

快中子辐照对枯草芽孢杆菌DNA损伤研究*

陈晓明^{1,2} 谭碧生¹ 郑春³ 张建国¹ 王丹¹ 楚士晋¹ 任正隆^{2;1)}

1 (西南科技大学 绵阳 621010)

2 (四川农业大学 雅安 625000)

3 (中国工程物理研究院核物理与化学研究所 绵阳 621900)

摘要 采用脉冲场凝胶电泳技术检测并定量分析了CFBR-II快中子脉冲堆产生的快中子在不同剂量和剂量率条件下,对枯草芽孢杆菌黑色变种(ATCC 9372)DNA双链断裂的诱导.通过DNA释放百分比PR值、DNA断裂水平L值、断裂DNA平均分子量和DNA片段分布等指标的分析,结果表明:在不同的辐射条件下,DNA片段均明显分布于两个区域,表明枯草芽孢杆菌黑色变种DNA分子上可能存在对快中子辐射较为敏感的位点;并且随着中子辐射剂量和剂量率的变化,DNA释放百分比PR值、DNA断裂水平L值和各片段区双链断裂的含量也会发生一定规律性的变化.

关键词 DNA双链断裂 脉冲场凝胶电泳 枯草芽孢杆菌黑色变种 CFBR-II快中子脉冲堆 辐照热点

1 引言

中子是电离辐射粒子中的一种,是原子核的组成部分.在辐射防护中,中子按能量可划分为:热中子(<0.4eV)、慢中子(1—10eV)、中能中子(几百eV—500keV)、快中子(500keV—20MeV)和高能中子(>20MeV).中子质量与质子的质量大约相等,并且中子与 γ 射线一样也不带电.因此,中子与原子核或电子之间没有静电作用.当中子与物质相互作用时,主要是和原子核内的核力相互作用,与外壳层的电子不会发生作用.中子向生物组织传递能量主要是通过产生氢反冲核,释放出大量能量,对各种生物活性分子造成不可修复的损伤.

电离辐射可导致生物DNA发生各种损伤,主要包括碱基损伤和链断裂,后者又有单链断裂(single-strand breaks, SSBs)和双链断裂(double-strand breaks, DSBs)两种形式.其效应可能是直接的^[1],即当生物体受到电离射线照射时,构成生物体的原子吸收足够的放射线能量后呈激发状态,当激发能高于分子电离电位时,则分子发生电离.分子激发能

又可转化为化学键振动能,当振动能超过键能时,则激发态分子的共价键断裂,而生成自由基.化学键振动能既可使键能较高的共价键断开,更可使键能低的氢键、疏水键和范德华力等键断开而直接破坏生物体的分子结构.或间接的,即水等分子受照射后分解为化学活性很强的自由基如H·, OH·等,这些自由基扩散,攻击维持生命的分子,起了破坏作用,从而致使生物体损伤或死亡.在电离辐射所致DNA分子的这些损伤中,DSBs是辐射所致生物效应中最重要原初损伤,而非重接性的DSB则被认为是细胞杀伤效应的最重要的损伤.因此,以DSBs为出发点,研究电离辐射所致DNA分子的损伤有利于研究辐射诱发的后期生物学效应.

DNA双链断裂的检测方法很多,各种检测法均有其一定的优越性和适用范围,近年来应用较多并日益受到重视的方法有原位杂交法、彗星试验(单细胞电泳法)以及高效毛细管电泳法和脉冲场凝胶电泳法等^[2].脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)是近年发展起来的一种分离大分子DNA的新技术,自从Schwartz等在1984年首次报道用此技

2006-10-19 收稿

* 中国工程物理研究院预研项目(052056),四川省教育厅(2005C13)和西南科技大学引进人才项目基金(051103)资助

1) 通讯作者, E-mail: cxmhyx99@163.com

术分离酵母细胞完整染色体DNA以后,这一技术就被广泛用于大分子DNA的研究.它通过定期改变脉冲电流方向,迫使DNA断片在凝胶电场的移动过程中周期性地改变移动方向,从而达到分离大分子DNA的目的.脉冲场凝胶电泳可以分离高达10Mbp的DNA分子,这为我们研究大分子生物的DNA双链断裂提供了一种敏感的研究方法.

2 材料和方法

2.1 样品制备

枯草芽孢杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis* var. *niger*, ATCC 9372)购于中国普通微生物菌种保藏中心,培养于营养肉汁液体培养基上.将枯草芽孢杆菌芽孢悬液置于45℃的水中水浴24h,使菌自溶断链,分散成单个芽孢.离心,PBS洗涤两次,PBS调整菌体浓度为 10^{10} cfu/mL,cfu为菌落数(colony-forming units).分装于2mL细胞冻存管(PP材料,AXYGEN),保存于4℃冰箱中备用.

2.2 快中子辐射源

本次实验在中国工程物理研究院核物理与化学研究所的CFBR-II快中子脉冲堆上进行.CFBR-II堆是一个以浓缩铀为活性区,以贫化铀和铜为反射层的快中子脉冲堆.其中子能谱近似裂变谱(见图1),堆外平均能量为1.12MeV.该堆可以在两种状况下运行,一是超瞬发临界的脉冲状况运行;二是如一般反应堆的缓发临界的稳定功率运行.在稳定功率运行时,中子注量率不随时间而变化,爆发脉冲时中子注量率随时间呈脉冲式变化^[3].本次实验是在稳定功率状态下运行.中子注量的测量采用硫活化片和金活化片同时进行.

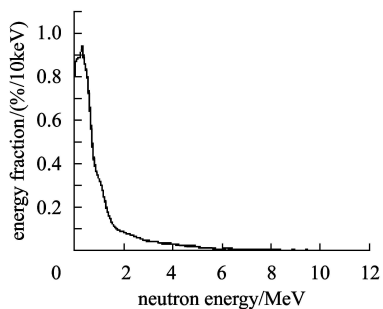


图 1 CFBR-II 中子能谱

2.3 辐照

1) 中子剂量对DSBs的影响研究:在中子剂量率为7.40Gy/min,剂量分别为200,400,555,800,2000,

4000Gy下,常温辐照样品.每个处理3个重复,同时设空白对照.下同.

2) 中子剂量率对DSBs的影响研究:在中子剂量为800Gy,剂量率分别为1.48,7.4,21.2,39.2Gy/min下辐照样品.

2.4 样品处理^[2]

1) 样品包埋:取30 μ L辐照过的芽孢悬液与等体积的2%低熔点琼脂糖(Takara公司产品)50℃混匀后取40 μ L混合液注入制胶模槽中,胶块体积6mm \times 1.5mm \times 4.4mm,置于4℃冰箱中15min后取出.将凝固的胶块从模槽中捅出.

2) 去壁:将每个样品胶块分别加入500 μ L含1mg/mL溶菌酶(上海伯奥)的100mmol EDTA溶菌液中,37℃恒温培养箱中孵育过夜.

3) 裂解:吸出溶菌酶溶液,然后向其中加入细胞裂解液(1% SDS,0.5mol/L EDTA,0.01mol/L Tris-HCl,0.1mg/mL蛋白酶K(Merck公司产品),0.02mol/L NaCl),50℃处理24h.

4) 去蛋白:吸出裂解液,加入250 μ L含1mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟,Beyotime公司产品)的TE缓冲液(1mmol EDTA,10mmol Tris,pH8.0),50℃处理2次,每次2h.然后用TE缓冲液洗胶块3次,每次不少于30min,而后将胶块置于0.5mol/L EDTA(pH8.0)中,4℃冰箱保存备用.

2.5 电泳

称取1g脉冲场专用琼脂糖(Pulse Field Certified Agarose,Bio-Rad公司产品),加入到100mL0.5 \times TBE(Tris Borate EDTA)缓冲液中,煮沸至透明澄清.装配好灌胶框,将DNA样品胶块粘在梳齿的外侧,将煮沸的琼脂糖溶液,冷却后倒入灌胶框中.静置15min,待胶完全凝固后,拔去梳子.将制好的凝胶转移到电泳槽中,加入0.5 \times TBE缓冲液,在脉冲场电泳仪(CHEF MAPPERTM,Bio-Rad公司产品)上进行电泳.设置电泳条件为6V/cm,脉冲角度120°,电泳温度14℃,电泳时间8h.标准DNA采用1—10kbp的DNA marker(Takara公司产品)和225kbp—2.2Mbp的酵母染色体DNA(Bio-Rad公司产品).

2.6 染色与分析

电泳后的凝胶放入5 μ g/mL的溴化乙锭溶液中染色20—30min,然后在Geldoc图像仪上照相并观察图谱.利用Quantity One凝胶定量软件对所得到的电泳图片进行光密度扫描与定量分析.

3 结果与分析

3.1 不同剂量中子辐照对DSBs的影响研究

图2是枯草芽孢杆菌在不同剂量中子辐照后, DNA经脉冲场凝胶电泳处理, 采用凝胶成像系统分析的荧光扫描结果. 为了使不同剂量的荧光强度曲线能清楚地显示出来, 随剂量的增加, 各剂量荧光强度曲线的荧光强度逐步增加200个单位^[4].

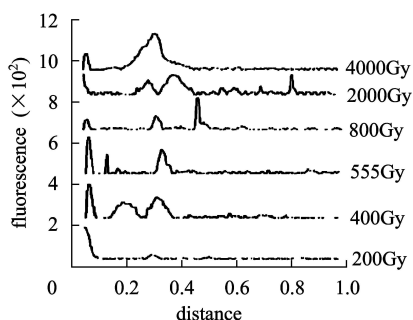


图2 不同剂量中子辐照后DNA片段荧光密度曲线

在剂量率为7.4Gy/min, 剂量分别为200, 400, 555, 800, 2000, 4000Gy时, DNA片段释放百分比(PR)随剂量的关系见图3. 从图中可看出, 当剂量小于2000Gy时, DNA释放百分比随着剂量的增加而线性增加, 相互关系满足方程 $Y = 0.0195X$, $r^2 = 0.9934$. 而当剂量上升为4000Gy时, PR 值反而有所下降, 这可能与DNA发生交联有关.

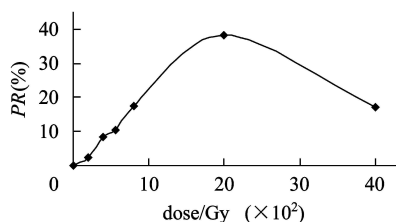


图3 中子辐照剂量对DNA释放百分比(PR)的影响

有报道认为辐射对DSB的诱导是随机性的, 即DNA片段呈随机分布态势, 但从电泳图发现, 辐照样品的DNA片段分布在50kbp区域附近有明显的分界点. 因此, 以50kbp为界对DNA片段大小分布进行了统计. 各区域的DNA片段含量见表1. 从表中可看出, 随着剂量的增加, 大片段DNA的含量逐渐减少, 小片段DNA含量逐渐增加, 从表1中还可看出, 随着剂量的增加, 大剂量照射下产生的DNA片段的平均分子量明显小于小剂量下产生的DNA片段的平均分子量. 这表明小剂量主要诱导大分子DNA片段产生, 大剂量则主要诱导小分子DNA片段产生. 这与周光明^[5, 6]等人报道的结果是相一致的.

表1 不同剂量中子辐照后的DNA片段分布

dose/ Gy	average molecular weight/kbp	>50kbp DNA content(%)	<50kbp DNA content(%)
200	5.03	29.33	4.94
400	4.62	27.14	12.51
555	4.77	24.92	16.58
800	4.96	23.52	24.83
2000	4.22	10.14	58.36
4000	3.40	9.1	38.8

DNA断裂水平 L 为^[7, 8]

$$L = PR/T, \quad (1)$$

式中 PR 为DNA释放百分比, T 为平均分子量(kbp), L 单位为DSBs·kbp⁻¹, 按照公式(1)可计算出 L , L 与剂量的关系如图4所示. 从图4中可看出, 当剂量小于2000Gy时, L 随着剂量的增加而线性增加, 相互关系为 $Y = 3 \times 10^{-5}X + 0.03$, $r^2 = 0.992$. 而当剂量上升到4000Gy时, L 值反而有所下降.

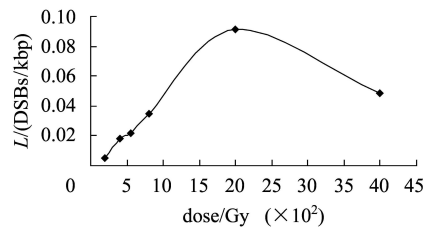


图4 中子辐照剂量对DNA断裂水平(L)的影响

3.2 不同剂量率中子辐照对DSBs的影响研究

图5是枯草芽孢杆菌经不同剂量率中子辐照后, DNA脉冲场凝胶电泳后荧光扫描结果. 与图2一样, 随剂量率的增加, 荧光强度逐步增加200个单位.

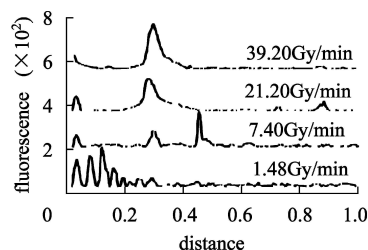


图5 不同剂量率中子辐照后DNA片段荧光密度曲线

当剂量为800Gy, 剂量率分别为1.48, 7.4, 21.2, 39.2Gy/min时, DNA释放百分比与剂量率的关系如图6所示, 从图中可看出, 当剂量率小于21.2Gy/min时, 随着剂量率的增加, PR 呈上升趋势, 但当剂量率上升到39.2Gy/min时, PR 值不再随剂量率的增加而增加, 反而有所下降. KOUFEN等在采用高剂量率(5.5, 24, 83Gy/min) X射线辐照膜脂和蛋白质时也出现了这种随剂量率的增加, 辐照对膜脂和蛋白质

的损伤反而降低的现象. 而在低剂量和低剂量率条件下, 这种辐照效应与剂量率相反的情况早有发现, 人们将这种现象称为反剂量率效应 (Inverse Dose-rate Effects). 究其原因, KOUFEN 等^[9]认为, 当剂量一定的条件下, 剂量率增加, 则辐射时间减小, 由此诱导产生的自由基和脂质过氧化物的量减少, 降低了辐射对生物大分子的间接作用.

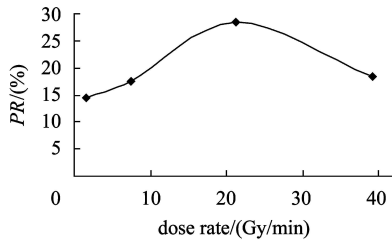


图 6 中子辐照剂量率对 DNA 释放百分比 (PR) 的影响

电泳图经荧光扫描后分析得到的 DNA 分布结果如表 2 所示, 从该表中可看出 DNA 仍分布于 >50kbp 和 <50kbp 两个区域, 且随着剂量率的增加大片段 DNA 的含量在减少, 小片段 DNA 的含量在增加, 而且从 DNA 片的平均分子量也可看出, 小剂量率产生的片段的分子量要大于大剂量下产生的片段的分子量, 这说明小剂量率主要产生大片段, 大剂量率主要产生小片段.

表 2 不同剂量率中子辐照后的 DNA 片断分布

dose rate/ (Gy/min)	average molecular weight/kbp	>50kbp DNA content(%)	<50kbp DNA content(%)
1.48	5.14	26.27	13.88
7.40	4.96	23.52	24.83
21.20	4.70	8.98	53.45
39.20	4.63	8.34	38.31

根据电泳扫描结果及公式 (1) 得到相同剂量不同剂量率条件下, DNA 断裂水平 L 与剂量率的关系如图 7 所示. 从图 7 中可看出, 当剂量率小于 21.2Gy/min 时, L 随着剂量率的增加而增加, 且 L 与剂量率之间有较好的线性关系. 但当剂量率上升到 39.2Gy/min 时, 与 PR 值类似, L 值反而有所降低.

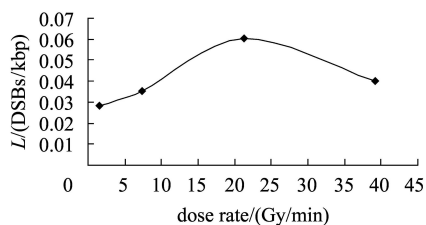


图 7 中子辐照剂量率对 DNA 断裂水平 (L) 的影响

4 讨论

4.1 脉冲场电泳的选择

获得完整的全基因组 DNA 是灵敏、准确地检测细胞 DNA 双链断裂的一个难题. 过去常用的诸如酚-氯仿抽提法、苯酚提取法、Marmur 法等由于染色体提取过程及提取后贮存在溶液里容易受到机械剪切力作用, 使染色体 DNA 断裂产生非特异性片段, 干扰实验结果. 为了解决这一问题, PFGE 采用琼脂糖包埋完整染色体 DNA 的原位提取法, 即将细菌包埋于琼脂糖胶块中, 经 SDS 及蛋白酶 K 等处理而得到纯净的 DNA 片段, 然后进行脉冲凝胶电泳, 从而提高了实验的准确性. 目前, 脉冲电场电泳仪 PFGE 已经能够对 5kbp—6Mbp 范围内的断裂片段的分布提供很好的测量结果.

影响脉冲场电泳效果的因素很多, 特别是电泳时间. 由于辐照后产生的 DNA 片段分子量大小的不确定性, 因此电泳时间的不同可能致使 DNA 片段的分离效果不一样. 电泳时间太长, 小分子量 DNA 片段容易跑出胶外; 电泳时间太短, 大分子量 DNA 可能无法从样品孔中进入凝胶. 在我们的实验中曾对电泳条件进行了探索, 初步确定了电泳条件为: 1% 胶浓度, 0.5×TBE 缓冲液, 电压为 6V/cm, 脉冲角度 120°, 电泳温度 14°C, 电泳时间 8h.

4.2 DSBs 的分布

长期以来, 人们一直将 DNA 看成是均匀的, 其损伤与修复也是随机的. 近年来的实验研究发现: 细胞内 DNA 的链断裂并不是随机的. 1996 年, 美国劳伦斯伯克利实验室的 Cooper 小组用高 LET 的重离子辐照细胞, 首次观察到了细胞内的染色体 DNA 的 DSB 片段的非随机分布现象^[8], 同年, 中国科学院近代物理所离子束应用生物实验室, 在采用重离子辐照黑色素瘤细胞中, 也观察到了 DNA 双链断裂片段的非随机分布现象, 并在 1997 年一次国际会议上报道了此结果^[10], 1997 年英国 Gray 实验室和德国 GSI^[11-13] 也报道了相似的研究结果. 对于 DSB 非随机分布的解释, 因为 Cooper 等人的实验对象是完整细胞, 所以他们认为细胞中 DNA 所处的高度有序的染色体结构和入射粒子的电离特性起着极其重要的作用. 中国科学院近代物理研究所周光明等研究了碳离子直接辐照哺乳动物细胞脱蛋白的 DNA 样品^[5] 和在完整细胞内的 DNA 样品^[14], 都发现了其 DSB 非随机分布现象. 周光明等

人的观点是:重离子辐照所沉积的能量可以直接或间接地沿DNA链迁移,从而导致链上相对较弱的或亲电性较高的化学键优先断裂,DSB片段的非随机分布可能与DNA的序列有关,即DNA分子上存在敏感位点.对于DSB非随机分布的现象,国外学者称之为DNA的“簇损伤”,有人认为DNA上存在辐照敏感性位点,也称其为DNA辐射损伤“热点”^[8].

在我们的实验研究中也发现DSBs的分布的非随机现象.不管辐射剂量高低,在分子量50kbp附近总会有一条条带.就其原因我们赞成周光明等人的观点,也许在枯草芽孢杆菌DNA上存在一个辐射敏感位点,在此位点首先发生DNA的断裂.但具体情况还需进一步的研究才能下结论.

4.3 DSB评估指标的选择

Pinto等人对 γ 射线和重离子诱导的哺乳动物细胞DNA的损伤和用脉冲场检测DNA损伤的定量分析方法等方面做了大量工作^[2];中国科学院近代物理研究所周光明等人在重离子诱导的DSB方面也做了大量研究,并提出了一种新的简洁的计算DNA断裂水平的方法——平均分子量法^[15].

DNA由于结合了EB而在紫外光下发射荧光,因此荧光强度是正比于DNA含量的,这样,通过对电泳图片进行光密度扫描就能得到各泳道进入胶中的DNA片段的含量即DNA释放百分比 PR 以及各片段区DNA片段的含量,从而得到DNA片段的分布. PR 值能直观地反映DNA受损伤的程度,但它只表示产生的DNA片段总含量,不能反映出DNA片段的分布,DNA断裂水平 L 能够全面地体现DNA片段的含量和

DNA片段的分布.因此,在我们的结果分析中采用了DNA释放百分比 PR ,DNA断裂水平 L 、平均分子量、各片段区DNA片段的含量等指标来全面的反映DNA双链断裂的情况.

4.4 中子射线对原核生物DNA的损伤研究

随着对中子认识的提高,采用中子辐照进行肿瘤治疗、诱变育种等的报道不断增加,而对这些真核生物DNA的损伤研究也比较多^[16, 17],但以原核生物为材料的研究较少.Lowy等^[18]在2001年曾对辐射的生物效应作了一个综述,发现除Singh等在1990年采用M13噬菌体为材料研究了加速器中子对其的作用效应外,还未见其他的报道.Lowy等采用流感病毒为材料研究了中子和 γ 射线的相对生物学效应,但仅限于辐射灭活效应和蛋白质的变化上进行比较,而对核酸链的断裂并未研究.我们拟进一步研究 γ 射线对芽孢杆菌DSB的损伤特点,并在DNA水平比较中子和 γ 射线对原核生物作用的相对生物学效应.

5 结论

本研究考察了不同剂量和剂量率的快中子辐照对枯草芽孢杆菌黑色变种DNA的损伤效应,通过对DNA释放百分比 PR 值、DNA断裂水平 L 值、断裂DNA平均分子量和DNA片段分布四方面进行分析,结果发现 PR 值、 L 值都具有剂量、剂量率效应,DNA片段呈非随机分布.这说明枯草芽孢杆菌DNA上可能存在辐照敏感位点,还有待继续研究.

参考文献(References)

- XIA Shou-Xuan. Radiobiology. Beijing: The Academy of Military Medical Sciences Press, 1998. 190—198 (in Chinese)
(夏寿萱主编.放射生物学.北京:军事医学科学出版社,1998.190—198)
- Pinto M, Prise K M, Michael B D. Int. J Radiat Biol., 2002, **78**(5): 375—388
- ZHENG Chun, LI Jian-Sheng, WU Jian-Hua. Nuclear Electronics & Detection Technology, 2001, **21**(4): 307—309 (in Chinese)
(郑春,李建胜,吴建华.核电子学与探测技术,2001, **21**(4): 307—309)
- ZANG Li-Hui, WEI Zhi-Yong, LI Ming et al. Chin. J Hemorrh, 2005, **15**(2): 193—196 (in Chinese)
(臧黎慧,魏志勇,李明等.中国血液流变学杂志,2005, **15**(2): 193—196)
- ZHOU Guang-Ming, LI Wen-Jian, WANG Ju-Fang et al. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2001, **19**(4): 289—294 (in Chinese)
(周光明,李文建,王菊芳等.辐射研究与辐射工艺学报,2001, **19**(4): 289—294)
- SUI Li, ZHAO Kui, NI Mei-Nan et al. HEP & NP, 2004, **28**(10): 1126—1130 (in Chinese)
(隋丽,赵葵,倪媚楠等.高能物理与核物理,2004, **28**(10): 1126—1130)
- Nikjoo H, Nell P O, Wilson W E et al. Radiation Research, 2001, **156**: 577—583
- Rydberg B. Radiation Research, 1996, **145**: 200—209
- Koufen P, Brdiczka D, Stark G. Int. J. Radiat. Biol., 2000, **76**(5): 625—631
- WEI Zeng-Quan, ZHOU Guang-Ming, WANG Ju-Fang et al. In: Book of Abstracts in 6th Workshop on Heavy-Charged Particles in Biology and Medicine. Carbon Ion Induced DNA Double-Strand Breaks in Melanophore B16.

- Baveno, Italy. 1997. 7
- 11 Sutherland B M, Bennett P V, Sidorkina O et al. *Biochemistry*, 2000, **39**(27): 8026—8031
- 12 Newman H C, Prise K M, Fclcard M et al. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, **71**(4): 347—363
- 13 Löbrich M, Cooper P K, Rydberg B. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1996, **70**(2): 493—503
- 14 ZHOU Guang-Ming, LI Wen-Jian, WANG Ju-Fang et al. *Acta Biophysica Sinica*, 2000, **16**(1): 139—145 (in Chinese)
(周光明, 李文建, 王菊芳等. *生物物理学报*, 2000, **16**(1): 139—145)
- 15 ZHOU Guang-Ming, LI Wen-Jian, Gao Qing-Xiang et al. *Nuclear Physics Review*, 2002, **20**(1): 52—54 (in Chinese)
(周光明, 李文建, 高清祥等. *原子核物理评论*, 2002, **20**(1): 52—54)
- 16 Schmid E, Regulla D, Guldbakke S et al. *Radiation Research*, 2002, **157**: 453—460
- 17 Hacker U B, Kohnlein W, Kronholz H L et al. *Radiation Research*, 2000, **153**(6): 734—742
- 18 Lowy R J, Vavrina G A, Labarre D D. *Antiviral Research*, 2001, **52**: 261—273

Studies on *Bacillus subtilis* DNA Lesions Induced by Fast Neutron Radiation*

CHEN Xiao-Ming^{1,2} TAN Bi-Sheng¹ ZHENG Chun³ ZHANG Jian-Guo¹
WANG Dan¹ CHU Shi-Jin¹ REN Zheng-Long^{2;1)}

1 (Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

2 (Sichuan Agriculture University, Yaan 625000, China)

3 (Institute of Nuclear Physics and Chemistry, China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621900, China)

Abstract The content of *Bacillus subtilis* var. *niger* (ATCC 9372) DNA double-strand breaks induced by neutron radiation at different doses and different dose rates respectively, was measured and quantified by pulsed-field gel electrophoresis. By the analyses of DNA release percentage (*PR*), DNA breakage level (*L*), average molecular weight of breakage DNA and DNA fragment distribution, the results showed that DNA fragments were obviously distributed into two regions in the different irradiation condition. This suggests that there are some sensitive points to neutron radiation in the *Bacillus subtilis* var. *niger* molecule. The DNA release percentage, DNA breakage level and the content of DNA fragments in different region varied regularly in some extent with change of the neutron radiation dose or dose rate.

Key words DNA double-strand breaks, pulsed-field gel electrophoresis, *Bacillus subtilis* var. *niger*, Chinese fast burst reactor II, radiation hot point

Received 19 October 2006

* Supported by Sci. & Tech. Funds of CAEP (052056), Scientific Research Fund of Sichuan Provincial Education Department (2005C13) and Scientific Research Fund of Southwest University of Science and Technology (051103)

1) Corresponding author. E-mail: cxmhyx99@163.com