

组蛋白乙酰化在二烯丙基二硫诱导 MGC803 细胞分化中的作用

向姝霖 肖晓岚 苏琦* 赵洁 黄琛 解娜 周秀田 董琳

(南华大学肿瘤研究所, 衡阳 421001)

摘要 探讨二烯丙基二硫(DADS)诱导人胃癌MGC803细胞分化过程中组蛋白乙酰化状态的改变情况。运用形态学方法及成瘤实验观察 DADS 诱导 MGC803 细胞分化, 应用 Western 印迹观察 DADS 诱导 MGC803 细胞分化与其调控细胞组蛋白乙酰化水平和相关 p21^{WAF1} 的关系。形态学观察结果显示, 30 mg/L DADS 处理 MGC803 细胞 24 h 后, 细胞异型性明显减少, 且经裸鼠成瘤实验证实, 处理后的细胞均未在裸鼠体内形成肿瘤; Western 印迹显示, 30 mg/L DADS 处理细胞 12 h 后, 其组蛋白 H3 乙酰化程度明显升高, 与未处理组比较增加了 38% ($P < 0.05$); H4 乙酰化程度无明显改变。用 15、30、60 mg/L DADS 处理细胞 12、24 h 后, p21^{WAF1} 均较对照组升高, 以 30 mg/L DADS 处理 24 h 升高最显著。研究结果表明, DADS 可诱导 MGC803 细胞分化, 其作用可能与增加核组蛋白乙酰化水平及 p21^{WAF1} 表达有关。

关键词 二烯丙基二硫; 胃肿瘤; MGC803 细胞; 组蛋白乙酰化; p21^{WAF1}

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 尤其在我国的发病率和死亡率仍居首位^[1]。并且, 传统的手术治疗、放射治疗、化疗治疗等疗效较差, 5 年生存率很低。发育生物学的观点认为, 细胞增殖失控、分化障碍和凋亡受阻是肿瘤细胞重要的生物学特征。通过诱导肿瘤细胞向良性或正常细胞分化, 从而达到治疗肿瘤的目的, 已经成为肿瘤生物学研究中的前沿热门课题。目前, 大蒜及其烯丙基硫化物抗癌作用的研究日益备受关注^[2]。实验证明, 二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)作为大蒜的主要有效成分烯丙基硫化物之一, 对各种化学致癌物诱发的乳腺癌、结肠癌、肺癌、膀胱癌、肝癌、前列腺癌及白血病有明显的抑制作用^[3]。本实验室先前的研究表明, DADS 可在体外抑制人胃癌 MGC803 细胞的增殖, 通过抑制 ERK 活性, 下调癌基因 *c-fos* 和 *c-jun* 表达水平, 从而抑制 ERK/AP-1 通路, 并可阻滞细胞周期在 G₂/M 期, 与增强 p38 激酶活性, 下调 Cdc25C 磷酸酶的表达^[4-7]。研究证实, DADS 作为一种天然高效低毒的治疗药物可通过增加组蛋白乙酰化诱导鼠肝细胞癌和鼠红白血病 DS19 细胞分化^[8,9]。本文在先前研究的基础上, 观察 DADS 处理人胃癌 MGC803 细胞后, 其形态学的改变、成瘤性及组蛋白乙酰化水平和 p21^{WAF1} 的表达情况, 进

一步探讨 DADS 对体外生长的 MGC803 细胞抑制和诱导分化的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品及试剂 DADS 为 Fluka 公司产品, 药物配置见参考文献^[7]。丁酸钠购自美国 Sigma 公司。RPMI 1640 培养液均为 Gibco 公司产品。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳低分子量标准蛋白质、p21^{WAF1} 鼠单克隆抗体购于丽欣生物技术有限公司。乙酰化 H3、H4 兔多克隆抗体、ECL 发光检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒分别购自美国 Upstate Biotechnology 公司、Santa Cruz 公司和 Pierce 公司, 相应抗鼠及抗兔的二抗、PVDF 膜及新生牛血清分别购自深圳晶美和杭州四季青生物工程公司。

1.1.2 肿瘤细胞株和实验动物 MGC803 细胞(山东师范大学生物系建系, 为人胃低分化黏液腺癌, 从中南大学细胞中心引进)用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液(加青霉素 1×10^5 U/L 和链霉素

收稿日期: 2005-06-15 接受日期: 2006-08-11

湖南省科研计划重大专项(No.04SK1004)和湖南省教育厅科研基金重点项目(No.04A047, No.03C391)资助

*通讯作者。Tel/Fax: 0734-8281547, E-mail: suqi1@hotmail.com

1×10^5 U/L), 在 37°C , 含 5% 的 CO_2 恒温培养箱内培养。8 只 BALB/C 裸鼠购自中科院上海实验动物中心, 雄性, 3~4 周, 体重 13~16 g, 动物质量合格证号为 SCXK(沪)2003-0003。裸鼠在层流架内带盖鼠盒中饲养(符合 SPF 环境), 购回饲养 1 周后用于实验。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 细胞分为未处理对照组, DADS 分 15 mg/L、30 mg/L 和 60 mg/L 三个浓度组, 5 mmol/L 丁酸钠组及 30 mg/L DADS 加 5 mmol/L 丁酸钠共同处理组。

1.2.2 形态学观察 倒置显微镜对活细胞接触处理因素前后细胞形态学及生长状况的变化进行动态观察。6 孔培养板中预先放入洗净消毒的盖玻片, 取对数生长期 MGC803 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, 调整细胞浓度接种于培养板中, 细胞贴壁 6 h 后加入处理因素并设未处理对照、丁酸钠阳性对照和 DADS 处理组, 继续培养 24 h。取出长有细胞的盖玻片, PBS 洗 3 次, 95% 乙醇固定 30 min, PBS 洗 3 次, HE 染色于镜下观察细胞形态学的改变。

1.2.3 裸鼠成瘤实验 分别取对数生长期的未经药物处理和经 DADS 处理 24 h 的 MGC803 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, 台盼蓝拒染法记数活细胞数占 95% 以上, 将细胞密度调至 1×10^7 个/ml, 8 只裸鼠分成两组, 对照组接种未经 DADS 处理的 MGC803 细胞, 处理组接种经 30 mg/L DADS 处理 24 h 后的 MGC803 细胞, 每只裸鼠取 0.2 ml 细胞悬液接种于右大腿背侧皮下, 观察移植瘤形成的时间及大小, 接种后 35 天结束实验。

1.2.4 细胞蛋白提取 收集细胞时, 先用离心法收集悬浮在培养基中的细胞, 贴在瓶壁的细胞先以预冷的 PBS 洗 3 次, 尽量吸尽残留的 PBS, 再加入适量的去污裂解缓冲液(0.01 mol/L NaCl、0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.6、0.001 mol/L EDTA pH 8.0、1 $\mu\text{g/ml}$ 抑蛋白酶肽、100 $\mu\text{g/ml}$ PMSF)于 4°C 裂解 30 min, 用细胞刮匙刮下已裂解细胞, 转移到相对应已收集有培养基中悬浮细胞的 eppendorf 管中, 再于 4°C 裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸出上清液, 即为细胞总蛋白。

1.2.5 SDS-PAGE 按常规配置分离胶为 12%, 积层胶为 5%, 交联度 2.6%, 胶厚度为 1 mm。BCA 蛋白定量试剂盒将各组蛋白质进行蛋白质定量, 调

节每份样品浓度, 以每孔 30 μg 的蛋白质量上样, 样品加入 1/4 体积的 5 \times SDS 加样缓冲液, 沸水煮沸 8 min, 将低分子量标准蛋白质和各组不同样本蛋白质一起上样。应用不连续缓冲系统进行垂直板电泳, 待溴芬指示剂距胶底部约 1 cm 处, 电泳完毕。电泳后的胶作考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h, 然后用脱色液褪至胶的本底无色为止。胶染完色用凝胶照相软件 UVIMAP 扫描。

1.2.6 Western 印迹分析 观察丁酸钠与不同浓度 DADS 处理 MGC803 细胞 3 h、6 h、12 h、24 h 后, 组蛋白 H3、H4 乙酰化程度及 p21^{WAF1} 改变情况, 实验重复 3 次。各组样本蛋白质经 12% SDS-PAGE 后(过程同前), 将蛋白质转到 PVDF 膜上, 膜用 5% 脱脂牛奶封闭, 随后加入相应的一抗、二抗温育, 用 ECL 发光法检测不同蛋白质表达, 薄层扫描仪(日本岛津制作所, 型号 CS-930)测定印迹区带的光密度值。

1.2.7 统计学处理 SPSS10.0 统计软件包进行数据处理, 数据比较采用 *t* 检验, 率的比较采用 χ^2 检验, 确定 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 DADS 处理人胃癌 MGC803 细胞的形态学变化

倒置和光学显微镜观察发现, 未处理 MGC803 细胞呈多角型、圆型, 边缘不清; 细胞体积大, 胞浆相对少, 细胞饱满而透亮; 细胞核大且染色深, 核仁明显, 有多个核仁; 细胞紧贴瓶底密集生长, 甚至可叠层生长(图 1A)。30 mg/L DADS 处理 24 h 的细胞先发生皱缩, 体积变小, 随后部分细胞变圆, 浮起, 余下贴壁的细胞与对照组相比, 胞浆更加丰富, 细胞核变小, 染色变淡, 核仁数量明显减少, 核浆比例下降, 细胞散在分布生长(图 1B)。

2.2 SDS-PAGE

分别收集各组药物处理后的细胞蛋白, 经 BCA 蛋白定量后与 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质一起上样。经 SDS-PAGE (分离胶浓度为 12%) 示, 10~21 kDa 处均有明显的条带, 而实验所需目的蛋白 p21^{WAF1} (21 kDa)、组蛋白 H3、H4 (分别为 17 kDa、10 kDa), 均在此范围内。

2.3 裸鼠成瘤实验

整个实验过程中无小鼠逃逸, 裸鼠饮水、进

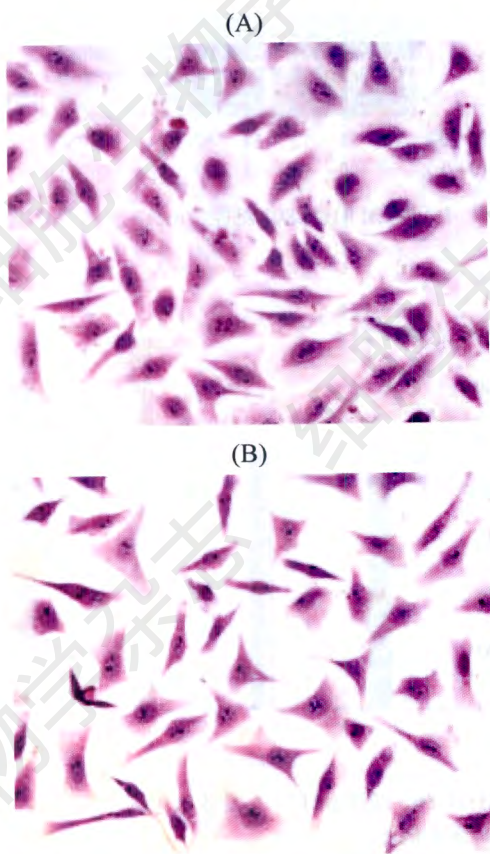


图 1 MGC803 细胞光学显微镜下形态变化(HE, 40×)

A: 未处理的 MGC803 细胞; B: 30 mg/L DADS 处理的 MGC803 细胞。

食正常且无腹泻、活动迟缓等不良反应，无一荷瘤裸鼠自然死亡。对照组中未经 DADS 处理的 MGC803 细胞接种至裸鼠皮下后均在 7 天形成肉眼可见的移植瘤，移植瘤生长迅速，接种后 14 天肿瘤长至 100 mm^3 左右，境界清楚，似有包膜，肿瘤表面凸凹不平，呈多个结节融合状。处理组经 30 mg/L DADS 处理 24 h 的 MGC803 细胞接种至裸鼠皮下，接种后未见移植瘤形成。实验结束时对照组瘤体积巨大，并伴有明显出血、坏死，有 1 只裸鼠肿块坏死已穿破皮肤形成溃疡(图 2)。

2.4 DADS 对 MGC803 细胞组蛋白 H3、H4 乙酰化的调控作用

Western 印迹分析表明，MGC803 细胞中组蛋白 H3 乙酰化程度经 30 mg/L DADS 处理 12 h (图 3C) 后，其与 5 mmol/L 的丁酸钠(图 3E)相近，是未处理组(图 3A)的 1.38 倍。在 30 mg/L DADS 与 5 mmol/L 丁酸钠共同处理组(图 3F)中，组蛋白 H3 乙酰化程度较两药单独作用均有明显升高，其升高程度比 5 mmol/L 丁酸钠单独处理时升高 18%。同期实验



图 2 MGC803 细胞裸鼠移植瘤大体形态学观察

A: 对照组裸鼠接种未经 DADS 处理的 MGC803 细胞，实验结束时瘤体积巨大，如箭头所示; B: 处理组裸鼠接种 30 mg/L DADS 处理 24 h 的 MGC803 细胞，实验结束时裸鼠均未见移植瘤形成。

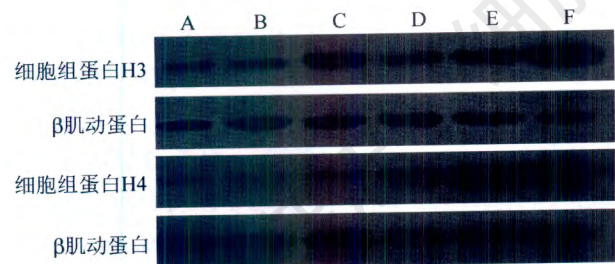


图 3 DADS 对 MGC803 细胞组蛋白乙酰化水平的影响

A: 未处理组; B: 15 mg/L DADS 处理组; C: 30 mg/L DADS 处理组; D: 60 mg/L DADS 处理组; E: 5 mmol/L 丁酸钠处理组; F: 5 mmol/L 丁酸钠和 30 mg/L DADS 共同处理组。

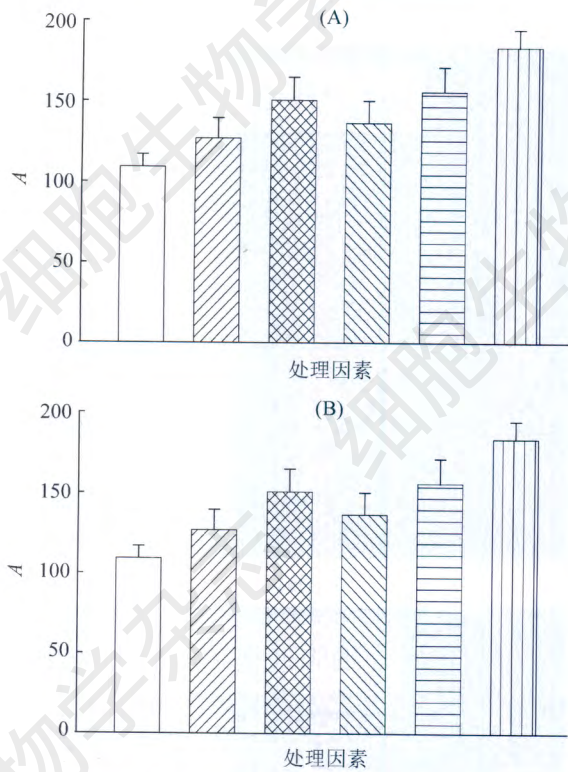


图4 Western 印迹结果相对灰度值图

A: 组蛋白 H3 乙酰化变化图; B: 组蛋白 H4 乙酰化变化图。
 □: 对照; ▨: 15 mg/L DADS; ▩: 30 mg/L DADS; ▪: 60 mg/L DADS; ▧: 5 mmol/L 丁酸钠; ▦: 5 mmol/L 丁酸钠和 30 mg/L DADS。

中, 组蛋白 H4 乙酰化程度较 H3 改变不明显, 仅在 60 mg/L DADS 处理 12 h 时(图 3D)有增加, 但观察两药共同处理组(图 3F)时发现, DADS 也可增强丁酸钠对乙酰化组蛋白 H4 的作用, 其程度比单用 5 mmol/L 丁酸钠(图 3E)增加 5% (图 3, 图 4)。

2.5 DADS 对 MGC803 细胞中 p21^{WAF1} 表达的影响

Western 印迹检测 MGC803 细胞 15、30、60 mg/L DADS 处理 12、24 h 后, p21^{WAF1} 表达情况(实验重复 3 次)。p21^{WAF1} 在各浓度 DADS 处理组均有上升。图 5、图 6 可见, 30 mg/L DADS 处理 12、24 h 后 p21^{WAF1} 表达明显增加, 分别较未处理对照组升高 34.6% 和 60.8%; 而当 DADS 浓度增加至 60 mg/L 时, p21^{WAF1} 表达非但没有升高反而开始下降, 只比未处理对照组增加 20.3% 和 42.4%。

3 讨论

人体任何一种细胞均可以发生恶性转化, 因而肿瘤组织起源多种多样, 在诱导分化剂的作用下,

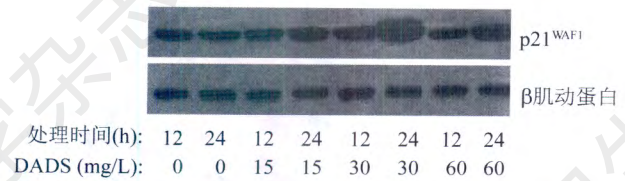


图5 DADS 对 MGC803 细胞中 p21^{WAF1} 表达的影响

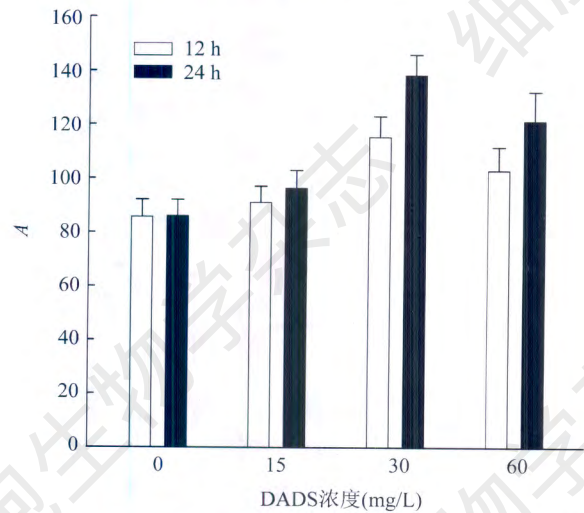


图6 MGC803 细胞 p21^{WAF1} 及 β 肌动蛋白 Western 印迹结果相对灰度值图

恶性肿瘤细胞可被诱导重新向正常细胞方向演变分化, 而不同类型细胞的分化指标各不相同。一般来说, 分化指标有细胞的形态结构、功能代谢、增殖能力和致癌性的改变等。细胞形态学上的分化成熟是肿瘤细胞逆转的重要标志。本实验结果显示, 经 DADS 处理的 MGC803 细胞有明显的细胞形态学改变。未处理的 MGC803 细胞多呈多边形, 少数呈梭形, 细胞体积大, 胞质少, 细胞核大, 核浆比例大, 核圆形、椭圆形或肾形, 核染色深, 核仁明显, 大部分细胞有多个核仁, 可见核分裂; 而 30 mg/L DADS 处理 24 h 后的 MGC803 细胞多边形减少, 梭形增多, 细胞体积变小, 胞质较丰富, 细胞核变小, 核浆比例下降, 核染色变淡, 核仁数量明显减少, 大部分细胞为 1~2 个核仁。MGC803 细胞的这种形态学改变与经 DADS 处理后的结肠癌 HT-29、HCT-15 细胞表现相似^[10,11]。

由于实体瘤的瘤谱广且没有特定的分化标志物, 故实体瘤细胞的诱导分化研究十分困难。Davies^r 等^[12]和 Cheson 等^[13]认为, 实体瘤细胞形态学上的分化成熟、成瘤性的改变是诱导肿瘤细胞分化的重要标志。本研究运用裸鼠成瘤实验观察发现, DADS 可明显抑制 MGC803 细胞裸鼠移植瘤的

成瘤性, 未经 DADS 处理的 MGC803 细胞接种至裸鼠皮下后, 均在 7 天内形成肉眼可见的移植瘤且移植瘤生长迅速, 而体外经 DADS 处理的 MGC803 细胞接种至裸鼠皮下后, 未见皮下移植瘤形成。结果提示, DADS 作为一种天然高效低毒的诱导分化剂对人胃低分化黏液腺癌 MGC803 细胞具有明显的诱导分化作用。

研究表明, 染色质重塑在基因转录调控中起着重要作用, 而组蛋白乙酰化、去乙酰化修饰是影响染色质重塑的重要因素。Allfrey 等^[14]早在 1964 年就发现, 核心组蛋白乙酰化与基因转录活性呈正相关。组蛋白乙酰化状态取决于组蛋白乙酰基转移酶 (histone acetyl-transferase, HAT) 与组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 之间的活性竞争^[15]。核小体核心组蛋白, 主要是 H3 和 H4 碱性 N 端的多个赖氨酸残基, 是可逆乙酰化参与调节基因转录的靶位点。HDAC 可移去组蛋白 H3、H4 赖氨酸残基上的乙酰基, 使带正电荷的赖氨酸残基暴露, 带正电荷的赖氨酸残基与 DNA 之间的相互作用可限制核小体在 DNA 上的移动, 使启动子不易接近转录调控元件。因此, 抑制转录 HDAC 异常结合到特定的启动子区, 从而抑制正常功能基因的转录可能是恶性肿瘤发生的机制之一。近年来, HDAC 抑制剂的发现如丁酸(BA)及其同类, 为恶性肿瘤提供了新的治疗途径。

许多的研究证实了组蛋白乙酰化状态与胃肠道肿瘤的发生密切相关。Choi 等^[16]通过对人胃癌组织和正常组织 HDAC-1 表达水平的对照研究发现, HDAC-1 在胃癌的发生中可能具有重要作用, 类似的研究支持以上观点^[17,18]。我们在研究 DADS 体外诱导人胃癌 MGC803 细胞分化时也发现, 当 30 mg/L DADS 处理细胞 12 h 后, 其乙酰化 H3 组蛋白的效果与 5 mmol/L 丁酸钠相似, 是未处理对照组的 1.38 倍; 相对与 H3 来说, 细胞组蛋白 H4 乙酰化程度在加入 DADS 处理因素后, 仅在 DADS 浓度为 60 mg/L 处理 12 h 时有稍增加。本实验还发现, DADS 可增强 HDAC 抑制剂丁酸钠乙酰化 MGC803 细胞组蛋白的作用, 表现为两药合用时组蛋白 H3、H4 乙酰化水平分别比单用丁酸钠时增加了 18% 和 5%。

组蛋白乙酰化是大部分细胞系中 p21^{WAF1} 基因调

节的主要机制。Shin 等^[19]用 HDAC 抑制剂丁酸盐或 TSA 分别干预 8 种胃癌细胞系后证实了组蛋白去乙酰化是胃癌细胞系中 p21^{WAF1} 失活的主要机制。关于组蛋白乙酰化与 p21^{WAF1} 基因表达的关系, 许多研究涉及到 HDAC 抑制剂可诱导 p21^{WAF1} 基因转录活性增加^[20-22]。本研究结果证实, 不同浓度 DADS 处理细胞 12、24 h 后, p21^{WAF1} 的表达与未处理对照组比较都有升高, 这种升高程度在 DADS 浓度为 30 mg/L 时最明显, 分别比未处理对照组增加了 34.6% 和 60.8%; 提高 DADS 浓度至 60 mg/L 时, p21^{WAF1} 的表达非但没有升高反而开始下降, 只比空白对照组增加了 20.3% 和 42.4%。

p21^{WAF1} 是 p53 的一个下游基因, 属 CDK1 族, 可抑制 cyclin/CDK 复合物活性阻滞细胞周期。近年来许多研究表明 p21^{WAF1} 参与了 G₂/M 期的调控^[23,24]。本实验室先前的研究证实了 DADS 可将体外培养的 MGC803 细胞阻滞在 G₂/M 期^[5], 这与本研究结果 DADS 明显增加 MGC803 细胞 p21^{WAF1} 表达一致。

综上所述, DADS 诱导 MGC803 细胞分化的分子机制可能是通过增加细胞核组蛋白乙酰化水平, 引起 p21^{WAF1} 表达上调, 从而将细胞阻滞在周期 G₂/M 期来完成的。

参考文献 (References)

- [1] 孙秀娣等. *中华肿瘤杂志*, 2004, **26**: 4
- [2] 向姝霖等. *国外医学肿瘤学分册*, 2004, **31**: 736
- [3] Milner JA. *J Nutr*, 2001, **131**: 1027S
- [4] 张良运等. *世界华人消化杂志*, 2003, **11**: 1290
- [5] 袁静萍等. *中国药理学通报*, 2003, **19**: 1147
- [6] 凌晖等. *中国药理学通报*, 2003, **19**: 1235
- [7] 袁静萍等. *癌症*, 2004, **23**: 169
- [8] Lea MA et al. *Anticancer Res*, 2001, **21**: 2841
- [9] Lea MA et al. *Int J Oncol*, 1999, **15**: 347
- [10] Robert V. *Carcinogenesis*, 2001, **22**: 1155
- [11] Knowels LM. *Nutri Cancer*, 1998, **30**: 169
- [12] Davies PJ et al. *Am J Med Sci*, 1988, **296**: 164
- [13] Cheson BD et al. *Cancer Treat Rev*, 1986, **13**: 129
- [14] Allfrey VG et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, **51**: 786
- [15] Kouzarides T. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, **9**: 40
- [16] Choi JH et al. *Jpn J Cancer Res*, 2001, **92**: 1300
- [17] Satoh A et al. *Br J Cancer*, 2002, **86**: 1817
- [18] Mitani Y. *J Pathol*, 2005, **205**: 65
- [19] Shin JY et al. *Cancer Res*, 2000, **60**: 262
- [20] Kamitani H et al. *Neuro-oncol*, 2002, **4**: 95
- [21] Sambucetti LC et al. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 34940
- [22] Demary K et al. *Cancer Lett*, 2001, **163**: 103
- [23] Bunz F et al. *Science*, 1998, **282**: 1497
- [24] Chowdhury IH et al. *Virology*, 2003, **305**: 371

Role of Histone Acetylation in the Differentiation Induced by Diallyl Disulfide in Gastric Cancer MGC803 Cells

Shu-Lin Xiang, Xiao-Lan Xiao, Qi Su*, Jie Zhao, Chen Huang, Na Xie, Xiu-Tian Zhou, Lin Dong
(Cancer Research Institute, Nanhua University, Hengyang, 421001, China)

Abstract We previously reported that diallyl disulfide (DADS) could significantly induce the differentiation in human gastric cancer MGC803 cells. In this study, we further investigated the change of histone acetylation level and the expression of p21^{WAF1} in the differentiation induced by DADS in MGC803 cells *in vitro*. Experiment were divided into six groups: untreated group, treated group with 5 mmol/L sodium butyrate, treated groups with 15, 30, 60 mg/L DADS and treated group with 5 mmol/L SB+30 mg/L DADS. After treated with 30 mg/L DADS for 24h *in vitro*, 0.2 ml including 1×10^7 MGC803 cells were implanted into subcutaneous side in BALB/C nude mice. Morphological changes were examined under light microscopy. Expression of acetylated histone H3, H4 and p21^{WAF1} were detected by Western blot. The results showed that MGC803 cells after 24 h treated with 30 mg/L DADS were fusiform multiplication, volume shrink, enlarged cytoplasm, diminished nucleus, descend karyoplasmic ratio, karyotin thinningz, decreased nucleoli and atypia reduced. The formation of xenograft tumor was not found. The acetylation level of histone H3 in MGC803 cells was elevated after treated by 30 mg/L DADS for 12 h, and the effect was higher 38 % than untreated cells ($P < 0.05$), and acetylation H4 did not changed. At the same time, the expression of p21^{WAF1} also was increaser after treated by 15, 30, 60 mg/L DADS, and treated by 30 mg/L DADS was higher 34.6% and 60.8% than untreated at 12 h and 24 h, respectively. It is suggested that the differentiation of MGC803 cells induced by DADS possibly involved in increase of histone acetylation and expression of p21^{WAF1}.

Key words diallyl disulfide; gastric cancer; MGC803 cells; histone acetylation; p21^{WAF1}

Received: June 15, 2005 Accepted: August 11, 2006

This work was supported by the Key Project Foundation of the Science and Technology Program of Hunan Province (No.04SK1004), the Key Project of Scientific Research Foundation of Hunan Province Education Department (No.04A047, No.03C391)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-734-8281547, E-mail: suqi1@hotmail.com