

一种抗革兰氏阳性致病菌新型靶酶* ——分选酶

罗立新** 施周铭

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510641)

摘要 许多革兰氏阳性菌的表面蛋白是经过一种被称为分选酶的半胱氨酸转肽酶的作用而锚定到细胞壁上, 由于表面蛋白在病原菌的致病性方面起关键作用, 分选酶有可能成为降低革兰氏阳性菌致病性的药物靶点. 目前, 通过对金黄色葡萄球菌中分选酶 A (SrtA) 的研究, 已初步阐明分选酶的作用机制及其活性位点, 与此同时, 一些 SrtA 抑制剂的初步鉴定为今后抑制剂更深层次的筛选提供了基础.

关键词 分选酶, 金黄色葡萄球菌, 表面蛋白, 分选信号

学科分类号 Q81

抗菌药物曾经是西医治疗学最成功的典范, 但近年来, 细菌耐药性增加, 特别是多药耐药细菌的增加速度已经超过了发现新抗生素的速度. 如何解决细菌耐药性问题是当前国内外生化领域的研究热点. 自从 Mazmanian 等^[1]于《科学》杂志(Science)上发表有关金黄色葡萄球菌分选酶(sortase, Srt)的文章以来, 国外很多研究者在分选酶, 尤其是金黄色葡萄球菌分选酶(SrtA)方面做了大量的基础研究工作, 并期待这一新发现的酶能成为抗革兰氏阳性致病菌感染的靶酶, 从而开辟新抗菌药物的筛选途径和新抗菌治疗方法. 分选酶具有独特的作用机制, 它是一些革兰氏阳性细菌将表面致病性蛋白锚定到细胞壁上的关键酶, 如果阻断这个由分选酶介导的锚定过程, 革兰氏阳性菌就无法表现出强烈的致病性并很容易被机体免疫系统所识别. 基于这一理论基础, 当对许多革兰氏阳性菌进行 SrtA 基因敲除实验后发现, SrtA 的缺乏使病原菌无法正常地将表面蛋白锚定到细胞壁上, 从而很大程度降低了病原菌的致病性. 本文以金黄色葡萄球菌分选酶(SrtA)为阐述对象来介绍分选酶的催化机制及其相关研究进展.

1 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 分选酶 A (SrtA) 的催化反应机制

病原菌表面蛋白不仅促进病原菌和动物组织细

胞之间的反应, 而且提供细菌逃避宿主免疫反应的手段. 以金黄色葡萄球菌为代表的革兰氏阳性致病菌, 其基因组至少编码 10 种以上表面蛋白, 这些表面蛋白能与人的不同组织、血清蛋白及细胞外基质的多肽相互作用, 如金黄色葡萄球菌的表面蛋白 A (Spa) 能与免疫球蛋白的 Fc 部分相连, 可使金黄色葡萄球菌进入人体宿主后, 不被调理吞噬. 菌体中的分选酶 A (SrtA) 是表面蛋白锚定到菌体细胞壁这一过程的关键酶, 它是一种膜结合巯基转肽酶^[1,2], 由 206 个氨基酸组成, 具有催化活性的 Cys184 位于分选酶特征基序 LXTC 上. SrtA 通过肽链 N 端部分固定在细胞膜上, 并能识别表面蛋白 C 端分选信号所含的保守氨基酸基序 LPXTG, 它通过某种目前尚不清楚的识别机制识别分选表面蛋白 C 端基序 (motif) LPXTG 并将之锚定到细胞壁上, 此酶因具有这种功能而被称为分选酶 (sortase, Srt).

Mazmanian 等^[1]以金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 中的表面蛋白 A (Spa) 为模型研究了表面蛋白的锚定过程. 表面蛋白 A 的 N 端

*教育部留学归国人员科研启动基金项目(教外司留 2005546).

** 通讯联系人. Tel: 020-87113841, Fax: 020-87114881

E-mail: btlxluo@scut.edu.cn

收稿日期: 2006-04-07, 接受日期: 2006-04-30

和 C 端部分都含有特征信号肽，N 端部分与表面蛋白如何分泌到膜外密切相关^[2]，保守氨基酸序列 LPXTG 片段 (LPXTG motif)、一个疏水区域 (hydrophobic domain) 和尾部带电荷的氨基酸残基 (charged tail) 这三部分则组成了含 35 个氨基酸残基的 C 端信号肽部分并被称之为细胞壁分选信号 (cell wall sorting signal, CWS) (图 1). 加州大学的 Ton-That 等^[3,4]在体内体外试验中较为详细地阐明了金黄色葡萄球菌表面蛋白的锚定过程及 SrtA 的相关生物学特性. 锚定过程 (图 2) 的第一步为断裂反应 (cleavage)，携带基序 LPXTG 的表面蛋白作为底物与 SrtA 的催化活性口袋 (pocket) 结合后，SrtA 的保守氨基酸残基 Cys184 作为亲核基团攻击底物 LPXTG 中的 T-G 肽键并与底物形成酰基酶中间体. 反应第二步称之为转肽反应 (transpeptidation)，肽

聚糖前体物 lipid II^[5] 中 5 个甘氨酸交联桥的氨基亲核攻击酰基酶中间体而形成酰氨键，通过这两步反应表面蛋白共价结合到 lipid II 上，随后青霉素结合蛋白 (penicillin binding proteins) 催化 lipid II 交叉联结形成成熟的肽聚糖.

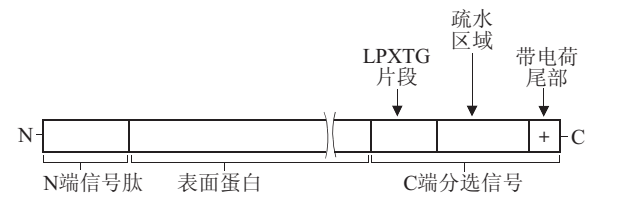


Fig. 1 Diagram illustrating a sorting signal-containing surface protein^[6]
图 1 带有分选信号的表面蛋白^[6]

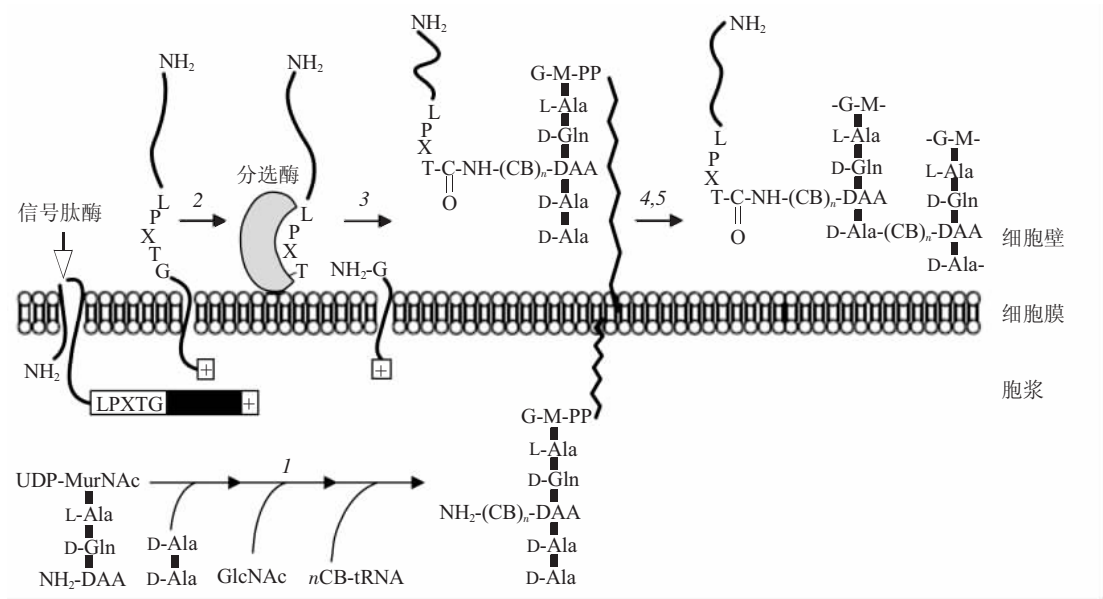


Fig. 2 Sortase catalyzed surface protein attachment^[7]
图 2 分选酶催化表面蛋白锚定过程^[7]

1: 肽聚糖前体物 lipid II 在细胞质的合成过程; 2: 分选酶断裂表面蛋白前体物中的分选信号，并与断裂的分选信号形成酰基酶中间体; 3: 中间体受到 lipid II 中肽桥的亲核攻击并与其形成酰胺键; 4,5: lipid II 与表面蛋白连接后经转糖苷作用和转肽作用后形成成熟的肽聚糖, 表面蛋白锚定到细胞壁肽聚糖上.

根据分选酶独特的作用机制，可以将它运用于细胞表面呈现技术 (cell-surface display) 领域，这种技术可在细胞表面表现出蛋白质并用以筛选出与某一特定物质有亲和作用的蛋白质，或在细胞表面表现出抗原蛋白质做为疫苗之用，目前用于此技术的模式微生物主要是革兰氏阴性菌和酵母，而在革兰

氏阳性菌上的应用报道较少. 最近，Nguyen 和 Schumann^[8]首次通过外源 SrtA 将 α 淀粉酶固定到枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 细胞壁表面上，由于目前尚不清楚 *B. subtilis* 中分选酶所识别的信号基序，他们先将单核细胞增多性李司氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 中的 *srtA* 基因导入 *B. subtilis* 中，

然后将 α -amylase 基因与带有 LPXTG 分选基序的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 纤维素结合蛋白 B (fibronectin binding protein B) 基因融合并构建成为质粒后导入 *B. subtilis* 表达, 结果显示有 240 000 分子的 α 淀粉酶通过分选酶作用固定在每个菌体细胞上。

2 分选酶 A 的三维结构

Ilangoan 等^[9]首先对 SrtA 的三维结构进行了初步探索, 他们将 SrtA 的 N 端截去 59 个氨基酸残基后得到 SrtA_{Δ59}, 并采用 NMR 和 X 射线衍射技术得到它的三维结构, 由于 SrtA_{Δ59} 在体外的断裂及转肽催化活性与原型基本保持一致, 因此可以用它作为模型来研究 SrtA 的活性位点。三维结构显示 SrtA 卷曲成 8 条 β 折叠、1 条 α 螺旋和 2 条有 3 个转角的螺旋连接到 β 折叠上, 其中 β 4-、 β 7-、 β 8- 形成的口袋 (pocket) 可结合多肽底物, 口袋上的 Cys184、His120 和 Trp194 组成了 SrtA 的活性中心 (图 3)。随后 Ton-That 等^[4,10]用 Ala 取代相应氨基酸残基来观察 SrtA 活性受影响的程度, 结果显示, 当 Cys184 和 His120 被 Ala 取代后, SrtA 无法锚定表面蛋白到细胞壁上, 而当 Trp194 被取代后, SrtA 的转肽活性则有所下降。他们推测当有底物 LPXTG 存在时, Trp194 可以促进 Cys184 与 His120 所在的 β 折叠片上发生构象改变, 而且 Cys 的巯基与 His 咪唑基能形成硫醇盐咪唑 (thiolate-imidazolium) 离子对, 从而激活 Cys 亲核攻击 T-G 肽键 (机制类似于木瓜蛋白酶)。但目前这个推测尚有争议, Connolly 等^[11]在对 SrtA 抑制动力学研究过程中发现 thiolate-imidazolium 离子对的假说不符合他们的试验结果, 从而提出了疑问。随后 Luciano 和 Ton-That 等^[12]在 LPXTG 底物存在时对 SrtA 的三维结构 (图 4) 进行了更为深入的分析, 并发现 β 8 折叠片上存在另一个保守氨基酸位点 Arg197, 当用丙氨酸、赖氨酸和组氨酸取代此 Arg 时, SrtA 催化活性严重下降, 因此他们推测 Arg197 通过和 Cys184 的离子化作用, 使 Cys184 的巯基更易攻击易断裂 T-G 肽键, 从而保证了 SrtA 的催化活性。最近, Naik 等^[13]对 SrtA 定点突变后发现, 位于 β 6- 之间 β 7- 回环 (loop) 上的 Glu171 能使 Ca^{2+} 更易结合到酶活性中心附近, 他们还比较详细地阐述了 Ca^{2+} 对酶的激活机制及其相关模型。至于 β 片段之间的回环上是否存在其他活性氨基酸残基, 有待研究人员的进一步探索。

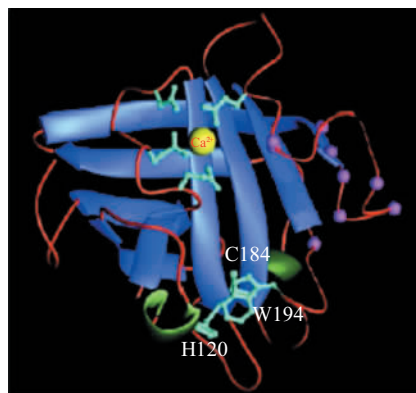


Fig. 3 The three-dimensional structure and active site of SrtA^[10]

图 3 SrtA 三维结构中的活性位点^[10]

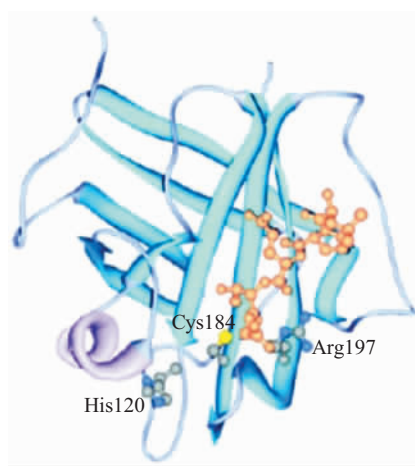


Fig. 4 The three-dimensional structure and active site of SrtA^[12]

图 4 SrtA 三维结构中的活性位点^[12]

3 Sortase 同系物

Pallen 等^[14]通过对已测序的革兰氏阳性菌基因组分析, 发现几乎在所有革兰氏阳性细菌中都存在分选酶基因, 分选酶基因在不同细菌基因组之间不仅在数量上存在差异, 而且在功能上也存在种种差异, 其中包括酶识别底物的机制及所识别分选信号序列差异, 他们当时还认为基因组中存在分选酶冗余序列, 而且不确定那些冗余序列是否会因 SrtA 被抑制而激活。随后 Mazmanian 等^[15,16]首先分析并阐明了 *Staphylococcus aureus* 中另外一种分选酶 SrtB 的相关生物学特性。S. aureus 中, SrtB 主要识别带有 NPQTN 类型锚定信号的 IsdC 表面蛋白并将之锚定到细胞壁上, 目前已知这种 IsdC 表面蛋白与菌体摄取铁元素有关。Zong 等^[17]对 SrtB 的三维结构分析后, 发现 SrtB 的活性中心氨基酸残基

与 SrtA 基本一致但活性中心的激活机制与 SrtA 有所区别. Jonsson 等^[18]以鼠脓毒性关节炎 (murine septic arthritis) 为模型对 SrtA、SrtB 的作用及两者之间的关联问题进行了探讨, 发现 SrtA 相对 SrtB 而言在致病性方面起更为关键的作用但两者之间的致病性具有独立性. 除金黄色葡萄球菌外, 其他革兰氏阳性菌基因组中也存在着与 SrtA、SrtB 类似的序列, 因此对于如何命名其他分选酶存在了争议. Comfort 等^[6]对已测序的 72 种革兰氏阳性菌基因组进行分析, 并将所发现的 176 种分选酶同系物分为 SrtA、SrtB、3、4、5 这 5 个亚类, 其中前两类因基因序列与金黄色葡萄球菌的分选酶具有高度同源性而命名. 他们还对 892 种表面蛋白的分选信号进行了分析, 并初步将 5 个分选酶亚类和能被它们所识别的分选信号进行了归类 (表 1). 随后 Dramsi 等^[19]建议将分选酶分为 A、B、C、D 4 类, 分别以 SrtA、SrtB、SrtC、SrtD 加以表示, 并且还比较详细地列举了这 4 类分选酶之间的区别以及在革兰氏阳性菌中的功能差异.

Table 1 Cell wall sorting signals (CWS) categorized by subfamily type^[6]

表 1 能被不同分选酶亚类所识别的分选信号^[6]

分选酶	1	2	3	4	5	6
SrtA	L	P	X	T	G	X
SrtB	N	P	X	T	N	D
Family3	L	P	X	T	G	G
Family4	L	P	X	T	A	X
Family5	L	A	X	T	G	X

4 SrtA 的抑制剂

随着对 SrtA 三维结构及其活性位点的明确, 目前很多研究集中分选酶抑制动力学特性上, 并筛选相应的抑制剂作为筛选抗菌药物的基础. 根据重氮酮和氯甲烷能与半胱氨酸的硫氢基形成共价硫醚键的原理, Scott 等^[20]首次合成了由 LPXTG 类型蛋白质底物衍生而得到的不可逆性抑制剂, 肽酰重氮甲烷 (Cbz-Leu-Pro-Ala-Thr-CHN₂) 和肽酰氯甲烷 (Cbz-Leu-Pro-Ala-Thr-CH₂Cl), 其中肽酰氯甲烷对酶有更强的抑制效果. 汉城国立大学的 Kim 等^[21]在 80 多种植物药物中筛选了几种 SrtA 的不可逆性抑制剂, 其中木防己 (*Cocculus trilobus*)、浙贝母 (*Fritillaria verticillata*)、阔叶麦冬 (*Liriope*

platyphylla) 和漆树 (*Rhus verniciflua*) 对 SrtA 有比较强的抑制效果, 而木防己对 SrtA 的半抑制浓度 (*IC*₅₀) 为 1.52 mg/L, 抑制效果最好. Kim 等^[22,23]又在浙贝母的鳞茎 (bulbs of *Fritillaria verticillata*) 中分离得到有效成分 beta-sitosterol-3-O-glucopyranoside, 这种物质能有效抑制 SrtA, 它对 SrtA 的半抑制浓度 (*IC*₅₀) 为 18.3 mg/L, 对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 最小抑菌浓度 (*MIC*) 分别为 50 mg/L 和 200 mg/L, 随后他们又分析鉴定了 4 种异喹啉生物碱^[22]对 SrtA 的抑制活性, 其中的盐酸黄连素 (berberine chloride) 对 SrtA 有最强的抑制效果, 它对 SrtA 的半抑制浓度 (*IC*₅₀) 为 8.7mg/L, 对革兰氏阳性菌的 *MIC* 范围为 50~400 mg/L 之间. 最近, Oh 等^[24,25]从韩国西南部 Chuja-Do 岛水域的浅水海绵 *Spongosorites* sp. 中分离出一系列 2- 吡啶生物碱 (Bis(indole) alkaloids), 结合反相高压液相层析和光谱分析确定了 9 种复合物并分别绘出了它们的结构式及其功能基团. 随后他们分别用这 9 种吡啶生物碱做了抑制 *S.aureus* 中的 SrtA 酶活及抑制 *S.aureus* 生长的实验, 结果显示, 第一种生物碱 deoxytyopsentin 抑制作用最强 (*IC*₅₀: (15.67 ± 0.54) mg/L; *MIC*<12.5 mg/L), 其他 8 种吡啶生物碱对 SrtA 的抑制效果存在不同程度的差别. 他们通过对这 9 种复合物的结构式及其功能分析后, 初步确定咪唑基和吡嗪基构成抑制功能的基本骨架, 这为以后合成高效的分选酶抑制剂提供了理论基础.

5 展 望

传统的抗生素是杀灭所有微生物, 但存在很强的选择性压力, 易导致潜在的抗性菌株的出现, 以分选酶作为新靶点, 其抗菌药物筛选模型的优点在于, 以分选酶的抑制剂作为抗感染制剂, 抑制细菌的感染机制, 使其易被宿主的免疫系统所识别, 相对于细菌的抗性不存在选择性压力, 目前分选酶抑制剂的筛选主要以金黄色葡萄球菌分选酶 A 为模型, 虽然已初步筛选出抑制活性相对较高的抑制剂, 但对于这些抑制剂能否广谱作用于革兰氏阳性菌还存在疑问. 如 Paterson 和 Mitchell^[26]通过实验证明, SrtA 在肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 中是作为适合性因子 (fitness factor) 而不是类似 *S. aureus* 中的致病因子 (virulence factor), 他们分别用 SrtA 突变型和亲本野生型去感染小鼠的肺部和血液以建立肺炎和菌血症 (bacteraemia) 模型, 结果

显示, 在两种感染模型中感染 36 h 后, 两者菌落数及小鼠存活的时间都无明显区别, 随后他们将 SrtA 突变型和亲本野生型以 1:1 的比例去感染小鼠肺部, 结果显示野生型的菌落数多于突变型, 从而证实了他们的设想. 此外, 分选酶识别底物分选信号的详细机制有待于进一步探明. Jonsson 等^[8]认为分选酶亚类间的功能是通过它们所锚定到细胞壁上的表面蛋白间接表现出来的, 因此, 进一步探明除 SrtA 及 SrtB 外其他分选酶亚类所锚定的表面蛋白, 有助于建立分选酶基因缺失模型, 最终可以针对性地筛选相应的分选酶抑制剂.

参 考 文 献

- Mazmanian S K, Liu G, Hung T T, *et al.* Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 1999, **285** (5428): 760~763
- Bae T, Schneewind O. The YSIRK-G/S motif of staphylococcal protein A and its role in efficiency of signal peptide processing. *J Bacteriol*, 2003, **185** (9): 2910~2919
- Ton-That H, Liu G, Mazmanian S K, *et al.* Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (22): 12424~12429
- Ton-That H, Liu G, Mazmanian S K, *et al.* Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Sortase catalyzed *in vitro* transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH(2)-Gly(3) substrates. *J Biol Chem*, 2000, **275** (13): 9876~9881
- Ruzin A, Severin A, Ritacco F, *et al.* Further evidence that a cell wall precursor [C (55)-MurNAc-(peptide)-GlcNAc] serves as an acceptor in a sorting reaction. *J Bacteriol*, 2002, **184** (8): 2141~2147
- Comfort D, Clubb R T. Comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in gram-positive bacteria. *Infect Immun*, 2004, **72** (5): 2710~2722
- Ton-That H, Marraffini LA, Schneewind O. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *BBA-Bio*, 2004, **1694** (11): 269~278
- Nguyen H D, Schumann W. Establishment of an experimental system allowing immobilization of proteins on the surface of *Bacillus subtilis* cells. *J Biotech*, 2006, **122** (4): 473~482
- Ilangovan U, Ton-That H, Iwahara J, *et al.* Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (11): 6056~6061
- Ton-That H, Mazmanian S K, Alksne L, *et al.* Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis. *J Biol Chem*, 2002, **277** (9): 7447~7452
- Connolly K M, Smith B T, Pilpa R, *et al.* Sortase from *Staphylococcus aureus* does not contain a thiolate-imidazolium ion pair in its active site. *J Biol Chem*, 2003, **278** (36): 34061~34065
- Marraffini L A, Ton-That H, Zong Y N, *et al.* Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus* - A conserved arginine residue is required for efficient catalysis of sortase A. *J Biol Chem*, 2004, **279** (36): 37763~37770
- Naik M T, Suree N, Ilangovan U, *et al.* *Staphylococcus aureus* Sortase A transpeptidase - Calcium promotes sorting signal binding by altering the mobility and structure of an active site loop. *J Biol Chem*, 2006, **281** (3): 1817~1826
- Pallen M J, Lam A C, Antonio M, *et al.* An embarrassment of sortases - a richness of substrates?. *Trends Microbiol*, 2001, **9** (3): 97~101
- Mazmanian S K, Ton-That H, Su K, *et al.* An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (4): 2293~2298
- Mazmanian S K, Skaar E P, Gaspar A H, *et al.* Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science*, 2003, **299** (5608): 906~909
- Zong Y N, Mazmanian S K, Schneewind O, *et al.* The structure of sortase B, a cysteine transpeptidase that tethers surface protein to the *Staphylococcus aureus* cell wall. *Structure*, 2004, **12** (1): 105~112
- Jonsson I M, Mazmanian S K, Schneewind O, *et al.* The role of *Staphylococcus aureus* sortase A and sortase B in murine arthritis. *Microbes*, 2003, **5** (9): 775~780
- Drams S, Trieu-Cuot P, Bierre H. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Res Microb*, 2005, **156** (3): 289~297
- Scott C J, McDowell A, Martin S L, *et al.* Irreversible inhibition of the bacterial cysteine protease-transpeptidase sortase (SrtA) by substrate-derived affinity labels. *Biochem J*, 2002, **366** (pt3): 953~958
- Kim S W, Chang I M, Oh K B. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by medicinal plants. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66** (12): 2751~2754
- Kim S H, Shin D S, Oh M N. Inhibition of sortase, a bacterial surface protein anchoring transpeptidase, by beta-sitosterol-3-O-glucopyranoside from *Fritillaria verticillata*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, **67** (11): 2477~2479
- Kim S H, Shin D S, Oh M N, *et al.* Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by isoquinoline alkaloids. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68** (2): 421~424
- Oh K B, Mar W, Kim S, *et al.* Bis(indole) alkaloids as sortase A inhibitors from the sponge *Spongosorites* sp. *Bioorg Med*, 2005, **15** (22): 4297~4931
- Oh K B, Mar W, Kim S, *et al.* Antimicrobial activity and cytotoxicity of bis(indole) alkaloids from the sponge *Spongosorites* sp. *Biol Phar B*, 2006, **29** (3): 570~573
- Paterson G K, Mitchell T J. The role of *Streptococcus pneumoniae* sortase A in colonisation and pathogenesis. *Microbes*, 2006, **8** (1): 145~153

Sortase: New Target Enzyme in Gram-positive Pathogens*

LUO Li-Xin**, SHI Zhou-Ming

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract Many surface proteins of Gram-positive bacteria are anchored to the cell wall by the action of sortase enzymes, a recently discovered family of cysteine transpeptidases. As the surface proteins of pathogens are frequently required for virulence, the sortase might be a suitable target for the development of anti-Gram-positive drugs. Recently, the mechanism and active sites of sortase was elucidated by the research of sortaseA (SrtA) in *Staphylococcus aureus* and a series of SrtA inhibitors have been identified for providing the basis for further development of potent inhibitors.

Key words sortase, *Staphylococcus aureus*, surface protein, sorting signal

*This work was supported by a grant from The Project Sponsored by the Scientific Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (2005546).

**Corresponding author . Tel: 86-20-87113841, Fax: 86-20-87114881, E-mail: btlxluo@scut.edu.cn

Received: April 7, 2006 Accepted: April 30, 2006