

金纳米棒的光学性质及其在生物医学领域的应用 *

刘 媚 杨培慧 ** 蔡继业

(暨南大学化学系, 广州 510632)

摘要 简要介绍金纳米棒的光学性质和合成方法, 重点阐述其在生物医学领域研究的最新进展, 并对其今后的研究方向进行展望。金纳米棒是一种胶囊状的金纳米颗粒, 具有一个横向等离子共振吸收峰和一个纵向等离子共振吸收峰, 分别对应其横轴和纵轴两个特征尺寸。通过调节金纳米棒的长径比, 纵向等离子共振吸收峰可由可见光区跨越至近红外光区。金纳米棒这一独特的光学性质在生物和化学传感方面有着广泛而重要的应用前景。

关键词 金纳米棒, 表面等离子共振, 长径比, 生物医学

学科分类号 O614.123, O648.1, Q503

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00194

当前, 纳米材料的制备和应用研究已经成为材料科学中十分活跃的领域, 合成与设计各种新型的纳米材料可以使材料具有独特的物理化学和光电性能, 这些独特的性能很大程度上依赖于它们的尺寸和形态^[1,2]。随着尺寸和形态的变化, 纳米材料的电磁性质和光学性质表现出了良好的可调控性。

金纳米棒 (gold nanorods, GNRs) 是一种胶囊状的金纳米颗粒, 比球形金纳米粒子具有更为奇特的光电性质, 其独特的可调的表面等离子共振特性以及合成方法简单、化学性质稳定、产率高等优点, 使其在材料学、生物医学以及疾病诊断和治疗等方面的应用越来越广泛。如应用于纳米材料组装^[3~5]、DNA 和氨基酸检测^[6,7]、抗原识别^[8,9]、癌细胞成像和光热治疗^[10,11]等领域。本文介绍了金纳米棒的光学性质、合成方法及其在生物医学领域的最新进展, 并对其今后的研究方向进行了展望。

1 金纳米棒的光学性质

1.1 表面等离子共振吸收特性

金纳米棒具有一个横向等离子共振吸收峰 (transverse surface plasmon resonance, TSPR) 和一个纵向等离子共振吸收峰 (longitudinal surface plasmon resonance, LSPR), 分别对应其横轴和纵轴两个特征尺寸, 纵轴长度和横轴直径之比为金纳米棒的长径比 (aspect ratio, AR)。改变实验条件可以制备长度、长径比可调的金纳米棒^[12]。通过改变金纳米棒

的长径比, 其 LSPR 可从可见光区向近红外光 (NIR) 区调控(图 1), 而在近红外波长范围通过人体组织的光学透射是最理想的, 金纳米棒为自由进入近红外光区提供了一条有效途径^[13,14]。同时, 金纳米棒的 LSPR 对周围环境的介电常数十分敏感^[15], 当金纳米棒表面发生键合反应扰动其周围环境的介电性质时, LSPR 红移, 这就有效地提供了界面反

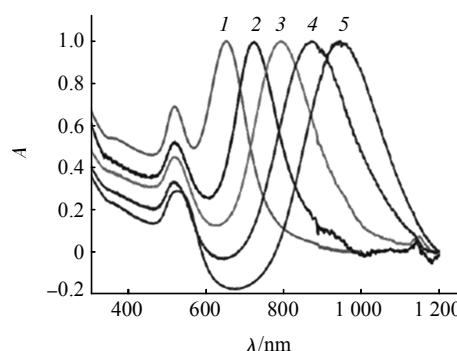


Fig. 1 Surface plasmon absorption spectra of gold nanorods of different aspect ratios^[14]

图 1 不同长径比金纳米棒的表面等离子共振吸收光谱^[14] 从左至右, 金纳米棒的长径比分别为 2.4(1), 3.1(2), 3.9(3), 4.8(4), 5.6(5)。

* 国家自然科学基金资助项目(30828028, 30872404)。

** 通讯联系人。

Tel: 020-85223039, E-mail: typh@jnu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-01, 接受日期: 2009-06-10

应的光学传导信号, 因此金纳米棒应用于非标记传感器方面有很大的优势^[16].

1.2 荧光特性

金纳米棒的荧光已经有许多实验和理论计算报道^[17~20]. 采用荧光发射和双光子诱导光致发光两种技术可以检测到低荧光量子产率的短金纳米棒的增强荧光. Zhu 等^[17]测定了长径比为 2.5 的金纳米棒的荧光光谱, 发射峰位于 370 nm 和 670 nm, 采用准静态计算结果表明, 随着金纳米棒长径比增加, 纵向荧光峰强度降低发生红移, 而横向荧光峰略微蓝移. 长金纳米棒(> 200 nm), 可以发出明显的荧光, 以 690 nm 波长激发, 743 nm 有较强的荧光发射峰, 793 nm 有相对较弱的荧光峰^[20].

2 金纳米棒的合成方法

目前合成金纳米棒的方法有: 光化学方法^[21]、电化学方法^[22]、模板法^[23]以及晶种生长法^[24~26]. 由于前三种方法设备要求较高, 操作过程复杂、耗时长、产量低, 使得制备过程简单、产量高的晶种生长法成为目前金纳米棒制备研究中应用最广的一种方法. 晶种生长法基本原理是在生长液中加入一定量的球形金纳米颗粒晶种(小于 4 nm), 在表面活性剂、银离子和弱还原剂的作用下, 金离子缓慢地被还原并以晶种颗粒作为纳米晶体各向异性生长的核, 定向生长为一定长径比的金纳米棒. 通过改变溶液中晶种的量、反应物的浓度以及溶液 pH 值可控制金纳米棒的长径比, 这是其他合成方法无法达到的.

3 金纳米棒在生物医学领域的应用

3.1 金纳米棒在药物传输和控制释放中的应用

用波长与 LSPR 吸收峰一致的激光照射金纳米棒产生等离激元共振, 金纳米棒发生光学吸收并转变成热释放到局部环境中, 利用这一特点金纳米棒可作为药物传输和生物分子控制释放的载体. Wei 等^[27]在金纳米棒表面修饰温敏聚合物 N- 异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)外壳, 使该功能化金纳米棒装载亲水性药物——盐酸去甲万古霉素以及无机银离子, 实验结果表明, 这种光热响应的功能化金纳米棒具有一定的载药能力和近红外光诱导药物释放行为, 显示了作为新一代智能响应药物传输体系的潜能.

多种药物的联合治疗被公认为治疗疑难病症的有效方法, 但是不同药物的化学性质和药代动力学

不同, 使得多种药物的负载、传输和释放成为了该法的一个巨大挑战. Wijaya 等^[28]用两种不同长度的金纳米棒负载两种不同的 DNA, 选择合适波长的激光照射金纳米棒选择性释放相应的 DNA 链(图 2). 通过调节激光使得 DNA 的释放率达到 50%~80%, 释放的 DNA 仍有其原有的功能, 这为多种药物运输提供了一种新思路.

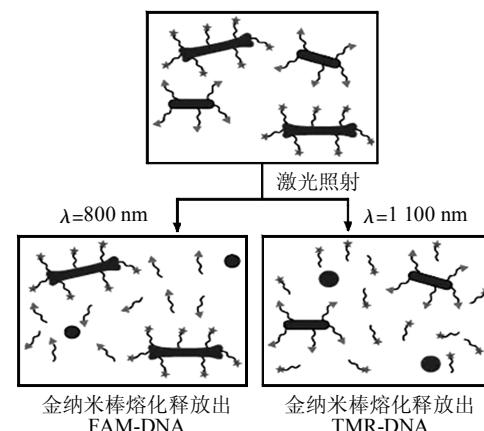


Fig. 2 Overview of selective release DNA^[28]

图 2 选择性释放 DNA 示意图^[28]

Lee 等^[29]将双链核苷酸偶联至金纳米棒上, 构建了一个吸收近红外光的对基因干预和远程控制释放的光学开关——oligonucleotides on a nanoplasmonic carrier-based optical switch(ONCOS). 通过近红外光照射活化 ONCOS 开关, 释放出的 DNA 单链与目标 mRNA 结合, 在 RNaseH 酶作用下, 阻止了相应蛋白质的翻译, 从而实现远程控制基因干预的过程(图 3). 这种基因干预的新技术能够实现空间和

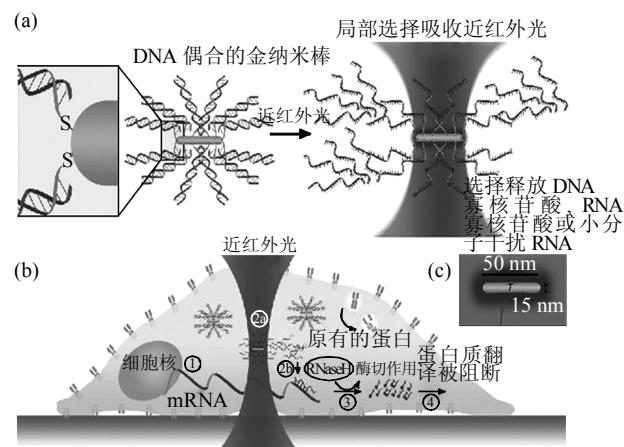


Fig. 3 Concept of gene release by ONCOS activation and gene Interference^[29]

图 3 活化 ONCOS 开关释放 DNA 对基因干预的示意图^[29]

时间上的控制，这是传统基因干预技术所不能做到的。

Kawano 等^[30]用胶体 - 模板聚合反应和硅蚀刻的方法制备了复合纳米凝胶(金纳米棒嵌入PNIPAM中)。用近红外光照射小鼠的右肾，PNIPAM发生由亲水到疏水的相转变，使GNRs/PNIPAM复合物聚集在靶部位。GNRs/PNIPAM复合物可同时应用于药物靶向传输、光热治疗以及生物成像等方面。

3.2 金纳米棒在细胞成像和光热治疗中的应用

金纳米棒作为一种新型的近红外荧光探针，具有以下优点：a. 用近红外光激发对活细胞的损伤很小，适于活体观察，光漂白作用小；b. 在组织中近红外光比可见光的透过率高，可达几个厘米，不受自身背景荧光及光在体内组织上散射等因素干扰，因而可实现深层组织的生物成像，能够进行体外或体内的非破坏、非介入性分析。此外，金纳米棒吸收近红外光可产生过高热行为，这在疾病的光热治疗中具有特殊的优越性。金纳米棒作为一种同时对细胞成像和光热治疗的新型活性试剂在生物医学领域具有广泛而重要的应用前景。

Oyelere 等^[13]用金纳米棒偶联核定位缩氨酸后与正常细胞和癌细胞孵化。暗场光散射成像表明金纳米棒可以定位于细胞质和细胞核中。单细胞的微拉曼光谱显示，在细胞质和细胞核中的缩氨酸拉曼光谱增强，能够分辨出良性细胞和恶性细胞(图4)。

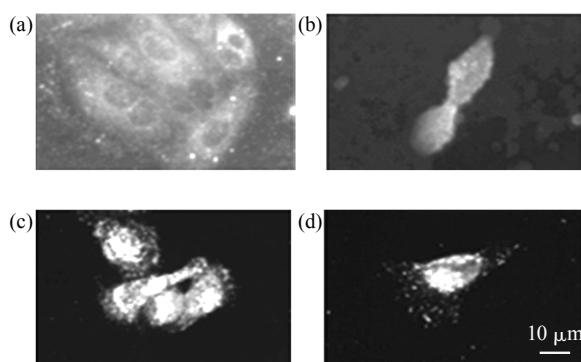


Fig. 4 Dark field images of cells after incubation

with GNRs and peptide-conjugated GNRs^[13]

图 4 细胞分别与 GNRs 和 GNRs/缩氨酸
孵育的暗场成像^[13]

(a, c) 正常细胞分别与 GNRs 和 GNRs/缩氨酸孵育。(b, d) 癌细胞分别与 GNRs 和 GNRs/缩氨酸孵育。

Durr 等^[11]将抗表皮生长因子受体抗体(anti-epidermal growth factor receptor antibody, anti-EFGR

antibody)修饰在金纳米棒表面，通过抗原抗体间的特异性识别作用将抗体修饰的金纳米棒标记到癌细胞上，用激光照射金纳米棒对癌细胞的三维组织进行双光子发光成像，成像的深度可达 75 μm。在 760 nm 激发光下，金纳米棒标记的癌细胞双光子发光强度比癌细胞的自发荧光强度大 3 个数量级，充分显示了金纳米棒作为近红外荧光探针的优越性。

人们滥用抗生素，使得多药耐药细菌的数目越来越多，药物的疗效越来越小，这是目前人类公共保健的最大挑战之一。Norman 等^[31]将金纳米棒修饰上抗铜绿假单胞菌抗体后与绿脓杆菌一起孵育，近红外激光下照射 10 min 后，绿脓杆菌表面出现大面积不可修复的损伤(图 5)。这为治疗多药耐药细菌感染疾病提供一种新方法。

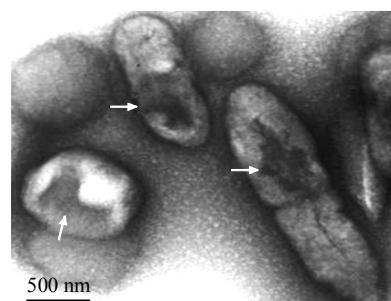


Fig. 5 TEM image of PA3 cells with attached antibody-conjugated GNRs following 10 min exposure to NIR^[31]

图 5 激光照射吸附金纳米棒的 PA3 细胞 10 min
后的 TEM 图^[31]
箭头标注处为细菌损伤部位。

Huang 等^[14]将金纳米棒修饰上 anti-EFGR 抗体后分别与正常细胞和癌细胞孵育，用暗场光学显微镜观察，癌细胞有强烈的红光散射，可从正常细胞中清楚地分辨和诊断。当用 800 nm 的激光照射细胞时，杀死癌细胞需要的激光能量只是正常细胞的一半，达到选择性杀死癌细胞而不损伤正常细胞的目的。

3.3 金纳米棒在生物分子检测和识别中的应用

金纳米棒的LSPR吸收峰对周围介质的介电性质十分敏感，当金纳米棒表面发生分子键合反应后，LSPR吸收峰发生明显的红移，金纳米棒自身提供内在的参比，消除金纳米球因没有自身参比带来的误差，提高了检测的灵敏度。Marinakos 等^[16]将固定在玻片上的金纳米棒生物素化，构建用于检测链霉亲和素的非标记蛋白传感器。生物素与亲和

素键合后传感器的 LSPR 吸收峰发生移动, 利用这个移动的吸收峰对亲和素进行定量测定。该方法线性范围是 $94 \sim 1.9 \times 10^5 \text{ pmol/L}$, 在 PBS 中的检出限为 94 pmol/L , 在血清中的检出限为 19 nmol/L 。

Yu 等^[32]将 3 种不同的抗体分子偶联到 3 种不同长度的金纳米棒上, 通过检测免疫识别作用诱导的金纳米棒 LSPR 吸收峰红移(图 6), 实现对 3 种靶分子的同时检测, 提高了检测效率。

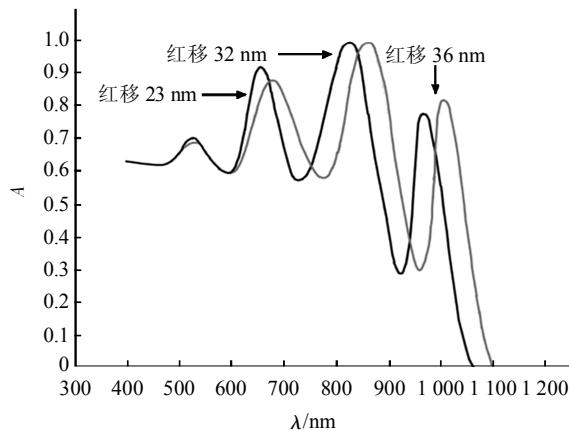


Fig. 6 Multiplexing detection of three targets using GNrMPs^[32]

图 6 金纳米棒用于三靶标检测^[32]

——: 对照; ——: 三靶标检测.

利用金纳米棒具有大的散射横截面和动态光散射灵敏度高的特点, 金纳米棒探针可以检测浓度很低的生物标记蛋白及其他生物靶分子。He 等^[33]建立了一种由 DNA 互补识别诱导金纳米棒聚集, 从而产生增强的等离子共振光散射信号来检测 HIV 相关 DNA 短序列的检测方法, 对 HIV-1 U5 长末端重复序列检测限为 80 pmol/L 。基于金纳米棒的聚集和相应地与等离子共振吸收带相关的颜色变化, 可以对低到 1.67 nmol/L 的靶 DNA 杂交实现可视化检测。该法具有简便、快速、免标记、实时以及不需要控温就可以检测到单碱基错配的优点。

Liu 等^[34]结合金纳米颗粒散射横截面积大和动态光散射技术灵敏度高的特点, 发展了一种一步均相非标记免疫测定法。他们用金纳米球偶联检测抗体, 金纳米棒偶联捕捉抗体, 金球与金棒以 1:2.5 的浓度比例混合后通过动态光散射来测定前列腺抗原(图 7)。方法简单, 样品用量少(只需 3.3 ml), 可以检测低至 $0.1 \mu\text{g/L}$ 的前列腺特异性抗原。

特殊细胞的分子识别对诸如癌症、疾病诊断和治疗有很重要的意义。尽管许多分子探针(例如核

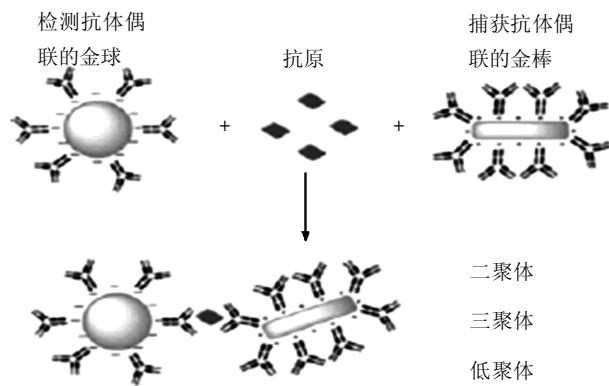


Fig. 7 A schematic illustration of a homogeneous immunoassay using antibody-conjugated nanoparticles and nanorods coupled with dynamic light scattering measurement^[34]

图 7 利用抗体偶联的金球与金棒基于动态光散射测定的均相非标记免疫测定示意图^[34]

酸适体和抗体)可以识别癌细胞上的特异分子, 但这些探针键合亲和力很弱, 导致检测信号很弱, 同时阻碍了细胞的靶向识别。Huang 等^[35]用 Au-Ag 纳米棒偶联上多个核酸适体, 在癌细胞识别中提高核酸适体的信号强度和键合的强度。复合纳米棒偶联上一个有 80 个荧光团的核酸适体所产生的荧光信号比偶联一个染料分子的核酸适体探针强得多。核酸适体分子自组装到纳米棒通过与细胞膜多个受体的同时反应显著增强与癌细胞键合亲和力, 此时键合吸引力至少是最初的核酸适体探针的 26 倍。通过流式细胞术的测量, 金纳米棒 / 核酸适体标记的细胞的荧光信号是单个核酸适体探针所得信号的 300 倍。该金纳米棒 / 核酸适体探针在具有低密度结合位点和弱键合力的细胞检测有潜在的应用, 同时, 可以提高对细胞的成像和靶向能力。这是应用纳米材料研究细胞功能和分子键合力的一个优秀范例。

Yu 等^[36]利用 11-巯基十一烷酸修饰 3 种不同长径比($\text{AR}=1.5, 2.8, 4.5$)的金纳米棒, 进而偶联 3 种不同的抗体分子(anti-CD44、anti-CD24、anti-CD49f)。制备的金纳米棒分子探针(图 8)用于同时识别人乳腺上皮细胞表面的 3 种靶分子(CD44、CD24、CD49f)(图 9)。利用暗场显微镜和光谱成像结合的方法同时对人乳腺上皮细胞表面的 3 种目标分子直接检测, 进而评价这些细胞组免疫表型成分转移的潜能。

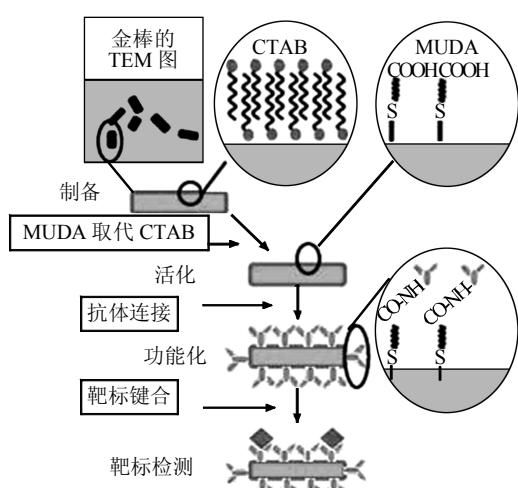


Fig. 8 Illustration of the fabrication of gold nanorod molecular probes (GNrMPs)^[36]
图 8 金纳米棒分子探针制备示意图^[36]

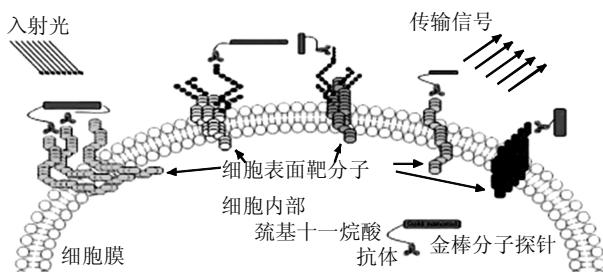


Fig. 9 Cell identity profiling for multiplex target detection using GNrMPs^[36]
图 9 金纳米棒分子探针同时识别细胞表面多个靶分子^[36]

4 结论和展望

综上所述，具有独特可调光学性质的金纳米棒在生物医学领域有着广泛而重要的应用前景，既可作为某些药物和生物分子的载体，又可作为细胞成像和光热治疗的活性试剂，还可以作为检测生物分子的超敏感生物传感器。通过生物功能化金纳米棒可以将细胞外源分子如 DNA、RNA 等导入真核细胞内，有望成为研究和控制真核细胞基因功能转染技术的常规工具，将在研究基因功能、调控基因表达、突变分析和蛋白质生产等方面应用越来越广泛。将金纳米棒应用于多个靶分子的同时检测，也将成为金纳米棒研究的一个热点。另外，将金纳米棒应用于细胞表面生物分子的分析以及药物对癌细胞的作用，对于了解细胞功能和分子与细胞的相互作用以及药物对癌细胞作用机制的研究具有重要意义。

参 考 文 献

- Salem A K, Searson P C, Leong K W. Multifunctional nanorods for gene delivery. *Nature Materials*, 2003, **2**(10): 668~671
- Chen S H, Fan Z Y, Carroll D L. Silver nanodisks: synthesis, characterization and self-assembly. *J Phys Chem B*, 2002, **106**(42): 10777~10781
- Chang J Y, Wu H M, Chen H, et al. Oriented assembly of au nanorods using biorecognition system. *Chem Commun*, 2005 (8): 1092~1094
- Vial S, Pastoriza-Santos I, Prez-Juste J, et al. Plasmon coupling in layer-by-layer assembled gold nanorod films. *Langmuir*, 2007, **23** (8): 4606~4611
- Kawamura G, Yang Y, Nogami M. End-to-end assembly of CTAB-stabilized gold nanorods by citrate anions. *J Phys Chem C*, 2008, **112**(29): 10632~10636
- Darbha G K, Rai U S, Singh A K, et al. Gold-nanorod-based sensing of sequence specific HIV-1 virus DNA by using hyper-rayleigh scattering spectroscopy. *Chemistry*, 2008, **14**(13): 3896~3903
- Sudeep P K, Shibu J S T, George T K. Selective detection of cysteine and glutathione using gold nanorods. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(18): 6516~6517
- Wang C G, Chen Y, Wang T T, et al. Biorecognition-driven self-Assembly of gold nanorods: a rapid and sensitive approach toward antibody sensing. *Chem Mater*, 2007, **19**(24): 5809~5811
- Wang C G, Chen Y, Wang T T, et al. Monodispersed gold nanorod-embedded silica particles as novel raman labels for biosensing. *Adv Funct Mater*, 2008, **18**(2): 355~361
- Wang H F, Huff T B, Zweifel D A, et al. *In vitro* and *in vivo* two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(44): 15752~15756
- Durr N J, Larson T, Smith D K, et al. Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Lett*, 2007, **7**(4): 941~945
- Nikoobakht B, El-Sayed M A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem Mater*, 2003, **15**(10): 1957~1962
- Oyelere A K, Chen P C, Huang X H, et al. Peptide-conjugated gold nanorods for nuclear targeting. *Bioconjugate Chem*, 2007, **18** (5): 1490~1497
- Huang X H, El-Sayed I H, Qian W, et al. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**(6): 2115~2120
- Chen H J, Kou X S, Yang Z, et al. Shape- and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. *Langmuir*, 2008, **24**(10): 5233~5237
- Marinakos S M, Chen S H, Chilkoti A. Plasmonic detection of a model analyte in serum by a gold nanorod sensor. *Anal Chem*, 2007, **79**(14): 5278~5283
- Zhu J, Wang Y C, Yan S N. Fluorescence spectrum characteristics of gold nanorods. *Chin Phys Lett*, 2004, **21**(3): 559~561
- Eustis S, El-Sayed M. Aspect ratio dependence of the enhanced fluorescence intensity of gold nanorods experimental and simulation

- study. *J Phys Chem B*, 2005, **109** (34): 16350~16356
- 19 Imura K, Nagahara T, Okamoto H. Plasmon mode imaging of single gold nanorods. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(40): 12730~12731
- 20 Li C Z, Male K B, Hrapovic S, et al. Fluorescence properties of gold nanorods and their application for DNA biosensing. *Chem Commun*, 2005(31): 3924~3926
- 21 Kim F, Song J H, Yang P D. Photochemical synthesis of gold nanorods. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(48): 14316~14317
- 22 Yu Y Y, Chang S S, Lee C L, et al. Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties. *J Phys Chem B*, 1997, **101** (34): 6661~6664
- 23 Martin C R. Nanomaterials: a membrane-based synthetic approach. *Science*, 1994, **266**(5193): 1961~1966
- 24 Wu H Y, Huang W L, Huang M H. Direct high-yield synthesis of high aspect ratio gold nanorods. *Crystal Growth & Design*, 2007, **7** (4): 831~835
- 25 Iqbal M, Tae G. Unstable reshaping of gold nanorods prepared by a wet chemical method in the presence of silver nitrate. *J Nanosci Nanotech*, 2006, **6**(11): 3355~3359
- 26 Wu H Y, Chu H C, Kuo T J, et al. Seed-mediated synthesis of high aspect ratio gold nanorods with nitric acid. *Chem Mater*, 2005, **17** (25): 6447~6451
- 27 Wei Q S, Ji J, Shen J C. Synthesis of Near-infrared responsive gold nanorod/PNIPAAm core/shell nanohybrids via surface initiated ATRP for smart drug delivery. *Macromol Rapid Commun*, 2008, **29** (8): 645~650
- 28 Wijaya A, Schaffer S B, Pallares I G, et al. Selective release of multiple DNA oligonucleotides from gold nanorods. *ACS Nano*, 2009, **3**(1): 80~86
- 29 Lee S E, Liu G L, Kim F, et al. Remote optical switch for localized and selective control of gene interference. *Nano Lett*, 2009, **9** (2): 562~570
- 30 Kawano T, Niidome Y, Mori T, et al. PNIPAM gel-coated gold nanorods for targeted delivery responding to a near-infrared laser. *Bioconjugate Chem*, 2009, **20**(2): 209~212
- 31 Norman R S, Stone J W, Gole A, et al. Targeted photothermal lysis of the pathogenic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, with gold nanorods. *Nano Lett*, 2008, **8**(1): 302~306
- 32 Yu C X, Irudayaraj J. Multiplex Biosensor using gold nanorods. *Anal Chem*, 2007, **79**(2): 572~579
- 33 He W, Huang C Z, Li Y F, et al. One-step label-free optical genosensing system for sequence-specific DNA related to the human immunodeficiency virus based on the measurements of light scattering signals of gold nanorods. *Anal Chem*, 2008, **80** (22): 8424~8430
- 34 Liu X, Dai Q, Austin L, et al. A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(9): 2780~2782.
- 35 Huang Y F, Chang H T, Tan W H. Cancer cell targeting using multiple aptamers conjugated on nanorods. *Anal Chem*, 2008, **80**(3): 567~572
- 36 Yu C X, Nakshatri H, Irudayaraj J. Identity profiling of cell surface markers by multiplex gold nanorod probes. *Nano Lett*, 2007, **7**(8): 2300~2306

Optical Properties and Biomedical Application of Gold Nanorods*

LIU Mei, YANG Pei-Hui**, CAI Ji-Ye

(Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Gold nanorods is a capsule-shaped gold nanoparticles. Gold nanorods give rise to two absorption peaks corresponding to their plasmonic modes, transverse mode and longitudinal mode, corresponding to light absorption and scattering along the short and long axis, respectively. The longitudinal surface plasmon resonance can be tuned by adjusting their aspect ratio from the visible to the NIR region and extremely sensitive to changes in the dielectric properties of the surroundings including solvents, adsorbates, and the interparticle distance of the gold nanorods. This unique optical property of gold nanorods opens up fascinating applications in biological and chemical sensors. Optical properties and biomedical application of gold nanorods are introduced, and its future research prospects are discussed.

Key words gold nanorods, surface plasmon resonance, aspect ratio, biomedicine

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00194

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30828028, 30872404).

**Corresponding author. Tel: 86-20-85223039, E-mail: typ@jnu.edu.cn

Received: April 1, 2009 Accepted: June 10, 2009