

稀土 La^{3+} 跨 PC12 细胞膜行为研究*

朱卫华¹⁾ 王金晞²⁾** 李海山²⁾ 陈瑶²⁾

(¹⁾镇江医学院无机化学研究室, 镇江 212001; ²⁾南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 使用 AR-CM-MIC 阳离子测定系统, 发展 Fura-2 荧光测定技术, 将其应用于测定细胞内游离稀土离子 La^{3+} , 并以此研究了 La^{3+} 跨 PC12 细胞 (大鼠嗜铬细胞瘤细胞) 膜的行为. 结果表明: 在模拟细胞内离子组分, pH=7.05 的溶液中, 测得 La^{3+} -Fura-2 的表现解离常数为 $3.27 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 对于 PC12 细胞, 静息条件下 La^{3+} 不能跨越细胞膜进入胞内. 与钙离子通道相关的 KCl 和去甲肾上腺素均不能刺激稀土 La^{3+} 过膜. 用哇巴因 (ouabain) 使胞内 Na^+ 超载后, La^{3+} 可过膜进入细胞内, 且过膜量与胞外 La^{3+} 浓度和胞内 Na^+ 超载程度有一定的浓度依赖关系, 提示 La^{3+} 可以经由 $\text{Na}^+/\text{La}^{3+}$ 交换机制过膜而进入细胞内.

关键词 Fura-2, 稀土, La^{3+} , $\text{Na}^+/\text{La}^{3+}$ 交换机制

学科分类号 O614.32

随着稀土的广泛应用, 已使其越来越多地进入环境和食物链. 因此稀土的生物效应尤其是其毒理作用, 是迫切需要解决的基础研究课题之一^[1]. 从细胞水平研究稀土的跨膜行为是较为直接的方法. 稀土离子与钙离子的理化性质较相似, 但稀土离子有更大的离子势, 故对一般生物配体其结合常数更大. 生物实验中常用 La^{3+} 作为钙通道阻断剂, 用 Tb^{3+} 作为离子探针研究细胞膜上的结合 Ca^{2+} . 大量的实验未观察到稀土离子进入健康活细胞^[2], 而 Wendt-Gallitalli 等^[3]用更灵敏的 X 射线微探针技术却检测到了胞内的 La^{3+} ; Peeters 等^[4]应用 Indo-1 荧光技术也观察到心肌细胞 La^{3+} 内流现象. 总之, 稀土离子跨膜行为的研究结果随方法的不同而有明显差异. 荧光探针 Fura-2 以往用于测定胞内游离 Ca^{2+} 浓度^[5], 在研究中我们尝试用于测定细胞内游离稀土 La^{3+} 离子浓度, 发现其灵敏度高, 检测方便, 测量过程对细胞无损伤. 并通过观察胞内 La^{3+} 浓度的动态变化, 探讨了其跨膜机制.

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

AR-CM-MIC 型单细胞阳离子测定系统 (美国 SPEX 公司产品); Diaphor-TMP 型倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司产品); 1815 TC 型 CO_2 培养箱 (美国 Shelter 公司产品) RF540 荧光分光光度计 (日本 Shimadzu 公司产品); pH-S-3C 型酸度计 (上海雷磁仪器厂产品). Fura-2 钾盐、Fura-2/AM 和 HEPES 均为美国 Sigma 公司产品, 小牛血清为国

产生化试剂. 其余各试剂为国产分析纯, 所有溶液用双蒸水配制. PC12 细胞株由上海药物研究所提供.

1.2 La^{3+} -Fura-2 配合物体系荧光光谱图测定

模拟细胞内溶液 A, 各组分浓度如下 (单位: $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): KCl 120.0, NaCl 20.0, MgCl_2 1.0, HEPES 10.0, EGTA 1.00, Fura-2 0.25×10^{-3} , 并用 KOH 调节 pH 值至 7.05. 稀土 La^{3+} 溶液 B 中除含 La^{3+} $8.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外, 其他各组分同溶液 A. 取溶液 A 10.00 ml, 依次向其中加入 0、1.14、0.060、0.030、0.020、0.015、0.015、0.020、0.030、0.040、0.10 ml 的溶液 B, 每次加入溶液 B 后均用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH 溶液调节 pH 至 7.05, 在发射波长 505 nm、激发波长 300~400 nm 测定荧光激发光谱.

1.3 PC12 细胞培养

经复苏后的 PC12 细胞接种于 25 ml 培养瓶中, 置于 CO_2 培养箱中培养 (37°C 、5% CO_2). 隔日更换培养液, 培养液的成分如下: CMEM 90%, 小牛血清 10%, 青霉素 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 链霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 为 7.2~7.4. 待细胞铺满瓶底, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 消化完全后加入 DMEM + 10% 小牛血清终止消化, 用吸管吹打均匀, 接种入六孔培养板 (内含预先用 0.1% 多聚赖氨酸 (Poly-L-Lysine) 处理的载玻片) 中. 培养 24 h 后

* 国家自然科学基金资助项目 (29271022).

** 通讯联系人.

Tel: 025-3594163, E-mail: wangjx@netra.nju.edu.cn

收稿日期: 2000-06-22, 接受日期: 2000-08-23

用于细胞内离子浓度测定^[6].

1.4 细胞内游离 La³⁺ 浓度 ([La³⁺]_i) 测定

荧光染料 Fura 2/AM 溶液 (溶于二甲亚砜, 浓度 0.5 mmol·L⁻¹) 10 μl 和灭活小牛血清 0.1 ml 混合均匀, 经超声波振荡 5 min, 加至 0.9 ml 无钙 Hepes 液中, Fura 2/AM 终浓度为 5 μmol·L⁻¹. 无钙 Hepes 液各组分 (单位: mmol·L⁻¹): NaCl 140.0, KCl 4.7, MgCl₂ 1.2, 葡萄糖 10.0, Hepes 10.0, EGTA 0.1, 外加灭活小牛血清 0.2%, 用 NaOH 调节 pH 至 7.4. 贴壁培养的细胞载玻片浸泡在负载溶液中 (可以根据需要在负载液加入哇巴因溶液), 37℃ 培育 20 min, 让荧光染料充分进入细胞, 随后取出载玻片在无钙 Hepes 溶液中浸泡 10 min 左右, 让 Fura 2/AM 水解, 再用无钙 Hepes 溶液洗二次, 在阳离子测定系统上测定单个细胞的荧光强度. 激发波长为 340 nm 和 380 nm, 发射波长为 505 nm. 在一定时刻内用微量进样器小心加入一定体积、浓度的 La³⁺ 溶液, 观察它对所测细胞内的荧光影响.

2 实验结果

2.1 Fura 2 荧光光谱和 Fura 2 配合物的解离常数

Fura 2 在不同浓度的 La³⁺ 溶液中, 其荧光发光谱如图 1 所示. 图 1 中各试液的游离 La³⁺ 浓度 ([La³⁺]_i) 是通过加入 1.00 × 10⁻³ mol·L⁻¹ EGTA 作为缓冲, 由所加入的金属离子总浓度计算出来. 根据 EGTA 的四级酸式解离常数和它们与 La³⁺ 的结合常数^[7], 在生理条件 pH = 7.05 条件下, EGTA 和 La³⁺ 的表观结合常数为 10^{11.6}. 当加入 La³⁺ 的总浓度 *c* (La³⁺) 小于 EGTA 的总浓度 *c* (EGTA) 时, La³⁺ 绝大部分形成 La³⁺-EGTA, 由于 Fura 2 的总浓度 < *c* (EGTA), 故 [La³⁺-Fura 2] < [La³⁺-EGTA], 因此可认为平衡时, [La³⁺-EGTA] = *c* (La³⁺), [EGTA] = *c* (EGTA) - *c* (La³⁺), 本实验 *c* (EGTA) 为 1.00 × 10⁻³ mol·L⁻¹, 则: [La³⁺]_i = { *c* (La³⁺) / (1.00 × 10⁻³ - *c* (La³⁺)) } × 10^{-11.6}; 当加入 La³⁺ 的总浓度 *c* (La³⁺) 大于 EGTA 的总浓度 *c* (EGTA) 时, 且 *c* (La³⁺) - *c* (EGTA) ≫ Fura 2 总浓度时, 则 [La³⁺]_i = *c* (La³⁺) - *c* (EGTA). 因此只要知道加入 La³⁺ 的浓度 *c* (La³⁺), 即可知平衡时游离 La³⁺ 的浓度 ([La³⁺]_i). 图 1 中在 340 nm 处从下向上各试液 [La³⁺]_i 分别为 0、0.225 × 10⁻¹⁰、0.300 × 10⁻¹⁰、0.378 × 10⁻¹⁰、0.461 × 10⁻¹⁰、0.533 × 10⁻¹⁰、0.601 × 10⁻¹⁰、0.687 × 10⁻¹⁰、

0.861 × 10⁻¹⁰、1.34 × 10⁻¹⁰、4.51 × 10⁻¹⁰ mol·L⁻¹ 和 4.95 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹. 图 1 用希尔 (Hill) 作图法来处理. 即将 lg (Fura 2-bound/Fura 2-free) 对 lg [La³⁺]_i 作图, 得一直线 (图 2). 该直线的斜率表示 Fura 2 与金属离子配位时的计量关系, 而在 *x* 轴上的截距则为两者的解离常数, 其倒数为结合常数. 其中:

$$\lg \left[\frac{\text{Fura 2-bound}}{\text{Fura 2-free}} \right] = \lg \left[\frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \times \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right]$$

其值可由图 1 得到. *R* 为加入定量 La³⁺ 后 340 nm/380 nm 荧光比值; *R*_{min} 为完全不含 La³⁺ 时 340 nm/380 nm 荧光比值, 即最小值, *R*_{max} 为 Fura 2 被 La³⁺ 所饱和时的 340 nm/380 nm 荧光比值, 即最大值; *S*_{f2}/*S*_{b2} 为自由态 Fura 2 与 La³⁺-Fura 2 在 380 nm 处荧光强度之比.

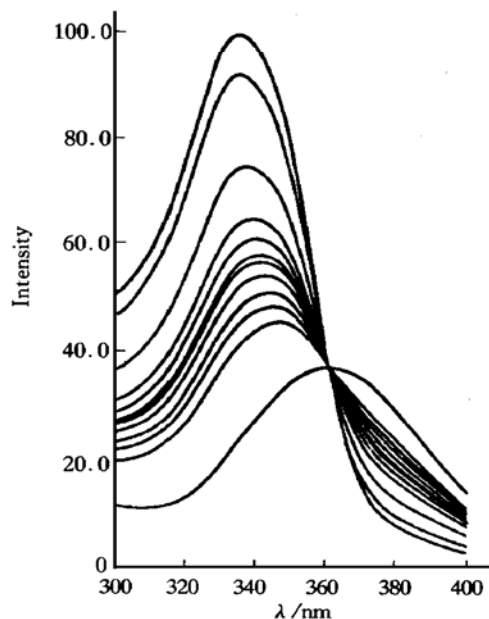


Fig. 1 Excitation fluorescence spectrum of Fura 2 with different La³⁺ concentration

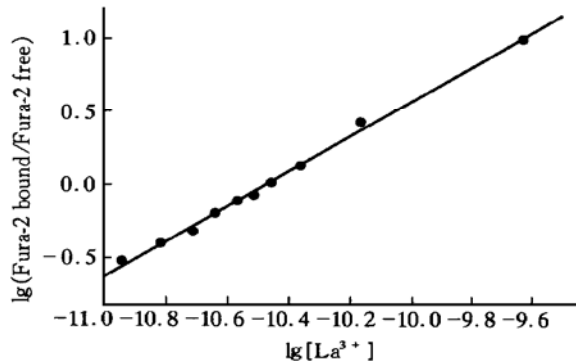


Fig. 2 Relationship of lg (Fura 2-bound/Fura 2-free) to lg [La³⁺]_i

由图 2 直线知该配合物解离常数为 $K_d = 3.27 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.2 胞内 La^{3+} 浓度 ($[\text{La}^{3+}]_i$) 计算

Fura2 可以和许多二、三价金属离子整合. 通常情况下, 由于在细胞内除了 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 外, 基本不含其他多价金属离子; 而 Fura2 结合 Mg^{2+} 的能力远小于 Ca^{2+} , 所以通常在细胞内 Fura2 仅和 Ca^{2+} 结合. 但如细胞内存在 La^{3+} 等稀土离子时, Fura2 也会和这些离子结合. 由图 1 可见, 当 Fura2 和 La^{3+} 结合后其荧光激发光谱最大吸收峰的位置向短波方向移动, 且峰强度也明显增大. 即当溶液中 La^{3+} 浓度增大时, Fura2 在 340 nm 和 380 nm 处的荧光比值 R 就升高, 同时 $R_{\max}(\text{La}^{3+}) > R_{\max}(\text{Ca}^{2+})$, 所以可以根据 Fura2 荧光比值 R 的变化来测定溶液中的 La^{3+} 浓度, 且灵敏度高于检测 Ca^{2+} 浓度.

当以 Fura2 来检测细胞内微量 La^{3+} 等稀土金属离子时, 必须考虑到细胞中还存在着 Ca^{2+} . 由于在实验过程中细胞培养液中无 Ca^{2+} , 可以认为在实验中细胞内 Ca^{2+} 浓度基本不变. 在用 Fura2 测定时, 如无 La^{3+} 进入细胞内, 则 R 不会发生明显变化; 如有 La^{3+} 进入细胞内, 则 Ca^{2+} 和 La^{3+} 同时和 Fura2 作用, 使 R 值升高. 用类似于 Tomsig 等^[8]的方法, 可推导出细胞内 La^{3+} 的浓度与荧光比值的定量关系:

$$[\text{La}^{3+}]_i = K_d \times \frac{(R_a - R_b)(R_{\max\text{Ca}} - R_{\min})}{(R_{\max\text{La}} - R_a)(R_{\max\text{Ca}} - R_b)} \times \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

上式中 R_b 、 R_a , 分别为加入 La^{3+} 前后 340 nm 和 380 nm 处的荧光比值, $R_{\max\text{Ca}}$ 、 $R_{\max\text{La}}$ 分别为 Fura2 被 Ca^{2+} 和 La^{3+} 饱和时的荧光比值, 而 R_{\min} 为自由态 Fura2 荧光比值. 可见: 加入 La^{3+} 前后荧光比值的变化 ($R_a - R_b$) 的大小即表示了细胞内游离 La^{3+} 浓度的高低.

2.3 La^{3+} 跨 PC12 细胞膜的实验结果

2.3.1 静息状态下的实验结果: 静息状态下, 35 ~ 37°C 时在负载 Fura2 后正常 PC12 细胞外液中分别加入 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 La^{3+} 后, 在 340 nm 和 380 nm 的荧光强度均不发生变化, 说明在此条件下 La^{3+} 不能通过细胞膜内流.

2.3.2 钾离子去极化时的实验结果: 实验观察了 10、25、55、75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 对 La^{3+} (浓度分别为: 0.02、0.5、1.0、4.0、10.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

过膜行为的影响, 结果表明无论向细胞外液中先加入 La^{3+} 再加入 KCl 还是先加入 KCl 再加入 La^{3+} , K^+ 均不能刺激 La^{3+} 通过 PC12 细胞膜.

2.3.3 去甲肾上腺素作用下的实验结果: 去甲肾上腺素可以作用于细胞膜上受体依赖性钙通道, 而使得细胞外钙内流, 引起内钙升高^[9], 本实验结果表明它不能促使 La^{3+} 过膜.

2.3.4 离子载体 Ionomycin 作用下的实验结果: Ionomycin 是一种 Ca^{2+} 载体^[10], 实验证明它也能运载 La^{3+} . 因此可通过加入 Ionomycin 将胞外 La^{3+} 载入胞内, 使 Fura2 全部和 La^{3+} 结合以测得 $R_{\max\text{La}}$ (需加入较高浓度的 Ionomycin, 为 150 ~ 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$). 八个样本的平均结果为 $R_{\max\text{Ca}} = 8.1 \pm 1.9$, $R_{\max\text{La}} = 10.4 \pm 2.2$, $R_{\min} = 0.55 \pm 0.08$.

2.3.5 哇巴因 (ouabain) 作用下的实验结果: 当细胞在以 Fura2 负载时, 加入微摩尔量级的哇巴因同时进行钠负载, 在观察单细胞荧光强度时, 加入 La^{3+} (毫摩尔量级) 后胞内荧光比值有明显变化 (图 3), 由于实验条件下细胞外液中无 Ca^{2+} , 因此该变化提示为 La^{3+} 通过细胞膜进入细胞内而与 Fura2 结合所致. 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 哇巴因进行钠负载的结果示于图 3 中, 从下向上四条曲线的胞外 La^{3+} 浓度依次为 0.16、0.33、0.75、1.6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (每条曲线均为六次实验的平均结果, 20 s 处加入 La^{3+} 溶液), 而在胞外加入更多 La^{3+} 后未见荧光比值明显升高. 根据 2.2 节计算公式得出 $[\text{La}^{3+}]_i$, 结果示于图 4. 用于钠负载的哇巴因浓度变化时, $[\text{La}^{3+}]_i$ 也随之变化. 在不同

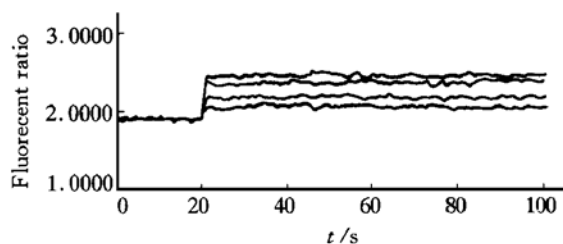


Fig. 3 Effect of La^{3+} on Fura 2 fluorescence

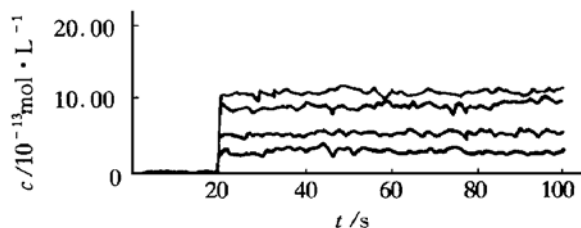


Fig. 4 Effect of $[\text{La}^{3+}]_o$ on $[\text{La}^{3+}]_i$

哇巴因浓度条件下改变细胞外液中 La^{3+} 浓度 ($[\text{La}^{3+}]_o$), 测得 $[\text{La}^{3+}]_i$ 结果见图 5 (图中曲线从下向上哇巴因浓度分别为 25、50、75、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图中每点均表示为 $\bar{x} \pm s$, $n=6$).

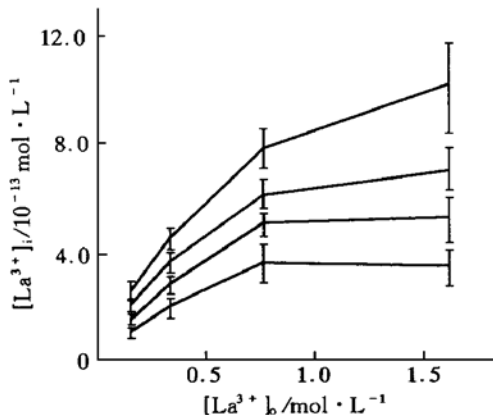


Fig. 5 Relationship of $[\text{La}^{3+}]_i$ on $[\text{La}^{3+}]_o$ with different ouabain concentrations

3 讨 论

实验结果表明, 在静息状态细胞外高离子浓度时、钾刺激以及去甲肾上腺素作用下, 均不能观察到有 La^{3+} 过膜. 而同样条件下, 都会引起细胞外 Ca^{2+} 的内流. 提示在实验条件下, La^{3+} 不能经由电压依赖性钙通道或受体依赖性钙通道进入细胞内. 这可能是由于 La^{3+} 与 Ca^{2+} 半径相近, 但 La^{3+} 电荷高于 Ca^{2+} , 因而 La^{3+} 比 Ca^{2+} 有更强的结合能力, 取代了细胞膜外表面键合的 Ca^{2+} , 更强地连接到钙通道连接点上, 从而阻断了电压依赖性钙通道或受体依赖性钙通道, 也阻止了 La^{3+} 自身通过钙通道进入细胞内. 另一方面, 实验结果也表明 La^{3+} 还可借助于离子载体 Ionomycin 的作用过膜, 但所需载体浓度则较大.

实验结果还表明在哇巴因作用下, La^{3+} 可通过细胞膜进入细胞内. 哇巴因可以抑制 Na^+/K^+ -ATP 酶的作用, 使 Na^+/K^+ 交换缺乏能量而受到抑制, 增加细胞内 Na^+ 浓度, 进而增加 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高. 在本实验条件下细胞外液中无钙, 则可能是细胞外液中的 La^{3+} 取代 Ca^{2+} 进入细胞内, 可称这种作用为 $\text{Na}^+/\text{La}^{3+}$ 交换. $[\text{La}^{3+}]_i$ 随 $[\text{La}^{3+}]_o$ 增大而升高, 且在 $[\text{La}^{3+}]_o$ 大于 1.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后 $[\text{La}^{3+}]_i$ 不再明显增加. 表明 $[\text{La}^{3+}]_i$ 的大小在一定范围内受 $[\text{La}^{3+}]_o$ 的影响, 但在 $[\text{La}^{3+}]_o$ 大于 1.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后达到饱和. 而

$[\text{La}^{3+}]_i$ 随哇巴因浓度增加而升高, 则进一步说明 La^{3+} 可能是通过 $\text{Na}^+/\text{La}^{3+}$ 交换机制进入细胞内的. 因为哇巴因是用于进行细胞内钠负载的, 其浓度增加导致细胞内钠浓度的增加, 从而增加了通过 $\text{Na}^+/\text{La}^{3+}$ 交换进入细胞内的 La^{3+} 的量. 此结果与我们研究稀土 Y^{3+} 的跨膜行为^[11] 及杨频等的工作^[12] 所得结论一致, 也与 Peeters^[4] 和 Powis 等^[13] 的工作相互印证.

参 考 文 献

- 1 倪嘉缙. 稀土生物无机化学. 北京: 科学出版社, 1995. 前言 Ni J Z. Bioinorganic Chemistry of Rare Earth. Beijing: Science Press, 1995. preface
- 2 Mead R H, Clusin W T. Paradoxical electromechanical effects of lanthanum ions in cardiac muscle cells. *Biophys J*, 1985, **48** (5): 695~ 700
- 3 Wendt-Gallitelli M F, Isenberg G. Extra- and intra-cellular lanthanum: modified calcium distribution, inward currents and contractility in guinea pig ventricular preparations. *Pfluegers Arch*, 1985, **405** (4): 310~ 322
- 4 Peeters G A, Kohmoto O, Barry W H. Detection of La^{3+} influx in ventricular cells by indo-1 fluorescence. *Am J Physiol*, 1989, **256** (2): C351~ C357
- 5 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, **260** (6): 3440~ 3450
- 6 Jackson G R, Apffel L, Werrbach P K. Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury I Stimulation of hydrogen peroxide resistance. *Journal of Neuroscience Research*, 1990, **25** (3): 360~ 368
- 7 Martell A E, Smith R M. Critical Stability Constants. New York: Plenum, 1974. 269
- 8 Tomsig J L, Suszkiw J B. Pb^{2+} -induced secretion from bovine chromaffin cells: fura-2 as a probe for Pb^{2+} . *Am J Physiol*, 1990, **259** (4): C762~ C768
- 9 Bond M, Kitazawa T, Somolyo A P. Release and re-cycling of calcium by the sarcoplasmic reticulum in guinea pig portal vein smooth muscles. *J Physiol (Lond)*, 1984, **355**: 677~ 695
- 10 Toeplitz B K, Cohen A I, Phillip T F. Structure of Ionomycin A novel diacidic polyether antibiotic having affinity for calcium ions. *J Am Chem Soc*, 1979, **101** (12): 3344~ 3353
- 11 李海山, 王金晔, 朱卫华, 等. Fura-2 探针对于稀土 Y^{3+} 跨 PC12 细胞膜行为研究. *无机化学学报*, 1999, **15** (1): 83~ 88 Li H S, Wang J X, Zhu W H, et al. *WuJiHuaXueXueBao*, 1999, **15** (1): 83~ 88
- 12 杨 频, 韦天新, 王金晔, 等. 利用荧光浓度指示剂 fura-2 研究稀土粒子的跨膜行为. *化学学报*, 1997, **55** (9): 901~ 906 Yang P, Wei T X, Wang J X, et al. *Acta Chimica Sinica*, 1997, **55** (9): 901~ 906
- 13 Powis D A. Lanthanum can be transported by the sodium-calcium exchange pathway and directly triggers catecholamine release from bovine chromaffin. *Cell Calcium*, 1994, **16** (5): 377~ 390

Research on Transmembrane Behaviors of La^{3+} to PC12 Cells*

ZHU Wei Hua¹⁾, WANG Jir-Xi^{2)**}, LI Hai-Shan²⁾, CHEN Yao²⁾

¹⁾ Zhenjiang Medical College, Zhenjiang 212001, China;

²⁾ State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract By the use of the applied research cation measurement system, Fura-2 fluorescence measurement method was forwarded to detect the intracellular La^{3+} concentration, and used for investigating the transmembrane behaviors of La^{3+} to PC12 cells. An apparent dissociation constant of La^{3+} -Fura-2 was $3.27 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in solutions simulating intracellular ionic composition, with pH 7.05. La^{3+} could not enter PC12 cell under the normal condition, and also could not enter the cell via the calcium channel stimulated by KCl and norpinephrine. However La^{3+} entered PC12 cell after Na^+ within the cell were overloaded using ouabain. Amount of La^{3+} entering PC12 cell were related to both outer cellular La^{3+} concentration and intracellular overloaded Na^+ concentration. It is suggested that La^{3+} enter the cell in $\text{Na}^+ / \text{La}^{3+}$ exchanging mechanism.

Key words fura-2, rare earth, La^{3+} , $\text{Na}^+ / \text{La}^{3+}$ exchanging mechanism

* This work was supported by a grant from National Natural Science Foundation of China (29271022).

** Corresponding author. Tel: 86-25-3594163, E-mail: wangjx@netra.nju.edu.cn

Received: June 22, 2000 Accepted: August 23, 2000