

4种急性经口毒性试验方法的比较研究

孙宇立, 董钺, 洪新宇, 帅怡, 肖萍

摘要: [目的] 通过比较4种急性经口毒性试验方法操作性和结果一致性, 分析其在化学品急性毒性评价中的应用价值及其意义。[方法] 对3种已知化学物(对苯二胺、对苯二酚、硼酸)分别使用固定剂量法(FDP)、上下增减剂量法(UDP)、急性毒性分类法(ATC)3种替代方法与传统霍恩氏(Horn's)法进行大鼠急性经口毒性试验。比较各方法判断化学物毒性分类的一致性; 并对动物使用、剂量选择、观察指标进行综合分析。[结果] 3种化学物分别用4种方法测定得到的全球化学品统一分类和标签系统(GHS)分类结果一致。3种替代方法均采用序贯原则, 使用实验动物数量较少, 但实验周期更长。FDP法和ATC法不以获得精确半数致死量(LD₅₀)为研究目标, 即不以动物死亡作为最终结果判定标准, 降低了实验动物的死亡率, 提高了动物福利。UDP法与Horn's法很相似, 系列剂量都有相对固定的剂量级数因子, 都以动物死亡为重要的结果判断指标, 都能获得确切的LD₅₀值及其95%CI; 但UDP更适合染毒后短期(48h内)死亡的急性毒性评价。[结论] 可根据受试物的性质和已知资料, 选择合适的急性经口毒性替代方法代替传统Horn's法。

关键词: 急性经口毒性; 固定剂量法; 急性毒性分类法; 上下增减剂量法; GHS分类

Comparison Study on Four Acute Oral Toxicity Testing Methods SUN Yu-li, DONG Cheng, HONG Xin-yu, SHUAI Yi, XIAO Ping (Department of Toxicology Assessment, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China). Address correspondence to XIAO Ping, E-mail: xiaoping@scdc.sh.cn · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To evaluate the operability and results consistency among four acute oral toxicity testing methods and analyze the application value of these methods to acute oral toxicity assessment. [Methods] Traditional Horn's procedure and three alternative methods including fixed dose procedure (FDP), up-and-down procedure (UDP), and acute toxic class method (ATC) were applied to assess the acute oral toxicity of selected chemicals of *P*-phenylenediamine, hydroquinone, and boracic acid to rats. The consistency of results, manipulation of experimental animal, dose selection, and observed indicators were compared among these four procedures. [Results] The Globally Harmonized System (GHS) grades of the three alternative methods are consistent with those of Horn's. The three alternative methods with sequential principle used less experimental animals but required a longer testing period. FDP and ATC methods did not provide accurate LD₅₀ values and not take animal death as final result judgment standards; therefore, the two methods reduced the mortality rate of experimental animals and improved animal welfare. UDP was similar with Horn's method in terms of relatively fixed dose progression factor, taking animal death as an important result judgment indicator, and providing exact LD₅₀ values and corresponding confidence intervals, but UDP was more suitable for the evaluation of acute toxicity resulting in death within 48 h after exposure. [Conclusion] According to the properties and available data of test substances, we could adopt appropriate alternative method to replace Horn's method for acute oral toxicity assessment.

Key Words: acute oral toxicity test; fixed dose procedure; acute toxic class method; up-and-down procedure; Globally Harmonized System classification

随着科技的发展, 新化学物质层出不穷; 同时, 人们对健康的关注程度与日俱增, 化学物质的毒性检测需求也随之增加。急性经口毒性试验是毒理学安全性评价中最基础的实验项目和评价指标, 随着需要检测的样品数量增加, 实验动物使用量也在逐年增长。

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.15265

[作者简介] 孙宇立(1979—), 女, 硕士, 主管医师; 研究方向: 毒理学和功能性安全性评价; E-mail: sunyuli@scdc.sh.cn

[通信作者] 肖萍, E-mail: xiaoping@scdc.sh.cn

[作者单位] 上海市疾病预防控制中心毒性评价科, 上海 200336

依据实验动物福利(3R原则), 要求尽可能地减少实验动物的使用数量。如何在不影响实验准确性的同时减少实验动物的使用成为关注重点^[1]。

固定剂量法(fixed dose procedure, FDP)、上下增减剂量法(up-and-down procedure, UDP)、急性毒性分类法(acute toxic class method, ATC)是国内外均已普遍认可的3种急性经口毒性试验替代方法^[2-4], 但是在实际工作中这些方法运用得不多, 而且对于如何选择合适的替代方法、合理的实验设计, 目前仍存在

许多困惑。本研究运用此3种替代方法和传统霍恩氏(Horn's)法分别对已知的3种化学物开展急性经口毒性试验,旨在分析、比较急性经口毒性试验替代方法与传统方法试验结果的一致性及方法的操作性,推动替代方法的开展。

1 材料与方法

1.1 受试物

3种受试物对苯二胺、对苯二酚和硼酸均购自美国Sigma公司,其提供的物质安全数据表(MSDS)提示:对苯二胺的半数致死量(LD_{50})为80 mg/kg,全球化学品统一分类和标签系统(GHS)类别3;对苯二酚的 LD_{50} 值为367.3 mg/kg, GHS类别4;硼酸的 LD_{50} 值为2660 mg/kg, GHS类别5。

1.2 实验动物

SD大鼠, SPF级, 体重180~220 g, 由上海西普尔-比凯实验动物有限公司提供。动物许可证号: SCXK(沪)2008-0016。饲养室温度20~25℃, 相对湿度40%~70%, 在整个试验期间动物自由进食饮水。

1.3 试验方法

1.3.1 FDP 参照 OECD TG420(2011.12.17)进行^[2]。

预试验:根据3种物质的MSDS提示和FDP方法的剂量选择原则,设对苯二胺和对苯二酚的起始剂量为300 mg/kg, 硼酸起始剂量为2000 mg/kg。每个剂量染毒1只动物,根据动物24 h的中毒反应及死亡情况,上下调整后续剂量,直到确定某一剂量引起动物非死亡的明显严重中毒体征。用此剂量进行正式试验。将预试验的观察结果合并入正式试验一起判断受试物的毒性范围。

1.3.2 ATC 按照 OECD TG423(2011.12.17)进行^[3]。

根据3种物质的MSDS提示、ATC方法的剂量选择原则,设对苯二胺的起始剂量为300 mg/kg, 对苯二酚和硼酸的起始剂量为2000 mg/kg。每个剂量染毒3只单一性别动物,根据动物48 h的死亡(或濒死)情况,决定是否调整后续试验剂量。每个剂量染毒最多不超过6只动物。

1.3.3 UDP 按照 OECD TG425(2008.10.3)进行^[4]。

根据3种物质的MSDS提示和UDP方法的剂量选择原则,设对苯二胺和对苯二酚的起始剂量为175 mg/kg, 硼酸的起始剂量为2000 mg/kg。每次染毒1只动物,根据动物48 h的死亡情况,上下调整下一试验剂量(使用默认的剂量级数因子为3.2)。

当符合以下停止条件之一时,可以结束试验:①在上限剂量时有连续3只或3只以上动物存活。②直到连续测试的任意6只动物中出现5次死亡情况的逆转现象。

根据 OECD 提供的软件包 AOT 425 Stat Pgm 计算得 LD_{50} 值和95%可信区间(95%CI)。

1.3.4 Horn's 法 参照 OECD TG401(1987.2.24)进行^[5]。

3个受试物均以2.15倍作为组距进行设计,每个受试物均设4个剂量组,每个剂量组选用10只大鼠,雌雄各半。根据MSDS和其他试验结果,剂量设计如下:对苯二胺选择剂量46.4、100、215、464 mg/kg;对苯二酚选择剂量215、464、1000、2150 mg/kg;硼酸选择剂量2150、4640、10000、21500 mg/kg。根据动物的死亡情况,查Horn's表得 LD_{50} 值和95%可信区间。

1.4 急性经口毒性分级评判

依据GHS急性经口毒性分级原则,对各受试物的毒性进行GHS分类^[6]。根据 LD_{50} 值分为5个GHS类别, $LD_{50} \leq 5$ mg/kg为类别1, $5 < LD_{50} \leq 50$ mg/kg为类别2, $50 < LD_{50} \leq 300$ mg/kg为类别3, $300 < LD_{50} \leq 2000$ mg/kg为类别4, $LD_{50} > 2000$ mg/kg为类别5。

2 结果

2.1 4种方法测定化学物急性经口毒性分级

2.1.1 FDP 对苯二胺在300 mg/kg剂量动物死亡,50 mg/kg剂量动物未见严重毒性反应,200 mg/kg剂量动物出现严重中毒反应,主要表现为竖毛、呼吸困难、活动减少。对苯二酚在300 mg/kg剂量动物未见严重毒性反应,2000 mg/kg剂量动物死亡,800 mg/kg剂量动物出现严重中毒反应,主要表现为竖毛、粪便稀烂、震颤、活动减少。硼酸在2000 mg/kg剂量动物未见明显毒性反应。剂量选择过程、观察指标分析及结果见表1。

表1 FDP试验结果

受试物	剂量 (mg/kg)	临床观察	是否进行下一个剂量实验	动物 编号	GHS 分类
对苯二胺	预试验	300 死亡	是	1	类别3
		50 未见严重中毒反应	是	2	
		200 出现严重中毒反应	否	3	
	正式试验	200 出现严重中毒反应	否	4~7	
对苯二酚	预试验	300 未见严重中毒反应	是	1	类别4
		2000 死亡	是	2	
		800 出现严重中毒反应	否	3	
	正式试验	800 出现严重中毒反应	否	4~7	
硼酸	预试验	2000 未见明显中毒反应	否	1	类别5
	正式试验	2000 未见明显中毒反应	否	2~5	

2.1.2 ATC 对苯二胺在 300 mg/kg 剂量 3 只动物均在 1 h 内死亡, 50 mg/kg 剂量动物均未见死亡或濒死。对苯二酚在 2 000 mg/kg 剂量 3 只动物均在 30 min 内死亡, 300 mg/kg 剂量动物均未见死亡或濒死。硼酸在 2 000 mg/kg 剂量动物均未见死亡或濒死。剂量选择过程、观察指标分析及结果见表 2。

表 2 ATC 试验结果

受试物	剂量 (mg/kg)	LD ₅₀ 区间 (mg/kg)	动物数量 (只)	动物 性别	死亡数 (只)	GHS 分类
对苯二胺	300	50~200	3	♀	3	类别 3
	50		3	♀	0	
	50		3	♂	0	
对苯二酚	2 000	300~500	3	♀	3	类别 4
	300		3	♀	0	
	300		3	♂	0	
硼酸	2 000	2 500~5 000	3	♀	0	类别 5
	2 000		3	♂	0	

2.1.3 UDP 对苯二胺经过 6 次剂量选择, 直至出现 5 次死亡情况逆转。对苯二酚经过 7 次剂量选择, 直至出现 5 次死亡情况逆转。硼酸采用 2 000 mg/kg 限量试验, 5 只动物均未见死亡。剂量选择过程、观察指标分析及结果见表 3。

表 3 UDP 试验结果

受试物	剂量 (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)	95%CI	动物 编号	48 h 死亡 情况	14 d 死亡 情况	GHS 分类
对苯二胺	175	175	0~481	1	否	否	类别 3
	550			2	是	是	
	175			3	否	否	
	550			4	是	是	
	175			5	否	是	
	550			6	是	是	
对苯二酚	175	1 098	550~2 000	1	否	否	类别 4
	550			2	否	否	
	2 000			3	是	是	
	550			4	否	否	
	2 000			5	是	是	
	550			6	否	否	
硼酸	2 000	>2 000	—	7	是	是	类别 5
	2 000			1	否	否	
	2 000			2	否	否	
	2 000			3	否	否	
	2 000			4	否	否	
	2 000			5	否	否	

2.1.4 Horn’s 法 根据各剂量下动物在观察期 14 d 内的死亡情况(表 4), 查找 Horn’s 表得 LD₅₀ 值及其 95%CI。

表 4 Horn’s 试验结果

受试物	剂量 (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)	95%CI	动物数量 (只)	动物 性别	14 d 内死亡 数量(只)	GHS 分类
对苯二胺	46.4	200	137~291	5	♀	0	类别 3
	100.0			5		0	
	215.0			5		3	
	464.0			5		5	
	46.4	126	77.5~205	5	♂	0	类别 3
	100.0			5		2	
	215.0			5		4	
对苯二酚	464.0	501	344~730	5		5	类别 3
	215.0			5		5	
	1 000.0			5		5	
	2 150.0			5		5	
	215.0	501	344~730	5	♂	0	类别 4
	464.0			5		2	
	1 000.0			5		5	
硼酸	2 150.0	5 010	3 440~7 300	5		5	类别 4
	215.0			5		5	
	4 640.0			5		2	
	10 000.0			5		5	
	2 500.0	5 010	3 440~7 300	5		5	类别 5
	2 150.0			5	♂	0	
	4 640.0			5		2	
	10 000.0			5		5	
	21 500.0			5		5	

2.1.5 4 种方法的检测结果比较 4 种方法检测所得的 3 个受试物 GHS 分类一致。FDP 无法得到 LD₅₀ 具体数值, 只能根据测试剂量和观察结果, 查流程表得到 GHS 分类。ATC 亦是根据测试剂量和观察结果, 查流程表得到 GHS 分类及 LD₅₀ 值区间, 3 个受试物的 LD₅₀ 值区间与 Horn’s 法所得的 LD₅₀ 值(95%CI)均有重叠。UDP 方法能根据剂量和动物死亡数, 用软件计算出 LD₅₀ 值及其 95%CI, 从而得到 GHS 分类。对苯二胺和硼酸用 UDP 方法所得 LD₅₀ 值与 Horn’s 法(雌性)LD₅₀ 值基本吻合; 对苯二酚用 UDP 方法与 Horn’s 法(雌性)所得 LD₅₀ 值虽相差较大, 但是 95%CI 有交集, 认为可能是动物个体差异引起。

2.2 操作性比较

2.2.1 动物使用的比较 3 种替代方法的动物使用量明显少于 Horn’s 法(表 5); Horn’s 法使用的动物雌雄各半, 而 3 种替代方法原则上仅使用雌性动物, 因为通常认为雌性动物较雄性动物更敏感^[7]。

表 5 4 种方法使用动物的数量(只)

受试物	FDP	ATC	UDP	Horn’s
对苯二胺	7	9	6	40
对苯二酚	7	9	7	40
硼酸	5	6	5	40

2.2.2 试验步骤的比较 FDP、ATC、UDP 3 种方法采用的均是序贯原则,即每个剂量用少量动物(FDP 和 UDP 是每个剂量使用 1 只动物,ATC 每个剂量用 3 只动物);FDP 观察 24h 后,ATC 和 UDP 观察 24~48h 后,决定是否需要选择其他剂量进行试验。而 Horn's 法选定的 4 个剂量同时给样。FDP、ATC、UDP 3 种方法的试验周期明显长于 Horn's 法。见表 6。

表 6 4 种方法的试验步骤

受试物	FDP		ATC		UDP		Horn's	
	试验 步骤数	时间* (d)	试验 步骤数	时间* (d)	试验 步骤数	时间* (d)	试验 步骤数	时间* (d)
对苯二胺	3	6	3	7	5	13	1	0
对苯二酚	3	6	3	7	5	15	1	0
硼酸	2	4	3	5	5	11	1	0

[注]*: 剂量选择时间,从第一次上样起,至决定不再选择其他剂量;不包括观察时间。

2.2.3 指标观察的比较 FDP 方法是以非死亡的明显中毒体征作为重要的观察和判定指标,动物死亡仅作为剂量选择的指标,动物的死亡数及死亡率较低。ATC 方法是以动物是否死亡作为剂量选择的指标,获得的 LD₅₀ 是个范围,动物死亡率也较少。UDP 方法是以动物死亡作为剂量选择和结果分析的主要指标,根据剂量和动物死亡情况,由软件计算确切 LD₅₀ 值,该方法中的动物死亡率较大,接近 Horn's 法。见表 7。

表 7 4 种方法动物死亡情况

受试物	FDP		ATC		UDP		Horn's	
	动物 死亡数	死亡率 (%)	动物 死亡数	死亡率 (%)	动物 死亡数	死亡率 (%)	动物 死亡数	死亡率 (%)
对苯二胺	1	14.3	3	33.3	4	66.7	19	47.5
对苯二酚	1	14.3	3	33.3	3	42.8	24	60.0
硼酸	0	0.0	0	0	0	0.0	24	60.0

3 讨论

急性经口毒性试验是检测和评价化学物毒性作用最基本的方法之一,该试验可提供在短期内经口接触受试物所产生的健康危害信息。LD₅₀ 值是描述急性经口毒性的经典指标,也是急性毒性分类管理的一个重要参数。有很多 LD₅₀ 值的经典计算方法,如 Bliss 法、概率法、寇氏法等。其中 Horn's 法,因其可根据动物死亡情况直接查表求出 LD₅₀ 值及其 95%CI,使用甚为方便,作为经典的方法至今仍广泛使用^[8-11]。但是传统的急性经口毒性试验是以动物死亡作为终极判断指标,试验动物的用量大,与现在动物保护的“3R

原则”严重冲突,近年来饱受诟病。GHS 是对化学品健康危害的全球统一分类制度,是目前公认的管理基础,其并不要求 LD₅₀ 的确切数值。急性经口毒性替代方法产生并迅速发展起来。其中 FDP、UDP 和 ATC 3 种替代方法经国际验证研究已被普遍采纳^[6-7, 12-15]。

本文分别通过实验动物使用数量及性别、试验周期、LD₅₀ 值、GHS 分类及动物死亡情况等对 FDP、ATC、UDP 和 Horn's 法进行了比较,认为这 3 种替代方法均采用序贯原则,每个剂量仅对少数动物进行试验,根据该剂量下动物的反应(是否死亡,有无明显中毒症状)判断是否需要调整剂量进行进一步检测,减少了实验动物的使用数量。FDP 法和 ATC 法不以获得精确 LD₅₀ 值为研究目标,即不以动物死亡作为最终判定标准,降低了实验动物的死亡率,提高了动物福利。但是也是因为序贯原则,替代方法的实验周期相对传统的方法长一些,不适合用在处理突发应急事件;而且每个剂量仅用少量动物实验,这样动物的个体差异对实验结果的影响较大,可能会导致结果的重现性不佳。在试验操作上,替代方法多以严重中毒症状作为实验终点,相较于 Horn's 法的死亡为终点,对实验人员的要求更高,不同实验人员之间所得的结果往往会不同,替代方法的结果重现性较差。

对于硼酸这样的急性经口毒性较低的化学物,若用传统的 Horn's 法,不仅动物使用量大、动物死亡率高,且为求出 LD₅₀,采用的剂量相当高,是低效的、耗能的。而在替代方法中采用了起始剂量为 2 000 mg/kg 的限量,不仅动物使用少,没有动物死亡,且实验步骤少,是高效的、节能的。

Horn's 法采用的是动物雌雄各半进行实验,可能得出雌雄动物不同的 LD₅₀ 值及分级,如本次实验对苯二胺, Horn's 法发现其雌、雄大鼠的 LD₅₀ 值不同。虽然已有大量的实验数据证明,雌性动物的急性经口毒性反应较雄性动物更敏感,替代方法为了减少动物的使用,都使用单一性别动物,推荐使用雌性(未受孕)动物^[16]。这样,对未知的化学物质,替代方法有可能造成性别偏倚。本次研究中,对 ATC 法进行了改良:在某一剂量的 3 只雌鼠均没有死亡的情况下,需用同一剂量对 3 只鼠进行验证时,选用 3 只雄鼠进行测试,目的是尽量减少性别误差。

UDP 法与 Horn's 法很相似,系列剂量都有相对固定的剂量级数因子,都以动物死亡为重要的观察指标,都能获得确切的 LD₅₀ 值及其 95%CI。但是,UDP

法在剂量选择过程中,某一剂量的指标观察时间为24~48 h,以决定是否需要调整剂量。AOT 425软件计算时,根据48 h内动物死亡数量和相应剂量计算出精确LD₅₀值及其95%CI;而48 h~14 d的死亡情况不予统计分析。若动物出现慢性死亡,即在48 h后、14 d观察期内死亡,如UDP方法测定对苯二胺时,5号动物在175 mg/kg剂量下,48 h内未死亡,14 d内死亡,这是不被计算的。而Horn's法是4个剂量同时给样,同时观察14 d,这段时间里的任何死亡都纳入计算。因此认为UDP更适合那些染毒后短期(48 h内)死亡的急性毒性评价。对于引起动物慢性死亡的化学物,可以考虑用OECD推荐的其他替代方法,如FDP法和ATC法。

本实验所使用的受试物均为单一物质,可以通过文献查阅得到该物质的LD₅₀值作为剂量设计参考。但在实际工作中检测的大多数物质可能都是混合物,没有相关的资料可供参考,通过替代方法得到可靠的LD₅₀值不太现实,而且目前我国多数标准在急性经口毒性试验中都要求结果以LD₅₀表示,如GB 15670—1995《农药登记毒理学试验方法》^[10],要扩大替代试验的使用范围就需要对目前的国标进行修改,如2013年《化学品测试方法 健康效应卷》(第2版)就没有LD₅₀划分要求,是参照GHS分类。

虽然替代试验在我国大范围开展还存在很多阻碍和困难,但通过不断的探索和对制度标准的改进,依然可以在不久的将来使用更加符合动物福利要求,可操作性更强的急性毒性经口试验替代方法^[17-18]。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 恽时锋,田小芸,郭联庆,等.维护实验动物福利促进生命科学发展[J].医学研究生学报,2009,22(8): 858-861.
- [2] OECD/OCDE. OECD guideline for the testing of chemicals. Acute oral toxicity: fixed dose procedure[S]. OECD iLibrary, 2001.
- [3] OECD/OCDE. OECD guideline for the testing of chemicals Test No.420: Acute oral toxicity: acute toxic class method[S]. OECD iLibrary, 2001.
- [4] OECD/OCDE. OECD guideline for the testing of chemicals. Acute oral toxicity: up-and-down-procedure[S]. OECD iLibrary, 2008.
- [5] OECD/OCDE. OECD guideline for the testing of chemicals. Acute oral toxicity[S]. OECD iLibrary, 1987.
- [6] Winder C, Azzi R, Wagner D. The development of the globally harmonized system (GHS) of classification and labelling of hazardous chemicals[J]. J Hazard Mater, 2005, 125(1/3): 29-44.
- [7] Rispin A, Farrar D, Margosches E, et al. Alternative methods for the median lethal dose LD₅₀ test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity[J]. ILAR J, 2002, 43(4): 233-243.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 21603—2008 化学品 急性经口毒性试验方法[S].北京: 中国标准出版社, 2008.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 化学品毒性鉴定技术规范卫监督发〔2005〕272号[EB/OL]. (2005-07-11). [2014-12-31]. <http://www.moh.gov.cn/zhjcj/s7885/200804/db2728e69a9845668bd29c4a54bac6f6.shtml>.
- [10] 中华人民共和国农业部. GB 15670—1995《农药登记毒理学试验方法》[S].北京: 中国标准出版社, 1996.
- [11] 中华人民共和国环保部. 化学品测试方法 健康效应卷[M]. 2版.北京: 中国环境出版社, 2013.
- [12] Stallard N, Whitehead A. A statistical evaluation of the fixed dose procedure[J]. Altern Lab Anim, 2004, 32(Suppl 2): 13-21.
- [13] Diener W, Siccha L, Mischke U, et al. The biometric evaluation of the acute-toxic-class method (oral)[J]. Arch Toxicol, 1994, 68(10): 599-610.
- [14] 张林媛,孙金秀.上下增减剂量法与Horn's法测定LD₅₀的研究[J].卫生毒理学杂志, 2003, 17(4): 234-236.
- [15] 肖经纬,崔涛,孟会林,等.3种急性经口毒性试验方法的比较[J].毒理学杂志, 2007, 21(2): 135-136.
- [16] 胡启之. GHS与急性毒性试验单性别动物的选用[J].毒理学杂志, 2008, 22(4): 297-298.
- [17] Walum E. Acute oral toxicity[J]. Environ Health Perspect, 1998, 106(Suppl 2): 497-503.
- [18] Botham PA. Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies[J]. Toxicol In Vitro, 2004, 18(2): 227-230.

(收稿日期: 2015-04-03)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 张晶; 校对: 丁瑾瑜)