

· 论 著 ·

子宫内 B[a]P 暴露与子代鼠 BPDE-DNA 加合物及胰腺功能损伤的关系

崔蓉¹, 郑玉建², 鲁英³, 夏力旦·阿力甫²

1.新疆医科大学护理学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2.新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3.海南医学院, 海南 海口 570216

摘要: **目的** 了解子宫内苯并[a]芘(B[a]P)暴露子代鼠体内二氢二醇环氧苯并[a]芘(BPDE)-DNA加合物水平, 以及对胰腺功能损伤和糖代谢的影响。**方法** 40只母鼠随机分为空白对照组、标准剂量组[2 μg/(kg·d)]、低剂量组[200 μg/(kg·d)]、中剂量组[800 μg/(kg·d)]和高剂量组[1 600 μg/(kg·d)], 每组8只。孕1 d起各剂量组采用B[a]P玉米油混合物0.2 mL/100 g体重灌胃, 空白对照组采用相同剂量玉米油灌胃, 至产后21 d。分析各组子代鼠2 d、21 d、12周BPDE-DNA加合物水平和胰腺发育情况; 采用Spearman秩相关分析子代鼠胰体比与B[a]P暴露剂量的相关性; 采用葡萄糖耐量(GTT)和胰岛素耐量(ITT)试验分析各组12个月子代鼠糖代谢差异。**结果** 各组母鼠和子代鼠外观均无异常, 活动、饮食、饮水和精神状况无差异, 无实验动物死亡、流产和早产。2 d子代鼠BPDE-DNA加合物水平最高, $M(Q_R)$ 为1 089.60(586.10)~1 405.49(346.47) pg/mL; 12周子代鼠未检出BPDE-DNA加合物。2 d($r_s=-0.620, P=0.001$)和21 d($r_s=-0.801, P=0.001$)子代鼠胰体比与B[a]P暴露剂量呈负相关。2 d子代鼠胰腺发育不全, 组织松散; 12周子代鼠胰腺发育良好, 外分泌部紧实。GTT试验结果显示, 腹腔注射葡萄糖后, 各组子代鼠GLU先上升, 30 min后呈下降趋势($F=365.578, P<0.001$); ITT试验结果显示, 腹腔注射胰岛素后, 各组子代鼠GLU均呈下降趋势($F=461.215, P<0.001$)。**结论** 子代鼠BPDE-DNA加合物水平均随B[a]P暴露剂量的增加而升高; 12个月后发现胰岛素抵抗和糖耐量受损。子宫内B[a]P暴露会影响子代鼠胰腺发育, 导致子代鼠成年后糖代谢异常。

关键词: 苯并[a]芘; 二氢二醇环氧苯并[a]芘; DNA加合物; 胰腺功能; 糖代谢

中图分类号: R322.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087(2022)04-0335-06

Association of intrauterine benzo[a]pyrene exposure with benzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels and pancreatic functional impairment in offspring rats

CUI Rong¹, ZHENG Yujian², LU Ying³, Xialidan Alifu²

1.School of Nursing, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 2.Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 3.Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570216, China

Abstract: Objective To investigate the benzo[a]pyrene (B[a]P) diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in offspring rats with intrauterine exposure to B[a]P, and examine the effects of BPDE-DNA adduct levels on pancreatic functional impairment and glucose metabolism in offspring rats. **Methods** Forty pregnant rats were randomly divided into the blank control group, standard-dose group, low-dose group, medium-dose group and high-dose group (daily dose of 0, 2, 200, 800, 1 600 μg/kg B[a]P, respectively), of 8 animals in each group. Rats in the B[a]P treatment groups were administered by oral gavage with a mixture of B[a]P and corn oil at a dose of 0.2 mL/100 g body weight since day 1 of preg-

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2022.04.003

基金项目: 国家自然科学基金(81960580); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2021D01C244)

作者简介: 崔蓉, 博士在读, 讲师, 主要从事公共卫生和儿科护理教育工作

通信作者: 鲁英, E-mail: 316139862@qq.com

nancy until 21 days after delivery, while rats in the blank control group were given the same volume of coin oil by oral gavage. The BPDE-DNA adduct levels were measured and the pancreatic development was observed in the offspring rats 2 and 21 days and 12 weeks after birth, and the correlation between pancreas volume index and dose of exposure to B[a]P was examined using Spearman's rank correlation analysis. In addition, glucose metabolism was measured in offspring rats 12 months after birth using glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT). **Results** There was no abnormal appearance, death, abortion or preterm birth in pregnant or offspring rats in the five groups, and no significant differences were seen in activity, diet, drinking water or mental status in rats. The greatest level of BPDE-DNA adducts was measured in offspring rats 2 days after birth, with median levels (interquartile range) of 1 089.60 (586.10) to 1 405.49 (346.47) pg/mL, and no BPDE-DNA adducts were found in offspring rats 12 weeks after birth. The pancreas volume index correlated negatively with the dose of exposure to B[a]P in offspring rats 2 ($r_s = -0.620, P=0.001$) and 21 days after birth ($r_s = -0.801, P=0.001$). Hypoplasia of pancreas with loose tissues was seen in offspring rats 2 days after birth, while well pancreatic development was found in offspring rats 12 weeks after birth, with tight exocrine portion. GTT showed an increase in glucose levels in offspring rats in all five groups following abdominal injection of glucose and declined 30 min post-injection ($F=365.578, P<0.001$), and ITT showed a tendency towards a decline in glucose levels in offspring rats in all five groups ($F=461.215, P<0.001$). **Conclusions** The levels of BPDE-DNA adducts in offspring rats increase with the dose of intrauterine B[a]P exposure, and insulin resistance and impaired glucose tolerance occur 12 months post-exposure to B[a]P. Intrauterine B[a]P exposure affects pancreatic development in offspring rats and causes abnormal glucose metabolism in adult offspring rats.

Keywords: benzo[a]pyrene; benzo[a]pyrene diol epoxide; DNA adduct; pancreatic function; glucose metabolism

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 广泛存在于环境中, 是具有致癌、致畸、致突变作用的持久性有机污染物^[1]。苯并[a]芘 (benzo[a]pyrene, B[a]P) 是环境 PAHs 化合物中占比最多, 危害最大的一类化合物^[2]。哺乳动物孕期和哺乳期 B[a]P 暴露, 可能干扰胎子宫内生长, 导致子代器官功能损伤, 增加成年后代谢性疾病发病甚至癌变风险^[3-4]。如 B[a]P 可影响胰腺发育, 胰腺功能损伤无法补偿胰岛素抵抗引起的胰岛素需求增加, 可能导致 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 和胰腺癌的发生风险升高^[5-6]。B[a]P 在多种代谢酶的作用下, 最终生成致癌物二氢二醇环氧苯并[a]芘 (benzo[a]pyrene diol epoxide, BPDE)^[7], 进一步与 DNA 亲核位点鸟嘌呤的外环胺基端共价结合, 形成 BPDE-DNA 加合物, 引起 DNA 氧化损伤, 导致遗传信息改变和成年后代谢障碍^[8-9]。本研究通过建立孕期和哺乳期大鼠 B[a]P 亚急性暴露模型, 观察子代鼠 BPDE-DNA 加合物水平及其对胰腺功能和糖代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 580 血糖仪 (江苏鱼跃医疗设备股份有限公司); 全自动石蜡包埋机、石蜡切片机、LeicaDM300 显微镜 (德国 Leica 公司)。纯度为 99.0% 的 B[a]P (德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司); 4% 多聚甲醛 (biosharp 生物); 玉米油 (中粮集团);

大鼠 BPDE-DNA 酶联免疫吸附试验检测试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司)。

1.2 实验动物 SPF 级健康未孕 90 日龄 Wistar 雌性大鼠 40 只, 体重 230~260 g, 购于新疆医科大学医学实验动物中心, 许可证号: SCXK (新)-2018-0002。本研究通过新疆医科大学动物实验中心管理和使用伦理委员会审查, 审批号: 20190226-30。

1.3 方法

1.3.1 动物模型制备 雌性大鼠适应性饲养 1 周, 将发情前期或发情期的雌性大鼠与雄性大鼠按 2:1 合笼过夜交配, 次日观察阴栓和阴道涂片, 发现精子即为受精, 记为孕 0 d。依据 GB 3095—2012《环境空气质量标准》^[10] 和美国环境保护署公布的 B[a]P 致癌风险水平^[11], 母鼠按体重随机分为空白对照组、标准剂量组、低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组 8 只, B[a]P 剂量依次为 0、2、200、800、1 600 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。

孕 1 d 起, 各剂量组母鼠采用 B[a]P 玉米油混合物 0.2 mL/100 g 体重灌胃, 空白对照组采用相同剂量玉米油灌胃, 至产后 21 d 子代鼠断乳分离、饮水自由。剔除产仔 <8 只或 >12 只的母鼠及其子代鼠。各组子代鼠按性别分笼, 每笼包含同组不同窝的同性别子代鼠。

1.3.2 一般情况观察 观察各组母鼠和子代鼠的毛色、食欲、运动和精神状况。记录产子数量、子代鼠性别、流产和死亡情况。

1.3.3 血清 BPDE-DNA 加合物检测 每组随机选取产后 21 d 母鼠 8 只, 出生 2 d (新生)、21 d (断乳) 和 12 周 (成年) 的子代鼠各 8 只 (雌、雄各半), 腹腔注射戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉后腹主动脉采血 (2 d 子代鼠心脏采血), 2 000×g 离心 20 min, 分离血清, 采用酶联免疫吸附试验检测血清 BPDE-DNA 加合物。

1.3.4 胰腺损伤情况 2 d、21 d 和 12 周子代鼠麻醉采血后摘取胰腺, 称重并计算胰体比, 比较各组子代鼠胰腺发育情况。取胰头组织 (0.5 cm×0.5 cm) 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 3 μm 厚度切片, 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色, LeicaDM300 显微镜观察胰腺发育情况。摘取脏器后予戊巴比妥钠安乐死。

1.3.5 葡萄糖耐量 (glucose tolerance test, GTT) 和胰岛素耐量 (insulin tolerance test, ITT) 试验 各剂量组子代鼠饲养至 12 个月, 空腹 24 h, 按 2 g/kg 体重腹腔注射 50% 葡萄糖, 分别于空腹, 注射后 15、30、60 和 120 min 尾尖采血测定血糖 (GLU)。再常规饲养 5 d, 空腹 4 h, 按 1 U/kg 体重腹腔注射胰岛素 (生理盐水稀释至 0.5 U/mL), 分别于空腹, 注射后 15、30、60 和 120 min 尾尖采血测定 GLU。

1.4 统计分析 采用 SPSS 28.0 软件统计分析。定

量资料服从正态分布的采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 描述, 组间比较采用单因素方差分析; 不服从正态分布的采用中位数和四分位数间距 [$M(Q_R)$] 描述, 组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 进一步两两比较采用 Bonferroni 法。子代鼠胰体比与 B[a]P 暴露剂量的关系采用 Spearman 秩相关分析。GTT 和 ITT 试验结果采用重复测量资料的方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况 各组母鼠和子代鼠外观均无异常, 活动、饮食、饮水和精神状况无差异, 无实验动物死亡、流产和早产。空白对照组、标准剂量组、低剂量组、中剂量组和高剂量组母鼠产仔数分别为 (9.00±2.45)、(8.25±2.38)、(9.44±3.58)、(7.57±2.07) 和 (9.29±1.89) 只, 差异无统计学意义 ($F=0.679$, $P=0.612$)。

2.2 大鼠 BPDE-DNA 加合物水平比较 各剂量组母鼠、2 d 子代鼠和 21 d 子代鼠 BPDE-DNA 加合物水平比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。其中, 低、中、高剂量组母鼠和 21 d 子代鼠 BPDE-DNA 加合物水平均高于标准剂量组 ($P<0.001$)。空白对照组和 12 周子代鼠均未检出 BPDE-DNA 加合物。见表 1。

表 1 各剂量组母鼠和子代鼠 BPDE-DNA 加合物水平 [$M(Q_R)$, pg/mL, $n=8$]

Table 1 BPDE-DNA adduct levels in mother and offspring rats of different groups [$M(Q_R)$, pg/mL, $n=8$]

组别 Group	母鼠 Mother rats	2 d 子代鼠 2 d offspring rats	21 d 子代鼠 21 d offspring rats
标准剂量组 Standard-dose group	36.12 (6.03)	1 089.60 (586.10)	40.95 (12.88)
低剂量组 Low-dose group	112.58 (59.15) *	1 314.55 (451.50)	184.21 (17.30) *
中剂量组 Medium-dose group	124.25 (3.62) *	1 232.46 (325.94)	243.36 (66.20) *
高剂量组 High-dose group	414.38 (85.91) *	1 405.49 (346.47)	420.01 (66.00) *
χ^2 值	27.157	16.229	27.883
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注: a 表示与标准剂量组比较 $P<0.05$ 。Note: a, $P<0.05$ compared with the standard-dose group.

2.3 子代鼠胰腺发育情况

2.3.1 子代鼠胰体比 各组 2 d 和 21 d 子代鼠胰体比比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。其中, 中、高剂量组 2 d 子代鼠胰体比均低于空白对照组和标准剂量组 ($P<0.001$); 低、中、高剂量组 21 d 子代鼠胰体比均低于空白对照组和标准剂量组 ($P<0.001$)。见表 2。2 d ($r_s=-0.620$, $P=0.001$) 和 21 d ($r_s=-0.801$, $P=0.001$) 子代鼠胰体比与 B[a]P 暴露剂量呈负相关。

2.3.2 胰腺组织形态学观察结果 2 d 子代鼠胰腺发育不全, 组织松散, 除空白对照组外胰岛形状不规则; 21 d 子代鼠外分泌部较 2 d 子代鼠紧实, 低、中、高剂量组胰岛形状不规则、边界不清; 12 周子代鼠胰腺发育良好, 外分泌部紧实, 胰岛未见明显异常。见图 1。

2.4 子代鼠 GTT 和 ITT 试验结果分析 GTT 试验结果显示, 腹腔注射葡萄糖后, 各组 12 个月子代鼠 GLU 呈上升趋势, 30 min 后呈下降趋势 ($F=$

表 2 各组子代鼠胰体比 (%)

Table 2 Pancreas volume index in offspring rats of different groups (%)

组别 Group	2 d	21 d	12周 Weeks
空白对照组 Blank control group	0.18±0.03	0.55±0.03	0.22±0.05
标准剂量组 Standard-dose group	0.16±0.03	0.55±0.02	0.22±0.09
低剂量组 Low-dose group	0.16±0.03	0.48±0.03 ^{ab}	0.21±0.04
中剂量组 Medium-dose group	0.13±0.03 ^{ab}	0.46±0.02 ^{ab}	0.21±0.07
高剂量组 High-dose group	0.13±0.02 ^{ab}	0.46±0.01 ^{ab}	0.21±0.07
F值	11.261	52.475	0.088
P值	<0.001	<0.001	0.986

注: a表示与空白对照组比较 $P<0.05$; b表示与标准剂量组比较 $P<0.05$ 。Note: a, $P<0.05$ compared with blank control group; b, $P<0.05$ compared with standard-dose group.

365.578, $P<0.001$); 组间 GLU 差异无统计学意义 ($F=1.837$, $P=0.174$); 时间与组间存在交互作用 ($F=13.953$, $P<0.001$)。其中, 注射后 120 min 各组间 GLU 比较, 差异有统计学意义 ($F=10.383$, $P<0.001$), 高剂量组 GLU 高于空白对照组 ($P=0.001$)、标准剂量组 ($P=0.001$)、低剂量组 ($P=0.001$) 和中剂量组 ($P=0.002$)。见表 3。ITT 试验结果显示, 腹腔注射胰岛素后, 各组 12 个月子代鼠 GLU 均呈下降趋势 ($F=461.215$, $P<0.001$); 组间差异有统计学意义 ($F=19.722$, $P<0.001$); 时间与组间存在交互作用 ($F=21.684$, $P<0.001$)。其中, 注射后 30、60 和 120 min 各组间 GLU 比较, 差异均有统计学意义 ($F=37.955$ 、24.000、21.796, 均 $P<0.001$), 高剂量组 GLU 高于其他各组 (均 $P<0.001$)。见表 4。

3 讨论

研究结果显示, 各剂量组母鼠产仔数差异无统计学意义, 无早产、流产现象, 能较好观察 B[a]P 对子代鼠的影响。空白对照组母鼠未检出 BPDE-DNA 加合物, 低、中、高剂量组母鼠 BPDE-DNA 加合物水平均高于标准剂量组, 表明 B[a]P 暴露形成 BPDE-DNA 加合物后存储在母鼠体内。空白对照组子代鼠未检出 BPDE-DNA 加合物, 各剂量组 2 d 子代鼠的 BPDE-DNA 加合物水平均较高, 表明 B[a]P 可通过胎盘屏障^[12-13]; 2 d 子代鼠体内各种酶的代谢率相对较低, B[a]P 更易与脂蛋白结合而蓄积, 导致 BPDE-DNA 加合物水平较高。低、中、高剂量组 21 d 子代鼠 BPDE-DNA 加合物水平均高于标准剂量组, 21 d 子代鼠 BPDE-DNA 加合物水平低于 2 d 子代鼠, 提示 B[a]P 母乳暴露水平低于胚胎期子宫

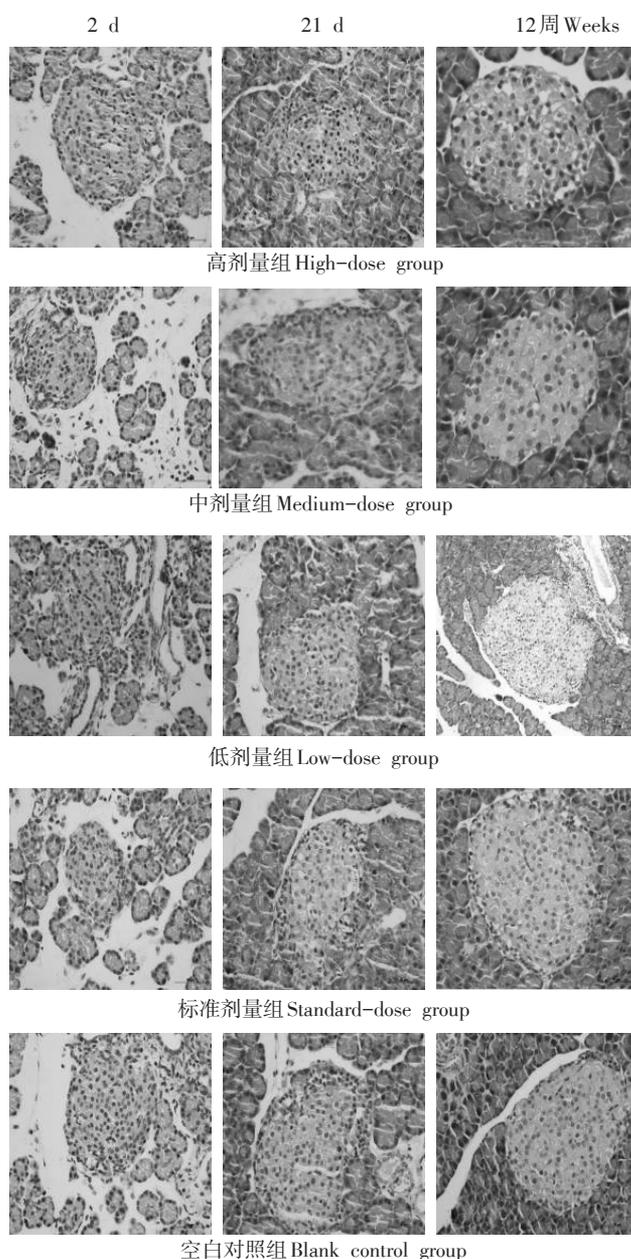


图 1 各组子代鼠胰腺形态观察 (HE 染色, ×400)
Figure 1 Pancreatic morphology of offspring rats (HE staining, ×400)

内暴露。

中、高剂量组 2 d 和 21 d 子代鼠胰体比均低于空白对照组, 并与 B[a]P 暴露剂量呈负相关。2 d 子代鼠胰腺发育不全, 组织松散; 低、中、高剂量组 2 d 和 21 d 子代鼠胰岛形状不规则、边界不清, 与既往研究结果^[14-15]一致。提示 B[a]P 暴露会导致子代鼠胰腺发育异常。各组 12 周子代鼠胰体比差异无统计学意义, 可能成年鼠胰腺重量相对于体重比重过小, 导致均数差异不大; 或子代鼠在生长发育过程中出现代偿性结构改变, 腺泡、腺管等胰岛外结构增多, 胰腺重量增加。

表3 各组12个月子代鼠GTT试验GLU值 (mmol/L)

Table 3 GLU levels resulting from GTT in different groups of 12-month-old offspring rats (mmol/L)

组别 Group	空腹 Limosis	注射后 After the injection			
		15 min	30 min	60 min	120 min
空白对照组 Blank control group	5.63±0.29	12.36±0.28	13.15±0.12	10.45±0.36	8.17±0.20
标准剂量组 Standard-dose group	6.27±0.33	9.92±0.65	12.45±0.36	10.41±0.32	8.37±0.38
低剂量组 Low-dose group	6.05±0.46	10.96±1.26	13.70±1.29	11.67±0.80	8.41±0.17
中剂量组 Medium-dose group	5.47±0.18	9.80±4.60	11.23±0.89	10.53±1.00	8.57±1.28
高剂量组 High-dose group	5.70±0.43	8.90±0.87	12.84±2.31	12.77±1.98	12.08±1.85

表4 各组12个月子代鼠ITT试验GLU值 (mmol/L)

Table 4 GLU levels resulting from ITT in different groups of 12-month-old offspring rats (mmol/L)

组别 Group	空腹 Limosis	注射后 After the injection			
		15 min	30 min	60 min	120 min
空白对照组 Blank control group	5.90±0.00	6.52±0.37	4.33±0.17	3.72±0.40	2.56±0.46
标准剂量组 Standard-dose group	6.47±0.40	6.20±0.29	4.62±0.28	3.57±0.47	2.15±0.12
低剂量组 Low-dose group	7.25±0.23	6.15±0.17	4.85±0.17	2.55±0.82	2.25±0.23
中剂量组 Medium-dose group	5.80±0.14	6.62±0.44	5.00±0.20	3.28±0.34	2.03±0.07
高剂量组 High-dose group	5.72±0.23	6.45±0.48	6.58±0.46	5.90±0.34	4.57±0.85

12周子代鼠GTT和ITT试验结果均显示,注射葡萄糖120min以及胰岛素30、60和120min后,高剂量组GLU高于其他各组,出现胰岛素抵抗和糖耐量受损等T2DM前期症状。

综上所述,在本实验条件下,子代鼠BPDE-DNA浓度随子宫内B[a]P暴露剂量的增加而升高,引起胰腺功能障碍,导致老年期胰岛素抵抗和糖耐量受损。

参考文献

[1] ALEXANDER D A, NORTHCROSS A, KARRISON T, et al. Pregnancy outcomes and ethanol cook stove intervention: a randomized-controlled trial in Ibadan, Nigeria [J]. Environ Int, 2018, 111: 152-163.

[2] 张露艺, 李欣, 鲁英. 乌鲁木齐市母婴多环芳烃负荷水平及关系: 基于某三甲医院的调查 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (10): 963-969.

ZHANG L Y, LI X, LU Y. Relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons loads of pregnant women and newborns in a Class-A tertiary hospital in Urumqi [J]. J Environ Occup Med, 2020, 37 (10): 963-969.

[3] DUCA R C, GROVA N, GHOSH M, et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons leads to non-monotonic modulation of DNA and RNA (hydroxy) methylation in a rat model [J/OL]. Sci Rep, 2018, 8 (1) (2018-07-12) [2022-02-02]. https://www.nature.com/articles/s41598-018-28911-y. DOI: 10.1038/s41598-018-28911-y.

[4] CHEN J S, ZHONG L, WU J, et al. A murine pancreatic islet cell-based screening for diabetogenic environmental chemicals [J/OL]. J Vis Exp, 2018 (136) (2018-06-25) [2022-02-02]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6101987. DOI: 10.3791/57327.

[5] DAYEH T, LING C. Does epigenetic dysregulation of pancreatic islets contribute to impaired insulin secretion and type 2 diabetes? [J]. Biochem Cell Biol, 2015, 93 (5): 511-521.

[6] 李珊珊, 赵钰岚. 胰岛素抵抗及高胰岛素血症促进胰腺癌发生的研究进展 [J]. 预防医学, 2021, 33 (11): 1122-1126.

LI S S, ZHAO Y L. Research progress of insulin resistance and hyperinsulinemia promoting pancreatic cancer [J]. Prev Med, 2021, 33 (11): 1122-1126.

[7] GUO L, JIANG X, TIAN H Y, et al. Detection of BPDE-DNA adducts in human umbilical cord blood by LC-MS/MS analysis [J]. J Food Drug Anal, 2019, 27 (2): 518-525.

[8] BORSKÝ P, ANDRÝS C, KREJSEK J, et al. Serum level of antibodies (IgG, IgM) against benzo[a]pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide-DNA adducts in children dermatologically exposed to coal tar [J]. Acta Medica, 2017, 60 (1): 27-31.

[9] PIBERGER A L, KRÜGER C T, STRAUCH B M, et al. BPDE-induced genotoxicity: relationship between DNA adducts, mutagenicity in the in vitro PIG-A assay, and the transcriptional response to DNA damage in TK6 cells [J]. Arch Toxicol, 2018, 92 (1): 541-551.

[10] 中华人民共和国环境保护部, 国家质量监督检验检疫总局. 环境空气质量标准: GB 3095-2012 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.

(下转第 345 页)