

# Src 介导骨桥蛋白诱导的血管平滑肌细胞黏附和迁移过程

李菁菁 温进坤\* 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

**摘要** 为阐明酪氨酸激酶Src在整合素被骨桥蛋白(OPN)激活所触发的细胞黏附和迁移信号途径中所起的作用,应用Src特异性抑制剂PP2阻断Src,观察OPN诱导的血管平滑肌细胞(VSMC)黏附和迁移活性的改变,并利用免疫沉淀检查PP2对整合素下游信号分子黏着斑激酶(FAK)和整合素偶联激酶(ILK)磷酸化及其相互作用的影响。结果显示,PP2可明显抑制OPN诱导的VSMC黏附和伤口愈合(黏附和迁移活性分别为对照组的76.6%和33.8%);OPN可显著诱导FAK磷酸化(磷酸化水平达对照组的1.9倍),促进ILK去磷酸化,并使FAK与ILK的结合减少(降至对照组的46.4%)。10 μmol/L PP2可明显抑制OPN诱导的FAK磷酸化、拮抗OPN诱导对ILK的去磷酸化作用、促进FAK与ILK之间的结合。研究结果表明,Src作为OPN-整合素-FAK信号途径中的信号分子,通过影响FAK和ILK的磷酸化以及两者之间的相互作用来调节VSMC的黏附和迁移活性。

**关键词** 血管平滑肌细胞; Src; 黏附; 迁移; 黏着斑激酶

整合素(integrin)是介导细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相互作用的跨膜受体,细胞外基质通过与整合素相互作用调节细胞的黏附、伸展、迁移、增殖和分化等多种细胞生物学行为。已经证明,整合素激活所触发的调节细胞生物学行为的信号转导途径有多条,其中,在整合素内向信号转导(outside-in signaling)中发生最早的事件之一是酪氨酸激酶Src和黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)被活化<sup>[1,2]</sup>。Src和FAK都是与整合素结合的非受体酪氨酸激酶,它们被活化后可以使其下游底物特异性磷酸化,包括p130Cas和paxillin<sup>[3,4]</sup>,并进而导致Rac活化,促进细胞迁移<sup>[5]</sup>。我室证实,细胞外基质——骨桥蛋白(osteopontin, OPN)可通过OPN-整合素 $\alpha v\beta 3$ -FAK-PI-3K途径促进血管平滑肌细胞(VSMC)的黏附和迁移<sup>[6,7]</sup>,但Src是否参与OPN诱导的VSMC黏附和迁移调节过程尚不清楚。另外,整合素偶联激酶(integrin linked-kinase, ILK)也是整合素信号途径中参与细胞迁移调节的重要分子,它被磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI-3K)活化后,可以进一步磷酸化其下游的蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt),进而参与细胞的多种生物学行为调节<sup>[8]</sup>。目前,有关Src、FAK和ILK三者VSMC中的上

下游关系及其相互作用方式还未被完全证实,尤其在OPN激活的整合素信号途径中还没有明确结论。本研究应用Src特异性抑制剂PP2阻断Src的作用,观察VSMC黏附和迁移活性的改变,并利用免疫共沉淀检查PP2对FAK和ILK磷酸化及其相互作用的影响,以期阐明Src在OPN-整合素 $\alpha v\beta 3$ -FAK信号途径中所起的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

DMEM培养基购自Gibco公司;小鼠抗FAK单抗(sc-1688)、小鼠抗ILK单抗(sc-20019)、鼠抗酪氨酸磷酸化单抗(PY-99)、蛋白A-琼脂糖和化学发光试剂盒购自Santa Cruz公司;鼠抗苏氨酸磷酸化单抗购自Sigma公司;兔抗鼠IgG购自Pierce公司;Src特异性抑制剂PP2(溶于DMSO中)购自Calbiochem公司;OPN由本室制备<sup>[9]</sup>,取大鼠VSMC无血清培养基进行DEAE-Cellulose不连续层析分离,

收稿日期: 2006-02-14 接受日期: 2006-05-25

国家自然科学基金(No.30570661)、国家科技部基础研究重大项目前期研究专项项目(No.2005CCA03100)、河北省自然科学基金(No.303455)和高等学校博士学科点专项科研基金(No.20040089018)资助

\* 通讯作者。Tel: 0311-86265563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn

在紫外分光光度计监测下收集蛋白质洗脱峰。将各峰洗脱液合并后经 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色进行鉴定。取分子量约为 66 kDa 的组分经盐酸水解后进行高压液相色谱分析,证实其氨基酸组成与标准鼠源 OPN 相一致。用改良酚试剂法测定洗脱液的蛋白质含量。

## 1.2 细胞培养与分组

按前文方法分离培养 VSMC<sup>[7]</sup>,经 VSMC 特异性表达的平滑肌 22 $\alpha$  (smooth muscle 22 alpha, SM22 $\alpha$ ) 免疫细胞化学染色对细胞进行鉴定,实验采用 3~5 代细胞。传代培养的 VSMC 生长到 80% 汇合时,血清饥饿培养 24 h,使细胞同步于 G<sub>0</sub> 期。之后,加入 20  $\mu$ g/ml OPN,继续培养 30 min 作为 OPN 刺激组;加入不同浓度 PP2 (0.1、1、5、10、20  $\mu$ mol/L) 或 DMSO 预温育 1 h 后,再加入 20  $\mu$ g/ml OPN 刺激 30 min 作为 PP2 组或 DMSO 组。分别按下述方法检测各组细胞的黏附和迁移活性,以及 FAK、ILK 磷酸化水平和两者之间的相互作用。

## 1.3 免疫沉淀和 Western 印迹分析

按文献[10]方法,用细胞裂解液(1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, pH 8.0, 0.2 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.2 mmol/L PMSF, 5% NP-40) 分别裂解各组细胞,离心收集上清液。各取 300  $\mu$ g 蛋白质,加入 NET- 明胶缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 明胶)至总体积为 180  $\mu$ l 后,加入蛋白 A- 琼脂糖 20  $\mu$ l, 4  $^{\circ}$ C 摇动 1 h, 12 000 r/min 离心 20 s, 收集上清液(沉淀作为阴性对照),加入小鼠抗 FAK 单抗或小鼠抗 ILK 单抗各 5  $\mu$ l, 4  $^{\circ}$ C 摇动 2 h。随后,加入 1  $\mu$ l 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 兔抗小鼠 IgG, 4  $^{\circ}$ C 摇动 30 min, 加入蛋白 A- 琼脂糖 20  $\mu$ l 至总体积为 200  $\mu$ l, 4  $^{\circ}$ C 摇动过夜, 12 000 r/min 离心 20 s, 收集蛋白 A- 琼脂糖-抗原-抗体三元复合物。依次用 0.5 ml NET- 洗涤缓冲液 I(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 明胶), 缓冲液 II(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 明胶), 缓冲液 III(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% NP-40) 于 4  $^{\circ}$ C 条件下洗涤 20 min, 12 000 r/min 离心 20 s, 用 2  $\times$  SDS 上样缓冲液悬浮沉淀, 100  $^{\circ}$ C 加热 3 min, 12 000 r/min 离心 20 s, 取上清液进行 SDS-PAGE, 同时任取

其中两组细胞裂解液各 100  $\mu$ g 蛋白质作为阳性对照(Input), 转移至 PVDF 膜上, 分别用 PY-99 和抗苏氨酸磷酸化单抗检测 FAK 和 ILK 的磷酸化水平以及两者之间的相互作用。

## 1.4 细胞黏附实验

将传代培养的 VSMC 用胰蛋白酶消化后, 离心收集细胞。将细胞重悬于含 1% 新生牛血清(NCS)的培养基中, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/ml, 加入不同浓度 PP2 或 DMSO 预温育 1 h 后, 接种于用 20  $\mu$ g/ml OPN 包被的 96 孔板, 50  $\mu$ l/孔, 每组 5 孔, 37  $^{\circ}$ C 温育 2 h, PBS 冲洗 3 遍后, 依次用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 0.5% 甲苯胺蓝染色 15 min, 经 1% SDS 裂解细胞后, 595 nm 测吸光度值。

## 1.5 伤口愈合实验

按文献[11]方法, 将传代培养的 VSMC 接种于玻片上, 细胞生长至 100% 汇合后, 取出玻片, 用无菌吸头在玻片上划痕。PBS 洗净被刮下的细胞后, 按上述分组将玻片置于含不同刺激因素的培养液中, 继续温育 24 h 后取出, 进行固定和 HE 染色。于低倍镜下观察细胞迁移即伤口愈合情况, 任意取 3 个视野, 计数向划痕伤口中迁移细胞的数量, 并以此表示细胞的迁移活性。

## 1.6 统计学处理

实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS10.0 统计分析软件进行组间及组内方差分析。Excel 软件作图。

# 2 结果

## 2.1 PP2 抑制 OPN 诱导的 VSMC 黏附

OPN 通过与整合素  $\alpha$ v $\beta$ 3 相互作用而促进 VSMC 的黏附和迁移<sup>[6]</sup>。细胞黏附实验结果表明, VSMC 接种于 OPN 包被的 96 孔板 2 h 后, 多数细胞已黏附在孔板上, 细胞呈椭圆形, 部分细胞开始伸展, 呈三角形或梭形(图 1A)。与不同浓度的 Src 特异性抑制剂 PP2 预温育 1 h 后, VSMC 在孔板上的黏附受到抑制, 并呈现剂量依赖性, 随着 PP2 浓度的增加, 未黏附的细胞逐渐增多(未黏附的细胞呈圆球形, 并有折光现象)。当 PP2 浓度为 5  $\mu$ mol/L 时, 黏附细胞的吸光度值比对照组下降了 23.4% ( $P < 0.05$ ) (图 1B), PP2 溶剂 DMSO 不影响细胞在 OPN 包被板上的黏附, 提示 Src 在 OPN 诱导的 VSMC 黏附过程中发挥重要作用。

## 2.2 PP2 抑制 OPN 诱导的 VSMC 迁移

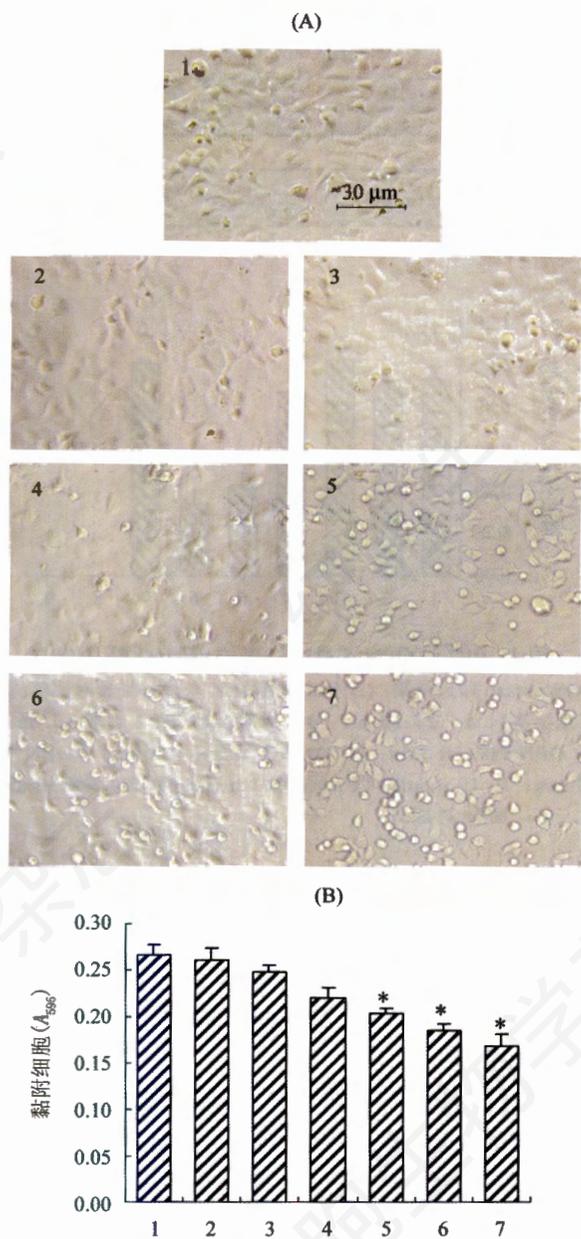


图1 不同浓度PP2对VSMC黏附功能的影响

(A)细胞黏附实验的相差显微镜照片(100 $\times$ ); (B)黏附细胞在595 nm处的吸光度值。1: 对照; 2: DMSO; 3: 0.1  $\mu\text{mol/L}$  PP2; 4: 1  $\mu\text{mol/L}$  PP2; 5: 5  $\mu\text{mol/L}$  PP2; 6: 10  $\mu\text{mol/L}$  PP2; 7: 20  $\mu\text{mol/L}$  PP2。n=5, 与对照相比, \* $P<0.05$ 。

伤口愈合实验结果显示, OPN可以促进VSMC从划痕伤口两侧向中间迁移, 刺激24 h后, 伤口接近愈合; 未给予OPN刺激的细胞培养24 h后, VSMC迁移不明显(图2A)。将VSMC与PP2预温育1 h后再给予OPN刺激, OPN的促迁移效应随PP2浓度的增加而受到不同程度地抑制, 当PP2浓度达到10  $\mu\text{mol/L}$ 时, 迁移进入伤口的细胞数比OPN组下降66.2% ( $P<0.05$ ) (图2B), PP2溶剂DMSO不

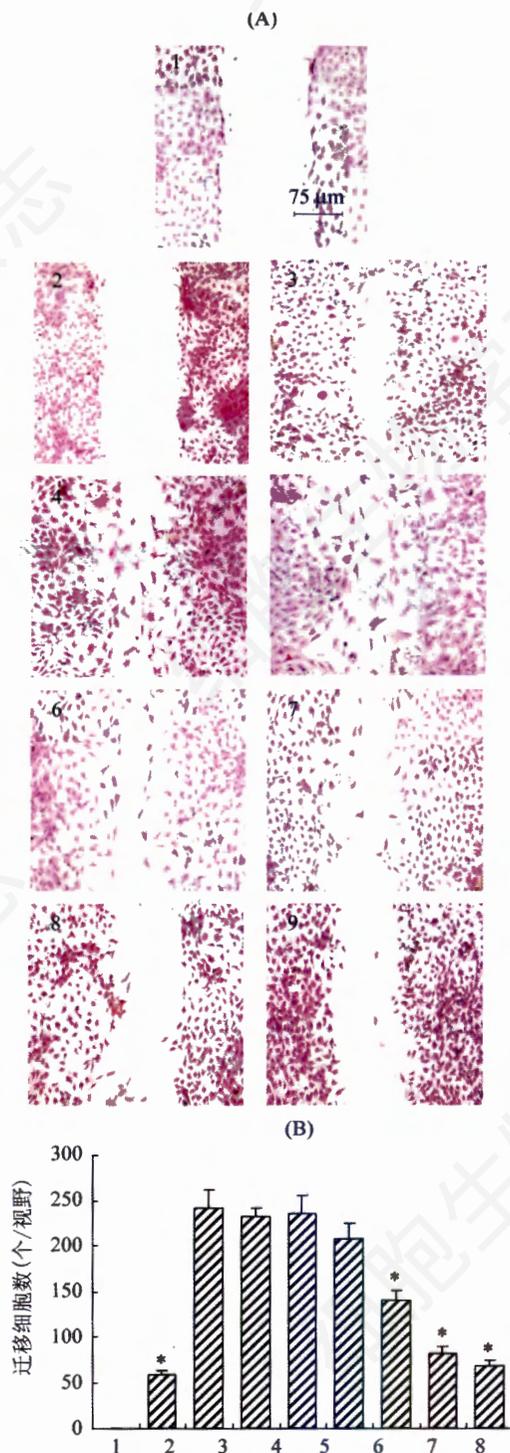
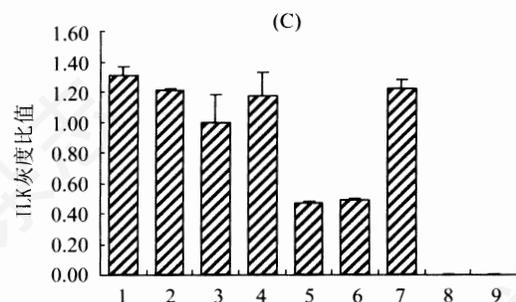
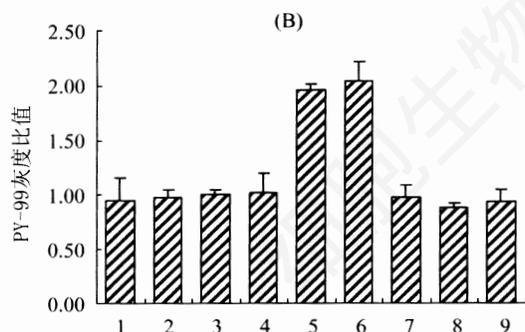
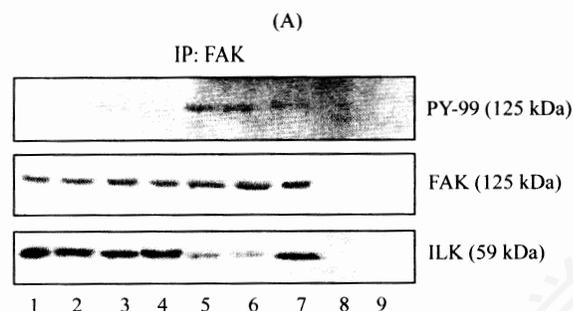


图2 不同浓度PP2对VSMC迁移功能的影响

(A)细胞迁移实验的HE染色图象(40 $\times$ ); (B)迁移细胞计数结果。1: 细胞划痕伤口; 2: 在不含OPN的培养液中温育24 h; 3: OPN刺激24 h; 4: DMSO预温育1 h后给予OPN刺激24 h; 5: 0.1  $\mu\text{mol/L}$  PP2预温育1 h后给予OPN刺激24 h; 6: 1  $\mu\text{mol/L}$  PP2预温育1 h后给予OPN刺激24 h; 7: 5  $\mu\text{mol/L}$  PP2预温育1 h后给予OPN刺激24 h; 8: 10  $\mu\text{mol/L}$  PP2预温育1 h后给予OPN刺激24 h; 9: 20  $\mu\text{mol/L}$  PP2预温育1 h后给予OPN刺激24 h。n=3, 与OPN刺激24 h组相比较, \* $P<0.05$ 。

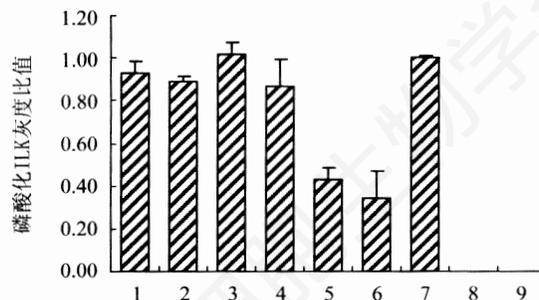
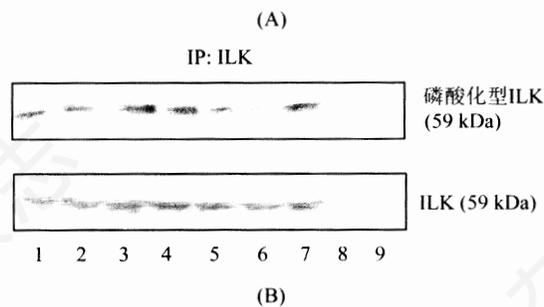


**图3 PP2对OPN诱导的FAK磷酸化及FAK与ILK结合的影响** (A)Western印迹结果; (B)、(C)磷酸化型FAK (PY-99)和ILK灰度扫描相对比值(实验重复3次)。1、2: Input; 3: 对照; 4: PP2刺激30 min; 5: OPN刺激30 min; 6: DMSO预温育1 h后给予OPN刺激30 min; 7: 10  $\mu\text{mol/L}$  PP2预温育1 h后给予OPN刺激30 min; 8、9: 阴性对照。

明显影响OPN诱导的VSMC迁移,表明Src参与了OPN诱导VSMC迁移的信号转导途径。

### 2.3 PP2抑制OPN诱导的FAK磷酸化,促进FAK与ILK结合

OPN刺激VSMC 30 min后,FAK的磷酸化被显著诱导,其磷酸化水平达对照组的1.9倍;细胞与10  $\mu\text{mol/L}$  PP2预温育1 h后再用OPN刺激,则FAK磷酸化被明显抑制,与对照细胞相比,FAK磷酸化水平不再发生明显变化(图3A,图3B)。以FAK抗体对VSMC裂解液进行免疫沉淀后,用ILK抗体进行Western印迹分析的结果表明,FAK抗体可使FAK与ILK共沉淀,即免疫沉淀物中出现ILK条带。OPN刺激使沉淀物中ILK减少到对照细胞的46.4%。



**图4 PP2对OPN诱导的ILK去磷酸化作用的影响**

(A)Western印迹结果; (B)磷酸化型ILK灰度扫描相对比值(实验重复3次)。1、2: Input; 3: 对照; 4: PP2刺激30 min; 5: OPN刺激30 min; 6: DMSO预温育1 h后给予OPN刺激30 min; 7: 10  $\mu\text{mol/L}$  PP2预温育1 h后给予OPN刺激30 min; 8、9: 阴性对照。

细胞与PP2预温育后再用OPN刺激,与单独用OPN刺激的细胞相比,FAK与ILK之间的结合增加,即免疫沉淀物中ILK明显增加(图3A、图3C)。这些结果提示Src通过使FAK磷酸化而发挥抑制FAK与ILK结合的作用。

### 2.4 PP2拮抗OPN诱导对ILK的去磷酸化作用

图4结果显示,OPN刺激可显著降低ILK的磷酸化水平,用PP2特异性抑制Src后,OPN诱导的ILK去磷酸化受到抑制,磷酸化型ILK水平比OPN刺激的细胞高2.3倍。给予PP2溶剂DMSO不影响ILK磷酸化,以上结果说明,Src参与介导OPN对ILK磷酸化水平的调节。

## 3 讨论

VSMC黏附、迁移和增殖是血管重塑性疾病的细胞病理生理学基础。已经证明,VSMC的黏附和迁移受一系列非常复杂的信号转导途径的调节,其中VSMC跨膜受体整合素 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 与其配体OPN相互作用所激活的信号途径在此过程中发挥重要作用。整合素被活化后将一些信号分子和细胞骨架蛋白选择性地募集到胞膜内侧,形成黏着斑(focal adhesion),并通过启动不同信号途径而引起细胞黏附、

伸展和迁移。在黏着斑募集的信号分子中,特异性的非受体酪氨酸激酶(如 Src 和 FAK 等)发挥重要作用,它们通过与整合素  $\beta 3$  亚单位胞内区直接作用而激活下游信号分子,导致胞内信号途径的级联活化<sup>[12]</sup>。大量研究证实,Src 可介导多条信号途径,这些信号途径在不同细胞或不同培养条件下发挥不同的作用。有研究表明,抑制 Src 基因表达可降低成纤维细胞的黏附功能,提示 Src 是细胞黏附所必需的<sup>[13]</sup>;也有报道称,Src 抑制剂 PP2 可完全阻断整合素  $\alpha 2\beta 3$  依赖的细胞伸展,但不影响其黏附<sup>[14]</sup>。我们的实验结果证实,Src 是 OPN-整合素  $\alpha v\beta 3$  诱导 VSMC 黏附所需要的,随着 Src 抑制剂 PP2 浓度的增加,黏附细胞所占比例逐渐下降,提示 Src 被 PP2 抑制后,其下游信号分子的磷酸化受到影响,从而干扰了黏附信号的转导,使 VSMC 黏附功能下降。

Src 介导的信号途径也与细胞的迁移相关。Src 基因剔除的小鼠成纤维细胞迁移活性降低,导入活性 c-Src 可增强其迁移功能<sup>[15]</sup>;Src 对细胞外基质与整合素相互作用诱导的 RhoA 活化是必需的,而 RhoA 活化与细胞迁移紧密相关<sup>[16]</sup>;表皮生长因子诱导小鼠癌细胞迁移需要 Src 参与<sup>[17]</sup>。这些实验结果表明,Src 参与整合素触发的细胞迁移信号途径,是否 Src 也介导 OPN 诱导的 VSMC 迁移呢?我们的实验结果显示,OPN 刺激 24 h 后,划痕伤口两侧的细胞向中间迁移,几乎使伤口完全愈合;加入 PP2 后 OPN 诱导的细胞迁移受到抑制,当 PP2 浓度达到 10  $\mu\text{mol/L}$  时,迁移进入伤口的细胞数比 OPN 刺激组减少 66.2%,伤口不再发生愈合,充分说明 Src 介导的信号途径参与了 VSMC 迁移过程。

关于 Src 调节细胞黏附和迁移的机制,有人认为,Src 的催化活性对细胞黏附不是必需的,而其分子中的 SH2 和 SH3 微区结构的完整性才是必需的,Src 可能仅作为一种衔接蛋白将特异蛋白定位于黏着斑<sup>[18]</sup>。但大多数研究证实,Src 通过磷酸化其下游底物参与细胞黏附和迁移信号的转导,其中 FAK 是与整合素结合的非受体酪氨酸激酶,在整合素与配体结合后,它通过 Y397 的自身磷酸化而与 Src 的 SH2 微区结合,而后,Src 在多个位点上磷

酸化 FAK,增加其激酶活性,并进一步激活下游底物,使信号向下传递<sup>[19]</sup>。本实验室曾报道,OPN 可促进 FAK 的磷酸化活化<sup>[7]</sup>,本文进一步证实这一作用依赖于 Src 的存在。当用 PP2 抑制 Src 时,OPN 诱导的 FAK 磷酸化明显下降,由此可以推论,OPN 与整合素  $\alpha v\beta 3$  结合后导致 Src 活化,Src 通过磷酸化 FAK 的多个位点而引起 FAK 的进一步活化,进而促进 FAK 相关的信号转导。本实验室还证实与 VSMC 迁移相关的另一个重要分子——ILK 的磷酸化水平也受 OPN-整合素  $\alpha v\beta 3$ -FAK 的调节(结果待发表),本研究用 PP2 抑制 Src 及 FAK 磷酸化后,进一步观察 ILK 的磷酸化变化。本实验室发现,OPN 诱导的 ILK 去磷酸化作用可被 PP2 抑制,且 FAK 与 ILK 的结合也明显增加。因此我们推测,PP2 对 ILK 磷酸化影响可能间接来源于其对 FAK 活性的调节,FAK 的活性改变进一步干扰了 ILK 的磷酸化程度及其两者的相互作用。

总之,在细胞外基质调节 VSMC 黏附和迁移的信号途径中,OPN-整合素  $\alpha v\beta 3$ -Src-FAK-ILK 途径可能起着重要作用,该途径与细胞骨架结构调节相关的其他信号途径形成网络,共同调节 VSMC 的黏附、迁移等生物学行为。

### 参考文献 (References)

- [1] Schwartz MA *et al. Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, **11**: 549
- [2] Giancotti FG *et al. Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, **19**: 173
- [3] Playford MP *et al. Oncogene*, 2004, **23**: 7928
- [4] Mitra SK *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**: 56
- [5] Valles AM *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 44490
- [6] 刘智敏等. *中国病理生理杂志*, 2003, **19**: 163
- [7] 刘智敏等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, **20**: 131
- [8] Deng JT *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 16365
- [9] 柴锡庆等. *中国老年学杂志*, 2004, **24**: 725
- [10] Wang XQ *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 44504
- [11] Qian Y *et al. Oncogene*, 2005, **24**: 3154
- [12] Arias-Salgado EG *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 13298
- [13] 邱彦等. *中国药物应用与监测*, 2004, (2): 37
- [14] Salsmann A *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 33610
- [15] Fox JE *et al. J Biol Chem*, 1993, **268**: 25973
- [16] DeMali KA *et al. Curr Opin Cell Biol*, 2003, **15**: 572
- [17] Altun-Gultekin ZF *et al. J Neurosci Res*, 1996, **44**: 308
- [18] Schlaepfer DD *et al. Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 1702
- [19] Brown MC *et al. Physiol Rev*, 2004, **84**: 1315

## Src Mediates the Adhesion and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Osteopontin

Jing-Jing Li, Jin-Kun Wen\*, Mei Han

(*Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China*)

**Abstract** To investigate the roles of tyrosine kinase Src and related signaling molecules in regulating the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs), the adhesion and migration of VSMCs were induced by osteopontin (OPN), and the effect of Src specific inhibitor PP2 on VSMC adhesion and migration as well as focal adhesion kinase (FAK) and integrin-linked kinase (ILK) was studied. The results showed that the adhesion and migration of VSMCs induced by OPN were decreased to 76.6% and 33.8% of control ( $P < 0.05$ ), respectively, after the cells were pre-treated with PP2 for 1 h. The level of phosphorylated FAK increased about 1.9 times after VSMCs were treated with OPN, compared with that of control. The immunoprecipitation and Western blotting showed OPN stimulation induced ILK dephosphorylation and inhibited the association of FAK with ILK, which was reduced to 46.4% of control. PP2 significantly inhibited the phosphorylation of FAK, antagonized ILK dephosphorylation induced by OPN and promoted the association of FAK with ILK. These results suggest that Src regulates the adhesion and migration of VSMCs through affecting the phosphorylation of FAK and dephosphorylation of ILK, and that Src may be involved in OPN-integrin-FAK signaling pathway.

**Key words** vascular smooth muscle cell; Src; adhesion; migration; focal adhesion kinase

Received: February 14, 2006 Accepted: May 25, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570661), the Special Found for Preliminary Research of Key Basic Research Project of Ministry of Science and Technology of China (No.2005CCA03100), the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.303455) and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20040089018)

\*Corresponding author. Tel: 86-311-86265563, E-mail: wjk@hebmh.edu.cn