

mtATPase6 基因变异与弱精子症的相关分析

金龙金 李传连 费前进¹ 张春玲 黄学锋¹ 楼哲丰²张李雅¹ 方可欣 凌雪梅 吕建新*(温州医学院生命科学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035; ¹温州医学院附属第一医院生殖医学中心, 温州 325001; ²温州医学院生物学实验中心, 温州 325035)

摘要 为了分析 mtATPase6 基因突变与弱精子症的相关性, 按 WHO 标准收集了 27 例弱精子症精液标本和 28 例精子活力正常精液标本, PCR 扩增 mtATPase6 基因, 纯化测序, 分析 mtATPase6 基因突变, 比较两组突变频率的差异。结合生物信息学工具分析错义突变位点的氨基酸进化保守性及其蛋白质部分三级结构。结果显示: 发现了 6 个未曾报道过的突变位点; 弱精子症组 mtATPase6 基因平均突变率显著高于对照组, 可能与弱精子症有一定的相关性。G8584A、A8701G 和 G9053A 三个错义突变可能是多态性位点, 其余 8 个错义突变中的 6 个具有进化保守性的位点累计突变频率显著高于对照组, 这些位点突变可能与弱精子症有关。

关键词 弱精子症; mtATPase6; 点突变; 进化保守; 三级结构

随着社会工业的不断发展, 不育夫妇的总发病率明显升高, 不孕症已经成为涉及全球各个国家和地区育龄夫妇的严重问题。2003 年, Hirsh^[1]报道, 在不孕的夫妇中有一半是因为男方的精子质量异常或性功能障碍所引起。精子质量下降可区分为精子密度降低和精子活力低下, 分别称为少精子症和弱精子症。临床上精子活力是衡量精子质量的重要指标之一, 按 WHO 标准, 将精子活力分为四级: a 级精子为快速前向运动精子, b 级精子为慢速前向运动精子, c 级精子为原地运动精子, d 级精子为静止精子。若 a 级 < 25% 且 (a+b) 级 < 50% 可诊断为弱精子症, 但引起精子活力降低的原因还不清楚。线粒体是细胞的供能中心, 也是精子活动主要能量来源。虽然组成线粒体呼吸链和氧化磷酸化代谢酶复合体的亚基中大多数由核基因编码, 但线粒体基因编码了呼吸链和氧化磷酸化 ATP 酶 4 个复合体中的 13 个亚基, 这 13 个亚基有 DN1~DN6、ND4L、COX1~COX3、Cytb、ATPase6 和 ATPase8。其中, mtATPase6 基因是编码 F₀F₁-ATPase 的第 6 亚单位, 主要构成质子通道, 参与线粒体氧化磷酸化过程, 与细胞能量代谢关系非常密切。近年来, 对线粒体基因缺失和点突变与弱精子症的相关研究越来越重视。Kao 等^[2, 3]报道发现精子 mtDNA 4 977 bp、7 345 bp 和 7 599 bp 片段缺失与精子活动力障碍有关, 缺失导致了线粒体 ATPase6、ATPase8、COX3、ND3、ND4L、

ND4、ND5、ND6、Cytb 基因和 8 个 tRNA 基因的缺失, 这些缺失基因中的哪个基因才是引起线粒体供能障碍的主要因素或者是综合作用结果需要进一步对单个基因缺失或突变进行研究。Spiropoulos 等^[4]对 1 名有 mtDNA A3243G 突变男性精子进行分析, 认为突变的程度和精子活动力降低程度有非常强的相关性。Holyoake 等^[5]在一个严重少精子男性精子中检测到 mtATPase6 T8821C 突变, 但这些突变与精子活力低下或少精子症是否相关还不能确定。目前, 国内外对是否存在其他可能与弱精子症相关的线粒体基因突变方面的报道还非常少。本研究采用序列分析法分析了 27 例弱精子症和 28 例正常对照的 mtATPase6 基因突变, 并结合生物信息学途径分析错义突变位点在不同物种间氨基酸进化保守性及其蛋白质三级结构预测, 试图探讨可能与弱精子症相关的 mtATPase6 基因点突变。

1 材料与方法

1.1 研究对象

弱精子症精液标本来自本校附属医院生殖医学

收稿日期: 2008-05-05

接受日期: 2008-06-17

浙江省自然科学基金(No. Y206582)和温州市科技发展计划项目(No. Y20060063)资助

* 通讯作者。Tel: 0577-86689805, E-mail: ljx@wzmc.net

中心,按世界卫生组织(WHO)精液参数标准,选取精子活动力低下(a级<25%且a+b级<50%)病例27例,平均年龄 30 ± 5 岁,a级和(a+b)级精子百分率分别为 7.88 ± 7.04 和 20.38 ± 13.09 。同时我们选取了28例精子活动力正常(a级>25%且a+b级>50%),平均年龄 32.2 ± 3.4 ,生殖系统无器质性病变正常男性作为对照,a级和(a+b)级精子百分率分别为 46.29 ± 12.32 和 60.20 ± 12.22 。所有标本采集前禁欲3天以上,手淫法采集精液标本, 37°C 液化20~30 min。

1.2 主要试剂

PCR扩增引物依据文献^[6],引物1上游序列:5'-ACGAGTACACCGACTACGGC-3'位于mtDNA 7908~7927,下游序列:5'-TGGGTGGTTGGTGTAATGA-3',位于mtDNA 8797~8816,扩增片段长908 bp;引物2上游序列:5'-TTTCCCCCTCTATTGATCCC-3'位于mtDNA 8602~8621,下游序列:5'-GTGGCCTTG-GTATGTGCTTT-3',位于mtDNA 9397~9416,扩增片段长815 bp,引物由宝生物工程(大连)有限公司合成;PCR聚合酶试剂、DNA片段纯化试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品;琼脂糖、Tris试剂为Promega公司进口分装;蛋白酶K为Merk公司的产品;Tris-饱和酚(pH 8.0)为上海生物工程技术有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 精子mtDNA的提取 已液化标本用PBS洗涤后的精子加精子裂解液(500 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 10% SDS, 20 mg/ml 蛋白酶K, 10 mmol/L DTT), 56°C 消化2 h,常规酚-氯仿法抽提精子基因组DNA,TE溶解。

1.3.2 PCR反应和产物鉴定 1 μl DNA模板,上游引物和下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.5 μl , 2 μl 2.5 mmol/L dNTP混合物, 1.5 μl 25 mmol/L MgCl_2 , 2.5 μl 10 \times PCR缓冲液(Mg^{2+} Free), 0.1 μl Taq酶,补充ddH₂O至25 μl 。反应体系在 94°C 预变性5 min后,按 94°C 变性30 s, 58°C 退火45 s, 72°C 延伸1 min程序共循环35次,最后 72°C 终末延伸8 min。扩增产物用1.5%琼脂糖电泳鉴定。

1.3.3 PCR产物的纯化和序列测定 按宝生物工程(大连)有限公司DNA片段纯化试剂盒说明书操作纯化PCR产物,纯化产物送上海基康生物技术有限公司进行正向测序。

1.4 数据分析

1.4.1 序列比对 测序返回结果用Gentle软件与Mitomap数据库(www.mitomap.org)上提供的人类线

粒体剑桥序列进行比对,发现可疑的变异位点后用ChormasPro软件读取测序结果峰图,进一步确认。将序列比对所发现的所有突变位点在Mitomap数据库中检索是否已报道过。

1.4.2 统计学分析 将序列比对结果进行统计分析,组间突变率的比较采用卡方检验,平均突变率的比较采用t检验,应用SSPS11.1软件进行分析。

1.4.3 氨基酸变异分析和氨基酸进化保守性分析 针对筛查到的变异位点,在Mitomap数据库中的Amino Acid Translation Tables查找氨基酸的相应改变。分析基因变异对应的氨基酸在不同物种之间保守性则通过在NCBI网站(www.ncbi.nih.gov)检索到人(*Homo sapiens*)、牛(*Bos taurus*)、小鼠(*Mus musculus*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)4种生物的线粒体基因组序列对应的mtATPase6氨基酸序列,利用BioEdit软件包分析对比,观察错义突变位点编码的氨基酸在4个不同物种之间的进化保守性。

1.4.4 蛋白质三级结构预测 mtATPase6跨膜区采用TMHMM软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行预测,参数采用默认设置。由于蛋白质的功能主要体现在三级空间结构上,我们采用基于同源建模原理的phyre(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>)软件对mtATPase6三级结构进行预测,参数采用默认设置,结果可视化过程在PdbViewer(<http://expasy.org/spdbv/>)软件中操作。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

经过PCR分别扩增出与mtDNA 7908~8816区域预期产物908 bp和mtDNA 8602~9416区域预期产物815 bp一致的目的片段。

2.2 测序比对和突变频率分析

测序结果与剑桥序列比对,两组55例精子标本共检测到mtATPase6基因20个位点的碱基突变,经在Mitomap数据库中查找发现6个突变位点未见报道过,分别是A8586G、C8811T、T8825C、T8966C、C9071T、A9120G突变(表1和图1)。mtATPase6基因平均突变率在两组间差异有统计学意义($P<0.05$),平均错义突变率组间差异无统计学意义($P>0.05$)(表2)。

2.3 mtATPase6单个位点错义突变频率分析及其氨基酸进化保守性分析

对mtATPase6基因单个位点错义突变频率较高的G8584A、A8701G、G9053A,突变频率在两组间

表1 mtATPase6 基因 20 个变异位点对应的氨基酸相关信息

突变位点	核苷酸变异	例数	氨基酸变异	保守性 H/B/M/X	是否报道过
8584	G-A	9	Ala-Thr	A/V/V/I	是
8586	A-G	1	Ala- Ala		否
8602	T-C	1	Phe-Leu(2)	F/F/F/D	是
8684	C-T	2	Thr-Ile	T/V/I/F	是
8701	A-G	26	Thr-Ala	A/S/L/Y	是
8793	T-C	3	Pro-Pro		是
8794	C-T	1	His-Tyr	H/H/H/Y	是
8811	C-T	1	Thr-Thr		否
8821	T-G	1	Ser(1)-Ala	S/S/S/S	是
8825	T-C	2	Met-Thr	M/M/M/L	否
8829	C-T	3	Asn-Asn		是
8856	G-A	3	Ala-Ala		是
8964	C-T	2	Thr-Thr		是
8966	T-C	1	Ile-Thr	I/I/I/I	否
9016	A-G	1	Ile-Val	I/I/I/L	是
9053	G-A	6	Ser(2)-Asn	S/G/G/T	是
9071	C-T	2	Ser(1)-Leu(1)	S/M/M/L	否
9090	T-C	5	Ser(1)-Ser(1)		是
9120	A-G	1	Leu(2)- Leu(2)		否
9180	A-G	2	Val-Val		是

保守性栏 H/B/M/X 分别指人/牛/小鼠/爪蟾, 该栏下的字母分别代表 4 种生物该位点氨基酸种类。

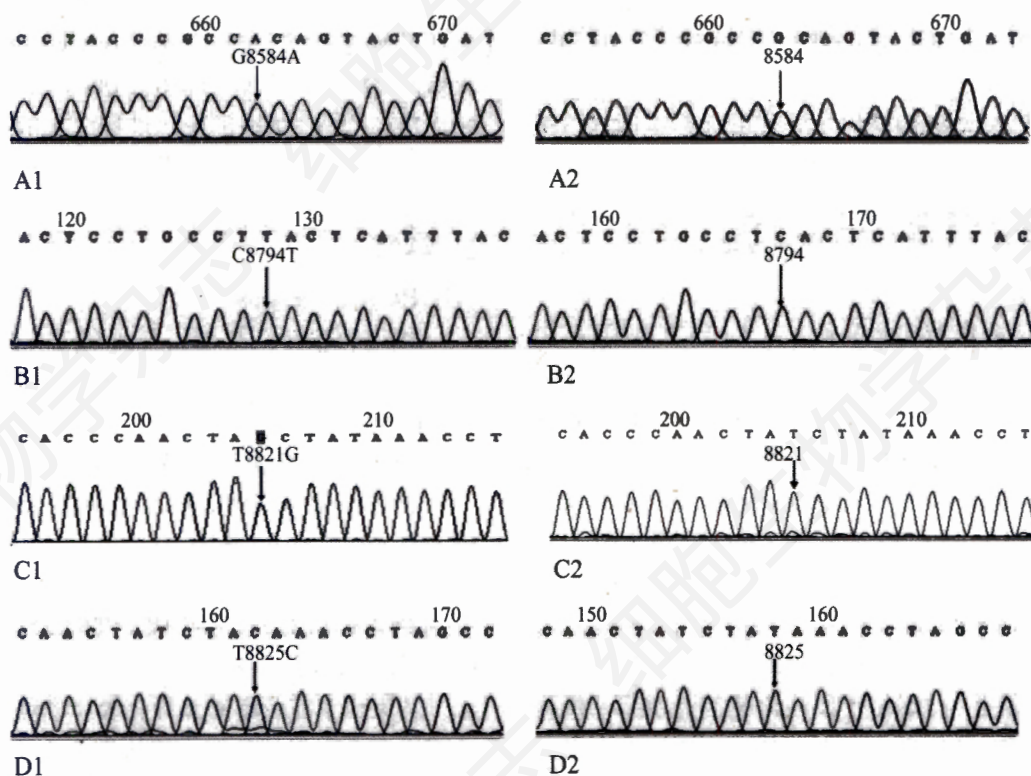


图1 mtATPase6 基因部分突变位点的测序峰图

A1: G8584A 突变、A2: 正常 8584 位点; B1: C8794T 突变、B2: 正常 8794 位点; C1: T8821G 突变、C2: 正常 8821 位点; D1: T8825C 突变、D2: 正常 8825 位点。

差异比较经卡方检验无统计学意义($P>0.05$) (表 3)。同时对这 3 个突变位点所编码的氨基酸进行保守性分析,结果显示在人、牛、小鼠和爪蟾这 4 种生物中不具有进化保守性(表 1 和图 2)。

根据上述分析, G8584A、A8701G、G9053A 这 3 个位点可能是多态性位点,剔除这 3 个位点后, mtATPase6 基因的其余 8 个错义突变因单个位点突变频率较低,两组间没有可比性。这 8 个突变位点的累计突变频率在弱精子症组和正常对照组分别为 37.04% 和 3.57%,经卡方检验比较在两组间差异具有统计学意义($P<0.01$) (表 4)。对这 8 个突变位点所编码的氨基酸进化保守性分析,除 nt 8684 和 nt 9071 位点所编码的氨基酸在所分析的人、牛、小鼠和爪蟾这 4 种生物中不具有进化保守性外, nt 8602、nt 8794、nt 8821、nt 8825、nt 8966 和 nt 9016 这 6 个位点所编码的氨基酸在所分析的人、牛、小鼠这 3 种生物中具有进化保守性,其中 nt 8821 和 nt 8966

位点所编码的氨基酸在所分析的人、牛、小鼠和爪蟾这 4 种生物中具有高度进化保守性,且具有进化保守性的 6 个位点累计突变频率在弱精子症组和正常对照组分别为 22.22% 和 3.57%,经卡方检验两组差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 mtATPase6 跨膜区预测和部分三级结构预测结果

尽管人类线粒体基因组只编码了 13 个蛋白质,但是大多数都还没有获得三级结构, mtATPase6 就是其中一个代表。本研究对其跨膜区的预测表明 mtATPase6 的结构为 6 次跨膜结构(图 3A);对三级结构的预测结果首次得到了一部分 mtATPase6 三级结构(包括 mtATPase6 的 59 到 152 位置)。观察这部分三级结构发现其主要由 α 螺旋和环(loop)组成,而 β 片层结构不存在。

有意思的是,本研究所检测到的 mtATPase6 基因 20 个突变位点所编码的 19 个氨基酸大部分都集中于 mtATPase6 的 6 个跨膜区。同时 Mitomap 数据库中检索到的 mtATPase6 基因突变位点所编码的氨基酸进行分析,也发现类似现象。我们分析的 nt 8602、nt 8794、nt 8821、nt 8825、nt 8966 和 nt 9016 这 6 个编码氨基酸进化保守性位点中, nt 8602、nt 9016 这 2 个位点的氨基酸不在可预测的三级结构

表 2 弱精子症组与正常对照组 mtATPase6 基因平均突变率和平均错义突变率的比较

	弱精子症组	对照组	P 值
平均突变率	1.52±0.98	0.96±0.84	<0.05
平均错义突变率	1.07±0.78	0.89±0.67	>0.05

表 3 mtATPase6 基因 20 个突变在弱精子症组和正常对照组中的分布

突变位点	核苷酸变异	弱精组		对照组		χ^2 值	P 值
		n=27	百分比 (%)	n=28	百分比 (%)		
8584	G-A Δ	5	18.52	4	14.29	0.1799	>0.05
8586	A-G	0	0	1	3.57		
8602	T-C Δ	1	3.70	0	0		
8684	C-T Δ	2	7.41	0	0		
8701	A-G Δ	12	44.44	14	50.00	0.1702	>0.05
8793	T-C	2	7.41	1	3.57		
8794	C-T Δ	1	3.70	0	0		
8811	C-T	0	0	1	3.57		
8821	T-G Δ	1	3.70	0	0		
8825	T-C Δ	2	7.41	0	0		
8829	C-T	2	7.41	1	3.57		
8856	G-A	2	7.41	1	3.57		
8964	C-T	1	3.70	1	3.57		
8966	T-C Δ	1	3.70	0	0		
9016	A-G Δ	0	0	1	3.57		
9053	G-A Δ	2	7.41	4	14.29	0.6691	>0.05
9071	C-T Δ	2	7.41	0	0		
9090	T-C	2	7.41	3	10.71		
9120	A-G	1	3.70	0	0		
9180	A-G	2	7.41	0	0		

Δ 为错义突变。

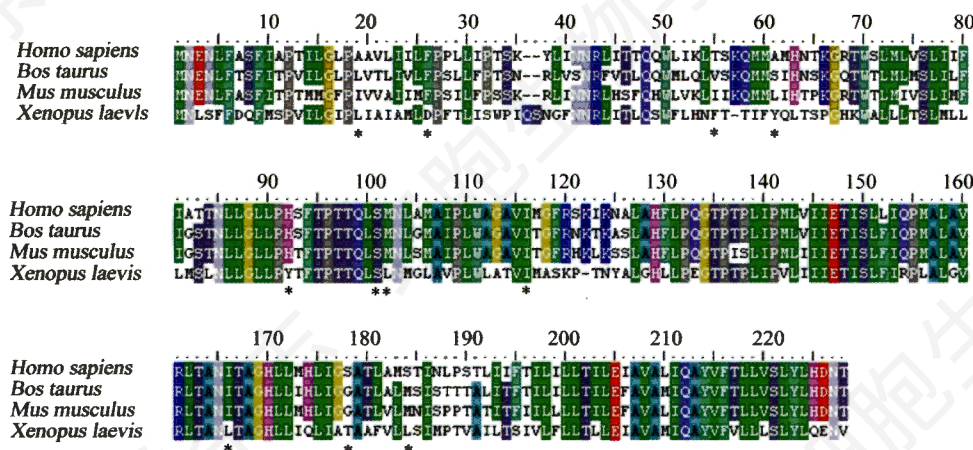


图2 mtATPase6 基因 11 个错义突变位点在 4 个不同物种间的氨基酸进化保守情况

从前到后“*”标出分别是 nt 8584、nt 8602、nt 8684、nt 8701、nt 8794、nt 8821、nt 8825、nt 8966、nt 9016、nt 9053 和 nt 9071 位点氨基酸进化保守性情况。

表 4 mtATPase6 基因 8 个错义突变在弱精子症组及正常对照中的分布

突变位点	核苷酸变异	弱精组		对照组		χ^2 值	P 值
		n=27	百分比 (%)	n=28	百分比 (%)		
8602	T-C Δ	1	3.70	0	0	0.0003	>0.05
8684	C-T Δ	2	7.41	0	0	0.5575	>0.05
8794	C-T Δ	1	3.70	0	0	0.0003	>0.05
8821	T-G Δ	1	3.70	0	0	0.0003	>0.05
8825	T-C Δ	2	7.41	0	0	0.5575	>0.05
8966	T-C Δ	1	3.70	0	0	0.0003	>0.05
9016	A-G Δ	0	0	1	3.57	0.0001	>0.05
9071	C-T Δ	2	7.41	0	0	0.5575	>0.05
合计		10	37.04	1	3.57	9.62	<0.01

Δ 为错义突变。

中, nt 8966 编码的氨基酸位置非常靠近可预测的三级结构的 C 端可能对预测的可靠性有影响, 因此我们只对 nt 8794、nt 8821、nt 8825 这 3 个位点的氨基酸突变引起 mtATPase6 部分三级结构的影响进行了预测, 结果在对 nt 8821 突变前后获得的三级结构进行比较时(比较方法采用 superposition), 发现其相应三级结构发生了非常明显的改变(图 3B~图 3D), 但 nt 8794、nt 8825 这 2 个位点的氨基酸突变前后 mtATPase6 三级结构没有发生变化。

3 讨论

Holyoake 等^[7]发现 2 个最常见的线粒体基因突变 9055 和 11719 在低活动力精子中发生率显著提高, 其中 9055 突变位于 mtATPase6 基因。Thangaraj 等^[8]在一例低活动力精子患者中通过对 mtATPase6 基因测序检测到 10 个单核苷酸替换, 其中 A8678C 突变为

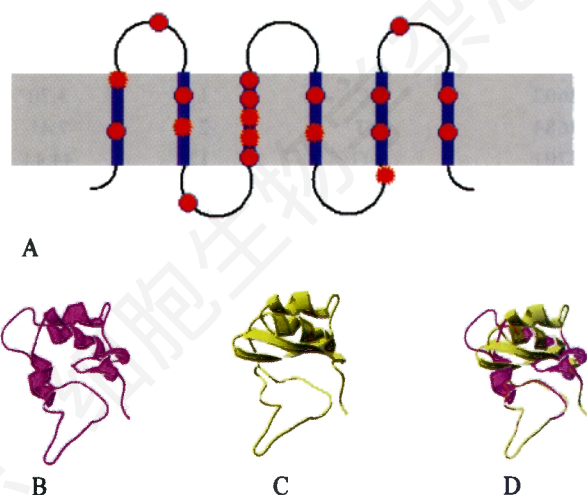


图 3 mtATPase6 跨膜示意图和部分三级结构示意图

A: mtATPase6 跨膜结构示意图, 其中跨膜区通过 TMHMM 软件预测获得; B: 正常情况下的部分三级结构示意图, 采用 phyre 软件预测获得; C: T8821G 突变后的部分三级结构示意图; D: B 和 C 叠加得到的结构示意图。

错义突变,而在血液细胞中没有发现核苷酸替换。在本研究中,我们用序列分析法对 27 例弱精子症和 28 例精子活动力正常对照精子 mtATPase6 基因序列进行了分析,共检测出 20 个位点的碱基突变,经在 Mitomap 数据库中查找发现 A8586G、C8811T、T8825C、T8966C、C9071T、A9120G 这 6 个突变未见报道过,其中 T8825C、T8966C、C9071T 这 3 个为错义突变,这些发现为线粒体基因突变研究丰富了资料。对在 mtATPase6 基因所检测出的突变率的比较,我们统计了 mtATPase6 基因平均突变率及其基因的平均错义突变率,对弱精子症组和正常对照组之间进行比较,mtATPase6 基因平均突变率具有统计学意义($P<0.05$),提示 mtATPase6 基因的突变率与弱精子症可能有相关性。从理论上讲错义突变对蛋白质的结构和功能可能产生影响,但统计结果 mtATPase6 基因平均错义突变率两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),我们推测可能是其中存在多态性变异位点并对统计结果产生了影响。

我们首先分析了 G8584A、A8701G、G9053A 这 3 个发生频率较高的错义突变位点,突变率两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),突变位点所编码的氨基酸在分析的 4 种生物中不具有进化保守性,这些结果提示这 3 个突变位点可能是多态性位点。如果这一推测成立,我们剔除这 3 个突变,将 mtATPase6 所检测出的其余 8 个错义突变率在两组间进行比较,由于单个位点的突变率都很低,两组间没有可比性。我们比较了两组间这些错义突变的累计发生频率,发现弱精子症组显著高于对照组,具有统计学意义($P<0.01$)。

当我们采用生物信息学工具分析这 8 个位点的错义突变在 4 种不同物种间的氨基酸进化保守性,发现 nt 8821、nt 8966 位点密码子编码的氨基酸在爪蟾、小鼠、牛、人具有高度进化保守性;nt 8602、nt 8794、nt 8825 和 nt 9016 位点所编码的氨基酸在所分析的人、牛、小鼠这 3 种生物中具有进化保守

性,但与爪蟾比较该位点氨基酸具有差异。从进化保守性角度推测,这 6 个位点对于蛋白质空间结构的形成和稳定,蛋白质功能的形成具有重要作用,其突变可能影响蛋白质空间结构和功能。Houstek 等^[9]对 1 个带有 mtATPase6 T8993G 突变的婴儿乳酸尿毒症家系的 3 个患者研究发现,培养的患者成纤维细胞 ATP 酶复合体发生组装的改变和结构的不稳定性,该位点氨基酸在爪蟾、小鼠、牛、人也具有高度的进化保守性。如果将进化不保守的 2 个位点剔除,6 个进化保守位点的累计突变发生频率在弱精子症组和正常对照组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$),因此我们推测:这 6 个位点的突变与弱精子症的发生可能存在一定的相关性,或者 6 个位点中某几个位点突变与弱精子症存在一定的相关性。我们进一步对 6 个进化保守位点中可预测三级结构的 3 个位点氨基酸突变对蛋白质三级结构的影响进行预测,发现 T8821G 突变引起的氨基酸变异使 mtATPase6 部分三级结构发生了非常明显的改变(图 3),该突变位点与 Holyoake 等^[5]在严重少精子症中发现的突变位点相同,同为错义突变但突变性质和突变后氨基酸变化不同,Holyoake 等同时进行了单精子细胞分析,发现在未成熟精细胞中有 7% 的突变而在成熟精子中未发现突变,他们认为 T8821C 突变使精细胞成熟障碍。由此我们认为 T8821G 突变在 6 个进化保守位点的错义突变中更值得关注。

参考文献(References)

- [1] Hirsh A. *BMJ*, 2003, 327: 669
- [2] Kao SH et al. *Biol Reprod*, 1995, 52: 729
- [3] Kao SH et al. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4: 657
- [4] Spiropoulos J et al. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8: 719
- [5] Holyoake AJ et al. *Andrologia*, 1999, 31: 339
- [6] Rieder MJ et al. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 967
- [7] Holyoake AJ et al. *Int J Androl*, 2001, 24: 175
- [8] Thangaraj K et al. *J Androl*, 2003, 24: 388
- [9] Houstek J et al. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1271: 349

Mutation Analysis of the mtATPase6 Associated with Asthenospermia Patients

Long-Jin Jin, Chuan-Lian Li, Qian-Jin Fei¹, Chun-Ling Zhang, Xue-Feng Huang¹,
Zhe-Feng Lou², Li-Ya Zhang¹, Ke-Xin Fang, Xue-Mei Ling, Jian-Xin Lu*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory for Medical Genetics, School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; ¹Reproductive Medicine Center, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325001, China;

²Central Laboratory of Biology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract This research attempted to investigate whether there was correlation between mtATPase6 point mutation in sperms and asthenospermia. After 27 asthenospermia cases and 28 control cases were collected under the WHO criterion, the regions of nt 7908–8816 and 8602–9416 of them were amplified by using PCR of two pairs primers. Consequently, the point mutation, mutation rate as well as evolutionary conservation pattern were analyzed by employing sequencing technology and bioinformatics tools. As a result, 20 point mutations were found, among which six had never been identified before: A8586G, C8811T, T8825C, T8966C, C9071T and A9120G. Meanwhile, a significant difference ($P < 0.05$) was detected in the average mutation rate between asthenospermia (1.52 ± 0.98) and control groups (0.96 ± 0.84), which suggests that a remarkable increase of mtATPase6 average mutation rate may correlate with asthenospermia in asthenospermia group. The three specific missense point mutation, namely, the G8584A, A8701G and G9053A, may be potential polymorphism. Besides, the differences between asthenospermia (22.22%) and control groups (3.57%) were statistically significant ($P < 0.05$) in terms of the cumulative mutation rates for the remaining six sites with evolution conservation, which may have the relationship with asthenospermia.

Key words asthenospermia; mtATPase6; point mutation; evolution conservation

Received: May 5, 2008

Accepted: June 17, 2008

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y206582) and Wenzhou Science & Technology Development Program (No.Y20060063)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689805, E-mail: ljx@wzmc.net