

· 论 著 ·

人肺腺癌吉非替尼耐药细胞系 A549/GR 的建立及小白菊内酯逆转耐药机制研究*

刘 英,姚开泰,肖广惠[△]

(南方医科大学肿瘤研究所,广州 510515)

摘要:目的 建立人肺腺癌吉非替尼耐药细胞系 A549/GR,研究其耐药机制,探讨小白菊内酯(PAR)逆转 A549/GR 耐药的机制。方法 以吉非替尼为诱导剂,人肺腺癌细胞系 A549 为诱导对象,采用大剂量冲击和逐步增加剂量相结合的方法,诱导建立人肺腺癌吉非替尼耐药细胞系 A549/GR。采用细胞毒实验(MTT)法测定细胞耐药指数,免疫印迹法(Western blotting)检测细胞耐药相关蛋白表达水平,进一步通过 MTT 法检测 PAR 对 A549/GR 的逆转倍数,Annexin V-FITC 双标法检测 PAR 的促凋亡作用,Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白表达水平。结果 所建立的人肺腺癌吉非替尼耐药细胞系 A549/GR 耐药指数为 18.7。A549/GR 细胞中 MDR 和 ABCG2 耐药相关蛋白表达水平较 A549 升高。MTT 结果显示 PAR 对耐药细胞 A549/GR 的逆转倍数为 8.66。Annexin V-FITC 凋亡检测结果显示 PAR 能有效促进 A549/GR 细胞凋亡,Western blotting 检测显示 PAR 能有效降低 survivin、Bcl-2 两种抑制凋亡相关蛋白的表达。结论 成功建立了人肺腺癌吉非替尼耐药细胞系 A549/GR;PAR 通过促进 A549/GR 细胞凋亡有效逆转其耐药。

关键词:肺肿瘤;抗药性;细胞凋亡;逆转剂;靶向治疗

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.35.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)35-3689-03

Establishment of the gefitinib-resistant A549/GR cell line of human lung adenocarcinoma and investigation of the mechanism of parthenolide in reversing drug resistance*

Liu Ying, Yao Kaitai, Xiao Guanghui[△]

(Cancer Research Institute, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective To establish a gefitinib resistant cell line A549/GR of human lung adenocarcinoma and investigate the mechanism of drug resistance. Then, to find a reversal agent parthenolide to reverse A549/GR drug resistance. **Methods** The gefitinib resistant cell line A549/GR was established by a method of repeated treatment with high dose of gefitinib for a short period and followed by low but gradually increasing concentrations of the drug. The drug resistance index was determined by MTT assay, and the expression levels of drug resistant related protein MDR and ABCG2 were detected by the Western blotting assay. The reversal factor of parthenolide in A549/GR cells was measured by MTT assays. The cell apoptosis was detected by Annexin V FITC staining and the apoptosis related proteins survivin and Bcl-2 were detected by Western blotting analysis. **Results** The resistance index of A549/GR to gefitinib was 18.7. The expression levels of the drug resistance-related protein MDR and ABCG2 were obviously increased in A549/GR cells. Parthenolide effectively reversed drug resistance of A549/GR, with a reversal factor 8.66. Importantly, parthenolide potently induced A549/GR cell apoptosis and inhibited expression of anti-apoptotic protein survivin and Bcl-2. **Conclusion** A drug-resistant cell line A549/GR expressing typical drug-resistant proteins was established. Parthenolide can reverse the drug-resistant cells by inducing apoptosis of A549/GR cells.

Key words: lung neoplasms; drug resistance; apoptosis; reversal agent; targeted therapy

肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤,近年来,肺癌的发病率和病死率均迅速上升。肺癌的治疗方案是以手术为主的综合治疗,随着靶向药物的问世,使肺癌的治疗向前迈进了一大步。靶向药物是目前最先进的用于治疗恶性肿瘤的药物,它通过与癌症发生、发展所必需的特定分子靶点的作用来阻止癌细胞的生长。故靶向药物以其高特异性、低细胞毒性的特点,逐渐成为临床肿瘤治疗的首选药物^[1-2]。吉非替尼(gefitinib,商品名 Iressa)是一种选择性表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂,2003 年被美国食品药品监督管理局(FDA)批准作为非小细胞肺癌(NSCLC)的三线治疗药物,主要用于治疗既往接受过化学治疗的局部晚期或转移性 NSCLC^[3-4]。然而在用药过程中出现吉非替尼耐药使得肺癌治疗再次陷入困境,为此寻找高效、低毒的逆转剂逆转肿瘤治疗过程中出现的多药耐药

已是一个重要研究方向。

研究发现,许多天然植物成分能诱导肿瘤细胞凋亡,并能使肿瘤细胞发生细胞周期阻滞,抑制其增殖。小白菊内酯(parthenolide, PAR)是从菊科植物野甘菊中提取的一种倍半萜内酯化合物,西方国家曾主要用于治疗皮肤感染、风湿病和偏头疼。近年来,发现 PAR 具有多种生物活性,并且对多种肿瘤株有抑制作用。本研究通过体外实验检测 PAR 能否逆转人肺腺癌吉非替尼耐药细胞 A549/GR 的耐药性,并探讨其逆转耐药的机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 吉非替尼,阿斯利康公司产品,剂型:250毫克/片;PAR,二甲基四氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)均为 Sigma 公司产品。PRMI1640 完全培养液、胎牛血清

和胰蛋白酶为 Hyclone 公司产品。抗体 MDR、ABCG2、survivin、Bcl-2 和内参磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体均为 Sanata Cruz 公司产品。Annexin V-FITC 凋亡试剂盒为 Key GEN 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞系、细胞培养及耐药细胞诱导方法

人肺腺癌细胞株 A549 为南方医科大学肿瘤研究所保存、复苏传代所得。用含 10% 胎牛血清和青霉素、链霉素各 100 U/mL 的 1640 培养基,置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。0.25% 胰蛋白酶消化传代。取对数生长期的细胞进行实验。耐药细胞采用大剂量冲击和逐渐增加剂量相结合的方法诱导产生^[5-6]。先用细胞毒实验(MTT)法测定吉非替尼对敏感细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为 1.88 μmol/L,然后用含 18 μmol/L 吉非替尼的培养基培养 24 h,立即更换含半数抑制浓度吉非替尼的培养基培养 5~10 d,直至细胞稳定生长并传代 3 次,再次测定 IC₅₀。然后再次用含 18 μmol/L 吉非替尼的培养基培养冲击 24 h,更换吉非替尼半数抑制浓度渐次提高了的培养基。直至细胞在含有 18 μmol/L 吉非替尼的培养基中稳定生长并连续传代 3 次,最后测定吉非替尼的 IC₅₀ 为 35.10 μmol/L,命名为 A549/GR。

1.2.2 MTT 法

实验前将 A549/GR 细胞传代,在不含吉非替尼的培养基中培养至少 7 d。选取对数生长期的细胞,调整细胞密度为 1×10⁵/mL,加入 96 孔板,每孔 100 μL。置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养至细胞完全贴壁。次日换液后再分别加入 100 μL 呈半数药物浓度梯度的培养基,每孔总体积为 200 μL,共设置 7 个浓度梯度,1 个空白对照,各种药物浓度做 3 个平行孔。培养 72 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,继续培养 4 h,吸出培养基,每孔加入 DMSO 150 μL,轻微振荡 10 min 溶解结晶。以 490 nm 为检测波长,在酶标仪上检测各孔的吸光度(A)值,细胞存活率=(实验组 A 值/对照组 A 值)×100%,计算 IC₅₀ 值。耐药倍数=耐药细胞 IC₅₀/亲代细胞 IC₅₀,逆转倍数=使用逆转剂前 IC₅₀/使用逆转剂后 IC₅₀。MTT 实验在不同日重复 3 次。

1.2.3 细胞凋亡检测

将生长状态良好的 A549/GR 细胞分别设置对照组和 PAR 处理组两组,加药作用 72 h 后,用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化收集细胞团块。用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次(2 000 r/min 离心 5 min)收集(1~5)×10⁵ 个细胞;加入 500 μL 的 Binding 缓冲液悬浮细胞;加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL 碘化丙啶(PI),混匀;室温,避光、反应 5~15 min;在 1 h 内进行流式细胞仪的观察和检测,收集图片并进行数据分析。

1.2.4 蛋白提取和免疫印迹法(Western blotting)检测

用冰预冷的 RIPA 细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF)分别裂解 A549、A549/GR(对照组、单药吉非替尼组及 PAR 联合吉非替尼组)共 4 组细胞,离心收集上清。BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μg 蛋白上样,经 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转膜,室温封闭 90 min,加入一抗(Mdr, 1:500; ABCG2, 1:500; survivin, 1:500; Bcl-2, 1:500; GAPDH, 1:1 000),4 °C 过夜;洗膜缓冲液(TBST)洗膜 5 min,3 次后加入二抗(1:1 000)室温孵育 90 min,用 TBST 洗膜 5 min,3 次,ECL 化学发光显色,由 Bio RAD 凝胶成像仪摄取凝胶图像,用 Quantity One 软件进行吸光度分析,实验重复

3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行描述性统计分析。

2 结果

2.1 细胞耐药指数检测

通过大剂量冲击和逐步增加剂量相结合的方法,历时 8 个月建立了吉非替尼的耐药细胞系,命名为 A549/GR,以细胞存活率为纵坐标、吉非替尼浓度为横坐标作图(图 1)。可见在相同吉非替尼浓度下,A549/GR 的存活率高于 A549,吉非替尼对两细胞的 IC₅₀ 分别为 35.10 μmol/L (A549/GR)和 1.88 μmol/L(A549),耐药指数为 18.7。

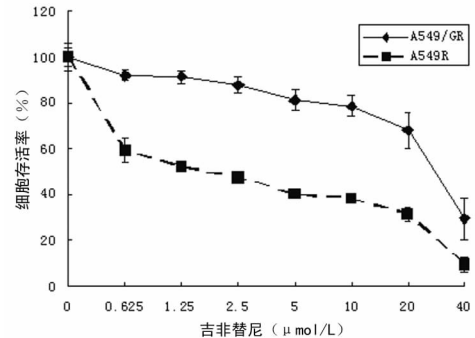


图 1 A549/GR 细胞的耐药性检测

2.2 耐药相关蛋白的检测

Western blotting 检测耐药相关蛋白,结果显示与亲代细胞 A549 对比,耐药细胞 A549/GR 中 MDR 和 ABCG2 两种耐药相关蛋白都明显升高,见图 2。

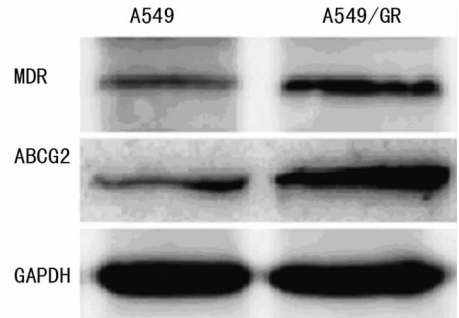


图 2 Western blotting 检测 A549 和 A549/GR 细胞中 MDR 和 ABCG2 蛋白表达水平

2.3 PAR 体外逆转耐药实验

联合低剂量 PAR(20 μmol/L)用药可明显降低吉非替尼对 A549/GR 半数抑制浓度,以细胞存活率为纵坐标、吉非替尼浓度为横坐标作图(图 3)。联合应用 PAR 前后吉非替尼对 A549/GR 的 IC₅₀ 分别为 35.10 μmol/L 吉非替尼单药组和 4.05 μmol/L 吉非替尼联合 PAR 用药组,其逆转倍数为 8.66。

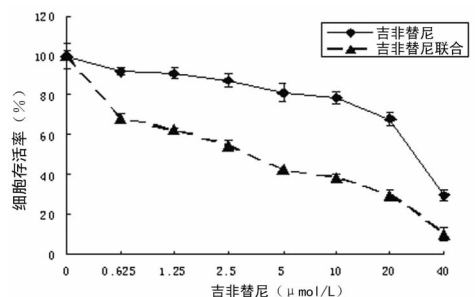


图 3 PAR 逆转 A549/GR 耐药实验

2.4 PAR 逆转耐药机制的探讨

Annexin V-FITC 凋亡检测结果显示,低剂量 PAR(20 μmol/L)作用于 A549/GR 可以有

效诱导细胞凋亡(图 4)。同时 Western blotting 检测结果显示,与对照组相比,低剂量 PAR 及联合吉非替尼用组细胞中,survivin、Bcl-2 两种抑制凋亡相关蛋白都明显降低,且联合用药降低更明显,见图 5。

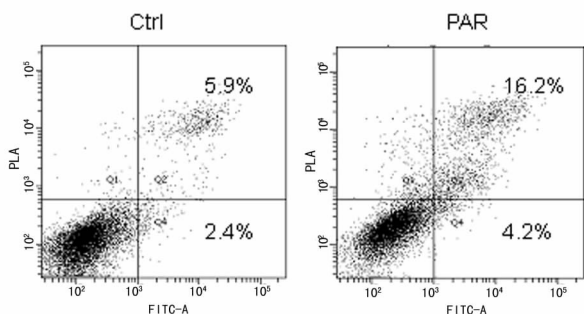


图 4 A549/GR 细胞凋亡分析

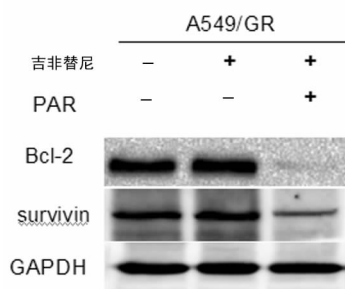


图 5 Western blotting 检测蛋白 survivin 及 Bcl-2 的表达水平

3 讨论

当肿瘤对一种抗肿瘤药物产生耐药性的同时,对结构和作用机制不同的其他抗肿瘤药物也产生交叉耐药性,通常称之为多药耐药性(multi-drug resistance, MDR),早在 1970 年 Biedler 等^[7]就首次报道肿瘤存在 MDR 现象。在对肿瘤 MDR 现象的研究过程中发现,有些肿瘤经诱导才会产生耐药性,即在首次用药或前几个疗程是敏感的,到后来才逐渐耐药,这种称之为获得性耐药即后天耐药。在临床肿瘤患者中,绝大多数是属于获得性耐药,即一开始是对治疗敏感的,但是用药治疗几个周期后,肿瘤开始对药物耐受并出现复发或者转移现象。采用大剂量冲击和逐步增加药物剂量相结合的方法诱导产生的耐药细胞株,这与临床上肿瘤患者出现耐药的机制类似,更有研究价值。故本课题采用大剂量冲击和逐步增加药物剂量相结合的方法历时 8 个月,成功诱导建立人非小细胞肺癌吉非替尼耐药细胞系 A549/GR,通过 MTT 实验证实该耐药细胞系的耐药指数高达 18.7。

关于 MDR 的产生已经提出几种较为肯定的机制,其中最为重要的机制被认为是细胞膜上存在一种 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)引起,1976 年 Juliano 等^[8]在耐药的中国仓鼠卵巢癌细胞中发现一种相对分子质量为 1.7×10^5 的糖蛋白,被命名 P-gp,它是多药耐药基因 MDR1 基因编码的产物^[9]。P-gp 能将细胞内的化疗药物泵出胞外,从而降低细胞内的有效药物浓度产生耐药,呈现典型的 MDR 表型。ABCG2 是 ABC 转运体超家族的成员之一。ABC 转运体的表达是肿瘤细胞对化疗药物耐受的一个重要机制,现在已经发现 3 个人类的 ABC 转运体与多药耐药相关,这 3 个转运体是 P-gp,MRP1 (multidrug resistance protein 1)和 ABCG2。这 3 个转运体的转运底物特异性很广,而且在一定程度上重叠,能够转运当前

癌症化疗中的主要药物^[10]。本研究建立的人肺腺癌吉非替尼耐药细胞 A549/GR 中 MDR、ABCG2 耐药相关蛋白,表达较亲代细胞 A549 明显升高,这可能是 A549/GR 产生耐药的主要机制。

肺癌是严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤之一,在治疗过程中出现的多药耐药现象使得肺癌对化疗和靶向治疗不敏感,从而导致治疗效果不理想、病死率高。因此,逆转人肺癌多药耐药性是提高肺癌疗效的有力手段。目前,逆转剂主要有 Ca^{2+} 通道拮抗剂(如维拉帕米)及其衍生物、免疫调节剂(如环孢菌素 A)、抗雌激素类(如三苯氧胺)等,但这些药物因其固有的药理作用而限制了临床应用,因此,研究筛选高效低毒的 MDR 逆转剂,是提高恶性肿瘤疗效的重要途径。已有研究证明,PAR 能促进细胞毒药物顺铂对肝癌细胞 HepG2 凋亡,二者联合具有协同作用^[11]。亦有研究表明 PAR 通过促进胃癌细胞 SGC7901 凋亡达到抗肿瘤作用^[12]。本研究针对自主诱导产生的人肺腺癌吉非替尼耐药细胞系 A549/GR,MTT 实验结果显示,联合低剂量 PAR(20 μ mol/L)应用后,吉非替尼对 A549/GR 的 IC₅₀ 较单独应用吉非替尼组 IC₅₀ 明显降低,逆转倍数高达 8.66,从而证实 PAR 能有效逆转人 A549/GR 耐药作用。而且对比第一、二代逆转剂,PAR 具有高效低毒的特点,从而突破前几代逆转剂不良反应太大而限制其临床应用的局限性。AnnexinV-FITC 双标凋亡检测显示低剂量 PAR 可有效诱导 A549/GR 细胞凋亡,同时 Western blotting 检测发现 PAR 可降低凋亡抑制蛋白 survivin 和 Bcl-2 表达,结果表明 PAR 逆转 A549/GR 可能的耐药机制是通过降低凋亡抑制蛋白表达进而促进耐药细胞凋亡实现的,至于 PAR 是否存在其他逆转耐药有关的机制还有待进一步研究。

本研究成功建立稳定的人肺腺癌吉非替尼耐药细胞系 A549/GR,并寻找到一种高效、低毒的逆转剂 PAR 逆转细胞耐药,为解决肺癌患者 MDR 问题提供了一个可能的途径。

参考文献:

- [1] Herbst RS, Fukuoka M, Baselga J. Gefitinib—a novel targeted approach to treating cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2004,4(12):956-965.
- [2] 刘新垣. 癌症靶向治疗的最新进展[J]. 中华肿瘤防治杂志,2006,13(18):1361-1364.
- [3] Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer(The IDEAL 1 Trial)[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(12): 2237-2246.
- [4] Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer; a randomized trial[J]. JAMA, 2003,290(16):2149-2158.
- [5] 陈杰,钱桂生,黄桂君,等. 人肺腺癌多药耐药细胞系的建立及其生物学特征[J]. 第三军医大学学报,2001,22(2): 135-137.
- [6] Rho JK, Choi YJ, Lee JK, et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line[J]. (下转第 3694 页)

细胞凋亡^[9]。

PI3K/Akt 细胞转导通路被认为是肿瘤细胞存活的首要通路,与肿瘤的发生、发展密切相关,在肿瘤细胞恶性增殖、转移以及对放、化疗的拮抗起着重要作用^[10]。近年来应用信号通路靶点抑制剂与放、化疗结合治疗的方法,为肿瘤的治疗开辟了一条新的途径,日益受到癌症研究者得重视。研究发现,磷酸化的 Akt 可以将 Bad 磷酸化,磷酸化的 Bad 失去与 Bcl-XL 结合的能力,恢复了 Bcl-2 的抗凋亡能力,通过控制细胞色素 C 从线粒体的释放来介导 Caspases 家族的活性^[11]。Fujiwara 等^[12]发现,CDDP 可以诱导胰腺癌细胞中 Akt 活化,LY294002 通过抑制 Akt 和 Bad 的磷酸化,上调 Caspase-3 的表达,从而增加了胰腺癌 AsPC-1、PANC-1 细胞对 CDDP 的敏感性,并在动物实验中得到证实。Asechi 等^[13]认为,survivin 的表达上调介导了大鼠肝癌细胞 K-251 对 CDDP 的耐药,LY294002 通过抑制 survivin 的表达增加肿瘤细胞对 CDDP 的敏感性。

本研究主要探讨 LY294002 联合 CDDP 是否可以增强对神经胶质瘤 U87 细胞的增殖抑制作用,以期改善化疗药物对预防脑胶质瘤术后复发的效果。本研究发现,在体外环境下 LY294002 联合 CDDP 能增强对胶质瘤 U87 细胞的增殖抑制作用。当 LY294002 浓度为 5 μmol/L、CDDP 0.625 μg/mL 时,联合用药存在协同作用(Q=1.21),说明 LY294002 有增加 CDDP 治疗效果的作用。FCM 结果表明,用相同剂量的 CDDP 作用 U87 细胞,在 LY294002 干预后,G₁ 期细胞比例增加,S 期细胞减少,G₂ 期变化不大。本研究发现,LY294002 和 CDDP 单药组可以抑制细胞增殖,联合用药组抑制作用更加明显。

总之,本研究已证实 LY294002 和 CDDP 能协同抑制人胶质瘤细胞株 U87 增殖,但 LY294002 增强胶质瘤对 CDDP 敏感性的分子机制尚未明确,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 申洁,贺外信.多西他赛联合顺铂治疗非小细胞肺癌近期疗效观察[J].中华实用诊断与治疗杂志,2012,26(1):68-69.
- [2] 刘莺,曹婧,张艳玲,等.依托泊甙联合顺铂治疗食管小细胞癌的疗效[J].肿瘤防治研究,2011,38(12):1423-1425.
- [3] 王蓓,王浙,吕晓皑.吉西他滨联合顺铂一线治疗晚期三阴乳腺癌疗效分析[J].实用肿瘤杂志,2011,26(5):507-

509.

- [4] 王晶宇,王志平,赵俊丽,等.LY294002 联合姜黄素对人膀胱癌 EJ 细胞的体外抑制作用[J].中国临床药理学杂志,2011,27(1):37-41.
- [5] Chen L,Han L,Shi Z,et al.LY294002 enhances cytotoxicity of temozolomide in glioma by down-regulation of the PI3K/Akt pathway[J].Mol Med Report,2012,5(2):575-579.
- [6] Wu D,Tao J,Xu B,et al.Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 suppresses proliferation and sensitizes doxorubicin chemotherapy in bladder cancer cells[J].Urol Int,2011,87(1):105-113.
- [7] 金正均.合并用药中的相加[J].中国药理学报,1980,1(2):70-76.
- [8] Schwartzbaum JA,Fisher JL,Aldape KD,et al.Epidemiology and molecular pathology of glioma[J].Nat Clin Practice,2006,2(9):494-503.
- [9] Brozovic A,Osmak M.Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance[J].Cancer Lett,2007,251(1):1-16.
- [10] Morgensztern D,McLeod HL.PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy[J].Anti Cancer Drugs,2005,16(8):797-803.
- [11] Chong ZZ,Maiese K.Targeting WNT,protein kinase B, and mitochondrial membrane integrity to foster cellular survival in the nervous system[J].Histol Histopathol,2004,19(2):495-504.
- [12] Fujiwara M,Izuishi K,Sano T,et al.Modulating effect of the PI3-kinase inhibitor LY294002 on cisplatin in human pancreatic cancer cells[J].J Exp Clin Cancer Res,2008,27:76.
- [13] Asechi H,Hatano E,Nitta T,et al.Resistance to cisplatin-induced apoptosis via PI3K-dependent survivin expression in a rat hepatoma cell line[J].Int J Oncol,2010,37(1):89-96.

(收稿日期:2012-06-13 修回日期:2012-09-12)

(上接第 3691 页)

- Lung Cancer,2009,63(2):219-226.
- [7] Biedler JL,Riehm H.Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro;cross-resistance,radioautographic,and cytogenetic studies[J].Cancer Res,1970,30(4):1174-1184.
- [8] Juliano RL,Ling V.A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J].Biochim Biophys Acta,1976,455(1):152-162.
- [9] Chen CJ,Chin JE,Ueda K,et al.Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human

cells[J].Cell,1986,47(3):381-389.

- [10] Robey RW,Polgar O,Deeken J,et al.ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance[J].Cancer Metastasis Rev,2007,26(1):39-57.
- [11] 王秀英,冷水龙.小白菊内酯增强肝癌 HepG2 细胞对顺铂敏感性的实验研究[J].实用医学杂志,2011,29(2):177-180.
- [12] Zhao LJ,Xu YH,Li Y.Effect of parthenolide on proliferation and apoptosis in gastric cancer cell line SGC7901 [J].J Dig Dis,2009,10(3):172-180.

(收稿日期:2012-06-09 修回日期:2012-08-22)