

## 地黄寡糖对脑缺血再灌注所致痴呆大鼠学习记忆功能的影响

杨菁<sup>1\*</sup>, 石海燕<sup>1</sup>, 李莹<sup>1</sup>, 王洪新<sup>2</sup>, 金英<sup>2</sup>, 刘春娜<sup>2</sup>

(辽宁医学院 1. 细胞生物学及新药开发重点实验室, 2. 药理学教研室, 辽宁锦州 121001)

**摘要:** **目的** 研究地黄寡糖对脑缺血再灌注致痴呆大鼠学习记忆功能的影响及其可能机制。**方法** 采用 ip 硝普钠及双侧颈总动脉夹闭 10 min-再灌 10 min-夹闭 10 min 的方式制备脑损伤模型。地黄寡糖 6.4, 32.0 或 160.0 mg·kg<sup>-1</sup> 于造模前 3 d 至造模后 7 d ip 给药, 每日 1 次, 共 10 d。于术后 d 7 开始进行水迷宫实验测定大鼠学习记忆能力; 术后 d 10 取海马, HPLC 异硫氰酸苯酯柱前衍生法测定海马谷氨酸 (Glu) 含量; Western 蛋白印迹法测定海马磷酸化细胞外信号调节激酶 2 (p-ERK2) 含量。**结果** 模型组大鼠学习记忆能力明显下降, 海马 Glu 含量明显升高, p-ERK2 含量降低。地黄寡糖可剂量依赖性地增强缺血再灌注损伤大鼠的学习记忆能力, 降低海马 Glu 含量, 提高海马 p-ERK2 含量。**结论** 地黄寡糖可以改善脑缺血再灌注致痴呆大鼠的学习记忆能力, 这种作用可能与抑制 Glu 过量释放、进而使 ERK2 信号途径正常发挥有关。

**关键词:** 地黄寡糖; 脑缺血; 再灌注损伤; 学习; 记忆; 谷氨酸盐类; 细胞外信号调节激酶; 海马

中图分类号: R286.1, R971

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)03-0165-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2008.03.002

缺血性脑血管病是引起中、老年人痴呆的主要病因之一<sup>[1-2]</sup>。由于其病因、机制和临床表现的复杂性, 至今还没有一种药物取得公认确切疗效。近

年中药及天然药物在痴呆的治疗中取得了较好的效果, 如“地黄饮子”和“六味地黄汤”均被证明对痴呆具有治疗作用<sup>[3]</sup>, 但由于中药的成分复杂, 不同批次药物的化学成分和含量不尽相同, 导致疗效不稳定。因此对其进行纯化及有效的质量控制是中药现代化的大势所趋。本研究用含寡糖 85% 以上的地黄寡糖 (*Rehmannia glutinosa oligosaccharides*) 提取液, 以双侧颈总动脉夹闭再灌注配合 ip 硝普钠 (sodium nitroprusside) 减压法建立痴呆模型, 探讨地黄寡糖对痴呆大鼠学习记忆能力的影响及可能机制, 为地黄寡糖的开发应用提供理论和实验依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验动物、药品及主要仪器

健康雄性 SD 大鼠, 体重 250 ~ 280 g, 由辽宁医学院实验动物中心提供。注射用硝普钠由开封康诺药业有限公司生产, 用注射用水溶解成 1 g·L<sup>-1</sup> 的溶液, 现用现配, 避光保存。谷氨酸 (glutamate, Glu) 对照品购于中国药品生物制品检定所。兔抗磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 (phospho-extracellular signal regulated kinase 1/2, p-ERK1/2) 多克隆抗体, 购于美国 Promega 公司。地黄, 产自河南省武陟县西陶镇, 由锦州奥鸿药业有限责任公司质量部按照 2005 年版《中国药典》一部地黄质量标准检验, 符合规定。地黄寡糖, 按如下方法制备<sup>[4]</sup>, 即取 10 kg 地黄粉碎成小于 2 mm 的颗粒, 用 25 L 注射用水浸泡 5 h, 离心取上清得上清液约 22 L, 将上清液于 35℃ 下真空浓缩至 10 L, 加入 95% 乙醇 40 L 混合, 离心取上清 0.45 μm 膜过滤, 得过滤液 48 L, 过滤液于 35℃ 下真空浓缩, 得浓缩液 10 L, 用 5 ku 的超滤器将浓缩液超滤得超滤液约 9.5 L, 将超滤液用活性炭吸附得地黄寡糖提取液约 9.5 L, 膜过滤除菌分装。按质量标准检测, 符合规定, 即总固体含量为 18 ~ 22 g·L<sup>-1</sup>。苯酚硫酸法测定总糖含量 85% 以上, 其中含水苏糖 55% ~ 65%, 梓醇 6% ~ 12%。用

收稿日期: 2007-08-20 接受日期: 2008-03-17

基金项目: 辽宁省高校分子细胞生物学与新药开发重点实验室开放课题 (2006LY07); 辽宁省教育厅资助课题 (20060528)

作者简介: 杨菁 (1968 -), 男, 辽宁省人, 副教授, 理学博士, 主要从事神经生物学及相关药物研究。

\* 联系作者 E-mail: jzyangjing@gmail.com Tel: (0416)4673465

高效液相色谱法,以 TSK-2000swxl 色谱柱为固定相,乙腈-三氟醋酸-水(40:0.1:60)为流动相,检测波长 190 nm,将先于胰岛素保留时间的峰视为高分子物质,按照归一化法计算高分子物质含量,高分子物质含量 < 2%。在硅胶 G 板上,以乙酸乙酯:乙醇:水:氨水(5:5:4:0.3)为展开剂,展开 15 cm,喷以 5% 硫酸乙醇溶液为显色液,可见有相对迁移率为 0.25,0.42,0.55 和 0.79 的 4 个斑点。Morris 水迷宫,中国医学科学院药物研究所研制;LC-10Avp 高效液相色谱仪,日本岛津公司生产。

### 1.2 动物分组

大鼠适应性喂养 3 d 后,置于 Morris 水迷宫中学习训练 2 d。于 d 3,选择 4 次均在 90 s 内找到平台的大鼠为合格实验大鼠。合格大鼠自由觅食饮水,室温 22~25℃,喂养 5 d 后,按照随机原则分为假手术组、模型组、地黄寡糖 6.4,32.0 和 160.0 mg·kg<sup>-1</sup>(以总固体计)组。每组 12 只,每笼 6 只。地黄寡糖组于造模前 3 d 至造模后 7 d,每天 8:00~9:00 ip 给药 1 次,共 10 d。手术当日术前 2 h 给药。假手术组与模型组 ip 等体积生理盐水。

### 1.3 模型制备

大鼠 ip 10% 水合氯醛 350 mg·kg<sup>-1</sup> 麻醉,仰卧位固定于鼠台上,常规消毒,颈正中切口,分离双侧颈总动脉,穿线备用。ip 硝普钠 2.5 mg·kg<sup>-1</sup> 造成低血压,随即用无创动脉夹关闭双侧颈总动脉 10 min 后,再通 10 min,再夹闭 10 min,造成大脑缺血再灌注损伤,再通后缝合伤口,放回笼中保温饲养。假手术组只分离双侧颈总动脉,不注射硝普钠,不进行缺血再灌注手术<sup>[5]</sup>。造模后 2 h 观察模型大鼠的行为学表现和死亡情况,并对动物进行脑卒中指数评分。评分标准为毛蓬乱竖起、动作缓慢或活动减少、触耳反应加强、眼睑下垂,每 1 项计 1 分;头翘起、不闭眼、两后肢向后向外伸展、转圈、抽搐或阵挛,每 1 项计 1 分;四肢无力或腹部着地计 6 分。选择符合脑缺血征象(>10 分)并无肢体残疾和视力受损的大鼠作为合格的实验大鼠。

### 1.4 Morris 水迷宫实验

术后 d 7 开始水迷宫实验。实验分为定位航行实验和空间探索实验。水迷宫为直径 120 cm,高 50 cm 的水池,水深 30 cm,水温控制在 22.5~23.5℃。在水池边缘等距离标有 4 个入水点,将水池分为 4 个象限,直径 9 cm 的平台位于第 1 象限中央水下 1 cm 处。首先进行定位航行实验,每天每只大鼠训练 4

次,每次采用不同象限入水点。训练时将大鼠面朝池壁轻轻放入水池,同时启动记录装置,记录大鼠寻找平台所用时间,如果 120 s 内没有找到,则将其放置于平台上 10 s,逃避潜伏期记为 120 s,4 次所用时间均值为大鼠当日潜伏期,连续训练 3 d,检测大鼠的学习能力。d 4 进行空间探索实验,训练 3 次后,撤除平台,从第 2 象限将大鼠放入水中,记录 120 s 内的游泳轨迹,观察大鼠的穿越平台次数,以检验大鼠的记忆能力。水迷宫实验完成后立即取双侧海马,冻存,5 d 内测定 Glu 及 p-ERK2 含量。

### 1.5 谷氨酸含量测定

将海马组织按 1:5 加入 0.01 mol·L<sup>-1</sup> HCl,冰浴下超声匀浆,低温离心 10 000 × g, 15 min;取上清液 100 μL 加入 10 μL 浓度为 1 g·L<sup>-1</sup> 的正亮氨酸为内标物,利用异硫氰酸苯酯衍生,用内标法测定 Glu 含量<sup>[6]</sup>。

### 1.6 p-ERK2 含量测定

将海马组织放到预冷的裂解液中。4℃ 超声粉碎后,17 000 × g 离心 1 h,取上清液分装。用 Bradford 法测定蛋白质含量,以牛血清白蛋白为标准品。用磷酸化抗体,常规 Western 蛋白印迹法测定 p-ERK2 含量<sup>[7]</sup>。扫描蛋白条带,利用 Image J 1.36b 图像分析软件进行吸光度分析,吸光度值代表 p-ERK2 含量,以假手术组 p-ERK2 含量为 100%,其余组与其进行比较。

### 1.7 统计学分析

数据均表示为  $\bar{x} \pm s$ , 应用 SPSS 12.0 版统计软件进行单因素方差分析和组间 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 地黄寡糖对脑缺血再灌注大鼠水迷宫逃避潜伏期和穿越隐匿平台次数的影响

造模后 d 7 开始对大鼠进行水迷宫实验测试。表 1 结果表明,模型组于 d 7, 8 和 9 测试的逃避潜伏期较假手术组明显延长,表明大鼠有学习记忆功能障碍。给药组随着地黄寡糖剂量加大,逃避潜伏期逐渐缩短,表明地黄寡糖可以改善痴呆大鼠的学习记忆能力。造模后 d 10 观察大鼠 2 min 内穿越隐匿平台位置的次数。模型组大鼠的穿越次数较假手术组明显减少,而且常有朝向错误,表明出现空间定位记忆障碍。地黄寡糖组较模型组的穿越次数明显增加,表明地黄寡糖可以改善痴呆大鼠的记忆能力,但尚未达到假手术组水平。

**Tab 1. Effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides (ROS) on learning and memory of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury in Morris water maze**

Group	Dose /mg·kg <sup>-1</sup>	n	Escape latency/s			Number of crossing platform in 2 min on d 10
			d 7	d 8	d 9	
Sham		12	13 ± 4	13 ± 3	12 ± 4	11.4 ± 3.2
I-R-I		9	39 ± 11 **	36 ± 8 **	34 ± 7 **	2.7 ± 1.8 **
I-R-I + ROS	6.4	8	28 ± 8 **#	26 ± 7 **#	25 ± 8 **#	5.0 ± 1.8 **#
	32.0	10	25 ± 11 **##	23 ± 8 **##	22 ± 8 **##	6.4 ± 1.8 **#
	160.0	9	21 ± 6 **##	19 ± 6 **##	17 ± 6 **##	8.1 ± 2.0 **##

Rat model of ischemia-reperfusion injury was established by 10 min ischemia-10 min reperfusion-10 min ischemia (I-R-I) of bilateral common carotid arteries and pretreated (ip) with sodium nitroprusside 2.5 mg·kg<sup>-1</sup>. The rats were given (ip) saline or ROS once daily for 10 d (from 3 d prior to 7 d after I-R-I). On d 7-9 after I-R-I, Morris water maze was tested.  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with I-R-I model group.

**2.2 地黄寡糖对脑缺血再灌注大鼠海马组织谷氨酸含量的影响**

表2结果可见,模型组海马组织Glu含量较假手术组升高了42%。地黄寡糖6.4, 32和160 mg·kg<sup>-1</sup>给药10 d对脑缺血再灌注引起的Glu含量升高具有剂量依赖性的抑制作用,与假手术组相比分别升高33%, 23%和12%。

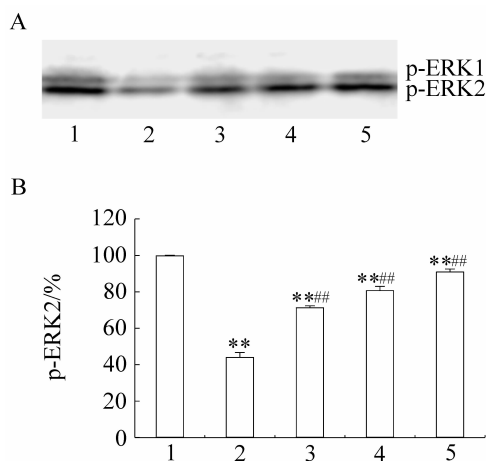
**Tab 2. Effect of ROS on hippocampal glutamate (Glu) content in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury**

Group	n	Dose/mg·kg <sup>-1</sup>	Glu/μmol·g <sup>-1</sup> wet tissue
Sham	12		4.6 ± 0.6
I-R-I	9		6.6 ± 0.4 **
I-R-I + ROS	8	6.4	6.2 ± 0.5 **##
	10	32.0	5.7 ± 0.5 **##
	9	160.0	5.2 ± 0.5 **##

See legend of Tab 1 for rat treatments. On d 10 after I-R-I, hippocampal Glu content was detected by HPLC after finishing Morris water maze test.  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with I-R-I model group.

**2.3 地黄寡糖对脑缺血再灌注大鼠海马组织p-ERK2含量的影响**

以假手术组p-ERK2含量为100%,模型组p-ERK2含量为(44.2 ± 2.5)%,明显降低。地黄寡糖6.4, 32.0和160.0 mg·kg<sup>-1</sup>组分别为(71.5 ± 0.8)%, (80.9 ± 2.1)%和(91.1 ± 1.4)%,与模型组相比显著升高(图1)。



**Fig 1. Effect of ROS on expressions of phospho-extracellular signal regulated kinase 2 (p-ERK2) in hippocampus of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury.** See legend of Tab 1 for rat treatments. On d 10 after I-R-I, hippocampal p-ERK2 was determined by Western blot after finishing Morris water maze test. 1: sham; 2: I-R-I model; 3, 4 and 5: I-R-I + ROS 6.4, 32.0 and 160.0 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively. The absorbance of sham group was taken as 100%.  $\bar{x} \pm s$ , n = 3. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with I-R-I model group.

**3 讨论**

反复的脑缺血再灌注损伤是导致学习和记忆障碍的重要原因,两血管阻断法是目前常用的研究方法<sup>[8]</sup>。该方法手术操作简单,重复性、稳定性较好,且动物无明显的运动系统损伤,存活率较高,故采用该方法制备痴呆模型。Morris水迷宫是检测动物学

习记忆能力的重要实验方法。本研究结果表明,模型组大鼠出现明显的空间学习记忆障碍,表现为逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数明显减少,表明模型复制成功。

Glu 是脑内主要的兴奋性神经递质,介导兴奋性突触传递,并与长时程增强(long term potentiation, LTP)的形成密切相关<sup>[9]</sup>。LTP 是突触可塑性的电生理指标,100 或 200 Hz 电刺激和四乙基铵(tetraethylammonium)化学刺激均可诱导形成 CA1 区 LTP,虽机制不同,但诱导 LTP 均需 ERK2 活性瞬间升高<sup>[10-11]</sup>。空间训练学习可以激活海马 CA1/CA2 的 ERK2<sup>[12]</sup>;用 ERK2 抑制剂 SL327 抑制该酶活性可以抑制小鼠隐蔽平台的搜索能力,但对可见平台则无影响<sup>[13]</sup>,表明 ERK2 的激活为空间学习记忆所必需;同时人们还发现味觉的厌恶性学习等也包括 ERK2 途径<sup>[14]</sup>,表明 Glu 及 ERK2 在学习记忆的形成中具有重要作用。

但 Glu 过度释放并激活 Glu 受体而诱导的兴奋毒性损伤会引起神经元死亡<sup>[15]</sup>。据报道,脑缺血再灌注损伤后海马组织中的 Glu 含量可维持较高水平数天<sup>[16]</sup>。还有研究发现,脑缺血再灌注后海马 p-ERK2 含量也迅速升高,于 24 h 时基本恢复至正常水平<sup>[17-19]</sup>。但 24 h 后 p-ERK2 的变化规律未见报道。本研究结果表明,模型组缺血再灌注后 10 d 时 Glu 含量依然明显高于假手术组,而 p-ERK2 含量却明显降低。出现这种现象的原因可能是 Glu 长时间处于高水平致使 Glu 受体敏感性降低,导致 p-ERK2 含量降低,进而学习记忆能力下降。地黄寡糖组海马组织中 Glu 含量随着药物剂量的升高逐渐降低,p-ERK2 含量逐渐升高。同时水迷宫实验中大鼠的潜伏期明显缩短,穿越平台次数增多,并具有剂量-效应关系,表明地黄寡糖对缺血再灌注导致的学习记忆损伤具有一定的保护作用,这种作用可能与抑制海马 Glu 水平升高、使 ERK2 信号途径正常发挥有关。

#### 4 参考文献:

- [1] Li FP, Zheng J. Characteristic analysis of cognitive disorder in patients with vascular dementia and cerebral infarction[J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2004, **8**(10):1804-1805.
- [2] Rockwood K. Vascular cognitive impairment and vascular dementia[J]. *J Neurol Sci*, 2002, **203-204**:23-27.
- [3] Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX. The effects of Liuwei Dihuang decoction on the differential expression genes in the hippocampus of senescence-accelerated mouse[J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2006, **22**(8):921-926.
- [4] Yang J, Wang HX, Yue CL. *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides and its method of extraction and separation (地黄寡糖及其提取方法): China, 200610088850.7 [P]. 2007-01-24.
- [5] Wang R, Yang QF, Tang YP, Fang LM, Hu JH, Jia XD, et al. Establishing of the imitative vascular dementia rat model and the preliminary study on the preventive and treating effects of TCM preparation 9602 on the disease[J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2000, **23**(5):30-32.
- [6] Yang J, Sun LG, Bai XZ, Zhou HT. Simultaneous determination of 18 amino acids by reversed-phase high performance liquid chromatography with precolumn phenylisothiocyanate derivatization[J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2002, **20**(4):369-371.
- [7] Yang J, Sun LG, Cai K, Zong ZH, Xing W, Liu SY, et al. Effect of acute and chronic lead exposure on CA1-long term potentiation and active extracellular signal-regulated kinase 2 of rat hippocampus[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2004, **18**(1):66-70.
- [8] Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia[J]. *Prog Neurobiol*, 1998, **54**(5):531-548.
- [9] Watkins JC, Jane DE. The glutamate story[J]. *Br J Pharmacol*, 2006, **147**(Suppl 1):S100-S108.
- [10] English JD, Sweatt JD. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation[J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**(31):19103-19106.
- [11] Kanterewicz BI, Urban NN, McMahon DB, Norman ED, Giffen LJ, Favata MF, et al. The extracellular signal-regulated kinase cascade is required for NMDA receptor-independent LTP in area CA1 but not area CA3 of the hippocampus[J]. *J Neurosci*, 2000, **20**(9):3057-3066.
- [12] Blum S, Moore AN, Adams F, Dash PK. A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory[J]. *J Neurosci*, 1999, **19**(9):3535-3544.
- [13] Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, Paylor R, Sweatt

- JD. A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning [J]. *Learn Mem*, 1999, **6**(5): 478-490.
- [14] Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y. Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat [J]. *J Neurosci*, 1998, **18**(23):10037-10044.
- [15] Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders [J]. *N Engl J Med*, 1994, **330**(9):613-622.
- [16] Ouyang CH, Guo LJ, LU Q, Qu L. Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid on amino acids and calcium levels in rat brain of acute incomplete global cerebral ischemia [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2004, **18**(4):248-252.
- [17] Hu BR, Liu CL, Park DJ. Alteration of MAP kinase pathways after transient forebrain ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, **20**(7):1089-1095.
- [18] Wang X, Zhu C, Qiu L, Hagberg H, Sandberg M, Blomgren K. Activation of ERK1/2 after neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia [J]. *J Neurochem*, 2003, **86**(2):351-362.
- [19] Jones NM, Bergeron M. Hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain involves enhanced ERK1/2 signaling [J]. *J Neurochem*, 2004, **89**(1):157-167.

## Effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on learning and memory abilities in rats with focal cerebral ischemia and reperfusion injury

YANG Jing<sup>1\*</sup>, SHI Hai-Yan<sup>1</sup>, LI Ying<sup>1</sup>, WANG Hong-Xin<sup>2</sup>, JIN Ying<sup>2</sup>, LIU Chun-Na<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Molecular Biology and New Drug Research and Development, 2. Department of Pharmacology, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China)

**Abstract:** **AIM** To investigate the effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides (ROS) on learning and memory abilities in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury and its possible mechanism. **METHODS** Rat model of ischemia-reperfusion injury was established by 10 min ischemia-10 min reperfusion-10 min ischemia (I-R-I) of bilateral common carotid arteries and pretreated (ip) with sodium nitroprusside  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . The rats were given (ip) ROS ( $6.4, 32.0$  or  $160.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) once daily for 10 d (from 3 d prior to 7 d after I-R-I). On d 7-9 after I-R-I, learning and memory abilities of rats were tested by Morris water maze. On d 10 after I-R-I, hippocampal glutamate (Glu) content and hippocampal phospho-extracellular signal regulated kinase 2 (p-ERK2) expression were detected by HPLC and Western blot, respectively, after finishing Morris water maze test. **RESULTS** Compared with the sham group, learning and memory abilities of model group were decreased, hipp-

ocampal Glu content was increased, and hippocampal p-ERK2 expression was decreased significantly. ROS treatment significantly improved the learning and memory abilities of rat with I-R-I injury, decreased hippocampal Glu content, and increased hippocampal p-ERK2 expression. **CONCLUSION** ROS can improve learning and memory abilities of rats with I-R-I injury, which may be related with inhibiting the elevation of hippocampal Glu content and sustain the ERK2 signaling pathways.

**Key words:** *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides; cerebral ischemia; reperfusion injury; learning; memory; glutamates; extracellular signal-regulated kinase; hippocampus

**Foundation item:** The project supported by Key Laboratory of Molecular Biology and New Drug Research and Development of Liaoning Province (2006LY07); Science Research Project of Education Department of Liaoning Province (20060528)

\* Corresponding author.

(本文编辑 董立春)

