最关键因素. 此外, 从胞内不同

ATP 水平时糖酵解 3 个关键酶活性的变化 (图 4) 可以看出, 随着胞内 ATP 含量的增加, PFK 的活性逐渐降低 (图 5), 二者之间呈负相关, 多项式关系为 $y=0.0102x^2-0.6709x+11.58$, 相关系数 $r^2=0.9971$, 而 ATP 与 HK ($r^2=0.5099$)、PK ($r^2=0.8706$) 的相关系数均小于 0.9 (图 5), 这一结果表明 ATP 主要是通过影响糖酵解 PFK 的活性而影响糖酵解速度的.

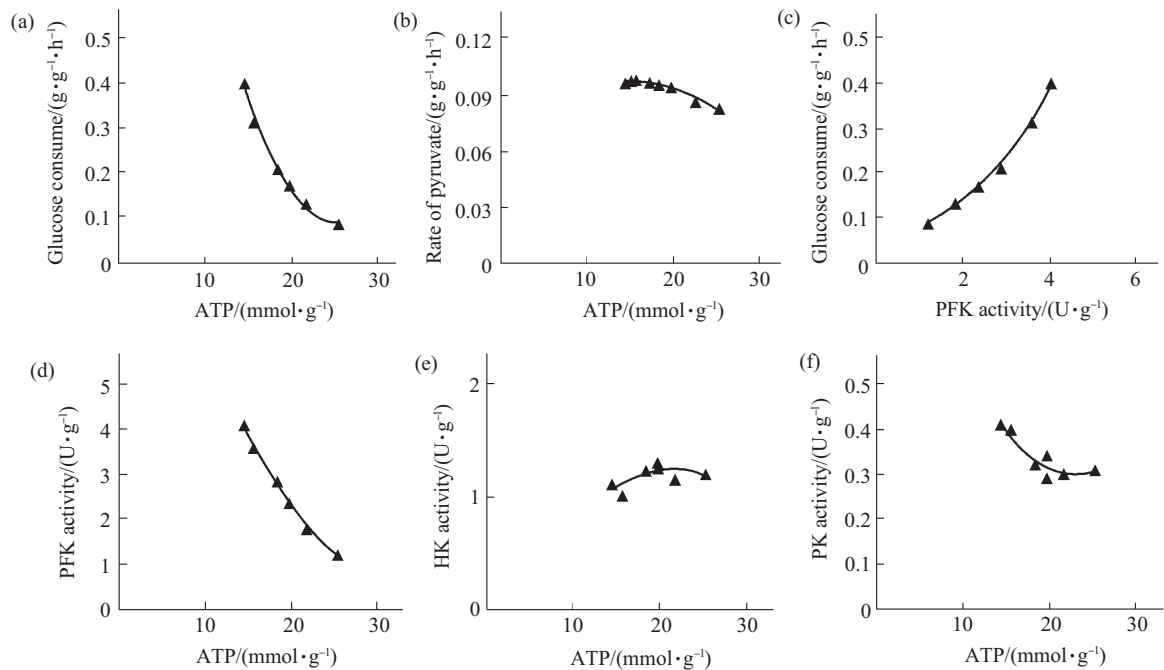


Fig.5 Effect of intracellular ATP concentration on the glycolytic pathway

(a) $y=0.0026x^2-0.1288x+1.7149$; $r^2=0.9967$. (b) $y=-0.0001x^2+0.0037x+0.0709$; $r^2=0.965$. (c) $y=0.0241x^2-0.0202x+0.0824$; $r^2=0.9958$. (d) $y=0.0102x^2-0.6709x+11.58$; $r^2=0.9971$. (e) $y=-0.0038x^2+0.1634x-0.5185$; $r^2=0.5099$. (f) $y=0.0018x^2-0.0796x+1.1986$; $r^2=0.8706$.

3 讨 论

降低胞内 ATP 水平能否提高酵解速度取决于两个因素: a. 细胞代谢系统的特性; b. 细胞代谢系统对 ATP 降低所表现出的响应. 在培养液中添加 1 mg/L 抗霉素 A 引起胞内 ATP 含量下降了 10%, 葡萄糖消耗速度却增加了 36%, 表明光滑球拟酵母的糖酵解途径对胞内 ATP 含量的变化非常敏感. 对于 3 种不同的氧化磷酸化抑制剂, 因寡霉素直接作用于 ATPase, 其对 ATP 的生成起着强烈抑制作用, 进而抑制细胞的生长. 但由于 NADH 通过电子传递链的氧化并未受到影响, 所以并不引起丙酮酸对葡萄糖得率的变化 (数据未给出). 然而对于电子传递链抑制剂鱼藤酮和抗霉素 A, 两者均能引起细胞生长的减弱和培养液中乳酸的积累 (大约 1.5 g/L), 尽管葡萄糖消耗速度加快, 但丙酮酸对葡萄糖的得率下降. 这是因为在加入鱼藤酮或抗霉素 A 后, NADH 通过电子传递链的氧化受阻, 为了使酵解能够持续进行, 在光滑球拟酵母中丙酮酸到乙醇的代谢途径受维生素 B₁ 限制的情况下^[12], 细胞将丙酮酸转化为乳酸, 以使 NAD⁺/NADH 比率保持相对稳定^[13-15]. 在培养液中含有相同浓度的鱼

藤酮和抗霉素 A 情况下, 抗霉素 A 更能有效地抑制 ATP 的合成, 表明在电子传递链中, 与 H⁺ 由 NADH 向 CoQ 传递相比, H⁺ 从细胞色素 b 向细胞色素 c 传递对 ATP 的生成有着重要的意义. 对氧化磷酸化途径中 3 个部位专一抑制结果表明, 阻断 H⁺ 向 ATPase 传递或者降低 ATPase 能有效降低胞内 ATP 水平, 且对细胞生理代谢影响较小. 其他学者在原核生物模式 *E. coli* 中进行的能量代谢研究也得到了相似的结论^[1,2,16].

实验结果表明, 降低 *T. glabrata* 胞内 ATP 含量能有效提高糖酵解速度, 且 ATP 是通过 *T. glabrata* 影响糖酵解的关键酶 PFK 活性从而影响糖酵解速度的. 这与作者前期关于呼吸缺陷型突变株的研究结论是一致的^[6]. 在原核生物中同样存在着类似的现象, 如降低 *E. coli* 腺嘌呤核苷酸的磷酸化水平可激活其糖酵解途径的限速酶(磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶), 从而加速酵解^[17]. Jensen 和 Michelsen^[18]通过去除 H⁺-ATPase 的质子转运功能, 降低 *E. coli* 胞内 ATP 含量, 明显加快糖酵解速度. 但在酵母中, Schaaff 等^[19]认为, 糖酵解途径中的关键酶并不是影响糖酵解速度的关键因素, 过量表达磷酸果糖激酶并不能提高糖酵解速度^[20]. 作者的

研究表明, *T. glabrata* 糖酵解速度主要受糖酵解途径中关键酶 PFK 所控制($r^2=0.9958$)(图 4), HK 和 PK 的活性在一定程度上影响了糖酵解速度. 这在一定程度上增加了对真核微生物中能量代谢和酵解之间相互关系的认识. ATP 含量对糖酵解速度的影响主要体现在影响 PFK($r^2=0.9971$)和 PK($r^2=0.8706$)活性上, 这可能是为什么过量表达磷酸果糖激酶的活性而不能提高糖酵解速度的原因^[20].

以往关于鱼藤酮、抗霉素 A 和寡霉素对氧化磷酸化影响的研究, 主要是用纯酶或无细胞提取物进行的. 在本研究中, 作者首次在实际培养状态下研究了氧化磷酸化抑制剂对光滑球拟酵母酵解途径的影响, 并证实添加氧化磷酸化抑制剂可以在保持细胞一定生长的基础上适当降低能量水平, 从而促进酵解. 这一结果对提高工业发酵生产中目标代谢产物的生产强度具有重要意义, 也为进一步的产能途径代谢工程研究奠定了理论基础.

参 考 文 献

- Yokota A, Henmi M, Takaoka N, *et al.* Enhancement of glucose metabolism in pyruvic acid-hyperproducing *Escherichia coli* mutant defective in F₁-ATPase activity. *J Ferment Bioeng.* 1997, **83**: 132~138
- Ruyter G J, Postma P W, van Dam K, *et al.* Control of glucose metabolism by enzyme IIGlc of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1991, **173** (19): 6184~6191
- Kacser H, Burns J A. Rate control of biological processes. Cambridge Symposium. Soc Exp Biol, 1973, **27**: 65~104
- Li Y, Hugenholtz J, Chen J, *et al.* Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* using a two-stage oxygen supply control strategy. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002, **60** (1~2): 101~106
- de Vries S, Marres C A M. The mitochondrial respiratory chain of yeast: Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1987, **895** (3): 205~239
- 刘立明, 陈 坚, 李华钟, 等. 降低光滑球拟酵母电子传递链活性加速丙酮酸合成. *微生物学报*, 2004, **44** (6): 800~804
- Liu L M, Chen J, Li H Z, *et al.* *Acta Microbiol Sin*, 2004, **44** (6): 800~804
- Liu L M, Li Y, Li H Z, *et al.* Manipulating the pyruvate dehydrogenase bypass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production. *Lett Appl Microbiol*, 2004, **39** (2): 199~206
- Sato K, Yoshida Y, Hirahara T, *et al.* On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing. *J Biosci Bioeng*, 2000, **90** (3): 294~301
- Stanley P E. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic acid. *Methods Enzymol*, 1986, **133**: 14~22
- Willis A W. *Methods in Enzymology: Carbohydrate Metabolism*. New York: Academic Press, 1982. 3~165
- 宁正祥. 食品成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 77~78
- NING Z X. *Handbook of Food Ingredients Analysis*. Beijing: China Light Industry Press, 1998. 77~78
- Li Y, Chen J, Lun S Y, *et al.* Efficient pyruvate production by a multi-vitamin auxotroph of *Torulopsis glabrata*: key role and optimization of vitamin levels. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55** (6): 680~685
- Van Dijken J, Scheffers W. Redox balances in the metabolism of sugars by yeast. *FEMS Microbiol Rev*, 1986, **32**: 199~224
- Krebs A, Bridger W. On the monomeric structure and proposed regulatory properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Escherichia coli*. *Can J Biochem*, 1976, **54** (1): 22~26
- Weitzman P. Regulation of citrate synthase activity in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1966, **128** (1): 213~215
- Koebmann B J, Westerhoff H V, Snoep J L, *et al.* The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol*, 2002, **184** (14): 3909~3916
- Shen L C, Atkinson D E. Regulation of pyruvate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Interactions of adenylate energy charge and other regulatory parameters. *J Biol Chem*, 1970, **245** (22): 5974~5978
- Jensen P R, Michelsen O. Carbon and energy metabolism of *atp* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1992, **174** (23): 7635~7641
- Schaaff I, Heinisch J, Zimmermann F K. Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast*, 1989, **5**: 285~290
- Davies S E, Brindle K M. Effects of overexpression of phosphofructokinase on glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 1992, **31** (19): 4729~4735

Effect of Oxidative Phosphorylation Inhibitors on The Glycolytic Flux in *Torulopsis glabrata**

LIU Li-Ming^{1,2)}, CHEN Jian^{1,2)}, LI Hua-Zhong^{1,2)}, LI Yin^{1,2)**}

⁽¹⁾The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education,

⁽²⁾School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract The relationship between the concentration of intracellular ATP and the glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* was studied by adding oxidative phosphorylation inhibitors (rotenone, antimycin A and oligomycin). When 10 mg/L rotenone and antimycin A were added to the cell cultures, the concentrations of intracellular ATP were approximately 43% and 27.7% less than that of the control, respectively. The specific activity of phosphofructokinase, one of the rate limiting enzymes of the glycolytic pathway, increased by a factors of 3.4 and 2.3, in comparison of the control respectively. With the specific activity of phosphofructokinase increased, the rate of glucose consumed increased by a factor of 3.6 and 2.4 compared with the control, and the rate of pyruvate produced increased by 17% and 8.5% respectively. The specific activities of hexokinase and pyruvate kinase were not affected by the addition of rotenone or antimycin A. Furthermore, the concentration of intracellular ATP decreased by 64.3% upon addition of 0.05 mg/L oligomycin to the cell culture, and the growth of *Torulopsis glabrata* was ceased when 0.4 mg/L oligomycin was added to the culture broth at 24 h. Both the rate of glucose consumed and the rate of pyruvate produced were enhanced with increasing the concentration of oligomycin (<0.6 mg/L) in the cell cultures. As a result, the activity of phosphofructokinase ($r^2=0.9971$), the rate of glucose consumed ($r^2=0.9967$) and the rate of pyruvate produced ($r^2=0.965$) were enhanced by a decrease in the energy level of the cell (the concentration of intracellular ATP). Increase of the rate of glucose consumed rooted in elevation of the specific activity of phosphofructokinase ($r^2=0.9958$) and pyruvate kinase ($r^2=0.8706$). These results are the first answer to the fundamental question of what controls the flux through glycolysis in *Torulopsis glabrata*.

Key words *Torulopsis glabrata*, oxidative phosphorylation inhibitors, glycolytic pathway, ATP

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2002072), The Postgraduate Innovation Project of Jiangsu Province, The Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry and The Ph.D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (20040294003).

**Corresponding author . Tel: 86-510-5885727, Fax: 86-510-5888301, E-mail: yinli@sytu.edu.cn

Received: September 27, 2004 Accepted: October 28, 2004