

氟他胺联合去雄激素环境诱导的雄激素非依赖性前列腺癌细胞模型的建立

许刚 毛易捷 陈兵华 何晶晶 陶志华* 林晓梅 陈占国 沈默

(温州医学院附属第一医院实验诊断中心, 温州 325000)

摘要 采用氟他胺联合去雄激素环境联合诱导培养的方法在体外建立一株雄激素非依赖性前列腺癌细胞系。倒置显微镜下观察细胞形态学变化;采用 CCK-8 法测定细胞生长率;流式细胞技术检测细胞周期和 Bcl-2、Bax 的表达变化。结果显示,第 1~20 代实验组细胞形态瘦长,第 30 代后细胞大部分呈扁平状,同时呈聚集生长,而对照组细胞形态始终呈长梭形;不同代数的实验组 LNCaP 细胞在氟他胺浓度为 5.0×10^{-6} mol/L 的去雄激素培养液中的细胞生长率总体呈上升趋势;氟他胺和去雄激素环境对实验组 LNCaP 细胞的细胞周期均无明显影响,而对照组 LNCaP 细胞的生长受氟他胺和去雄激素环境影响而受到抑制;实验组第 60 代 LNCaP 细胞 Bcl-2 平均荧光强度明显高于对照组,而 Bax 平均荧光强度与对照组间无显著差异。结果表明 LNCaP 细胞在氟他胺和去雄激素环境下能形成雄激素非依赖性前列腺癌细胞,这为其发病机制的研究提供了合适的实验对象。

关键词 雄激素非依赖性;氟他胺;前列腺癌;凋亡

近十多年来,随着人们生活方式的改变、寿命的延长及医疗保健和诊断水平的提高,前列腺癌(PCa)在我国的发病率呈持续上升趋势^[1-3]。自 1941 年 Huggins 等^[4]首先发现 PCa 细胞呈雄激素依赖生长以来,雄激素剥夺疗法已成为治疗 PCa 和转移癌的经典方法。然而,此方法却难以阻止 PCa 的进展,大部分患者会由雄激素依赖性 PCa (androgen dependent prostate cancer, ADPC)转变为雄激素非依赖性 PCa (androgen independent prostate cancer, AIPC),这使得治疗相当棘手。由于前列腺癌的生物行为极其复杂,至今人们尚未提出一个系统的理论来解释 AIPC 的发生机制^[5],其也一直是 PCa 领域研究的热点课题。然而在研究 AIPC 转变机制时所面临的问题是很难获取大量经病理学确诊的 AIPC 组织标本,而通过人工诱导 ADPC 细胞形成 AIPC 细胞可为今后的机制研究提供合适的实验模型。本研究拟在添加氟他胺的去雄激素培养液中长期传代培养雄激素依赖性前列腺癌 LNCaP 细胞,诱导形成雄激素非依赖性前列腺癌细胞,同时探讨在此过程中细胞相关性能的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

LNCaP 细胞(中国科学院上海细胞库);氟他胺(加拿大 Schering-Plough 公司);透析处理的胎牛血清(美

国 SAFC 公司);无酚红的 DMEM/F12 细胞培养液(美国 Gibco 公司);细胞培养瓶、细胞培养板(美国 Corning 公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所);通用型细胞周期检测试剂盒(上海杰美基因医药有限公司);细胞固定与破膜剂、FITC 荧光标记 Bcl-2 抗体(美国 CALTAG 公司);PE 荧光标记 Bax 抗体(美国 Santa Cruz 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 氟他胺溶液的配制 0.25 g 氟他胺完全溶解于 9 ml 无水乙醇中,其摩尔浓度为 0.1 mol/L,4 °C 保存备用。临用前用培养液稀释成各所需摩尔浓度。

1.2.2 细胞培养与分组 处于对数生长期的雄激素依赖 LNCaP 细胞经 0.05% 胰酶消化后,吹打成单个细胞悬液,接种于 10% (体积分数)去雄激素胎牛血清的 DMEM/F12 (1:1)培养液,然后在 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养,每周换液与传代各一次。培养 5 代后,向培养液中加入终浓度为 1.0×10^{-7} mol/L 的氟他胺继续培养 25 代,再提高氟他胺的浓度到 5.0×10^{-6} mol/L,培养 35 代,并以此 LNCaP 细胞为实验组。同时,父代的 LNCaP 细胞长期传代培养在普通胎牛血清的 F12 培养液中,并以此 LNCaP 细胞为对

收稿日期: 2009-01-09 接受日期: 2009-05-11

浙江省自然科学基金资助项目(No. Y207516)

* 通讯作者。Tel: 0577-88069595, E-mail: wwwtzh@wz.zj.cn

照组。

1.2.3 细胞形态观察 观察实验组 LNCaP 细胞在整个培养过程中的细胞形态改变, 同时将实验组第 60 代 LNCaP 细胞重新培养在常规培养液中, 观察其细胞形态是否发生改变。对照组 LNCaP 细胞培养在氟他胺浓度为 5.0×10^{-6} mol/L 的去雄激素培养液中, 观察其生长情况。

1.2.4 细胞生长增殖抑制试验 采用 CCK-8 法进行检测。取对数生长期的实验组 LNCaP 细胞, 用胰蛋白酶消化后, 加入去雄激素 DMEM/F12 (1:1) 培养液终止消化并吹打成单细胞悬液, 细胞计数板上计数, 调整细胞密度为 3.3×10^4 个/ml。按 3.0×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板中, 分为对照孔和实验孔, 每孔 90 μ l, 待细胞贴壁生长后, 实验孔中加入 10 μ l 氟他胺浓度为 5.0×10^{-5} mol/L 的培养液, 对照孔中加入 10 μ l 培养液, 并以培养液为空白孔, 每组设 4 个平行孔, 共 5 块平行板, 在 96 孔板周边未使用的孔内加入 100 μ l 无菌生理盐水, 以防止培养孔内水分挥发。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱内常规培养。培养 72 h 后, 每孔加入 10 μ l CCK8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 温育 3 h, 以测定波长 450 nm、参比波长 570 nm 测定吸光度值(A)。以培养代数为横轴, 细胞生长率为纵轴, 绘制细胞生长率曲线。细胞生长率 = $(A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的实验组第 60 代 LNCaP 细胞和对照组 LNCaP 细胞, 以 3.0×10^5 个/孔接种于去雄激素培养液和常规培养液中, 同时每种培养液各设一个重复孔, 每孔培养液总量 2 ml, 共 3 块平行板。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 细胞贴壁后, 除重复孔外, 每孔均加 131 μ l 氟他胺浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 的培养液, 继续培养 24、48、72 h 后, 进行细胞周期检测, 具体步骤按 Cycle Test^{plus} DNA Reagent Kit 试剂盒说明书操作。流式细胞仪进行检测, 应用 Cellquest 3.2 分析软件获取细胞 20 000 个, ModFit 3.0 软件分析结果。

1.2.6 流式细胞术检测细胞 Bcl-2 与 Bax 表达 分别收集实验组和对照组 LNCaP 细胞 1.0×10^6 个, 按 FIX/PERM 试剂盒说明书处理, 每组分别加入 100 μ l Reagent A (fixation medium) 室温避光温育 15 min, 含 5% FBS 的 PBS 洗涤 1 次, 300 g 离心 5 min, 弃上清液。每组加入 100 μ l Reagent medium (permeabilization medium), 混匀后移出 50 μ l 细胞悬液至另一试管中, 分别标记为标本测定管和同型抗体阴性对照管, 并分别加入抗 Bcl-2-FITC 和阴性同型对照荧光标记抗体 (mouse IgG1 FITC), 混匀, 室温避光温育 20 min, 含

5% FBS 的 PBS 洗涤 1 次, 300 g 离心 5 min, 弃上清液, 1% 多聚甲醛重悬后流式细胞仪检测, Cellquest3.2 分析软件获取和分析结果。Bax 检测方法同上。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件, 实验结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 数据呈正态分布用两样本比较的成组 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 LNCaP 细胞形态改变

2.1.1 实验组 LNCaP 细胞形态的变化 培养初期, 实验组 LNCaP 细胞在去雄激素培养液中经过短暂的增殖后, 其生长受到抑制, 主要表现为: 细胞生长状态差, 贴壁困难, 大部分细胞开始凋亡, 仅少数细胞继续生长, 细胞形态瘦长。经过氟他胺和去雄激素环境培养 60 代后, 细胞生长状态良好, 且细胞形态已发生明显改变, 大部分胞体变小, 呈扁平状, 少见圆形或梭形(图 1A), 同时出现聚集生长现象。对照组 LNCaP 细胞形态呈三角形或长梭型, 小部分为圆形, 分布均匀, 长期传代过程中细胞形态无明显改变(图 1B)。

2.1.2 雄激素对实验组 LNCaP 细胞形态的影响 实验组 LNCaP 细胞重新培养在含雄激素的常规培养液中, 3 天后发现其细胞形态发生明显改变, 主要表现为细胞呈长梭型、多边形, 多见单个细胞独立生长, 与父代的 LNCaP 细胞形态相似(图 1C), 本组实验至少重复 3 次。

2.1.3 氟他胺和去雄激素环境对对照组 LNCaP 细胞形态的影响 雄激素依赖的 LNCaP 细胞直接培养在氟他胺浓度为 5.0×10^{-6} mol/L 的无雄激素培养液中, 观察到在培养的前 10 天左右, 细胞生长部分抑制, 当继续传代培养时, 细胞贴壁较差, 胞体缩小, 大部分细胞呈圆形, 生长缓慢, 培养至第 20 天时几乎全部死亡(图 1D), 本组实验至少重复 3 次。

2.2 不同代数实验组 LNCaP 细胞在浓度为 5.0×10^{-6} mol/L 氟他胺的去雄激素培养液中的生长曲线

CCK-8 法细胞增殖实验结果显示, 实验组第 1、2、10 代 LNCaP 细胞在 5.0×10^{-6} mol/L 氟他胺的去雄激素培养液培养 72 h 后, 其细胞生长率分别为 $77.3\% \pm 3.2\%$ 、 $70.3\% \pm 5.6\%$ 和 $62.3\% \pm 3.5\%$, 表明氟他胺和去雄激素对 LNCaP 细胞的生长呈抑制作用, 但继续培养至第 30、50、60 代时, 发现其细胞生长率分别为 $67.6\% \pm 1.7\%$ 、 $92.6\% \pm 5.9\%$ 和 $96.0\% \pm 6.6\%$, 表明氟他胺和去雄激素对细胞生长抑制作用随培养时间的延长而减小。从生长曲线(图 2)可以看出, 实

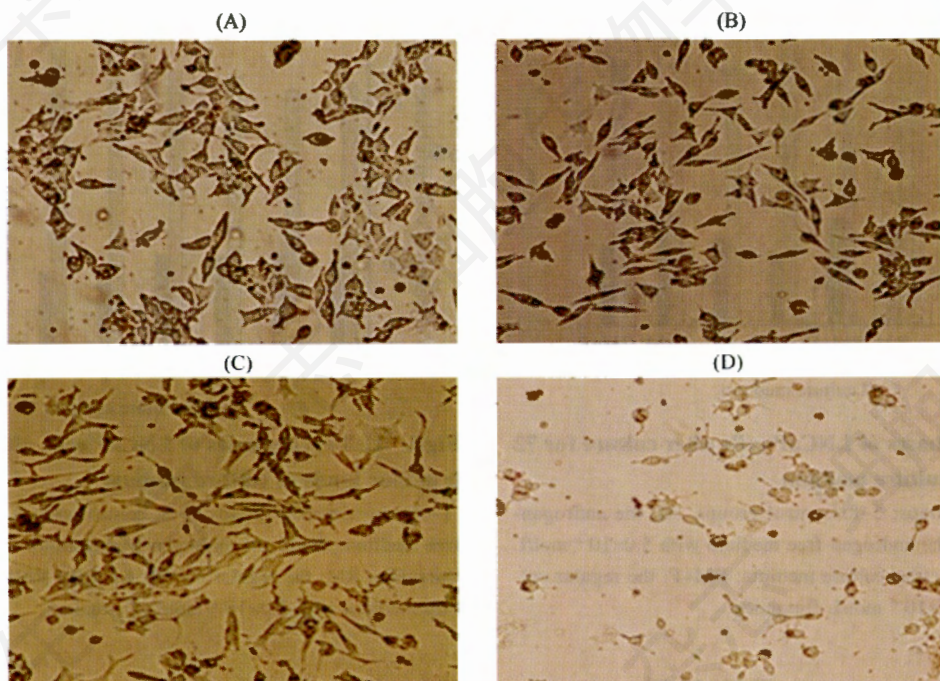


Fig.1 Cell morphology

A: cell morphology of experimental group at passage 60 (100×); B: cell morphology of control group (100×); C: cell morphology of experimental group after culture for 3 days in regular culture medium (100×); D: cell morphology of control group after culture for 20 days in androgen-free medium with the terminal concentration of flutamide of 5.0×10^{-6} mol/L (100×).

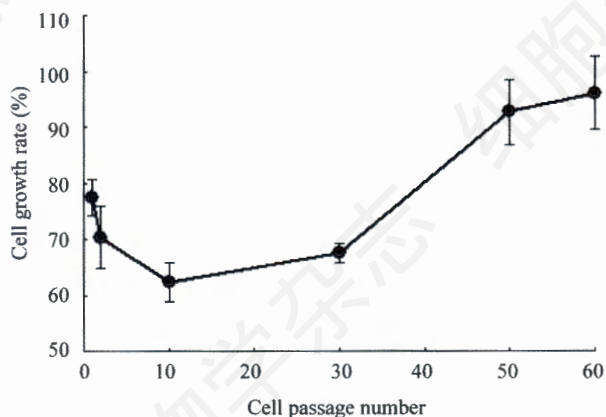


Fig.2 Effect of flutamide and androgen deprivation environment on the growth of LNCaP cells at different passages in experimental group

实验组 LNCaP 细胞随着传代次数的增加, 细胞生长率总体呈明显上升趋势, 提示长期培养的实验组第60代 LNCaP 细胞对氟他胺和去雄激素环境已基本耐受。

2.3 氟他胺和去雄激素环境对 LNCaP 细胞周期的影响

实验组第60代 LNCaP 细胞在不同培养液(AI+F: 氟他胺浓度为 5×10^{-6} mol/L的去雄激素培养液; AI: 去

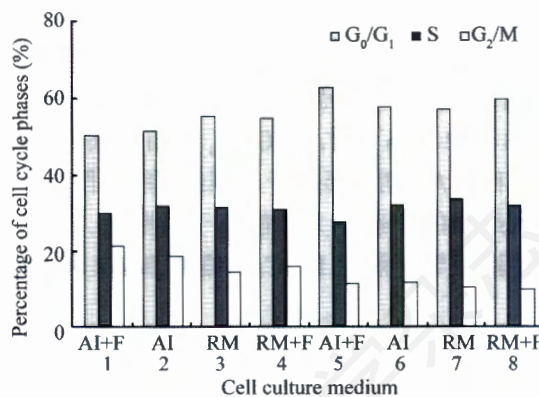


Fig.3 Cell cycle phases of LNCaP cells after culture for 48 h in four kinds of culture medium

1-4: experimental groups; 5-8: control groups. AI: the androgen-free medium; AI+F: the androgen-free medium with 5.0×10^{-6} mol/L flutamide; RM: the regular culture medium; RM+F: the regular culture medium with 5.0×10^{-6} mol/L flutamide.

雄激素培养液; RM: 常规培养液; RM+F: 氟他胺浓度为 5×10^{-6} mol/L的常规培养液)中培养 48、72、96 h时, 以其普通培养液中生长的细胞为对照, 可见氟他胺、去雄激素环境及两者联合作用均对其细胞周期无明显影响, 主要表现为 G₀/G₁ 期、S 期和 G₂/M 期总体变化趋势一致。对照组 LNCaP 细胞周期受氟他胺、去雄激素环境而影响, 且两者联合作用时生长

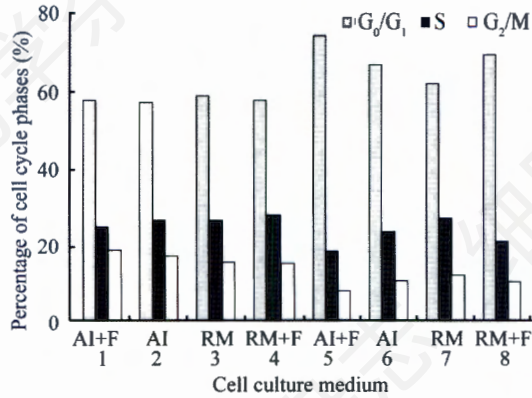


Fig.4 Cell cycle phases of LNCaP cells after culture for 72 h in four kinds of culture medium

1-4: experimental groups; 5-8: control groups. AI: the androgen-free medium; AI+F: the androgen-free medium with 5.0×10^{-6} mol/L flutamide; RM: the regular culture medium; RM+F: the regular culture medium with 5.0×10^{-6} mol/L flutamide.

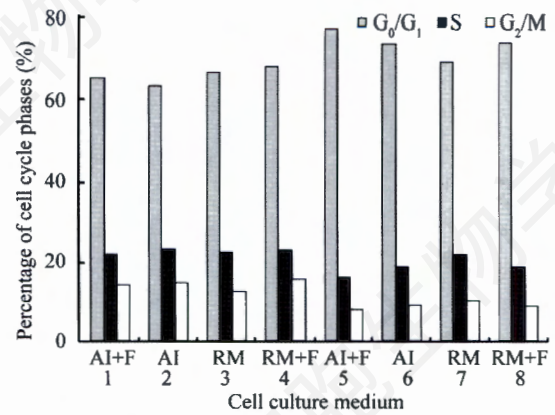


Fig.5 Cell cycle phases of LNCaP cells after culture for 96 h in four kinds of culture medium

1-4: experimental groups; 5-8: control groups. AI: the androgen-free medium; AI+F: the androgen-free medium with 5.0×10^{-6} mol/L flutamide; RM: the regular culture medium; RM+F: the regular culture medium with 5.0×10^{-6} mol/L flutamide.

Table 1 The expression of Bcl-2 and Bax (MFI, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
Experimental group (passage 60)	$9.97 \pm 1.62^*$	$3.48 \pm 0.45^\Delta$	$3.26 \pm 0.81^*$
Control group	5.90 ± 1.07	3.59 ± 0.76	1.65 ± 0.16

* $P < 0.01$, $^\Delta P > 0.05$ compared with control group.

抑制更为明显, 表现为 G_0/G_1 期阻滞, S 期和 G_2/M 期均减少(图 3~图 5)。另外, 实验组第 60 代 LNCaP 细胞在 48、72、96 h 时, 其 G_0/G_1 期明显低于对照组, 而 S 期和 G_2/M 期明显高于对照组(图 3~图 5), 提示实验组细胞的增殖能力可能高于对照组。

2.4 实验组与对照组 LNCaP 细胞 Bcl-2 和 Bax 的表达

本实验利用流式细胞术的方法分别检测了实验组第 60 代 LNCaP 细胞和对照组 LNCaP 细胞中 Bcl-2 和 Bax 的表达, 结果显示实验组第 60 代 LNCaP 细胞 Bcl-2 的平均荧光强度(MFI)明显高于对照组细胞, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。然而, 实验组与对照组 LNCaP 细胞间 Bax 表达无明显差异($P > 0.05$)。因此, 实验组 Bcl-2/Bax 比值也明显高于对照组($P < 0.01$), 表明实验组第 60 代 LNCaP 细胞抗凋亡活性明显增强(表 1)。

3 讨论

LNCaP 细胞系是从前列腺癌患者锁骨上淋巴结转移灶获取的癌细胞, 其保留了人前列腺癌功能分化的特征, 生长呈雄激素依赖性, 并且可分泌前列腺癌特异抗原、前列腺癌膜抗原及雄激素受体等重要的

前列腺癌标记物, 是目前在雄激素依赖性研究方面应用最广泛的前列腺癌细胞系^[6]。研究表明, 急性的雄激素剥夺会导致 LNCaP 细胞生长受到抑制, 慢性的雄激素剥夺反而可以建立激素非依赖的亚细胞克隆^[7]。根据此生长特性, Lu 等^[8]将 LNCaP 细胞在去雄激素胎牛血清培养液中长期传代培养, 建立了雄激素非依赖前列腺癌 LNCaP-AI 细胞。虽然此培养液中的胎牛血清已经活性炭/葡聚糖处理, 但仍可能含有低浓度的雄激素, 对细胞生长可能还存在一定的促进作用。为了进一步去除低浓度雄激素对细胞生长的促进作用, 本实验在去雄激素培养液中加入一定浓度的氟他胺使起到抑制雄激素受体的作用。氟他胺是非甾体类雄性激素拮抗药, 可与雄激素竞争雄激素受体, 并与其结合成受体复合物, 进入细胞核内与核蛋白结合, 从而抑制雄激素受体与雄激素结合。Olea 等^[9]研究发现氟他胺可在 3.0×10^{-8} mol/L 浓度刺激 LNCaP 细胞增殖, 汪涌等^[10]研究发现氟他胺对 LNCaP 细胞的作用为双相, 即低浓度促进生长, 而高浓度(1.0×10^{-5} mol/L)抑制生长。本研究中先在培养液加入 1.0×10^{-7} mol/L 氟他胺, 防止浓度过高造成细胞死亡。随着传代次数的增加, 氟他胺对细胞的抑制作用减少, 再提高氟他胺的浓度到 5.0×10^{-6} mol/L, 继续传代培养, 直至细

胞形成耐药。因此, LNCaP 细胞在此培养环境下可诱导形成雄激素非依赖前列腺癌细胞, 该细胞模型可模拟临床上前列腺癌病人雄激素去势手术后同时合并氟他胺药物治疗时由 ADPC 转变为 AIPC 的过程。

本研究中实验组 LNCaP 细胞在培养初期时, 大部分细胞开始凋亡, 同时部分细胞聚集成团生长, 提示 LNCaP 细胞可能通过这种生长状态的改变以抵抗细胞凋亡。当培养 60 代后, 实验组 LNCaP 细胞形态发生改变, 同时将其重新培养在含雄激素的常规培养液中培养中, 发现其细胞形态与父代 LNCaP 细胞相似, 表明 LNCaP 细胞形态可能与雄激素存在密切的关系, 同时也说明该细胞对雄激素仍有应答。那么实验组第 60 代 LNCaP 细胞是否对去雄激素和氟他胺环境已产生耐受呢? CCK8 法细胞增殖抑制实验结果显示第 1 至 10 代实验组 LNCaP 细胞在氟他胺浓度为 5.0×10^{-6} mol/L 的去雄激素培养液中生长率呈逐渐下降趋势, 表明氟他胺和去雄激素环境对 LNCaP 细胞呈抑制作用。当培养至第 60 代时, 其生长率接近 100%, 表明长时间培养 LNCaP 细胞可形成对氟他胺和去雄激素环境的耐受。同时, 细胞周期检测结果显示氟他胺和去雄激素环境并未阻滞细胞生长, 而对照组受氟他胺和去雄激素环境影响较大, 且两者联合作用时更大, 表明对照组的 LNCaP 细胞对氟他胺和去雄激素环境敏感。

Bcl-2 是一种抗凋亡基因, 其并不能改变细胞增殖的速度, 而是通过延长细胞寿命抑制细胞凋亡, 使癌变效应得以累积, 增加基因发生突变的几率。*Bax* 是 *Bcl-2* 拮抗基因, *Bcl-2* 与 *Bax* 间的比例关系决定细胞是否接受凋亡信号。Shi 等^[11] 研究结果表明 *Bcl-2* 在未经治疗的前列腺癌病人中低表达, 但经雄激素剥夺治疗后 *Bcl-2* 表达量明显增加, 且雄激素非依赖性前列腺癌中表达最高。叶定伟等^[12] 同样发现全雄激素阻断 3 个月后 *Bcl-2* 表达频率明显增加, 而去势前有 *Bcl-2* 表达者在去势后表达量略有增加。本实验流式检测结果显示实验组 LNCaP 细胞的 *Bcl-2* 表达明显高于对照组, 而 *Bax* 在两组间无明显差异, 表明实

验组 LNCaP 细胞抗凋亡能力增强, 提示 *Bcl-2* 可能参与了雄激素对前列腺癌细胞的生物调节作用。

综上所述, 我们已成功诱导形成了雄激素非依赖性前列腺癌细胞, 其细胞周期发生改变, 同时抗凋亡活性增强。本课题组将进一步研究实验组与对照组细胞之间分子水平上的差异, 从而为今后雄激素非依赖性前列腺癌发病机制的研究提供有利线索。

参考文献(References)

- [1] Sim HG, Cheng CW. Changing demography of prostate cancer in Asia, *Eur J Cancer*, 2005, 41(6): 834-845
- [2] Ian LH, Li H, Yang Y, et al. Comparisons of the incidence and pathological characteristics of prostate cancer between Chinese and Portuguese in Macau, *Chin Med J*, 2008, 121(4): 292-294
- [3] 叶定伟. 前列腺癌的流行病学和中国的发病趋势, *中华外科杂志*, 2006, 44(6): 362-364
- [4] Huggins C, Stevens RE, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. II. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland, *Arch Surg*, 1941, 43(3): 209-223
- [5] Schröder FH. Progress in understanding androgen-independent prostate cancer (AIPC): a review of potential endocrine-mediated mechanisms, *Eur Urol*, 2008, 53(6): 1129-1137
- [6] 叶华茂, 孙颖浩, 许传亮, 等. 雄激素非依赖性前列腺癌细胞亚系模型 LNCaP-AI 的建立, *第二军医大学学报*, 2008, 29(1): 59-62
- [7] Shi XB, Ma AH, Tepper CG, et al. Molecular alterations associated with LNCaP cell progression to androgen independence, *Prostate*, 2004, 60(3): 257-271
- [8] Lu S, Tsai SY, Tsai MJ. Molecular mechanisms of androgen-independent growth of human prostate cancer LNCaP-AI cells, *Endocrinology*, 1999, 140(11): 5054-5059
- [9] Olea N, Sakabe K, Soto AM, et al. The proliferative effect of "anti-androgens" on the androgen-sensitive human prostate tumor cell line LNCaP, *Endocrinology*, 1990, 126(3): 1457-1463
- [10] 汪涌, 邵晨, 曹云新, 等. 氟他胺耐受性前列腺癌细胞系 LNCaP-fiu 的建立, *中华实验外科杂志*, 2005, 22(3): 341-343
- [11] Shi Y, Chatterjee SJ, Brands FH, et al. Role of coordinated molecular alterations in the development of androgen-independent prostate cancer: an *in vitro* model that corroborates clinical observations, *BJU Int*, 2006, 97(1): 170-178
- [12] 叶定伟, Li H, Zhang W, 等. 全雄激素阻断前后前列腺癌细胞中 *Bcl-2* 和 *Bcl-XL* 基因表达改变, *中华泌尿外科杂志*, 2004, 25(6): 424

Establishment of an Androgen-independent Prostate Cancer Cell Line Induced by the Combined of Flutamide and Androgen-free Environment

Gang Xu, Yi-Jie Mao, Bin-Hua Chen, Jing-Jing He, Zhi-Hua Tao*, Xiao-Mei Lin, Zhan-Guo Chen, Mo Shen
(Center for Clinical Laboratory Diagnosis, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract We established an androgen-independent prostate cancer cell line induced by the combination of flutamide and androgen-free environment after long-term culture *in vivo*. Cell morphological changes were traced with inverted microscope. Cell proliferation rate was measured by CCK-8 assay. Flow cytometry was used to determine the changes of cell cycle, and expression of Bcl-2 and Bax. Cell morphology of experimental group from 1 to 20 passages was leptosomic, however, it was changed into flatting and aggregation growth pattern after 30 passages, cell morphology of control group was always shuttle-like shape. Cell growth rate of experimental group LNCaP cell was shown a gradual uptrend in the whole process when cultured in androgen-free medium with the terminal concentration of flutamide of 5.0×10^{-6} mol/L. Flutamide and androgen-free environment was revealed to have no significant effect on the cell cycle of experimental group LNCaP cell, but the control group was found to be inhibited. Mean fluorescence intensity (MFI) of Bcl-2 in experimental group was significantly higher than control group. However, there was no significant difference in the MFI of Bax between two groups. LNCaP cell could be changed into androgen-independent prostate cancer cell after long-term induced by the combination of flutamide and androgen-free environment, and this would be a suitable cell line for the pathogenesis studies.

Key words androgen-independent; flutamide; prostate cancer; apoptosis

Received: January 9, 2009 Accepted: May 11, 2009

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y207516)

*Corresponding author. Tel: 86-577-88069595, E-mail: wwwtzh@wz.zj.cn