

托品烷类生物碱生物合成分子生物学与代谢工程

卢 衍^{1,2}, 王细荣^{1,2}, 陈 敏³, 廖志华^{1,2*}

1. 西南大学 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715

2. 西南大学生命科学学院 天然产物与代谢工程实验室, 重庆 400715

3. 西南大学药学院 药物分析教研室, 重庆 400715

摘 要: 莨菪碱和东莨菪碱属于托品烷类生物碱, 是重要的抗胆碱类药物。托品烷类生物碱生物合成分子生物学和代谢工程一直是植物次生代谢工程研究的热点。随着植物功能基因组学和代谢组学的发展, 托品烷类生物碱生物合成研究取得重要进展。重点对托品烷类生物碱生物合成途径、功能基因和代谢工程研究进展进行综述, 并对可能存在的问题以及应用前景进行展望。

关键词: 托品烷类生物碱; 生物合成; 分子生物学; 代谢工程; 功能基因

中图分类号: R282.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)05-1018-06

Molecular biology and metabolic engineering of tropane alkaloids biosynthesis

LU Yan^{1,2}, WANG Xi-rong^{1,2}, CHEN Min³, LIAO Zhi-hua^{1,2}

1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Southwest University, Chongqing 400715, China

2. Laboratory of Natural Products and Metabolic Engineering, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

3. Drug Analysis Department, School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Key words: tropane alkaloids; biosynthesis; molecular biology; metabolic engineering; functional gene

托品烷类生物碱(tropane alkaloids, TAs)来源于茄科颠茄属、莨菪属、山莨菪属、天蓬子属、马尿泡属、泡囊草属、曼陀罗属等数10种药用植物^[1]。莨菪碱和东莨菪碱是TAs中最为重要的两种生物碱, 在临床上应用广泛的抗胆碱类药物。与莨菪碱相比, 东莨菪碱具有不良反应少、药理作用更强的特点, 主要用于镇痛、麻醉、抗晕动症、治疗帕金森症、改善微循环、戒毒脱瘾、治疗农药中毒等, 市场需求十分巨大^[2]。但是东莨菪碱在植物中的量比莨菪碱低得多, 在东莨菪碱商业药源植物颠茄中的量仅为干质量的0.01%~0.08%, 使得东莨菪碱价格高昂。培育东莨菪碱高产的药源植物成为该领域的热门研究内容。但通过大量研究表明, 采用常规育种、脱毒、杂交育种、射线诱变育种、多倍体育种等方法, 均未得到高产东莨菪碱药源植物。近年来, 随着TAs生物合成途径分子生物学和东莨菪碱药源植物基因工程研究的深入, 使得包括莨菪碱和

东莨菪碱在内的TAs生物合成的代谢调控在分子水平上取得了重要进展, 代谢工程成为培育高产TAs药源植物最有可能取得突破的方向。本文就TAs生物合成途径的分子生物学与代谢调控研究进展进行系统综述。

1 托品烷类生物碱的生物合成途径

托品烷类生物碱的生物合成起始于鸟氨酸(ornithine)和精氨酸(arginine)。鸟氨酸在鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)作用下, 脱羧生成腐胺(putrescine); 精氨酸在精氨酸脱羧酶(arginine decarboxylase, ADC)催化下脱羧生成精氨, 然后经过一系列未知酶促反应生成腐胺^[3]; 腐胺在N-甲基-腐胺转移酶(putrescine N-methyl-transferase, PMT)作用下, 甲基化形成N-甲基-腐胺(N-methyl-putrescine, mP), N-甲基-腐胺在二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)作用下生成4-氨基-正丁醛(4-amino-butanal); 4-氨基-正丁醛再自

收稿日期: 2011-11-03

基金项目: 国家“863”计划项目: 东莨菪碱植物代谢产物生物反应器研制(2011AA100605); 重庆市高校优秀人才资助计划

作者简介: 卢 衍(1986—), 硕士研究生, 研究方向为药用植物的代谢工程。Tel: (023)68367146 E-mail: v015158@163.com

*通讯作者 廖志华 Tel: (023)68367146 E-mail: zhiliao@swu.edu.cn

2 托品烷类生物碱生物合成途径中的功能基因

TAs 生物合成途径分子生物学研究开始于 20 世纪 80 年代, 经过 30 多年研究, 该途径中多个重要功能基因, 包括 *PMT*、*TRI*、*TRII*、*CYP80F1* 和 *H6H* 都已经从多种茄科植物中克隆鉴定 (表 1)。

2.1 PMT

PMT 是一种甲硫氨酸依赖性的甲基转移酶, 能够促进腐胺氮甲基化生成 *N*-甲基-1, 4-丁二胺和 *S*-腺苷高半胱氨酸, 一般认为 PMT 催化的反应是 TAs 生物合成途径的限速反应, PMT 是 TAs 生物合成

表 1 茄科植物 TAs 合成相关酶基因

Table 1 Related genes involved in biosynthetic pathway of TAs from plants in Solanaceae

酶	功 能	植物来源	GenBank 编号	参考文献
PMT	催化腐胺生成 <i>N</i> -甲基-腐胺	莨菪	AB018572.1	7
		颠茄 (PMT1)	AB018570.1	
		颠茄 (PMT2)	AB018571.1	
		毛曼陀罗 (PMT1)	AM177609.1	8
		毛曼陀罗 (PMT2)	AM177610.1	
		山莨菪	AY690623.1	9
		三分三 (PMT1)	EU670745.1	10
		三分三 (PMT2)	EU670746.1	
		曼陀罗 (TRI)	L20473.1	11
		曼陀罗 (TRII)	L20474.1	
TRs	催化托品酮还原为托品/假托品	莨菪 (TRII)	L20485.1	12
		马铃薯 (TRI)	AJ30584.1	13
		马铃薯 (TRII)	AJ245634.1	
		三分三 (TRI)	EU424321.1	14
		三分三 (TRII)	EU424322.1	
		莨菪	DQ387048.1	15
		莨菪	M62719.1	4
		颠茄	AB017153.1	16
		三分三	EF187826.1	17
CYP80F1	催化海螺碱生成 hyoscyamine aldehyde	莨菪	DQ387048.1	15
H6H	催化莨菪碱生成东莨菪碱	莨菪	M62719.1	4
		颠茄	AB017153.1	16
		三分三	EF187826.1	17

途径中的第一个限速酶。*PMT* 基因已经从烟草、莨菪、毛曼陀罗、颠茄和三分三等植物中克隆。在茄科植物中, *PMT* 由一个具有两个基因成员 (*PMT1* 和 *PMT2*) 的基因家族编码, 这两个基因在编码区序列和基因表达时空特异性上具有一定差异。三分三 *Anisodus acutangulus* C. Y. Wu et C. Chen 中具有两条 *PMT* 基因, 即 *AaPMT1* 和 *AaPMT2*。*AaPMT1* 编码区为 1 017 bp, 编码 338 个氨基酸; *AaPMT2* 编码区为 1 041 bp, 编码 347 个氨基酸; *AaPMT1* 和 *AaPMT2* 在三分三根、叶和茎中都有表达, 但 *AaPMT1* 在各组织中表达量高于 *AaPMT2*; 同时茉莉酸甲酯 (MeJA) 能够显著提高 *AaPMT1* 的表达^[10]。颠茄 *Atropa belladonna* L. 也具有两条 *PMT* 基因, 即 *AbPMT1* 和 *AbPMT2*。*AbPMT1* 编码区为 1 011 bp, 编码 336 个氨基酸; *AaPMT2* 编码区为 1 023

bp, 编码 340 个氨基酸; *AbPMT1* 在颠茄根的表达量远高于 *AbPMT2*。颠茄 *PMT* 基因对 MeJA 诱导没有响应^[7]。

2.2 托品酮还原酶 (TRs)

TRs 是依赖还原型辅酶 II (NADPH) 的立体专一性还原酶, 包括 TRI 和 TRII 两种类型, 构成了托品烷类生物碱生物合成的一个分支点^[18]。TRI 和 TRII 都以托品酮为底物, 但却具有不同的催化作用和酶动力学特性。TRI 催化生成产物是托品, 而 TRII 催化生成的产物是假托品。曼陀罗 *TRI* 和 *TRII* 基因分别编码 273 和 260 个氨基酸的酶, 两者序列有 64% 氨基酸相同。在 pH 值为 7.0 时, TRI 酶活性是 TRII 的 11 倍; TRI 在高 K_m 值及酸性环境条件下, 能达到其最高的酶活^[11]。莨菪 *Hyoscyamus niger* L. TRI 和 TRII 在氨基酸序列上具有 64% 的一致性, 而

且编码这两个酶的基因组序列具有相同的组织结构,即内含子和外显子在基因组中的组织形式完全相同;基因表达分析表明莨菪 *TRI* 和 *TRII* 具有相似的表达时空特异性,且表达量大小比较接近^[19]。三分三 *TRI* 和 *TRII* 在各个组织中均有表达,但是 *TRI* 表达水平远低于 *TRII*,且 MeJA 诱导后这两个基因表达都得到提高^[14]。*TRI* 和 *TRII* 基因在不同植物中表达特性的差异,说明这两个基因在不同植物的 TAs 生物合成途径中的代谢调控作用可能具有种属特异性。

2.3 CYP80F1

海螺碱存在于产托品烷生物碱的植物中^[20],它是莨菪碱和东莨菪碱生物合成途径中的一个重要产物和重要前体^[21]。莨菪 *CYP80F1* 基因属于 P450 细胞色素氧化酶基因家族,编码 510 个氨基酸的酶,在酵母中重组 CYP80F1 结合前体饲喂的研究表明,CYP80F1 能够催化海螺碱生成 hyoscyamine aldehyde (莨菪碱的直接前体);*CYP80F1* 基因只在莨菪根及发根中表达,这与根是莨菪碱主要生物合成部位一致。在莨菪发根中超表达 *CYP80F1* 不能提高莨菪碱合成;而采用 RNAi 降低 *CYP80F1* 表达,结果导致莨菪碱合成减少,转基因研究表明 CYP80F1 不是 TAs 合成途径中的限速酶^[15]。

2.4 H6H

H6H 是一种双功能酶,具有羟基化和环氧化的作用,是托品烷类生物碱生物合成途径中一个重要的限速酶。它可将莨菪碱的 C-6 β 羟基化形成山莨菪碱,而后再将山莨菪碱的 C-6、C-7 环氧化形成东莨菪碱^[6](图 1)。*H6H* 基因已从莨菪、颠茄、三分三、曼陀罗等茄科药用植物中被克隆出来。莨菪 *H6H* 基因的编码区能够编码 344 个氨基酸,通过 cDNA 可推断有 12 个肽段。莨菪 *H6H* 主要在根中表达,但在叶、茎以及培养的细胞中均没有表达^[4]。三分三 *H6H* 基因在氨基酸水平上,与莨菪、颠茄和曼陀罗 *H6H* 的一致性分别为 95%、95%和 93%。与莨菪以及颠茄等其他茄科植物 *H6H* 基因只在根部表达的特征不同的是三分三 *H6H* 在根、茎、叶中均有表达,说明 *H6H* 在不同物种中的表达方式有所不同^[18]。*H6H* 是东莨菪碱生物合成途径中公认的关键酶,也是利用基因工程技术提高东莨菪碱生物合成的最重要功能基因。

3 TAs 生物合成途径的代谢工程

TAs 生物合成途径中重要功能基因的克隆和功

能鉴定为利用这些基因遗传改造 TAs 生物合成途径,开展 TAs 生物合成途径代谢工程研究奠定了良好基础。在利用 *PMT*、*TRs* 和 *H6H* 基因遗传改造不同产 TAs 药用植物中取得了丰富研究成果。

TAs 生物合成途径存在于莨菪、颠茄、曼陀罗、三分三等茄科不同属植物中,该途径相关基因序列及其编码蛋白质序列相似性普遍很高,表明该途径在进化上具有共同起源。一般认为,不同植物中相同生物合成途径涉及的限速步骤和关键酶比较一致。但是在 TAs 生物合成途径中却发现转 *PMT* 基因在具有相同生物合成途径的不同植物中具有不同表现。在曼陀罗过量表达 *PMT* 基因使莨菪碱量提高 2 倍多,东莨菪碱量提高 3 倍多;在埃及莨菪 *Hyoscyamus muticus* L. 中过量表达 *PMT* 基因使莨菪碱量提高近 5 倍^[22];而在颠茄中过量表达 *PMT* 基因,莨菪碱量没有显著性变化^[23]。这些研究表明,*PMT* 在曼陀罗和埃及莨菪的 TAs 生物合成途径中是限速酶,而在颠茄的 TAs 生物合成途径中不是限速酶。因此,对于开展 TAs 生物合成途径代谢工程而言,在针对不同植物是否选用 *PMT* 作为目的基因进行遗传转化要根据具体情况分析,不能一概而论。

TRs 是 TAs 生物合成途径的分支点,不同 *TRs* 基因的表达会引导代谢流向不同的途径。在颠茄发根中超表达 *TRI*,导致莨菪碱量提高 3 倍多,东莨菪碱量提高 5 倍多;而由 *TRII* 主导的打碗花精量降低 30%~90%,这是由于 *TRI* 大量表达,对 *TRII* 形成强有力的竞争,使得托品酮向莨菪碱和东莨菪碱生物合成方向流动更多所致^[24]。在三分三发根中超表达 *TRI*,使得莨菪碱量提高 1.87 倍,东莨菪碱量提高 8 倍^[14]。这些转基因研究表明 *TRI* 是实现 TAs 生物合成能力大幅度提高的一个重要功能基因。

H6H 被公认为是东莨菪碱生物合成的限速酶,*H6H* 的表达与东莨菪碱产量呈正比关系。在产 TAs 药用植物中超表达 *H6H* 基因,能够大幅度提高东莨菪碱的量。在颠茄中转入 *H6H* 基因,其转基因植株中东莨菪碱量提高十分显著,转基因颠茄叶与茎中的生物碱几乎全是东莨菪碱,而在其根中能够检测到莨菪碱^[6]。在颠茄发根中超表达 *H6H* 基因,使得东莨菪碱的量比对照提高了 5 倍^[25]。在埃及莨菪中超表达 *H6H* 基因,转基因发根最高克隆产生了 17 mg/L 的东莨菪碱^[26]。

上述 TAs 生物合成途径遗传改造均是采用超表达单基因的策略,取得了较好成效。由于天然产物

合成途径代谢调控的复杂性,位于同一途径中的不同基因在推动代谢流流向共同的目标产物中可能具有协同作用。2004年,唐克轩教授课题组首次在国际上采用双基因超表达策略改造TAs生物合成途径,研究发现超表达 *PMT* 和 *H6H* 的转基因莨菪发根中东莨菪碱量比野生型和含有单基因 (*PMT* 或 *H6H*) 的转基因莨菪发根显著提高:共转 *PMT* 和 *H6H* 莨菪发根中东莨菪碱量最高是单转 *H6H* 发根中的2倍,而其量高达411 mg/L,直到现在仍然是东莨菪碱生物合成途径遗传改造后东莨菪碱产量的最高记录,可能的原因是 *PMT* 和 *H6H* 在TAs生物合成途径中存在共同推动代谢流向终产物东莨菪碱合成方向流动的协同作用^[27]。随后,在东莨菪碱商业药源植物颠茄中超表达 *PMT* 和 *H6H*,也进一步验证了这种策略的可行性,并在此基础上培育出了东莨菪碱高产的转基因颠茄^[28-29]。

4 问题与展望

虽然TAs生物合成途径的分子生物和代谢工程研究在过去的30年取得了丰富成果和巨大进展,但由于植物次生代谢产物生物合成途径的复杂性,仍然有诸多科学问题有待深入研究。在TAs生物合成分子生物学研究方面,目前已经克隆鉴定了 *PMT*、*TRI*、*TRII* 和 *H6H* 等TAs合成途径中的重要功能基因,但该途径中还有多步酶促反应步骤不清楚,相关的酶及其编码的基因也未获得,如催化托品酮和莨菪碱合成的酶与基因。在这些未知的步骤中,是否存在限速步骤和限速酶更有待研究。

TAs生物合成部位是根,但是在植物全株均有分布,表明TAs存在转运机制,而关于TAs转运的分子机制研究目前才刚刚开始,正在成为该领域的研究热点。大量前期研究表明,TAs生物合成受到MeJA和ABA等植物激素的诱导而表现出超量积累的现象,该途径中相关基因如 *PMT*、*TRs* 和 *H6H* 等在MeJA和ABA等诱导下表现为表达量显著上升,说明这些功能基因受到MeJA响应的相关转录因子的正调控,但是关于转录因子调控TAs生物合成途径的研究仍是一片空白;而对于转录因子调控植物次生代谢产物生物合成的研究一直是该领域的前沿热点。

在TAs生物合成途径代谢工程研究方面,目前已经对 *PMT*、*TRs* 和 *H6H* 进行了转基因研究并实现了莨菪碱/东莨菪碱量的大幅度提高,但是这些研究大多是在莨菪和曼陀罗中进行,由于相同基因在

具有相同途径的不同植物中表现可能不同(最为典型的的就是 *PMT*),使得直接将这些研究成果用于商业药源植物如颠茄就具有一定风险。因此,针对不同产TAs的药用植物,在开展代谢工程研究时要充分考虑这一因素。关于TAs生物合成途径代谢工程研究,绝大多数是采用这些药用植物的发根作为表达系统(到目前为止,仅有两例培育产TAs转基因植株的报道),由于生产上使用的是植株,而在发根这一器官中获得的理论成果应用有限。虽然发根TAs生物合成途径代谢工程研究理论成果对于培育TAs高产转基因植株具有一定指导意义,但是这些成果直接移植到转基因植株中不一定有相同表现。针对这一情况,还应培育转基因植株,进一步研究转基因对TAs在植株中合成的作用。

参考文献

- [1] 肖培根. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] Yaiviada Y, Tabata M. Plant biotechnology of tropane alkaloids [J]. *Plant Biotechnol*, 1997, 14: 1-10.
- [3] Patterson S, O'Hagan D. Biosynthetic studies on the tropane alkaloid hyoscyamine in *Datura stramonium*; hyoscyamine is stable to *in vivo* oxidation and is not derived from littorine via a vicinal interchange process [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(3): 323-329.
- [4] Matsuda J, Okabe S, Hashimoto T, *et al.* Molecular cloning of hyoscyamine 6 β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger* [J]. *J Biol Chem*, 1991(266): 9460-9464.
- [5] Nasomjai P, Reed D W, Tozer D J, *et al.* Mechanistic insights into the cytochrome P450-mediated oxidation and rearrangement of littorine in tropane alkaloid biosynthesis [J]. *Chem Biol Chem*, 2009, 10(14): 2382-2393.
- [6] Yun D Y, Hashimoto T, Yamada Y. Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition [J]. *PNAS*, 1992(89): 11799-11803.
- [7] Suzuki K, Yamada Y, Hashimoto T. Expression of *Atropa belladonna* putrescine N-methyltransferase gene in root pericycle [J]. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40: 289-297.
- [8] Teuber M, Azemi M, Namjooyan F, *et al.* Putrescine N-methyltransferases-a structure-function analysis [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 63(6): 787-801.
- [9] Liu T, Zhu P, Cheng K, *et al.* Molecular cloning and expression of putrescine N-methyltransferase from the hairy roots of *Anisodus tanguticus* [J]. *Planta Med*, 2005,

- 71(10): 987-989.
- [10] Kai G, Zhang Y, Chen J, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of two distinct putrescine *N*-methyltransferases from roots of *Anisodus acutangulus* [J]. *Physiol Plant*, 2009, 135(2): 121-129.
- [11] Nakajima K, Hashimoto T, Yamada Y. Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor [J]. *PNAS*, 1993, 90(20): 9591-9595.
- [12] Nakajima K, Hashimoto T, Yamada Y. cDNA encoding tropinone reductase-II from *Hyoscyamus niger* [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103(4): 1465-1466.
- [13] Kaiser H, Richter U, Keiner R, *et al.* Immunolocalisation of two tropinone reductases in potato (*Solanum tuberosum* L.) root, stolon, and tuber sprouts [J]. *Planta*, 2006, 225: 127-137.
- [14] Kai G, Li L, Jiang Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of two tropinone reductases in *Anisodus acutangulus* and enhancement of tropane alkaloid production in AaTRI-transformed hairy roots [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 54(3): 177-186.
- [15] Li R, Reed D W, Liu E, *et al.* Functional genomic analysis of alkaloid biosynthesis in *Hyoscyamus niger* reveals a cytochrome P450 involved in littorine rearrangement [J]. *Chem Biol*, 2006, 13: 513-520.
- [16] Suzuki K, Yun D Y, Chen X Y, *et al.* An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6 β -hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 40(1): 141-152.
- [17] Kai G, Chen J F, Li L, *et al.* Molecular cloning and characterization of a new cDNA encoding hyoscyamine 6 β -hydroxylase from roots of *Anisodus acutangulus* [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2007(40): 715-722.
- [18] Hashimoto T, Nakajima K, Ongena G, *et al.* Two tropinone reductases with distinct stereo specificities from cultured roots of *Hyoscyamus niger* [J]. *Plant Physiol*, 1992, 100: 836-845.
- [19] Nakajima K, Oshita Y, Kaya M, *et al.* Structures and expression patterns of two tropinone reductase genes from *Hyoscyamus niger* [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 1999, 63(10): 1756-1764.
- [20] Evans W C, Ghani A, Woolley V A. Distribution of littorine and other alkaloids in the roots of *Datura* species [J]. *Phytochemistry*, 1972, 11(8): 2527-2529.
- [21] Robins R J, Bachmann P, Woolley J G. Biosynthesis of hyoscyamine involves an intramolecular rearrangement of littorine [J]. *J Chem Soc Perkin Trans I Org Chem*, 1994, 1: 615-619.
- [22] Moyano E, Jouhikainen K, Tammela P. Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus* [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(381): 203-211.
- [23] Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, *et al.* Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis [J]. *PNAS*, 2001, 98(1): 367-372.
- [24] Richter U, Rothe G, Fabian A K, *et al.* Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures [J]. *J Exp Bot*, 2005, 412: 645-652.
- [25] Hashimoto T, Yun D, Yamada Y. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(3): 713-718.
- [26] Jouhikainen K, Lindgren L, Jokelainen T, *et al.* Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering [J]. *Planta*, 1999(208): 545-551.
- [27] Zhang L, Ding R, Chai Y, *et al.* Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures [J]. *PNAS*, 2004, 101(17): 6786-6791.
- [28] Liu X Q, Yang C X, Chen M, *et al.* Promoting scopolamine accumulation in transgenic plants of *Atropa belladonna* generated from hairy roots with over expression of pmt and h6h gene [J]. *J Med Plants Res*, 2010, 4(17): 1708-1713.
- [29] Yang C X, Chen M, Zeng L J, *et al.* Improvement of tropane alkaloids production in hairy root cultures of *Atropa belladonna* by overexpressing pmt and H6H genes [J]. *Plant Omics J*, 2011, 4(1): 29-33.