

# 盘基网柄菌中分化诱导因子信号与细胞命运决定

彭建涛 施佳乐 谭宁 侯连生\*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

**摘要** 对盘基网柄菌发育过程中分化诱导因子(DIF)的作用及其机制进行了综述, 包括DIF对盘基网柄菌前柄细胞、柄细胞分化的作用以及DIF的生物合成、DIF的诱导、降解失活、DIF对细胞命运和细胞比例的调节及其作用机制等。

**关键词** 盘基网柄菌; 前柄细胞; 前孢子细胞; 细胞命运; 分化诱导因子

盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)是一种“土壤阿米巴”, 以吞食细菌为生。在饥饿条件下, 进入多细胞发育时期: 单个阿米巴聚集成多细胞体, 细胞经发育和分化形成主要由孢子细胞和柄细胞组成的子实体(图1)。由于其发育周期短, 过程相对简单, 目前已成为研究细胞发育决定的一个极好的模型。在涉及到盘基网柄菌发育中细胞命运决定诸多因子中, 分化诱导因子(differentiation inducing factor, DIF)一直是研究的重点。最初在研究cAMP与细胞分化的关系中发现了DIF, 随着对DIF作用的了解逐步深入, 发现它们与细胞命运和细胞比例的决定有密切关系, 搞清了DIF生物合成和降解失活的途径, 分离鉴定了DIF诱导基因, 并通过对各突变株研究, 又基本搞清了DIF的具体作用及其机制, DIF信号通路中各种信号分子的作用以及与其他信号通路如cAMP、GSK之间的关系。近年来, 又发现DIF在抑制肿瘤细胞增殖中有重要作用<sup>[1]</sup>。

## 1 DIF的生物合成和降解

最近, 盘基网柄菌基因组测序工作已经完成<sup>[2]</sup>。在整个基因组中, 大约存在40个聚酮合成酶的基因, 大部分在细胞发育过程中表达, 其中最重要聚酮分子——DIF对细胞类型的决定起重要作用<sup>[3]</sup>。DIF主要由DIF-1和少量的DIF2~DIF5组成的、可溶的、扩散性的亲脂类烷基氯化物<sup>[4]</sup>。DIF-1(3,5-二氯-2,6-二羟-4-甲氧基苯-1-己酮), 一个六碳苯环连接一个六碳的烷基链, 苯环上有两个氯分子、两个羟基和一个羟甲基。DIF-2是DIF-1的类似物, 它的烷基链比DIF-1少一个碳原子; 由DIF-1脱氯酶去掉一个氯后产生DIF-3。DIF-2和DIF-3具有

DIF-1相似的生物活性, DIF-2的活性大约为DIF-1的40%, 而DIF-3只有DIF-1活性的3.5%。

DIF-1生物合成的第一步是C<sub>12</sub>骨架的组装: 由聚酮合成酶催化一分子乙酰辅酶A和五分子丙二酸单酰辅酶A生成C<sub>12</sub>骨架的分子, 即DIF-1的前体——THPH; 浅蓝菌素cerulenin可抑制该反应。第二步, 氯过氧化物酶催化THPH的双氯化, 该酶存在于细胞膜上。最后, DmtA甲基酶催化一分子的甲基连接到C环的羟基上, 形成DIF-1。DmtA甲基酶专一性非常强, 特异性地催化DIF-1的合成<sup>[5]</sup>。当细胞发育到蛞蝓体阶段, 氯过氧化物酶和甲基转移酶的活性达到最高, 相应地DIF-1水平也达到最高<sup>[6]</sup>。

DIF-1的降解过程是DIF-1信号通路中关键的调节步骤。第一步由DIF-1脱氯酶催化, 是一种还原性的单脱氯反应, 产生DIF-3。DIF-1脱氯酶以谷胱甘肽(GSH)为辅助因子, 这是真核生物中发现的第一个催化脱氯反应的酶<sup>[7]</sup>, 其作用机制类似于甲状腺素的脱碘过程, 可被金葡萄糖硫苷酶抑制。之后, DIF-3发生连续的氧化反应, 在其烷基链上连上羰基和羟基, 由DIF-3羟化酶即细胞色素P450酶催化, 细胞色素P450酶是一个膜连蛋白, 环苯嘧啶醇能够抑制该酶的反应<sup>[8]</sup>, 结果细胞内的DIF-3得以积累。DIF-1脱氯酶活性存在于前柄细胞中, 是前柄细胞特异性的酶, 其表达需要DIF-1的诱导。

## 2 DIF与细胞分化

### 2.1 前柄细胞、柄细胞的分化

收稿日期: 2005-09-09 接受日期: 2005-12-20

国家自然科学基金资助项目(No.30470200)

\* 通讯作者。Tel: 021-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

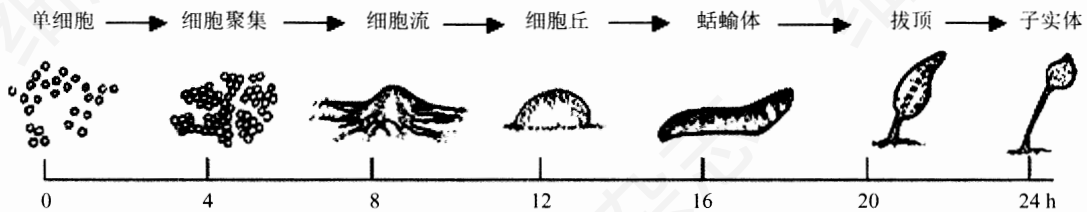


图1 盘基网柄菌的发育周期

营养充足时，为单细胞变形虫，以二分裂繁殖生长；当食物缺乏时，为了抵御不良的环境，细胞进入多细胞发育期，发育周期短，大约24个小时。依据盘基网柄菌在发育过程中形态上的变化，大致为4个阶段：聚集阶段、细胞丘阶段、蛞蝓体阶段和子实体阶段。子实体由含有大量休眠孢子的顶囊和坚硬的柄及基盘组成。待到环境适宜后，孢子释放，开始新的生命周期。在早期细胞丘阶段的可以鉴定出柄细胞和前孢子的前体：前柄细胞(*prestalk cell-pst*)和前孢子细胞(*prespore cell-ps*)，发育到蛞蝓体阶段，前柄细胞和前孢子细胞明显分区，在蛞蝓体前端都是前柄细胞，后面部分主要是前孢子细胞。其中前柄细胞又可分为5种细胞亚群：前柄细胞A (*pstA*)、前柄细胞B (*pstB*)、前柄细胞AB (*pstAB*)、前柄细胞O (*pstO*)和类前端细胞(*anterior like cells, ALCs*)。

DIF 诱导的基因大多是柄细胞分化过程中的标志基因。其中两个特定基因 *ecmA* 和 *ecmB* 具有高度相关性，它们编码细胞外的基质成分并形成包裹柄细胞和柄管的结构<sup>[9]</sup>。*ecmA* 和 *ecmB* 基因的启动子具有一个可调节的结构<sup>[10]</sup>，根据 *ecmA* 启动子表达的差异可鉴定出两类细胞亚型：*pstA* 和 *pstO* 细胞<sup>[11]</sup>。从启动子 +1 下游的位置开始表达的结果是产生 *pstA* 细胞；从更上游的位置开始表达是 *pstO* 细胞和 *ALCs* 细胞的特征。在该启动子上游区域中包含一段 TTGA 顺式重复序列，该序列是 DIF 的激活效应域。而 *ecmB* 在 *pstAB* 细胞和 *pstB* 细胞表达。在 *ecmB* 启动子的上游含有一段激活序列、下游有两段抑制子序列。这段激活序列对于柄细胞的表达非常重要，而抑制子序列阻止细胞进入柄管前的表达<sup>[12]</sup>，该抑制子序列包含 TTGA 反向重复序列。推测 DIF 对细胞分化的诱导是通过作用于 *ecmA* 和 *ecmB* 基因的启动子中关键的激活序列和抑制序列，很可能与 TTGA 序列有关。

DIF-1 诱导细胞表达 *ecmA* 基因(前柄细胞特异基因)和产生 DIF-1 脱氯酶(前柄细胞特有的)，这样细胞就具有了最初的前柄细胞的特异性；这表明 DIF 最初的诱导功能主要作用于前柄细胞。*DmtA* 甲基酶基因剔除后形成的 *dmtA* 突变株，其 DIF-1 的甲基化受阻，结果无法合成 DIF-1<sup>[13]</sup>。观察突变株细胞与野生型细胞的形态和基因表达的差异，发现突变细胞的聚集速度要稍慢些，可以形成正常的细胞丘，但是它们形成的蛞蝓体容易断裂，子实体形成的时间也延长，并有一定的缺陷。推测 DIF 诱导的某些基因编码的成分可能是细胞黏附分子，这些黏

附分子的缺失导致其聚集较慢且蛞蝓体易断裂。*dmtA* 突变株的特点是缺失了大约 30%~50% 的前柄细胞，大部分缺失的是 *pstO* 细胞。若将突变细胞与野生细胞共培养，或者向培养基中加入 DIF-1，突变细胞能恢复正常发育。若加入 DIF-2 和 DIF-3 也能恢复突变细胞的发育<sup>[14]</sup>。因此，DIF-1 缺失导致的发育缺陷主要是影响 *pstO* 细胞的分化。

最近，用反相 HPLC 提取 cAMP 和  $\text{Cd}^{2+}$  诱导的 *dmtA* 突变株发现几种活性物质，可能是诱导前柄细胞和前孢子细胞新的物质<sup>[15]</sup>。第一种是和目前已知的 DIFs 都不相同的洗脱峰，对  $\text{NaBH}_4$  敏感，有羰基基团，这种新的化合物命名为 DIF-6；第二种和 DIF-2 有相同洗脱峰，但是它对  $\text{NaBH}_4$  不敏感，缺少羰基基团，命名为 DIF-7；第三种与 DIF-1 有相同洗脱峰，对  $\text{NaBH}_4$  敏感，含有羰基基团，有可能是 DIF-1 的其他甲基酶的产物。这三种物质都能够诱导 *pstA* 细胞中 *ecmA* 的表达。因此，*dmtA* 突变株 *pstA* 细胞能正常分化可能是由其他的 DIF 类似物诱导的。

## 2.2 DIF 的分泌与前孢子细胞、孢子细胞的分化

*dmtA* 的 mRNA 原位杂交试验发现<sup>[13]</sup>，细胞丘早期阶段所有细胞都呈一致的浅染色；在细胞丘指状突起形成阶段，前孢子细胞染色非常深，而前柄细胞无明显染色；随后的整个发育阶段中，前孢子区一直会有较深的染色。此外将 *dmtA* 启动子上融合绿色荧光蛋白(*green fluorescence protein, GFP*)后发现，前孢子细胞区有 87% 的细胞强烈表达 GFP，而 13% 的细胞不表达 GFP，这个比例恰好与前孢子区中包含的类前端细胞(*ALCs*)细胞数的相符合。当

细胞发育到子实体阶段，孢子团的顶部和底层的杯状结构中均不表达 GFP。这些都说明前孢子细胞中强烈表达 *dmtA*，而前柄细胞，包括 ALCs 细胞都不表达 *dmtA*。酶活测定研究发现，前孢子细胞内的 DmtA 甲基酶活性比前柄细胞的高 9.7 倍，这与标准的前孢子细胞标志物 *psA/D19* 的 mRNA 相似；通过测定 [<sup>3</sup>H]THPH 和氯化物的 THPH 的转化发现，前孢子细胞区的氯化酶活性也比前柄细胞的高。标记试验也发现前孢子细胞产生的 DIF-1 约是前柄细胞的 20 倍。这些证据都表明：在早期细胞丘阶段，所有的细胞都产生较低水平的 DIF-1。至紧密细胞丘以后，DIF-1 主要由前孢子细胞产生。

cAMP 能够诱导所有的前孢子细胞标志物的表达，但又受到 DIF-1 不同程度的拮抗。在最初分化的前柄细胞中，cAMP 大大的提高 *dmtA* 的 mRNA 水平和 DmtA 甲基酶、氯化酶的活性并抑制脱氯酶的活性；若单用 DIF-1，对 *dmtA* 表达和上述几种酶活性无明显影响；若两者同时作用，DIF-1 就会强烈抑制 cAMP 对 *dmtA* 表达的诱导和氯化酶活性的提高。因而推测在对 DIF-1 合成的调节过程中，cAMP 和 DIF 共同作用后产生适宜的 DIF 水平。外加 DIF-1 发现，刚开始时 DIF-1 对本身的合成没有明显的影响；但是 1 h 后出现 DIF-1 的抑制效果，DIF-1 可强烈抑制自身的合成，原因可能是 DIF-1 抑制了 *dmtA* 表达。另外，DIF-3 可以直接作用于氯化酶，明显地阻碍氯化反应而抑制 DIF-1 的合成；DIF-2 也可以抑制 DIF-1 的产生。

前孢子诱导因子——PSI-1，是 *psiA* 基因编码的分子量为 106 kDa 的高度糖基化的蛋白质<sup>[16]</sup>。在疏松细胞丘阶段，PSI 表达量最大，之后大部分的前孢子细胞的特异性基因开始表达或表达量明显提高。因此，PSI 在前孢子细胞的分化诱导和细胞分裂的诱导过程中起了重要作用。但是 *psiA* 突变株细胞能够正常分化产生前孢子细胞并正常发育。因而推测在发育的早期，细胞还会产生其他的前孢子诱导因子，补偿 PSI 缺失造成的缺陷。最近发现另一种新的化合物 PSI-2<sup>[15]</sup>，在浅蓝菌素存在的情况下可以强烈刺激 *psA* 的表达，刺激孢子的形成。所以，推测这些前孢子诱导因子可能是 cAMP 信号通路的产物，并且它们与 DIF 信号之间可能存在某种相互影响的关系，具体的作用机制还需进一步的研究。

### 3 DIF-1 的作用机制

DIF 具有亲脂特性，它可能会象类固醇一样起

作用<sup>[3]</sup>。DIF-1 可分解成正己烷<sup>[5]</sup>，迅速地穿越细胞膜，然后与细胞内的受体结合。已鉴定出来一种具某些生化特性的 DIF 结合蛋白，但它的基因尚未克隆出来<sup>[17]</sup>。研究发现，DIF-1 可以引起细胞外的 Ca<sup>2+</sup> 内流，导致细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的提高。另外还可能存在一种间接效应，在某些蛋白质的辅助下，提高 Ca<sup>2+</sup> 浓度。抑制 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶后发现存在依赖 Ca<sup>2+</sup> 的 *ecmA* 诱导通路<sup>[18]</sup>，这个通路的开启还需要另一些蛋白质的合成，但是该诱导反应较慢。同时推测也存在一种依赖 Ca<sup>2+</sup> 的 *ecmB* 的诱导通路。

DIF 可能通过激活信号转导子和转录激动子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 而最终影响到基因的转录调节。STATs 是最初在哺乳动物的细胞中分离鉴定出来的、能被细胞内的信号激活的转录因子<sup>[19]</sup>。STATs 经酪氨酸磷酸化激活后二聚化，转位到细胞核内，激活转录。盘基网柄菌中的同源物是 Dd-STAT，并有几个亚型。DIF-1 诱导 *pstO* 细胞中的 Dd-STATc 酪氨酸磷酸化，导致其向核内积聚，抑制 *pstA* 细胞特异蛋白的表达<sup>[20]</sup>。Dd-STATc 的 N 末端存在核内输入信号，控制其向核内的运输；C 末端的结构序列包含 DNA 结合位点、SH<sub>2</sub> 区域和酪氨酸磷酸化位点以及核外输出信号<sup>[21]</sup>。DIF 作用于 Dd-STATc 的 SH<sub>2</sub> 区域，导致其酪氨酸磷酸化，然后二聚化形成二聚体。二聚体的形成遮蔽了 C 端的核外输出信号，这样相对提高了核内输入信号的水平，从而导致 Dd-STATc 在细胞核内积聚，结果激活某些基因的表达。另外，当胞外的 cAMP 结合到 CAR1 (cAMP receptor) 能引起 Dd-STATa 的磷酸化<sup>[22]</sup>。最近的研究发现 Dd-STATa 是 *ecmB* 基因的抑制子<sup>[23]</sup>。而 DIF 可以诱导 *ecmB* 基因的表达。所以，DIF 信号通路和 cAMP 信号通路是一个复杂的、相互影响的网络系统：cAMP 诱导盘基网柄菌的多细胞发育，当细胞发育到一定阶段，在 cAMP 的影响下细胞产生 DIF，然后 DIF 诱导前柄细胞分化，同时 DIF 诱导前柄细胞产生磷酸二酯酶，调节 cAMP 的浓度，拮抗 cAMP 对前孢子分化的诱导。推测，DIF 和 cAMP 在对基因水平的调节上可能通过对 Dd-STAT 互相影响，共同实现对细胞分化的调节。

最近，发现在 DIF-1 信号通路中的另一个基因——*dimA*，该基因突变株能正常产生 DIF-1，其细胞发育过程中与 *dmtA* 突变株有类似的形态缺陷和细胞类型的缺失，而且加入外源 DIF-1 不能恢复细胞发育的缺陷，因此 *dimA* 的产物位于 DIF-1 的下游，

其序列和 bZIP/bRLZ 转录因子类似<sup>[24]</sup>, 很有可能 *dimA* 编码了 DIF-1 信号通路中关键的转录调节因子, 整合 DIF-1 信号并参与细胞类型形成的调节。

GSK-3糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase)在细胞的生长、发育、肿瘤发生等过程中均有重要作用。盘基网柄菌中的 GskA 是 GSK-3 的同源物, 也参与细胞分化的调控<sup>[1]</sup>。 *gskA* 突变株早期的发育速度加快, 从蛞蝓体到拔顶的时间也大大缩减, 对 DIF-1 特别敏感, 同时降低了 cAMP 对柄细胞分化的抑制作用。据此有人把 DIF 用于肿瘤研究中并发现 DIF-1 和 DIF-3 能够抑制哺乳动物肿瘤细胞的增殖并诱导其分化。DIF-1 和 DIF-3 以及人工合成的 DIF 类似物都能抑制人类白血病 K562 癌细胞的扩增<sup>[25]</sup>。在扁平癌细胞中发现, 尽管 DIF 不会诱导细胞分化的特异基因表达, 但是它可以把细胞限制在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。进一步研究发现, DIF-1 使 GSK-3 $\beta$  Ser9 去磷酸化, 激活 GSK-3 $\beta$  向核内转运, GSK-3 $\beta$  磷酸化周期蛋白 D1 Thr286 后导致其降解。所以, 搞清楚 DIF 调节 GSK 的作用机制无疑对肿瘤的发生和治疗有重要意义。

#### 4 细胞命运和细胞比例的调节

在盘基网柄菌的发育过程中会形成不同大小的蛞蝓体, 但它们前孢子细胞和前柄细胞的比例基本上是固定的<sup>[26]</sup>, 前孢子细胞区大约占蛞蝓体的 80%, 前柄细胞占 20%; 而不同大小的 *dmtA* 突变株蛞蝓体中, 前孢子细胞占 90%, 前柄细胞占 10%, 这个比例基本上也是固定的; 突变株前柄细胞的缺少主要是缺失 *pstO* 细胞, 但是几种前柄细胞亚型在蛞蝓体前柄细胞区中的位置分布没有出现错位。用原位杂交技术证实至少存在 54 个前孢子特异性基因, 研究证实不管是野生型中占蛞蝓体 80% 的前孢子细胞, 还是 *dmtA* 突变株中占蛞蝓体 90% 的前孢子细胞都表达这些基因。换句话说, 只要是前孢子细胞都表达这些特异基因。在单层细胞培养实验中发现, 当加入外源 DIF-1 后蛞蝓体中前柄细胞的比例增加, 若加大 DIF-1 的量, 前柄细胞的比例也会随之增加。所以有可能存在一种确认细胞分化和比例机制。研究证实存在一个严格的检验点——GDT 点(growth/differentiation transition point), 即在饥饿诱导下盘基网柄菌从生长期转化到发育期<sup>[20]</sup>。在 GDT 点发生了许多特定的事件, 细胞内和细胞间的许多信号参与了这些事件。早期细胞丘阶段, 所

有的细胞都产生较低水平的 DIF-1, 由于 DIF-1 是可溶的, 细胞又处于运动状态中, 所以所有的细胞所处的 DIF-1 环境是相似的。在均一的 DIF-1 环境下, 盘基网柄菌分化成 *pstO* 细胞或前孢子细胞由细胞内在的特异性决定的, 即细胞开始发育时所处的细胞周期的时期决定了它们对 DIF-1 反应的敏感性。不同细胞类型会改变其 DIF 浓度来适合自身的分化, 前柄细胞区的 DIF 浓度下降, 前孢子区中则上升。通过 DIF 合成和降解的平衡来调整 DIF 的浓度。到蛞蝓体阶段, DIF 的合成和降解达到某种平衡, 所以就形成了特定的、稳定的前柄细胞/前孢子细胞的比例。

前柄细胞和前孢子细胞的比例还可能通过这种反馈调节机制来进行调控: 前孢子细胞产生大量的 DIF-1, 前柄细胞中的 DIF-1 脱氯酶活性大大提高, 降解 DIF-1, 使之 DIF-1 的浓度达到细胞分化所需的合适水平。前柄细胞中的 DIF-1 另一作用是诱导 cAMP 磷酸二酯酶的表达, 从而拮抗 cAMP 对前孢子细胞的诱导, 藉此来控制前孢子细胞的数量。所以 DIF 在调控前孢子细胞和前柄细胞的比例中起了关键作用。同时, DIF-6、DIF-7 等其他化合物也会影响前柄细胞的分化, 影响 *pstO* 细胞和 *pstA* 细胞等细胞亚型的比例。另外, 前孢子诱导因子 PSI1-2 也诱导前孢子细胞的分化, 对于调节前孢子细胞的数量也会起一定的作用。所以细胞比例的调节是诸信号途径综合作用的结果。

#### 5 小结

综上所述, DIF 在盘基网柄菌细胞发育中有相当重要作用, 但是它们起作用的许多细节还不完全清楚; 它们是否是类固醇激素的原始形式, 是直接进入盘基网柄菌细胞与细胞内受体结合还是经酶解后进入细胞, 胞内受体与类固醇激素胞内受体的结构是否相似, 特别是与 cAMP 信号协同调控细胞比例的交汇点等问题都值得去深入研究。希望通过对盘基网柄菌 DIF 信号转导过程的研究, 可以为阐明某些信号分子的起源和进化、细胞分化的调节和发育分子机制提供重要资料。

#### 参考文献 (Reference)

- [1] Schilde C et al. *Development*, 2004, **131**: 4555
- [2] Eichinger L et al. *Nature*, 2005, **435**: 43
- [3] Early A. *Semin Cell and Dev Biol*, 1999, **10**: 587
- [4] Morris HR et al. *Nature*, 1987, **328**: 811

- [5] Kay RR *et al. Semin Cell and Dev Biol*, 1999, **10**: 577
- [6] Kay RR. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 2669
- [7] Nayler O *et al. Eur J Biochem*, 1992, **208**: 531
- [8] Morandini P *et al. Biochem J*, 1995, **306**: 735
- [9] McRobbie SJ *et al. Development*, 1988, **104**: 275
- [10] Early AE *et al. Development*, 1993, **118**: 353
- [11] Early A *et al. Cell*, 1995, **83**: 91
- [12] Ceccarelli A *et al. Cell*, 1991, **65**: 983
- [13] Kay RR *et al. Development*, 2001, **128**: 4959
- [14] Thompson CRL *et al. Mol Cell*, 2000, **6**: 1509
- [15] Serafimidis I *et al. Dev Biol*, 2005, **282**: 432
- [16] Kawata T *et al. Dev Growth Differ*, 2004, **46**: 383
- [17] Insall R *et al. EMBO J*, 1990, **9**: 3323
- [18] Verkerke-van Wijk I *et al. Exp Cell Res*, 1998, **245**: 179
- [19] Darnell JE Jr. *Science*, 1997, **277**: 1630
- [20] Maeda Y. *Int Rev Cytol*, 2005, **244**: 287
- [21] Fukuzawa M *et al. Development*, 2003, **130**: 797
- [22] Araki T *et al. EMBO J*, 1998, **17**: 4018
- [23] Mohanty S *et al. Development*, 1999, **126**: 3391
- [24] Thompson CR *et al. Development*, 2004, **131**: 513
- [25] Gokan N *et al. Biochem Pharmacol*, 2005, **70**: 676
- [26] Maruo T *et al. Eukaryot Cell*, 2004, **3**: 1241

## DIF Signalling Pathways and Cell-Fate Determination in *Dictyostelium discoideum*

Jian-Tao Peng, Jia-Le Shi, Ning Tan, Lian-Sheng Hou\*

(School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract** The effects of differentiation inducing factor (DIF) and its working mechanism during *Dictyostelium* development are introduced in this article, including effects of DIF on prestalk and stalk cells, DIF biosynthesis, DIF induction, DIF inactivation, and the control of cell fate and cell proportion by DIF.

**Key words** *Dictyostelium*; prestalk cells; prespore cell; cell fate; differentiation inducing factor

Received: September 9, 2005 Accepted: December 20, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470200)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn