

谷氨酸转运体对癫痫持续状态 大鼠突触可塑性的影响*

韩大东¹⁾ 裘嘉恒²⁾ 姚扬¹⁾ 张涛^{2)**} 杨卓^{1)**}

(¹⁾南开大学医学院, 天津 300071; (²⁾南开大学生命科学学院, 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要 探讨了在大鼠癫痫持续状态模型, 谷氨酸转运体功能改变对突触可塑性的影响. 健康成年雄性 Wistar 大鼠((304.06±13.79) g)随机分为 5 组, 短期癫痫实验组(SE)及其对照组(SC), 长期癫痫实验组(LE)及其对照组(LC), 健康对照组(Sham). 匹鲁卡品皮下注射(25 mg/kg)建立癫痫模型, 建模 14 天后 SE 和 LE 组大鼠右侧海马内注射谷氨酸转运体抑制剂 TBOA (7.5 nmol, 1 μl), SC 和 LC 组注射相同剂量的人工脑脊液. 注射药物 2 h 后, SE 和 SC 组检测脑电图(EEG); 药物注射后 2 周, LE 和 LC 组检测内嗅区前穿通纤维-海马齿状回(PP-DG)长时程增强(LTP)和 EEG. 电生理学检测后动物灌流取脑做 Fluoro-Jade-B 染色. 结果表明: 脑电功率谱分析, SE 组 theta 波段能量较 SC 组明显下降($P < 0.05$), LE 组与其对照 LC 组相比, EEG 的 theta 波段能量无明显差异($P > 0.05$); LTP 检测显示, LE 组与对照 LC 组相比, 兴奋性突触后电位(EPSP)斜率升高($P < 0.01$); Fluoro-Jade-B 染色显示, LE 组与对照 LC 组相比, 给予 TBOA 2 周后细胞变性明显增加. 结果提示, 癫痫持续状态后, 海马神经元损伤, TBOA 导致谷氨酸转运体功能障碍, 加重癫痫所至神经元损伤, 对海马区突触可塑性产生影响.

关键词 谷氨酸转运体, 癫痫, 突触可塑性, 长时程增强(LTP)

学科分类号 Q6

癫痫是中枢神经系统神经元突发性异常放电, 导致短暂的大脑功能障碍的一种慢性疾病, 并常伴随有发作间期的学习记忆障碍. 谷氨酸是中枢神经系统内重要的兴奋性神经递质, 生理情况下参与神经冲动的传导并调节其效率, 病理状态下导致神经元兴奋性升高并产生神经毒性. 有报道称, 在病理条件下皮层谷氨酸能神经元的变化将导致失神性癫痫发作^[1], 而且胶质细胞的谷氨酸释放也发挥着致病作用^[2]. 谷氨酸转运体(EAATs)是一组位于神经元和胶质细胞膜上的糖蛋白^[3], 目前有 5 种已明确的谷氨酸转运体(GLAST/EAAT1, GLT-1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 和 EAAT5)^[4]. 谷氨酸转运体在生理状态下清除细胞外谷氨酸, 维持信号在突触间的正常传递. 在某些病理状态下(如 Na⁺ 跨膜梯度减小等), EAATs 不但在表达上发生改变而且会导致神经毒性谷氨酸释放^[5,6]. 谷氨酸-谷氨酸转运体共同影响细胞外谷氨酸水平并与谷氨酸受体协同影响神经元和胶质细胞的生理效应. 谷氨酸的释放与再摄取影响了发生在皮层及海马和边缘系统

的选择性神经变性, 包括神经元的缺失、神经细胞和胶质细胞的增生、星形胶质细胞的肥大和苔藓纤维出芽, 这些变化在癫痫的发病机制及发展过程中均发挥重要作用. 癫痫急性期, 在海马 CA1、CA2 和 CA3 区的锥体细胞以及齿状回颗粒细胞均可观察到谷氨酸转运体表达的变化^[7,8]. 慢性期, 在 CA3 和齿状回的神经元中 EAAC1 的表达上调, 内侧丘脑的反应性星形胶质细胞中 GLAST 和 GLT-1 表达上调. 这些变化可以视为对大量细胞丢失的一种代偿机制, 并阻止进一步的细胞丢失^[9]. 在潜伏期, 齿状回颗粒细胞层和分子层的 EAAC1 表达上升^[10], 但 EAAC1 上调表达的远期效应及对自发作期神经可塑性的影响, 尤其是对兴奋性突触后电

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2007CB914803)和天津市应用基础研究基金(06YFJMJC09400)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 022-23504364

E-mail: zhuoyang@nankai.edu.cn, zhangtao@nankai.edu.cn

收稿日期: 2008-01-09, 接受日期: 2008-03-27

位和动作电位的产生及同步性方面的影响尚不明确。本实验应用锂-匹鲁卡品癫痫大鼠模型, 探讨谷氨酸转运体对癫痫持续状态的作用和对远期突触可塑性的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 建模及实验分组

本实验采用雄性 Wistar 大鼠, 体重(304.06 ± 13.79) g(275~330 g), 由军事医学科学院提供。建模前 20 h 给予 LiCl_2 , 皮下注射匹鲁卡品(Pilocarpine, Pilo, 25 mg/kg, Sigma, USA)诱导癫痫发作。建模前 30 min 给予硫酸阿托品(1 mg/kg, i.p.), 对抗匹鲁卡品的外周胆碱能作用。癫痫发作持续 30 min 以上视为建模成功^[1], 发作 60 min 后给予安定(10 mg/kg, i.p.)终止发作减少死亡率。

Wistar 大鼠 32 只随机分为 5 组: 短期癫痫实验组(SE)及其对照组(SC), 长期癫痫实验组(LE)及其对照组(LC), 健康大鼠对照组(Sham), 大鼠建模 14 天后, 30%乌拉坦(4 ml/kg, i.p.)麻醉, 手术暴露颅骨, 立体定向引导在 SE 和 LE 组大鼠的右侧海马内(前囟后 3.1 mm, 右侧 2.5 mm, 深 4.0 mm)缓慢匀速注射(5 min)谷氨酸转运体抑制剂 TBOA (7.5 nmol/ μl , Sigma, USA), 及在 SC 和 LC 组大鼠的相同部位注射相同剂量人工脑脊液, 留针 15 min。

1.2 电生理学

大鼠给予 TBOA 2 h(SE 和 SC 组)及 14 天后(LE 和 LC 组), 30%乌拉坦(1.2 g/kg)麻醉, 固定于头部立体定位仪(Narishige, Japan), 检测右侧海马内嗅区前穿通纤维(PP)和海马齿状回(DG)之间长时程增强(LTP)并记录右侧 DG 区 EEG。依据 Paxinos 和 Watson 大鼠脑立体定位图谱(1986 年), 记录 LTP 时, 置于 PP 的刺激电极前为前囟后 8.0 mm, 中线旁 4.4 mm, 置于 DG 的记录电极位于前囟后 4.2 mm, 中线旁 2.5 mm。用比较接近生理变化的 theta 频率刺激(theta burst stimulation, TBS)诱导出 LTP (Power Lab, Australian)。记录电极和刺激电极均缓慢插入, 直到选一固定强度而能记录出最大群体峰电位(population spike, PS)的部位, 调整刺激强度至记录的电位反应稳定增加 20%后, 记录 15 min 低频(0.1 Hz, 波宽 0.1 ms)诱导的反应作为基础值, 再给予高频刺激(10 个 4 Hz 的串刺激, 每个串刺激有 4 个频率为 100 Hz 的单脉冲, TBS 重复 5 次, 每次间隔 20 s)诱导长时程增强(LTP)。

记录并保存刺激前 15 min 至刺激后 1 h 的反应, 分析兴奋性突触后电位(EPSP)的斜率和 PS 的波宽。LTP 记录后, 记录 DG 区的 EEG。

1.3 病理及组织学

电生理实验结束后大鼠经心脏灌流取脑, 固定、脱水、包埋、石蜡切片(Leica, Germany), 然后作特异性标记神经元变性的荧光染色^[2], 即 Fluoro-Jade-B 染色, 观察海马区神经元变性情况。

1.4 数据分析

实验各组 LTP 和 EEG 的数值都用均数($\bar{x}$) $\pm$ 标准误差(s)表示, 组间差异使用多因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$ 视为具有显著性差异; $P < 0.01$ 视为具有极显著性差异。

2 结 果

2.1 LTP

兴奋性突触后电位(EPSP)的斜率: LC 与 Sham 组相比, 高频刺激后各个时间点 EPSP 的斜率显著降低($P < 0.05$); LE 与 Sham 组相比, HFS 后各个时间点 EPSP 的斜率显著增加($P < 0.01$; $P < 0.05$); LE 与 LC 组相比, HFS 后各个时间点 EPSP 的斜率显著增加($P < 0.01$; $P < 0.05$), 如图 1 所示。

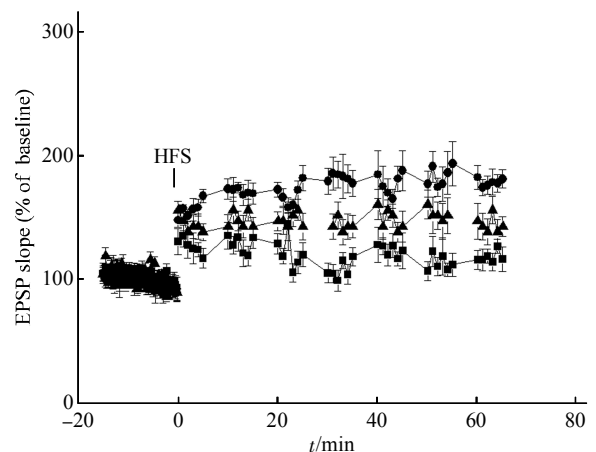


Fig. 1 LTP was induced using HFS after recording a stable baseline for 15 min

LTP lasted at least 60 min. Comparison of slopes of EPSP in LE, LC and Sham groups. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ compared with the Sham group. ●—●: LE group ($n=6$); ■—■: LC group ($n=7$); ▲—▲: Sham group ($n=6$).

PS 的宽度: LE、LC 与 Sham 组相比, HFS 后各个时间点 PS 的宽度均无明显变化($P > 0.05$), 如图 2 所示。

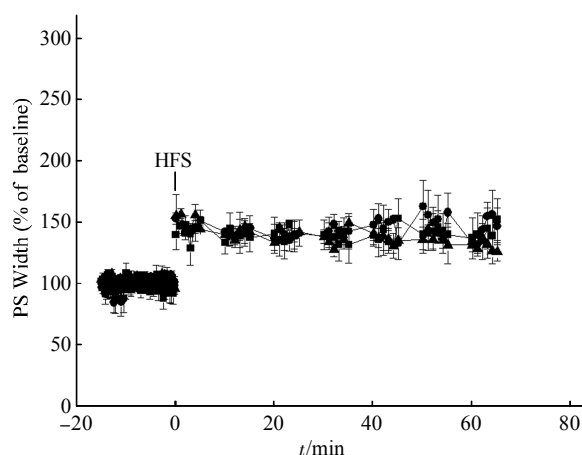


Fig. 2 LTP was induced using HFS after recording a stable baseline for 15 min

LTP lasted at least 60 min. Comparison of width of PS in LE, LC and Sham groups. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ compared with the Sham group. ●—●: LE group ($n=6$); ■—■: LC group ($n=7$); ▲—▲: Sham group ($n=6$).

2.2 EEG

计算海马 DG 部位 EEG 的功率谱, theta 波段能量显示: 给予谷氨酸转运体抑制剂 TBOA 2 h 后 SE 组的 theta 波段能量下降(0.04 ± 0.02) V^2 , 与 SC 组(0.10 ± 0.02) V^2 相比具有显著性差异($P < 0.05$); 给予 TBOA 14 天后 LE 组 EEG 的 theta 波段能量(0.04 ± 0.02) V^2 与 LC 组(0.03 ± 0.01) V^2 相比已无显著性差异. 并且 LC theta 波段能量较 SC 组明显降低(0.10 ± 0.02) V^2 和(0.03 ± 0.01) V^2 , $P < 0.05$, 但是 LE 组与 SE 组相比未见此趋势(图 3).

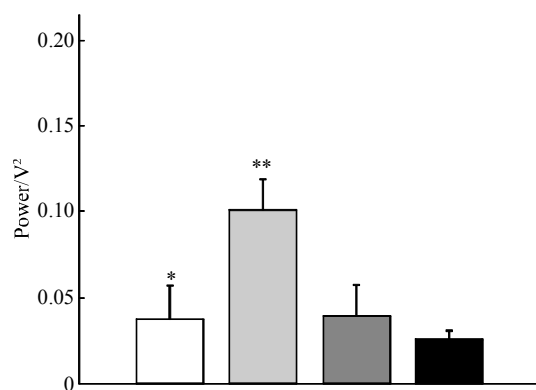


Fig. 3 Comparison of theta band power spectrum of SE, SC, LE and LC groups

Data were expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ compared with SC group; ** $P < 0.05$ compared with LC group. □: SE ($n=6$); □: SC ($n=7$); ■: LE ($n=6$); ■: LC ($n=7$).

2.3 组织学

Fluoro-Jade-B 染色是一种特异性标记变性神经元的荧光染色. 如图 4 所示: LE 组, 给予 TBOA 引起的谷氨酸转运体功能障碍, 在给予 TBOA 2 周后, 齿状回可见大量颗粒细胞变性(绿色荧光所示)(图 4a). LC 组, 给予人工脑脊液 2 周后, 齿状回颗粒细胞变性明显少于 LE 组(较少的绿色荧光)(图 4b).

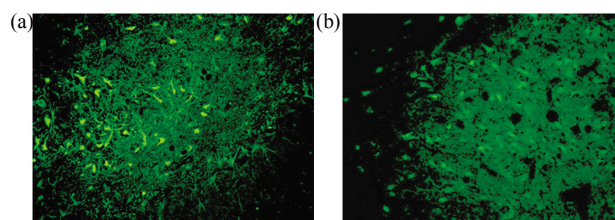


Fig. 4 Fluoro-Jade-B staining of LE group (a) and LC group (b)

Degenerating cells showed green fluorescence. The number of degenerating cells in (a) was more than that of (b).

3 讨 论

长时程增强(LTP)是记忆的分子机制之一^[13], 本实验中用以衡量兴奋性突触后电位(EPSP)和群峰电位的变化^[14, 15], 以了解癫痫潜伏期中谷氨酸转运体的作用及对自发发作期突触可塑性的影响. DL-TBOA 用于阻滞的谷氨酸转运体包括分布在神经元的 EAAC1 和胶质细胞的 GLT1 与 GLAST^[16]. 相比于其他转运体抑制剂, TBOA 的优势在于: a. 它是一类非转运性抑制剂, 不降低递质释放; b. 它在电生理记录和电泳条带测定时, 没有谷氨酸受体激动剂的作用^[17, 18].

LTP 的诱导和维持包含有 NMDA 受体介导的内向 Ca^{2+} 流, 因此, EPSP 的斜率改变不仅是突触可塑性的改变, 还提示相同的刺激将产生不同程度的 Ca^{2+} 内流. 在癫痫的化学点燃模型中, 点燃对 LTP 的幅值、极性和饱和度具有不同的影响^[19]. 本实验中谷氨酸转运体对 LTP 的影响也有类似结果, 如图 1 所见: LC 组与 Sham 组相比, EPSP 的斜率明显降低, 说明在癫痫病程中, 机体上调谷氨酸转运体表达, 降低 EPSP 的同步性即降低突触后神经元的可塑性, 减少神经元的 Ca^{2+} 内流以保护残存神经元. LE 组 EPSP 的斜率不但高于 LC 组, 甚至与正常对照 Sham 组相比也明显增强, 说明阻滞谷氨酸转运体后, 谷氨酸转运体的功能障碍逆转了

这种趋势^[20], 这样的保护机制随之消失, 细胞承担了更多的 Ca^{2+} 超载, 进一步引起变性、凋亡/死亡及再生。换言之, 正是谷氨酸转运体介导了该机制。Fluoro-Jade-B 染色显示(图 4): 在 TBOA 干预 2 周后, LE 组的变性细胞明显多于 LC 组, 从病理学上证实上述推断。相关文献报告提出癫痫发作在海马产生了一系列的变化, 包括 PP-DG 传导通路上的谷氨酸能神经元递质释放的增加^[21]、神经元的变性、死亡^[22]与再生的增加^[23], 苔藓纤维出芽以及由此产生的突触重组^[24], 而且在星型胶质细胞, 谷氨酸水平升高时反应性逆行释放谷氨酸, 并借此调整谷氨酸能神经元的神经传递^[25]。由 TBOA 介导的谷氨酸转运体功能障碍加强了上述变化。有研究报道, 海马齿状回年轻、新生的颗粒细胞在海马区突触可塑性方面发挥着重要作用^[26], 正是这些新生细胞包括增生的胶质细胞参与介导并增强了 LTP 的 EPSP 斜率, 而 EPSP 斜率的增加又导致细胞更大的 Ca^{2+} 超载并导致细胞变性, 形成一个恶性循环。群峰电位的宽度代表着某一脑区内神经元动作电位的同步性, 本实验中, 群峰电位的宽度在 LE、LC 和正常对照 Sham 组之间均无明显变化, 说明无论是谷氨酸转运体功能障碍还是癫痫病程对 DG 区域神经元动作电位的同步性无明显影响。

theta 波为海马区生理脑电波集中的频段, 反映海马区神经细胞的活性。给予 TBOA 2 h 后, SE 组的 theta 波段能量(0.04 ± 0.02) V^2 较 SC 组(0.10 ± 0.02) V^2 明显下降, 说明海马区谷氨酸转运体即时的功能障碍引起突触间谷氨酸堆积, 影响神经元功能。在给予 TBOA 2 周后, LE 组在 EEG 功率谱 theta 波段能量(0.04 ± 0.02) V^2 与 LC 组(0.03 ± 0.01) V^2 相比已无显著性差异, 提示此时 TBOA 导致的谷氨酸转运体功能障碍对神经元活动已无直接影响。SC 组与 LC 组相比, 两次 EEG 功率谱 theta 波段能量随时间下降, 而在 SE 组和 LE 组却没有这样的趋势, 反而在数值上略有上升。很有可能是新生细胞参与介导了 LE 组 EEG theta 波段能量的增加。Fluoro-Jade-B 染色结果证实了这一推测。谷氨酸转运体功能障碍导致 LE 组神经元变性较 LC 组明显增多, 进而导致神经元再生及胶质细胞反应性增生。

综上所述, a. TBOA 所致的谷氨酸转运体功能异常引起 EPSP 斜率增加, 提示细胞钙负荷增加, 削弱了机体保护机制, 进一步加重癫痫所至神经元损伤。b. TBOA 所致的谷氨酸转运体功能异

常并不改变 LTP 的 PS 宽度, 提示癫痫持续状态后谷氨酸转运体对癫痫大鼠突触可塑性 EPSP 和 PS 产生不同的影响。

参 考 文 献

- 1 Touret M, Parrot S, Denoroy L, *et al.* Glutamatergic alterations in the cortex of genetic absence epilepsy rats. *BMC Neuroscience*, 2007, **8**: 69~75 (doi:10.1186/1471-2202-8-69)
- 2 Kang N, Xu J, Xu Q, *et al.* Astrocytic glutamate release-induced transient depolarization and epileptiform discharges in hippocampal CA1 pyramidal. *J Neurophysiol*, 2005, **94**(6): 4121~4130
- 3 Arriza J L, Eliasof S, Kavanaugh M P, *et al.* Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(8): 4155~4160
- 4 Storck T, Schulte S, Hofmann K, *et al.* Structure, expression, and functional analysis of a Na (+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(22): 10955~10959
- 5 McMahon H T, Nicholls D G. Glutamine and aspartate loading of synaptosomes: a reevaluation of effects on calcium-dependent excitatory amino acid release. *J Neurochem*. 1990, **54**(2): 373~380
- 6 Levi G, Raiteri M. Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci*, 1993, **16**(10): 415~419
- 7 Zhang G, Raol Y S, Hsu F C, *et al.* Long-term alterations in glutamate receptor and transporter expression following early-life seizures are associated with increased seizure susceptibility. *J Neurochem*, 2004, **88**(1): 91~101
- 8 Crino P B, Jin H, Shumate M D, *et al.* Increased expression of the neuronal glutamate transporter (EAAT3/EAAC1) in hippocampal and neocortical epilepsy. *Epilepsia*, 2002, **43**(3): 211~218
- 9 Gorter J A, Van Vliet E A, Proper E A, *et al.* Glutamate transporters alterations in the reorganizing dentate gyrus are associated with progressive seizure activity in chronic epileptic rats. *J Comp Neurol*, 2002, **442**(4): 365~377
- 10 Voutsinos-Porche B, Koning E, Clément Y, *et al.* EAAC1 glutamate transporter expression in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, **26**(11): 1419~1430
- 11 Klitgaard H, Matagne A, Vanneste-Goemaere J, *et al.* Pilocarpine-induced epileptogenesis in the rat: impact of initial duration of status epilepticus on electrophysiological and neuropathological alterations. *Epilepsy Res*, 2002, **51**(1-2): 93~107
- 12 Schmued L C, Hopkins K J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, 2000, **874**(2): 123~130
- 13 Bliss T V, Collingridge G L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993, **361**(6407): 31~39
- 14 Moser E, Moser M B, Andersen P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci*, 1993, **13**(9): 3916~3925
- 15 Moser E, Moser M B, Andersen P. Synaptic potentiation in the rat dentate gyrus during exploratory learning. *Neuroreport*, 1993, **5**(3):

- 317~320
- 16 Furuta A, Rothstein J D, Martin L J. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci*. 1997, **17**(21): 8363~8375
 - 17 Shimamoto K, Lebrun B, Yasuda-Kamatani Y, *et al.* DL-threo-beta-benzoyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol*. 1998, **53**(2): 195~201
 - 18 Jabsaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, *et al.* Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(15): 8733~8738
 - 19 Schubert M, Siegmund H, Pape H C, *et al.* Kindling-induced changes in plasticity of the rat amygdala and hippocampus. *Learn Mem*, 2005, **12**(5): 520~526
 - 20 韩大东, 张涛, 杨卓. 谷氨酸转运体对癫痫大鼠的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(增刊 2): 74
 - Han D D, Zhang T, Yang Z. *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34** (Suppl 2): 74
 - 21 Scimemi A, Schorge S, Kullmann D M, *et al.* Epileptogenesis is associated with enhanced glutamatergic transmission in the perforant path. *J Neurophysiol*, 2006, **95**(2): 1213~1220
 - 22 Ben-Ari Y. Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia*, 2001, **42**(Suppl 3): 5-7. Review
 - 23 Sankar R, Shin D, Liu H, *et al.* Granule cell neurogenesis after status epilepticus in the immature rat brain. *Epilepsia*, 2000, **41**(Suppl 6): S53~56
 - 24 Sutula T, Zhang P, Lynch M, *et al.* Synaptic and axonal remodeling of mossy fibers in the hilus and supragranular region of the dentate gyrus in kainate-treated rats. *J Comp Neurol*, 1998, **26**(4): 390
 - 25 Br er A, Deitmer J W, Br er S. Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate. *Glia*, 2004, **48**(4): 298~310
 - 26 Snyder J S, Kee N, Wojtowicz J M. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*, 2001, **85** (6): 2423~2431

Effects of Glutamate Transporters on Synaptic Plasticity in Status Epilepticus Rats*

Han Da-Dong¹⁾, Qiu Jia-Heng²⁾, Yao Yang¹⁾, Zhang Tao^{2)**}, Yang Zhuo^{1)**}

¹⁾College of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China;

²⁾College of Life Science, Key Laboratory for Biological Active Material of Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract The effects of glutamate transporters on synaptic plasticity in rat models of pilocarpine-induced status epilepticus were investigated. Male Wistar rats (304.06±13.79) g were randomly divided into 5 groups, short-term seizures (SE) and its control (SC), long-term seizures (LE) and its control (LC), normal control (Sham) groups. Epilepsy rat models were induced by injection of pilocarpine (25 mg/kg, i.d.). Glutamate transporter inhibitor, DL-threo-benzoyloxyaspartate (TBOA, 7.5 nmol, 1 µl) was microinjected into right side of hippocampus after 14 days of initial status epilepticus in SE and LE groups. The same volumes of artificial cerebrospinal fluid were injected into same side of hippocampus in SC and LC groups. Electroencephalographs (EEG) were detected in SE and SC groups after 2 h of drug injection. Long term potential (LTP) at perforant pathway and dentate gyrus (PP-DG) and EEG were recorded in LE and LC groups after two weeks of drug injection. Example of Fluoro-Jade-B staining in the rat brain was made at the end of electrophysiological experiment. The results showed that there was a significant decrease in theta band power of EEG in SE group compared with that of SC group ($P < 0.05$). There was no significant difference in theta band power of EEG between LE and LC groups ($P > 0.05$). The slope of excitatory postsynaptic potential (EPSP) was significantly increased in LE group compared with that of LC group ($P < 0.01$). Fluoro-Jade-B showed more neuronal degeneration in LE group compared with that of LC group. The results suggested that TBOA induced damage of glutamate transporters and enhanced the neurotoxicity of status epilepticus, which contributed the synaptic plasticity in status epilepticus rats.

Key words glutamate transporters, epilepsy, synaptic plasticity, long term potential (LTP)

*This work was partly supported by National Basic Research Program of China (2007CB914803) and Municipal Science Foundation Research of Tianjin (06YFJMJC09400).

**Corresponding author.

Tel: 86-22-23504364, E-mail: zhuoyang@nankai.edu.cn, zhangtao@nankai.edu.cn

Received: January 9, 2008 Accepted: March 27, 2008