

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.007

辛伐他汀干预对大鼠肺动脉高压及其内皮祖细胞的影响*

裴芳¹,裴华²,刘俊峰^{3△},陈植⁴,康兴斌³,黄骥¹,黄婕¹,王华民²

(1. 中国人民武装警察部队重庆市总队医院心血管内科,重庆 400061;2. 海南医学院免疫学教研室,海口 571101;3. 华北石油总医院儿科,河北任丘 062552;4. 首都医科大学附属北京儿童医院,北京 100045)

摘要:目的 探讨辛伐他汀治疗大鼠实验性肺动脉高压(PH)的疗效及其对循环内皮祖细胞(EPC)数量和功能的影响。方法 选取 Sprague-Dawley 大鼠 24 只,随机分为 3 组:模型组、干预组、对照组,每组 8 只。利用野百合碱皮下注射制备 PH 模型,干预组大鼠于第 3 天应用辛伐他汀对其进行治疗,第 21 天测定比较各组大鼠右室收缩压(RVSP)、肺血管结构和循环 EPC 的数量,同时体外培养各组 EPC,对 EPC 的产量和功能进行分析比较。结果 干预组循环 EPC 含量明显高于模型组及对照组($P < 0.01$);和模型组比较,干预组 RVSP、肺小动脉中膜厚度与血管外径比值显著降低($P < 0.01$),管腔面积与血管总面积比值(VA/TAA)显著增高($P < 0.01$);体外培养下,干预组 EPCs 的产量以及增殖、黏附、迁移能力均较模型组显著增高。结论 辛伐他汀能够通过有效上调 PH 模型大鼠循环 EPC 的数量及功能,从而达到对 PH 的治疗目的。

关键词:高血压,肺性;大鼠;内皮祖细胞;辛伐他汀

中图分类号:R543.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)33-4436-04

Effect of simvastatin treatment on pulmonary hypertension and endothelial progenitor cells in rat*

Pei Fang¹, Pei Hua², Liu Junfeng^{3△}, Chen Zhi⁴, Kang Xingbin³, Huang Ji¹, Huang Jie¹, Wang Huamin²

(1. Department of Cardiology, Chongqing Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Chongqing 400061, China; 2. Department of Immunology, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Department of Pediatrics, the General Hospital of Huabei Oil field Company, Rengui, Hebei 062552, China; 4. Department of Cardiology, Beijing Children's Hospital of Capital Medical University, Beijing 100045, China)

Abstract: Objective The present study was designed to investigate the efficiency of simvastatin therapy for experimental pulmonary hypertension (PH) in rat, and the effects on the number and function of circulating endothelial progenitor cells (EPC). **Methods** Twenty four Sprague Dawley rats were divided into 3 groups randomly: model group, treatment group and control group, 8 rats in each group. Rats were treated with a single subcutaneous injection of monocrotaline to induce PH (PBS used as control). The rats in the experimental group were administrated with simvastatin 3 days following subcutaneous injection of monocrotaline. In the 21st day, the number of circulating EPC, the right ventricle systolic pressure of rat, pulmonary vascular structural changes and the quantity of cultured EPC were measured. At the same time, EPC in each group were cultured in vitro, then the ability of proliferation and function were analyzed and compared. **Results** The number of circulating EPC in model group was decreased significantly compared to both control and model groups ($P < 0.01$). Compared with model group, simvastatin treatment markedly decreased the RVSP and the ratio of media thickness to eternal diameter ($P < 0.01$), but the ratio of vessel area to total arterial area (VA/TAA) was definitively increased ($P < 0.01$). After 7 days of culture in vitro, both the output of EPC and the ability of proliferation, conglutination and migration of EPC in treatment group were up-regulated compared with those in model group ($P < 0.01$). **Conclusion** This study confirmed that simvastatin effectively treat experimental PH through improving quantity and function of circulating EPC.

Key words: hypertension, pulmonary; rats; endothelial progenitor cell; simvastatin

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一种病因各不相同的难治性恶性肺血管疾病,预后不佳,临床上目前药物治疗效果不甚理想。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)又称血管母细胞,是一种成年个体骨髓中的血管内皮前体细胞,它能迁移至外周血并分化成成熟血管内皮细胞,具有良好的增生潜能。近年来研究发现 EPC 能通过促进受损的肺动脉内皮修复及动脉重塑减低肺动脉压^[1-2]。研究发现,辛伐他汀可促进 EPC 增殖,减少 EPC 凋亡,提高其迁移能力及趋化活性^[3-4]。因此,本研究旨在探讨利用辛伐他汀治疗 PH 的可行性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 24 只 8 周龄雄性 SD 大鼠,体质量 150~200 g,许可证号:SCXK(京)2005-0013。适应性饲养 2 周后,分为模型组、实验组及对照组,每组 8 只。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 模型组及干预组于项背部皮下注射 1% 的野百合碱(monocrotaline,美国 Sigma 公司) 50 mg/kg 以诱导形成 PH 模型^[5];对照组注射等量磷酸盐缓冲液(PBS)。注射当天为第 0 天。实验组于第 3 天开始予辛伐他汀 20 mg/kg 溶液灌胃,模型组以等量蒸馏水灌胃,直至实验结束。

* 基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划资助项目(20110202)。 作者简介:裴芳(1976-),副主任医师,博士,主要从事心血管病高血压的临床及基础研究。 △ 通讯作者, Tel:13730570141; E-mail:lioneliu@126.com。

1.2.2 循环 EPC 含量测定 第 21 天各组大鼠经尾静脉取血,予乙二胺四乙酸抗凝后取 0.1 mL,加入 2 μ L 小鼠抗大鼠血管内皮细胞生长因子受体-2(VEGFR-2)抗体(美国 Santa Cruz 公司),孵育 15 min,经红细胞裂解、PBS 洗涤离心后,再加入 5 μ L 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠 IgG(美国 Santa Cruz 公司),避光孵育 15 min,PBS 洗涤离心后,依次加入 5 μ L 藻红素标记的小鼠抗大鼠 CD34 抗体(PE-CD34)、别藻蓝素标记的小鼠抗大鼠 CD45 抗体(APC-CD45,美国 BD 公司)避光孵育 15 min,PBS 洗涤离心后,应用流式细胞仪计数每 100 000 个单个核细胞中 CD34⁺ VEGFR-2⁺ CD45⁻ 的 EPCs 所占的比例。

1.2.3 心肺指标测定

1.2.3.1 右心室收缩压测定 经静脉采血后的大鼠以 10% 水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉,自右侧颈外静脉插管至右心室,应用 PM-8000 型多参数监护仪测定右心室收缩压,以此间接反映肺动脉压力。

1.2.3.2 观察肺组织及肺血管病理变化 大鼠断头处死,分离右下肺叶,10%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察大鼠肺组织病理变化,并应用 Leica QWinV3 图像分析系统测量与终末细支气管伴行的小动脉管壁中膜厚度(MT)与血管外径(ED)的比值(MT/ED)、管腔面积(VA)与血管总面积(TAA)的比值(VA/TAA)。

1.2.4 循环 EPC 的体外培养及功能监测

1.2.4.1 循环 EPC 的体外培养 将经尾静脉采集的外周血,以淋巴分离液经密度梯度离心法获得单个核细胞,加入含 5% 胎牛血清(FBS)的内皮细胞生长培养基-2(EGM-2,瑞士 Lonza 公司),以 2×10^6 个/mL 密度将细胞接种于纤维连接蛋白(美国 Hematological Technologies 公司)包被的 24 孔板中,每只大鼠设 2 个孔,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。培养箱孵育,3 d 后以 PBS 洗去未贴壁细胞,更换新的培养液,以后隔日半量换液。

1.2.4.2 循环 EPC 的免疫荧光鉴定 细胞培养 7 d 后,分别取 1 孔细胞加入 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(美国 Molecular Probes 公司)至终浓度 5 mg/L。继续孵育 4 h,吸弃培养液,用 2% 多聚甲醛固定细胞 20 min,PBS 反复浸洗后,加入含 5 mg/L FITC 标记的血凝素(美国 Sigma 公司)的 PBS 0.5 mL,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBS 浸洗后予 90% 中性甘油封片,于共聚焦显微镜下观察。显示红色荧光者为 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白阳性细胞,显示绿色荧光者为 FITC 标记的血凝素阳性细胞,双荧光阳性细胞被认为是 EPC。

1.2.4.3 流式细胞仪检测 EPCs 特异性表面标志 CD34、VEGFR-2 表达情况 体外培养的 EPC 于第 14 天各取 1 孔细胞应用 0.25% 胰酶消化细胞制备单细胞悬液,调整细胞密度为

2×10^6 个/mL,取 0.1 mL,加入 2 μ L 小鼠抗大鼠 VEGFR-2 抗体,孵育 15 min,经 PBS 洗涤离心后,再加入 5 μ L FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG,避光孵育 15 min,PBS 洗涤离心后,加入 5 μ L PE-CD34,避光孵育 15 min,经 PBS 洗涤离心后,应用流式细胞仪检测 EPCs 相对特异性表面标志 CD34、VEGFR-2 的表达情况。

1.2.4.4 细胞增殖能力检测 将消化的 EPC 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,取 0.2 mL 接种于预先铺有纤维连接蛋白的 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 96 h,每孔加入 20 μ L 四甲基偶氮唑蓝(5 mg/mL,美国 Duchfo 公司),培养 4 h 后加入 100 μ L 二甲基亚砷,应用酶标仪检测其在 570 nmol/L 处的吸光度。

1.2.4.5 细胞黏附能力检测 将消化的 EPC 调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,取 1 mL 接种于预先铺有纤维连接蛋白的 24 孔板中,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。培养箱中培养 30 min,以 PBS 冲洗 3 遍去除未贴壁细胞,200 倍相差显微镜下选择 3 个不同视野进行细胞计数,取平均值。

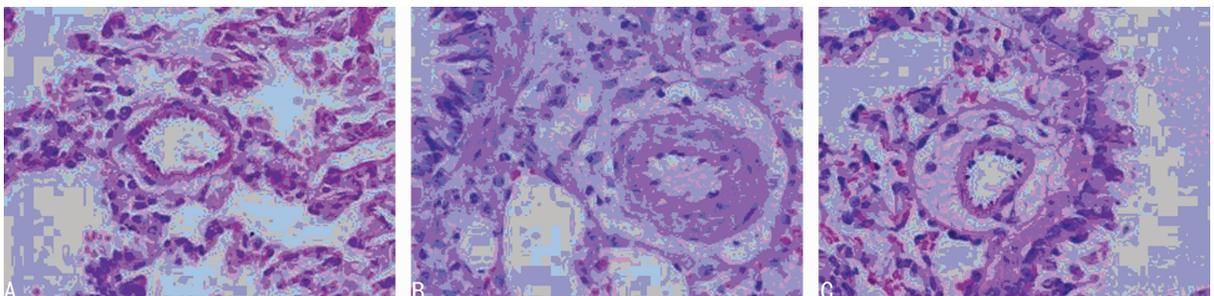
1.2.4.6 细胞迁移能力检测 孔径为 8 μ m 的插入式培养皿置于 24 孔板中,在插入式培养皿外加入 0.6 mL 含 5.0% FBS 的 EGM-2,将消化的 EPC 应用含 0.1% FBS 不含细胞因子的 EBM-2 重新调整至细胞密度为 5×10^5 个/mL,取 0.1 mL 加于皿内。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,取出插入式培养皿,用棉签擦净滤膜上层的细胞,应用 4% 多聚甲醛将膜下层细胞固定 20 min,PBS 反复浸洗干燥后,经 0.1% 结晶紫染色,200 倍相差显微镜下选择 3 个不同视野进行细胞计数,取平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况观察 模型组大鼠于第 10 天起较对照组大鼠活动明显减少,进食减少,体毛杂乱无光泽,呼吸急促。干预组大鼠除活动略有减少外,呼吸、进食及体毛情况均较对照组无明显的变化。

2.2 肺动脉压力及局部病变的比较 与对照组相比,模型组大鼠 RVSP 明显升高,且肺小动脉血管内皮细胞损伤明显。血小板黏附在损伤的内皮细胞及裸露的基底膜上,可见淋巴细胞浸润,肌型小动脉中膜厚度显著增加,MT/ED 比值增大。管腔狭窄,甚至闭塞,VA/TAA 比值减小。同时,与模型组相比,干预组大鼠 RVSP 明显降低,已接近对照组水平。肺部病变也相对较轻,MT/ED 及 VA/TAA 比值明显改善并趋于正常,见图 1、表 1。



A: 对照组; B: 模型组; C: 干预组。

图 1 不同组别大鼠肺组织病理表现(HE, $\times 400$)

表 1 不同组别大鼠肺动脉压力指标的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	RVSP(mm Hg)	MT/ED 比值(%)	VA/TAA 比值(%)
对照组	26.13±3.25 ^a	14.15±1.67 ^a	40.52±4.19 ^a
模型组	49.78±3.42	32.28±3.12	22.73±3.62
干预组	31.06±3.43 ^a	18.46±2.03 ^a	37.21±4.63 ^a

^a: $P<0.01$, 与模型组比较。

2.3 循环 EPCs 数量及功能的比较

2.3.1 循环 EPCs 数量的变化 流式细胞仪检测显示, 模型组大鼠循环 EPCs 在外周血单核细胞中所占比例(0.017±

0.008)%较对照组(0.036±0.014)%明显减低($P<0.01$)。干预组循环 EPCs 数量(0.039±0.012)%较模型组及对照组均明显增加($P<0.01$)。

2.3.2 EPCs 的体外生长情况 培养后 7 d, 外周血单个核细胞可以见到大量梭形细胞(图 2A), 其具有结合 FITC-lectin(图 2B、2D)及吞噬 Dil-acLDL(图 2C、2D)的特性。模型组中同时结合 FITC-lectin 和吞噬 Dil-acLDL 双阳性细胞所占的比例(80.25±6.34)%较对照组(87.92±6.74)%略少($P<0.05$)。干预组双阳性细胞的比例(88.05±6.92)%较模型组明显增多($P<0.05$), 与对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。

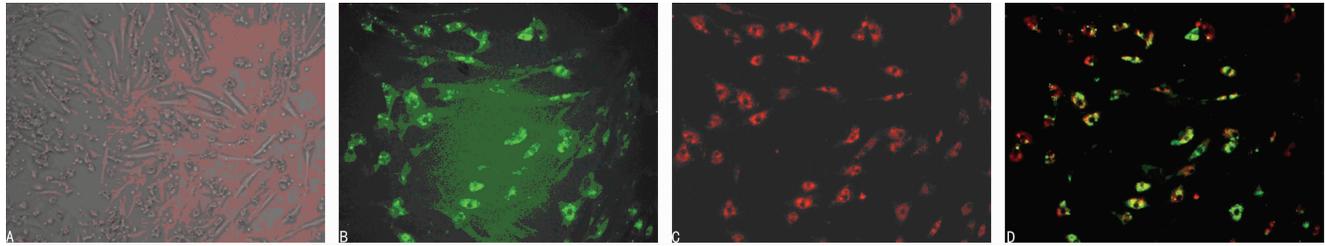


图 2 循环 EPC 的培养及免疫荧光鉴定($\times 100$)
A: 培养第 7 天可以见到大量的梭形细胞生成; B: 细胞结合血凝素呈现绿色荧光; C: 细胞吞噬乙酰化低密度脂蛋白呈现红色荧光; D: 双阳性细胞呈现黄色荧光。

图 2 循环 EPC 的培养及免疫荧光鉴定($\times 100$)

2.3.3 EPC 表面分子的表达 培养至第 14 天, 模型组外周血单个核细胞 CD34、VEGFR-2 的表达明显低于对照组($P<0.01$); 而干预组表达显著上调, 明显高于模型组($P<0.01$), 且与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 2。

表 2 不同组别循环 EPC 表面分子表达的比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	CD34	VEGFR-2
对照组	30.17±4.62 ^a	50.68±5.16 ^a
模型组	17.35±3.52	32.93±4.72
干预组	31.62±4.86 ^{ab}	49.75±5.04 ^{ab}

^a: $P<0.01$, 与模型组比较; ^b: $P>0.05$, 与对照组比较。

2.3.4 EPC 功能的变化 比较循环 EPC 在体外培养状态下的增殖、黏附、迁移能力, 模型组与对照组比较均有所下降($P<0.01$)。干预组各项功能指标较模型组显著上调($P<0.01$), 且与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 3。

表 3 不同组别循环 EPC 功能指标的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	增殖能力 (OD 值)	黏附能力 (细胞个数/HPF)	迁移能力 (细胞个数/HPF)
对照组	0.65±0.08 ^a	12.23±2.12 ^a	13.19±2.67 ^a
模型组	0.44±0.05	7.35±1.68	7.36±2.13
干预组	0.62±0.07 ^{ab}	11.73±2.06 ^{ab}	12.78±2.72 ^{ab}

^a: $P<0.01$, 与模型组比较; ^b: $P>0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

PH 是以肺血管阻力渐进性增加、右心后负荷渐进性增加、最终导致右心衰竭为特征的恶性疾病。近十余年来, 虽然波生坦、西地那非等靶向药物的应用使得 PH 的临床症状能够在一定程度上得到改善, 但远期预后依旧不佳。有研究认为, 血管内皮细胞过度凋亡所引起的内皮损伤是 PH 的触发因素和起始环节^[6-8]。因此, 从病理基础角度来说, 尽早修复受损的

血管内皮, 防止血管功能障碍的发生及血管重构将有可能从根本上阻止 PH 的进程, 从而达到对 PH 治疗的目的。研究表明, EPC 在血管内皮细胞损伤后的修复及维持正常功能方面都起着重要作用^[9-10]。PH 急性期循环 EPC 数量明显增加, 而对于已经发生血管重构的病例, 其循环 EPC 的数量及活性存在明显下降^[11-13]。本实验结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠外周血中 EPC 的数量显著减少, 其表面 CD34、VEGFR-2 的表达及各项功能指标也发生了明显的下调。在组织病理方面, 模型组大鼠肺小动脉血管内皮细胞损伤明显、管壁增厚、管腔狭窄及肺循环压力增高。这说明 PH 的形成确实与 EPC 的数量及功能有关。

他汀类药物具有良好的调脂作用, 在胆固醇水平相当的情况下, 他汀类药物能显著降低心血管事件发生率。此外, 他汀类药物还具有促进血管新生和内皮损伤后的修复作用。近年来, 随着研究的深入, 人们逐渐发现了他汀类的很多非干细胞的生物学作用。有研究报道, 他汀类能增加 EPC 的增殖、迁移及分化, 有利于改善 EPC 的功能, 以实现血管损伤的修复及通过血管生成来增加和改善缺血区域的血液供应。本研究显示, 干预组大鼠于实验第 21 天时, 其循环 EPC 的数量较模型组增多, 与对照组比较也在相对较高水平。在体外培养状态下, 干预组 EPC 表面 CD34、VEGFR-2 的表达及增殖、黏附、迁移能力比模型组有显著上调, 相应地, 其肺小动脉的病变及肺循环压力的增高也得到了改善。这说明辛伐他汀对 PH 有一定的治疗效果。

综上所述, 辛伐他汀能明显地增加循环 EPC 的数量, 改善 EPC 的功能, 达到促进血管新生和受损血管内皮修复的作用, 以便在肺动脉内皮损伤的早期即有效地完成修复工作, 维持内皮正常的结构和功能, 防止因血管的舒张功能受损和平滑肌细胞、成纤维细胞过度增殖而造成的血管重构, 达到对 PH 的治疗目的。然而, 由于辛伐他汀治疗过程中的具体信号转导途径、EPC 参与局部损伤修复的具体作用方式及机制尚不完全明了, 因此应用辛伐他汀治疗 PH 尚需要对其远期疗效和可能

存在的问题进行更加深入地研究和评估。

参考文献:

- [1] Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1249-1259.
 - [2] Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, et al. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells[J]. *Circulation*, 2003, 108(7): 889-895.
 - [3] Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury[J]. *Circ Res*, 2003, 93(2): e17-24.
 - [4] Griese DP, Ehsan A, Melo LG, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy [J]. *Circulation*, 2003, 108(21): 2710-2715.
 - [5] Liu JF, Du ZD, Chen Z, et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by upregulating endothelial progenitor cells via the nitric oxide system[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(6): 1402-1408.
 - [6] Song Y. Association study of circulating endothelial progenitor cells and plasma prostacyclin levels in pulmonary hypertension rats[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(1): 438-444.
 - [7] Qiao L, Nishimura T, Shi L, et al. Endothelial fate mapping in mice with pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2014, 129(6): 692-703.
 - [8] Levy M, Bonnet D, Mauge L, et al. Circulating endothelial cells in refractory pulmonary hypertension in children: markers of treatment efficacy and clinical worsening [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65114.
 - [9] Lin CP, Lin FY, Huang PH, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 845037.
 - [10] Yang JX, Pan YY, Zhao YY, et al. Endothelial progenitor cell-based therapy for pulmonary arterial hypertension [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(8): 1325-1336.
 - [11] Diller GP, van Eijl S, Okonko DO, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2008, 117(23): 3020-3030.
 - [12] Junhui Z, Xingxiang W, Guosheng F, et al. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *Respir Med*, 2008, 102(7): 1073-1079.
 - [13] Marsboom G, Pokreisz P, Gheysens O, et al. Sustained endothelial progenitor cell dysfunction after chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 1017-1026.
- (收稿日期: 2014-06-17 修回日期: 2014-08-14)
-
- (上接第 4435 页)
- PLoS One, 2012, 7(3): 33241.
 - [3] Seyide S, Emin SM, Suzan O, et al. The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(1): 160-167.
 - [4] Schindler AE. Pathophysiology, diagnosis and treatment of endometriosis [J]. *Minerva Ginecol*, 2004, 56(5): e. 419-435.
 - [5] Sasagawa S, Shimizu Y, Kami H, et al. Dienogest is a selective progesterone receptor agonist in transactivation analysis with potent oral endometrial activity due to its efficient pharmacokinetic profile [J]. *Steroids*, 2008, 73(2): 222-231.
 - [6] Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, et al. Reprint of classification and pharmacology of progestins [J]. *Maturitas*, 2008, 61(1): 171-180.
 - [7] Harada T, Momoeda M, Taketani Y, et al. Dienogest is as effective as intranasal buserelin acetate for the relief of pain symptoms associated with endometriosis-a randomized, double-blind, multicenter, controlled trial [J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(3): 675-681.
 - [8] Momoeda M, Taketani Y. Randomized double-blind, multicentre, parallel-group dose-response study of dienogest in patients with endometriosis [J]. *Jpn Pharmacol Ther*, 2007, 35(7): 769-783.
 - [9] Szymanowski K. Apoptosis pattern in human endometrium in women with pelvic endometriosis [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006, 68(2): 343-350.
 - [10] Harada T, Taniguchi F, Izawa M, et al. Apoptosis and endometriosis [J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 3140-3151.
 - [11] Braun DP, Ding J, Shaheen F, et al. Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2007, 87(2): 263-268.
 - [12] 王芳, 何援利, 刘木彪. 核转录因子- κ B 在子宫内膜异位症中的表达及其意义 [J]. *诊断病理学杂志*, 2005, 12(2): 137-139.
- (收稿日期: 2014-03-11 修回日期: 2014-07-19)