

肠绒毛消化法所得仔猪小肠上皮细胞的培养与鉴定

李慧 格日乐其木格 王健宇 王娟 王芳 薛冰华 刘忠华*

(东北农业大学胚胎工程实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 小肠上皮细胞作为肠道的主要功能细胞, 在多种肠道疾病和上皮间质转化的研究中发挥着重要的作用。采取组织块消化和肠绒毛消化两种方法对新生仔猪小肠上皮细胞进行分离培养, 传代后通过细胞形态学及免疫荧光等方法对其进行鉴定, 结果表明: 肠绒毛消化法所获得的小肠上皮细胞要远好于组织块消化法所得细胞, 细胞在24-48 h贴壁, 呈现出典型的三角形或多角形样, 10~12 d细胞汇合成片、单层生长、互不重叠; 细胞角蛋白18 (cytokeratin-18)和尾型同源盒基因2 (Cdx2)阳性, 碱性磷酸酶检测阴性, 扫描电镜下可以清楚地看到均匀分布的肠绒毛。以上结果表明, 该实验成功建立出可连续传代并符合小肠上皮细胞鉴定标准的仔猪小肠上皮细胞。

关键词 猪; 肠绒毛消化法; 小肠上皮细胞; 培养; 鉴定

小肠上皮细胞是消化道的主要功能性细胞, 在肠道食物的消化吸收、免疫屏障和应激反应中都发挥着很大的作用, 是研究消化道疾病的理想细胞模型, 也广泛应用于药物和营养素吸收机制的研究^[1]。人们已先后建立了多个物种的小肠上皮细胞系^[2], 如大鼠肠隐窝细胞系IEC-6^[3]、IEC18、IEC-17^[4], 大鼠肠上皮细胞系IRD98^[5]、人结肠腺癌细胞系Caco-2^[6]、HT-29^[7]、Lovo、SW-480^[8]和人结肠上皮细胞系T84^[9]等。关于猪小肠上皮细胞的培养研究, 国外已成功建立了成年公猪回肠细胞系IPI-2I^[10]和新生仔猪空肠细胞系IPEC-J2、IPEC-1^[11-12], 但在国内几乎未见建系成功的报道, 且相关文章多关注于小肠上皮细胞的初步培养, 没有对其进行全面严格的鉴定和确认。该实验通过不同培养方法的比较, 获得了高效分离纯化仔猪小肠上皮细胞(pIEC)的方法, 传代培养的细胞经系统全面的鉴定证明其确实为猪小肠上皮细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

本文实验材料为无菌条件取得的出生12 h内未进食仔猪。实验涉及药品有Gibco公司的胶原酶II、0.25%胰蛋白酶、DPBS、DMEM培养液、胎牛血清(FBS)、谷氨酰胺、青霉素和链霉素, Sigma公司的ITS (insulin 1.0 mg/mL+Transferrin 0.55 mg/mL+Selenium 0.5 μg/mL)、表皮生长因子(EGF)、细胞角

蛋白18单克隆抗体、波形蛋白单克隆抗体, 武汉博士德公司的CCK-8试剂盒和Millipore公司的碱性磷酸酶试剂盒。培养基配方为DMEM+10 ng/mL EGF+1%谷氨酰胺+5% FBS+1% ITS+100 U/mL青霉素+100 μg/mL链霉素。

1.2 仔猪小肠上皮细胞的原代分离培养

将出生12 h内未进食的仔猪通过颈动脉放血处死, 沿胃取出小肠, 用针管吸取加有青霉素和链霉素的生理盐水冲洗肠管, 至冲洗液清亮为止, 移入无菌培养皿中, 然后用以下两种方法分离培养小肠上皮细胞。

1.2.1 组织块消化法 无菌条件剔除肠系膜, 用加有青霉素和链霉素的生理盐水反复洗涤, 而后纵向剪开肠管, 再次洗涤, 至液体清亮为止; 将小肠移入另一培养皿中, 剪成1 mm³大小的组织块, 用0.25%胰蛋白酶消化20 min, 消化后用含有10% FBS的培养液终止, 离心后使用小肠上皮细胞培养液置于5% CO₂培养箱中39 °C恒温培养。

1.2.2 肠绒毛消化法 同上法反复清洗肠段, 而后纵向剪开肠管, 使腔面朝上, 用两块玻片把小肠黏膜轻轻刮下, 收集刮取液, 添加已预热的0.1%的胶原酶II, 37 °C消化15 min, 而后取出吹打; 用预冷培养液终止消化, 200目细胞筛网过滤, 收集滤液,

收稿日期: 2011-05-20 接受日期: 2011-07-19

973计划重大科学基金项目(No.2011CBA01006, No.932004)和黑龙江省教育厅“新世纪”人才基金(No.1153-NCET-007)资助项目

*通讯作者。Tel: 0451-55191729, E-mail: liu086@yahoo.com

1 500 r/min离心10 min, 弃上清, 重复两次。完成后将细胞接种到24孔细胞培养板中, 置于5% CO₂培养箱中39 °C恒温培养。

1.3 小肠上皮细胞的传代

原代细胞长满培养孔底部后, 使用DPBS洗涤, 而后加入0.25%胰蛋白酶消化, 待细胞变圆回缩时终止消化, 吹打收集细胞悬液, 1 000 r/min离心3 min, 弃上清, 用小肠上皮细胞培养液重悬, 以 1×10^4 /mL接种至培养皿中。

1.4 小肠上皮细胞生长曲线的测定

实验使用CCK-8试剂盒对猪小肠上皮细胞的增殖速度进行检测。将第五代细胞接种于96孔板中, 24 h后开始检测, 每100 μ L培养液中加入10 μ L CCK-8溶液, 孵育4 h, 同时设加有等量培养液和CCK-8溶液, 但无细胞的孔为空白对照, 而后测每孔吸光光度值(*D*), 计算每组三孔平均值。此后6天, 每24 h检测一次, 获得细胞生长曲线。

1.5 碱性磷酸酶检测

将培养中的猪小肠上皮细胞弃去培养液, 加入4%多聚甲醛固定1 min; 吸出固定液, 清洗液清洗三遍; 而后将现配的碱性磷酸酶反应液加入, 避光室温孵育15 min; 最后吸出反应液, 再用清洗液清洗三遍, 镜下观察着色情况。

1.6 免疫荧光检测

传代接种的猪小肠上皮细胞, 待长至密度超过85%时用DPBS清洗; 预冷的4%多聚甲醛固定30 min; 透膜液37 °C恒温孵育1 h; 封闭液37 °C封闭1 h; 滴加相应检测一抗(Cdx2稀释比例为1:200, 角蛋白18稀释

比例为1:800, 波形蛋白稀释比例为1:200) 4 °C孵育过夜; 滴加清洗液, 置摇床上清洗5 min, 连续3次; 滴加相应二抗(驴抗兔稀释比例为1:200, 羊抗小鼠为1:200) 37 °C孵育1 h; 滴加清洗液, 置摇床上清洗5 min, 连续3次; Hoechst染核10 min, 清洗液清洗, 方法同上; 夹取盖玻片至涂有防猝灭剂的载玻片上, 荧光显微镜下观察。

1.7 扫描电镜

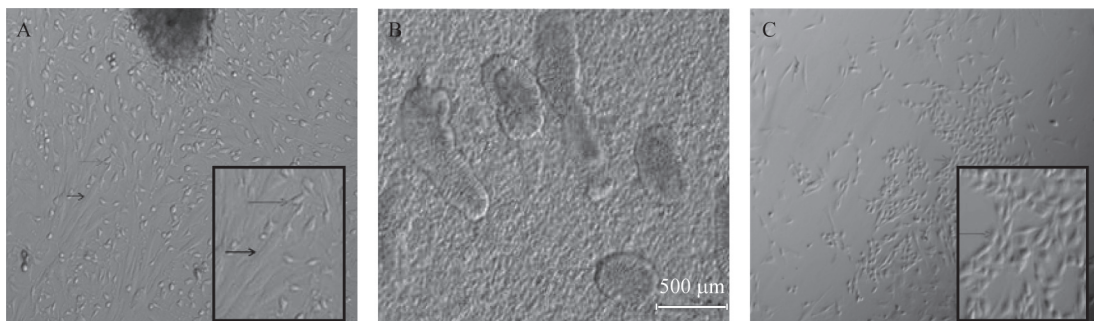
爬片培养5 d的小肠上皮细胞, 吸去培养液, 用遇冷的固定液固定培养中的猪小肠上皮细胞; 用0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次, 每次15 min; 利用不同浓度乙醇梯度脱水, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%各10 min; 将样品放入乙醇: 叔丁醇=1:1的溶液中15 min, 而后再换入纯叔丁醇的溶液中15 min; 采用零界点干燥法干燥; 利用真空喷镀仪对样品观察表面进行镀膜, 而后扫描电镜观察。

2 结果

2.1 不同处理方法得到的小肠上皮细胞

采用组织块消化法可以看到贴壁的组织块, 继而在周围出现大量细胞(图1A), 但所得到的细胞种类不均一, 混杂有大量的间充质样细胞, 且在后期的培养中, 由于间充质样细胞数量和生长速度均超过小肠上皮细胞, 无法完全纯化。

使用肠绒毛消化法在消化后可以见到单个肠绒毛(图1B), 接种初期可以看到贴壁的肠绒毛和少量贴壁单个细胞, 后期培养中细胞种类均一, 生长良好(图1C)。由此表明, 使用肠绒毛消化法可以更



A: 组织块消化法得到的间质样细胞(黑色箭头)和上皮样细胞(灰色箭头); B: 消化后的单个肠绒毛; C: 肠绒毛消化法培养7 d得到的上皮样细胞(灰色箭头)。

A: mesenchymal-like cells (black arrow) and epithelial-like cells (gray arrow) at 7 d from digesting intestinal tissue; B: intestinal villi after digesting; C: epithelial-like cells (gray arrow) at 7 d from digesting intestinal villi.

图1 不同方法得到的小肠上皮细胞(40 \times)

Fig.1 Primary cultures of intestinal epithelial cells in different ways (40 \times)

好地得到实验所需的小肠上皮细胞。

2.2 体外培养仔猪小肠上皮细胞的形态特征及生长状态

原代培养的小肠上皮细胞,组织块和单个细胞在24~48 h贴壁,肠绒毛周围也有细胞缓慢迁移出来,开始生长缓慢,约在一周后细胞生长速度增快,呈现出典型的铺路石样(图2A),10~12 d细胞汇合成片,单层生长,互不重叠(图2B)。传代细胞接种后在2~4 d进入对数生长期,而后增殖速度下降(图3)。

培养过程中,随着传代次数的增多,细胞增殖速度明显下降,且不能持续维持其典型形态,部分细胞变为间质样细胞,细胞间隙变大,消化时间延长,

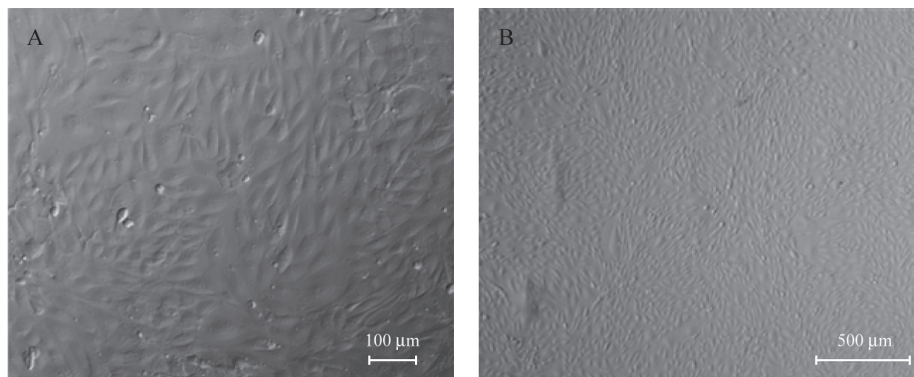
死亡细胞增多。

2.3 碱性磷酸酶检测结果

如图4所示,阳性对照细胞猪诱导型多潜能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS) (中科院动物所惠赠)碱性磷酸酶检测结果呈红色信号,表明碱性磷酸酶阳性(图4A),而实验所获得的pIEC未显示红色,呈碱性磷酸酶阴性(图4B)。

2.4 免疫荧光鉴定结果

基因系尾型同源盒基因(caudal homeobox gene, Cdx2),属肠特异性转录因子,稳定表达于小肠绒毛上皮细胞及结肠的腺上皮细胞中,同时在其他各系统正常的上皮细胞内检测不到Cdx2^[1]。



A: 培养8 d呈铺路石样生长的小肠上皮细胞(100×); B: 培养12 d形成紧密连接的小肠上皮细胞(40×)。

A: cobblestone-like morphology of intestinal epithelial cells at 8 d (100×); B: cells formed a monolayer with close contact between cells at 12 d (40×).

图2 体外培养的猪小肠上皮细胞形态

Fig.2 Morphology of pIEC *in vitro*

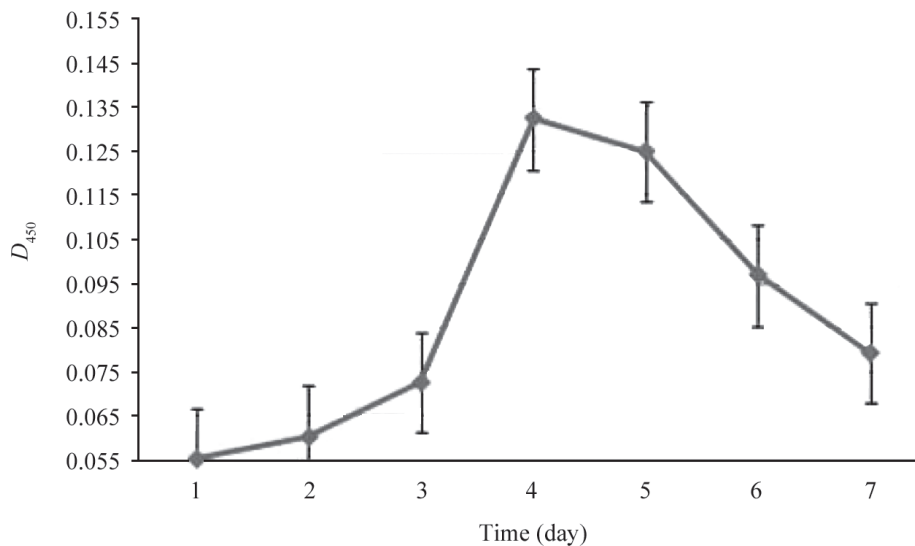
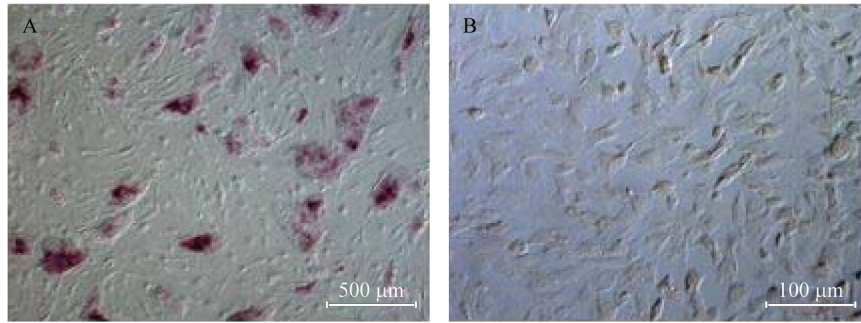


图3 猪小肠上皮细胞生长曲线

Fig.3 Growth curve of pIEC



A: 猪诱导型多潜能干细胞(40×); B: 猪小肠上皮细胞(100×)。

A: iPS cells (40×); B: pIEC (100×).

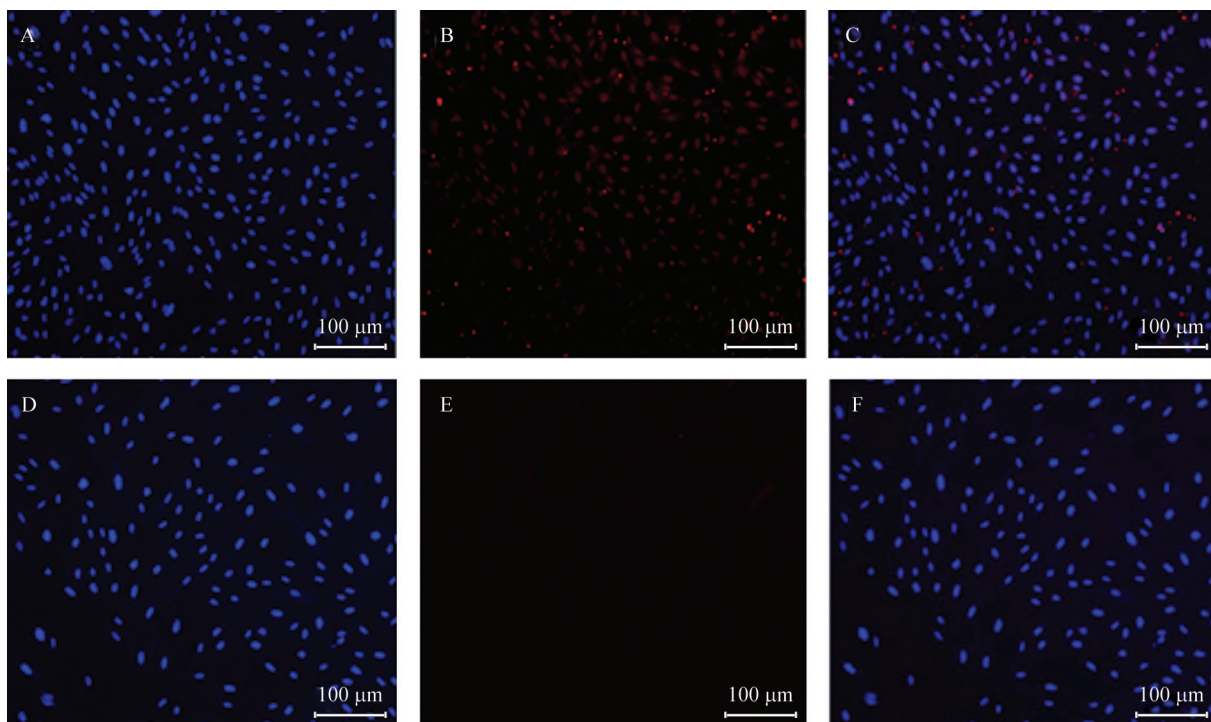
图4 猪小肠上皮细胞碱性磷酸酶染色
Fig.4 Alkaline phosphatase staining of pIEC

实验采用Cdx2、上皮细胞特征表达蛋白细胞角蛋白18和间质细胞特征表达蛋白波形蛋白单克隆抗体对所培养的IEC进行免疫荧光检测, 结果表明Cdx2和细胞角蛋白18在猪小肠上皮细胞中均呈阳性, 同时在猪成纤维细胞中不表达, 检测结果和鉴定完全的IEC特征一致(图5和图6); 波形蛋白(vimentin)在初期培养的pIEC中不表达, 但在多次传代后形态

改变的pIEC中呈阳性表达, 猪胎儿成纤维细胞作为阳性对照细胞(图7)。

2.3 扫描电镜观察结果

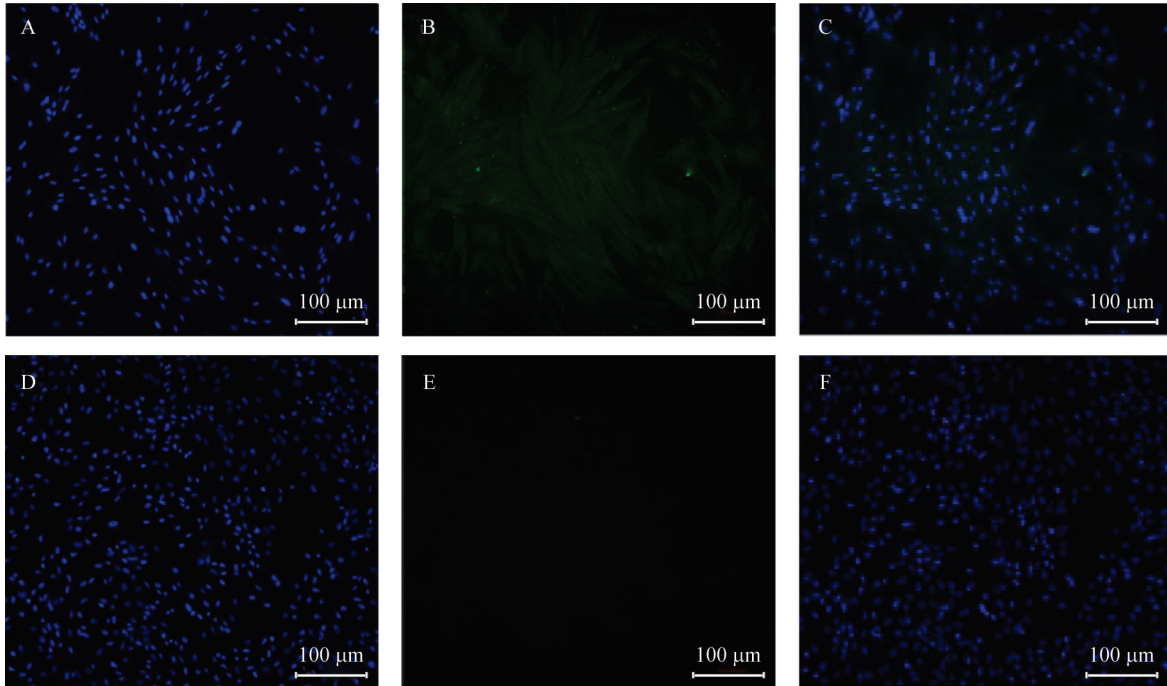
对猪小肠上皮细胞的爬片进行常规处理后, 用于扫描电镜观察, 结果可见: 获得的猪小肠上皮细胞表面具有大量的微绒毛, 分布均匀, 长短均一, 符合小肠上皮细胞的特征(图8)。



A~C: 猪小肠上皮细胞; D~F:猪胎儿成纤维细胞, 其中A、D为hoechst核染, B、E为抗Cdx2染色, C为A、B的合成图, F为D、E的合成图。

A~C: pIEC; A: hoechst; B: anti-Cdx2; C: merged figure of A and B; D~F: porcine fibroblast cells D: hoechst; E: anti-Cdx2; F: merged figure of D and E.

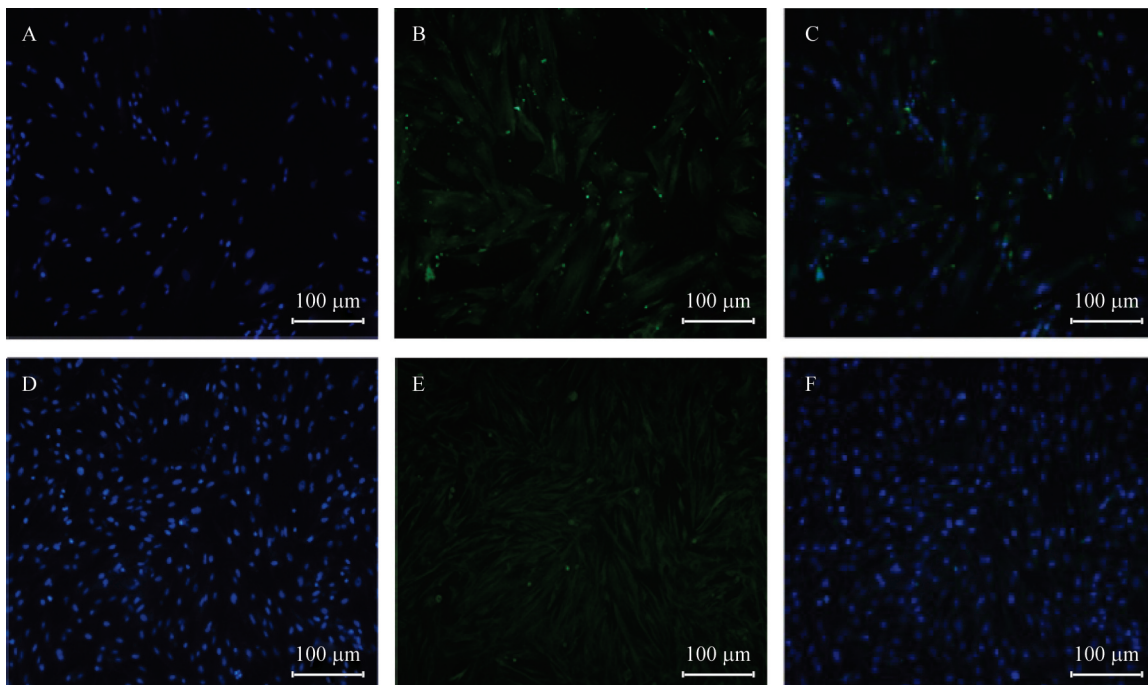
图5 猪小肠上皮细胞Cdx2免疫荧光鉴定(100×)
Fig.5 Immunofluorescence staining of Cdx2 in pIEC (100×)



A~C: 肠上皮细胞; D~F为猪胎儿成纤维细胞, 其中A、D为hoechst核染; B、E为抗角蛋白18染色; C为A、B的合成图, F为D、E的合成图。
A~C: pIEC; A: hoechst; B: anti-cytokeratin-18; C: merged figure of A and B; D~F: porcine fibroblast cells; D: hoechst; E: anti-cytokeratin-18; F: merged figure of D and E.

图6 猪小肠上皮细胞角蛋白18免疫荧光鉴定(100×)

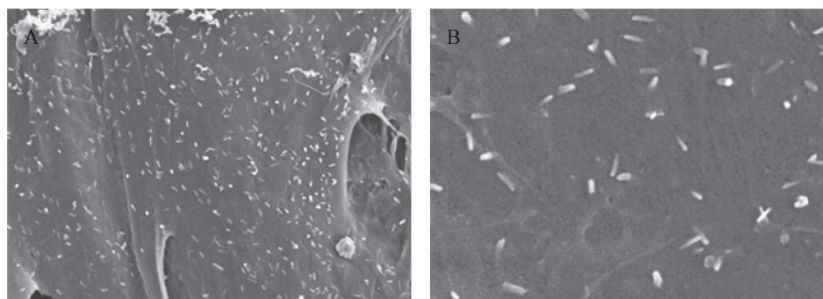
Fig.6 Immunofluorescence staining of cytokeratin-18 in pIEC (100×)



A~C: 猪小肠上皮细胞; D~F: 猪胎儿成纤维细胞, 其中A、D为hoechst核染; B、E为波形蛋白染色; C为A、B的合成图, F为D、E的合成图。
A~C: pIEC; A: hoechst; B: anti-vimentin; C: merged figure of A and B; D~F: porcine fibroblast cells; D: hoechst; E: anti-vimentin; F: merged figure of D and E.

图7 猪小肠上皮细胞波形蛋白免疫荧光鉴定(100×)

Fig.7 Immunofluorescence staining of vimentin in pIEC (100×)



A: 猪小肠上皮细胞表面的微绒毛样结构(5 000×); B: 微绒毛长度较短, 不规则分布于细胞表面(10 000×)。

A: microvilli-like structures on the surface of pIEC (5 000×); B: the irregular and short microvilli at higher magnification (10 000×).

图8 扫描电镜观察到的肠绒毛形态

Fig.8 Microvilli morphology under scanning electron microscopy

3 讨论

通过上述结果, 我们可以看到通过肠绒毛消化法得到的细胞在形态和生长特性上符合小肠上皮细胞的特征, 免疫荧光结果呈细胞角蛋白18阳性和Cdx2阳性, 同时通过扫描电镜可以清楚地看到均匀分布的肠绒毛, 因此, 可以确定我们成功培养获得了猪小肠上皮细胞。

目前, 关于小肠上皮细胞的原代培养有多种方法^[14], 主要分为组织块培养法、非酶消化法和酶消化分离法, 各种方法均有成功建系的报道^[15-16]。本实验对三种方法的优劣进行分析, 结合实验选用了酶消化法, 同时分别以肠绒毛和组织块为材料, 对肠绒毛消化法和组织块消化法进行了对比。实验结果表明, 组织块消化法所得细胞在后期纯化中不论使用柠檬酸胰酶, 还是差速消化法, 均不能取得纯化的细胞, 间质样细胞污染严重, 而对组织块消化法所得细胞进行单克隆培养纯化会导致孔内细胞数量较少, 生长速度慢, 在后期培养中生长能力降低, 老化凋亡等现象严重; 与之相比, 肠绒毛消化法获得的细胞无间质样细胞的污染, 细胞生长状态良好, 增殖速度快, 因此, 我们认为肠绒毛消化法是优于组织块消化法的猪小肠上皮细胞分离纯化方法。

在对小肠上皮细胞的鉴定中, 目前常用的检测有碱性磷酸酶染色法、电镜观察和免疫荧光检测法。本实验中获得的pIEC不具有碱性磷酸酶活性, 这与Miyazawa等^[17]和Landsverk等^[18]的结果一致, 而与李莉等^[19]国内文献结果不符。探究这种现象, 可能与碱性磷酸酶多用于鉴定自然分化的肠上皮细胞有关^[20]。而此类分化细胞在体外只能存活几个小时, 无法长期

培养。与此同时, 本实验材料为未进食的新生猪小肠, 在没有食物和微环境的刺激调节下, 还不具有完整的功能性, 所以碱性磷酸酶阴性的结果也可能与小肠上皮细胞还没有分化为功能性的细胞有关。

对肠绒毛消化法获得的小肠上皮细胞进行免疫荧光鉴定, 结果表明上皮特异表达细胞角蛋白18呈阳性, 小肠上皮细胞特异性表达转录因子Cdx2经检测也被确认在我们培养的小肠上皮细胞核内表达, 而猪胎儿成纤维细胞或其他间质细胞上述两种蛋白表达呈阴性。实验中较为特殊的现象是波形蛋白在多次传代后的猪小肠上皮细胞和成纤维细胞中均呈阳性表达, 而波形蛋白是间质细胞特异表达蛋白, 出现这种现象可能与上皮间质转化有关。转化过程中, 细胞上皮表型逐渐丢失, 获得间质细胞表型, 形态改变; 角蛋白等表达下降, 波形蛋白等间质细胞的表型逐渐上升^[21], 这与实验中细胞随着传代次数增多而呈现出间质样形态变化的情况一致。现阶段研究表明, 调控上皮细胞间质转化的信号通路有很多, 但主要的是TGF- β 信号通路^[22], 而血清中含有大量TGF- β 配体, 会增强TGF- β 信号通路作用, 这使得连续培养中的小肠上皮细胞的上皮间质转化无可避免。为降低上皮间质转化的作用, 在后期实验中我们使用了不含TGF- β 信号通路配体的KOSR血清, 以探索去除TGF- β 信号通路配体后, 小肠上皮细胞能否避免向间质细胞转化。结果表明, 在KOSR血清中细胞不能维持正常的生长状态并逐渐凋亡, 这可能与KOSR血清不能提供给细胞足够的营养有关。

实验中抑制上皮间质转化的方法还有待进一

步探讨,但是获得的符合标准的猪小肠上皮细胞,将在后期实验中成为理想的细胞模型,为相关信号通路和机制研究提供良好平台,以供进一步的探索。

参考文献 (References)

- 1 Cencic A, Langerholc T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology—a review. *Int J Food Microbiol* 2010; 141(Suppl 1): S4-14.
- 2 匡伟, 赵国琦. 几种特殊的肠上皮细胞系. *中国畜牧杂志* 2007; 43(13): 41-55.
- 3 Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 1979; 80(2): 248-65.
- 4 Quaroni A, Isselbacher KJ. Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67(6): 1353-62.
- 5 Negrel R, Rampal P, Nano JL, Cavenel C, Ailhaud G. Establishment and characterization of an epithelial intestinal cell line from rat fetus. *Exp Cell Res* 1983; 143(2): 427-37.
- 6 Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59(1): 221-6.
- 7 Truant S, Bruyneel E, Gouyer V, De Wever O, Pruvot FR, Mareel M, *et al.* Requirement of both mucins and proteoglycans in cell-cell dissociation and invasiveness of colon carcinoma HT-29 cells. *Int J Cancer* 2003; 104(6): 683-94.
- 8 Dang LH, Chen F, Ying C, Chun SY, Knock SA, Appelman HD, *et al.* CDX2 has tumorigenic potential in the human colon cancer cell lines LOVO and SW48. *Oncogene* 2006; 25(15): 2264-72.
- 9 Zeng J, Teng F, Weinstock GM, Murray BE. Translocation of *Enterococcus faecalis* strains across a monolayer of polarized human enterocyte-like T84 cells. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3): 1149-54.
- 10 Kaeffer B, Bottreau E, Velge P, Pardon P. Epithelioid and fibroblastic cell lines derived from the ileum of an adult histocompatible miniature boar (d/d haplotype) and immortalized by SV40 plasmid. *Eur J Cell Biol* 1993; 62(1): 152-62.
- 11 Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch KD, Amasheh S, Lodemann U, *et al.* Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for *in vitro* studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* 2006; 125(3): 293-305.
- 12 Bouhet S, Hourcade E, Loiseau N, Fikry A, Martinez S, Roselli M, *et al.* The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicol Sci* 2004; 77(1): 165-71.
- 13 庄利萍, 王芳, 郭萍. CDX2基因研究进展. *医学综述* 2008; 14(21): 3221-4.
- 14 王远孝, 王恬. 肠上皮细胞体外培养技术的研究进展. *饲料研究* 2008; 12: 24-6.
- 15 Kondo Y, Rose I, Young GP, Whitehead RH. Growth and differentiation of fetal rat small intestinal epithelium in tissue culture. Relationship to fetal age. *Exp Cell Res* 1984; 153(1): 121-34.
- 16 Pedersen G, Saermark T, Giese B, Hansen A, Drag B, Brynskov J. A simple method to establish short-term cultures of normal human colonic epithelial cells from endoscopic biopsy specimens. Comparison of isolation methods, assessment of viability and metabolic activity. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35(7): 772-80.
- 17 Miyazawa K, Hondo T, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Itani W, *et al.* Characterization of newly established bovine intestinal epithelial cell line. *Histochem Cell Biol* 2009; 133(1): 125-34.
- 18 Landsverk T. The epithelium covering Peyer's patches in young milk-fed calves. An ultrastructural and enzyme histochemical investigation. *Acta Vet Scand* 1981; 22(2): 198-210.
- 19 李莉, 高淑静, 张守全, 陈俊伟, 陆咸赏, 罗园, 等. 新生仔猪小肠上皮细胞体外培养的研究. *仲恺农业工程学院学报* 2010; 23(1): 30-3.
- 20 刘芳宁, 张彦明. 哺乳动物肠上皮细胞的原代培养. *动物医学进展* 2007; 28(4): 53-7.
- 21 沈克平, 王海永, 胡兵. 上皮间质转化分子机制研究进展. *世界中西医结合杂志* 2011; 6(1): 87-9.
- 22 任陈, 申洪. 上皮间质转化的信号转导机制. *国际病理科学与临床杂志* 2009; 29(4): 365-8.

Culture and Characterization of Intestinal Epithelial Cells Isolated from Digested Neonatal Porcine Intestinal Villi

Li Hui, Bou Gerelchimeg, Wang Jianyu, Wang Juan, Wang Fang, Xue Binghua, Liu Zhonghua*

(Lab of Embryo Biotechnology, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract Intestinal epithelial cell is the main functional cell in the small intestine. Previous studies indicated that intestinal epithelial cell played important role in many intestinal diseases processing and epithelial-mesenchymal transition. Therefore, establishing an efficient culture system of intestinal epithelial cells *in vitro* would be helpful for defining cells function during these processes. In present study, we compared two methods of isolating and culturing porcine intestinal epithelial cells, and characterized isolated and passaged cells by morphological observation and immunofluorescence. We found that the method of digested intestinal villi was better than the method of digesting of intestinal tissue blocks in isolating and culture of porcine intestinal epithelial cells. Cells digested from intestinal villi attached on the bottom of the dishes in 24~48 hours and showed a typical triangular or polygonal shape. Cells reached confluence in 10~12 days. Immunofluorescence result revealed that these cells expressed cytokeratin-18 and Cdx2. Alkaline phosphates test showed that this type of cells were lack of alkaline phosphates activity. Scanning electron microscopy further revealed that these cells possess a typical slender microvilli-like structure which is unique to intestinal cell lines. These results demonstrated that in this experiment we successfully established neonatal porcine small intestine epithelial cell line, which possesses the capability of continuous passage and the standard characteristics of small intestine epithelial cells.

Key words porcine; intestinal villi; intestinal epithelial cell; primary culture; characterization

Received: May 20, 2011 Accepted: July 19, 2011

This work was supported by Grant from the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2011CBA01006, No.932004) and Fund from New Century Talents from Department of Education of Heilongjiang Province (No.1153-NCET-007)

*Corresponding author. Tel: 86-451-55191729, E-mail: liu086@yahoo.com