

2个丹参鲨烯合酶基因的克隆和鉴定

马艺沔¹, 袁丽钗^{1#}, 张林甦^{1,2}, 侯学敏^{1,3}, 卢善发^{1*}

1. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

2. 黔南民族医学高等专科学校, 贵州 都匀 558003

3. 山西师范大学, 山西 临汾 041004

摘要: 目的 克隆与鉴定丹参 *Salvia miltiorrhiza* 鲨烯合酶基因。方法 基于丹参基因组的基因预测结果设计引物, 通过 RT-PCR 方法, 克隆丹参鲨烯合酶基因。利用生物信息软件对基因序列进行了结构分析, 对基因编码多肽进行了序列同源性比较和保守结构域分析, 利用实时定量 RT-PCR 方法对基因进行表达模式研究。结果 通过 RT-PCR 方法扩增得到 2 个丹参鲨烯合酶基因 (*SmsQS1* 和 *SmsQS2*), 它们编码的多肽具有鲨烯合酶相关结构域和保守基序。这 2 个基因具有不同的外显子/内含子结构特征, 具有不同的组织特异性表达模式和时间表达模式。结论 丹参基因组中存在 2 个鲨烯合酶基因, 它们具有不同的基因结构特征和表达模式, 可能在丹参甾体类和三萜类化合物生物合成中起不同作用。

关键词: 丹参; 三萜类; 鲨烯合酶; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)09-1307-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.09.021

Cloning and identification of two squalene synthase genes from *Salvia miltiorrhiza*

MA Yi-mian¹, YUAN Li-chai¹, ZHANG Lin-su^{1,2}, HOU Xue-min^{1,3}, LU Shan-fa¹

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558003, China

3. Shanxi Normal University, Linfen 041004, China

Abstract: Objective To clone and identify the squalene synthase genes in *Salvia miltiorrhiza*. **Methods** The primers were designed based on the predication result of *S. miltiorrhiza* genome genes and two squalene synthase genes (*SmsQS1* and *SmsQS2*) from *S. miltiorrhiza* were amplified via RT-PCR method. Some bioinformatic methods and softwares were used for the gene structure analysis, the analyses of sequence homology and protein conserved domains of the two gene encoding polypeptides were carried. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) method was used for the analysis of gene expression patterns. **Results** The two squalene synthase genes of *S. miltiorrhiza* were obtained by RT-PCR method. The encoded polypeptide of the two genes has the related domains and a conserved motif for squalene synthases. The two genes had the different exon/intron characteristics and the different tissue-specific and time-specific expression patterns. **Conclusion** There are two squalene synthase genes existing in the genome of *S. miltiorrhiza*, which have the different gene structures and expression patterns, and probably play the different roles in the biosynthesis process of steroids and triterpenoids in *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; triterpenoids; squalene synthase; gene cloning; gene expression

鲨烯合酶 [squalene synthase (EC 2.5.1.21)] 能够催化 2 分子法呢基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP) 首尾聚合生成三萜和甾体类化合物的前体物质鲨烯, 是植物三萜和甾体类化合物生物合成过程中的关键酶之一。由于植物三萜类化合物多具有重

要药用价值, 人们对药用植物的鲨烯合酶基因较为关注, 包括人参、甘草、积雪草、金铁锁、蛇足石杉在内的多种药用植物的鲨烯合酶基因已经得到了克隆^[1-5]。迄今为止, 还未见丹参鲨烯合酶基因研究报道。为了研究丹参三萜和甾体类化合物生物合成途

收稿日期: 2014-01-24

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81102727); 国家自然科学基金面上基金 (31070534)

作者简介: 马艺沔 (1977—), 女, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为分子生药学。Tel: (010)57833366 E-mail: mayimian@163.com

*通信作者: 卢善发, 男, 博士, 研究员。Tel: (010)57833366 E-mail: sflu@implad.ac.cn

#并列第一作者, 袁丽钗, 女, 博士, 助理研究员。Tel: (010)57833366 E-mail: lcyuan2008@163.com

径, 本课题组克隆了 2 个丹参鲨烯合酶基因 (*SmSQS1* 和 *SmSQS2*), 鉴定了这 2 个基因及其编码多肽的序列特征, 还分析了这 2 个基因的表达模式。研究表明, 这 2 个丹参鲨烯合酶基因具有不同的基因结构特征和表达模式, 可能在丹参甾体和三萜类化合物生物合成过程中具有不同作用。

1 材料

1.1 植物材料

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 品系 993 的田间材料由药用植物研究所李先恩研究员鉴定并惠赠。于 2012 年 6 月 8 日进行取材, 分别将丹参的根、茎、叶和花用锡箔纸包好后液氮冻存, 作为分析丹参鲨烯合酶基因组织特异性表达的材料。丹参鲨烯合酶基因时间特异性表达的 18 株丹参小苗由丹参田间材料通过组培扩增得来。首次取材于 2012 年 6 月 11 日 16:00, 取 3 株丹参小苗叶片液氮冻存。然后每隔 4 h 再同样取 1 次样本, 直到取得 6 个样本。

1.2 试剂

所用试剂包括 LA Taq 酶 (TAKARA 公司), pMD18T 载体 (TAKARA 公司), SYBR premix Ex Taq™ 实时定量试剂盒, Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech 公司)。通用植物 RNA 提取试剂盒 (百泰克公司)、Power M-MLV 反转录酶 (百泰克公司)。引物合成与 DNA 测序由三博远志公司完成。

2 方法

2.1 基因克隆

将拟南芥鲨烯合酶基因 *At4g34640* 和 *At4g34650* 应用 Blastn 程序在本地服务器上与丹参基因组序列进行比对, 将所得到的同源性序列提交 Genscan 网站 (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) 进行编码基因预测。根据预测的鲨烯合酶基因序列设计引物, 引物为 SmSQS1-F、SmSQS1-R、SmSQS2-F 和 SmSQS2-R (表 1), 应用 Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 合成丹参 cDNA, 通过 RT-PCR 方法对丹参鲨烯合酶基因进行了扩增, 连入 pMD-18T 载体进行测序。

2.2 基因序列的生物信息学分析

将测序得到的基因编码区序列与基因组序列一并提交 GSDS 网站 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>), 进行基因结构分析。将克隆的 2 个丹参鲨烯合酶基因序列提交到 Genebank 网站应用 BLASTx 程序进行序列比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

表 1 基因克隆及 RT-qPCR 所用引物

Table 1 Primers used for gene clone and RT-qPCR

引物名称	引物序列 (5'→3')
SmSQS1-F	CCATGGGGAGTTTACGTGCGATTTTGA
SmSQS1-R	GGTTAGACGGCTCTCTTTGGTGCAAAGT
SmSQS2-F	CCGGAAGATTTGTATCCGATGGT
SmSQS2-R	GCATTGTATTGTGGCTTCCTCTGGAT
SmUBQ-F	AGATGGGCGGACACTTGCTGATTA
SmUBQ-R	ACTCTCCACCTCCAAAGTGATGGT
RT-SQS1-L	CAAAGATCCTAATGCGGGAACGACA
RT-SQS1-R	AGACGGCTCTCTTTGGTGCAAAGT
RT-SQS2-L	GATGATGCCGATCCTAATGCCAGAAAGA
RT-SQS2-R	CTGGTTGGTTCGAGCTGCTGACAGGA

Blast.cgi), 选取有代表性的植物鲨烯合酶基因, 下载编码蛋白, 用 VectorNTI 11.0 程序包中的 AlignX 进行多序列比对, 并应用 GeneDoc 程序进行编辑^[6]。应用生物软件 MEGA5.0 构建 Neighbor-joining 系统发育树。通过 TMHMM 网站预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 2 个丹参鲨烯合酶基因编码蛋白的跨膜区^[7]。利用 ExPASy 蛋白分析系统 (http://web.expasy.org/compute_pi/) 预测 2 个丹参鲨烯合酶基因编码多肽的理论等电点/相对分子质量 (pI/Mw)。

2.3 实时定量 PCR 分析丹参基因表达模式

实时定量 PCR 根据 SYBR premix Ex Taq™ 试剂盒的使用说明进行操作, 具体步骤可参考 Ma 等^[8]报道。以 *SmUBQ10* 作为内对照, *SmUBQ10* 引物的序列为 SmUBQ-F 和 SmUBQ-R, 2 个丹参鲨烯合酶基因 *SmSQS1* 和 *SmSQS2* 的实时定量 RT-PCR 的引物为 RT-SQS1-L、RT-SQS1-R、RT-SQS2-L 和 RT-SQS2-R (表 1)。

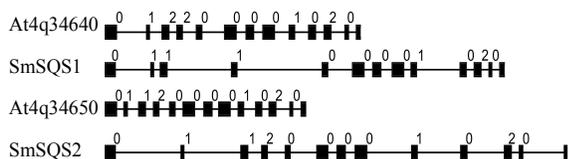
3 结果与分析

3.1 丹参鲨烯合酶的基因克隆与序列提交

通过将拟南芥鲨烯合酶基因同丹参基因组进行序列同源性比对, 本课题组获得了一些与拟南芥鲨烯合酶基因 (*At4g34640* 和 *At4g34650*) 具有较高同源性的丹参基因组片段。基于这些基因组片段, 预测其中 2 个基因组片段能够编码丹参鲨烯合酶基因全长。根据预测的丹参鲨烯合酶基因全长编码区序列, 本课题组设计引物通过 RT-PCR 方法扩增得到了 2 个丹参鲨烯合酶基因的全长编码区, 并将这 2 个鲨烯合酶基因命名为 *SmSQS1* 和 *SmSQS2*。经过

测序, *SmSQS1* 基因编码区全长 1242 bp。 *SmSQS2* 基因编码区全长 1245 bp。将 *SmSQS1* 的编码区序列提交到 Genbank 核酸数据库进行比对, 结果表明 *SmSQS1* 高度相似于 1 个从商洛丹参中获得的鲨烯合酶基因 (Genbank 登录号为 FJ768961.1), 而 *SmSQS2* 是 1 个新基因, 它的编码区与 FJ768961.1 仅有 83% 的序列相似性。

将这 2 个基因的编码区都提交到 GSDS 网站上进行外显子/内含子结构预测, 发现这 2 个基因的编码区都包含 13 个外显子和 12 个内含子, 2 个基因的内含子相位 (即内含子在基因内相对于遗传密码的 3 个核苷酸的位置) 有相似之处。这 2 个基因的外显子/内含子组织形式与拟南芥相似, 但是丹参鲨烯合酶基因的内含子要比拟南芥鲨烯合酶基因的内含子序列长很多 (图 1)。编码这 2 个丹参鲨烯合酶基因的基因组片段已提交到了 Genbank 数据库 (*SmSQS1* 的基因组片段序列的 Genbank 登录号为 JQ763409, *SmSQS2* 的基因组片段序列的 Genbank 登录号为 JQ763410)。



黑色实心方块代表外显子, 黑线代表内含子, 外显子右上角的数字代表内含子相位
Black solid blocks represent exons, black lines represent introns.
Figures at the top right corner of exon represent intron phase

图 1 拟南芥与丹参鲨烯合酶基因外显子/内含子组织形式示意图

Fig. 1 Diagram of exon/intron structures of thaliana squalene synthase genes from *Arabidopsis thaliana* and *S. miltiorrhiza*

3.2 丹参鲨烯合酶的生物信息学分析

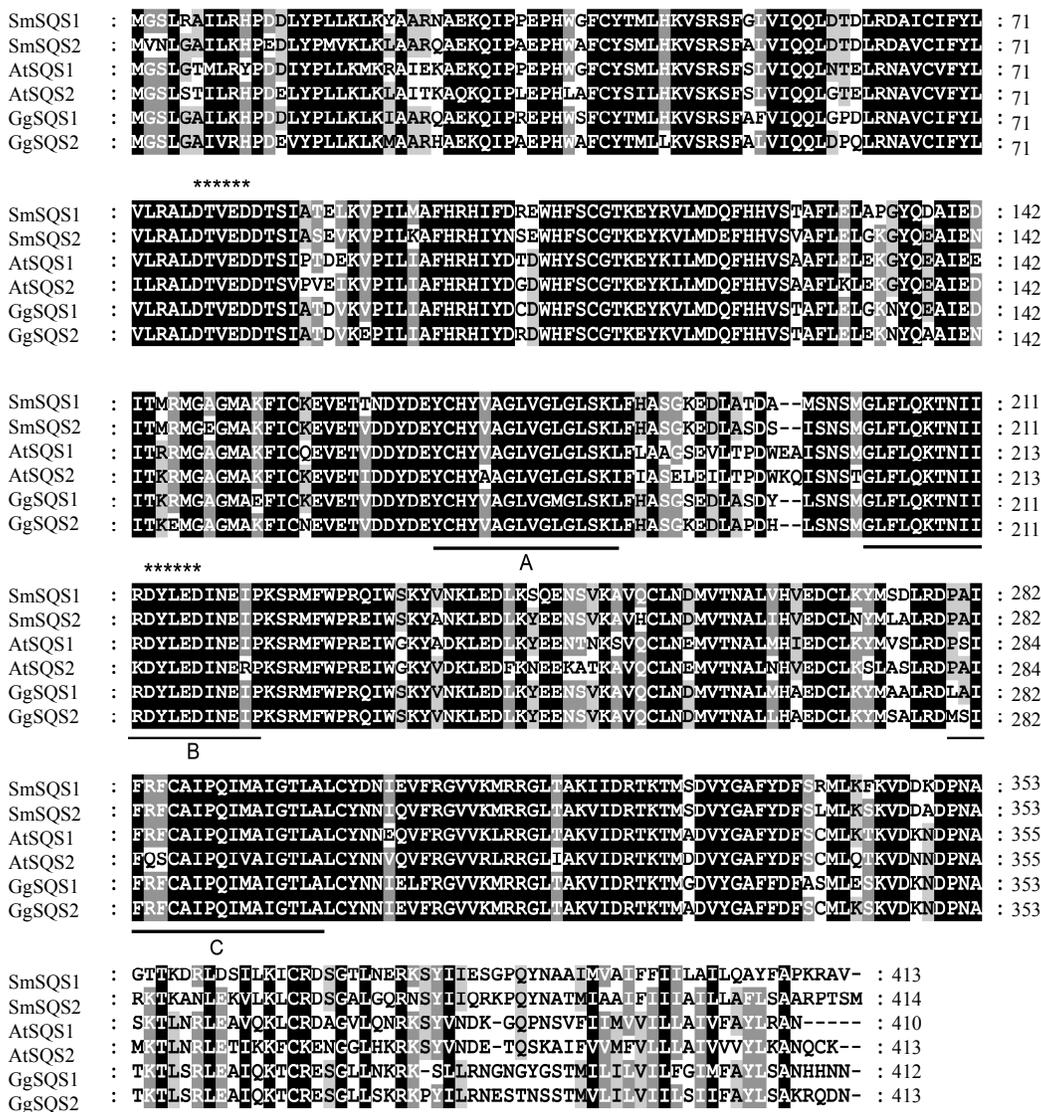
应用多种生物信息学方法分析了这 2 个丹参鲨烯合酶基因序列特征。经过 ExPASy 服务器预测, *SmSQS1* 编码一个包括 413 个氨基酸的多肽 (理论 pI/Mw: 6.60/47 351.96), *SmSQS2* 编码一个推断的包括 414 个氨基酸的多肽 (理论 pI/Mw: 7.16/47 158.93)。将 2 个基因提交到 Genebank 网站应用 BLASTp 程序进行序列比对, *SmSQS1* 和 *SmSQS2* 编码多肽与假马齿苋 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. 鲨烯合酶 (Genbank ID, ADX01171)

具有 85% 和 87% 的一致性, 都具有反式异戊烯基焦磷酸合酶的保守结构域 (Trans_IPPS_HH), 这说明这 2 个基因都可能编码鲨烯合酶。

将 *SmSQS1* (Genbank 登录号 JQ763409.1) 和 *SmSQS2* (Genbank 登录号 JQ763410.1) 编码的鲨烯合酶与拟南芥和光果甘草的鲨烯合酶 (Genbank 的登录号分别为 AtSQS1、At4g34640、AtSQS2、At4g34650、GgSQS1、D86410.1、GgSQS2、D86409.1) 进行比较, 发现它们都具有保守的结构域 A、B、C, 以及保守的天冬氨酸丰富区 (DXXXD) (图 2)。根据以往报道, 鲨烯合酶是一种结合在内质网上的膜结合酶^[9]。通过在 TMHMM 网站进行预测, 丹参 *SmSQS1* 编码鲨烯合酶包含 1 个跨膜结构域, 位于 386~408 位置。丹参 *SmSQS1* 编码鲨烯合酶具有 2 个跨膜区, 第 1 个跨膜区在 281~303 位置, 第 2 个跨膜区在 387~409 位置。应用 MEGA 软件对不同植物中的鲨烯合酶序列进行系统进化分析, 包括西洋参鲨烯合酶 PgSQS1 (AB115496)、PgSQS2 (GQ468527.2) 和 PgSQS3 (GU183406.1); 丹参鲨烯合酶 *SmSQS1* (JQ763409.1) 和 *SmSQS2* (JQ763410.1); 光果甘草鲨烯合酶 GgSQS1 (D86410.1) 和 GgSQS2 (D86409.1); 拟南芥鲨烯合酶 AtSQS1 (At4g34640) 和 AtSQS2 (At4g34650) 以及水稻鲨烯合酶 OsSQS (AB007501.1)。研究结果表明, 拟南芥、甘草、丹参和西洋参中都包含 2 或 3 个鲨烯合酶, 同一物种的鲨烯合酶聚为一支, 这说明拟南芥、甘草、丹参和西洋参鲨烯合酶的基因都可能是“平行同源”基因, 也就是在同一物种内由同一基因复制而来的基因, 所以同一物种的鲨烯合酶之间要比不同物种的鲨烯合酶相似度高 (图 3)。

3.3 丹参基因表达模式分析

将丹参的不同组织的样品提取 RNA、反转录和进行实时定量 RT-PCR 检测。结果表明 *SmSQS1* 在不同组织中的表达量高低依次为花>茎>叶>根, 在花中的最高表达量比在根中的最低表达量要高出将近 9 倍。*SmSQS2* 在不同组织中的表达量依次为茎>根>叶>花, *SmSQS2* 在茎、根、和叶中的表达量相差不多, 都远远大于在花中的表达量。2 个基因相比较, 在丹参根部, *SmSQS1* 的表达水平比 *SmSQS2* 稍低。而在丹参茎、叶和花等部位, *SmSQS1* 的表达水平都要高于 *SmSQS2*。*SmSQS1* 在花中具有最高的表达水平, 而 *SmSQS2* 在花中表达水平最低



鲨烯合酶保守的结构域 A、B 和 C 用“—”标出，介导异戊烯基磷酸结合的保守天冬氨酸丰富区 (DXXXX) 用“*”标出
 Squalene synthase conserved domain A, B, and C are underlined by “—”, and two aspartate-rich regions (DXXXX) that mediate binding of prenyl phosphates are marked out by “*”

图 2 丹参、拟南芥和光果甘草鲨烯合酶氨基酸序列同源性比对

Fig. 2 Homological alignment of amino acids in squalene synthases from *S. miltiorrhiza*, *A. thaliana*, and *G. glabra*.

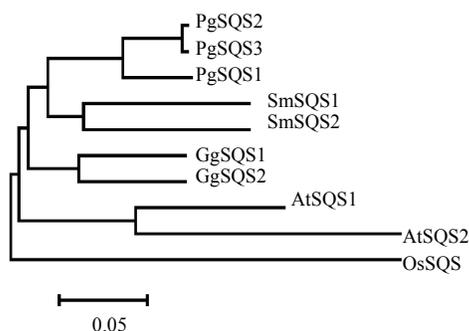
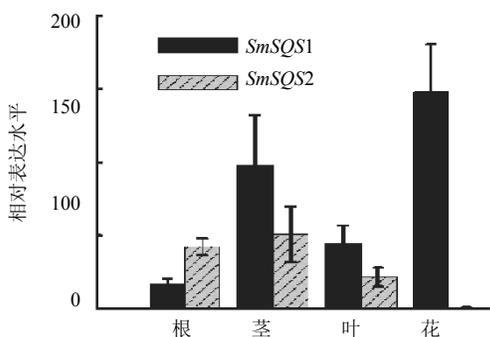


图 3 植物的鲨烯合酶系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of plant squalene synthases

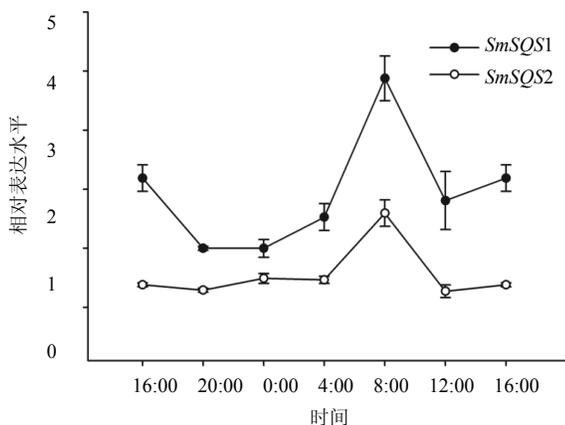
(图 4)。以上研究表明, *SmSQS1* 和 *SmSQS2* 具有不同的组织特异性表达模式, 可能在丹参甾体或三萜类物质的生物合成途径中起着不同作用。将 1 天中 6 个不同时间点的丹参小苗叶片样品提取 RNA、反转录和进行实时定量 PCR 检测。结果表明, 这 2 个丹参 SQS 基因在叶片中尽管表达水平有所不同, 但具有相似的时间表达曲线。在每个时间点, *SmSQS1* 的表达量都高于 *SmSQS2*。在取材的当天, 经观测, 日出时间大概在 4:30, 而 *SmSQS1* 和 *SmSQS2* 的表达量在 4:00 到 8:00 显著增加, 2 个基因的表达量都在大约 8:00 达到最高值。因此,

这 2 个基因可能受到早晨的光照诱导或具有相似的生物钟现象 (图 5)。



将 *SmSQS2* 在花中的表达水平设定为 1, Y 轴代表基因相对于 *SmSQS2* 在花中表达水平的倍数
Y axes represent the fold levels of gene expression relative to *SmSQS2* gene expression level in flowers that arbitrary set to 1

图 4 丹参鲨烯合酶的组织特异性表达模式 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Tissue-specific expression patterns of *S. miltiorrhiza* squalene synthase genes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



将 *SmSQS1* 在 0:00 的表达水平设为 1, Y 轴代表基因相对于 *SmSQS1* 在 0:00 表达水平的倍数
Y axes represent fold levels of gene expression relative to *SmSQS1* gene expression level in 0:00 that arbitrary set to 1

图 5 丹参鲨烯合酶基因在不同时间点小苗叶片中的表达模式 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Expression patterns of *S. miltiorrhiza* squalene synthase genes in seedling leaves at different time points in a day ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

丹参为鼠尾草属重要的药用植物,其根部含有二萜丹参酮类和酚酸类等多种活性物质。此外,研究表明,丹参地上部分包含有多种脂溶性的甾体化合物和三萜类化合物,其中的甾体化合物有 γ -谷甾醇、 β -谷甾醇等,具有多种生物活性^[10]。丹参地上部分的三萜类化合物成分也十分丰富,这些成分包括熊

果酸和齐墩果酸等,丹参地上部分富含三萜的提取物可能具有抗动脉粥样硬化的药理活性^[11-12]。丹参地上部位三萜类及甾体成分的研究和开发,对于丹参资源的综合利用具有重要意义。然而,迄今为止,丹参三萜类和甾体化合物的生物合成途径尚不清楚。

在本研究中,通过同源基因预测以及 RT-PCR 等方法,从丹参基因组中发现了 2 个可能编码鲨烯合酶的基因,根据基因序列结构比较以及系统进化分析,这 2 个基因可能是通过基因复制而来的“平行同源”基因。据报道,“平行同源”基因能够有不同的表达模式和产物特异性^[13]。在本研究中,2 个丹参鲨烯合酶基因在不同组织的表达模式也有所不同。在丹参的茎、叶和花等是包含三萜和甾体类化合物较多的部位, *SmSQS1* 的表达量比 *SmSQS2* 高。这 2 个基因还具有不同的时间表达模式,但都受光照诱导。拟南芥具有不同表达模式的 2 个鲨烯合酶基因 (*At4g34640* 和 *At4g34650*) 中,只有一个基因能够编码有活性的鲨烯合酶^[14]。西洋参、苜蓿和甘草等三萜量较为丰富的植物中,也有多个具有不同表达模式的鲨烯合酶基因^[15-17]。与拟南芥和烟草等植物不同的是,西洋参的 3 个鲨烯合酶基因都能够编码有活性的鲨烯合酶。Kim 等^[17]认为,由于西洋参比拟南芥含有更多的三萜类物质,含有 3 个有功能的鲨烯合酶基因会有利于西洋参特异的三萜皂苷的生成。由于丹参也具有一些特异的三萜类物质,本研究中克隆的 2 个丹参鲨烯合酶基因具有不同的表达模式,这 2 个基因可能在丹参甾醇和三萜类物质合成中具有不同作用。而这 2 个基因表达的酶是否都有活性,它们如何与下游酶相配合调节丹参特有的三萜类物质的生成,还有待于进一步研究。

致谢: 中国医学科学院药用植物研究所栽培中心李先恩研究员提供丹参材料,资源中心研究人员提供丹参基因组高通量测序数据。

参考文献

- [1] 罗志勇, 陆秋恒, 刘水平, 等. 人参植物皂苷生物合成相关新基因的筛选与鉴定 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35(6): 554-560.
- [2] 卢虹玉, 刘敬梅, 阳文龙, 等. 甘草鲨烯合成酶基因的分离及植物表达载体的构建 [J]. 药物生物技术, 2007, 14(4): 255-258.
- [3] Kim O T, Seong N S, Kim M Y, et al. Isolation and

- characterization of squalene synthase cDNA from *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. *J Plant Biol*, 2005, 48(3): 263-269.
- [4] 戴住波, 钱子刚, 胡运乾, 等. 金铁锁鲨烯合酶 cDNA 的克隆和功能鉴定 [J]. *药学学报*, 2008, 43(12): 1245-1250.
- [5] 殷秀梅, 白志川, 牛云云, 等. 蛇足石杉鲨烯合酶 *HsSQS1* 基因克隆和序列分析 [J]. *药学学报*, 2012, 47(8): 1079-1084.
- [6] Nicholas K B, Nicholas H B Jr, Deerfield D W II. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation [J]. *Embnew. News*, 1997, 4: 14.
- [7] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes [J]. *J Mol Biol*, 2001, 305(3): 567-580.
- [8] Ma Y M, Yuan L C, Wu B, *et al.* Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(7): 2809-2823.
- [9] Kribii R, Arro M, Del Arco A, *et al.* Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana SQS1* gene encoding squalene synthase involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 249(1): 61-69.
- [10] 杨黎彬, 刘少静, 魏彩霞, 等. 丹参地上部分脂溶性成分研究 [J]. *儿科药学杂志*, 2011, 17(4): 7-9.
- [11] Liu P, Hu P, Deng R X, *et al.* Triterpenoids from the flowers of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *HCA*, 2011, 94(1): 136-141.
- [12] Zhang Q, Chang Z, Yang J, *et al.* Antiatherogenic property of triterpenoids-enriched extract from the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(8): 1040-1045.
- [13] Lin H, Ouyang S, Egan A, *et al.* Characterization of paralogous protein families in rice [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 18.
- [14] Busquets A, Keim V, Closa M, *et al.* *Arabidopsis thaliana* contains a single gene encoding squalene synthase [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67: 25-36.
- [15] Naoumkina M A, Modolo L V, Huhman D V, *et al.* Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 850-866.
- [16] Hayashi H, Hirota A, Hiraoka N, *et al.* Molecular cloning and characterization of two cDNAs for *Glycyrrhiza glabra* squalene synthase [J]. *Biol Pharm Bull*, 1999, 22(9): 947-950.
- [17] Kim T D, Han J Y, Huh G H, *et al.* Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(1): 125-137.