

E1A 激活基因阻遏子促进 人血管平滑肌细胞分化和迁移*

韩雅玲^{1)**} 胡 叶¹⁾ 刘海伟¹⁾ 康 建¹⁾ 闫承慧¹⁾ 李少华²⁾

(¹⁾沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科, 沈阳 110016;

²⁾Department of Pathology, Robert Wood Johnson Medical School, New Jersey 08854, USA)

摘要 为探讨 E1A 激活基因阻遏子(cellular repressor of E1A-stimulated genes, CREG)蛋白在人血管平滑肌细胞株 HITASY 分化和迁移中的调控作用, 构建了重组逆转录病毒载体 pLNCX₂(+)/CREG 和 pLXSN(-)/CREG. 以带绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的空载体 pLNCX(+)/GFP 和正常 HITASY 为对照, 用磷酸钙共沉淀法将重组逆转录病毒载体转染 293 细胞, 包装出完整的逆转录病毒后, 感染 HITASY. 经 G418 筛选, 获得稳定感染的细胞克隆. 应用免疫荧光染色、蛋白质印迹等方法检测 CREG 和平滑肌分化标志蛋白 α -肌动蛋白(SM α -actin) 表达, 同时通过刮伤实验、慢速显微摄像技术检测细胞迁移能力以及用明胶酶谱方法分析细胞基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 的活性. 结果表明: pLNCX₂(+)/CREG 稳定感染的 HITASY 中 CREG 和 SM α -actin 蛋白表达上调, MMP-2 和 MMP-9 活性升高, 细胞迁移速度加快; pLXSN(-)/CREG 稳定感染的 HITASY 中 CREG 和 SM α -actin 蛋白表达下调, MMP-2 和 MMP-9 活性降低, 细胞迁移速度减慢. 上述研究提示 CREG 在诱导血管平滑肌细胞分化的同时促进细胞迁移.

关键词 阻遏子, 腺病毒蛋白 E1A, 分化, 迁移, 逆转录病毒载体, 平滑肌

学科分类号 Q555.7, R34

E1A 激活基因阻遏子 (cellular repressor of E1A-stimulated genes, CREG) 是新近从 HeLa 细胞 cDNA 文库中克隆的转录调控相关基因. 研究表明^[1], CREG 蛋白与 6-磷酸甘露醇胰岛素样生长因子 II 受体 (insulin-like growth factor II /mannose 6-phosphate receptor, M6P/IGF2R) 相关, 在多种肿瘤细胞中发挥抑制增殖和促进分化的作用. 先前报道本室建立的人胸廓内动脉平滑肌细胞克隆株 HITASY, 在不同培养条件下可发生分化和去分化表型的相互逆转, 应用差异显示 PCR 技术在分化表型 HITASY 中可筛选到高表达差异性 CREG 基因, 提示其表达可能与血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 的分化密切相关^[2], 但该基因的表达变化对 VSMCs 迁移功能有无影响国内外尚未见报道. 目前认为血管损伤后 VSMCs 表型转换是其增殖和迁移的始动因素, 而 VSMCs 增殖与迁移是导致动脉粥样硬化和血运重建后再狭窄等增生性血管病的重要机制. 本实验以 HITASY 为模型, 通过构建正、反义 CREG 逆转录病毒表

达载体感染 HITASY, 研究 CREG 基因对 HITASY 分化和迁移功能的影响, 以期探讨增生性血管病发病机制提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料

人胸廓内动脉平滑肌细胞克隆株 HITASY 由本研究室建立. pGEX-4T(+)/CREG 重组质粒、兔抗人 CREG 多克隆抗体由本研究室刘海伟博士构建和制备. pVAX₁ 质粒、pLNCX₂、pLXSN 逆转录病毒真核表达载体购自 Clontech 公司. 胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青公司. DMEM 购自 GIBCO BRL 公司. SM α -actin, MMP-2 和 MMP-9 单克隆抗

*国家自然科学基金资助项目(30070280).

** 通讯联系人.

Tel: 024-23056183, Fax: 024-23922184

E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

收稿日期: 2004-12-27, 接受日期: 2005-01-30

体购自北京中山公司. 4,6- 联脒 -2- 苯基吲哚 (4, 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 细胞核荧光染料购自 Sigma 公司. 辣根过氧化物酶及荧光染料标记的山羊抗兔二抗购自 Jackson Immunoresearch Laboratories 公司. 蛋白质印迹化学发光试剂 (ECL, RPN2106) 购自 Amersham 公司. 反转录 PCR 采用 TaKaRa 公司的 RNA PCR Kit (DR019A).

1.2 方法

1.2.1 CREG 正、反义表达载体的定向克隆. 用亚克隆技术将 pGEX-4T(+)/CREG 中的 CREG cDNA 经 pVAX₁ 质粒正向克隆至逆转录病毒载体 pLNCX₂. 同时, 将 CREG cDNA 反向克隆至逆转录病毒载体 pLXSN. 分别构建正义 CREG 载体 pLNCX₂(+)/CREG 和反义 CREG 载体 pLXSN(-)/CREG, 筛选阳性克隆送 TaKaRa 公司测序.

1.2.2 细胞培养、DNA 转染及阳性克隆筛选. HITASY 培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 贴壁生长至 50% 融合时, 磷酸钙沉淀法将转染 293 包装细胞后获得的 pLNCX₂(+)/CREG、pLXSN(-)/CREG 和 pLNCX(+)/GFP 逆转录病毒上清感染 HITASY. 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养 20 h 后弃转染试剂, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 72 h, 以 1:10 比例转入 G418 浓度为 800 mg/L 的选择培养基中至生长出细胞克隆, 扩增培养. 以正常 HITASY 为空白对照进行以下实验.

1.2.3 RT-PCR. TRIzol 一步法提取细胞总 RNA. 取各组细胞总 RNA 2 μg 逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 10 μl 进行热启动 PCR 温育 5 min, 94℃ 变性 1 min, 60℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 34 个循环, 72℃ 延伸 10 min. 引物序列: CREG 上游引物, 5' CTATGCCTGGTAGAGATCACAAG, 下游引物, 5' CTCTACCTTCAAAGAGAGGTCAGTCG, 扩增片段约 670 bp; GAPDH 上游引物, 5' TCACCATCTTCCAGGAGCGAG, 下游引物, 5' TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG, 扩增片段为 697 bp. 以 GAPDH 为内参照, 参考 TaKaRa RNA PCR Kit 说明书实施 RT-PCR, PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于 Bio-Rad Doc2000 图像分析仪扫描分析.

1.2.4 免疫荧光染色. 将细胞培养在清洁灭菌的盖玻片上至 70%~80% 融合, 用 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次, 再用 0.2% Triton X-100 PBS 通透 15 min, 经 PBS 洗涤 3 次后, 用 5% 山羊血清封闭 30 min. 加 CREG、SMα-actin 抗体, 室温

孵育 4 h. 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入荧光标记的第二抗体孵育 2 h. DAPI 复染细胞核 15 min. 经 PBS 洗涤后甘油封片. 共聚焦显微镜 (Olympus FV-500) 下观察、摄像.

1.2.5 刮伤实验. 参照文献 [3], 将 pLNCX₂(+)/CREG、pLXSN(-)/CREG、pLNCX(+)/GFP 稳定感染的 HITASY 和对照 HITASY 接种在清洁灭菌的盖玻片上, 待细胞融合后以无 FBS 的 DMEM 培养液饥饿 24 h, 使细胞同步化, 取出盖玻片, 用无菌牙签沿直线刮除 HITASY 形成无细胞区, 放回新培养板中, 恢复含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 在倒置显微镜下观察细胞迁移能力, 以迁移至空白区的细胞数计算空白区覆盖率. 每一样品平行测量 3 次, 每次观察 12 个高倍视野, 取平均值.

1.2.6 慢速显微摄像技术 (time-lapse). 参照文献 [4], 将细胞以 1×10⁴ 接种于 35 mm 培养皿, 置 5% CO₂, 37℃ 恒温小室, 在配有自动摄像装置 (CoolSNAPfx) 的倒置相差显微镜 (Olympus IX-70) 下观察细胞移行, 每隔 1 h 作序列摄影 (Image Express plus 4.5), 连续 8 h.

1.2.7 蛋白质印迹分析. 按文献 [5] 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、转膜、抗体结合及显色. 分离胶浓度为 12%; 一抗分别为抗 MMP-2、MMP-9、SMα-actin 和抗 CREG 抗血清. 经辣根过氧化物酶标记的二抗孵育后, 按 ECL 试剂盒说明书进行曝光.

1.2.8 明胶酶谱分析. 配制 10% 的聚丙烯酰胺凝胶, 其中含 0.1% 明胶. 将培养上清与上样缓冲液混合后直接上样, SDS-PAGE 电泳. 电泳结束后, 剥离凝胶, 以蒸馏水漂洗后, 移入 2.5% Triton X-100 溶液 100 ml 中, 摇床上低速摇动以洗脱 SDS. 30 min 后更换洗脱液继续洗脱 30 min. 再以蒸馏水漂洗, 凝胶移入明胶酶缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L CaCl₂, 1 μmol/L ZnCl₂) 100 ml 中, 37℃ 温育 12~16 h. 0.1% 考马斯亮蓝染色, 用脱色液 (甲醇:水:冰醋酸 = 45:45:10) 脱色至出现明显清晰的负染谱带.

1.2.9 统计处理分析. 实验结果以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件, 组间比较用单因素方差分析.

2 结 果

2.1 真核表达载体的构建和转染

将 CREG cDNA 经 pVAX₁ 质粒正向克隆至逆

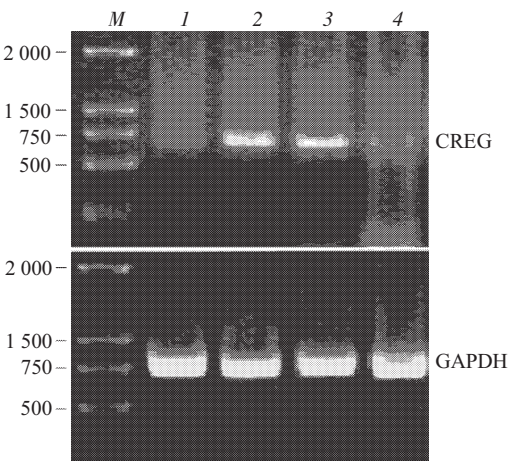


Fig.1 Expression of CREG was analyzed by RT-PCR
Expression of CREG mRNA in HITASY was detected by RT-PCR. Blots were scanned with GelDoc2000 analysis system and band density was quantified with image analysis software. 1: control HITASY; 2: HITASY infected with pLNCX₂(+)/CREG; 3: HITASY infected with pLXSN(-)/CREG; 4: HITASY infected with pLNCX(+)/GFP. M: DL2000 DNA marker.

转录病毒载体 pLNCX₂, 反向克隆至逆转录病毒载体 pLXSN, 转化 *E.coli* DH5 α , 用酶切鉴定筛选出阳性克隆, 测序结果与 GenBank 中报道的 CREG 序列比对完全一致.

将重组逆转录病毒载体用磷酸钙共沉淀法分别感染 HITASY 后, 以正常 HITASY 为对照, 用 RT-PCR 检测各组细胞 CREG mRNA 表达水平. 如图 1 所示, pLNCX₂(+)/CREG 和 pLXSN(-)/CREG 稳定感染的 HITASY 中均可见约 670 bp 的扩增谱带, 与空载体 pLNCX(+)/GFP 转染组及与空白对照组相比明显增强.

2.2 CREG 诱导细胞 SM α -actin 表达变化

为验证正、反义 CREG 对 HITASY 分化标志蛋白 SM α -actin 表达的影响, 用免疫荧光染色和蛋白质印迹分析观察到与空白对照组相比感染 pLNCX₂(+)/CREG 的 HITASY 其 CREG、SM α -actin 表达明显上调, 而感染 pLXSN(-)/CREG 的 HITASY 其 CREG 和 SM α -actin 表达下调 (图 2).

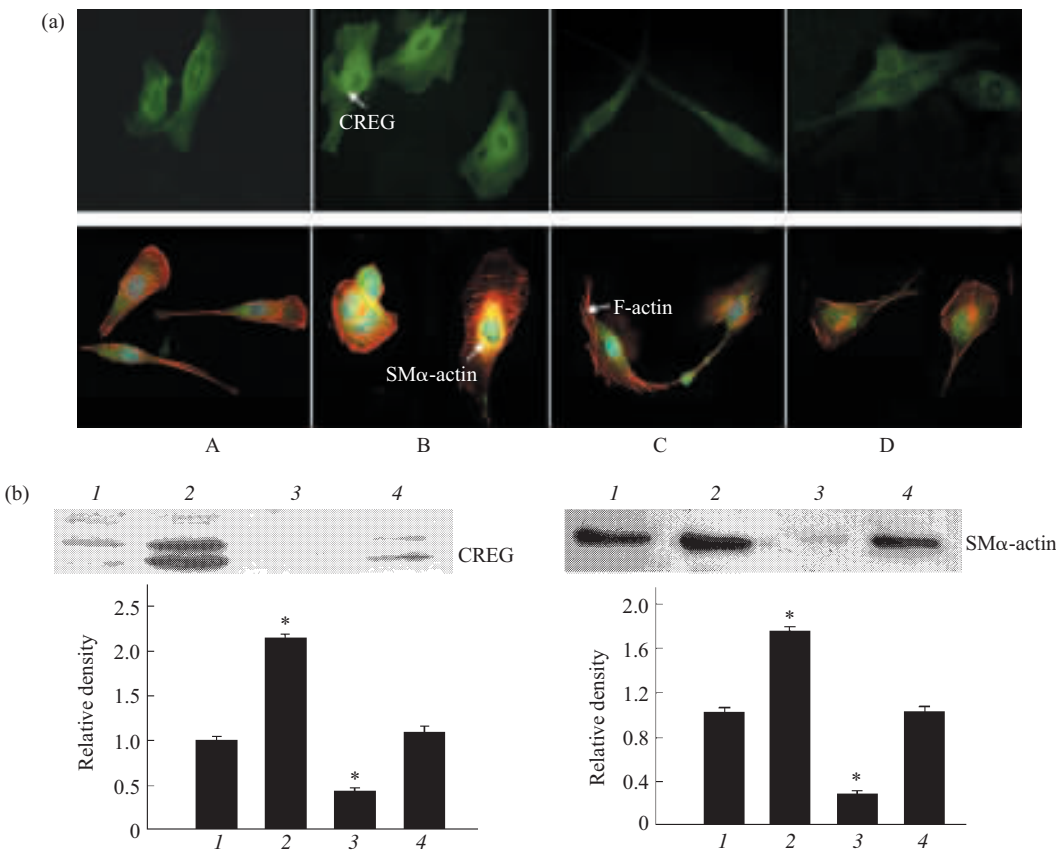


Fig.2 Effects of CREG on SM α -actin expression in HITASY by immunofluorescence and Western blot
(a) Expression of CREG and SM α -actin in HITASY were visualized by immunofluorescence. Green or yellow fluorescence was CREG and SM α -actin staining, and red fluorescence was F-actin staining. A: control HITASY; B: HITASY infected with pLNCX₂(+)/CREG; C: HITASY infected with pLXSN(-)/CREG; D: HITASY infected with pLNCX(+)/GFP ($\times 400$). (b) Cellular proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gel, and Western blot analysis was performed using specific antibodies for CREG and SM α -actin. Blots were scanned with GelDoc2000 analysis system and band density was quantified with image analysis software. 1: control HITASY; 2: HITASY infected with pLNCX₂(+)/CREG; 3: HITASY infected with pLXSN(-)/CREG; 4: HITASY infected with pLNCX(+)/GFP. * $P < 0.05$ vs control HITASY.

2.3 CREG 对 HITASY 迁移的影响

倒置相差显微镜下检测刮伤实验后各组 HITASY 的迁移细胞数, 计算空白区覆盖率, 每一样品平行测量 3 次, 每次观察 12 个高倍视野, 取平均值. 结果显示: 与正常 HITASY 相比,

pLNCX₂(+)/CREG 感染后细胞迁移速度加快, pLXSN(-)/CREG 感染后细胞迁移明显减慢, 两组移行细胞数和移行距离与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$) (图 3).

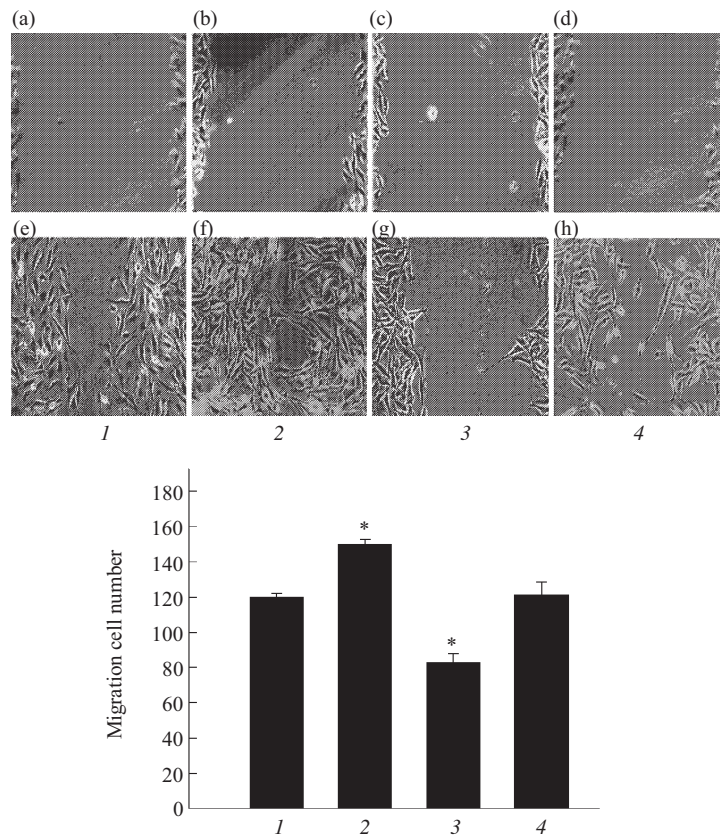


Fig.3 Effects of CREG on HITASY migration investigated by scrape-wounding assay

The graph of HITASY migration was drafted by SigmaPlot software. (a) through (d) were the cells wounded at once, (e) through (h) were the cells cultured in 10% FBS DMEM for 72 h. 1: control HITASY; 2: HITASY infected with pLNCX₂(+)/CREG; 3: HITASY infected with pLXSN(-)/CREG; 4: HITASY infected with pLNCX(+)/GFP. * $P<0.05$ vs control HITASY ($\times 10$).

Time-lapse 检测 HITASY 移行轨迹和速度, 结果表明不同感染组 HITASY 迁移轨迹多为不规则形运动, pLNCX₂(+)/CREG 感染后细胞迁移速度较空白对照组和 pLXSN(-)/CREG 感染组细胞明显加快. 正常 HITASY 迁移速度亦高于 pLXSN(-)/CREG 感染的 HITASY (图 4).

2.4 CREG 诱导细胞 MMP-2、MMP-9 表达

用蛋白质印迹分析发现 pLNCX₂(+)/CREG 稳定感染的 HITASY 增加了 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达, 提示细胞基质合成利用增加. pLXSN(-)/CREG 稳定感染的 HITASY 可使 MMP-2 和 MMP-9 表达下调, 与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$); pLNCX(+)/GFP 感染组及空白对照

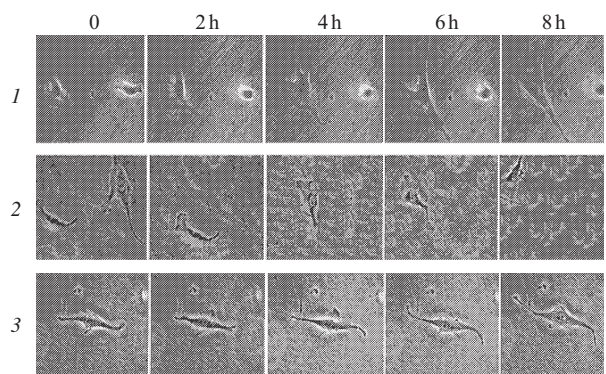


Fig.4 Migration of HITASY traced by time-lapse

HITASY were cultured in DMEM with 10% FBS. The migration paths of the cells were depicted for 0, 2, 4, 6, 8 h. 1: control HITASY; 2: HITASY infected with pLNCX₂(+)/CREG; 3: HITASY infected with pLXSN(-)/CREG ($\times 400$).

组间 MMP-2 和 MMP-9 表达差异无统计学意义 (图 5)。

图 6 表明, 与空白对照组比较, pLNCX₂(+)/CREG 感染的 HITASY 中基质金属蛋白酶 MMP-9、MMP-2 活性明显增高, pLXSN(-)/CREG 感染后 HITASY 中 MMP-9、MMP-2 活性明显减低。

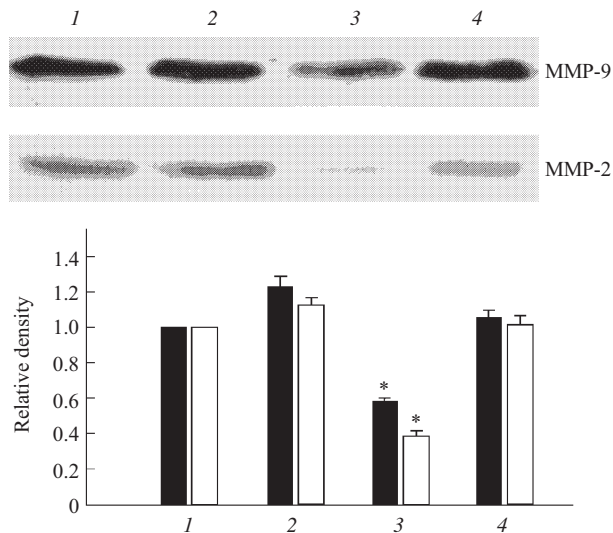


Fig.5 Effects of CREG on MMPs expression in HITASY
MMPs protein expressed in HITASY were detected by Western blot. Blots were scanned with GelDoc2000 analysis system and band density was quantified with image analysis software. 1: control HITASY; 2: HITASY infected with pLNCX₂(+)/CREG; 3: HITASY infected with pLXSN(-)/CREG; 4: HITASY infected with pLNCX(+)/GFP. **P*<0.05 vs control HITASY. ■: MMP-2; □: MMP-9.

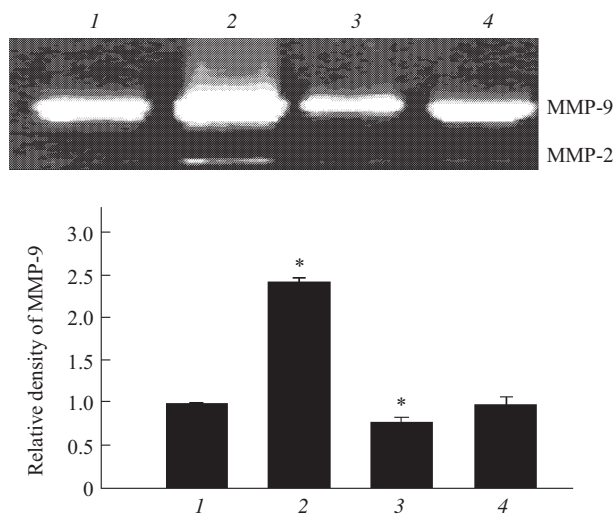


Fig.6 Effects of CREG on MMPs activities in HITASY
MMPs protein activities was detected in HITASY by gelatin SDS-PAGE zymography analysis. Blots were scanned with GelDoc2000 analysis system and band density was quantified with image analysis software. 1: control HITASY; 2: HITASY infected with pLNCX₂(+)/CREG; 3: HITASY infected with pLXSN(-)/CREG; 4: HITASY infected with pLNCX(+)/GFP. **P*<0.05 vs control HITASY.

3 讨 论

CREG 基因最初是作为平滑肌细胞表型调控相关基因, 在分化表型的 HITASY 中被克隆的。我们先前的研究发现, CREG 基因能够诱导体外培养的大鼠平滑肌细胞 SM α -actin 表达并促进细胞向分化表型转化^[6]。大鼠颈动脉拉伤实验亦证实, CREG 蛋白表达与血管损伤后再狭窄过程中血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖能力呈负相关^[7]。这些提示 CREG 基因具有促进分化、抑制增殖等促进 VSMCs 向分化表型转化的功能, 但该基因对 VSMCs 迁移的影响迄今尚未见报道。

本研究应用逆转录病毒载体体外感染正、反义 CREG 基因后发现, CREG 过表达后 HITASY 分化标志蛋白 SM α -actin 表达上调, 表明 CREG 基因促进 HITASY 的分化。然而刮伤实验和 Time-lapse 分析均发现, CREG 过表达促进 HITASY 迁移。蛋白质印迹检测表明, CREG 调控细胞外基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 表达上调。明胶酶谱分析亦发现, CREG 过表达 HITASY 中 MMPs 的活性显著增加。用感染反义 CREG 基因的细胞验证其分化和迁移能力的变化, 所得结果与感染正义细胞比较互为相反, 提示 CREG 基因在维持 HITASY 细胞分化的同时也促进 HITASY 细胞迁移。

SM α -actin 是 VSMCs 分化早期表达的标志蛋白^[8]。当细胞处于分化表型, SM α -actin 表达上调; 血管损伤后处于去分化表型的 VSMCs 大量增殖和迁移时, SM α -actin 表达下调^[9]。本实验观察到 HITASY 分化过程中 CREG 基因能诱导 SM α -actin 表达上调, 已知过表达的 CREG 蛋白可与血清反应因子共结合 SM α -actin 基因启动子区 CArG 位点, 调控 VSMCs 中 SM α -actin 表达, 表明 CREG 基因可能是通过启动 SM α -actin 基因转录调控 HITASY 的表型转换^[6]。

血管损伤后首先出现中膜 VSMCs 向内膜的迁移, 这一过程中, 细胞基底膜和细胞外基质发生降解、新生和重排, 其间需要基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 的参与, 而且 MMP-9 过度表达可通过多种途径增强 VSMCs 的迁移能力^[10]。本研究结果表明, CREG 表达上调不仅导致细胞分化, 亦可促进 MMP-2 和 MMP-9 表达, 使得细胞移行加快, 迁移能力增强。

本实验发现, CREG 转染诱导的 HITASY 细胞分化和迁移的变化与对照 HITASY 明显不同,

HITASY处于分化表型的同时迁移能力增强,表明CREG基因可引起VSMCs细胞本身生物学特性发生改变,进而细胞功能亦发生改变.本实验和其他研究结果^[1]虽然尚不能确定VSMCs分化与迁移发生在不同时期是VSMCs本身固有的特征,但血管损伤后VSMCs分化和迁移可能是两种不同的病理过程.VSMCs细胞表型以及细胞异质性是否影响CREG的功能表达,以及CREG基因发挥作用的具体机制尚需要更深入的研究来证实.

参 考 文 献

- 1 Veal E, Eisenstein M, Gill G. The secreted glycoprotein CREG enhances differentiation of NTERA-2 human embryonal carcinoma cells. *Oncogene*, 2000, **19** (17): 2120~2128
- 2 韩雅玲, 康 建, 张 剑, 等. 对去血清后 HITASY 细胞分子表达及表型分析. *生物化学和生物物理进展*, 2003, **30** (6): 868~873
Han Y L, Kang J, Zhang J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (6): 868~873
- 3 Pickering J G, Uniyal S, Ford C M, *et al.* Fibroblast growth factor-2 potentiates vascular smooth muscle cell migration to platelet-derived growth factor. *Circ Res*, 1997, **80** (5): 627~637
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1860
- 5 Kudrjashova E, Bashtrikov P, Bochkov V, *et al.* Expression of adhesion molecule T-cadherin is increased during neointima formation in experimental restenosis. *Histochem Cell Biol*, 2002, **118** (4):281~90
- 6 韩雅玲, 闫承慧, 刘海伟, 等. E1A 激活基因阻遏子过表达诱导体外培养大鼠平滑肌细胞分化. *生物化学和生物物理进展*, 2004, **31** (12): 1099~1105
Han Y L, Yan C H, Liu H W, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (12): 1099~1105
- 7 韩雅玲, 王效增, 康 建, 等. 大鼠颈动脉球囊损伤后血管平滑肌细胞 E1A 激活基因阻遏子的表达变化. *中华心血管病杂志*, 2004, **32** (1): 53~58
Han Y L, Wang X Z, Kang J, *et al.* *Chin J Cardiol*, 2004, **32**(1): 53~58
- 8 Owens G K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 1995, **75** (3):487~517
- 9 Gabbiani G, Bloom W S, Vandekerckhove J, *et al.* Actin expression in smooth muscle cells of rat aortic intimal thickening, human atheromatous plaque, and cultured rat aortic media. *J Clin Invest*, 1984, **73** (1): 148~152
- 10 Mason D P, Kenagy R D, Hasenstab D, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res*, 1999, **85** (12): 1179~1185
- 11 Wang C C, Gurevich I, Draznin B. Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways. *Diabetes*, 2003, **52** (10): 2562~2569

The Cellular Repressor of E1A-stimulated Genes Induces Differentiation and Migration of Human Vascular Smooth Muscle Cells*

HAN Ya-Ling^{1)**}, HU Ye¹⁾, LIU Hai-Wei¹⁾, KANG Jian¹⁾, YAN Cheng-Hui¹⁾, LI Shao-Hua²⁾

⁽¹⁾Department of Cardiology, Shenyang General Hospital, Cardiovascular Research Institute of PLA, Shenyang 110016, China;

⁽²⁾Department of Pathology, Robert Wood Johnson Medical School, New Jersey 08854, USA)

Abstract In order to study the effect of the cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG) on differentiation and migration of human vascular smooth muscle cells (VSMCs)-HITASY, the full length human sense and antisense-CREG cDNA retroviral vectors, pLNCX₂(+)/CREG and pLXSN(-)/CREG, were constructed. Western blot and immunofluorescence analysis showed that the expression of CREG and SM α -actin increased in HITASY after infection with pLNCX₂(+)/CREG. The migration of HITASY infected with pLNCX₂(+)/CREG obviously enhanced compared with that of normal HITASY and pLXSN(-)/CREG cells showed by scrape-wounding and time-lapse analysis. Moreover, CREG over-expression increased the secretion of MMPs in HITASY tested by Western blot. Gelatin SDS-PAGE zymography analysis revealed that the activities of MMPs also increased in HITASY infected with pLNCX₂(+)/CREG. On the other hand, the opposite effects were observed when CREG expression decreased by using antisense pLXSN(-)/CREG. These results suggest that CREG may be able to induce the VSMCs differentiation and promote the VSMCs migration in the meantime.

Key words repressor, adenoviral protein E1A, differentiation, migration, retrovirus vector, smooth muscle

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30070280).

**Corresponding author. Tel: 86-24-23056183, Fax: 86-24-23922184, E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

Received: December 27, 2004 Accepted: January 30, 2005