

间歇低氧对大鼠肝脏 GSK-3 及 mTOR 表达的影响

任国梅 任寿安

【摘要】 目的 测定间歇低氧大鼠肝脏糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 的表达, 观察间歇低氧对胰岛素信号转导通路的影响。**方法** 将 24 只健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠按照随机数字表法分成间歇空气组 (NC 组)、间歇低氧 4 周组 (IH4 组)、间歇低氧 8 周组 (IH8 组), 每组 8 只。于上午 9:00 至下午 5:00 将 IH4 组及 IH8 组暴露于间歇低氧舱内, NC 组则给予间歇压缩空气。检测各组大鼠空腹血糖、空腹胰岛素 (FINS), 并以稳态模型评估-胰岛素敏感指数 (HOMA-IS) 及稳态模型评估-胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 评价胰岛素抵抗; 免疫组化法测定大鼠肝脏 GSK-3 及 mTOR 的表达, 以平均灰度值评价二者的蛋白表达量。**结果** 与 NC 组相比, IH4 组、IH8 组 HOMA-IS 降低, 空腹血糖、FINS、HOMA-IR 升高, 以 IH8 组更为显著 (F 值分别为 62.52, 100.37, 68.90, 85.49, P 均 <0.01); 与 NC 组相比, IH4 组、IH8 组 GSK-3 及 mTOR 蛋白表达均升高, 以 IH8 组更明显 (F 值分别为 72.25, 148.01, P 均 <0.01)。Pearson 相关分析显示 GSK-3、mTOR 平均灰度值与 HOMA-IS 呈正相关 ($r=0.786, 0.811, P$ 均 <0.01), 与 HOMA-IR 呈负相关 ($r=-0.882, -0.889, P$ 均 <0.01)。**结论** 间歇低氧暴露使大鼠肝脏 GSK-3、mTOR 表达增加, 从而引起胰岛素抵抗。

【关键词】 间歇低氧; 胰岛素抵抗; 糖原合成酶激酶-3; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

Effects of intermittent hypoxia on the expression of GSK-3 and mTOR in rat liver Ren Guomei, Ren Shouan. Department of Respiration, The First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Ren Shouan, Email: renshouan@163.com

【Abstract】 Objective To determine the expression of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in the liver of rats exposed to intermittent hypoxia, and to observe the effects of intermittent hypoxia on the insulin signaling pathway. **Methods** Twenty four healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups according to the random number table: intermittent air group (NC group), 4 weeks of intermittent hypoxia group (IH4 group) and 8 weeks of intermittent hypoxia group (IH8 group), with 8 rats in each group. Each day from 9:00 am to 5:00 pm, rats in NC group were housed in intermittent air cabin, while rats in IH4 group and IH8 group were housed in intermittent low oxygen cabin. Fasting blood glucose and fasting insulin (FINS) were tested. Homeostasis model assessment of insulin sensitive index (HOMA-IS) and homeostasis model assessment of insulin resistance index (HOMA-IR) were used to evaluate insulin resistance. The expression of hepatic GSK-3 and mTOR were determined by immunohistochemical method and the amount of protein expression was evaluated by average gray value. **Results** Compared with NC group, HOMA-IS was reduced and fasting blood glucose, FINS, HOMA-IR were elevated in IH4 group and IH8 group, but was more apparent in IH8 group (F values were 62.52, 100.375, 68.90, 85.49, all $P<0.01$). Compared with NC group, the expression of GSK-3 and mTOR protein were increased in IH4 group and IH8 group, especially in IH8 group (F values were 72.25, 148.01, all $P<0.01$). Pearson correlation analysis showed that the average gray values of GSK-3 and mTOR were positively correlated to HOMA-IS ($r=0.786, 0.811$, all $P<0.01$), and negatively correlated with HOMA-IR ($r=-0.882, -0.889$, all $P<0.01$). **Conclusions** Intermittent hypoxia increases the expression of GSK-3 and mTOR in the liver of rats, thus induces insulin resistance.

【Key words】 Intermittent hypoxia; Insulin resistance; Glycogen synthase kinase-3; Mammalian target of rapamycin

(Int J Endocrinol Metab, 2015, 35:77-80)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2015.02.002

基金项目: 山西科技研究基金资助项目 (2013011048-4)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第一医院呼吸科

通信作者: 任寿安, Email: renshouan@163.com

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(OSAHS)是一种以睡眠中频繁发生呼吸气流减少或中断为特征的睡眠呼吸障碍,可诱发严重的睡眠结构紊乱,造成全身多器官、多系统的损伤。OSAHS 并发糖尿病的关键在于胰岛素抵抗(IR),且 IR 随着 OSAHS 程度的加重而加重^[1]。间歇低氧是 OSAHS 最显著的特征,而间歇低氧可致 IR,具体机制尚待研究。胰岛素信号通路的信号减弱或通路受损是 IR 形成的必要条件,受体后缺陷是绝大多数 IR 的发生机制,磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (PKB/Akt)通路为胰岛素受体后主要的信号转导通路,该通路异常可致 IR^[2]。糖原合成酶激酶-3 (GSK-3)及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)为该通路重要的负反馈作用蛋白。本实验建立间歇低氧大鼠模型,模拟 OSAHS 患者的夜间低氧/复氧过程,并选择 GSK-3、mTOR 为研究靶点,探讨间歇低氧导致 IR 的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 24 只,平均体重(170±10)g,按照随机数字表法分为间歇空气组(NC 组)、间歇低氧 4 周组(IH4 组)、间歇低氧 8 周组(IH8 组),每组 8 只,标记。实验动物、饲料、垫料均由山西医科大学实验动物中心提供,饲养于山西医科大学第一医院呼吸科实验室。实验室许可证号:SYXK(晋)2009-0004;动物批号:SCXK(晋)2009-0001。动物分笼饲养,自由饮水,湿度(50±5)%,室温(23±2)℃。

1.2 间歇低氧大鼠模型制备 间歇低氧舱制备:体积 65 cm×45 cm×50 cm,厚 5 mm 的透明有机密封玻璃箱,舱盖密封,舱两侧各有 2 个出气孔以保持舱内气压恒定。由尼龙抗压力管连接氧气钢瓶、氮气钢瓶、单向电磁阀门(该控制系统由单片机编程序控制)及进气口。控制系统程序设定:先输氮气 45 s,使舱内氧浓度由 21%逐渐降至最低氧浓度 7%,持续 10 s 后再通氧气 45 s,使舱内浓度逐渐恢复至 21%后再持续 10 s,每个循环 110 s。舱内氧浓度由间歇低氧仪控制,同时由便携式测氧仪实时监控,由生石灰吸收舱内水分及 CO₂。暴露方案:将 IH4 组与 IH8 组大鼠每日上午 9:00 至下午 5:00(共 8 h)暴露于间歇低氧舱内;NC 组大鼠给予间歇压缩空气,其余条件同实验组。

1.3 标本采集 于第 4、8 周间歇低氧暴露结束后将 3 组大鼠称重、腹腔注射 10%水合氯醛麻醉、固定、暴露腹主动脉、采血、静置、高速离心,取上清液于-80℃超低温冰箱保存以备检测血清胰岛素。取

部分肝组织浸泡于 4%中性甲醛溶液,48 h 后石蜡包埋、切片、染色。

1.4 指标检测

1.4.1 生理生化指标 间歇低氧暴露结束后测定 3 组大鼠空腹血糖、空腹胰岛素(FINS)。取大鼠微量尾尖血滴于美国强生公司 AW06336402B 血糖仪配套试纸上,读取血糖值。采用 ¹²⁵I 胰岛素放射免疫分析药盒、全自动放射免疫分析仪检测血清胰岛素水平。计算稳态模型评估-胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)=(空腹血糖×FINS)/22.5,计算稳态模型评估-胰岛素敏感指数(HOMA-IS)=1/(空腹血糖×FINS)。

1.4.2 免疫组化法测定大鼠肝脏 GSK-3、mTOR 的表达 采用石蜡包埋切片,常规脱蜡,兔抗鼠 GSK-3 一抗稀释度为 1:100,兔抗鼠 mTOR 一抗稀释度为 1:150,加入一抗后 4℃过夜,孵育;生物素标记二抗,DAB 显色,封片,Olympus 显微镜下观察切片。用 PBS 代替一抗阴性对照,用已知阳性片作阳性对照,阳性染色为棕黄色。在光镜下(400×)对免疫组化切片采图,采用 Image-Pro Plus 图像分析系统进行灰度定量分析。

1.5 统计学处理 检测结果用 SPSS17.0 统计软件分析,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较用单因素方差分析,组间两两比较用最小显著性差(LSD)法,两变量间的相关分析用 Pearson 线性相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠空腹血糖、FINS、HOMA-IS、HOMA-IR 的结果 与 NC 组相比,IH4 组、IH8 组的空腹血糖、FINS 及 HOMA-IR 升高,ISI 降低,差异有统计学意义(P 均 <0.01),以 IH8 组更为显著($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组空腹血糖、FINS、HOMA-IS、HOMA-IR 结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	空腹血糖 (mmol/L)	FINS(mU/L)	HOMA-IS	HOMA-IR
NC 组	8	2.52 ± 0.37	2.60 ± 0.24	0.16 ± 0.04	0.29 ± 0.05
IH4 组	8	3.90 ± 0.13 ^a	3.49 ± 0.37 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.60 ± 0.07 ^a
IH8 组	8	4.70 ± 0.37 ^{ab}	4.75 ± 0.45 ^{ab}	0.04 ± 0.01 ^{ab}	1.00 ± 0.16 ^{ab}
F 值		100.37	68.90	62.52	85.49
P 值		0.001	0.000	0.001	0.005

注:与 NC 组相比,^a $P < 0.01$;与 IH4 组相比,^b $P < 0.01$;FINS:空腹胰岛素;HOMA-IS:稳态模型评估-胰岛素敏感指数;HOMA-IR:稳态模型评估-胰岛素抵抗指数;NC 组:间歇空气组;IH4 组:间歇低氧 4 周组;IH8 组:间歇低氧 8 周组

2.2 各组大鼠 GSK-3、mTOR 蛋白的表达 GSK-3 蛋白主要在大鼠肝细胞核内表达,核内呈棕黄色,而细胞质中也有少量散在分布的棕黄色颗粒表达;

mTOR 蛋白主要在大鼠肝细胞胞质中表达,胞质内棕黄色颗粒呈散在分布,细胞核内几乎没有表达。图像定量分析显示:与 NC 组相比,IH4 组和 IH8 组肝细胞中 GSK-3 蛋白、mTOR 平均灰度值降低,蛋白表达水平升高,差异均有显著性(P 均 <0.01),与 IH8 组相比,IH4 组表达亦升高,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 1(封 3),表 2。

表 2 各组 GSK-3 及 mTOR 蛋白平均灰度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	GSK-3 平均灰度值	mTOR 平均灰度值
NC 组	8	195.55 \pm 3.91	196.44 \pm 4.72
IH4 组	8	185.96 \pm 3.03 ^a	181.07 \pm 2.77 ^a
IH8 组	8	173.68 \pm 3.93 ^{ab}	162.30 \pm 4.18 ^{ab}
F 值		72.25	148.01
P 值		0.001	0.002

注:与 NC 组相比,^a $P<0.01$;与 IH4 组相比,^b $P<0.01$;GSK-3:糖原合成酶激酶-3;mTOR:哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;NC 组:间歇空气组;IH4 组:间歇低氧 4 周组;IH8 组:间歇低氧 8 周组

2.3 HOMA-IS、HOMA-IR 与 GSK-3 及 mTOR 相关性分析 GSK-3、mTOR 平均灰度值与 HOMA-IS 呈正相关($r=0.786, 0.811, P$ 均 <0.01),与 HOMA-IR 呈负相关($r=-0.882, -0.889, P$ 均 <0.01)。

3 讨论

OSAHS 与糖尿病及 IR 联系紧密,两者无论是在流行病学、发病机制还是临床方面均相关^[3]。OSAHS 患者存在 IR,并随 OSAHS 病情的加重更加明显,另外,IR 者 OSAHS 高发^[4]。OSAHS 反复出现的呼吸暂停和低通气可致一种特殊的缺氧状态,即低氧/复氧交替、低氧程度重、血氧变化大、机体难适应、发生频率高等特点的间歇低氧。与持续低氧明显不同的是间歇低氧存在低氧后复氧,复氧时产生大量的活性氧簇,引发细胞、分子损伤,临床表现为全身多系统损害,包括 IR 或糖尿病,但目前具体机制未明,其中包括影响胰岛素信号转导通路中多种蛋白激酶或磷酸酶活性,阻断胰岛素信号转导。Chen 等^[5]将雄性 Sprague-Dawley 大鼠分为正常对照组、间歇低氧组和持续低氧组,给予相应干预 40 d,用正常血糖高胰岛素钳夹技术检测胰岛素敏感性,结果显示与其他两组相比,间歇低氧组大鼠的外周血胰岛素水平较高,而葡萄糖注射速率明显降低。Polak 等^[6]将 C57BL/6J 小鼠分为正常对照组、间歇低氧组、间歇低氧-复氧组,结果显示间歇低氧组空腹血糖、FINS 水平及糖耐量高于正常对照组,间歇低氧降低了胰岛素敏感性,损伤了 β 细胞功能,升高了肝糖原含量及肝糖输出量。本实验发现间歇低氧暴露后实验组 HOMA-IS 降低,空腹血糖、FINS、HOMA-IR 升高,

以 IH8 组更显著,差异均有统计学意义,说明间歇低氧可致大鼠 IR,且 IR 程度随暴露时间延长而加重,这与上述实验结论相符。

IR 是糖尿病的始发因素,而肝 IR 是机体 IR 的核心,因为肝脏是物质代谢中心,是葡萄糖代谢及胰岛素作用的主要器官,也是人体胰岛素受体最密集的脏器之一,对胰岛素极为敏感。对小鼠而言,肝脏中的糖代谢对 IR 起更重要的作用^[7]。IR 本质即胰岛素信号转导缺陷,且以受体后的信号抑制最常见。PI3K/Akt 通路是胰岛素受体后信号转导的主要途径,该通路信号转导的减弱或中断是发生 IR 的主因。GSK-3 及 mTOR 均是该通路下游的效应蛋白,可负反馈调节该通路,参与了 IR 的发生、发展。

GSK-3 分为 GSK-3 α 和 GSK-3 β 两种亚型,其磷酸化水平影响自身活性,该激酶磷酸化后失活,去磷酸化后有活性,是调节糖原合成的关键酶。在胰岛素信号通路中,胰岛素信号磷酸化 GSK-3,使之失活,引起糖原合成酶去磷酸化,降低血糖。发生 IR 时,GSK-3 活性显著升高,再磷酸化肝糖原合成酶使之失活,抑制糖原合成及葡萄糖转运,升高血糖。MacAulay 等^[8]将禁食葡萄糖的小鼠 GSK-3 α 基因敲除后,肝糖原合成增多,肝脏胰岛素受体底物(IRS)-1 表达显著增加,胰岛素靶组织的葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性增强。Greene 等^[9]发现 GSK-3 β 通过提高 IRS-1、IRS-2 的丝/苏氨酸磷酸化水平抑制胰岛素受体对 IRS-1、IRS-2 的酪氨酸磷酸化,从而阻断胰岛素信号转导,引起 IR。这些研究均支持 GSK-3 为 PI3K/Akt 通路及糖原合成酶的负反馈调节因子。本实验显示,IH4 组及 IH8 组大鼠肝细胞 GSK-3 蛋白表达比 NC 组明显增加,且 IH8 组更为显著,表明间歇低氧条件下 GSK-3 在大鼠肝细胞中表达升高,暴露时间延长后表达更明显。相关性分析显示 GSK-3 蛋白平均灰度值与 HOMA-IS 呈正相关、与 HOMA-IR 呈负相关,说明间歇低氧使 GSK-3 蛋白表达增加、发生 IR,且随暴露时间延长 IR 程度加重。

mTOR 由 mTORC1 和 mTORC2 组成,前者位于 Akt 下游,能被磷酸化的 Akt 激活;而后者作为一种蛋白激酶-2,将 Akt 完全活化^[10]。胰岛素与其受体结合后启动 IRS-1 酪氨酸磷酸化,激活 PI3K 引起 PKB/Akt 磷酸化,再激活 mTOR 并磷酸化其下游底物,从而影响细胞的生长与代谢^[11-12]。mTOR 及其下游底物核糖体蛋白 S6 激酶 1 高度活化后可增加 IRS-1 的 636 和 639 位丝氨酸残基磷酸化及 IRS-1 降解和转

(下转第 87 页)

参 考 文 献

- [1] Jones TH. Effects of testosterone on type 2 diabetes and components of the metabolic syndrome [J]. *J Diabetes*, 2010, 2 (3): 146-156.
- [2] Corona G, Mannucci E, Petrone L, et al. Association of hypogonadism and type II diabetes in men attending an outpatient erectile dysfunction clinic [J]. *Int J Impot Res*, 2006, 18 (2): 190-197.
- [3] Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, et al. Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA, and ASA recommendations [J]. *J Androl*, 2009, 30 (1): 1-9.
- [4] Al HA, Khader YS, Jafar S, et al. Prevalence of low testosterone levels in men with type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study [J]. *J Family Community Med*, 2013, 20 (3): 179-186.
- [5] Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K. Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27 (5): 1036-1041.
- [6] Grossmann M. Low testosterone in men with type 2 diabetes: significance and treatment [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96 (8): 2341-2353.
- [7] Basaria S, Muller DC, Carducci MA, et al. Hyperglycemia and insulin resistance in men with prostate carcinoma who receive androgen-deprivation therapy [J]. *Cancer*, 2006, 106 (3): 581-588.
- [8] Kapoor D, Aldred H, Clark S, et al. Clinical and biochemical assessment of hypogonadism in men with type 2 diabetes: correlations with bioavailable testosterone and visceral adiposity [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30 (4): 911-917.
- [9] Abate N, Haffner SM, Garg A, et al. Sex steroid hormones, upper body obesity, and insulin resistance [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87 (10): 4522-4527.
- [10] Cohen PG. The hypogonadal-obesity cycle: role of aromatase in modulating the testosterone-estradiol shunt—a major factor in the genesis of morbid obesity [J]. *Med Hypotheses*, 1999, 52 (1): 49-51.

(收稿日期: 2014-09-18)

(上接第 79 页)

录抑制, 负反馈阻断 PI3K 通路, 引起 IR^[13]。发生 IR 时, 高度活化的 mTORC1 反馈抑制 PI3K 通路^[14]。最新研究表明通过负性调节 mTORC1, 可以抑制 IRS-1、阻断 PI3K 信号通路导致 IR, 且低氧条件下 mTOR 表达会增强^[15]。本实验发现与 NC 组相比, 间歇低氧环境下的 IH4 组、IH8 组 mTOR 蛋白在大鼠肝细胞胞质中的表达逐渐增加, 以 IH8 组增加明显。同时发现 mTOR 蛋白平均灰度值与 HOMA-IS 呈正相关、与 HOMA-IR 呈负相关, 同样也说明间歇低氧使增强 mTOR 的表达并导致 IR 发生, 且间歇低氧时间延长后 IR 程度加重。

综上所述, 间歇低氧通过各种可能的机制产生 IR 已得到共识, 而 PI3K/Akt 途径作为胰岛素主要信号转导通路在间歇低氧导致的 IR 中也发挥重要作用, 此途径中的两个负向调节因子 GSK-3、mTOR 升高均可引发 IR, 两者在 OSAHS 合并 2 型糖尿病发生、发展中发挥重要作用, 抑制其活性有望成为治疗 OSAHS 合并 2 型糖尿病的新靶点。

本文图 1 见封 3。

参 考 文 献

- [1] Reichmuth KJ, Austin D, Skatrud JB, et al. Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172 (12): 1590-1595.
- [2] 孙庆磊, 高宏凯, 张新国. 肝细胞胰岛素信号传导通路与胰岛素抵抗 [J]. *中国实用医药*, 2007, 2 (33): 182-184.
- [3] 何权瀛. 睡眠呼吸暂停与世界人口全因死亡率前 10 位疾病的关系 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2014, 13 (3): 225-228.
- [4] Tan BK, Heutling D, Chen J, et al. Metformin decreases the adipokine vaspin in overweight women with polycystic ovary syndrome concomitant with improvement in insulin sensitivity and a decrease in insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2008, 57 (6): 1501-1507.
- [5] Chen L, Cao ZL, Han F, et al. Chronic intermittent hypoxia from pedo-stage decreases glucose transporter 4 expression in adipose tissue and causes insulin resistance [J]. *Chin Med J*, 2010, 123 (4): 463-470.
- [6] Polak J, Shimoda LA, Drager LF, et al. Intermittent hypoxia impairs glucose homeostasis in C57BL/6J mice: partial improvement with cessation of the exposure [J]. *Sleep*, 2013, 36 (10): 1483-1490.
- [7] Bunner AE, Chandrasekera PC, Barnard ND. Knockout mouse models of insulin signaling: relevance past and future [J]. *World J diabetes*, 2014, 5 (2): 146-159.
- [8] MacAulay K, Dobel BW, Patel S, et al. Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism [J]. *Cell Metab*, 2007, 6 (4): 329-337.
- [9] Greene MW, Garofalo RS. Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) serine/threonine phosphorylation [J]. *Biochemistry*, 2002, 41 (22): 7082-7091.
- [10] Sudarsanam S, Johnson DE. Functional consequences of mTOR inhibition [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010, 13 (1): 31-40.
- [11] Soliman GA. The integral role of mTOR in lipid metabolism [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10 (6): 861-862.
- [12] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12 (1): 21-35.
- [13] Stadlbauer K, Brunmair B, Szöcs Z, et al. The effects of amino acids on glucose metabolism of isolated rat skeletal muscle are independent of insulin and the mTOR/S6K pathway [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297 (3): E785-E792.
- [14] Robinson KA, Buse MG. Mechanisms of high-glucose/insulin-mediated desensitization of acute insulin-stimulated glucose transport and Akt activation [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294 (5): 870-881.
- [15] Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeblerlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease [J]. *Nature*, 2013, 493 (7432): 338-345.

(收稿日期: 2014-12-08)