

综述与专论

果蝇昼夜节律的分子机制研究进展

周先举¹⁾ 袁春燕¹⁾ 杨旭科¹⁾ 郭爱克^{1,2)*}¹⁾中国科学院上海生命科学研究院, 神经科学研究所, 上海 200031;²⁾中国科学院生物物理研究所脑与认知研究中心, 视觉信息加工重点实验室, 北京 100101)

摘要 果蝇由于遗传易操作性而成为一个研究昼夜节律分子机制的理想模式生物. 到目前为止, 通过遗传学和生物化学方法已经鉴定到 10 多个时钟基因 (clock genes) 和许多时钟相关基因, 包括时钟输入基因和钟控基因. 这些时钟基因以及它们的相应产物组成两个互相依赖的转录/翻译反馈环路, 从而调节行为和生理的昼夜节律. 果蝇这种核心钟的工作原理同样见于哺乳动物.

关键词 果蝇, 导引, 昼夜节律, 生物钟, 时钟基因, 反馈环路

学科分类号 Q42

地球自转和公转所引起自然环境的昼夜波动和季节变化, 深刻地影响地球生物的生命活动. 生物节律是生物最基本的特征之一, 昼夜节律是生物生命活动中最多见的一类生物节律, 从单细胞生物如真菌直至人类均表现昼夜节律. 早在 17 世纪, 人们在可进行光合作用的植物中首先注意到昼夜节律现象^[1], 而深入研究昼夜节律的内在定时机制却是近几十年的事, 这归功于分子生物学和遗传学的研究技术不断发展. 由于果蝇有遗传易操作性和经典的遗传杂交技术优势, 果蝇成为昼夜节律研究最前沿的模式生物. 理解昼夜节律分子基础的重大突破来自对果蝇的研究, 科学家通过研究果蝇可以深刻地理解昼夜节律行为的分子、细胞和进化的基础.

生物昼夜节律系统包括输入途径、生物钟本身和输出途径三个部分. 输出途径指生物将外界环境的时间信号, 如光照、声音和温度等传入到生物钟从而导引 (entrainment) 生物钟的过程, 最主要的授时因子是光照信号; 生物钟本身指可以产生自我维持的昼夜振荡机制; 输出途径指生物钟将产生的时间信号传出到特定的外周组织, 从而调节特定的生理和行为的过程. 实际上, 这三部分可以相互作用形成一个复杂的昼夜节律网络系统. 这些方面在果蝇中均得到较为深入的研究, 下面逐一给予综述.

1 果蝇昼夜生物钟的导引

研究证实光照导致果蝇时钟蛋白 TIMLESS (TIM) 水平降低, 从而导引生物钟时相 (图 1)^[2],

而 TIM 蛋白本身不是光敏感性的, 因此, 必须有一个中介来介导 TIM 蛋白对光反应. 对果蝇的研究为其他生物的生物钟如何被导引提供了线索. 早期实验表明, 视紫红质并不是果蝇昼夜节律的光感受器, 因为耗竭视紫红质 (维生素 A) 或者 *ninaE* 突变 (缺乏视紫红质)、*glass* 突变 (缺乏眼结构) 或 *norpA* 突变 (缺乏光信号转导蛋白磷脂酶 C) 均不影响外界光照黑暗周期导引果蝇的昼夜节律^[3]. 通过遗传筛选, 鉴定一种重要的节律光感受器突变体, 称为 *cry^{b4,5}*, 它表现正常的运动节律, 也可完全导引到 12 h:12 h 光照黑暗周期. 但它和野生型果蝇不同之处在于, 在夜间呈现短暂的 10 min 光刺激之后, 它并没有表现时相位移, 而且在持续光照条件下仍然呈现昼夜节律, 而野生型果蝇在这种条件下丧失节律. 最重要的是, 它体内核心时钟蛋白 TIM 的水平对光刺激不敏感. 经过分子遗传学分析发现, *cry* 基因编码的蛋白质隐色素 (CRYPTOCHROME, CRY) 和植物昼夜节律的光感受器隐色素具有高度序列相似性. CRY 是果蝇脑内深部的蓝光敏感性光感受器^[3], 主要表达在脑内中央昼夜起搏神经元——外侧神经元 (lateral neurons, LNs). *cry^b* 突变位点对应于一个核黄素结合位点的高度保守位置. 生化特征分析发现, TIM 蛋白对光敏感性通过

*通讯联系人.

Tel: 010-64888532, 021-54921785, E-mail: akguo@ion.ac.cn

收稿日期: 2004-11-02, 接受日期: 2004-12-02

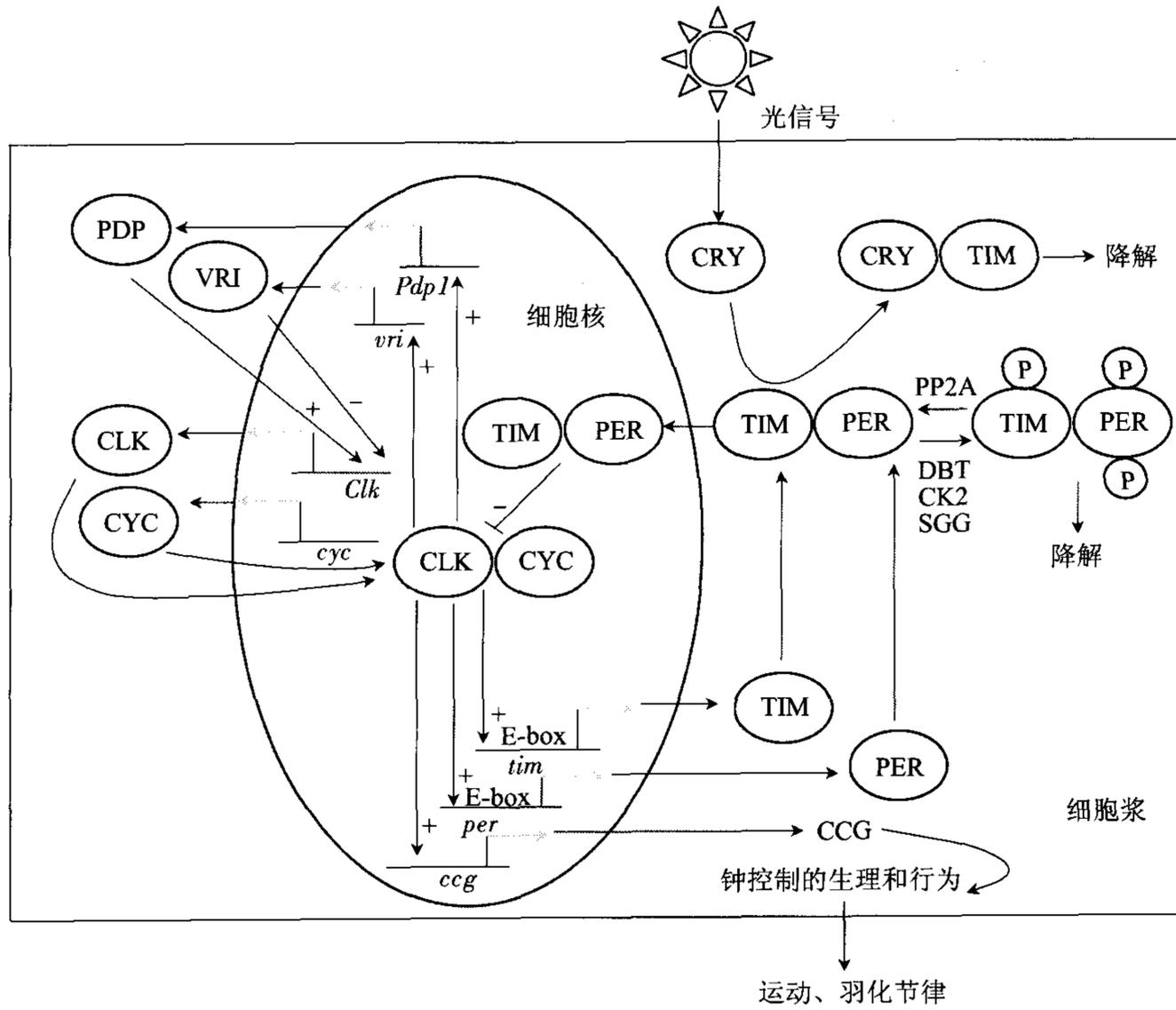


Fig.1 Two interlocked feedback loop model for *Drosophila* clocks

图 1 果蝇昼夜生物钟的两个互相依赖的反馈环路模式

在第一个环路中，CLK 和 CYC 蛋白结合形成异二聚体，在细胞核结合在 *per* 和 *tim* 基因中的 E-box 元件上，正向调节它们的转录。而 PER 和 TIM 蛋白在细胞浆堆积形成 PER/TIM 异二聚体之后，在夜间转移至细胞核，抑制 CLK/CYC 复合体的转录活性，结果抑制它们自身的转录。在第二个环路中，VRI 和 PDP 分别是 *Clk* 转录的阻遏物和激活物。CLK 同时激活 *Pdp1* 和 *vri* 的转录，而 VRI 和 PDP 反过来先后抑制和激活 *Clk* 的转录，使得 *Clk* 表达呈现昼夜振荡。

CRY 介导，光线通过 CRY 促进 TIM 蛋白的磷酸化、泛素化直至降解，而这种光介导的降解依赖于核黄素的氧化还原活性。因此，在夜间早期，当 TIM 蛋白水平升高时，呈现短暂的光刺激，通过 CRY 促进 TIM 蛋白的降解，延迟了 TIM 的堆积，进而延迟随后的分子钟时相；相反，在夜间后半部分 TIM 蛋白水平正处于下降，这时给予光刺激，加速 TIM 蛋白的降解，导致时相提前。*cry^b* 突变体并不是完全不能感知昼夜的时间信号，因为这种突变体仍具有可导引的生物钟，而且它的运动节律可导引到一个新的光照黑暗周期。*glass⁶⁰*；*cry^b* 双突变体^[9]，既缺乏 CRY 又缺乏眼结构，表现出完全不能感受外界昼夜时间信号，这些研究表明果蝇隐色素、复眼/单眼和视网膜下 H-B 小眼共同感知昼夜时间信号(图 2)。因此果蝇利用三种光感受器导引生物钟，这与哺乳动物有些不同。

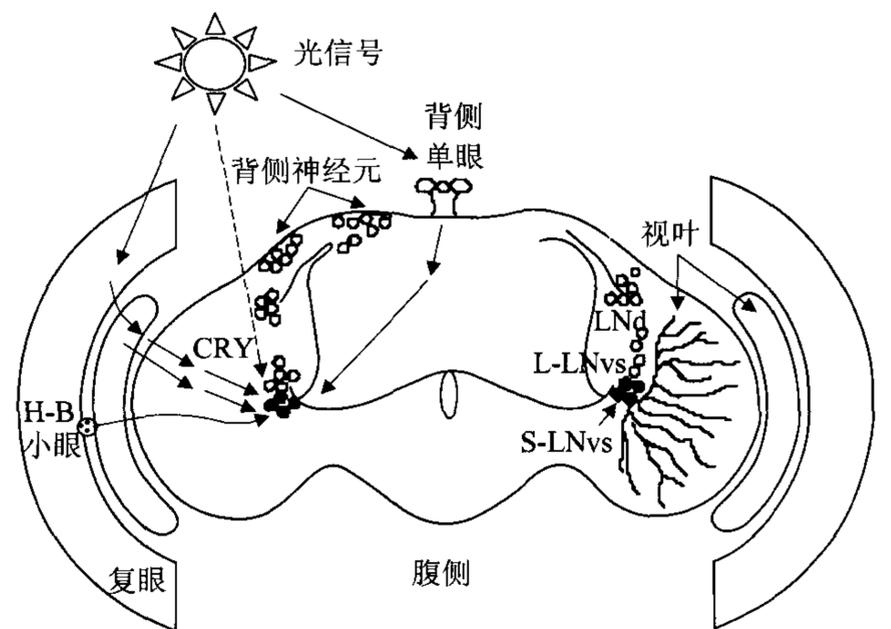


Fig.2 The light-input pathways of the clock in *Drosophila*

图 2 果蝇昼夜生物钟的光输入途径

光照信号通过 CRY、复眼/单眼和视网膜下 H-B 小眼导引中枢昼夜起搏神经元——外侧神经元，后者分为背外侧神经元 (LN_d) 和腹外侧神经元 (LN_v)，LN_v 按照细胞大小进一步分为 l-LN_{v,s} 和 s-LN_{v,s}。

温度改变也是调节生物钟的一个重要授时因子. 研究表明, 低温可增加果蝇 *per* 基因的一个内含子 *dmpi8* (*Drosophila melanogaster per* intron 8) 的剪切^[7], 从而使得整个 *per* mRNA 水平时相提前, 高温的效应相反. 实际上, 光照时间长短也影响 *dmpi8* 的剪切率, 短光照周期增加 *dmpi8* 的剪切率, 长光照周期降低 *dmpi8* 的剪切率. 这样, 在短白昼寒冷或长白昼温暖的季节, 光照和温度协同调节 *dmpi8* 的剪切率, 从而导引果蝇的夜间活动峰时相提前或延后. 如果说光照诱导 TIM 降解是果蝇生物钟感应当地时区的话, 那么温度和光照双重调节 *dmpi8* 的剪切率则可以被认为是一个季节性感应器.

2 果蝇分子钟的两个相互依赖的反馈环路

果蝇作为一种模式生物研究昼夜节律, 始于 1971 年 Konopka 和 Benzer^[8] 通过化学诱变剂筛选得到第一个果蝇时钟 *per* 突变体, 这个标志性研究开辟了昼夜节律研究分子机制的新时代.

迄今为止, 通过遗传学和生物化学的筛选方法, 在果蝇鉴定了 10 多个时钟基因, 其中包括 4 个核心时钟基因 *period(per)*、*timeless(tim)*、*clock(Clk)* 和 *cycle(cyc)*. 所有这些时钟基因及其相应的表达产物组成了两个互相依赖的转录 - 翻译反馈环路 (图 1)^[9], 从而驱动生理和行为的昼夜节律. 在第一个环路中, *per* 和 *tim* 处于核心位置, 又称 *per/tim* 环 (图 1). 这个环路控制了 *per* 和 *tim* 转录产物的昼夜振荡, *per* 和 *tim* mRNA 水平在黄昏达到峰值, 在黎明返回低谷 (图 3). PER 和 TIM 两个蛋白质均不具有 DNA 结合位点, 但是具有 PAS 结合域 (蛋白质相互作用的部位), 而且 *per* 和 *tim* 基因的启动子具有一个 E-box 调节元件 (CACGTG) 或称时钟盒 (bHLH 蛋白结合位点), 而 CLK 和 CYC 既含有 DNA 结合位点 bHLH 又含有 PAS 域. CLK 和 CYC 蛋白形成异二聚体, 在细胞核结合在 *per* 和 *tim* 基因中的 E-box 元件上, 正向调节它们的转录. PER 和 TIM 蛋白水平在整个白昼持续上升, 直到夜间早期达到峰值——延迟 *per* 和 *tim* mRNA 峰值几个小时 (图 3). PER 和 TIM 蛋白在细胞浆堆积形成 PER/TIM 异二聚体之后, 在夜间转移至细胞核, 和 CLK/CYC 复合体结合并抑制其活性, 从而抑制它们自身的转录. 随着 PER 和 TIM 黎明前被降解, 这种抑制过程被解除, CLK/CYC 复合体的转录活性增加, 于是开始 PER 和 TIM 蛋白的下一个周期.

这个环路从果蝇到哺乳动物都是保守的, 其功能主要调节昼夜节律的周期长短和时相^[10].

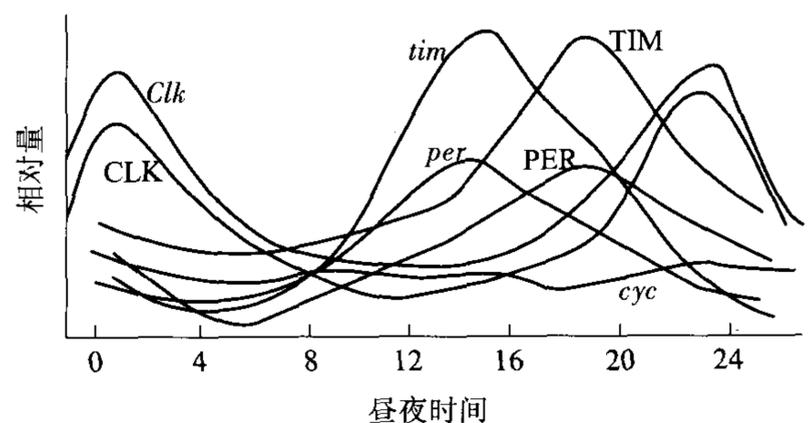


Fig.3 Circadian oscillation of the core clock genes and proteins

图 3 果蝇核心时钟基因和时钟蛋白的昼夜振荡

per 和 *tim* 表达模式基本一致, mRNA 水平在黄昏达到峰值, 在黎明返回低谷, 它们的蛋白水平的峰值时相滞后几小时. 而 *Clk* 和 *CLK* 水平相反, 在白昼早期达到峰值, 在夜间返回低谷. *cyc* mRNA 和 *CYC* 蛋白水平恒定, 不呈现昼夜振荡.

核心时钟蛋白翻译后调节对于分子钟的维持非常重要. 目前已经发现 4 种酶, 它们分别调节 PER 或 TIM 的磷酸化状态和 PER/TIM 核内转移 (图 1), 它们的突变或过表达都会影响昼夜节律周期. *dbt* 编码的蛋白 DBT 和哺乳动物酪蛋白激酶 I ϵ (CK I ϵ) 同源, 它可直接结合到 PER 蛋白或 PER/TIM 复合体上, 其作用磷酸化 PER 蛋白^[11]. *sgg* 编码的蛋白 SGG, 与糖原合成激酶 GSK-3 同源, 其作用促进 TIM 蛋白的磷酸化, 调节 PER/TIM 复合体进入细胞核的时间^[11]. *ck2* 编码的酪蛋白激酶 2 (CK2), 磷酸化 PER 且促进其转入核内^[12]. 蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 的作用与 DBT 和 CK2 相反, 通过 PER 去磷酸化而增加其稳定性, 而且促进 PER 核内定位^[13]. PER 只有和 TIM 结合才能稳定存在, 否则被 DBT 和 CK2 降解. 在白昼早期, PER 蛋白单体在细胞浆被合成时, DBT 和 CK2 与之结合促进其磷酸化, 导致 PER 蛋白的降解和 TIM 蛋白的堆积. 在夜间早期, 高浓度的 TIM 蛋白促进稳定的 DBT/PER/TIM 复合体形成并转移至细胞核, 同时, *per* 和 *tim* 的转录被逐渐抑制. 这样 DBT/PER/TIM 复合体形成并转移至细胞核减少, DBT 蛋白可以不断地磷酸化 PER 蛋白, 使得它在细胞核降解, 并延迟 PER 蛋白在细胞浆堆积或延迟.

在第二个反馈环路 *Clk* 处于核心位置, 又称

*Clk*环(图 1), 这个环路调控 *Clk* mRNA 的昼夜振荡 (*cyc* mRNA 和 *CYC* 蛋白水平恒定, 不呈现昼夜振荡), *Clk* mRNA 昼夜振荡的时相和 *per* 以及 *tim* mRNA 大致相反, 且在白昼早期达到峰值(图 3). 最近研究提示, *VRI* 和 *PDP* 分别是 *Clk* 转录的阻遏物和激活物^[9]. *vri* (*vri*)基因编码的 *VRI* 蛋白属于 *bzip* 转录因子, 具有周期性振荡, 其时相和 *PER* 以及 *TIM* 蛋白相同, *Pdp1* (*PAR domain protein*) 编码的 *PDP* 蛋白含有 *PAR* (*proline and acidic rich*). *CLK* 同时激活 *Pdp1* 和 *vri* 的转录. 由于 *VRI* 先于 *PDP* 堆积和消失, 从而 *Clk* 的抑制和激活在时间上得以分离, 两者互相协调使得 *Clk* 表达呈现昼夜振荡. 进一步研究表明, *VRI* 拮抗 *PDP* 激活 *Clk* 的启动子, 而且, *VRI* 和 *PDP* 在体外可结合在相同的 *Clk* 启动子位点. 因此, *VRI* 和 *PDP* 竞争 *Clk* 启动子位点, 从而决定了 *Clk* 的转录率. 由于 *Clk* 位于这个反馈环路核心, 通过研究 *Clk* 基因在昼夜节律中的作用, 提示第二个反馈环路主要调节昼夜节律的幅度以及调节特定的昼夜输出^[10].

3 果蝇中枢生物钟和外周生物钟

通过时钟基因表达和相应时钟蛋白的免疫细胞定位方法研究时钟基因表达模式, 可以为我们提供一个框架, 来理解控制昼夜节律行为的生物钟所在的解剖部位和功能组构. 其中 *per* 基因研究得最为详细. *per* 基因表达于复眼/单眼和 *H-B* 小眼的光感受器、许多胶质细胞以及外侧神经元和背侧神经元. 外侧神经元进一步划分为 *LN_s* 和 *l-LN_s* 以及 *s-LN_s* (图 2)^[14]. 采用遗传嵌入和转基因方法, 确定 *LN_s* 是控制羽化 (果蝇从蛹变为成虫的过程) 和运动节律的中枢生物钟. 近几年发现, 时钟基因及其相应表达产物的昼夜振荡也见于许多外围组织, 如内脏, 内分泌系统和睾丸. 将这些外围组织移植到体外能形成自我维持昼夜振荡. 这些外围组织内的昼夜振荡器具有光反应性, 即为外界环境信号所导引, 而且还鉴定其中的一些输出功能, 因此, 这些外周振荡器被确定为外周生物钟^[14]. 相对于脑内中枢生物钟, 一些外周生物钟的钟基因昼夜振荡时相提前几个小时, 培养的果蝇睾丸内, *per* 和 *tim* 报告基因荧光素酶 (*luciferase*) 的活动时相早于分离的中枢生物钟几个小时, 这与在夜间睾丸 *PER* 和 *TIM* 蛋白水平时相早于中枢生物钟时相的结果一致. 将光照黑暗周期颠倒, 发现整体和去头果蝇的马氏管 (*Malpighian tubules*) *per* 基因振荡均表现非

常相似的时相位移, 这说明中枢生物钟并没有介导外周生物钟的导引^[14]. 最近, 通过基因操作, 部位特异地恢复时钟突变体的触角内外周生物钟功能时, 果蝇对嗅觉刺激的电生理反应的昼夜节律得以再现, 这表明嗅觉节律由触角内外周生物钟负责, 而不受中枢生物钟支配^[15]. 此外, 将供体果蝇的马氏管移植到受体果蝇, 而受体果蝇接受相反的光照周期的导引, 在这种情况下, 受体和供体的马氏管 *TIM* 蛋白振荡时相并不一致, 这样排除中枢生物钟通过激素影响外周生物钟, 这些研究有力地支持果蝇外周生物钟可以作为一个完全独立的系统自主运行^[14]. 出现这种情况可能因为果蝇外周生物钟和环境的联系尤为紧密, 这一点不同于哺乳动物, 外周生物钟更多地接受中枢生物钟的支配^[16]. 然而, 并不是所有的果蝇外周生物钟能完全独立运行驱动相应的昼夜节律. 前胸腺 (*prothoracic gland*, *PG*) 是果蝇羽化节律的外周生物钟, 它需要接受中枢生物钟 *LN_s* 传递的色素驱动因子 (*pigment dispersing factor*, *PDF*) 的作用, 协同调节羽化节律^[17], 这类似于哺乳动物.

4 果蝇昼夜生物钟的输出

尽管人们对生物钟分子机制的理解越来越清楚, 但是对时间信号如何从生物钟传出来调节生理和行为知之不多. 将生物钟和生理行为联系起来, 一般先鉴定周期波动的成分, 然后运用分子遗传学和组织化学方法建立两者之间的联系. 运用这种指导思想鉴定两个时钟调控基因 *lark*^[18] 和 *pdf*^[19], 它们分别是调控果蝇羽化和运动节律的主要中介. 通过野生型和钟基因突变体果蝇的基因表达差异显示筛选, 鉴定到 *takeout*^[20] 基因, 它编码一个亲脂性的配体结合蛋白. 在饥饿状态这个基因可被快速诱导表达于摄食器官. 因此它在建立昼夜摄食行为具有重要作用. 以上这些方法具有局限性, 不能提供整个基因组昼夜表达的图景, 以后研究者应用 *DNA* 微阵列技术, 系统分析果蝇不同组织和不同基因型的基因表达的昼夜模式. 结果发现, 100 多个基因表现昼夜振荡的表达, 而且振荡时相有多样性^[21]. 这些基因可分为功能相似的几类, 分别参与解毒、嗅觉、视觉、摄食、抗氧化及免疫反应等, 而且功能相似的基因位于同一染色体且成簇排列, 这有力地支持了昼夜振荡基因表达的一个重要特征, 即生物钟通过共同的 *cis* 作用元件来转录调节它们. 所有的这些基因表达在 *Clk* 突变体丧失昼夜振荡, 后来

通过异位表达研究发现, 只有 *Clk* 异位表达才能产生异位的生物钟^[22]. 这些研究提示, *Clk* 基因位于昼夜调节网络的最高层, 直接或间接调控靶基因的昼夜振荡表达.

5 结语与展望

果蝇时间生物学的快速进展, 归功因研究者着眼于昼夜节律的分子遗传机制, 将来的研究应更多地着重于生物钟和昼夜生理以及行为的联系. 鉴定周期性振荡的转录产物只是探索这种联系的开始. 随着技术的可行, 将来需要鉴定蛋白质和小分子的昼夜振荡, 整合这些资料将会勾画出一副相当详尽的维持昼夜生理和行为的图景. 昼夜节律的产生和维持需要多层次的协调, 不断形成许多假说, 以至来不及用目前的研究方法在哺乳动物上验证它们. 在果蝇上, 易于进行遗传操作以及 RNA 干扰, 可快速得到突变体, 表型分析可以自动化定量. 这些优势可迅速用来验证这些假说, 从而指导人们解读人类的昼夜节律行为.

参 考 文 献

- Johnson C H. Endogenous timekeepers in photosynthetic organisms. *Annu Rev Physiol*, 2001, **63**: 695~728
- Suri V, Qian Z, Hall J C, *et al.* Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in *Drosophila melanogaster*. *Neuron*, 1998, **21** (1): 225~234
- Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Forster C, *et al.* *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron*, 2000, **26** (2): 493~504
- Emery P, So W V, Kaneko M, *et al.* CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contribute to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 1998, **95** (5): 669~679
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, *et al.* The *cry^b* mutation identifies cryptochromes as circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 1998, **95** (5): 681~692
- Helfrich-Forster C, Winter C, Holfauer A, *et al.* The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron*, 2001, **30** (1): 249~631
- Majercak J, Chen W F, Edery I. Splicing of the period gene 3'-terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and phospholipase C. *Mol Cell Biol*, 2004, **24** (8): 3359~3372
- Konopka R J, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68** (9): 2112~2115
- Allada R. Circadian clocks: a tale of two feedback loops. *Cell*, 2003, **112** (3): 284~286
- Allada R, Kadener S, Nandakumar N, *et al.* A recessive mutant of *Drosophila* clock reveals a role in circadian rhythm amplitude. *EMBO J*, 2003, **22** (13): 3367~3375
- Panda S, Hogenesh J B, Kay S A. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 2002, **417** (6886): 329~335
- Lin J M, Kilman V L, Keegan K, *et al.* A role for casein kinase 2 α in the *Drosophila* circadian clock. *Nature*, 2002, **420** (6917): 816~820
- Sathyanarayanan S, Zheng X, Xiao R, *et al.* Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell*, 2004, **116** (4): 603~615
- Giebultowicz J M. Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2001, **356** (1415): 1~9
- Tanoue S, Krishnan P, Krishnan B, *et al.* Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfaction rhythms in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2004, **14** (8): 638~649
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 2000, **288** (5466): 682~685.
- Myers E M, Yu J, Sehgal A. Circadian control of eclosion: interaction between a central and peripheral clock in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*, 2003, **13** (6): 526~533
- Newby L M, Jackson F R. A new biological rhythm mutant of *Drosophila melanogaster* that identifies a gene with an essential embryonic function. *Genetics*, 1993, **135** (4): 1077~1090
- Renn S C, Park J H, Rosbash M, *et al.* A *pdf* neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, 1999, **99** (7): 791~802
- Sarov-Blat L, So W V, Liu L, *et al.* The *Drosophila takeout* gene is a novel molecular link between circadian rhythms and feeding behavior. *Cell*, 2000, **101** (6): 647~656
- McDonald M J, Rosbash M. Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell*, 2001, **107** (5): 567~578
- Zhao J, Kilman V L, Keegan K P, *et al.* *Drosophila* clock can generate ectopic circadian clocks. *Cell*, 2003, **113** (6): 755~766

Progress in Molecular Mechanisms of Circadian Rhythm in *Drosophila*

ZHOU Xian-Ju¹⁾, YUAN Chun-Yan¹⁾, YANG Xu-Ke¹⁾, GUO Ai-Ke^{1,2)*}

¹⁾Institute of Neuroscience, Shanghai Institute for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

²⁾Laboratory of Visual Information Processing, Center for Brain and Cognitive Sciences, Institute of Biophysics,
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract *Drosophila melanogaster* is an ideal model system for understanding the molecular mechanisms of circadian rhythm. The genetic amenability of *Drosophila* has led to the identification of more than ten clock genes and a set of clock-related genes, including clock input and clock-regulated genes. These clock genes and their products consist of two interlocked transcriptional/translational feedback loop, which regulate circadian rhythms of behavior and physiology in *Drosophila*. The working principles of the *Drosophila* core clock are also seen in mammals.

Key words *Drosophila*, entrainment, circadian rhythm, circadian clock, clock gene, feedback loop

*Corresponding author . Tel: 86-10-64888532, 86-10-54921785, E-mail: akguo@ion.ac.cn

Received: November 2, 2004 Accepted: December 2, 2004