

Flt3 配体增强 HCV 核心-包膜 E2 融合基因 DNA 疫苗诱导的细胞免疫应答

柯金山^{1,2} 赵平^{1*} 曹洁¹ 于嘉屏² 戚中田¹

(¹ 第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433; ² 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003)

摘 要 建立一种可高效诱导细胞免疫应答,对丙型肝炎病毒(HCV)感染可能起预防和治疗作用的 DNA 疫苗。将小鼠 Flt3 配体(FL)信号肽和胞外段 cDNA 插入结构优化的 HCV 核心-包膜 E2 融合抗原 DNA 疫苗 pST-CE2t, 构建成 pST-CE2t/FL。将 pST-CE2t/FL 转染 COS7 细胞,Western blot 和 ELISA 检测表明该重组质粒能表达 HCV 核心-包膜 E2 融合抗原和可溶性小鼠 FL。分别将 pST-CE2t、pST-CE2t/FL 和空载体 pCI-neo 肌肉注射接种 BALB/c 小鼠,检测小鼠的体液和细胞免疫应答。结果表明两种 DNA 结构均能在小鼠体内诱导细胞和体液免疫应答,但 pST-CE2t 诱导的体液免疫应答强于 pST-CE2t/FL,而后者诱导的细胞免疫应答明显强于前者。FL 能明显增强 HCV 核心-包膜 E2 融合抗原 DNA 疫苗诱导的细胞免疫应答,对于发展 HCV 预防和治疗性疫苗有潜在的应用价值。

关键词 丙型肝炎病毒, DNA 疫苗, fms 样酪氨酸激酶受体 3 配体, 细胞免疫应答

中图分类号 R512.630.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)02-0158-05

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)是引起人类慢性肝炎的主要致病因子之一,与肝硬化、肝细胞癌的关系十分密切,丙型肝炎疫苗目前还没有研制成功。HCV 基因组是由 9.5kb 核苷酸组成的单正链 RNA,变异率较高,尤其是包膜蛋白基因的变异率最高,而 HCV 中和抗体表位就位于包膜蛋白 E2^[1]。用重组 E2 或合成肽免疫黑猩猩,诱生的抗体仅对同株病毒感染有保护性^[2],因此,用疫苗诱导具有广泛保护性的抗 HCV 中和抗体极为困难。细胞免疫应答是人体感染 HCV 后清除病毒的主要决定因素,迅速有效的细胞免疫应答能使 HCV 感染者从急性感染中恢复^[3],故以比较保守的 HCV 抗原或联合多个 T 细胞抗原表位作为免疫原诱导强的细胞免疫应答,可能是研制 HCV 疫苗的理性选择。由于 DNA 疫苗具有高效诱导细胞免疫应答、制备程序简单等特点,在 HCV 疫苗研制方面有很大的发展前景。我们曾构建了结构优化的 HCV 核心-包膜 E2 融合抗原 DNA 疫苗,利用外源性信号肽和辅助性 T 细胞表位增强其诱导的免疫应答,在小鼠得到了较好的免疫效果^[4]。树突状细胞(DC)对抗原的加工提呈和

提供 T 细胞共刺激作用是疫苗诱导细胞免疫应答的关键,而 fms 样酪氨酸激酶受体 3 配体(FL)对于促进 DC 增殖和刺激 T 细胞均起重要作用^[5]。为了进一步增强该 HCV 融合抗原 DNA 疫苗诱导的细胞免疫应答,我们构建了 FL 与 HCV 融合抗原共表达的 DNA 疫苗,小鼠实验表明,FL 基因可明显增强该 DNA 疫苗诱导的细胞免疫应答。

1 材料和方法

1.1 实验材料

编码 HCV 核心-E2 融合抗原的真核表达质粒 pST-CE2t 由本室构建^[4];含有小鼠 FL 全长 cDNA 的质粒 pBR322-mFL 由美国爱因斯坦医学院卢洋博士惠赠;真核表达质粒载体 pCI-neo、非放射性细胞增殖检测试剂盒和细胞毒检测试剂盒为 Promega 产品;稳定表达 HCV 核心抗原的 SP2/0 细胞由本室建立^[3];雌性、6 周龄 BALB/c 小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司;HCV 核心蛋白第 1 至 36 位氨基酸合成肽由日本东京大学 Koike 博士惠赠;抗 HCV 核心抗原单克隆抗体为本实验室建立;CHO 细

收稿日期 2002-09-26, 修回日期 2002-12-08。

基金项目 国家自然科学基金(No. 39980038, No. 30271187)资助。

* 通讯作者。 Tel 86-21-25070313, Fax 86-21-25070312, E-mail zhao-pn@yahoo.com

胞表达的重组 HCV E2 抗原和抗 HCV E2 单克隆抗体 3E5-1 由美国 Chiron 公司 Shirley 博士惠赠;抗-HCV ELISA 试剂为上海长征-康仁生物试剂公司产品;可溶性小鼠 FL ELISA 检测试剂购自 Genetime 科技公司;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、IgG1 和 IgG2a 为 SouthernBiotech 产品。

1.2 DNA 疫苗 pST-CE2t/FL 的构建

质粒 pST-CE2t 以 *Nhe* I、*Eco*R I 酶切后,与经 *Nhe* I、*Eco*R I 酶切的 pCI-neo 连接,得到重组质粒 pCI-ST-CE2t。合成小鼠 FL 信号肽和胞外段 cDNA 的扩增引物,上游引物 5'-gcggccgcgtcgacacatgacagtgctggcgcagcctg-3',引入 *Not* I 和 *Sal* I 酶切位点,下游引物 5'-gcggccgcttacctggccgaggtctgggag-3',引入 *Not* I 酶切位点。以质粒 pBR322-mFL 为模板,PCR 扩增小鼠 FL 信号肽和胞外区 cDNA,PCR 产物与 pMD18-T 载体连接得到的重组质粒,经 DNA 测序证明 FL 核苷酸序列与原始序列一致后,再以 *Not* I 酶切,切出的 FL 基因与经 *Not* I 酶切线性化并用碱性磷酸酶去磷酸化处理的 pCI-CE2t 连接,得到的重组质粒以 *Sal* I 酶切,鉴定出 FL 基因正向插入的重组质粒 pCI-ST-CE2t-FL。以 *Eco*R I、*Sma* I 酶切 pIRES-neo,切出的 IRES 基因插入经过相同酶切的 pCI-ST-CE2t-FL,即为编码 HCV 核心-包膜 E2 融合抗原和小鼠 FL 信号肽和胞外段的 DNA 疫苗 pST-CE2t/FL。

1.3 重组质粒转染 COS7 细胞及其表达产物的检测

用 Lipofectamine(Gibco BRL)分别将质粒 pST-CE2t/FL、pCI-neo 转染 COS7 细胞,质粒用量 2 μ g,加 0.2 μ g 绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFPN1(Clontech)作为参照以检验转染效率。转染 48h 后,以 Western-blot 检测细胞内 HCV 核心和包膜 E2 抗原的表达^[6],分别以抗 HCV 核心和 E2 抗原的单克隆抗体为捕获抗体,以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为检测抗体。ELISA 法检测细胞培养上清中小鼠 FL 的表达。

1.4 DNA 免疫接种

以肌肉注射法分别将质粒 pST-CE2t/FL、pST-CE2t 和 pCI-neo 接种 BALB/c 小鼠,剂量为 100 μ g/次,3 周 1 次,共 2 次。每种质粒分别接种 8 只小鼠。

1.5 体液免疫应答的检测^[4]

分别在首次免疫第 1、3、5、7 周后从各组小鼠眼眶取血,ELISA 法检测检测小鼠血清抗 HCV 核心抗原和包膜 E2 抗原的总 IgG、IgG1 和 IgG2a,并计算 IgG2a/IgG1 比值。

1.6 小鼠脾细胞增殖反应和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)效应的检测^[4]

首次免疫后第 7 周,分别处死各组小鼠,制备脾细胞悬液,接种 96 孔板。设 HCV 核心抗原合成肽刺激孔、重组 HCV E2 抗原刺激孔、无抗原刺激的阴性对照孔和 BSA 刺激的无关对照孔。抗原合成肽的终浓度为 10 μ g/mL,重组抗原和 BSA 的终浓度均为 30 μ g/mL。检测小鼠 T 细胞的增殖反应,结果以刺激指数(Stimulation index,SI)表示。分别以稳定表达 HCV 核心抗原的 SP2/0 细胞为刺激细胞和靶细胞,以免疫小鼠的脾细胞为效应细胞,效应细胞/靶细胞数目之比为 20:1 或 100:1,用乳酸脱氢酶释放法检测小鼠的 CTL 应答,结果以杀伤率(%)表示。

数据的统计学分析用 *t* 检验。

2 结果

2.1 共表达 HCV 融合抗原与小鼠 FL 的重组质粒结构

重组质粒 pST-CE2t/FL 的转录调控区结构如图 1,其中 P 为 CMV 启动子和增强子序列,S 为小鼠 IgG kappa 链信号肽,T 为 Th 表位 PADRE,C 为核心抗原基因,E2t 为截短的包膜 E2 抗原基因,对应于 HCV 多蛋白前体的 384~661 位氨基酸,BGH pA 为牛生长激素转录终止 polyA 序列,SV pA 为 SV40 转录终止的 polyA 序列。

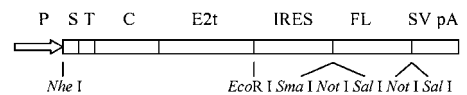


图 1 候选 DNA 疫苗 pST-CE2t/FL 的结构

Fig.1 Structure of DNA vaccine candidate pST-CE2t/FL

2.2 重组质粒在 COS7 细胞表达产物的检测

转染 48h 后,在荧光显微镜下观察到 pCI-neo/pEGFPN1 和 pST-CE2t/FL/pEGFPN1 转染的细胞中均有 GFP 阳性细胞,且分布密度相似。Western-blot 分析表明:用 HCV 核心抗原或 E2 抗原单抗均能检测到 pST-CE2t/FL 转染的细胞表达的蛋白条带,分子量约 70 kD (Fig.2 A、C),大于预计的 52 kD 的融合蛋白的分子量。ELISA 检测细胞培养上清中的小鼠, pCI-neo 转染细胞的上清 A_{450nm} 为 0.01 ± 0.00 ,pST-CE2t/FL 为 0.35 ± 0.02 ,表明 pST-CE2t/FL 能分泌表达小鼠 FL。

2.3 小鼠的抗体应答

首次免疫 1、3、5、7 周后,pST-CE2t 免疫组抗 HCV 核心抗原的总 IgG、IgG1 和 IgG2a 的阳转率分别为 17/8、3/8、5/8、5/8,抗核心

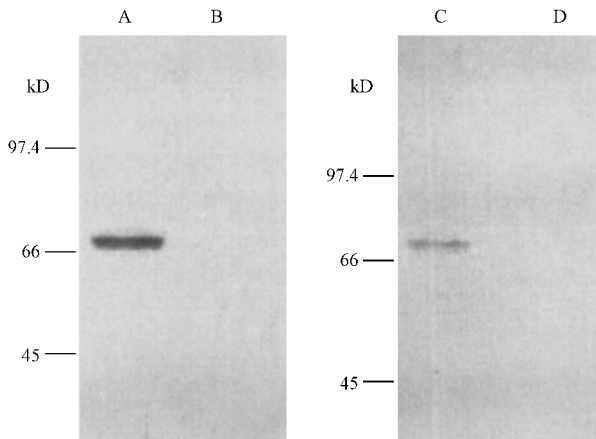


图 2 pST-CE2t/FL 在 COS7 细胞表达产物的 Western-blot 分析

Fig.2 Western-blot analysis of expressed product of pST-CE2t/FL (A and B, detected with anti-HCV core McAb; C and D, detected with anti-HCV E2 McAb)

- A. COS7 cells transfected with pST-CE2t/FL;
 B. COS7 cells transfected with pCI-neo
 C. COS7 cells transfected with pST-CE2t/FL;
 D. COS7 cells transfected with pCI-neo

IgG 阳转率分别 0/8、3/8、4/8、4/8。pST-CE2t/FL 免疫组抗 HCV E2 IgG 阳转率分别为 0/8、2/8、3/8、3/8, 抗核心 IgG 阳转率分别 0/8、1/8、2/8、2/8。pST-CE2t/FL 免疫组小鼠抗 HCV E2 的 IgG2a/IgG1 比值高于 pST-CE2t 免疫组, Table 1 显示首次免疫后第 7 周的结果 (p 小于 0.05), 因 pST-CE2t/FL 免疫组抗核心抗原 IgG 阳转小鼠较少, 未进行 IgG2a/IgG1 统计学分析。

表 1 不同免疫组小鼠血清抗 HCV E2 IgG2a/IgG1 比值

Table 1 Ratios of anti-HCV E2 IgG2a/IgG1 in mice immunized with different DNA vaccine

Group	IgG2a/IgG1
pST-CE2t	1.54 ± 0.09
pST-CE2t/FL	1.89 ± 0.10

2.4 小鼠脾细胞增殖反应

用 HCV 核心抗原合成肽或重组 E2 抗原刺激后, pST-CE2t 与 pST-CE2t/FL 免疫组小鼠的脾细胞均发生明显增殖反应, 且前一组的增殖强度不及后一组, 二者的差异有显著的统计学意义 (p 均小于 0.05, Table 2)。

2.5 小鼠的 CTL 应答

检测免疫小鼠脾细胞对稳定表达 HCV 核心抗原的 SP2/0 细胞的杀伤反应, 效应细胞/靶细胞比为 20:1 或 100:1 时, pST-CE2t 和 pST-CE2t/FL 免疫组的

杀伤率与 pCI-neo 免疫组相比均有显著性差异 (p 均小于 0.001), 且 pST-CE2t/FL 免疫组的杀伤率明显高于 pST-CE2t 免疫组 (p 均小于 0.05, Table 3)。

表 2 不同免疫组小鼠 T 细胞对于 HCV 核心抗原合成肽或重组 HCV E2 抗原刺激的增殖反应

Table 2 The T lymphocyte proliferative response of immunized mice stimulated with HCV antigens

Group	Stimulation index
pST-CE2t	
core	1.62 ± 0.11
E2	1.58 ± 0.09
pST-CE2t/FL	
core	1.85 ± 0.12
E2	1.78 ± 0.12
pCI-neo	
core	1.03 ± 0.06
E2	1.00 ± 0.01

表 3 不同免疫组小鼠脾细胞对于表达 HCV 核心抗原的 SP2/0 细胞的 CTL 反应(杀伤率)

Table 3 HCV core protein specific CTL response of DNA immunized mice (%)

Group	E:T ratio	
	20:1	100:1
pST-CE2t/FL	60.9% ± 8.53%	79.03% ± 9.95%
pST-CE2t	46.48% ± 7.70%	62.2% ± 8.62%
pCI-neo	2.7% ± 1.50%	4.12% ± 1.75%

3 讨 论

细胞免疫应答对清除 HCV 起关键作用, 用疫苗诱导有效的细胞免疫应答, 虽然不能防止急性 HCV 感染, 但能在急性感染阶段迅速清除 HCV, 从而防止感染的慢性化。因为体内存在的记忆性 T 淋巴细胞被 HCV 抗原再次激活以后, 能够迅速增殖、活化, 进而清除病毒。此外, 用疫苗诱导细胞免疫应答, 能增强 HCV 感染者的细胞免疫应答, 因而还可能具有治疗作用。

DC 是激活 T 细胞能力最强的抗原提呈细胞, 慢性 HCV 或 HBV 感染者的 DC 增殖、抗原提呈和刺激 T 细胞的活性均明显降低^[7], 故增强 DC 功能, 对于在正常人诱导强的细胞免疫应答或在病毒感染者增强原来反应弱的细胞免疫应答均有重要意义。体内的 DC 可分为两个亚群, 即来源于单核细胞的髓系

CD11c⁺ DC 和来源于淋巴细胞的浆系 CD11c⁻ DC^[8]。Flt3-L 是早期造血的关键性调节因子,对 CD11c⁺ DC 有强的促增殖、分化作用,而其他的 DC 生长因子如 G-CSF 对 CD11c⁺ DC 的刺激作用则较弱^[9]。CD11c⁺ DC 刺激 CD4⁺ T 细胞分化为 Th1 型,而有效的抗病毒细胞免疫应答即为 Th1 型,Th1 型 CD4⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子不仅可直接抑制病毒基因复制和表达,还能以旁分泌方式促进 CD8⁺ T 细胞杀伤被病毒感染的靶细胞和诱导靶细胞发生凋亡。CD11c⁻ DC 主要刺激 Th2 型免疫应答,而 Th2 型免疫应答正是慢性病毒感染的免疫特点,是病毒抗原特异性免疫耐受的特殊形式^[10]。因此,用 FL 作为疫苗佐剂对于诱导有效的抗病毒细胞免疫应答可能有重要促进作用。

FL 有膜结合型和可溶性两种存在形式,其生物学活性相似。从 DNA 疫苗诱导免疫应答的机理分析,分泌性 Flt3-L 可能更有利于刺激 DC。故本研究构建了编码信号肽和 FL 胞外段及 HCV 融合抗原的 DNA 疫苗 pST-CE2t/FL,细胞转染试验表明该 DNA 疫苗能表达可溶性 FL 和 HCV 融合抗原。HCV 融合抗原的分子量表明 E2 抗原发生了广泛的糖基化修饰,这与 E2 中有多个 N 糖基化位点相一致。免疫小鼠的结果表明 pST-CE2t/FL 诱导的包括脾细胞增殖和 CTL 反应在内的细胞免疫应答均明显强于 pST-CE2t,比较小鼠抗 HCV IgG2a/IgG1,也提示 pST-CE2t/FL 诱导的免疫应答更偏向于 Th1 型。这可能是因为 DNA 疫苗转染的细胞如肌细胞和其他体细胞表达并分泌 FL,后者再作用于 CD11c⁺ DC 等一系列串联免疫事件的最终效应。当然,DNA 疫苗也可能在体内直接转染 DC,使 FL 以自分泌形式刺激 DC,但在肌肉注射 DNA 疫苗时这可能不占主要位置。检测小鼠血清抗体表明 pST-CE2t/FL 诱导的抗核心和包膜 E2 的总 IgG 均不及 pST-CE2t,这可能与 pST-CE2t/FL 诱导更强的细胞免疫应答有关,因为 CD4⁺ T 细胞可通过分泌 Th1 型细胞因子抑制 DNA 疫苗中 CMV 启动子的转录活性,使抗原的表达下调,而 CD8⁺ T 细胞则通过细胞毒作用直接破坏表达 HCV 融合抗原的肌细胞,降低抗原刺激的持续时间,二者均使抗原对 B 细胞的刺激减弱。pST-CE2t/FL 中的 IRES 和 FL 基因也有可能影响 HCV 融合抗原的表达,本文未能比较这两种结构 DNA 疫苗表达 HCV 融合抗原水平的差异,但这也可能是二者

诱导抗体效果不同的原因之一。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Farci P A , Shimoda D , Wong T *et al.* Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the heper-variable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 , **96** :15394 - 15399
- [2] Esumi M , Rikihisa T , Nishimura S *et al.* Experimental vaccine activities of recombinant E1 and E2 glycoproteins and hypervariable region 1 peptides of hepatitis C virus in chimpanzees. *Arch Virol* , 1999 , **144** :973 - 978
- [3] Gerlach J T , Diepolder H M , Jung M C *et al.* Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4⁺ T cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* , 1999 , **117** (4) :933 - 941
- [4] JIANG C H (姜春鹏) , ZHAO R (赵平) , ZHU S Y (朱诗应) *et al.* Construction of HCV core and envelope 2 fusion gene DNA vaccine and its immunogenicity in mice. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物与免疫学杂志) 2002 , **22** (5) :510 - 514
- [5] Curti A , Fogli M , Ratta M *et al.* Stem cell factor and FLT3 - ligand are strictly required to sustain the long-term expansion of primitive CD34⁺ DR⁻ dendritic cell precursors. *J Immunol* , 2001 , **166** :848 - 854
- [6] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [7] Auffermann-Gretzinger S , Keeffe E B , Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic , but not resolved , hepatitis C virus infection. *Blood* , 2001 , **97** (10) :3171 - 3176
- [8] Marie-Clotilde R , Soumelis V , Kadowaki N *et al.* Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* , 1999 , **283** (19) :1183 - 1186
- [9] Bail P , Banchereau J , Burkeholder S *et al.* Flt3-Ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets *in vivo* . *J Immunol* , 2000 , **165** :566 - 572
- [10] Rosen H R , Miner C , Sasaki A W *et al.* Frequencies of HCV-specific effector CD4⁺ T cells by flow cytometry : correlation with clinical disease stages. *Hepatology* , 2002 , **35** (1) :190 - 198

Enhancement of Cellular Immune Response to DNA Vaccine Encoding Hepatitis C Virus Core and Envelope 2 Fusion Antigen by Murine Fms-like Tyrosine Kinase 3 Ligand

Ke Jin-Shan^{1,2} ZHAO Ping^{1*} Cao Jie¹ Yu Jia-Ping² QI Zhong-Tian¹

¹(Department of Microbiology ,Second Military Medical University ,Shanghai 200433 ,China)

²(Department of Laboratory Diagnosis , Changzheng Hospital , Second Military Medical University , Shanghai 200003 ,China)

Abstract Hepatitis C virus (HCV) is an important human pathogen that causes chronic liver disease worldwide. It is desirable to develop vaccines to prevent HCV infection , or at least to prevent progression to chronicity. We once constructed an optimized hepatitis C virus core and envelope 2 fusion antigen DNA vaccine , which could induce humoral and cellular immune responses against HCV core and E2 protein in BALB/c mice efficiently. Flt3 (Fms-like tyrosine kinase 3)-ligand has been identified as an important cytokine for the generation of professional antigen-presenting cells , particularly dendritic cells. We reasoned that a DNA vaccine coexpressing the antigen and FL may activate immune responses more effectually. In this study , The influence of FL on this HCV DNA vaccine was evaluated. The cDNA encoding signal peptide and extracellular domain of murine FL was inserted into the plasmid pST-CE2t , and the resulting plasmid pST-CE2t/FL was transfected into COS7 cells. The HCV core and E2 protein were detected by Western blotting , and the soluble murine FL was detected by ELISA. Eight-week-old female BALB/c mice were inoculated intramuscularly with 100 μ g pST-CE2t , pST-CE2t/FL or mock vector , respectively , and boosted at the same dosage 3 weeks later. Anti-HCV core and E2 total IgG and isotypes were measured at weeks 1 , 3 , 5 , 7. Splenocyte proliferative response to recombinant HCV core and E2 protein were detected at week 7. SP2/0 cells expressing HCV core protein were used as target cells for the detection of cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. Western blot analysis showed that a protein band with molecular weight about 70 kD from lysate of COS7 cells transfected with plasmid pST-CE2t/FL could be detected by anti-HCV core or E2 monoclonal antibodies , which indicated that pST-CE2t could express glycosylated HCV core and E2 fusion protein. Murine FL could be detected in the culture supernatant of COS7 cells transfected with pST-CE2t/FL. Plasmid pST-CE2t immunized mice developed higher anti-HCV core and E2 IgG seroconversion rates and titers than pST-CE2t/FL group did at different various times , but the IgG2a /IgG1 ratio of anti-HCV E2 protein in pST-CE2t/FL group is much higher than pST-CE2t group. Splenocytes from pST-CE2t or pST-CE2t/FL immunized mice could proliferate with stimulation of HCV core or E2 protein in vitro , although pST-CE2t/FL group showed much stronger response. Splenocytes from mice immunized with pST-CE2t/FL induced 79.03% \pm 9.95% of target cell lysis at the effector/target ratio of 100:1 , which was significantly greater than the lysis (62.2% \pm 8.62%) observed in mice immunized with pST-CE2t. Our data demonstrated that the incorporation of FL can preferentially enhance the cellular response to this HCV fusion antigen DNA vaccine. In contrast , HCV specific antibodies were inhibited by FL in vaccinated mice. More and more data supports that recovery from acute HCV infection may depend upon the generation of broad-based cellular immune responses to viral proteins. So , FL may be of potential value as an adjuvant in the development of DNA-based immunization for prophylactic and therapeutic vaccine against HCV infection.

Key words hepatitis C virus ,DNA vaccine ,fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3)ligand (FL) ,cellular immune response

Received : 09-26-2002

This work was supported by the Grant from National Natural Science Foundation of China (No. 39980038 , No. 30271187) .

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

* Corresponding author. Tel : 86-21-25070313 ; Fax : 86-21-25070312 ; E-mail : zhao_pn@yahoo.com