

第一类肽链释放因子结构与功能研究的新进展*

陈洁 柴宝峰 梁爱华**

(化学生物学和分子工程教育部重点实验室, 山西大学生物技术研究所, 太原 030006)

摘要 蛋白质生物合成过程的终止是由于第一类肽链释放因子识别终止密码子, 并导致肽酰-tRNA 酯键水解, 释放出新合成的多肽链。近期, 通过冷冻电镜、结晶学、核磁共振、分子动力学和生物化学等方面的研究, 使第一类肽链释放因子的结构与功能逐渐清晰。对近期的研究进行了分析和整理。

关键词 第一类肽链释放因子, 冷冻电镜, 晶体结构, 核磁共振, 分子动力学

学科分类号 Q753

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00780

蛋白质合成的整个过程包括在核糖体上发生的肽链合成的起始、延伸、终止并释放新生肽链等几个步骤, 其中的终止过程主要由两类肽链释放因子(polypeptide release factor, RF)参与。第一类肽链释放因子为密码子特异性因子, 负责识别终止密码子并诱导肽酰-tRNA 的水解, 而第二类肽链释放因子则是一类 GTP 酶, 为密码子非特异性, 协助第一类肽链释放因子行使功能^[1]。

真核及原核生物中第一类肽链释放因子的功能不尽相同, 原核生物中有两种第一类肽链释放因子 RF1 和 RF2, RF1 识别 UAG/UAA, RF2 识别 UGA/UAA, 而在大多数真核生物中只有一种第一类肽链释放因子 eRF1, 负责识别 3 个终止密码子。但有趣的是, 纤毛虫虽然是真核生物, 但在其中的一些物种中却发现也有两种第一类肽链释放因子, 可能与纤毛虫终止密码子编码氨基酸的现象有关^[2]。这就意味着这些生物中第一类肽链释放因子识别终止密码子的机制与高等真核生物存在差异。人 eRF1 晶体结构的解析使人们对第一类肽链释放因子的精细结构有了直观的认识, 而第一类肽链释放因子如何识别终止密码子? 在纤毛虫中终止密码子为什么会编码氨基酸? 新生肽链的释放机制是怎样的? 这些问题已经成为第一类肽链释放因子结构与功能关系研究的热点。

3 个结构域(domain)组成(N、M 和 C), 形状类似字母 Y。M 结构域位于 Y 的茎部, 其总体形状和空间结构与 tRNA 相似(图 1a), 支持了 tRNA-mimicry 模型^[3]。eRF1 的 3 个结构域都属于 α - β 三明治结构簇, 但是具有不同的拓扑学结构。N 结构域中包含 4 个 β 折叠形成的簇, 两侧是 α 螺旋, 其中 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 形成反平行的螺旋发夹堆积在 β 折叠的一侧, 在螺旋和 β 折叠的界面间形成明显的沟, 这种结构特点对终止密码子的识别具有极其重要的作用。第一类肽链释放因子 N 端的螺旋 $\alpha 1$ 与 C 结构域形成了一个界面。M 结构域的特点是 $\alpha 5$ 螺旋的 N 端偏离结构域主体达 25Å, 并且在高度保守的 GGQ 区不具有二级结构, 而是形成转角, 并与 M 结构域 β 簇的边缘相连^[3]。2007 年, Ivanova 等^[4]用 NMR 对溶液中的 M 结构域进行构象分析, 结果表明: 溶液构象与晶体结构在 GGQ 模块上有较大的差异。GGQ 模块在溶液中的构象具有更大的柔性, 在 NMR 动力学分析中具有较快的质子交换速率和相对缓慢的构象重排。此外, 在 GGQ 模块 C 端 α 螺旋的尽头还有一个 loop 结构, 在动力学研究中, 该 loop 具有快运动(ps-ns)和慢运动(ms)两种运动方

1 第一类肽链释放因子的结构

人肽链释放因子的晶体结构表明: eRF1 由

* 国家自然科学基金资助项目(30670282, 30770294)。

** 通讯联系人。

Tel: 0351-7018731, E-mail: aliang@sxu.edu.cn

收稿日期: 2008-11-13, 接受日期: 2009-01-19

式, 可能也具有独特的功能. M 和 C 结构域之间通过一个较长的 α 螺旋连接, 该螺旋处于两个结

构域的分界面上. C 结构域不是典型的 α - β 三明治结构.

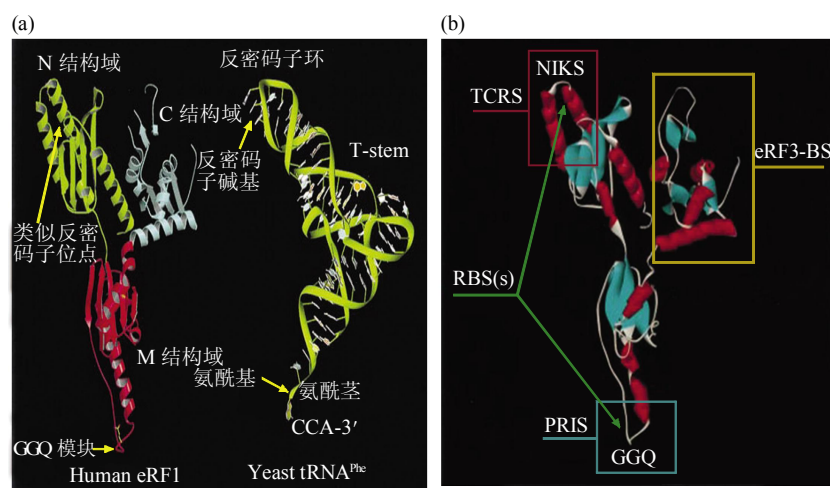


Fig. 1 The structure feature of the class I polypeptide release factors^[3]

图 1 第一类肽链释放因子的结构特点^[3]

(a)第一类肽链释放因子的 tRNA-mimicry 模型. (b)第一类肽链释放因子的功能位点.

2 第一类肽链释放因子的功能

目前, 普遍认为肽链释放因子的 3 个结构域分别执行 3 个不同的功能(图 1b). N 结构域中保守的 NIKS 和 YxCxxxF 区可能与终止密码的识别有关^[3], 这两个保守区分别位于 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 螺旋上. 不论原核还是真核生物, 所有第一类肽链释放因子 RFs 的 M 结构域中, 高度保守的 GGQ 区可激发肽酰 tRNA 的水解^[3]. RF 的 GGQ 区极可能模拟 tRNA 末端的 CCA, 并占据 A 位点的相同位置^[6]. C 结构域是两类肽链释放因子相互作用的区域.

2.1 第一类肽链释放因子解码的可能模式

目前, 提出了两种模式来阐述第一类肽链释放因子对终止密码子的解码: 一种模式突出了 16 S 和 23 S rRNA 的重要性, 这是由于对 rRNA 的突变会影响解码的准确性^[7], 暗示了 rRNA 与 mRNA 或终止子-RF 复合体之间可能存在相互作用. 另一种模式更关注第一类肽链释放因子上氨基酸与 mRNA 上终止密码子的直接相互作用^[6].

原核细胞中, 结合于核糖体上的 RF2 与终止密码子之间极为接近, 支持第二种模式. 肽链释放因子 RF1 和 RF2 在核糖体上的晶体结构显示: 包含 PVT 三肽模块的 loop 区域环绕着终止密码子, 特别是密码子的第二、第三位碱基(图 2)^[6]. 此外, $\alpha 5$ -螺旋的末端靠近终止密码子的第一位碱

基, 可能参与对尿苷 U 的识别, 而尿苷是所有终止密码子的第一位碱基. 在晶体结构中, 电子密度沿着从反密码子环的末端向终止密码子 3' 碱基的方向延伸^[6]. 较早获得的人线粒体肽链释放因子 mtRF1 的基因^[8], 其 PVT 模块的后面含有 4 个额外的氨基酸, 它们可能参与介导对线粒体特异性终止密码子 AGG 和 AGA 的识别, 而在最近(2007 年)鉴定的人线粒体肽链释放因子 mtRF1a 则更类似于 RF1^[9].

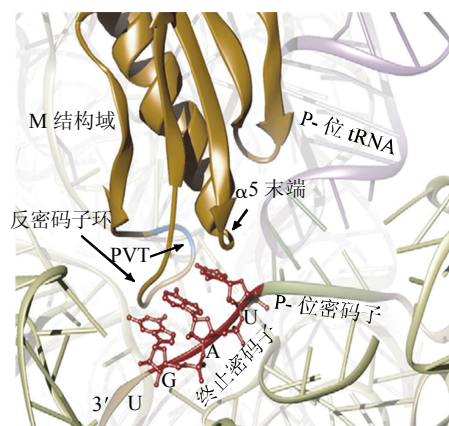


Fig. 2 Interaction of RF1 with the decoding center of the 30 S subunit from *E. coli*^[6]

图 2 大肠杆菌 *E. coli* 第一类释放因子与 30 S 亚基解码中心的相互作用^[6]

真核生物蛋白质合成的终止主要由两类肽链释放因子的协同作用来完成, 最新的试验研究结果表明: 由第一类肽链释放因子 N 端结构域中的两个模体(motifs) 即“TASNIKS”和“YxC_{xxx}F”通过与相应的核苷酸形成氢键, 参与终止密码子的识别^[10, 11]; 第二类肽链释放因子通过水解 GTP, 改变第一类肽链释放因子的构象, 决定其对 3 个终止密码子的识别活性^[11]。以此解释, 纤毛虫肽链释放因子识别终止密码子活性的改变不仅决定于识别结构域关键氨基酸, 而且受到两类肽链释放因子相互作用关系的影响。本课题组利用游仆虫等纤毛虫为材料, 先后获得 4 个肽链释放因子基因及其重组蛋白(Eo-eRF1a, Eo-eRF1b, Bj-eRF1, Eo-eRF3), 其中一种(Eo-eRF1a)纯化后获得分辨率达 2.8 Å 的晶体, 这是除人的肽链释放因子外, 在真核生物中获得的另一个第一类肽链释放因子晶体^[12, 13]。2006 年, 本课题组通过构建一系列突变体, 在体内体外研究了游仆虫中两种肽链释放因子的相互作用关系和作用区域, 并进一步证实了第一类肽链释放因子对第二类肽链释放因子的 GTP 酶活性是不可或缺的^[14]。目前, 课题组正在通过定点突变的方法, 研究纤毛虫肽链释放因子参与识别终止密码的氨基酸, 探讨纤毛虫第一类肽链释放因子的解码模式。

第一类释放因子在结构上模拟了 tRNA, 那么在功能上它是否也会选择类似的解码方式呢? 众所周知, tRNA 对有义密码子的解码过程存在校读机

制, 但是令人奇怪的是, 虽然在 RFs 对终止密码子的识别过程中没有进行校读, 其解码的精确性却高于 tRNA 对有义密码子的解码。Youngman 等^[15]的研究表明: 对 16 S rRNA 解码位点的碱基(A1492、A1493 和 G530)直接进行突变产生的影响不同于 tRNA 和 RF1/2。来源于其他 16 S rRNA 区域中碱基的突变影响 RF 对特定终止密码子的识别, 但是不影响 tRNA 的解码^[16]。因此, RF1 和 RF2 对终止密码子的识别是直接的, 但其机制明显不同于 tRNA 对有义密码子的解码^[17]。

2.2 第一类肽链释放因子是如何释放新生肽链的

Alkalaeva 等^[10]在体外重建了真核翻译的过程, 提出了一个真核翻译终止的模型(图 3)。首先是 eRF1, eRF3 和 GTP 结合于预终止复合物 pre-TC 上(第一步); 然后导致 pre-TC 重排(第二步), 重排可能是主要结构发生了变化, 也可能是 P 位点密码子和朝向 E 位点的肽酰-tRNA 反密码子茎环(但不是接受臂)以及朝向 P 位点的 A 位点终止密码子的部分或整体发生位移。在重排后复合物的 PTC 中, eRF1 的 GGQ 区不能正确定位, 要求 eRF3 介导的 GTP 水解(第三步)。结合 GTP 的 eRF3 水解可以导致 eRF3-GDP 从核糖体上释放, 或改变它与 eRF1 的相互作用, 可以使 PTC 中的 GGQ 区正确装配; 最后, 精确定位的 eRF1 最终激发肽酰 tRNA 的水解(第四步)。

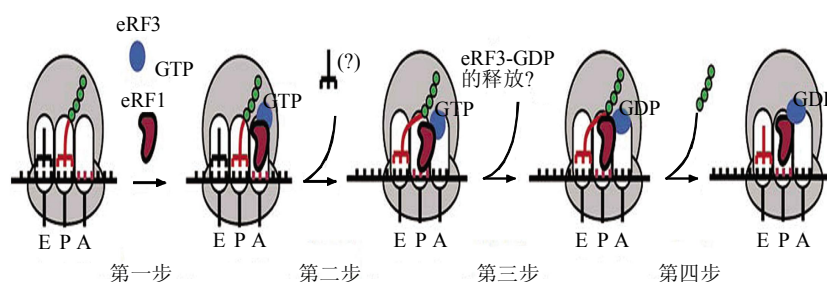


Fig. 3 A model for translation termination in Eukaryotes^[10]

图 3 真核生物中翻译终止的模式^[10]

第一步: eRF1, eRF3 和 GTP 结合于 pre-TC; 第二步: Pre-TC 转位 / 结构重排; 第三步: eRF3 水解 GTP; 第四步: 肽酰-tRNA 水解和肽链的释放。

晶体结构研究表明, 大肠杆菌第一类释放因子 RF1 的 GGQ loop 可以进入核糖体(图 4), 作用于肽酰转移酶中心(peptidyl transferase center, PTC), 与 P 位点的 tRNA 的 A76 相对^[6]。与 GGQ loop 最靠近的 23 S rRNA 的核苷酸是 U2585 和 A2602, 突变分析证明, 它们对于 RF 介导的肽酰 tRNA 水解是十分关键的^[18]。RF 与核糖体 A76 之间存在一定

距离, RF 上能够跨越这一距离的最长侧链是谷氨酰胺, 但是奇怪的是, 对它的突变并不影响 RF 的活性^[19]。值得注意的是, 该氨基酸不论在真核或原核生物中其 N5 位置都是甲基化的^[20, 21]。晶体研究表明: 用 3' 含 CAA 的 tRNA 类似物与 *Haloarcula marismortui* 的 50 S 核糖体亚基结合可以导致几种 23 S rRNA 核苷酸(2583~2585 及 2506)的移动, 在

诱导的状态下, 肽酰-tRNA 的酯键暴露出来, 受到进入核糖体 A 位氨基酸 α -氨基的亲核进攻^[22]. 第一类肽链释放因子与 tRNA 相似, 可以诱导 PTC 的构象发生变化, 使得化学上较难发生的水的亲核进攻得以实行. 在水解过程中, 选择水作为亲核试剂是至关重要的^[23]. 在 NMR 动力学分析中, GGQ 具有较快的质子交换速率, 推测 GGQ loop 可能与水形成配合物, 使水对肽酰 tRNA 的酯键进行亲核进攻^[4], 使肽链从肽酰 tRNA 脱落, 新生肽链得以释放. 此外, 以含 GGQ 模块的 11 个残基 loop 作为 A 位点的类似物, 用分子动力学(molecular dynamics, MD)方法进行观测的确得到一个氢键的模型^[24].

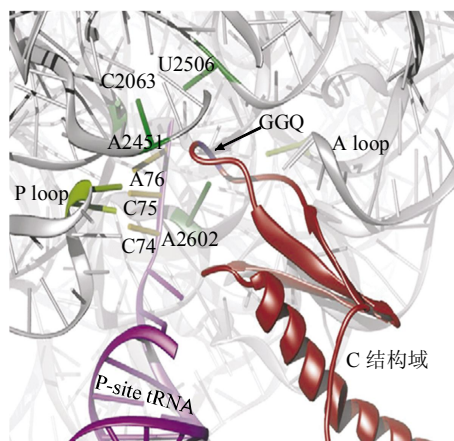


Fig. 4 Interaction of RF1 with the peptidyl transferase center of the 50 S subunit from *E. coli*^[6]

图 4 大肠杆菌 *E. coli* 第一类释放因子 RF1 与 50 S 核糖体亚基的相互作用^[6]

2.3 第一类肽链释放因子结构域间信号的传导

翻译过程中, 当行进中的核糖体遇到 mRNA 上的终止密码子, 终止密码子处于 A 位点, 解码过程发生在小亚基上, 而肽酰 tRNA 酯键的水解发生在大亚基 PTC 上. 对于第一类肽链释放因子, 负责解码和酯键水解的分别是 N 和 M 结构域, 那么它们之间的信号是如何传导的? 在原核生物中, 第一类肽链释放因子行使其功能时, 信号是从位于解码中心负责识别反密码子 RF 的 M 结构域传导到处于 PTC 中 RF 的 C 结构域. 与真核的 eRF1 不同, RF1 或 RF2 处于“关闭”的晶体构象^[25, 26], 有人提出这样的模型: 在终止密码子的识别过程中, C 结构域从分子的核心反转到 GGQ 模块的位置, 使酯键水解^[24]. 该观点与结合于核糖体上的

RF1/2 的结构^[6, 27~29]是一致的, MD 研究也支持这一模型^[30]. 此外还发现, 当密码子出现在核糖体 A 位点时, RF1/2 与核糖体的结合保持不变, 但是, K_{cat} 参数大多减小^[31]. 然而, 近期用小角度 X 射线散射(small-angle X-ray scattering, SAXS)所获得的数据显示: 在溶液中, 游离的 *E. coli* RF1 是处于打开的构象^[32]. 尽管如此, 当 *E. coli* RF1 与负责对保守 GGQ 模块中的谷氨酰胺进行甲基化的 PrmC 酶形成复合物时, 也是处于关闭的构象^[33], 说明关闭的构象具有一定的功能.

人的 eRF1 的晶体构象与 *E. coli* 不同, 研究表明, 3 个结构域中, M 结构域与 C 结构域可以相互作用, 但不与 N 结构域相互作用, 而 N 结构域的长螺旋 $\alpha 1$ 处于 N 和 C 结构域的界面上, 可能参与了与 C 结构域的相互作用^[3]. Vorob'ev 等^[34]在人 eRF1:mRNA:tRNA 三元复合物的 NMR 构象研究中发现, 终止密码子在空间上与 eRF1 的 C 结构域临近. Ivanova 等^[4]假设了两种信号传递的模式: 一种是信号直接通过 eRF1 从 N 结构域传导到 M 结构域的 GGQ loop, 该结构定位于 PTC 上; 另一种是由 rRNA 介导, 通过下述路径进行的传导过程, N domain→18 S rRNA→28 S rRNA→M domain→GGQ→PTC-peptidyl-tRNA

Song 的观点与第一种不同, 而与第二种途径不谋而合. Ivanova 等^[4]似乎更倾向于第一种模式, 认为 M 结构域中 GGQ loop C 端的螺旋 $\alpha 5$ 在动力学上运动较慢, 因此具有刚性, 当一个环的构象变化时, $\alpha 5$ 的刚性触发了另一个环的构象变化.

3 结 语

在蛋白质合成的终止过程中, 第一类肽链释放因子无疑是重要的蛋白质因子之一, 虽然核糖体与肽链释放因子复合物晶体结构的解析掀起了冰山一角, 但是想在分子水平上了解第一类释放因子如何催化肽酰-tRNA 依赖终止密码子的水解, 还得积累更多的结构数据. 在众多复杂生理过程中, 还需要了解各种功能复合物处于怎样的中间状态. 目前, 虽然尚未掌握 eRF1 和 eRF3 结合于 80 S 核糖体的结构信息, 但新的进展表明, 在确定的功能状态下, 可以通过获取核糖体复合物的结晶, 并在较高分辨率下进行解析以阐明其机制. 我们期待这一途径能与生物化学和遗传学的研究手段一起将翻译终止的分子机理逐步展示于世人面前.

参 考 文 献

- 张素平, 梁爱华. 第一类肽链释放因子研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28** (5): 619~622
Zhang S P, Liang A H. Prog Biochem Biophys, 2001, **27**(5): 619~622
- Liang A H, Claudia B N, Muramatsu T, *et al.* The ciliate *Euplotes octocarinatus* expresses two polypeptide release factors of the type eRF1. Gene, 2001, **262**(1~2): 161~168
- Song H W, Mugnier P, Das A K, *et al.* The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1-Mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. Cell, 2000, **100** (3): 311~321
- Ivanova E V, Kolosov P M, Birdsall B, *et al.* Eukaryotic class 1 translation termination factor (eRF1) the NMR structure and dynamics of the middle domain involved in triggering ribosome-dependent peptidyl-tRNA hydrolysis. FEBS J, 2007, **274** (16): 4223~4237
- Kolosov P, Frolova L, Seit-Nebi A, *et al.* Invariant amino acids essential for decoding function of polypeptide release factor eRF1. Nucleic Acids Res, 2005, **33**(19): 6418~6425
- Petry S, Brodersen D E, Murphy F V, *et al.* Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. Cell, 2005, **123**(7): 1255~1266
- Arkov A L, Murgola E J. Ribosomal RNAs in translation termination: facts and hypotheses. Biochemistry (Mosc), 1999, **64** (12): 1354~1359
- Zhang Y, Spremulli L L. Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor. Biochim Biophys Acta, 1998, **1443**(1~2): 245~250
- Soleimanpour-Lichaei H R, Kuhl I, Gaisne M, *et al.* mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG. Mol Cell, 2007, **27**(5): 745~757
- Alkalaeva E Z, Pisarev A V, Frolova L Y, *et al.* *In vitro* reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. Cell, 2006, **125**(6): 1125~1136
- Fan-Minogue H, Du M, Pisarev A V, *et al.* Distinct eRF3 requirements suggest alternate eRF1 conformations mediate peptide release during eukaryotic translation termination. Mol Cell, 2008, **30** (5): 599~609
- Zhang S P, Zhou W, Liang A H, *et al.* Preliminary X-ray crystallographic analysis of ciliate *Euplotes octocarinatus* release factor eRF1a. Protein and Peptide Letters, 2002, **9**(1): 81~85.
- Wang W, Chai B F, Liang A H, *et al.* Cloning, characterization and expression of the polypeptide release factor gene, eRF1, of *Blepharisma japonicum*. Biotechnol Lett, 2004, **26**(12): 959~963
- Song L, Chai B F, Liang A H, *et al.* Identification of translational release factor eRF1a binding sites on eRF3 in *Euplotes octocarinatus*. Res Microbiol, 2006, **175**(9): 842~850
- Youngman E M, Cochella L, Brunelle J L, *et al.* Two distinct conformations of the conserved RNA-rich decoding center of the small ribosomal subunit are recognized by tRNAs and release factors. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006, **71**: 545~549
- Wang K, Neumann H, Peak-Chew S Y, *et al.* Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. Nat Biotechnol, 2007, **25**(7): 770~777
- Petry S, Weixlbaumer A, Ramakrishnan V. The termination of translation. Current Opinion in Structural Biology, 2008, **18** (1): 70~77
- Youngman E M, Brunelle J L, Kochaniak A B, *et al.* The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. Cell, 2004, **117**(5): 589~599
- Mora L, Heurgue-Hamard V, Champ S, *et al.* The essential role of the invariant GGQ motif in the function and stability *in vivo* of bacterial release factors RF1 and RF2. Mol Microbiol, 2003, **47**(1): 267~275
- Shaw J J, Green R. Two distinct components of release factor function uncovered by nucleophile partitioning analysis. Mol Cell, 2007, **28**(3): 458~467
- Dincbas-Renqvist V, Engstrom A, Mora L, *et al.* A post-translational modification in the GGQ motif of RF2 from *Escherichia coli* stimulates termination of translation. EMBO J, 2000, **19** (24): 6900~6907
- Heurgue-Hamard V, Champ S, Mora L, *et al.* The glutamine residue of the conserved GGQ motif in *Saccharomyces cerevisiae* release factor eRF1 is methylated by the product of the YDR140w gene. J Biol Chem, 2005, **280**(4): 2439~2445
- Schmeing T M, Huang K S, Strobel S A, *et al.* An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA. Nature, 2005, **438**(7067): 520~524
- Trobro S, Aqvist J. A model for how ribosomal release factors induce peptidyl-tRNA cleavage in termination of protein synthesis. Mol Cell, 2007, **27**(5): 758~766
- Vestergaard B, Van L B, Andersen G R, *et al.* Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. Mol Cell, 2001, **8**(6): 1375~1382
- Shin D H, Brandsen J, Jancarik J, *et al.* Structural analyses of peptide release factor 1 from *Thermotoga maritima* reveal domain flexibility required for its interaction with the ribosome. J Mol Biol, 2004, **341** (1): 227~239
- Rawat U B, Zavialov A V, Sengupta J, *et al.* A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. Nature, 2003, **421**(6918): 87~90
- Klaholz B P, Pape T, Zavialov A V, *et al.* Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2. Nature, 2003, **421**(6918): 90~94
- Rawat U, Gao H, Zavialov A, *et al.* Interactions of the release factor RF1 with the ribosome as revealed by cryo-EM. J Mol Biol, 2006, **357**(4): 1144~1153
- Ma B, Nussinov R. Release factors eRF1 and RF2: a universal

- mechanism controls the large conformational changes. J Biol Chem, 2004, **279**(51): 53875~53885
- 31 Freistroffer D V, Kwiatkowski M, Buckingham R H, *et al.* The accuracy of codon recognition by polypeptide release factors. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(5): 2046~2051
- 32 Vestergaard B, Sanyal S, Roessle M, *et al.* The SAXS solution structure of RF1 differs from its crystal structure and is similar to its ribosome bound cryo-EM structure. Mol Cell, 2005, **20**(6): 929~938
- 33 Graille M, Heurgue-Hamard V, Champ S, *et al.* Molecular basis for bacterial class I release factor methylation by PrmC. Mol Cell, 2005, **20**(6): 917~927
- 34 Vorob'ev IuN, Kisselev L L. Molecular modeling of positioning of human release factor eRF1 relative to mRNA stop-codon explains proximity of the eRF1 C-domain to stop-codon in ribosomal complex. Mol Biol (Mosk), 2008, **42**(2): 341~351

New Progress in Function and Structure of The Class I Polypeptide Release Factors*

CHEN Jie, CHAI Bao-Feng, LIANG Ai-Hua**

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education,
Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract The process of protein synthesis is terminated by one of the three stop codons which are recognized by class I polypeptide release factors. Subsequently, it could promote the hydrolysis of the ester bond of peptidyl-tRNA, resulting in release of the nascent polypeptide. Recent results from cryoelectron microscopy, crystallography, NMR, molecular dynamic and biochemical experiments have shed considerable light on the function and structure of the class I release factors. The progress in these aspects were summarized.

Key words class I release factors, cryoelectron microscopy, crystallography, NMR, molecular dynamic

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00780

*This research was supported by The National Natural Science Foundation of China (30670282, 30770294).

**Corresponding author.

Tel: 86-351-7018731, E-mail: aliang@sxu.edu.cn

Received: November 13, 2008 Accepted: January 19, 2009