

# 微囊化新生大鼠卵巢组织体外及异体移植

严春晓 郑伟\* 傅红星<sup>1</sup> 金一<sup>1</sup> 卢晓声

(浙江大学医学院附属第二医院妇科, 杭州 310009; <sup>1</sup>浙江大学药学院药物制剂研究所, 杭州 310031)

**摘要** 为探讨海藻酸钠-聚左赖氨酸-海藻酸钠(APA)微囊化新生大鼠卵巢组织用于治疗实验性卵巢功能丧失大鼠的可行性, 应用高压静电法, 用海藻酸钠-聚左赖氨酸-海藻酸钠(APA)生物膜包裹新生大鼠卵巢组织, 体外培养微囊, 用免疫化学分析法检测雌二醇(E<sub>2</sub>)、孕酮(P)分泌情况, 透射电镜观察卵巢组织形态, 并将微囊移植到去势大鼠(切除双侧卵巢的雌性大鼠)腹腔中, 检测大鼠血清中雌、孕激素变化情况, 同时用阴道涂片观察大鼠动情周期恢复情况, 并在不同时间回收观察微囊。结果显示在相同条件下制得的微囊粒径均匀、表面光滑; 体外培养条件下持续分泌 E<sub>2</sub>、P; 卵巢组织中颗粒细胞发育成为粒性黄体细胞; 大鼠腹腔移植微囊后无异常, E<sub>2</sub>、P 水平上升, 动情周期未恢复; 回收的微囊大部分形态完整。提示用高压静电法制备的 APA 微囊化新生大鼠卵巢组织能持续稳定释放 E<sub>2</sub>、P, 明显改善大鼠卵巢功能, 在大鼠体内有良好的生物相容性。

**关键词** 微囊; 卵巢; 培养; 移植

卵巢是妇女重要的内分泌和生殖器官, 由于卵巢早衰、卵巢先天发育异常或缺如、病理性卵巢切除、恶性肿瘤放化疗等原因失去卵巢功能后, 将引起一系列内分泌失调及失去生育功能的问题。传统的激素替代疗法, 由于外源性雌激素在体内呈非生理性释放, 可产生一些严重副作用, 增加子宫内膜病变和乳腺癌的发生率<sup>[1]</sup>, 如果患者本身合并有血栓性疾病(如下肢血栓性静脉炎)或者乳房癌, 系统性红斑狼疮等疾病时, 激素替代疗法更受到极大的限制。随着器官移植理论和技术的发展, 卵巢组织移植受到了各国学者更大的关注。但是由于移植供体来源有限以及免疫排斥反应使卵巢移植的发展受到了很大限制。

在其他内分泌低下的疾病, 学者们发现通过微囊化组织移植解决内分泌激素替代治疗, 可以同时避免免疫排斥问题以及替代治疗所带来的非生理性释放问题。目前这一方法已成为医学和生物工程领域的研究热点, 甲状腺、胰岛、甲状旁腺、垂体、肾上腺嗜铬细胞<sup>[2]</sup>等微囊化的研究已经开展了很多, 但在卵巢方面尚未有报道。

我们采用新生大鼠卵巢组织配以海藻酸钠-聚左赖氨酸-海藻酸钠(APA)微囊作为免疫隔离工具的方法, 移植治疗实验性卵巢功能丧失大鼠, 受体雌二醇(E<sub>2</sub>)、孕酮(P)水平明显改善, 说明 APA 微囊有良好的免疫隔离作用, 运用微囊技术的卵巢移植有一定可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 受体为 SD 成年雌性大鼠(购于浙江大学医学院实验动物中心), 体重 220~250 g。卵巢来源: 出生 24 h 以内的 SD 新生大鼠(购于浙江大学医学院实验动物中心)卵巢。实验动物随机分组: 实验组(20 只): 去势大鼠腹腔内植入含新生大鼠卵巢组织的 APA 微囊; 空微囊对照组(10 只): 去势大鼠腹腔内植入空 APA 微囊; 去势对照组(8 只): 正常成年雌性大鼠切除双侧卵巢; 正常对照组(8 只): 正常成年雌性大鼠。

**1.1.2 试剂与仪器** 海藻酸钠(中国医药集团上海化学试剂公司); 聚左赖氨酸分子量为 27400 (Sigma 公司, 美国); RPMI 1640 培养基(上海吉诺生物医药技术有限公司); 胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物制品所); Estradiol Test Units (美国 Beckman Coulter 公司); PGN Test Units(美国 Beckman Coulter 公司); 其余试剂均为分析纯。高压静电发生器(苏州市巨晟涂装工程有限公司); 自动注入机 ZZ-50(浙江医科大学仪器实验厂); ACCESS 全自动微粒子化学发光免疫分析仪(美国 Beckman Coulter 公司); JEM-1230 透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

### 1.2 方法

收稿日期: 2006-01-09 接受日期: 2006-05-26

\* 通讯作者。Tel: 0571-87783505, Fax: 0571-87783505, E-mail:

dwzheng00@yahoo.com

**1.2.1 新生大鼠卵巢组织的获取** 出生 24 h 以内的雌性大鼠背部肋脊角处剪开皮肤, 取出双侧卵巢, 置于 PBS 溶液中, 于体视镜下剥除表面的结缔组织囊, 可见肾形的卵巢组织, 约 1 mm × 1 mm × 1 mm。剪切成 0.3 mm × 0.3 mm × 0.3 mm 大小的组织块, 置入含 20% FBS, pH 7.2 的 RPMI 1640 培养液中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、95% 空气条件湿化的培养箱中培养, 每 48 h 或者 72 h 更换 1/2 培养液。

**1.2.2 新生大鼠卵巢组织的微囊化** 采用 Ve Dos 等<sup>[3]</sup>方法纯化海藻酸钠, 将培养 48 h 的卵巢组织用冷生理盐水洗涤两次(1 500 r/min, 5 min), 去除上清液后的卵巢组织混悬于质量分数为 15 g/L 的海藻酸钠溶液中, 吸入 50 ml 注射器, 用自动注入机将注射器中的海藻酸钠溶液推出, 同时利用高压静电发生器产生的静电场将溶液滴入 0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中反应 10 min, 生成海藻酸微钙胶珠; 生理盐水洗涤 3 次, 加入聚左赖氨酸溶液反应 5 min; 洗涤 3 次, 再加入质量分数为 15 g/L 的海藻酸钠溶液反应 5 min; 洗涤 3 次, 最后用 55 mmol/L 柠檬酸钠溶液液化囊心 6 min, 最后形成包裹新生大鼠卵巢组织的 APA 微囊<sup>[4]</sup>。微囊用生理盐水洗涤 3 次, 按上述条件培养待用。

**1.2.3 E<sub>2</sub>、P 的测定** 正常组雌性大鼠在动情周期的动情期眼眶取血, 去势组雌性大鼠在去势 20 天后眼眶取血, 空位囊组及实验组雌性大鼠在移植术后不同时期眼眶取血, 采用免疫化学分析法, 测定血清中 E<sub>2</sub>、P 水平。同时定期测定培养液中 E<sub>2</sub>、P 水平, 对微囊化后的卵巢组织内分泌功能进行量化判定。所取培养液及血清在 -20 °C 低温保存待测, 用同一试剂盒整批测定。

**1.2.4 透射电镜观察** 定期取出微囊内新生大鼠卵巢组织, 用 2% 戊二醛固定后, 梯度乙醇脱水, 环状树脂包埋, 切片, 染色, 观察。

**1.2.5 微囊化新生大鼠卵巢组织的动物移植** 微囊化新生大鼠卵巢组织通过功能检测证实存活后移植入实验组受体腹腔内, 移植的组织量为每只受体植入 3 对 APA 微囊化的新生大鼠卵巢。

**1.2.6 阴道涂片检查** 为观察微囊移植后大鼠动情周期的恢复情况, 于术后 5 天起, 每天清晨 8 时对各组大鼠阴道脱落细胞进行检查。以脱落细胞类型进行分析, 未出现性周期变化者, 显微镜下计数, 每高倍视野角化细胞比例 > 50% 者视为有雌激素作用。

**1.2.7 微囊的回收及观察** 实验组大鼠分别在 1、2、4、8 周处死, 用生理盐水灌洗腹腔, 回收微囊, 观察微囊形态变化, 常规锥虫蓝染色观察组织存活率。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件统计, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 APA 微囊的形态学观察

在光学倒置显微镜下观察相同条件下制得的 APA 微囊, 可见微囊形态圆整, 大小均匀, 直径大约为 500~700 μm。新生大鼠卵巢组织在囊内分化发育, 边界模糊不清, 组织团反光良好(图 1)。随着培养时间的延长, 可见到部分卵巢组织有逐渐沿囊壁生长现象(图 2)。培养至 8 周时, 大部分囊壁仍呈完整形态。

### 2.2 APA 微囊培养液中 E<sub>2</sub>、P 水平

通过免疫化学分析法, 分别在第 2、4、6、8、10、12、14、21、28、35、42、49、56 天时测定培养液中 E<sub>2</sub>、P 浓度。可见培养液中 E<sub>2</sub> 水平随着培养时间的延长逐渐升高, 在第 14 天时达到最高峰, 此后稍下降, 并持续维持稳定浓度(图 3)。培养液中 P 浓度也随着培养时间的延长逐渐升高, 在第 21 天时达到最高峰, 此后稍下降, 并持续维持稳定浓度(图 4)。

### 2.3 APA 微囊中卵巢组织的超微结构

通过透射电镜观察 APA 微囊卵巢组织的超微结构, 根据相关书籍<sup>[5,6]</sup>及文献<sup>[7]</sup>, 可见在培养 1 周后的微囊化新生大鼠卵巢组织中, 存在大量正常的颗粒细胞, 胞核不规则, 核膜下有薄层异染色质, 胞质中有内质网、线粒体(图 5)。在培养 4 周后的微囊化新生大鼠卵巢组织中, 可见到大量粒性黄体细胞, 胞核大, 染色质颗粒细, 分布均匀, 胞质内细胞器丰富, 有高尔基体、内质网、线粒体、脂滴等(图 6)。说明卵巢组织在囊内分化发育良好。

### 2.4 APA 微囊移植后大鼠动情周期的恢复情况

通过大鼠阴道细胞涂片, 发现正常对照组大鼠呈正常动情周期变化; 空微囊对照组及去势对照组大鼠阴道上皮呈持续无角化状态; 实验组大鼠在移植后(20.54 ± 4.60)天阴道涂片开始出现改变, 有角化细胞周期性出现, 但是未呈现典型动情周期的细胞类型。在实验组中, 19 只大鼠角化细胞数量超过 50%, 认为有雌激素作用, 1 只出现持续无角化状态, 认为无雌激素作用。

### 2.5 APA 微囊移植后大鼠血清中 E<sub>2</sub>、P 水平

在微囊移植 20 天后, 通过免疫化学分析法测定大鼠血清中 E<sub>2</sub>、P 水平, 可见到实验组大鼠 E<sub>2</sub> 水平与去势对照组比较均有显著差异(*t* = 17.93; *t* = 19.56; *t* = 16.05; *P* 均 < 0.01); P 水平与去势对照组比较均有

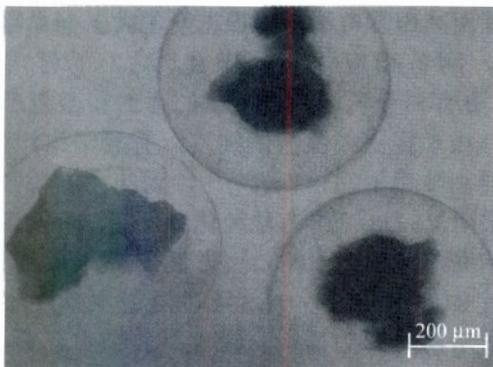


图1 光镜下体外培养2天的APA微囊(10×)  
可见囊壁光滑, 卵巢组织居中。



图2 光镜下体外培养6周的APA微囊(10×)  
可见囊壁完整, 大部分卵巢组织趋向囊壁生长。

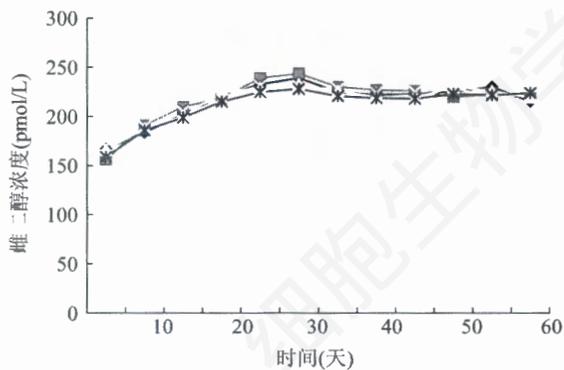


图3 培养液中E<sub>2</sub>水平的变化

◆、■、▲、×、\* 分别代表5个不同样本(每个样本中均有2对APA微囊化的新生大鼠卵巢组织), 等量培养液中E<sub>2</sub>水平随时间的变化情况。

显著差异( $t=5.62$ ;  $t=7.41$ ;  $t=7.33$ ;  $P$ 均 $<0.01$ )。可见实验组大鼠E<sub>2</sub>水平与空微囊组比较均有显著差异( $t=29.87$ ;  $t=28.53$ ;  $t=22.87$ ;  $P$ 均 $<0.01$ ); P水平与空微囊组比较均有显著差异( $t=8.09$ ;  $t=10.07$ ;  $t=8.86$ ;  $P$ 均 $<0.01$ )。但是实验组大鼠未能恢复与正常对照组相近的E<sub>2</sub>、P水平(表1)。

### 2.6 APA微囊的回收观察

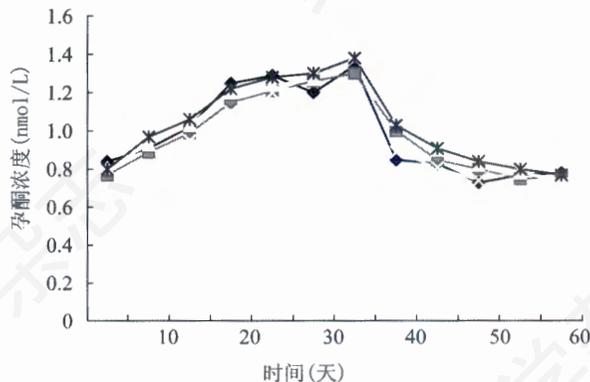


图4 培养液中P水平的变化

◆、■、▲、×、\* 分别代表5个不同样本(每个样本中均有2对APA微囊化的新生大鼠卵巢组织), 等量培养液中P水平随时间的变化情况。

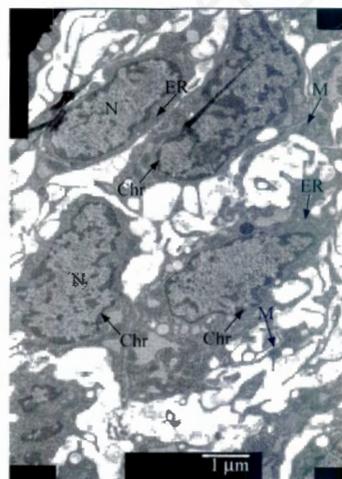


图5 透射电镜下体外培养1周的APA微囊化新生卵巢组织(钡铅染色, EM 6 000×)

N: 细胞核; M: 线粒体; Chr: 染色质; ER: 内质网。

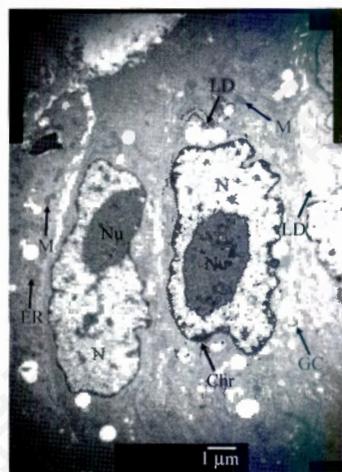


图6 透射电镜下体外培养4周的APA微囊化新生卵巢组织(钡铅染色, EM 5 000×)

N: 细胞核; Nu: 核仁; M: 线粒体; Chr: 染色质; ER: 内质网; GC: 高尔基体; LD: 脂滴。

表1 各组大鼠不同时期血清中 E<sub>2</sub>、P 水平

组别	E <sub>2</sub> (pmol/L)	P (nmol/L)
正常对照组	230.20 ± 35.17	115.90 ± 9.94
去势组	71.50 ± 13.55*	59.80 ± 15.93*
空位囊组		
5~10 天	63.70 ± 14.62	58.16 ± 18.01
20~25 天	68.40 ± 7.75 <sup>▲</sup>	53.05 ± 12.52 <sup>▲</sup>
30~35 天	73.50 ± 10.11 <sup>▲</sup>	54.10 ± 12.85 <sup>▲</sup>
>35 天	71.30 ± 7.53 <sup>▲</sup>	53.09 ± 14.99 <sup>▲</sup>
实验组		
5~10 天	71.50 ± 13.55	60.01 ± 16.06
20~25 天	187.30 ± 9.91* <sup>▲</sup>	92.15 ± 8.78* <sup>▲</sup>
30~35 天	195.40 ± 8.96* <sup>▲</sup>	100.32 ± 6.74* <sup>▲</sup>
>35 天	186.20 ± 13.99* <sup>▲</sup>	99.16 ± 5.85* <sup>▲</sup>

实验组与去势组比较有显著差异, \* $P < 0.01$ ; 实验组与空位囊组比较有显著差异, <sup>▲</sup> $P < 0.01$ 。

按时回收实验组大鼠体内微囊, 打开腹腔, 肉眼可见大鼠腹腔内各脏器表面光滑, 无明显结节, 大多数微囊在腹腔内浮游, 腹腔灌洗后回收微囊(回收率 100%)。在光学倒置显微镜下观察, 可见 1、2、4 周回收的微囊大部分表面光滑, 形态完整, 有部分微囊出现组织沿囊壁生长。常规锥虫蓝染色发现存活率均达到 80%。可见 8 周后回收的微囊(75 ± 2)% 形态完整, 但组织沿囊壁单边生长的微囊数量增多, 使微囊形态变化, 甚至破口。常规锥虫蓝染色存活率达 70%。

### 3 讨论

激素替代治疗(HRT)广泛应用于一些因各种原因发生卵巢功能衰退或者丧失的妇女, 以减轻骨痛、骨质疏松等症状, 近年来还被应用于预防一些老年性疾病, 希望提高生活质量的更年期或者绝经期妇女。但是外源性雌激素在体内的非生理性释放所带来的副作用和副反应也引起很多学者的争论。根据美国妇女健康启动项目研究中后期报告<sup>[8]</sup>指出绝经后妇女在使用 HRT 治疗时, 有潜在的乳腺癌和心血管病风险, 应权衡利弊, 并不应作为冠心病的一级预防措施。如何更安全的治疗这些患者成为研究者的关注焦点。近年来, 组织移植治疗内分泌系统疾病成为医学和生物工程领域内的研究热点, 人们发现通过器官或组织移植替代激素治疗符合生理内环境要求, 但组织移植存在两个技术难点: 一是获取高产量、高活性、高纯度的供体组织, 关键是缩短热、冷缺血时间及选择优良的培养基和培养方法<sup>[9]</sup>。二是解决免疫排斥, 关键是免疫隔离工具的选择。

1980 年, Lim 等<sup>[10]</sup>首先发明了免疫隔离 APA 微胶囊, 利用生物半透膜隔绝了抗体及免疫细胞对移植物的攻击, 是控制免疫排斥的有效方法之一。本

实验使用高压静电法, 可根据新生大鼠卵巢组织的大小, 制备相应体积的微囊, 减少了囊内“死腔”, 更有利于囊内卵巢组织的存活和微囊形态的保持。由于提高海藻酸钠纯度, 有利于组织生长, 并可提高微囊生物相容性<sup>[3,11]</sup>, 因此在制备微囊前我们采用 Ve Dos 等<sup>[3]</sup>方法纯化海藻酸钠, 发现去杂质后的海藻酸钠无菌滤过更方便, 成囊表面更光滑。

在体外培养过程中, 通过透射电镜观察, 发现随着培养时间的延长, 粒性黄体细胞逐渐增多。根据文献<sup>[12,13]</sup>报道, 卵巢髓质可能分泌一种抑制皮质内原始卵泡生长起始的物质, 以维持原始卵泡库的静息状态。微囊化卵巢组织培养时, 完整的器官形态已经不能维持, 加上定期的换液处理, 克服了髓质分泌的抑制因素影响。原始卵泡得以自发或在未知因素下启动发育, 成为黄体, 粒性黄体细胞也得以增多。并且实验中所用的是新生大鼠卵巢组织, 尚未达到性成熟, 组织中主要为大量原始卵泡。微囊中的卵巢组织能透过微囊获取营养物质和氧气, 排出代谢产物, 进一步发育成熟。原始卵泡发育成为黄体, 颗粒细胞也进一步发育成为粒性黄体细胞。这一结果证实微囊化后的新生大鼠卵巢组织在培养体系下发育良好, 具备良好的生物活性。在体外培养过程中, 我们持续检测到 E<sub>2</sub>、P 的稳定释放, 从另一方面证实了卵巢组织的存活情况, 说明微囊有良好的生物膜性, 制备微囊的材料和方法对卵巢组织的活性和分泌功能无不良影响。但是可能由于对卵巢组织的反复机械剪切操作, 使卵泡结构遭到一定程度的破坏, 我们未在透射电镜中观察到完整的卵泡结构。在进一步实验中, 对卵巢组织的处理方法还需要更多的尝试和研究。

一般细胞在体外培养生长具有几个特点, 主要是贴附、接触抑制和密度依赖性。贴附并伸展, 是多数体外培养细胞的基本生长特点。在体外培养过程中, 微囊化卵巢组织也出现了向囊壁贴附生长的现象。考虑到卵巢组织中主要包括结缔组织、卵泡和黄体。其中大部分都是贴壁生长细胞, 即有贴附伸展的特性。因此, 在 APA 微囊内, 卵巢组织也需要有贴附生长的底物, 即 APA 微囊的内表面; 同时组织生长所需的营养物质及氧等需要通过微囊膜才能供给细胞, 所以卵巢组织有趋向囊壁生长的现象。但是体内条件下, 发现微囊中组织沿囊壁单边生长的情况多于体外培养, 考虑可能由于体内环境和体外培养环境不同, 体外培养仅提供营养物质和氧气, 而卵泡发育与体内 FSH、LH 等激素分泌有密切的关系。正是由于受到体内激素分泌的影

响, 导致体内条件下微囊中组织生长快于体外。为了改善组织单边生长所引起的微囊变形及破口, 在以后的研究中, 应改进微囊强度, 使微囊体内长期应用不受限制。

将包含新生大鼠卵巢组织的 APA 微囊移植入去势大鼠腹腔后, 发现实验组大鼠 99.5% 阴道脱落细胞有角化细胞周期性出现, 且血清中  $E_2$ 、P 水平明显高于空位囊对照组及去势对照组。说明微囊化后的新生大鼠卵巢组织在受体腹腔内稳定释放  $E_2$ 、P, 具备良好的生物活性。我们考虑, 未能使实验组大鼠完全恢复动情周期的原因可能有微囊数量不够多, 还可能是由于机械剪切后对卵巢组织的损伤所致卵巢内环境破坏。在进一步研究中, 还需要更多的尝试。2 个月内不同时期回收实验组大鼠腹腔内微囊大部分形态完整, 表面光滑, 同时大鼠腹腔内无任何异常或者结节产生, 经锥虫蓝染色发现囊内组织成活率达 80%, 可见 APA 微囊有良好的生物相容性, 微囊膜通透性良好, 营养物质可以通过但是抗体及免疫细胞不能进入, 移植物可以长期存活。

由于 HRT 所带来的种种问题和争议, 使卵巢

移植成为解决女性卵巢功能衰退或丧失的重要选择方法。本实验通过选择 APA 微囊的方法, 使移植所面临的免疫排斥问题得到一定解决, 达到了免疫隔离的目的, 显著改善了大鼠的卵巢功能。随着微囊化胰岛异种移植应用于人体研究<sup>[14]</sup>的开展, 我们相信, 通过微囊化卵巢移植的进一步研究, 可以扩大移植供体和受体的选择范围, 具有巨大的潜在临床应用价值。

#### 参考文献 (References)

- [1] Beral V *et al.* *Lancet*, 2005, **365**: 1543
- [2] 马学强等. 解剖科学进展, 2003, **9**: 343
- [3] De Vos P *et al.* *Diabetologia*, 1997, **40**: 262
- [4] 李保国等. *上海理工大学学报*, 2000, **22**: 189
- [5] 钟慈声等. *细胞和组织的超微结构*, 北京: 人民卫生出版社, 1984, 170
- [6] 帕里斯·康斯坦丁尼德斯. *机能电镜组织学*, 北京: 科学出版社, 1980, 132
- [7] 魏美娟等. *上海医科大学学报*, 2000, **27**: 511
- [8] Rossouw JE *et al.* *JAMA*, 2002, **288**: 321
- [9] 吴美惠等. *实用内科杂志*, 1991, **11**: 640
- [10] Lim F *et al.* *Science*, 1980, **210**: 908
- [11] 于聪慧等. *中华外科杂志*, 2000, **38**: 300
- [12] Eppig JJ *et al.* *Biol Reprod*, 1996, **54**: 197
- [13] Fortune JE *et al.* *Theriogenology*, 1998, **49**: 441
- [14] 章乐虹等. *中华器官移植杂志*, 2003, **24**: 121

## Microencapsulated Newborn Rats Ovaries *in Vitro* and Allotransplantation

Chun-Xiao Yan, Wei Zheng\*, Hong-Xing Fu<sup>1</sup>, Yi Jin<sup>1</sup>, Xiao-Sheng Lu

(The Second Affiliate Hospital of Medicine College, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China; <sup>1</sup>College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 3100031, China)

**Abstract** To explore the feasibility of alginate-polylysine-alginate (APA) microencapsulated newborn rats ovaries in treatment of castrated adult female rats. The APA microencapsulated newborn rats ovaries were prepared with a high-voltage electrostatic system. The microcapsules were cultured *in vitro*, and the estradiol ( $E_2$ ) and progesterone (P) secretion were measured periodically, and the ovaries were measured by transmission electron microscope periodically. The microcapsules were transplanted to castrated adult female rats, and the  $E_2$  and P secretion were measured periodically. The recovery and maintaining time of the oestrus cycle were carefully observed, and the endocrine function of transplanted ovaries was determined by measuring serum  $E_2$  and P. The transplanted microcapsules were recovered at intervals. The microcapsules prepared in the same condition of high-voltage electrostatic system were round and homogeneous. The  $E_2$ , P secreted by microencapsulated newborn rats ovaries were shown the permeate of the membrane of APA microcapsules, and the develop of granulose cells in ovaries were founded by transmission electron microscope *in vitro*. After microcapsules were transplanted, the level of  $E_2$ , P in castrated adult female rats were raised gradually, but the oestrus cycle were not resumed. The majority of recovered APA microcapsules were intact, and no evidence of immunological reaction in terms of fibrosis. The  $E_2$  and P were secreted continually and steadily by the APA microencapsulated newborn rats ovaries prepared by high-voltage electrostatic system. The ovarian function of castrated adult female rats were improved by APA microcapsules, and the microcapsules have good biocompatibility *in vivo*.

**Key words** microcapsule; ovary; culture; transplantation

Received: January 9, 2006 Accepted: May 26, 2006

\*Corresponding author. Tel: 86-571-87783505, Fax: 86-571-87783505, E-mail: dwzheng00@yahoo.com