

与应力调控相关的基因选择性剪接****☆◆

傅亚^{1,2,3}, 张遥尧^{1,2}, 孙姣霞^{1,2}, 向燕^{1,2}, 王远亮^{1,2}

Gene alternative splicing related to stress regulation

Fu Ya^{1,2,3}, Zhang Yao-yao^{1,2}, Sun Jiao-Xia^{1,2}, Xiang Yan^{1,2}, Wang Yuan-liang^{1,2}

Abstract

BACKGROUND: The proper mechanical environment is not only the important factors for organism normal growth and development, structure reestablishment and function maintenance, but also is one of the key factors for functional recovery of injured tissue. The regulation of gene expression by stress does not only reflect the switch or regulation of gene expression, but also is related to alternative splicing after transcription.

OBJECTIVE: The introduction of a new stress regulation by alternative splicing combined with growth factor binding, and to predict the presumable regulatory mechanism.

METHODS: PubMed database (1964 to 2010) and CNKI database (2000 to 2009) were searched for relative review articles and research reports for aspects of signal transduction and genetic alternative splicing, the linkages between the two and possible regulatory mechanisms were analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: Stress stimulation could lead to alternative splicing of insulin like growth factor-1 genes in muscle cells and bone cells, which would produce a new stress-sensitive growth factor mechano-growth factor and reveal a new regulation by stress. The mechanism of regulation is not clear, which may be related to the stress caused by the location of splicing bodies (the displacing movement) and the change of the location and spatial structure (deformation) of splicing enzymes (such as RNP enzyme).

Fu Y, Zhang YY, Sun JX, Xiang Y, Wang YL. Gene alternative splicing related to stress regulation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(15):2817-2820. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 适当的力学环境是生物体正常生长发育、结构重建以及功能维持的重要因素,也是损伤组织功能性修复的关键因素之一。应力调控基因表达不仅体现在基因的开关或表达水平的调节,还可以体现在转录后的选择性剪接。

目的: 结合力生长因子介绍选择性剪接这种新的应力调控方式,并推测可能的调控机制。

方法: 检索 PubMed 数据库(1964/2010)、CNKI 数据库(2000/2009)有关力信号转导和基因选择性剪接方面的综述文章和研究报告,分析二者的联系和可能的调控机制。

结果与结论: 应力刺激可以导致肌细胞、成骨细胞中的胰岛素样生长因子 1 基因发生选择性剪接,产生一种新的应力敏感的生长因子力生长因子,这种新型调控方式的机制还不明确,推测与应力导致的剪接小体的位置(位移运动)以及改变了剪接酶(如 RNP 酶)的位置和空间结构(变形)有关。

关键词: 选择性剪接;生物力学;力学生物学;力生长因子;组织修复

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.15.038

傅亚, 张遥尧, 孙姣霞, 向燕, 王远亮. 与应力调控相关的基因选择性剪接[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(15):2817-2820. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

可变剪接是基因表达调控的重要方式,可使同一基因产生多种蛋白质,与细胞的生长、分化和凋亡等细胞过程密切相关。估计接近 95% 的人多外显子基因表达会发生可变剪接^[1-2]。有关可变剪接的发生机制已有广泛的研究,其失调可导致多种疾病,特别是癌症的发生^[3-4]。目前人们仍然没能弄清错综复杂的蛋白质-RNA 调控,但是通过个体转录和基因组手段的研究,为认识选择性信使 RNA 前体 pre-mRNA 剪接提供了可能的途径。可变剪接调节是通过不同的剪接因子在剪接体组装的不

同步骤进行的反式调节,以及基因序列所包含的顺式作用元件发生的顺式调节。所以,可变剪接具有多个层面的精细调节,任何简单步骤的干扰都可能造成可变剪接失调^[5]。

可变剪接过程的失调可由剪接小体的干扰来实现。剪接小体是识别 mRNAs 前体上剪除非编码内含子并完成剪接的复合蛋白质结构。剪接小体在剪接过程中所采取的策略,一方面提供了 mRNAs 前体上反应性剪接位点识别的准确性,另一方面提供了可变剪接过程中剪接位点选择的灵活性,也就是剪接小体展现出超常的组成和结构的动态特性,以适用于基底相关复合物组装,催化反应活性和活性位点重建^[6]。既然是一种动态特性,就意味着可能受到来自生物化学的

¹Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, China; ²Research Center of Bioinspired Materials Science and Engineering, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China; ³Department of Biology, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China

Fu Ya ☆, Studying for doctorate, Associate professor, ¹Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, China; ²Research Center of Bioinspired Materials Science and Engineering, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China; Department of Biology, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China cqfuya@163.com

Correspondence to: Wang Yuan-liang, Doctor, Professor, ¹Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, China; ²Research Center of Bioinspired Materials Science and Engineering, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China bio730@cqu.edu.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30870609*, 51043004*; Natural Science Foundation of Chongqing, No. CSTC2009BB4382*; Foundation of Chongqing Municipal Education Commission, No. KJ091415*; the Science and Technology Plan of Jiulongpo Area, No. 090109*

Received: 2010-12-11
Accepted: 2011-01-18

和生物物理的干扰或误调。

目前从生物化学角度研究可变剪接过程已经取得相当大的进展^[5-7]。但是, 维持生命正常生长和发育不可或缺的生物物理环境, 尤其是生物力学环境对可变剪接的贡献却知之甚少。近来, 在骨骼肌细胞和成骨细胞的研究中都获得了一种力生长因子(mechano growth factor, MGF), 该生长因子由力学调控下的胰岛素样生长因子 1 基因选择性剪接产生, 并与应力刺激所致的生理现象密切相关^[8-10]。综合生物力学的研究成果, 在应力刺激下力响应细胞不仅会改变其基因表达谱, 而且会发生可变剪接。这个发现既给可变剪接增添了新内容, 也给力载荷调控基因表达的研究带来新的启示, 即外力刺激可以调节 mRNA 前体的可变剪接, 形成新的 mRNA, 表达新的生长因子。

1 资料和方法

1.1 资料来源 由第一作者于 2010 年在 2000/2010 PubMed 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) 和 2000/2010 CNKI 数据库(<http://www.cnki.net>)对生物力学、力-化学信号转导、基因选择性剪接、力生长因子有关的综述和研究原著等文献进行检索, 英文检索词有 mechanotransduction, alternative splicing, spliceosome, mechano-growth factor, 通过检索词间的布尔运算尽量全面准确的检索的相关文献。

1.2 入选标准

纳入标准: ①有关细胞力学响应中, 涉及力学信号转导、基因调节的文献。②应力调控基因选择性剪接的文献。③MGF 表达特点和功能的文献。④有关选择性剪接的调控。

排除标准: ①与本文主题无关。②较陈旧的文献。③重复同类综述或研究选择最新最全。

1.3 质量评估 通过各种检索策略的应用, 获得了较全面的文献资料, 在文章的评审和修改过程中进一步检索最新文献, 因此所获得的资料全面而新颖。

1.4 数据的提取 文献筛选和质量评价由第一作者独立进行, 如有分歧, 则通过讨论或由审阅者协助解决。计算机初检得到英文文献 280 余篇。阅读标题和摘要进行初筛, 精读 50 余篇进行归纳总结, 最终引用 29 篇与本文观点密切相关的文献。其中基因选择性剪接及应力调控基因选择性剪接的文献 8 篇^[1-5, 11-12], 力-化学转

导类文章 12 篇^[10, 13-23], 有关 MGF 的表达和功能的文献 9 篇^[8-10, 24-29], 选择性剪接调控类文献 5 篇^[6-10]。以此为依据归纳总结了应力转导过程、应力引起可变剪接并产生新的变异分子, 并对应力调控基因选择性剪接的机制做了分析和推测, 讨论了该现象的意义。

2 结果

2.1 应力转导过程 应力刺激如何调控基因表达? 力学载荷作为一种外部的物理刺激, 如何转化为胞内的化学信号? 这些都是需要深入研究的重大问题。从目前的研究结果来看, 胞外基质分子-整合素-细胞骨架-核基质系统的信号传递和转导途径是外力传递的有效途径。细胞骨架以网络的形式存在, 通过整合素与胞外基质相连, 胞内与核基质以及其它胞内成分相连^[13-14]。由于细胞骨架是个张力完整性系统, 外力的刺激可以迅速传递到细胞核, 并可能调节细胞内基因的表达^[14-15]。将 α -辅肌动蛋白 α -actinin 的蛋白酶解片段用显微注射的方式引入 MC3T3-E1 成骨细胞株中, 发现剪应力诱导的细胞骨架重排和基因表达变化被阻断。所使用的 α -actinin 片段保持与整合素结合的能力, 但不再与 actin 结合, 从而竞争抑制了内源性 α -actinin 与整合素的结合, 并因此打断了整合素和细胞骨架的联系^[16-17]。这表明胞外基质-整合素-细胞骨架在力转导中起重要作用。

力信号转导的另一种途径是通过力敏感离子通道, 如成骨细胞和骨骼肌细胞表面存在牵拉, 从而激活了细胞膜上的阳离子非选择性通道, 内皮细胞表面存在对剪应力敏感的钾离子选择性通道等^[18-19]。经过初始阶段对力的感受, 细胞将产生一系列的第三信使分子, 如 Ca^{2+} 、环磷酸腺苷、1, 4, 5-三磷酸肌醇等, 最终通过对基因表达调控得以实现。目前报道的力学载荷诱导的基因表达可以分为 4 类: ①即早期基因的表达变化。如应力刺激可使大鼠骨外膜细胞 *c-fos* 表达上调。随后的实验证据表明, 骨细胞在力学应变作用下 *c-fos* 表达同样出现增高趋势^[18], *c-fos* 是一种即早基因, *c-fos/c-jun* 异源二聚体即为转录因子 1 可结合于基因调控序列中的转录因子 1 结合位点从而启动相关基因表达。②细胞/生长因子的表达。目前已见报道力学载荷导致表达发生变化的因子有胰岛素样生长因子 1、转化生长因子 β 、白细胞介素等^[21-22]。③胞外基质分子基因的表达。载荷能

重庆大学, ¹ 生物流变科学与技术教育部重点实验室, ² 生物工程学院生物材料与仿生工程研究中心, 重庆市 400044; ³ 重庆科技学院生物系, 重庆市 411331

傅亚, 女, 1970 年生, 四川省大邑县人, 汉族, 重庆大学在读博士, 副教授, 主要从事组织工程与生物材料方面的研究。cqfuya@163.com

通讯作者: 王远亮, 博士, 教授, 重庆大学, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 生物工程学院生物材料与仿生工程研究中心, 重庆市 400044 bio730@cqu.edu.cn

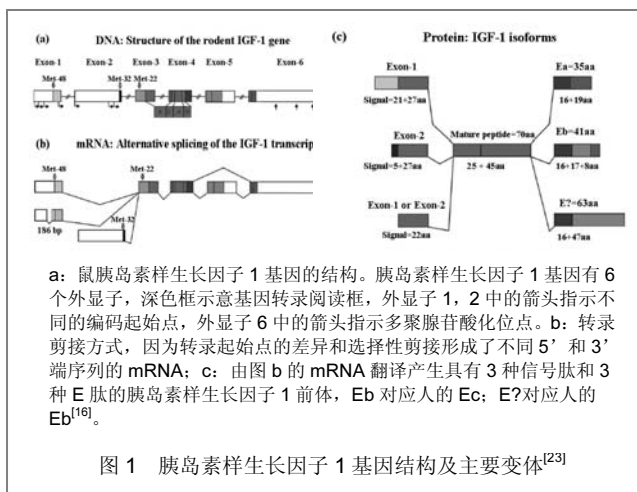
中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)15-02817-04

收稿日期: 2010-12-11
修回日期: 2011-01-18 (20100926020/YJ · Z)

够促进骨密度增加和肌纤维粗壮, 因此不可避免的会引起胞外基质的变化。在成骨细胞中, 力学变化可使 I 型胶原和骨桥蛋白的合成增加^[13]。④酶类基因表达。当前载荷影响表达变化的酶类主要是成骨细胞、骨细胞和血管内皮细胞中的一氧化氮合酶和环氧合酶, 这 2 种酶催化生成的产物一氧化氮和前列腺素 E2 可以旁分泌的方式参与胞间信号转导^[23]。

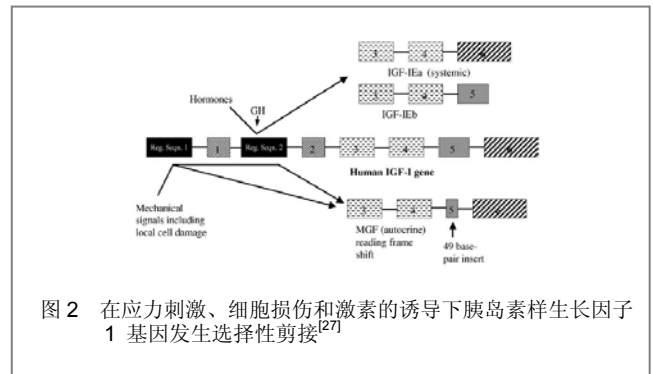
基因表达受到严格调控机制的制约。虽然已知力学应变, 如剪应力和拉伸扭转可诱导细胞基因表达的变化, 目前的研究主要还是对已知基因表达产物的 mRNA 和蛋白质水平变化的研究, 而应力对基因表达的调控机制还知之甚少, 也少有发现新颖的应力敏感的“力响应分子”。研究的总体情况表明, 力传递与转导的研究正深入向转录水平。而转录水平的一个新发现是拉伸过载导致胰岛素样生长因子 1 基因的选择性剪接。

2.2 应力引起可变剪接并产生新的变异分子 拉伸载荷使得细胞赖以生存的基质发生应变, 应变会引起可变剪接。迄今为止, 由应变引起的可变剪接有胰岛素样生长因子 1 基因和 VEGF 基因^[8-11]。胰岛素样生长因子 1 基因属于单拷贝基因, 跨度达 90 kb 以上, 但成熟的胰岛素样生长因子 1 只含 70 个氨基酸, 由 B, C, A, D 四个结构域组成。在鼠肝中发现两种具有不同 3' 端序列的胰岛素样生长因子 1 转录物 mRNA, 二者的差别在于 E 结构域 49 bp 序列, 表明有可变剪接发生, 可变剪接导致后续阅读框的改变, 产生了具有不同延伸肽(E 肽)的胰岛素样生长因子 1 变体胰岛素样生长因子 1Ea 和胰岛素样生长因子 1Eb, 见图 1。



有作者在对骨骼肌的长期拉伸实验中发现, 胰岛素样生长因子 1 不仅表达量受到拉伸刺激的调控^[18], 更让人惊讶的是, 胰岛素样生长因子 1 并不是以单一的形式出现, 而是存在多种变构体形式, 其中一种对应力刺激敏感, 只在拉伸作用下产生, 命名为 MGF^[8-10]。MGF mRNA 序列大部分与胰岛素样生长因子 1 mRNA 序列相同, 不同之处在于其 3' 端有 49 bp (啮齿类动物有 52

bp) 的插入序列, 导致后续可读框改变, 因此具有完全不同的 C 端肽(E 结构域), 见图 2。随后作者所在实验室在另一种力效应细胞(成骨细胞)中, 通过拉伸刺激也发现该因子的表达受到促进, 提示该因子作为一种应力刺激敏感的因子在骨组织的应力适应性变化中可能有其独特作用^[24-25]。



MGF 是新的生长因子还有一个证据是它发挥功能的受体与胰岛素样生长因子 1 的受体不一样。用体外的细胞模型 C2C12 研究了胰岛素样生长因子 1 和 MGF 的生理功能。结果显示, MGF 促进正常的 C2C12 细胞增殖, 呈剂量依赖性, MGF 的最大增殖浓度达到 5 μg/L。更有趣的是, 该刺激不因胰岛素样生长因子 1 受体阻断而被抑制^[28-29]。该结果提示, MGF 诱导 C2C12 成肌细胞增殖不是通过胰岛素样生长因子 1 受体, 而是有不同的信号传递通路。与成熟的胰岛素样生长因子 1 不同, MGF 的 E 结构域抑制终末分化, 同时促进成肌细胞的增殖。用特异性的抗体阻断胰岛素样生长因子 1 受体, 表明 MGF 的 E 结构域的功能通过不同的受体而调制。随着 MGF 功能的广泛深入研究, 发现 MGF 具有骨骼肌再生修复、心肌保护、神经保护、成骨等能力^[8]。

2.3 应力引起可变剪接的机制 生物力学是研究生物物质的运动与变形的, 其外载荷由基底向细胞传递或者外力直接作用于细胞, 进一步向细胞骨架至细胞核膜的传递。当外力传入核膜上时, 核膜变形, 影响了核膜内部的生命活动, 如转录与翻译^[14-15]。所以, 现代生物力学研究已经从生命体的生物物质或材料的力学表征转向生命体在应力刺激作用下的功能调节研究。其中, 力学信号如何转换成生物化学信号, 从而调节生命功能, 是集中关注的焦点。关于力学刺激产生的细胞应答及其相关的分子生物学研究已经进入转录水平。但是应力刺激的细胞响应机制仍然不清楚。

从力学变形或称应变导致了 mRNA 水平的可变剪接这个事实看, 虽然目前仅获得少数例子, 也不妨推测应变引起的剪接变异是可变剪接的新机制。细胞膜变形导致细胞内的一系列变化已经有相当的研究成果, 而核膜变形导致核膜内部的一系列变化虽然还知之甚少, 却可以类比, 即膜内骨架相应变形或膜孔通路产生变形,

从而改变膜内部的生命活动。

尤其值得注意的是, 关于可变剪接由剪接小体实施, 外力的作用如何呢? 一是使剪接小体位移(力学使物质运动), 因而剪接位点发生变化; 二是使剪接小体变形, 造成其中的负责剪与接的酶变形, 这些酶的活性中心亦随之变形, 其后果是误剪或误接。目前已知, 可变剪接的干扰是必定存在的, 后果是调节表达相关因子, 也可能是致病因子^[12]。因此不能忽视生物力学调节可变剪接的作用。这种新机制能够增添生命科学的新内容, 也会为疾病治疗提供新的参考意见。

那么, 力学产生的可变剪接是如何实现的似乎有了答案, 即力学关乎物质的运动与变形, 在细胞功能发挥的关键步骤中, 力学的作用最大可能是改变了剪接小体的位置(位移运动)以及改变了剪接酶(如核糖核蛋白酶)的位置和空间结构(变形), 由此改变了可变剪接的结果, 从而产生了与生物化学作用不同的 mRNAs, 进一步表达出新的蛋白质。显然, 这个过程是复杂的, 参考生物化学或分子生物学作用的可变剪接过程就可以理解。

3 小结

应力环境是生物体正常生长发育所必须的, 并且与损伤组织的功能性修复密切相关, 但在临床治疗中, 对损伤组织施加力学刺激往往难以实现, 如骨、韧带、肌腱等力学承载组织的修复过程中, 因为固定引起的应力遮挡或应力系统的破坏, 导致应力刺激不足, 致使修复延迟, 甚至不修复, 愈合后的组织也会因为缺乏力学强度容易再损伤。通过生物力学的研究, 在深入认识应力-生长关系, 尤其对应力响应的分子机制的认识, 可以对临床治疗中面临的应力刺激不足的组织修复难题提出新的解决方案, 如开发相关的药物, 通过药物作用代替物理刺激。MGF 的发现提示基因的选择性剪接是应力调控的一种新方式, 通过选择性剪接产生应力敏感的新型因子, 这些因子可能在应力-生长关系中发挥了重要作用, 利用这些因子或许就能发挥代替应力刺激促进组织功能性修复的作用。目前, MGF 在肌肉、骨组织中表现出的促进组织再生或增强的作用, 给了这种暗示。

4 参考文献

[1] Keren H, Lev-Maor G, Ast G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet.* 2010; 11(5):345-355.
 [2] Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature.* 2010;463(7280):457-463.
 [3] David CJ, Manley JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev.* 2010; 24(21): 2343-2364.
 [4] Omenn GS, Yocum AK, Menon R. Alternative splice variants, a new class of protein cancer biomarker candidates: findings in pancreatic cancer and breast cancer with systems biology implications. *Dis Markers.* 2010;28(4):241-251.

[5] Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(11):741-754.
 [6] Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell.* 2009;136(4):701-718.
 [7] Newman AJ, Nagai K. Structural studies of the spliceosome: blind men and an elephant. *Curr Opin Struct Biol.* 2010;20(1):82-89.
 [8] Dai Z, Wu F, Yeung EW, et al. IGF-1Ec expression, regulation and biological function in different tissues. *Growth Horm IGF Res.* 2010;20(4):275-281.
 [9] Matheny RW Jr, Nindl BC, Adamo ML. Minireview: Mechano-growth factor: a putative product of IGF-I gene expression involved in tissue repair and regeneration. *Endocrinology.* 2010;151(3):865-875.
 [10] Yang S, Alnaqeeb M, Simpson H, et al. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J Muscle Res Cell Motil.* 1996;17(4):487-495.
 [11] Faure C, Linossier MT, Malaval L, et al. Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. *Bone.* 2008;42(6):1092-1101.
 [12] Yagurtcu ON, Wolgemuth CW, Sun SX. Mechanical response and conformational amplification in α -helical coiled coils. *Biophys J.* 2010;99(12):3895-3904.
 [13] Jacobs CR, Temiyasathit S, Castillo AB. Osteocyte mechanobiology and pericellular mechanics. *Annu Rev Biomed Eng.* 2010;12:369-400.
 [14] Dahl KN, Kalinowski A, Pekkan K. Mechanobiology and the microcirculation: cellular, nuclear and fluid mechanics. *Microcirculation.* 2010;17(3):179-191.
 [15] Campbell VA, O'Connell B. Cellular and molecular biomechanics. *Technol Health Care.* 2010;18(3):233-243.
 [16] Deguchi S, Sato M. Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile cells. *Biorheology.* 2009;46(2):93-105.
 [17] Albiges-Rizo C, Destaing O, Fourcade B, et al. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 17):3037-3049.
 [18] Yoshimura K, Sokabe M. Mechanosensitivity of ion channels based on protein-lipid interactions. *J R Soc Interface.* 2010;7 Suppl 3:S307-320.
 [19] Arnadóttir J, Chalfie M. Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu Rev Biophys.* 2010;39:111-137.
 [20] Iqbal J, Zaidi M. Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328(3):751-755.
 [21] Hinz B. Tissue stiffness, latent TGF- β 1 activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2009;11(2): 120-126.
 [22] Sanchez C, Gabay O, Salvat C, et al. Mechanical loading highly increases IL-6 production and decreases OPG expression by osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(4):473-481.
 [23] Zhao H, Hiroi T, Hansen BS, et al. Cyclic stretch induces cyclooxygenase-2 gene expression in vascular endothelial cells via activation of nuclear factor kappa-beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;389(4):599-601.
 [24] Zhang B, Xian C, Luo Y, et al. Expression and subcellular localization of mechano-growth factor in osteoblasts under mechanical stretch. *Sci China C Life Sci.* 2009;52(10):928-934.
 [25] Deng M, Zhang B, Wang K, et al. Mechano growth factor E peptide promotes osteoblasts proliferation and bone-defect healing in rabbits. *Int Orthop.* in press.
 [26] Shavlakadze T, Winn N, Rosenthal N, et al. Reconciling data from transgenic mice that overexpress IGF-I specifically in skeletal muscle. *Growth Horm IGF Res.* 2005;15(1):4-18.
 [27] Goldspink G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:232-238.
 [28] Yang SY, Goldspink G. Different roles of the IGF-I Ec peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS Lett.* 2002;522(1-3):156-160.
 [29] Mills P, Lafrenière JF, Benabdallah BF, et al. A new pro-migratory activity on human myogenic precursor cells for a synthetic peptide within the E domain of the mechano growth factor. *Exp Cell Res.* 2007;313(3):527-537.

关于作者: 由傅亚, 张徭尧, 孙姣霞, 向燕进行资料收集, 由傅亚撰写成文、由王远亮教授审校, 由傅亚对文章负责。

基金资助: 国家自然科学基金(30870609, 51043004); 重庆市自然科学基金(CSTC2009BB4382); 重庆市教委科学技术研究项目(Kj091415); 九龙坡区科技计划项目(高090109)。