

# 细胞提取物介导的体细胞重编程

刘辉 黎江 刘新垣 钱其军\*

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

**摘要** 将完全分化的细胞重编程,不经胚胎阶段而直接逆转至多能干细胞状态,这从法律、道德、伦理等方面均被人们所接受,重新点燃了人们对体细胞重编程的热情,点燃了再生医学研究的新希望。现重点阐述细胞提取物介导的体细胞重编程的原理及其应用前景,并详细介绍体细胞重编程的最新方法:细胞核移植入卵母细胞;体细胞与胚胎干细胞或胚胎癌细胞融合;在体细胞中强制性过表达特定的转录因子;用卵细胞、胚胎干细胞或多能癌细胞的细胞提取物处理体细胞等。

**关键词** 重编程;细胞提取物;转分化

人们普遍认为细胞分化为成熟细胞后,其分化状态不会再发生变化,但自然界存在着成熟细胞去分化现象,且科研工作者亦通过体外实验得到了相似的实验结果。这说明成熟细胞的分化状态并非一成不变的,在某些条件下可能发生去分化甚至逆转至多能性细胞。1997年,克隆羊“多利”的诞生引发了对成熟体细胞重编程为多能状态的众多关注。然而,如何稳定高效地将体细胞转变为多能性细胞,一直困扰着科学家们。

体细胞重编程(somatic reprogramming)是指分化成熟的体细胞在特定条件下,被逆转回全能性状态或形成胚胎干细胞系,或进一步发育成一个全新个体的过程。成熟体细胞重编程至多能状态是通过逐步改变细胞结构,表观遗传修饰染色质、转录因子及转录后因子表达等方式实现的,其中靶细胞结构的改型是达到稳定的重编程的重要条件。若能通过将体细胞重编程至多能状态为再生医学生产干细胞样细胞(stem cell-like cell),将为治疗多种重大疾病提供新的思路。对体细胞重编程的研究还能进一步阐明细胞分化、去分化及转分化等机制。有科学家将体细胞重编程法应用于肿瘤治疗研究中,旨在发现引起肿瘤发生发展的具体物质,如RNA或蛋白质等,为肿瘤治疗研究提供一种新的思路。本文对目前运用于体细胞重编程的主要方法作简要概括,并重点介绍细胞提取物介导的体细胞重编程及其医学应用前景。

## 1 体细胞重编程的方法

20世纪50年代,美国科学家以两栖动物和鱼类作研究对象,创立细胞核移植技术。1986年,英国

科学家 Willadsen 用胚胎细胞克隆出一只羊,随后科学家们相继克隆出牛、鼠、兔、猴等动物,这些克隆动物均是利用胚胎细胞作为供体细胞进行细胞核移植而诞生的。1997年2月22日,英国罗斯林研究所 Wilmut 等<sup>[1]</sup>人宣布克隆羊获得成功,克隆羊“多利”是利用乳腺上皮细胞(体细胞)作为供体细胞进行细胞核移植,是人类首次在哺乳动物中成功的实现体细胞克隆,突破了利用胚胎细胞进行核移植的传统方式,翻开了生物克隆史上崭新的一页。从此体细胞重编程引起广大研究者的关注,科学家们已经用以下方法在体细胞重编程研究中取得了一定成果。

### 1.1 细胞核移植入卵母细胞

体细胞核移植到卵母细胞后,经卵母细胞微环境以及各种因子的作用,体细胞核进行重编程。重编程后,体细胞核重新进入发育阶段,发育过程与自然受精后胚胎的发育过程极为相似。但由于存在诸多问题可导致细胞核表观重编程不完全,使得这一方法难以全面发展。如:胚胎重建过程中的技术限制;所用卵母细胞活性不高或质量低;供体和受体细胞周期缺乏同步性等。技术障碍、伦理标准以及政府的管制等因素使得科学家们开始寻找其他重编程的方法。

### 1.2 体细胞与胚胎干细胞或胚胎癌细胞的融合

1976年,Miller等<sup>[2]</sup>发现胚胎癌细胞(embryonic carcinoma cell, EC细胞)与原代培养的胸腺细胞融合

收稿日期:2008-04-23 接受日期:2008-06-10

国家自然科学基金资助项目(No.30671402)

\*通讯作者。Tel: 021-35030677, Fax: 021-35030677, E-mail: qianqj@163.com

可形成多能性杂合体,并且杂合体表现出与胚胎癌细胞一致的表型特征,并可引发肿瘤。与分化细胞相比,多能性细胞的表型在杂合体中占主导地位,这种现象在体细胞与鼠胚胎生殖细胞(embryonic germ cell, EG 细胞)<sup>[3]</sup>和胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)<sup>[4]</sup>的融合实验中均得到证实。但由于多倍体的存在可导致杂合体基因组不稳定,具有潜在的风险性,而科学家们目前尚未找到有效去除多余染色体的方法,因此通过细胞融合进行体细胞重编程在应用中有很大的局限性。

### 1.3 在体细胞中强制性过表达特定的转录因子

在体细胞中强制性过表达特定的转录因子是近年来研究最热的方法,特别是近两年不断有新的研究成果,成为人们关注的焦点。Takahashi 等<sup>[5]</sup>发现转录因子 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 可诱导鼠成纤维细胞成为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS 细胞)。iPS 细胞具有胚胎干细胞形态,表达胚胎干细胞表面标记,并且转录谱极为相似。但 iPS 细胞不能长期发育,且不是所有的 iPS 细胞基因表达谱均相同。2007 年, Yamanaka 等<sup>[6]</sup>和 Jaenisch 等<sup>[7]</sup>通过进一步研究得到了新一代 iPS 细胞,它不仅具有和胚胎干细胞几乎一样的基因印记模式,且能形成嵌合体并产生后代。2007 年 11 月, Takahashi 等<sup>[8]</sup>和 Yu 等<sup>[9]</sup>分别表示,已成功对人类皮肤细胞进行基因操作,得到了人 iPS 细胞。而不同的是: Takahashi 等<sup>[8]</sup>利用 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc, 而 Yu 等<sup>[9]</sup>利用 Oct4、Sox2、Nanog、Lin28 诱导。Hanna 等<sup>[10]</sup>利用自体同源的皮肤产生的 iPS 细胞来治疗镰刀型细胞贫血症,并且已在鼠模型中取得成功。Aoi 等<sup>[11]</sup>利用成体实验鼠的肝和胃细胞培育出 iPS 细胞,肝细胞和胃细胞在人体内相对容易提取,与皮肤细胞培育出的 iPS 细胞相比,这种 iPS 细胞引发癌症的可能性大为下降。尽管这些成果将会加速细胞疗法的研究,但仍需要进行更多的研究工作以防止引入基因与细胞基因组发生融合。另外,为确保治疗的安全性,还需要研究出能够移除病毒载体的方法。

### 1.4 运用合成分子进行重编程

应用合成的化合物分子重编程细胞具有很大的应用前景。化合物 reversine 具有诱导 C2C12 成肌细胞去分化的能力,产生的去分化细胞在适当的培养基上可分化为成骨细胞和脂肪细胞<sup>[12]</sup>,其他一些化合物也能诱导细胞分化,如异环化合物<sup>[13-15]</sup>等。

### 1.5 RNA 相关的细胞质重编程

细胞质重编程也能改变细胞蛋白质的合成。MicroRNA (miRNA)是具有 21~22 核苷酸的非编码 RNA,具有转录后调节作用<sup>[16]</sup>。通常认为 miRNA 介导的翻译抑制是动物中最普遍的转录后基因抑制机制,而 Wienholds 等<sup>[17]</sup>发现也可通过 RNA 诱导沉默复合体的内切酶活性介导的转录特异性剪切来进行转录后基因抑制。Lim 等<sup>[18]</sup>认为 Dicer 酶是加工 miRNA 需要的酶,可保持细胞的未分化状态。去除了 Dicer 酶的鼠胚胎干细胞,其分化能力和增殖能力均减弱。Krützfeldt 等<sup>[19]</sup>和 Boyer 等<sup>[20]</sup>研究发现每个 miRNA 在 3' UTR 上的识别模体不同,特定 miRNA 的抑制可导致数百 mRNA 表达上调或下降,这表明改变细胞 miRNA 的表达量可能会提高对外源因子的细胞反应。

### 1.6 细胞提取物介导的体细胞重编程

细胞提取物可提供诱导多能性细胞产生的调节因子,运用不同类型细胞的细胞提取物重编程可驱使体细胞产生新的基因表达谱。细胞提取物介导的重编程主要有两方面优势:(1)不存在被导入的胚胎干细胞(或多能性细胞)的染色体重编程;(2)可通过操纵细胞提取物的成分识别与重编程有关的细胞因子,同时具有阐明重编程机制的可能性。目前比较成熟的方法是首先用细菌毒素链球菌溶血素 O (streptolysin O, SLO)穿透(permeate)供体细胞(如 293T 纤维原细胞)的质膜,然后将供体细胞置于靶细胞(如 T 细胞)的细胞提取物中温育,靶细胞特异性因子扩散入已被穿透的供体细胞,并被供体细胞的细胞核占据。温育完的细胞用 CaCl<sub>2</sub> 重新闭合(reseal),然后培养,并分析细胞的功能特征的改变,测定重编程的效率(图 1)<sup>[21]</sup>。

SLO 是胆固醇依赖的溶血素家族(CDC)的一员,是由 β 溶血素家族 A 链球菌分泌的 69 kDa 的水溶性蛋白质。首先 SLO 结合在细胞膜上,在 37 °C 时利用细胞膜上的胆固醇与 SLO 聚合形成半环或环状的孔,而细胞膜大部分依旧是完整的。靶细胞提取物进入供体细胞后,加入 CaCl<sub>2</sub> 孔可重新封闭。

1.6.1 细胞提取物介导的体细胞重编程的方法 细胞提取物介导的体细胞重编程研究已取得一定成果,目前集中在细胞的横向分化(转分化)和经细胞提取物重编程后得到多能性细胞。

#### (1)转分化

转分化(transdifferentiation)指将一种分化的细胞类型直接转变为另一种细胞类型。细胞完成转分化的过程必须满足以下条件:供体细胞的一系列基因必

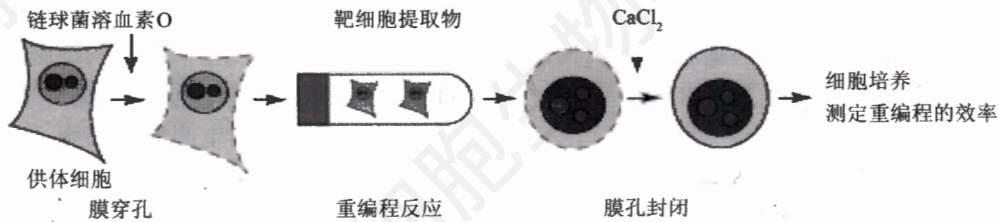


图1 细胞提取物介导的体细胞重编程示意图<sup>[21]</sup>

须打开, 而靶细胞的基因关闭。当转分化过程较慢时, 会有一个靶基因在供体基因激活之前关闭的阶段, 当供体细胞基因完全激活后转分化的细胞获得新的特征表型。如果这种转变发生的太快, 这两种细胞的基因产物共存于细胞中, 导致转分化不彻底, 从而产生杂交类型的细胞。

Landsverk 等<sup>[22]</sup>研究发现用 Jurkat T 细胞提取物处理的人类上皮细胞可呈现 T 细胞的特征: 如 IL2 座位组蛋白 H4 超乙酰化; 表达 T 细胞特异性基因如 IL2 和表面受体; 可诱导 T 细胞特异的信号途径(如 IL2 的分泌)。Häkeliën 等<sup>[23,24]</sup>发现, 用大鼠的胰岛瘤细胞提取物处理大鼠原代成纤维细胞可诱导胰腺特异性基因 Pdx1 和胰岛素的表达, 并且有些新的表型在培养过程中可持续几个月之久。利用相似的途径, Gaustad 等<sup>[25]</sup>诱导心肌细胞作为人类脂肪干细胞起作用, 以及 Qin 等<sup>[26]</sup>将鼠胚胎干细胞分化成肺细胞。虽然转分化研究已取得一定成果, 但仍需要进一步研究提高转分化的效率, 且转分化细胞长期的稳定性需要进一步证实。

#### (2) 用两栖动物的生殖细胞因子进行重编程

体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)的分化逆转表明卵母细胞具有建立多能表型的所有成分, 但哺乳动物卵母细胞来源有限而限制了生物资源的利用, 因此推动了寻找卵母细胞替代资源的发展。Tamada 等<sup>[27]</sup>研究发现鼠 EC 细胞的细胞核和卵母细胞共培养时, nucleoplasmin(指存在于 *Xenopus* 卵母细胞中的蛋白质)在染色质的去浓缩过程中起重要作用。Nucleoplasmin 诱导的染色质改型包括中心粒 DNA 的去浓缩; 染色质相关的 HP1 蛋白的减少; 组蛋白 H3K9 三甲基化的丢失; 卵母细胞特异性基因 *c-mos*、*Mys-2* 和 *H1foo* 的重新激活。

未分化的细胞包含引起成熟分化细胞产生多能性所必须的调节因子。McGann 等<sup>[28]</sup>研究发现, 再生蝾螈肢细胞提取物可诱导 C2C12 起源的鼠肌小管去

分化为可进行 DNA 复制的成肌细胞, 移走细胞提取物后, 去分化的表型依然存在, 这表明细胞重编程事件已经发生。Hansis 等<sup>[29]</sup>报道 *Xenopus* 卵细胞提取物也可诱导类胚胎干细胞克隆的形成和人类上皮细胞及白血球细胞中多能基因的表达, 但是重编程的白细胞不表达具有胚胎干细胞特征的细胞表面标记, 因此这种条件下的重编程是部分的、不完全的。未受精的鱼卵细胞也具有诱导人类上皮细胞表达多能性的能力, 如形成一些可表达 Oct4 和 Nanog 基因和蛋白质的克隆。两栖动物或鱼的细胞提取物对生产与治疗相关细胞是非常有用的, 毕竟两栖动物更易获得大量的卵细胞, 但这仍是一个技术挑战, 还需进一步探究。

#### (3) 胚胎干细胞和胚胎癌细胞的提取物进行体细胞重编程

Hakeliën 等<sup>[30]</sup>研究发现经 NCCIT 细胞株提取物重编程的 293T 细胞有克隆形成, 并可在培养过程中保持许多代, 而用 293T 细胞提取物或 Jurkat T 细胞提取物不能形成克隆或形态清晰的聚集物。经胚胎干细胞提取物处理一周后 60%~70% 的细胞表达细胞内 Oct4 蛋白, 并伴随着其他多能标记(如 Sox2)的表达, 而细胞分化标记——*laminA/C* 表达量显著下降。经胚胎干细胞提取物处理过的细胞基因表达谱发生了变化, 大约 1 800 个基因上调和大概 1 700 个基因下调, 分别有 70% 和 34% 的基因是 EC 细胞的基因。

Taranger 等<sup>[31]</sup>研究发现将通透的 NIH3T3 纤维原细胞短暂的暴露于未分化的鼠胚胎干细胞提取物中, 产生了 Oct4<sup>+</sup> laminA<sup>-</sup> 重编程细胞。Taranger 等<sup>[31]</sup>证实人类癌细胞核和细胞质提取物在人上皮细胞中具有相似的效果。重编程细胞以克隆形式生长, 表达在胚胎发育早期和胚胎干细胞中表达的基因如 Oct4、Sox2、Nanog 等, 并引起 *laminA* 表达的下调。在检测胚胎干细胞提取物处理的细胞基因表达谱变化时发现大概有 700 个基因上调或被诱导表达, 并可

持续表达2个月以上,同时160个基因下调。大多数上调的基因编码的元件与转录、细胞骨架、代谢、信号途径和染色质改型有关,而下调的基因无特异性分布。

1.6.2 与重编程有关的表观遗传修饰 Taranger等<sup>[31]</sup>和Freberg等<sup>[32]</sup>发现人类癌细胞NCCIT的细胞提取物可引起293T细胞表观遗传组和转录组的重编程,使其具有胚胎干细胞的功能。利用亚硫酸氢盐测序法和快速定量Q<sup>2</sup>ChIP分析后发现细胞提取物可引起Oct4和Nanog启动子的去甲基化,同时这些启动子的组蛋白修饰也有所改变。

重编程细胞表达谱的改变说明DNA和组蛋白发生了表观修饰;首先,重编程细胞的DNA发生了变化,如癌细胞提取物可以引起上皮细胞中Oct4和Nanog的表达。Taranger等研究发现Oct4末端的增强子区域去甲基化;Freberg等通过Oct4调节座位分析证实了DNA的去甲基化,然而去甲基化是不完全的,并不是Oct4所有的区域均等地去甲基化,这与在胚胎干细胞和癌细胞中的不同。另外,Nanog的启动子也易于去甲基化。然而基因启动子的去甲基化如何在重编程细胞中发生还需要进一步探讨。其次,重编程细胞的组蛋白也发生了修饰,Freberg等还发现:用癌细胞提取物处理上皮细胞同时引起Oct4启动子/增强子上组蛋白3赖氨酸9(H3K9)的乙酰化程度提高,以及H3K9的去甲基化、组蛋白3赖氨酸4(H3K4)的二、三甲基化等,与正常细胞在基因转录激活过程中发生的现象一致。

另外,研究人员已找到一些方法可诱导重编程细胞向中胚层和外胚层系的细胞类型分化。用视黄酸处理重编程细胞后会引起Oct4重新甲基化从而导致Oct4表达下调,且同时导致laminA和nestin的表达升高,并可诱导神经祖细胞的产生。Taranger等用ad hoc试剂刺激促进重编程细胞向脂肪细胞、成骨细胞、内皮细胞的分化。Collas实验室已经完成了经癌细胞提取物处理过的人类细胞表观遗传图谱,目前正致力于研究重编程细胞经移植后的生长状况<sup>[21]</sup>。虽然体细胞介导的重编程已在体外取得了一定成果,但在体内尚未有充足的证据来证实,还需科研工作者进一步研究。

## 2 前景与展望

利用细胞提取物介导的重编程,使诱导重编程的分子能够直接的进入细胞内部,且不需要提前掌握细

胞融合的调节机制,从而使重编程更为有效。在体外,重编程可以应用于一系列的细胞类型包括胚胎干细胞、成体干细胞、原代细胞等等。因此这项技术可以为再生医学生产替代细胞。另外,它不像细胞核移植需要利用卵母细胞,且作为重编程材料的多能性细胞容易大量获得,从而避免了有关克隆人和从人类胚胎中产生胚胎干细胞所引起的伦理道德和法律问题。

细胞提取物可作为研究细胞核重编程机制的工具。尽管已经知道与表观遗传事件相关的特定基因<sup>[33]</sup>,但由于不了解其分子机制,细胞分化和细胞重编程为各种不同细胞类型的效率注定会受到限制。而细胞提取物可诱导转分化、去分化以及干细胞分化等使其成为分析细胞核重编程机制非常有用的工具。细胞提取物的成分可以增减,同时可以通过分馏法确定对多能性建立以及分化调节起关键作用的因子。另外,也可以通过细胞提取物、无细胞系统处理细胞核或染色质<sup>[34,35]</sup>,为直接操纵染色质和表观遗传组提供可能。充分理解细胞核重编程的机制不仅可以更好的理解分化、去分化、克隆以及干细胞的生物学,而且对研究危及生命的疾病(如癌症、发育缺陷等)中出现的异常程序的机制有重要意义。

虽然利用细胞提取物介导的细胞重编程技术具有诱人的应用前景,但用来为再生医学生产治疗用的替代细胞仍需要进一步的研究。这种方法涉及到大量细胞的处理,需要确保在此过程中被处理细胞的遗传性状没有发生变化,细胞暴露在重编程细胞提取物之前和之后细胞遗传性状有没有发生变化,以及如何设计出最适的细胞培养系统来选择目标细胞类型,或快速将细胞转移到合适的宿主环境中。所有的这些因素都会影响重编程细胞表型的稳定性。

细胞重编程应用于治疗还有很长的路要走,许多基础问题还需要进一步的研究。例如,哪种类型的供体细胞最容易引起表观遗传的改变?在重编程细胞中表观遗传调节转变的程度如何?组织内环境(如细胞外基质、细胞和细胞的接触)在重编程细胞基因表达中起什么作用?重编程细胞的功能稳定性如何?为什么在一个器官中一部分细胞可以转分化而其余的大部分却不能(如部分的肝细胞可转化成为胰腺细胞)?完全的转分化对治疗是必须的,还是仅仅部分的转分化就已经足够?

另外,将细胞提取物介导的细胞重编程用于肿瘤研究将别有一番前景,我们实验室提出一种新的肿瘤

发生机制,认为肿瘤是因为细胞之间发生交换而产生。为了证明这种肿瘤发生机制的正确性,需要有力的证据来说明。目前我们已经取得了一定的成果,正准备利用这种方法,通过调节细胞提取物的成分,找出细胞之间交换的具体因子,从而明确引起肿瘤发生的具体物质,进行肿瘤的靶向治疗。

### 参考文献(References)

- [1] Wilmut I *et al.* *Nature*, 1997, **385**: 810
- [2] Miller RA *et al.* *Cell*, 1976, **9**: 45
- [3] Tada M *et al.* *Dev Dyn*, 2003, **227**: 504
- [4] Tada M *et al.* *Curr Biol*, 2001, **11**: 1553
- [5] Takahashi K *et al.* *Cell*, 2006, **126**: 663
- [6] Yamanaka S *et al.* *Nature*, 2007, **448**: 313
- [7] Jaenisch R *et al.* *Nat Biotechnol*, 2007, **25**: 1177
- [8] Takahashi K *et al.* *Cell*, 2007, **131**: 861
- [9] Yu J *et al.* *Science*, 2007, **318**: 1917
- [10] Hanna J *et al.* *Science*, 2007, **318**: 1920
- [11] Aoi T *et al.* *Science*, 2008, **321**: 699
- [12] Chen S *et al.* *J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 410
- [13] Ding S *et al.* *Nat Biotechnol*, 2004, **22**: 833
- [14] Wu X *et al.* *J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 1590
- [15] Wu X *et al.* *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 14520
- [16] Bartel DP. *Cell*, 2004, **116**: 281
- [17] Wienholds E *et al.* *FEBS Lett*, 2005, **579**: 5911
- [18] Lim LP *et al.* *Genes Dev*, 2003, **17**: 991
- [19] Krützfeldt J *et al.* *Nature*, 2005, **438**: 685
- [20] Boyer LA *et al.* *Cell*, 2005, **122**: 947
- [21] Collas P *et al.* *Trends Biotechnol*, 2003, **21**: 354
- [22] Landsverk HB *et al.* *EMBO Rep*, 2002, **3**: 384
- [23] Häkelien A M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **316**: 834
- [24] Häkelien A M *et al.* *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 460
- [25] Gaustad K G *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **314**: 420
- [26] Qin M *et al.* *Stem Cells*, 2005, **23**: 712
- [27] Tamada H *et al.* *Mol Cell Biol*, 2006, **26**: 1259
- [28] McGann CJ *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 13699
- [29] Hansis C *et al.* *Curr Biol*, 2004, **14**: 1475
- [30] Häkelien AM *et al.* *Exp Cell Res*, 2005, **309**: 32
- [31] Taranger CK *et al.* *Mol Biol Cell*, 2005, **16**: 5719
- [32] Freberg CT *et al.* *Mol Biol Cell*, 2007, **18**: 1543
- [33] Simonsson S *et al.* *Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 984
- [34] Kikyo N *et al.* *Science*, 2000, **289**: 2360
- [35] Sullivan EJ *et al.* *Biol Reprod*, 2004, **70**: 146

## Reprogramming Somatic Cells into Stem Cells Using Cell Extract

Hui Liu, Jiang Li, Xin-Yuan Liu, Qi-Jun Qian\*

(Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract** Extensive investigation demonstrated that terminally differentiated somatic cells can be reversely reprogrammed into a pluripotent state, which obviates ethical concerns and legal restriction in embryonic stem (ES) cell research and ignites reborn enthusiasm on reprogramming for patient-specific pluripotent cells and regenerative medicine. This paper primarily elucidates reprogramming principle mediated by cellular extracts and its applicative prospect as well as cutting edge approaches of somatic cell reprogramming, including nuclear transfer into oocyte, cellular fusion between somatic cells and ES cells or embryonic carcinoma (EC) cells, ectopic expression of transcription factors and coculture of somatic cells with extracts from oocytes, ES cells or multipotent cancer cells.

**Key words** reprogramming; cellular extract; transdifferentiation

Received: April 23, 2008 Accepted: June 10, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671402)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-35030677, Fax: 86-21-35030677, E-mail: qianqj@163.com