

# 淀粉样蛋白沉积疾病在细胞水平的研究进展

宋有涛\* 张慧丽 官雅楠

(辽宁大学生命科学学院, 沈阳 110036),

**摘要** 近些年的研究表明许多神经退行性疾病都与受累组织和器官中的错误折叠蛋白积聚成淀粉样纤维有关。现结合作者在国内外对于该领域 10 余年的研究经历及研究成果, 针对淀粉样蛋白沉积疾病在细胞内的形成机制、致病机制及调控机制进行阐述, 展现了国际上过去几年中对蛋白质错误折叠和积聚的新认识。

**关键词** 淀粉样蛋白沉积; 错误折叠; 积聚; 分子伴侣

迄今在全球已发现了大约 20 多种蛋白质沉积疾病, 例如阿尔茨海默病、帕金森病、II 型糖尿病、疯牛病和亨廷顿病等, 其中很大一部分具有高度的致死性, 它们共同的特征是体内或体外淀粉样蛋白积聚体的积累和沉积<sup>[1]</sup>。虽然积聚物的主要成分是特定肽段或蛋白质, 且肽段或蛋白质类型因疾病不同而不同(表 1), 但它们形成毒性积聚体的趋势是相同的。除了已知的淀粉样疾病外, 许多未知疾病也可能与一些蛋白质在细胞内外积聚成淀粉样纤维有关。因此, 最近的观点认为, 对蛋白质错误折叠和积聚分子机制的认识能够阐明淀粉样蛋白沉积疾病的分子特性, 并期望以此来阐明更多相关疾病的病理学分子基础和生化基础。

## 1 淀粉样蛋白沉积疾病形成机制

淀粉样蛋白沉积疾病的共同特征是在细胞内出现纤维内含体或细胞外出现淀粉样积聚体, 其积聚的分子基础是: 蛋白质错误折叠、特定多肽链丢失或蛋白质不能形成天然紧密包装的三维结构, 因而形成富含  $\beta$  结构积聚物的趋势大大增强, 最终导致纤维状积聚物的形成<sup>[2,3]</sup>(图 1)。

### 1.1 利于蛋白质积聚及纤维形成的条件

引起淀粉样前体浓度增加的因素都能够引起沉积, 例如正确折叠和部分折叠分子间平衡的变化、侵袭蛋白表达水平的增加、突变、环境改变或蛋白质的稳定性降低等。特定的突变可以在动态上帮助未折叠或部分折叠单体积聚成早期的原纤维而增强积聚。例如, 阿尔茨海默病中 E22G 突变能促进原纤维的形成, 与帕金森病早发相关的  $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein)突变体也能有效地产生原纤维<sup>[4]</sup>。近期的

数据表明一般的物理特性改变都能影响未折叠或部分折叠多肽链的积聚<sup>[2,5]</sup>。例如特定突变的  $\alpha$ -突触核蛋白和 tau, 通过提高疏水值可以增强其积聚能力; 马心脏去铁肌红蛋白 N 端 1~29 片段在低 pH 条件下极易形成淀粉样纤维<sup>[6]</sup>。除此之外, 近来研究表明氧化损伤类脂膜也能够促进  $A\beta$  的积聚及纤维的形成<sup>[7]</sup>。如果有一个利于特定构象转变的模板, 一个天然折叠蛋白也可能错误折叠和积聚。例如朊病毒的积聚物能吸引天然折叠的蛋白质, 使其发生重折叠和积聚<sup>[8]</sup>。因此, 即使少量的积聚物也能通过个体间的传递而传播表型。

最后, 履行蛋白质折叠质量控制机制的损伤也有利于蛋白质积聚。质量控制能确保未折叠中间体被分子伴侣重新折叠或被泛素-蛋白酶体途径降解<sup>[2]</sup>。质量控制系统中任何组分的特定突变或热激、氧化应激和化学修饰等环境条件都将损伤机制组分或增加错误折叠与未折叠蛋白的数量, 从而导致系统不能负荷<sup>[2,3]</sup>。例如, 作者在研究中先后发现, 内质网中的分子伴侣钙连蛋白(calnexin)基因的剔除能抑制鸡溶菌酶淀粉样突变体 I55Q、D66H 在细胞内的降解<sup>[9]</sup>, 另一种分子伴侣 Eps1p 基因的剔除能抑制具有淀粉样倾向的鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin)在细胞内的降解, 而这两种分子伴侣的基因剔除对于正常的溶菌酶的表达却没有明显的影响<sup>[10]</sup>。另一方面, 正常环境下细胞蛋白通过 ATP- 依赖的泛素系统降解,

收稿日期: 2008-03-20 接受日期: 2008-06-12

国家自然科学基金(No.0600113)、辽宁省自然科学基金(No.20072055)和沈阳市科技局研究项目(No.1063305-1-00)资助

\* 通讯作者。Tel: 024-62202280, Fax: 024-81563139, E-mail: ysong@lnu.edu.cn

表1 主要淀粉样疾病及相关的蛋白质和肽段

临床症状	纤维组分
阿尔茨海默病	$\beta$ 淀粉样蛋白(A $\beta$ )肽段(1~40, 1~41, 1~42, 1~43), Tau
海绵状脑病	朊病毒(全长或片段)
帕金森疾病	$\alpha$ -突触核蛋白(野生型或突变型)
额颞痴呆	Tau (野生型或突变型)
家族性 Danish 痴呆	Adan 肽
家族性 British 痴呆	Abri 肽
淀粉样变的遗传性脑出血	半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (-10 残基的片段), A $\beta$ 肽
肌萎缩性(脊髓)侧索硬化	超氧化物歧化酶(野生型或突变型)
亨廷顿病	亨廷顿蛋白(谷氨酰胺重复延伸)
小脑性共济失调	Ataxins (谷氨酰胺重复延伸)
Kennedy 疾病	雄激素受体(谷氨酰胺重复延伸)
原发性全身性淀粉样变性	Ig 轻链(全长或片段)
继发性系统性淀粉样变性病	血清淀粉样蛋白 A (片段)
家族性地中海热	血清淀粉样蛋白 A
老年全身性淀粉样变性	甲状腺素转运蛋白(野生型或片段)
家族性淀粉样多发性神经疾病 I	甲状腺素转运蛋白(超过 45 种变异体或片段)
血液相关淀粉样疾病	$\beta$ 2- 球蛋白
家族性淀粉样多神经病 III	载脂蛋白 A-1 (片段)
II 型糖尿病	胰岛淀粉样多肽(片段)
甲状腺管道样癌	心房钠尿因子
溶菌酶系统性淀粉样疾病	溶菌酶(全长, 突变)
胰岛素相关淀粉样	胰岛素(全长)
人纤维蛋白原 $\alpha$ 链淀粉样疾病	人纤维蛋白原( $\alpha$ 链变异体和片段)

其中也包含 26S 蛋白酶体, 它随年龄增长活性减弱, 这也是许多神经变性疾病形成的因素<sup>[7]</sup>。

## 1.2 淀粉样纤维具有共同的结构特性

在不稳定的条件下, 一个蛋白质或肽段经过寡聚体、纤维状积聚前体及原纤维或原丝, 最终形成成熟纤维。虽然形成积聚物的蛋白质和肽段在结构上有很大不同, 但形成的淀粉样纤维却有共同的结构特性。由于积聚体不可溶、不能结晶, 并且分子量很大, 用常规的技术手段如核磁共振(NMR)和 X 射线衍射来研究其结构非常困难。近几年发展起来的固相 CD、傅里叶红外、原子力显微镜、低温电子显微镜、固相 NMR 和氘气交换技术可以提供更加细准确的纤维结构<sup>[11]</sup>, 典型的淀粉样纤维是直线状、无分支、6~12 nm 宽, 由许多直径 1.5~2.0 nm 的初级丝彼此扭成绳状结构, 其具有一个有序分子间交叉的  $\beta$  片层(cross  $\beta$ -sheet)结构核心, 每一个单体提供一对  $\beta$  折叠在此形成原纤维<sup>[2]</sup>。

目前, 在应用研究领域关注的是形成成熟纤维中间体的结构特性同毒性之间的关系。过去几年的研究表明具有致病作用的主要是不稳定的单体、寡聚体、形成成熟纤维前的原纤维。原纤维在临床症状表现之前就出现在组织中, 因此解释了淀粉样沉积物的含量与临床症状严重度之间无太大关联的疑

惑<sup>[12]</sup>。早期的原纤维为线性积聚物, 它缺少确定的二级结构, 是由单体添加在端部形成的<sup>[13]</sup>, 能自发形成链和不同大小的包含有一个中心孔的小“环状物(doughnuts)”, 然后进一步能形成原丝和成熟纤维<sup>[2,14]</sup>, 而原丝有明确的  $\beta$  折叠结构, 与原纤维的区别在于结构特性不同, 后者与完全成熟的纤维结构更相似, 一些研究者仅用原丝表示纤维的结构亚单位, 依赖于纤维而存在<sup>[13]</sup>。

## 1.3 目前解释淀粉样蛋白纤维形成过程的模型

蛋白质或肽段形成成熟淀粉样纤维是极其复杂的过程, 通常包括无定形积聚体、纤维、中间体, 多种构象状态和许多丝状体间形成的动态竞争<sup>[15]</sup>。目前有许多模型可以解释这个过程。

通过纤维形成动力学实验, 以 Axelsen 为代表的研究团队提出了两种基本模型<sup>[16]</sup>: 成核聚合作用(nucleation-dependent polymerization, NDP)和扩散限制积聚(diffusion-limited aggregation, DLA)。

其中 NDP 模型能够解释诸多的动力学数据, 它将纤维形成过程分成两个阶段, 成核阶段(停滞期)和延伸阶段(生长期)<sup>[17,18]</sup>。Murphy<sup>[13]</sup>也提出相似模型, 纤维形成过程分为纤维起始和纤维生长两个阶段。前一阶段是通过(1)单体动力或热力上的不利转变成“核”, (2)转化成淀粉样蛋白构象的两个单体间的碰



撞,或(3)单体结合成非结构寡聚体,然后转变成结构完整的寡聚体。后一阶段通过(1)非淀粉样单体加入到已存在的积聚体中,然后构象转变,(2)淀粉样单体自联成结构完整寡聚体和大的积聚体,或(3)寡聚体联合成大的积聚体,在丝的侧面尾对尾形成短纤维,最终形成一束成熟纤维。

DLA模型能够解释A $\beta$ 肽段自联动力学过程。肽段单体能自发地形成八聚体,然后堆积成纤维,纤维延伸是通过短纤维扩散限制的尾对尾作用完成,这个模型考虑到纤维长度增长的时间依赖性,但是它是在假定了单体全部转变成寡聚体的情况下,而事实上并不完全是这样<sup>[16]</sup>。

其他模型还有模板装配(template assembly, TA)、单体定向转变(monomer-directed conversion, MDC)和成核构象转变(nucleated conformational conversion, NCC)。这些模型一般认为肽段有两种结构不同的状态即可溶状态(S)和装配活性状态(A)。TA模型认为S状态单体在速率决定阶段转变成A状态然后与A状态核结合生长,进而形成丝和纤维;MDC模型指出S状态单体限速转变成聚合形式,进而形成可逆的AS二聚体;而NCC模型认为寡聚中间体能与核结合,发生构象上的转变<sup>[19]</sup>。

## 2 淀粉样蛋白沉积疾病的致病机制

在蛋白质沉积疾病中,至少在神经变性疾病中,临床症状最终归结于淀粉样积聚体对细胞的毒性效应(淀粉样蛋白假说)<sup>[20]</sup>(图1)。在外周淀粉样变性病中发现大量的积聚物,它们通过阻止营养素的流动而损伤组织功能<sup>[21]</sup>。

近年来,提出了纤维形成中间体的核心作用。研究表明早期的积聚物,如可溶的寡聚体和原纤维,在淀粉样紊乱病理效应中起促进作用<sup>[21,22]</sup>。许多研究表明这些积聚物是真正的毒性种类,而成熟纤维毒性较小<sup>[2]</sup>。我们所进行的酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]的实验结果进一步证明<sup>[23]</sup>,这种原纤维在细胞内具有一定的数量平衡,并具有较强的SDS抗性,分子质量在600~4 000 kDa之间。

许多研究表明淀粉样寡聚体有膜通透性,其毒性与膜透性和细胞内钙浓度的增加有关。淀粉样蛋白和肽段例如A $\beta$ 肽段、PrP<sup>sc</sup>、 $\alpha$ -突触核蛋白和聚谷氨酰胺片段(poly-Q)都能在膜上形成分离的小孔或单通道而引发毒性,其机制可以用“通道假设”来解释。淀粉样寡聚体的膜通透性和细胞内钙浓度的增

加能够引起其他病理途径,包括产生活性氧(ROS),改变信号途径和线粒体异常,进而导致自噬作用和细胞死亡<sup>[24]</sup>。

此外,淀粉样原纤维积聚体能够通过一种与特定四级结构相关的细胞死亡机制发挥其毒性效应,而与多肽链序列,长度及氨基酸手性无关,这些毒性积聚物可能与膜脂质相互作用,其毒性程度取决于细胞膜的组成<sup>[25]</sup>。此外,在许多神经变性疾病例如阿尔茨海默病和帕金森病中,引发细胞死亡的根本机制之一是金属的错误调节增加氧化还原敏感金属的浓度,从而催化活性氧簇的形成,使蛋白质变性、积聚<sup>[7]</sup>。

## 3 淀粉样蛋白沉积疾病调控机制

既然淀粉样蛋白沉积疾病的分子基础主要是蛋白质或肽段错误折叠,因此确保蛋白质正确折叠的质量控制机制,包括细胞质和内质网中分子伴侣和泛素-蛋白酶体途径具有重要作用。

在多肽链合成中,分子伴侣能够避免蛋白质与蛋白质之间不正确相互作用来帮助天然蛋白维持其功能构象。我们在之前的研究中已经证明了细胞质中的Ssa1p(Hsp70家族)对酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]的积聚与繁殖的调控作用——通过调控病毒聚集体的裂解,限制朊病毒寡聚体作为“种子(seeds)”在胞质内繁殖积聚物的能力<sup>[23]</sup>。辅助分子伴侣主要是通过改变分子伴侣底物结合能力来作用,例如,在我们的研究中发现辅助分子伴侣Stilp能激活Ssalp促进底物结合,而Stilp的缺失则促进了朊病毒[PSI<sup>+</sup>]繁殖。相反,缺失Feslp(Ssalp的核苷酸交换因子)能帮助Ssalp的底物释放,减弱朊病毒的聚集与繁殖<sup>[26]</sup>(图2)。另外,近期研究表明在阿尔茨海默病、帕金森病和亨廷顿病中,Hsp70能阻止神经元变性。例如,Hsp70可以抑制MPP<sup>+</sup>诱导的A $\beta$ 表达,加速其降解,因此减少A $\beta$ 的数量从而阻止其积聚<sup>[27]</sup>。

分子伴侣另一方面的作用,表现在参与对未正确折叠的成熟蛋白清除上,也就是所谓的质量控制功能。例如,我们在研究中发现,分子伴侣Eps1p(PDI家族中唯一的一个内质网中的跨膜蛋白)对于含有二硫键的淀粉样半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin)的表达具有重要的质量控制作用<sup>[10]</sup>。同样,另一种内质网膜上的分子伴侣钙连蛋白也表现出对于糖基化淀粉样鸡溶菌酶突变体D66H/G49N的高度严格的质量控制作用<sup>[9]</sup>。除了细胞内质网上的质量控制,在细胞膜或细胞外空间中也存在着分子伴侣的质量控制,包

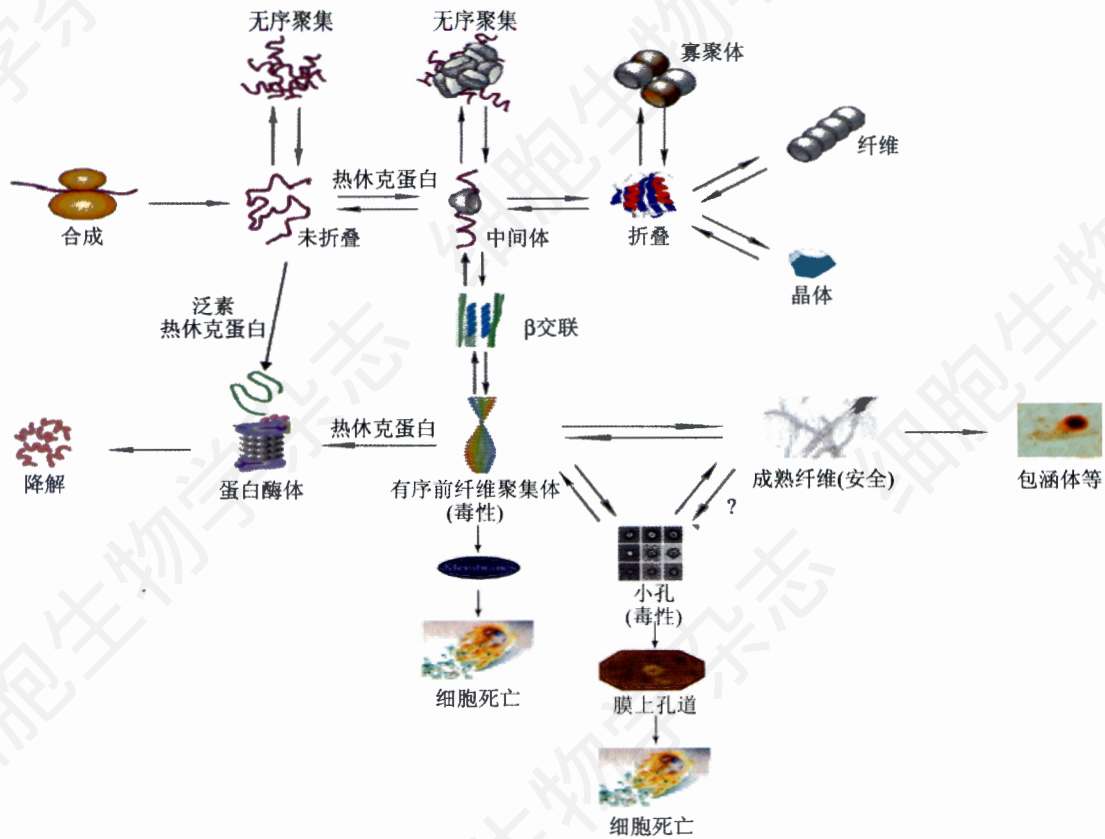


图1 淀粉样蛋白沉积疾病机制<sup>[2]</sup>

蛋白质结构或条件的改变有助于蛋白质间相互作用形成纤维或晶体。条件的不稳定增加了部分折叠分子的数量,在正常条件下,它们能够通过分子伴侣重新折叠或被泛素-蛋白酶体机制清除。这些机制的损伤或错误折叠蛋白数量超过其负荷,会产生无序积聚物或开始积聚途径。原纤维组装成淀粉样小孔直接与淀粉样蛋白的细胞毒性有关,它们能够与细胞膜相互作用,触发细胞死亡。产生原纤维的过程主要与细胞损伤有关,分子伴侣通过帮助错误折叠蛋白正确折叠或被蛋白酶体降解可以阻止原纤维的出现。

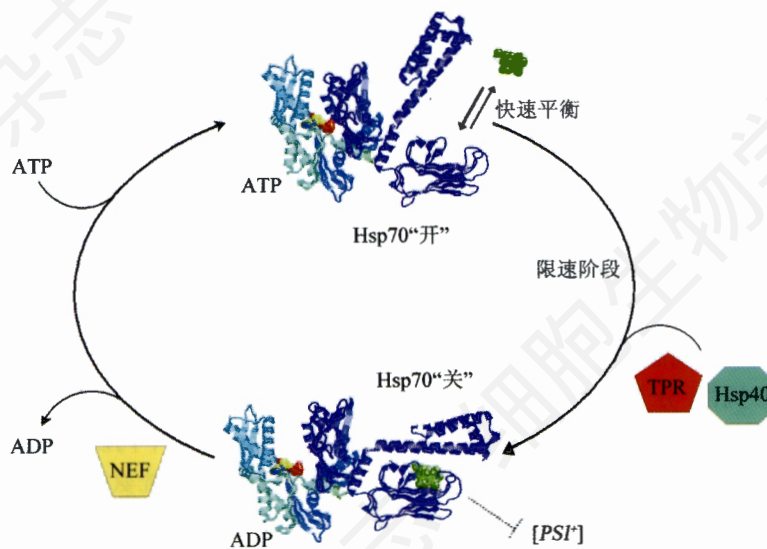


图2 Hsp70对酿酒酵母肌蛋白作用及辅助分子伴侣调节Hsp70(Ssa1p)反应循环<sup>[26]</sup>

ATP水解和核苷酸交换能调节Hsp70功能,进而调节底物结合。Hsp40(Ydj1p, Sis1p)和TPR(Sti1p)能够刺激ATP水解,促进底物的结合,而NEF(Fes1p)能够加速ADP的释放和核苷酸交换,从而促进底物的释放。数据表明,增强Hsp70到ADP结合状态的变化或稳定这种状态能够损害[PSI<sup>+</sup>]的繁殖。NEF: nucleotide exchange factor, 核苷酸交换因子; TPR: tetratricopeptide repeats。



括蛋白酶 IDE, 它能够消化处于单体或积聚物水平的 A $\beta$  和其他积聚物前体。在细胞外液中也有大量分子伴侣存在, 例如丛生蛋白, 对细胞外蛋白质沉积控制起重要作用<sup>[2]</sup>。

除了分子伴侣还可以利用蛋白酶体的降解作用来避免蛋白质积聚。这两种机制在功能上也是相互关联的, 已发现有几种组分不仅能参与底物蛋白折叠也与降解有关。哺乳动物 Hsp70 分子伴侣的双重作用很好地证明了这点。当与 Hsp40 结合时能够促进折叠, 而当与 Bag-1 和 CHIP 结合时, 能够促进底物蛋白降解<sup>[2]</sup>。

另外, 细胞内含有其他机制能够阻止蛋白质错误折叠形成纤维化积聚物, 例如糖基化。细胞内糖基化机制的缺失会导致蛋白质形成淀粉样纤维<sup>[28]</sup>。另外, 我们的研究表明<sup>[29]</sup>, 在细胞内对于溶菌酶和鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂的淀粉样突变体的糖链的附加可以有效地抑制该蛋白质形成淀粉样纤维, 从另一个角度证明了这一点。

#### 4 淀粉样蛋白沉积疾病可能更加频繁

过去几年对蛋白质积聚和累积毒性分子基础和发生率进行了大量研究, 重新评价了这个话题生物学和药学的重要性以及它们早期的毒性积聚物分子机制的生物学重要性。

人类蛋白质沉积疾病发病率增长与人类寿命增长有关, 尤其是在发达国家。因此可以想像除了已知的淀粉样疾病外, 由淀粉样积聚物的出现而产生变异疾病的数量也会增加。事实上, 越来越多变性疾病的淀粉样基础已经被提出(表 2)。由于蛋白质积聚在医学和生物学中是比较普遍的过程, 因此除了提供生物机能外, 蛋白质本身也具有不利的一面, 对细胞有种潜在的毒性作用。因此生物进化必须要控制蛋白质, 利用其所有可能的益处而减少它们的聚合和毒性潜能。

事实上, 生物的进化已经成功达到这个要求了, 蛋白质和肽段错误折叠引起的淀粉样疾病已经非常有限。但是, 有观点表明任何少量的干扰因子都可能提高蛋白质聚合能力, 说明了蛋白质沉积疾病比以前更为广泛。事实上, 近期关于人类基因组序列变异性的数据统计其外显子包括大约 60 000 单个核苷酸多形物, 使得上述观点具有更高的可能性<sup>[30]</sup>。至少一些变异体能够转变折叠和错误折叠分子间的平衡而增加了后者的浓度。过去几年的研究都支持这

表 2 其他的淀粉样蛋白沉积疾病

疾病	聚集蛋白
慢性肺病	表面活性蛋白 C
视网膜营养不良	视紫质
白内障(散发/先天性)	$\gamma$ 晶体蛋白
家族性角膜淀粉样疾病	乳铁蛋白
遗传性角膜营养不良	$\beta$ ig-h3
晶格角膜营养不良	角质上皮素
假鳞片样脱皮	?
遗传眼脑病	?
眼咽的肌营养不良	PAPB2
散发性包含体肌炎	APP, A $\beta$
动脉粥样硬化	LDL/ApoB100
FENIB	神经抑丝酶
DFNA9	cochlin

FENIB: familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies, 神经抑丝酶包涵体家族性脑病; DFNA9: autosomal dominant non-syndromic sensorineural hearing loss, 常染色体显性遗传非综合征性耳聋。

个观点: 很多分子起源不明的变性疾病(无论是散发的还是家族的)和多种类型癌症都可看成是淀粉样疾病或是与淀粉样相关的疾病。这样的信息对于发展治疗措施具有很大的价值, 基于已知淀粉样疾病蛋白和肽段的积聚机制, 可以了解更多相关疾病的病理学分子基础和生化基础, 对它们的治疗也与治疗已知淀粉样疾病的方法相同。

#### 参考文献(References)

- [1] Muchowski PJ *et al.* *Nat Rev Neurosci*, 2005, **6**: 11
- [2] Stefani M. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1739**: 5
- [3] Stefani M *et al.* *J Mol Med*, 2003, **81**: 678
- [4] Pellarin R *et al.* *J Mol Biol*, 2007, **374**: 917
- [5] Chiti F *et al.* *Nature*, 2003, **424**: 805
- [6] Picotti P *et al.* *J Mol Biol*, 2007, **367**: 1237
- [7] Crichton RR *et al.* *Coordin Chem Rev*, 2008, **252**: 1189
- [8] Prusiner SB. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 13363
- [9] Song Y *et al.* *FEBS Lett*, 2002, **512**: 213
- [10] He J *et al.* *FEBS Lett*, 2005, **579**: 2277
- [11] 胡红雨等. *科学通报*, 2007, **52**: 129
- [12] Hartley D *et al.* *J Neurosci*, 1999, **19**: 8876
- [13] Murphy RM. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1768**: 1923
- [14] Lashuel HA *et al.* *J Mol Biol*, 2002, **322**: 1089
- [15] Wang W. *Int J Pharm*, 2005, **289**: 1
- [16] Gorbenko GP *et al.* *Chem Phys Lipids*, 2006, **141**: 82
- [17] Liu L *et al.* *J Mol Biol*, 2008, **377**: 1236
- [18] 胡红雨. *科学通报*, 2000, **45**: 1905
- [19] Kelly JW. *Nat Struct Biol*, 2000, **7**: 824
- [20] Dobson CM. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001, **356**: 133
- [21] Pellarin R *et al.* *J Mol Biol*, 2007, **374**: 917
- [22] Haass C *et al.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8**: 101
- [23] Song Y *et al.* *Eukaryot Cell*, 2005, **4**: 289
- [24] Glabe CG. *Neurobiol Aging*, 2006, **27**: 570

- [25] Pastor MT *et al. J Mol Biol*, 2008, **375**: 695  
[26] Jones G *et al. Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 3928  
[27] Fan G *et al. FEBS Lett*, 2006, **580**: 3091  
[28] Liang F *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **342**: 482  
[29] Song Y *et al. FEBS Lett*, 2001, **491**: 63  
[30] Sachidanandan R. *Nature*, 2001, **409**: 928

## The Progress in Amyloid Deposition Diseases at Cellular Level

You-Tao Song\*, Hui-Li Zhang, Ya-Nan Gong

(School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

**Abstract** Recent studies indicate that, a number of degenerative diseases are related to the presence of amyloid fibrils in the affected tissues and organs, which is caused by protein misfolding and aggregation. This review explains and discusses the new understandings, findings and progresses of protein misfolding and aggregation made by international scientists and researchers, integrated with author's 10-year research experiences and achievements. The mechanism of formation, pathopoiesis and regulation of the protein deposition disease *in vivo* is the main focus of this review.

**Key words** amyloid deposition; misfolding; aggregation; molecular chaperone

Received: March 20, 2008 Accepted: June 12, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.0600113), the Natural Science Foundation of Liaoning Province (No.20072055) and the Research Project of Science and Technology Administration of Shenyang (No.1063305-1-00)

\*Corresponding author. Tel: 86-62202280, Fax: 86-81563139, E-mail: ysong@lnu.edu.cn