

“自我剪切” 2A 肽介导的 Δ -12 和 ω -3 脂肪酸脱氢酶以及过氧化氢酶在转基因小鼠肌肉表达研究 *

方 锐¹⁾ 彭云乾¹⁾ 郑 敏²⁾ 孟庆勇^{1)**}

(¹⁾ 中国农业大学, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193; (²⁾ 北京济普森生物技术有限公司, 北京 100193)

摘要 哺乳动物因为缺乏 Δ -12 和 ω -3 脂肪酸脱氢酶, 不能自身合成必需的多不饱和脂肪酸。目前, 通过转基因技术在哺乳动物体内表达 ω -3 脂肪酸脱氢酶, 能将长链的 n-6 多不饱和脂肪酸转化成 n-3 多不饱和脂肪酸, 造成体内长链的 n-6 多不饱和脂肪酸含量显著减低。本研究通过自我剪切 2A 肽介导 Δ -12 和 ω -3 脂肪酸脱氢酶(FAT-2 和 FAT-1)以及人过氧化氢酶(human catalase, hCAT)在小鼠的肌肉同时表达。结果表明, 转基因小鼠肌肉中长链 n-3 多不饱和脂肪酸含量提高 2.6 倍, 长链 n-6 多不饱和脂肪酸含量没有显著变化, 而 n-6/n-3 比例显著降低($P < 0.01$)。同时蛋白质印迹检测到人过氧化氢酶 hCAT 在小鼠的肌肉组织中表达, 且过氧化氢酶活性比野生型小鼠显著提高($P < 0.01$)。

关键词 多不饱和脂肪酸, Δ -12 脂肪酸脱氢酶, ω -3 脂肪酸脱氢酶, 过氧化氢酶

学科分类号 Q81, Q813

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00222

长链 n-3 多不饱和脂肪酸是维持人类身体健康的重要物质, 有预防心脑血管疾病、癌症、糖尿病和自身免疫疾病的功能^[1-5]。哺乳动物因为缺乏相应的脂肪酸脱氢酶而不能自身合成 n-3 多不饱和脂肪酸, 通过转基因技术, 在哺乳动物体内表达 ω -3 脱氢酶可以有效地将 n-6 多不饱和脂肪酸转化为 n-3 多不饱和脂肪酸, 但发现这种转基因动物体内的 n-6 不饱和脂肪酸含量显著低于正常水平^[6-7]。为了不改变体内 n-6 多不饱和脂肪酸的含量, 在本研究中我们在小鼠肌肉特异性的表达秀丽线虫的 Δ -12 和 ω -3 脱氢酶基因 *FAT-2* 和 *FAT-1*, 将哺乳动物多不饱和脂肪酸的合成途径补充完全。同时考虑到多不饱和脂肪酸的含量升高会导致氧化水平的提高, 给动物体带来过多的氧化压力, 为了减低多不饱和脂肪酸提高带来的负面影响, 希望通过表达人的过氧化氢酶基因(*human catalase*, *hCAT*), 减低肌肉组织由氧自由基增多引起的氧化压力^[8]。用病毒的自我剪切肽 F2A(VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP)和 T2A(EGRGSLTTCGDVEENPGP)的编码序列把 *TFAT-1*、*FAT-2* 和 *hCAT* 基因串联起来形成一个编码框, 在猪的骨骼肌肌动蛋白启动子驱动下特异地

在小鼠肌肉组织中表达^[9]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠、引物和载体。 昆明小白鼠购自国家计划生育研究所动物部; 表 1 引物由上海生物工程有限公司合成; PBR322-PSA 载体、pBudCE4.1FAT1/FAT2^[10]和 pBC-sightCAT^[11]由本实验室构建和保存。

1.1.2 试剂及来源。 Phusion 高保真 DNA 聚合酶和 T4 连接酶购自 NEB 公司; 限制性内切酶 *Hind* III、*Nhe* I 和 *Sal* I 购自 Takara 公司; 质粒纯化试剂盒购自 Qiagen 公司; DNA 胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 地高辛标记试剂盒购自 Roche 公司; 过氧化氢酶活性检测试剂盒购自碧云天公司; 绵羊抗人过氧化氢酶(*human catalase*)多克隆抗体和兔抗鼠肌动蛋白(*actin*)单克隆抗体购自 Abcam 公司。

* 转基因重大专项资助项目(2008ZX08006-003)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62733181, E-mail: qingyong.meng@gmail.com

收稿日期: 2011-08-08, 接受日期: 2011-09-08

1.2 载体构建

以 pBudCE4.1FAT1/FAT2 为模板, fat1F 和 fat1-F2A-R 为引物扩增 *FAT-1* 片段, fat2-F2A-F 和 fat2-T2A-R 为引物扩增 *FAT-2* 片段. 以 pBC-sightCAT 为模板, cat-T2A-F 和 cat-R 为引物扩增人过氧化氢酶 *hCAT* 片段. 利用 fat1-F 和 cat-R 引物分别引入 *Nhe* I 和 *Sal* I 酶切位点和两个保护碱基. 引物 fat1-F2A-R、fat2-F2A-F、fat2-T2A-R 和

cat-T2A-F 加有 F2A 和 T2A 剪切肽序列, 序列见表 1. 3 个扩增片段胶回收后, 检测浓度, 按照摩尔比 1:1:1 混合, 以 fat1F 和 cat-R 为引物, 通过重合 PCR 技术, 融合 3 个片段得到 *FFC* 片段, 经 *Nhe* I 和 *Sal* I 双酶切后连接到载体 pBR322-PSA 上, 得到 pBR322-PSA-FFC 载体, 引物序列见表 1.

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence
fat1F	aaGCTAGCATGGTCGCTCATTCCAGCGAAGG
fat1-F2A-R	TCCA CGTCTCCCGC CAACTTGAGAAGGTCAAATTCAAAGTCTG TTTCAC CTTGGCCTTTGCCTTCTCCTC
fat2-F2A-F	CTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGA GTCCAACCCAGGGCCCATGACAATCGCTACAAAA
fat2-T2A-R	CCGGGATTCTCTCCACGTCACCGCATGTTAGAAGACTTCTCTGCCCTC TTATTGAGCCTTCTTAGC
cat-T2A-F	GAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTATGGCT GACAGCCGGGAT
cat-R	aatGTCGAC TCACAGATTTGCCTTCTCCCTT
FFC-F	AACTCTGAACGGGTCCAATG
FFC-R	ATGTTGTCGAGTCCGAATCC
GAPDH-F	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
GAPDH-R	CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT

1.3 转基因小鼠制备

将构建好的 pBR322-PSA-FFC 载体, 用限制性内切酶 *Not* I 线性化后, 显微注射到小鼠受精卵雄原核, 显微操作由北京市济普霖生物技术有限公司完成, 注射后的胚胎移植到假孕母鼠中, 代孕 21 天后分娩.

1.4 DNA 印迹

剪取小鼠的少量尾部组织经消化后, 酚仿抽提基因组 DNA; 检测浓度, 取 10 μ g 基因组 DNA 用限制性内切酶 *Hind* III 消化 12 h, 低压电泳分离后, 转移至 Hybond-N+ 尼龙膜上 (Amersham 公司); 以 FFC-F 和 FFC-R 为引物 (序列见表 1), 以 pBR322-PSA-FFC 质粒为模板, PCR 扩增合成地高辛标记探针 (地高辛标记试剂盒, Roche 公司), 杂交显影.

1.5 RT-PCR 检测 FFC 表达

用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取转基因小鼠心、肝、脾、肺、肾、小肠、脑、脂肪、骨骼肌组织的总 RNA, Nanodrop (Thermo 公司) 测定浓度, 取 500 ng 总 RNA 用反转录酶 M-MLV (Promega 公司) 合成 cDNA; 以 FFC-F 和 FFC-R 为引物, PCR

扩增检测 FFC 的 RNA 表达水平, 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 30 个循环 (95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min), 72 $^{\circ}$ C 10 min; 以 GAPDH 为内参基因, 扩增引物为 GAPDH-F 和 GAPDH-R (序列见表 1).

1.6 蛋白质印迹和过氧化氢酶活性检测

取 30 mg 小鼠骨骼肌经液氮研磨后, IP 裂解液裂解, 离心取上清总蛋白; BCA 法测定蛋白质浓度, 取 30 μ g 总蛋白用 SDS-PAGE 分离, 转移至 PVDF 膜上, 脱脂牛奶封闭, 一抗杂交 (human catalase 一抗 1:1 000 稀释, actin 一抗 1:2 000 稀释), 洗膜, 二抗杂交 (1:5 000 稀释), 洗膜, 加显色底物 (Thermo 公司), 显影. 总蛋白过氧化氢酶活性检测原理和方法见碧云天公司过氧化氢活性检测试剂盒使用说明书.

1.7 脂肪酸分析

取 50 mg 骨骼肌经液氮研磨后, 加入 1 ml 含 2.5% H_2SO_4 的甲醇溶液, 80 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 待冷却至室温, 加入 0.2 ml 正己烷和 1 ml 水, 震荡混匀, 低速离心, 取上层正己烷氮气吹干后进行气相色谱分析.

2 结 果

2.1 载体构建和转基因小鼠检测

通过融合 PCR 技术将 Δ -12 和 ω -3 脂肪酸脱氢酶 *FAT-1*, *FAT-2* 以及人的过氧化物酶(*catalase*, *CAT*)基因编码区融合起来构成 FFC 片段, 其中 *FAT-1* 和 *FAT-2* 不包括终止密码子, 中间由 F2A 的自我剪切肽连接. *FAT-2* 和 *CAT* 不包括起始密码子(ATG), 中间由 T2A 自我剪切肽连接. 将融合的 PCR 产物 FFC 片段双酶切后, 连接到 pBR322-PSA 载体中. FFC 由猪的骨骼肌肌动蛋白启动子驱动表达(图 1). 将载体线性化后, 显微注射到小鼠的受精卵雄原核中, 经假孕母鼠代孕获得 31 只小鼠, Southern 杂交检测发现, Tg4 号雄性和 Tg1、Tg16、Tg23 号雌性小鼠基因组中有 5.1 kb 的杂交信号, 确定为转基因阳性个体, 转基因阳性率为 12.9%. 将阳性小鼠传代后, 从 Tg4 号公鼠的后代中检测到 9 只阳性个体, 3 只雌性小鼠没有获得阳性后代(图 2).

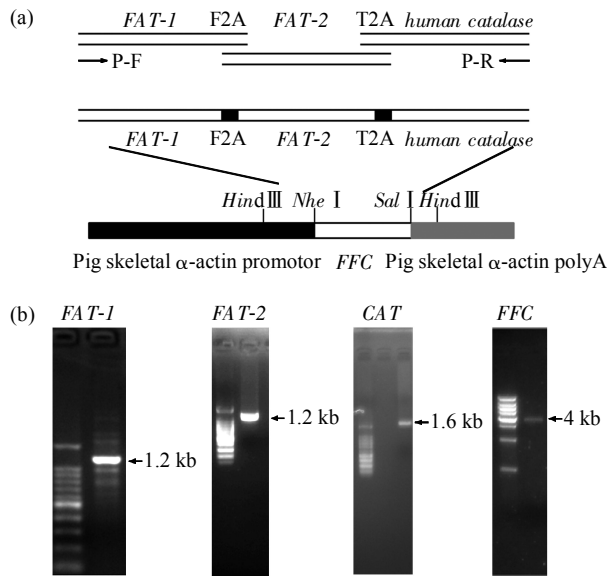


Fig. 1 Sketch of muscle-specific FFC-expressing vector construction (a) and FFC fragment was assembled by overlapping PCR (b)

FFC represents a fragment of 2A linked *FAT-1*, *FAT-2* and human *catalase* coding sequence; F2A and T2A represent “self cleaving” 2A peptide region of foot-and-mouth disease virus and *thossea asigna* virus; F2A and T2A were introduced along with primers.

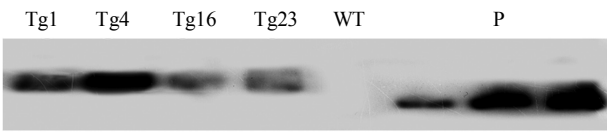


Fig. 2 Identification of transgenic mice by southern blot analysis of genomic DNA

Tg1, Tg4, Tg16 and Tg23: Four transgenic mice founders; WT: Wild type mice; P: Vector control.

2.2 RT-PCR 检测转基因表达

RT-PCR 检测转基因小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脂肪、骨骼肌、脑和小肠组织中外源基因的表达情况, 发现 FFC 在骨骼肌肉中有较高的表达, 其次在心脏也能检测到少量的表达, 而其他的组织未能检测到表达(图 3).

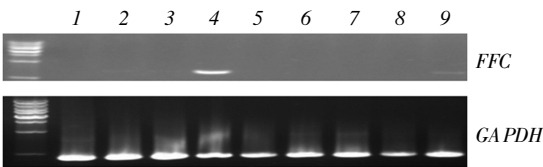


Fig. 3 Identification of FFC mRNA level in kidney, liver, spleen, muscle, intestine, brain, lung, fat, heart tissue by RT-PCR, GAPDH used as a housekeeping gene

1: Kidney; 2: Liver; 3: Spleen; 4: Muscle; 5: Intestine; 6: Brain; 7: Lung; 8: Fat; 9: Heart.

2.3 脂肪酸成分分析

分析转基因小鼠和野生型小鼠骨骼肌的脂肪酸组成和含量(表 2), 转基因和野生型小鼠各 8 只. 气相色谱分析结果表明: 转基因小鼠骨骼肌中 n-3 长链多不饱和脂肪酸含量显著提高; 其中二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)含量提高 6 倍, 二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)含量提高了 2.6 倍, 二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)提高了 3.3 倍. 虽然 C18:2n6 的比例显著升高, 但总 n-6 多不饱和脂肪酸转基因小鼠与野生型对照没有显著差异; 转基因小鼠骨骼肌中 n-6 多不饱和脂肪酸与 n-3 多不饱和脂肪酸比例

(n-6/n-3 ratio)与野生型对照比较起来降低了 60.9% (表 2 和图 4)。

Table 2 Fatty acid composition of total lipids in the muscle of non-transgenic (WT) and transgenic mice (Tg)

Fatty Acids	Tg skeletal muscle	WT skeletal muscle
	(%) ¹⁾	
C20 : 5n3	0.12 ± 0.03*	0.02 ± 0.04
C22 : 5n3	1.12 ± 0.18*	0.43 ± 0.11
C22 : 6n3	9.14 ± 0.56*	2.74 ± 0.51
n-6	23.33 ± 1.29	22.54 ± 2.53
n-3	10.89 ± 0.74*	4.1 ± 0.37
n-6/n-3	2.15 ± 0.26*	5.5 ± 0.34

¹⁾n = 8. All results are given as $\bar{x} \pm s$. *Significant difference ($P < 0.01$) between control mice and transgenic mice.

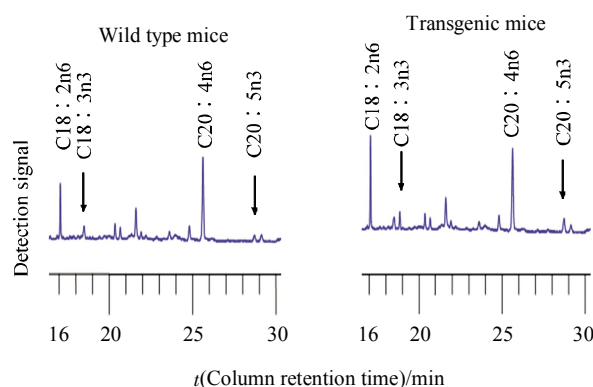


Fig. 4 Partial gas chromatograph traces

It showed fatty acid profiles of total cellular lipids extracted from the skeletal muscle of wild type mice and transgenic mice.

2.4 人过氧化氢酶表达和活性分析

提取转基因和野生型小鼠的骨骼肌总蛋白, 进行 SDS-PAGE, 用辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的人的过氧化氢酶抗体进行蛋白质印迹反应, 结果见图 5a, 在转基因小鼠骨骼肌蛋白中检测到了表达, 其分子质量为 59 ku. 小鼠骨骼肌中总蛋白的过氧化氢酶活性检测显示, 转基因小鼠骨骼肌过氧化氢酶活性显著高于野生型小鼠, 结果见图 5b.

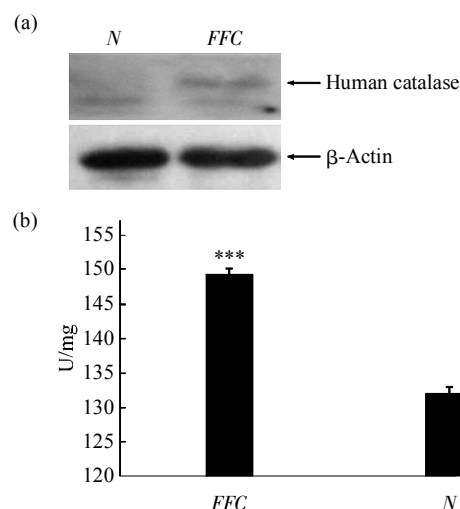


Fig. 5 Western blot analysis of human catalase in skeletal muscle (a) and catalase activity in skeletal muscle (b)

(a) N sample from non-transgenic mice, FFC sample from transgenic mice. (b) Catalase activity in skeletal muscle was determined by a catalase analysis kit, FFC sample from transgenic mice ($n = 4$), N sample from non-transgenic mice ($n = 4$), ***Significant difference ($P < 0.01$) between control animals and transgenic animals.

3 讨 论

长链 n-3 多不饱和脂肪酸是人类重要的健康营养物质, 多不饱和脂肪酸的合成需要多种脂肪酸脱氢酶. 真菌、植物和一些低等动物能够自身合成多不饱和脂肪酸, 哺乳动物由于缺乏 Δ -12 和 ω -3 脂肪酸脱氢酶不能自身合成多不饱和脂肪酸. 通过转基因技术在哺乳动物体内表达这两种脱氢酶, 使哺乳动物能够自身合成多不饱和脂肪酸. 本研究采用猪的骨骼肌肌动蛋白调控元件启动秀丽线虫的 *FAT-1*(ω -3 脂肪酸脱氢酶), *FAT-2*(Δ -12 脂肪酸脱氢酶)和 *hCAT*(人过氧化氢酶)基因在小鼠的骨骼肌中特异表达. 3 个基因在同一个启动子下启动表达, 由同一个 mRNA 编码合成蛋白质. 由于 3 个基因由两种病毒自我剪切小肽 F2A(foot-and-mouth disease virus)和 T2A(thosea asigna virus)连接, 在翻译的过程中, 2A 肽 C 端的甘氨酸(Gly)和脯氨酸(Pro)不能形成肽键, 断裂形成 3 个蛋白质^[12-15]. 因此, *FAT-1* 蛋白的 C 端留下 21 个氨基酸残基的肽段(VKQTLNFDLLKLAGDVESNPG). *FAT-2* 蛋白

的N端会多出一个脯氨酸残基,C端会留下一个17个氨基酸残基的肽段(EGRSLTCDVEENPG),重组的人过氧化氢酶蛋白的N端多出一个脯氨酸残基^[16]。在饲喂相同饲料的情况下,通过气相色谱分析转基因与野生型小鼠骨骼肌组织内n-6与n-3多不饱和脂肪酸的比例,发现转基因小鼠的n-3多不饱和脂肪酸比例显著升高。虽然n-6多不饱和脂肪酸比例与对照组没有显著变化,但其中C18:2n6的比例明显提高。由此可以推测,FAT-1蛋白C端21个氨基酸残基以及FAT-2蛋白C端17个氨基酸残基的肽段并不会影响它们的生物学活性。

早期研究主要采用全身性的表达 ω -3脂肪酸脱氢酶,将n-6多不饱和脂肪酸转化成n-3多不饱和脂肪酸,这样往往造成体内n-6脂肪酸的含量减低。我们通过在肌肉组织特异表达秀丽线虫的FAT-1和FAT-2基因,显著地提高了骨骼肌中长链n-3多不饱和脂肪酸的含量。由于FAT-2蛋白的 Δ -12脱氢酶活性,肌肉内n-6多不饱和脂肪酸含量并不因为n-6到n-3脂肪酸的转化而减低,维持n-6多不饱和脂肪酸在体内的正常水平,而且肌肉内n-6与n-3脂肪酸的比例(n-6/n-3)也显著减低。

提高多不饱和脂肪酸的含量会导致氧化性提高,使动物体的脂肪容易软化和黄化变质。而肌肉中表达的人过氧化氢酶能将过氧化氢分解,减低氧化水平,将可能有效地防止氧自由基的伤害,改善肉质。

本实验利用两种“自我剪切”2A肽在同一个编码框下同时表达3种蛋白质,通过研究发现蛋白质的C端2A肽残基不会影响到蛋白质的生物学活性。证明在哺乳动物体内同一个编码框中编码3种蛋白质的可行性,为我们在哺乳动物中组织特异性表达多基因提供一种新思路。

参 考 文 献

- [1] Dyerberg J, Bang H O. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos(Reprinted from Lancet, vol 2, pg 433, 1979). Nutrition, 1995, **11**(5): 475-475
- [2] Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, et al. n-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity?. Reprod Nutr Dev, 2004, **44**(3): 289-299
- [3] Ruggiero C, Lattanzio F, Lauretani F, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and immune-mediated diseases: inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis. Curr Pharm Design, 2009, **15**(36): 4135-4148
- [4] Schwarzenfeld C, Haindl P M, Rintelen B, et al. Polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis. Curr Top Nutraceut R, 2009, **7**(1): 45-49
- [5] Remans P H J, Sont J K, Wagenaar L W, et al. Nutrient supplementation with polyunsaturated fatty acids and micronutrients in rheumatoid arthritis: clinical and biochemical effects. Eur J Clin Nutr, 2004, **58**(6): 839-845
- [6] Lai L X, Kang J X, Li R F, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. Nat Biotech, 2006, **24**(4): 435-436
- [7] Zhu G M, Chen H X, Wu X J, et al. A modified n-3 fatty acid desaturase gene from *Caenorhabditis briggsae* produced high proportion of DHA and DPA in transgenic mice. Trans Res, 2008, **17**(4): 717-725
- [8] Howe P R. Omega 3-enriched pork. World Rev Nutr Diet, 1998, **83**(1): 132-143
- [9] Szymczak A L, Workman C J, Wang Y, et al. Correction of multi-gene deficiency *in vivo* using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector (vol 22, pg 589, 2004). Nat Biotech, 2004, **22**(12): 1590-1590
- [10] 孔平,杜苗,汤波,等.转基因哺乳动物细胞自合成多不饱和脂肪酸,生物化学与生物物理进展,2008, **35**(11): 1305-1311
Kong P, Du Z, Tang B, et al. Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(11): 1305-1311
- [11] He Z Y, Yu S L, Mei G, et al. Maternally transmitted milk containing recombinant human catalase provides protection against oxidation for mouse offspring during lactation. Free Radical Bio Med, 2008, **45**(8): 1135-1142
- [12] Palmenberg A C, Parks G D, Hall D J, et al. Proteolytic processing of the cardioviral P2 region-primary 2a/2b cleavage in clone-derived precursors. Virology, 1992, **190**(2): 754-762
- [13] Donnelly M L L, Hughes L E, Luke G, et al. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. J Gen Virol, 2001, **82**(5): 1027-1041
- [14] Ryan M D, King A M Q, Thomas G P. Cleavage of foot-and-mouth-disease virus polypeptide is mediated by residues located within a 19 amino-acid-sequence. J Gen Virol, 1991, **72**(11): 2727-2732
- [15] Donnelly M L L, Luke G, Mehrotra A, et al. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polypeptide 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. J Gen Virol, 2001, **82**(5): 1013-1025
- [16] Szymczak A L, Workman C J, Wang Y, et al. Correction of multi-gene deficiency *in vivo* using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. Nat Biotech, 2004, **22**(6): 760-760

Muscle-specific Expression of Δ -12 and ω -3 Fatty Acid Desaturases and Human Catalase Using "Self-cleaving" 2A Peptides in Transgenic Mice*

FANG Rui¹⁾, PENG Yun-Qian¹⁾, ZHENG Min²⁾, MENG Qing-Yong^{1)**}

¹⁾ State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

²⁾ Beijing Genprotein Biotechnology Company, Beijing 100193, China)

Abstract Essential polyunsaturated fatty acids can not be synthesized in mammals due to the lack of Δ -12 and ω -3 fatty acid desaturases. Expressing ω -3 fatty acid desaturases in transgenic mammals could convert long chain n-6 polyunsaturated fatty acids to n-3 polyunsaturated fatty acids, significantly reducing the level of long chain n-6 polyunsaturated fatty acids. In this study, the muscle-specific transgenic mice expressed *Caenorhabditis elegans* *FAT-1* and *FAT-2* genes, which encode ω -3 and Δ -12 fatty acid desaturases respectively and human catalase *hCAT* gene, based on "self-cleaving" 2A peptides, and they were generated by microinjection. Fatty acids in skeletal muscle were analyzed by gas chromatography. The level of total n-3 polyunsaturated fatty acids in transgenic mice was 2.6-fold higher than that in wild type mice, while there was no significantly difference in the level of total n-6 polyunsaturated fatty acids between transgenic and wild type mice. But the skeletal muscle tissue of transgenic mice had a dramatically reduced ratio of n-6/n-3 fatty acids ($P < 0.01$). In addition, the expression level of human catalase was identified by Western blot, and the catalase activity of hCAT in skeletal muscle of transgenic mice was significantly higher than that of wild type mice ($P < 0.01$).

Key words polyunsaturated fatty acids, Δ -12 fatty acid desaturases, ω -3 fatty acid desaturases, human catalase

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00222

*This work was supported by a grant from Genetically Modified Major Projects (2008ZX08006-003).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62733181, E-mail: qingyong.meng@gmail.com

Received: August 8, 2011 Accepted: September 8, 2011