

精原干细胞的生物学特性

张学明¹ 李德雪^{1,3*} 于家傲² 岳占碰¹

(¹ 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; ² 吉林大学第一医院, 长春 130021; ³ 军事医学科学院, 北京 100850)

摘要 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是雄性生殖系干细胞, 位于睾丸曲细精管基膜上, 既具有自我更新潜能, 又具有定向分化潜能, 是自然状态下出生后动物体内在整个生命期间进行自我更新并能将基因传递至子代的唯一成体干细胞。自 SSCs 移植技术建立以来, 有关其分离、鉴定、培养、冻存、转基因操作及移植等方面均已取得长足进步, 使人们对其生物学特性有了更深入的了解。根据最近的相关进展, 系统评述了 SSCs 的相关生物学特性, 以期为该领域及其他干细胞研究提供借鉴。

关键词 精原干细胞; niche; 自我更新; 形态学; 表型标记

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是位于睾丸曲细精管基膜上既能自我更新维持自身群体恒定, 又能定向分化, 最终产生精子的一类原始精原细胞^[1]。由于其独具的生物学特性, SSCs 研究对于干细胞生物学、医学、农牧业生产等领域均具有重要的理论和实践意义。近年来, 借助于 SSCs 移植技术和其他干细胞相关技术, 人们对 SSCs 的生物学特性有了多层面、多角度的认识。本文结合最近的相关报道和自己的工作, 系统评述了本领域的进展情况。

1 SSCs 的起源

SSCs 起源于原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)。在小鼠第 11.5 胚龄时, PGCs 到达生殖嵴。在此处, 约在第 13.5 胚龄时 PGCs 停止分裂^[2]。在雌性, PGCs 经减数分裂后成为卵母细胞并随之失去干细胞潜能; 在雄性, PGCs 进入胎儿睾丸曲细精管, 被支持细胞包绕后变为生精母细胞(gonocyte), 后者分裂几天后停滞于 G₀/G₁ 期, 直到出生。但与卵细胞相反, 生精母细胞依然保留了干细胞潜能。出生后不久, 它们恢复增殖并启动精子发生过程, 在出生后 6 天左右迁移至曲细精管基膜, 成为以 SSCs 为主的精原细胞^[3,4]。

2 SSCs 的数量

SSCs 数量很少。据估测, 在成年小鼠睾丸中约有 10⁸ 个细胞, 其中约有 2×10⁴ 个是 SSCs, 仅占睾丸所有生精上皮细胞总数的 0.02%~0.03%^[5]。在

小鼠性成熟过程中, SSCs 的数量呈渐进性增长, 从出生到成年, SSCs 的数量共增加约 39 倍^[6]。在一些特定模型动物, 如人工隐睾动物^[7]、维生素 A 缺乏动物^[8]、W/W^v 及 SL/SL^d 突变动物^[9]、二甲磺酸丁二醇二酯(busulfan, 俗名白消胺)处理动物^[10]、胶质细胞源神经营养因子(GDNF)基因及其受体缺失动物^[11]等的睾丸内, 正常精子发生过程发生紊乱, SSCs 不能进一步发育分化, 导致 SSCs 在生精上皮细胞总数中所占的比例大大提高。借助于 SSCs 移植这一功能性检测法, 利用流式细胞术、免疫磁珠分选等方法可从这些模型动物睾丸内富集到高纯度的 SSCs。

3 SSCs 的生物学特性

3.1 具有发育微环境

干细胞一般出现于一个被称之为 niche 或发育微环境的特殊细胞组织当中。在自我更新组织中, niche 为干细胞的自我更新或存活提供特定的发育环境。在 niche 中, 干细胞具有较高自我更新的可能性并很少分裂。当一个干细胞分裂时, 只有一个子细胞能保留在该 niche 中; 而另一子细胞若得不到另一 niche 即发生定向分化。由此推测, niche 一定提供了一些维持干细胞状态的因子而排斥了其他一

收稿日期: 2005-05-13 接受日期: 2005-07-21

国家自然科学基金(No.30200195, No.30471246)及全军医药卫生科研基金(No.01MA204)资助项目

* 通讯作者: Tel: 0431-7836175, E-mail: zacharyzhxm@yahoo.com.cn, lidx@bmi.ac.cn

些能诱导其分化的因子。根据这一点,如果必须的 niche 受限,则干细胞的数目也将受限^[12,13]。因此, niche 控制着干细胞的自我更新和定向分化,在干细胞生物学中伴演着重要角色。

在睾丸内,主要由支持细胞形成 SSCs 定居的特定 niches。SSCs 移植研究表明,当支持细胞形成的 niches 被占用后,这些 niches 内一般很难再接受更多的干细胞;而消除内源性 SSCs 则有利于受体曲细精管接受更多的外源性 SSCs^[14];发育中的幼龄动物的生精上皮比成年动物的生精上皮能接受更多的外源性 SSCs^[6]。这些结果不但证实生精上皮中存在着 SSCs 定居的 niches;也说明内源性干细胞确实影响着外源性干细胞在睾丸中形成精原细胞克隆的数量和模式^[15]。出生后,SSCs 在向基膜迁移的过程中开始竞争 niches。获得 niche 的 SSCs 能继续维持其干细胞潜能,反之则发生定向分化^[16]。

3.2 具有自我更新与分化潜能

3.2.1 自我更新潜能 SSCs 具有高度的自我更新潜能。正常情况下,在个体的整个生命期间,SSCs 在不断产生定向分化精原细胞的同时,能持续自我更新保持自身群体数量恒定。当受到不利因素影响使 SSCs 大量损失后,一旦不利因素消除,存活下来的 SSCs 能快速扩增,部分或完全恢复原有 SSCs 群体数量^[10,17]。在恢复干细胞数量的过程中,SSCs 的自我更新占主导地位,而定向分化占次要地位。当原有干细胞数量恢复后,干细胞的自我更新退居次要地位,而分化则占据主导地位。随着年龄的增长,SSCs 的自我更新潜能会逐渐下降,导致个体的生精能力逐渐减退^[1,2]。

3.2.2 分化潜能 SSCs 能产生定向分化的精原细胞,它们在分化前先大量扩增,然后按既定模式分化,最终形成终末分化细胞——功能性精子。维生素 A 缺乏、W 位点突变、隐睾等不育小鼠生精上皮中的干细胞及体外培养一段时间的或长期冷冻保存后的干细胞移入适宜受体曲细精管后,它们均能

发生定向分化,产生成熟精子,并能由此获得正常后代^[7-11,18,19]。这些实验结果均表明 SSCs 具有分化潜能。其分化能力的体现,由 SSCs 自身及其所处的生理、环境条件所决定。当环境条件不适时,它们停止分化;反之则恢复分化活动。

3.2.3 分裂方式 哺乳动物干细胞主要进行对称性分裂。这种分裂方式使干细胞可以接受细胞因子的调控,以控制其产生干细胞与定向分化细胞之间的比例,从而保持干细胞池内细胞数量的恒定^[12]。哺乳类的 SSCs 可能以对称方式进行分裂,也可能以非对称方式进行分裂^[20]。对称式分裂时,或产生两个相互分开的单个 A 型精原细胞(type-A single spermatogonia, A_s),或产生两个由细胞间桥/胞质间桥(inter-cellular bridge/cytoplasmic bridge)相连的 A_{pr} 型精原细胞(type-A paired spermatogonia, A_{pr})。非对称式分裂时,产生的 2 个 A_s 中的一个仍作为 A_s 干细胞,另一个则进入定向分化,产生 A_{pr} (图 1)。目前,多数学者假设哺乳类的 SSCs 以前一种方式进行分裂^[1-5]。

低等生物如果蝇、线虫等的 SSCs 则主要以非对称方式进行分裂。SSCs 分裂产生的子代细胞,一个仍作为干细胞,以维持干细胞群的恒定;另一个则进入定向分化过程,直到产生成熟精子^[13,21]。

3.2.4 分化模式 根据以 de Rooij^[20]为代表的多数学者的观点以及我们前期对新生至出生后 18 天小鼠生精上皮的系统研究^[4],生精细胞可划分为 3 个类群:即可增殖的精原细胞、完成减数分裂的精母细胞及可变形的精子细胞。所有的精原细胞均位于曲细精管的基膜上;从形态学上,这些细胞又可被划分为未分化的和分化中的 2 类;依次又可依据其局部解剖学排列特征,将未分化精原细胞划分为由不同数目的细胞组成的克隆,即单个的 A_s 型,2 细胞组成的 A_{pr} 型,以及由 4、8、16 细胞组成的链状 A_{al} 型精原细胞(type-A aligned spermatogonia, A_{al})。在啮齿类及羊等动物, A_s 很可能是干细胞。当 A_s

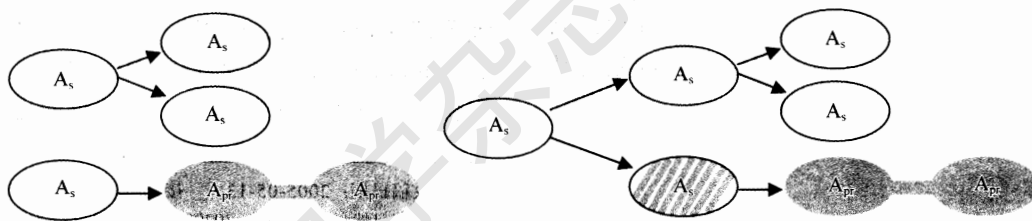


图 1 SSCs 的分裂模式^[20]

左: 对称式分裂; 右: 非对称式分裂; 阴影表示该细胞注定分化, 斜线表示该干细胞注定产生 A_{pr} 。

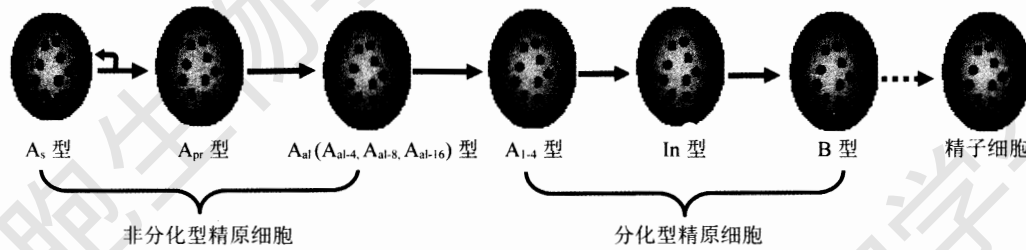


图2 SSCs的分化模式(根据文献[20]、[22]改绘)

分裂时，其子代细胞或相互离开成为2个新的干细胞，或由细胞间桥连接而成为 A_{pr} 。后者进一步分裂即形成 A_{ai} 。在细胞周期的特定时刻， A_{ai} 分化为第一代分化细胞—— A_1 型精原细胞(type A_1 spermatogonia, A_1 , 下同)，后者进行连续6次分裂，经历 A_2 、 A_3 、 A_4 、间型(intermediate spermatogonia, In)、B型精原细胞(type B spermatogonia, B)，形成初级精母细胞并最终形成精子(图2)。

3.3 具有较独特的形态学特征

人及其他灵长类的精原细胞，根据核染色的不同，可分为4大类： A_d 型精原细胞(A dark spermatogonia, A_d)、 A_p 型精原细胞(A pale spermatogonia, A_p)、间型精原细胞(A transition spermatogonia, A_t)及B型精原细胞(又包括 B_1 ~ B_4 4代)。在成年恒河猴睾丸内， A_d 型为贮备干细胞，很少分裂增殖； A_p 型为更新型干细胞，进行着持续的增殖循环，并在生精上皮周期的第VII阶段可通过自我更新启动精子发生过程，产生B型细胞^[23,24]。

牛的精原细胞前体细胞可分为基底干细胞(basal stem cells, BSCs)、集合精原细胞前体细胞(aggregated spermatogonia precursor cells, ASPCs)、定向精原细胞前体细胞(committed spermatogonia precursor cells, CSPCs)，分别相当于啮齿类的 A_s - A_{pr} 、 A_{ai} 及 A_{1-4} 。BSCs见于25和30周龄的睾丸内，在成年睾丸内数量很少。BSCs呈圆形，有一个位于胞质中央的核，核的直径平均为 $8.8\ \mu\text{m}$ 。BSCs多数情况下成对紧密毗连存在，2个细胞间可能由细胞间桥相连，但功能上也可能是独立的；也见有单个或3个一群存在的情况。绝多数BSCs核内含有2~3个不规则形核仁，核仁由致密纤维成份包绕的许多较明亮的纤维中心组成，其余核质电子密度中等。在25周龄牛的睾丸内，多数生精细胞属于ASPCs，它们一般多个紧密相邻存在。在全铺片上，ASPCs的胞质及核的轮廓呈相互叠加状。超薄系列切片观察表明，这些细胞的胞质与曲细精管基膜均有直接或间接接触。CSPCs一般具有核周体和胞质突起，核

的轮廓呈球形或卵圆形^[25]。

对啮齿类的SSCs研究得最为详尽，它们一般具有相似的形态学特征。在出生后1~4天的小鼠睾丸内，生精母细胞尚未分化，明显位于曲细精管的中央，为大圆形细胞，直径 $20\sim 24\ \mu\text{m}$ ，有一个具有均质染色质和中央纤维状核仁的圆形核。随后生精母细胞开始向基膜迁移，约在出生后6天时附着于生精上皮基膜，形成SSCs，其形态仍类似于生精母细胞，只是稍小，直径 $14\sim 15\ \mu\text{m}$ ；核内有散在的异染色质，核仁内有一明显的网状核仁线，核仁形状不规则，在核的偏中心存在；核内有时会有一个空泡，其超微结构类似于人的 A_d ^[4,26]。在仓鼠，SSCs核的形态常随其大小而变化。SSCs核的面积从 $40\ \mu\text{m}^2$ 到 $150\ \mu\text{m}^2$ 不等。胞核一般为球形或卵圆形，染色质较均匀，多数情况下核仁不清楚，偶可见有异染色质颗粒。当核变大时，一般有3~5个核仁出现，染色质变为更为粗糙的颗粒，核内的空泡多数消失^[15]。啮齿类SSCs之后的精原细胞的一个最为显著的形态学特征就是，它们通常沿着曲细精管基膜成群、成簇存在。细胞群大小不一，通常由偶数个细胞组成，细胞间由开放的细胞间桥相连^[26]。胞质间桥是生精细胞分裂时，分裂末期不完全结束而留下的一个胞质连接的开放区域。胞质间桥的存在，使得一个克隆内的细胞共享基因产物，导致同期化发育^[5,26]。

3.4 具有不确定的细胞周期

SSCs具有较长的、不确定的细胞周期，它们以有丝分裂静滞的形式存在或缓慢分裂。研究表明，有些SSCs为长周期细胞，其周期长度在小鼠可长达8天，在大鼠则长达3天；另一些SSCs的细胞周期较短，但也在60 h以上^[20]。这一方面有利于它们维持自身遗传物质的稳定，抵御不良环境因素的伤害；同时也有利于对特定环境信号做出反应，或增加分裂，或减少分裂，或保持静滞，从而有利于产生新的干细胞，或朝着既定方向分化。 ^3H -胸腺嘧啶标记研究也证实，SSCs的细胞周期长

短不一,长周期 SSCs 对有害因素可能具有更强的抵御能力^[20]。

3.5 具有迁移能力

SSCs 在生精上皮中具有迁移能力。当受到有害因素如 X 射线照射、腹腔注射烷化剂二甲磺酸丁二醇二酯等的刺激后,大部分生精细胞(包括部分 SSCs)就会发生死亡、退化。当有害因素去除后,存活下来的 SSCs 能够依靠其自我更新潜能及迁移能力,在曲细精管内重新分布、定居,从而重建 SSCs 群体及精子发生过程^[10,18]。SSCs 移植实验也表明,在受体睾丸中,供体 SSCs 不但能从曲细精管管腔向生精上皮基膜迁移,定居到基膜上;随着时间的延长,还能沿曲细精管长轴逐渐向注射部位以外的其他区域迁移^[6-9,14-16]。

3.6 具有较特异的分子标记

一直以来,人们未能找到 SSCs 的特异性分子标记。近年来,借助于 SSCs 移植技术、流式细胞仪及免疫磁珠分选系统,学者们已找到了 SSCs 的几种较为特异的分子标记。Shinahara 等^[27]用抗 β_1 和 α_6 整合素的抗体筛选小鼠睾丸细胞,结果表明, β_1 和 α_6 整合素可作为鉴定 SSCs 的表面标志,并提示此二者在 SSCs 表面形成二聚体。随后他们又从小鼠隐睾内,用荧光激活细胞分类分析(fluorescence-activated cell sorter analysis, FACS)筛选睾丸细胞,发现具有低侧向散光特性(side scatter light-scattering)、 α_6 整合素⁺、低水平表达或不表达 α_v 整合素的睾丸细胞为干细胞,富集度可提高 166 倍^[28]。Kubota 等^[29]用流式细胞术结合 SSCs 移植技术分析了隐睾小鼠的生精上皮细胞,发现较高的干细胞活性存在于表型为(MHC-I)⁻Thy-1⁺c-kit⁻的细胞群内,这些细胞还表现为 α_6 整合素⁺、CD24⁺、 α_v 整合素⁻、Sca⁻、CD34⁻。2002 年 Satie 等^[30]运用免疫组织化学方法分析了人的健康睾丸及肿瘤睾丸中 NY-ESO-1 基因的表达情况,发现该基因在 SSCs 和初级精母细胞中均有较强表达,而在其他相关基质细胞中未见表达,提示 NY-ESO-1 可能是 SSCs 的表型标记之一。2004 年 Shinohara 等^[31]用抗 CD9 的抗体获得了富集度为 5~7 倍的小鼠和大鼠 SSCs,因此他们认为 CD9 也是小鼠和大鼠 SSCs 的表型标记之一。利用这些分子标记,采用 SSCs 移植技术,根据受体睾丸曲细精管内形成的来自供体干细胞的精原细胞克隆的数目和面积,再结合其他各型精原细胞的特异性分子标记,即可较为准确地在体内外检测、鉴定 SSCs^[32]。Kubota 等^[18]以 Thy-1 为 SSCs 的表型标记,采用 FACS 从隐睾内富集到的 SSCs 的纯度可达每 15

个细胞中就有 1 个干细胞。

3.7 具有较特异的荧光染料染色特性

根据其他干细胞如造血干细胞、骨骼肌干细胞、神经干细胞等排斥烟酸己可碱 33342(Hoechst 33342,一种核结合活性荧光染料)的染色特性,发现用 FACS 富集的具有 Hoechst^{low} 染色特性的“侧群”细胞(The “side population”, P cells)中存在高丰度的干细胞。Lassalle 等^[33]报道,在 Hoechst^{low} 睾丸 SP 细胞中存在被富集的 SSCs。但 Ryu 等^[32]报道,利用 Hoechst 分选后的睾丸 SP 细胞不能在不育受体睾丸曲细精管内形成精原细胞克隆。换言之,这些细胞不具有 SSCs 活性或干细胞活性很低。这可能是由于供体细胞的来源不同(如来自隐睾或正常睾丸)或 Hoechst 的高毒性所造成的。

根据上述分析,Lo 等^[34]选用了毒性较低的罗丹明 123 (Rho),从隐睾小鼠睾丸中收集睾丸细胞,经 Hoechst 和 Rho 染色、FACS 分选,分别收集了具有 Hoechst^{low}、Rho^{low}、Rho^{high} 特性的 SP 细胞,细胞移植后分析发现, Hoechst SP 细胞在受体睾丸曲细精管中未产生精原细胞克隆, Rho^{low} 细胞群产生的精原细胞克隆数比 Rho^{high} 细胞群增加了 17 倍,比未经分选的细胞群增加了 20 倍。提示 SSCs 具有 Rho^{low} 染色特性。

3.8 具有较高的端粒酶活性

端粒酶在多数正常体细胞中无活性或活性很低,而在大多数肿瘤细胞、永生化细胞及未分化幼稚细胞中均呈现较高活性。研究表明,SSCs 表达很强的端粒酶活性,而其他分化型生精细胞如精母细胞、精子细胞虽表达端粒酶活性,但总是处于低水平状态;附睾中的精子则完全不表达该酶活性。这说明,在精子发生中,端粒酶活性随 SSCs 的分化而处于下调状态^[35]。因此,在体外培养中,如能保持 SSCs 的端粒酶活性不减退或丧失,即可维持其干细胞状态不发生变化,从而有利于具有干细胞潜能的细胞系的建立或进一步扩增。

根据这一思路,Feng 等^[36]用携带小鼠端粒酶反转录酶 cDNA 的逆转录病毒载体(携带 Neo 基因)体外转导小鼠未分化 A 型精原细胞,经 G418 培养液筛选培养 2 个月,建立了具有干细胞特征的 A 型精原细胞系。

4 小结

综观上述,作为成体干细胞的一类,SSCs 既具有其他干细胞共有的一些生物学特性,如具有自我更新潜能和分化潜能、数量少、具有特定的分裂

分化方式和迁移能力、细胞周期不确定、形态结构特殊、端粒酶活性较高等。与其他组织中的干细胞相比, SSCs 又有其独特之处, 即它是自然状态下出生后机体内能够终生自我更新并能向子代传递基因的唯一成体干细胞群^[1,3]。深入研究 SSCs 的相关生物学特性不但有助于进一步阐明精子发生过程的机制, 而且也可能使人们通过 SSCs 分离、培养(冻存)、体外遗传修饰、移植这一途径来进行某些雄性不育的治疗、濒危动物保护及优质高产家畜的繁育等研究。然而目前对 SSCs 相关生物学特性的研究仍然远远不够, 特别是对于人(包括其他灵长类)、家畜及经济动物的 SSCs 而言。由于对其生物学特性认识的不足, 目前尚未能建立人、家畜或经济动物 SSCs 的长期培养体系或细胞系, 因此难于在体外进行各种操作。如能借助于 SSCs 移植这一功能性检测手段, 从 SSCs 增殖分化调控的分子机制入手, 解决其体外批量培养或建系问题, 将会极大地促进其相关研究。

参考文献 (References)

- [1] Hamra FK *et al. Dev Biol*, 2004, **269**: 393
- [2] Molyneaux K *et al. Int J Dev Biol*, 2004, **48**: 537
- [3] Brinster RL. *Science*, 2002, **296**: 2174
- [4] 张学明等. *中国兽医学报*, 2000, **20**: 293
- [5] de Rooij DG *et al. J Androl*, 2000, **21**: 776
- [6] Shinohara T *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 6186
- [7] Sperling H *et al. Urology*, 2000, **56**: 886
- [8] McLean DJ *et al. Biol Reprod*, 2002, **66**: 1374
- [9] Ohta H *et al. Biol Reprod*, 2003, **69**: 1815
- [10] Choi YJ *et al. FEBS Lett*, 2004, **575**: 41
- [11] Meng X *et al. Science*, 2000, **287**: 1489
- [12] Fuchs E *et al. Cell*, 2000, **100**: 143
- [13] Xie T *et al. Science*, 2000, **290**: 328
- [14] Ogawa T *et al. Biol Reprod*, 1999, **60**: 515
- [15] Shinohara T *et al. Biol Reprod*, 2002, **66**: 1491
- [16] Ryu BY *et al. Dev Biol*, 2003, **263**: 253
- [17] Shimada A *et al. Radiat Res*, 2005, **163**: 112
- [18] Kubota H *et al. Biol Reprod*, 2004, **71**: 722
- [19] Kanatsu-Shinohara M *et al. Biol Reprod*, 2005, **72**: 985
- [20] de Rooij DG. *Reproduction*, 2001, **121**: 347
- [21] Chen D *et al. Development*, 2003, **130**: 1159
- [22] Meachem S *et al. Reproduction*, 2001, **121**: 825
- [23] Ehmcke J *et al. Biol Reprod*, 2005, **72**: 293
- [24] Ehmcke J *et al. Hum Reprod*, 2005, **20**: 1185
- [25] Izadyar F *et al. Reproduction*, 2002, **124**: 85
- [26] Chiarini-Garcia H *et al. Biol Reprod*, 2001, **65**: 1170
- [27] Shinohara T *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 5504
- [28] Shinohara T *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 8346
- [29] Kubota H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 6487
- [30] Satie AP *et al. Lab Invest*, 2002, **82**: 775
- [31] Kanatsu-Shinohara M *et al. Biol Reprod*, 2004, **70**: 70
- [32] Ryu BY *et al. Dev Biol*, 2004, **274**: 158
- [33] Lassalle B *et al. Development*, 2004, **131**: 479
- [34] Lo KC *et al. Biol Reprod*, 2005, **72**: 767
- [35] Riou L *et al. Endocrinology*, 2005, **146**: 3926
- [36] Feng LX *et al. Science*, 2002, **297**: 392

The Biological Properties of Spermatogonial Stem Cells

Xue-Ming Zhang¹, De-Xue Li^{1,3*}, Jia-Ao Yu², Zhan-Peng Yue¹

¹College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; ²The Frist Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; ³Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract Spermatogonial stem cells (SSCs), the postnatal male germline stem cells, reside on the base membrane of the seminiferous tubules in testes. They are not only capable of self-renewing and differentiating but also the only adult stem cells in normal postnatal body that undergo self-renewal throughout life and transmit gene to offspring. Remarkable progresses involving the isolation, characterization, culture, cryopreservation, transgenic manipulation, and transplantation of these unique cells have been made since the report of SSCs transplantation technique. With the aid of this functional assay, the biological properties of SSCs were researched deeply in recent years. Based on the related reports most recently and our previous work, we aim to provide a comprehensive overview of the biological properties of SSCs.

Key words spermatogonial stem cells; niche; self-renewal; morphology; phenotypic marker

Received: May 13, 2005 Accepted: July 21, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30200195, No.30471246) and the Medicine & Health Science Research Foundation of PLA (No.01MA204)

*Corresponding author. Tel: 86-431-7836175, E-mail: zacharyzhxm@yahoo.com.cn, lidx@nic.bmi.ac.cn