



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104830764 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201510289599. X

(22) 申请日 2015. 05. 29

(71) 申请人 广州赛莱拉干细胞科技股份有限公司

地址 510000 广东省广州市国际生物岛螺旋四路一号生产区第五层 502 单元

(72) 发明人 葛啸虎 陈海佳 王一飞 卢瑞珊
王小燕 李平 马岩岩

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 赵青朵

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775(2010. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

羊水间充质干细胞的原代分离培养方法

(57) 摘要

本发明涉及干细胞培养技术领域,尤其涉及羊水间充质干细胞的原代分离培养方法。本发明提供的方法,利用差速贴壁原理,在适宜条件下,使内皮细胞先贴壁生长,而此时间充质干细胞尚未贴壁。本发明准确控制培养时间,待内皮细胞贴壁完成后,转移包含羊水间充质干细胞的培养液。对培养液进行传代培养后获得羊水间充质干细胞。本发明提供的方法操作简单,无需更多的仪器,且无需人为刮除的操作,避免了细胞的损伤和污染。检测结果表明,步骤1中获得的培养液中所包含的羊水间充质干细胞的活力不低于89.28%,经传代3代,流式细胞检测结果表明,其表面抗体仍符合干细胞特性,未见分化趋势。

1. 羊水间充质干细胞的原代分离培养方法,其特征在于,包括:
步骤 1:明胶铺板后接种羊水组织细胞,培养 11h ~ 13h 后转移培养液;
步骤 2:将所述培养液培养至细胞融合率不低于 85%,获得初步纯化的细胞;
步骤 3:将所述初步纯化的细胞重悬,培养 3h ~ 5h 后,更新培养基,继续培养至细胞贴壁,弃除培养液,获得羊水间充质干细胞。
2. 根据权利要求 1 所述的原代分离培养方法,其特征在于,步骤 1 中所述接种的羊水组织细胞密度为 5×10^5 个 /mL。
3. 根据权利要求 1 所述的原代分离培养方法,其特征在于,步骤 1 中所述培养的培养基为 Lonza 完全培养基;步骤 1 中所述培养的温度为 37°C,5% CO₂、湿度为 95%。
4. 根据权利要求 1 所述的原代分离培养方法,其特征在于,步骤 1 中所述培养的时间为 12h。
5. 根据权利要求 1 所述的原代分离培养方法,其特征在于,步骤 2 中所述培养的时间为 72h。
6. 根据权利要求 1 所述的原代分离培养方法,其特征在于,步骤 3 中所述重悬至细胞密度为 1×10^5 个 /mL。
7. 根据权利要求 1 所述的原代分离培养方法,其特征在于,步骤 3 所述重悬采用 Lonza 完全培养基;步骤 3 中所述培养的温度为 37°C,5% CO₂、湿度为 95%。
8. 根据权利要求 1 所述的原代分离培养方法,其特征在于,步骤 3 所述培养的时间为 4h,继续培养的时间为 120h。
9. 根据权利要求 1 所述的原代分离培养方法,其特征在于,所述羊水组织细胞的获取方法为:将羊水离心后取沉淀,以 PBS 缓冲液洗涤,获得羊水组织细胞。
10. 根据权利要求 1 ~ 9 任一项所述的原代分离培养方法,其特征在于,所述羊水组织细胞为人羊水组织细胞。

羊水间充质干细胞的原代分离培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及干细胞培养技术领域,尤其涉及羊水间充质干细胞的原代分离培养方法。

背景技术

[0002] 干细胞是一类具有自我复制能力和多向分化潜能的原始未分化细胞,处于未定向分化状态并具有增殖能力。在特定条件下,干细胞可分化成不同类型的具有特征性形态、特异分子标志和特殊功能的成熟细胞。根据干细胞来源的不同可分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和来源于出生后器官或成年个体组织的组织干细胞或成体干细胞(adult stem cell, ASC)。从来源看,要获取大量干细胞较困难。因此,寻找新的干细胞源成为热点。

[0003] 近年研究表明:羊水(amniotic fluid, AF)中存在干细胞,可以分化为多种成体细胞,有望成为一种新的干细胞来源,且可避免ESC的伦理问题以及ASC的局限性。羊水干细胞(amniotic fluid-derived stem cell, AFS)可通过AF穿刺获取,较ESC易获取。羊水细胞比其它普通类型的细胞有着很多优点:首先,正常情况下羊水细胞在孕妇临产前就能够被提取。其次,羊水混合物中所包含细胞的“年龄”都比较小,因此这些细胞遭受周围环境引起的诱发突变的可能性就很小,从遗传学角度来说它们会更稳定。

[0004] 羊水中含有较多类型的细胞,如内皮细胞等,在分离和培养的过程中需要去除。目前,对羊水干细胞的分选多采用免疫磁珠分选法,但该方法对细胞活性存在一定影响,且费用较高。还有些方法采用机械分离,但人为刮除内皮细胞的方法操作十分繁琐且极易引起污染,并且,极易造成细胞的损伤,导致细胞活性的降低。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供羊水间充质干细胞的原代分离培养方法;本发明提供的方法利用差速贴壁原理,简化了操作,获得的干细胞纯度较高,活性良好,经传代后仍保持良好的干性。

[0006] 本发明提供的羊水间充质干细胞的原代分离培养方法包括:

[0007] 步骤1:明胶铺板后接种羊水组织细胞,培养11h~13h后转移培养液;

[0008] 步骤2:将所述培养液培养至细胞融合率不低于85%,获得初步纯化的细胞;

[0009] 步骤3:将所述初步纯化的细胞重悬,培养3h~5h后,更新培养基,继续培养至细胞贴壁,弃除培养液,获得羊水间充质干细胞。

[0010] 本发明提供的方法,利用差速贴壁原理,在适宜条件下,使内皮细胞先贴壁生长。本发明准确控制培养时间,待内皮细胞贴壁完成后,转移包含羊水间充质干细胞的培养液。对培养液进行传代培养后获得羊水间充质干细胞。本发明提供的方法操作简单,无需更多的仪器,且无需人为刮除的操作,避免了细胞的损伤和污染。检测结果表明,步骤1中获得的培养液中所包含的羊水间充质干细胞的活力不低于89.28%,经传代3代,流式细胞检测

结果表明,其表面抗体仍符合干细胞特性,未见分化趋势。

[0011] 在本发明的实施例中,步骤 1 中接种的羊水组织细胞密度为 5×10^5 个 /mL。

[0012] 在本发明的实施例中,步骤 1 中接种羊水组织细胞的量为 2mL。

[0013] 步骤 1 中接种密度和细胞量直接影响细胞增殖速率和贴壁效果,密度过高则内皮细胞不能完全贴壁,而密度过低则细胞贴壁速度过缓,影响细胞活力。

[0014] 在本发明的实施例中,步骤 1 中培养的培养基为 Lonza 完全培养基;步骤 1 中培养的温度为 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 、湿度为 95% 。

[0015] Lonza 完全培养基包括:无血清培养基 (Lonza UltraCULTURE™)、血清替代物 (PALL Ultrosor G)、谷氨酰胺和 NEAA。

[0016] 其中,血清替代物的质量分数为 10% 。

[0017] 谷氨酰胺的质量分数为 1% 。

[0018] NEAA 的质量分数为 1% 。

[0019] 明胶可促进细胞贴壁,明胶铺板的方法为:向细胞培养板中加入质量分数为 0.1% 的明胶溶液, $1\text{mL}/\text{孔}$, 常温下孵育 30min , 结束后弃去明胶溶液。

[0020] 在本发明的实施例中,步骤 1 中所述培养的时间为 12h 。

[0021] 在本发明的实施例中,步骤 2 中培养的时间为 72h 。

[0022] 在本发明的实施例中,步骤 3 中重悬至细胞密度为 1×10^5 个 /mL。

[0023] 在本发明的是实施例中,步骤 3 重悬采用 Lonza 完全培养基;步骤 3 中所述培养的温度为 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 、湿度为 95% 。

[0024] 在一些实施例中,重悬具体为:将初步纯化的细胞经胰酶酶解后,以 Lonza 完全培养基重悬。

[0025] 作为优选,胰酶酶解的酶解液中,胰酶的质量分数为 0.25% , EDTA 的质量分数为 0.02% 。

[0026] 在一些实施例中,步骤 3 中培养在平皿中进行,培养量为 8mL 。

[0027] 在一些实施例中,步骤 3 所述培养的时间为 4h , 继续培养的时间为 120h 。

[0028] 在一些实施例中,步骤 3 中更新培养基具体为,弃除平皿中的上清液,加入新的 Lonza 完全培养基。

[0029] 加入新的 Lonza 完全培养基的量为 8mL 。

[0030] 在一些实施例中,羊水组织细胞的获取方法为:将羊水离心后取沉淀,以 PBS 缓冲液洗涤,获得羊水组织细胞。

[0031] 优选的,羊水为剖腹产产妇的羊水。

[0032] 优选的,离心的速度为 2000rpm , 时间为 5min 。

[0033] PBS 缓冲液洗涤的体积为 40mL 。

[0034] 在本发明的实施例中,本发明分离培养的羊水组织细胞为人羊水组织细胞。

[0035] 本发明提供的方法,利用差速贴壁原理,在适宜条件下,使内皮细胞先贴壁生长,而此时间充质干细胞尚未贴壁。本发明准确控制培养时间,待内皮细胞贴壁完成后,转移包含羊水分充质干细胞的培养液。对培养液进行传代培养后获得羊水分充质干细胞。本发明提供的方法操作简单,无需更多的仪器,且无需人为刮除的操作,避免了细胞的损伤和污染。检测结果表明,步骤 1 中获得的培养液中所包含的羊水分充质干细胞的活力不低于

89.28%，经传代 3 代，流式细胞检测结果表明，其表面抗体仍符合干细胞特性，未见分化趋势。

附图说明

[0036] 图 1-a 示实施例 1 经原代培养 (24h) 后的贴壁细胞形态，放大 4 倍；

[0037] 图 1-b 示实施例 1 经原代培养 (72h) 后的贴壁细胞形态，放大 4 倍；

[0038] 图 2 示实施例 1 和对比例 1 ~ 2 细胞增殖曲线；其中，线 1 示实施例 1 的细胞增殖曲线；线 2 示对比例 1 的细胞增殖曲线，线 3 示对比例 2 的细胞增长曲线；

[0039] 图 3-a 示同型对照抗体检测实施例 1 制得的第 3 代羊水间充质干细胞的结果；分别表示了所检测的细胞数量；以及根据对照组细胞所设定抗体 CD73、CD90、CD105、HLA-DR、CD45、CD34 的门；

[0040] 图 3-b 示实施例 1 制得的第 3 代示羊水间充质干细胞的流式检测结果；分别表达 CD73、CD90、CD105、HLA-DR、CD45、CD34 的细胞含量。

具体实施方式

[0041] 本发明提供了羊水间充质干细胞的原代分离培养方法，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

[0042] 本发明采用的仪器皆为普通市售品，皆可于市场购得。

[0043] 下面结合实施例，进一步阐述本发明：

[0044] 实施例 1

[0045] 本发明提供的羊水间充质干细胞的纯化过程具体为：

[0046] 一、原代培养：

[0047] 1、取剖腹产产妇的羊水，用无菌容器盛装后，放入超净台中。

[0048] 2、把羊水分装至 50mL 离心管中，2000rpm 离心 5min，弃上清。

[0049] 3、每个 50mL 离心管中加入 40mL PBS 进行重悬，2000rpm 离心 5min，弃上清。

[0050] 4、往六孔板中加入 0.1% 明胶，1mL/ 孔，常温下孵育 30min，结束后弃去明胶溶液。

[0051] 5、用 Lonza 完全培养基重悬沉淀，调整细胞密度为 5×10^5 cell/mL，接种至孵育过明胶的六孔板中，2mL/ 孔；转移至细胞培养箱进行培养。

[0052] 6、培养 12h 后，将培养液转移至新的六孔板中（切勿吹打，贴壁的均为内皮细胞），转移至细胞培养箱进行培养。

[0053] 7、24h 后观察到贴壁的细胞多为间充质干细胞（倒置显微镜观察细胞形态，图 1-a），共培养 72h（倒置显微镜观察细胞形态，图 1-b）。

[0054] 二、传代培养：

[0055] 待原代细胞融合率达 85% 时，用 0.25% 胰酶 -0.02% EDTA 进行酶解传代。

[0056] 调整细胞密度为 1×10^5 cell/mL，接种 8mL 至 9cm 平皿中，转移至细胞培养箱进行培养 4h。

- [0057] 4h 后,取出平皿,吸弃上清,加入新 lonza 完全培养基进行培养。
- [0058] 继续培养 4h 至细胞贴壁,弃除培养液,贴壁的细胞为进一步纯化的间充质干细胞。
- [0059] 经检测,间充质干细胞纯度为 99.3%。
- [0060] 实施例 2
- [0061] 本发明提供的羊水间充质干细胞的纯化过程具体为:
- [0062] 一、原代培养:
- [0063] 1、取剖腹产产妇的羊水,用无菌容器盛装后,放入超净台中。
- [0064] 2、把羊水分装至 50mL 离心管中,2000rpm 离心 5min,弃上清。
- [0065] 3、每个 50mL 离心管中加入 40mL PBS 进行重悬,2000rpm 离心 5min,弃上清。
- [0066] 4、往六孔板中加入 0.1%明胶,1mL/孔,常温下孵育 30min,结束后弃去明胶溶液。
- [0067] 5、用 lonza 完全培养基重悬沉淀,调整细胞密度为 1×10^5 cell/mL,接种至孵育过明胶的六孔板中,2mL/孔;转移至细胞培养箱进行培养。
- [0068] 6、培养 13h 后,将培养液转移至新的六孔板中(切勿吹打,贴壁的均为内皮细胞),转移至细胞培养箱进行培养。
- [0069] 7、24h 后观察到贴壁的细胞多为间充质干细胞,共培养 72h。
- [0070] 二、传代培养:
- [0071] 待原代细胞融合率达 85%时,用 0.25%胰酶-0.02% EDTA 进行酶解传代。
- [0072] 调整细胞密度为 1×10^5 cell/mL,接种 8mL 至 9cm 平皿中,转移至细胞培养箱进行培养 5h。
- [0073] 5h 后,取出平皿,吸弃上清,加入新 lonza 完全培养基进行培养。
- [0074] 继续培养 4h 至细胞贴壁,弃除培养液,贴壁的细胞为进一步纯化的间充质干细胞。
- [0075] 经检测,间充质干细胞纯度为 99.5%。
- [0076] 实施例 3
- [0077] 本发明提供的羊水间充质干细胞的纯化过程具体为:
- [0078] 一、原代培养:
- [0079] 1、取剖腹产产妇的羊水,用无菌容器盛装后,放入超净台中。
- [0080] 2、把羊水分装至 50mL 离心管中,2000rpm 离心 5min,弃上清。
- [0081] 3、每个 50mL 离心管中加入 40mL PBS 进行重悬,2000rpm 离心 5min,弃上清。
- [0082] 4、往六孔板中加入 0.1%明胶,1mL/孔,常温下孵育 30min,结束后弃去明胶溶液。
- [0083] 5、用 lonza 完全培养基重悬沉淀,调整细胞密度为 1×10^6 cell/mL,接种至孵育过明胶的六孔板中,2mL/孔;转移至细胞培养箱进行培养。
- [0084] 6、培养 11h 后,将培养液转移至新的六孔板中(切勿吹打,贴壁的均为内皮细胞),转移至细胞培养箱进行培养。
- [0085] 7、24h 后观察到贴壁的细胞多为间充质干细胞,共培养 72h。
- [0086] 二、传代培养:
- [0087] 待原代细胞融合率达 85%时,用 0.25%胰酶-0.02% EDTA 进行酶解传代。
- [0088] 调整细胞密度为 1×10^5 cell/mL,接种 8mL 至 9cm 平皿中,转移至细胞培养箱进行

培养 3h。

[0089] 3h 后,取出平皿,吸弃上清,加入新 lonza 完全培养基进行培养。

[0090] 继续培养 4h 至细胞贴壁,弃除培养液,贴壁的细胞为进一步纯化的间充质干细胞。

[0091] 经检测,间充质干细胞纯度为 92.5%。

[0092] 对比例 1

[0093] 本发明提供的羊水间充质干细胞的纯化过程具体为:

[0094] 一、原代培养:

[0095] 1、取剖腹产产妇的羊水,用无菌容器盛装后,放入超净台中。

[0096] 2、把羊水分装至 50mL 离心管中,2000rpm 离心 5min,弃上清。

[0097] 3、每个 50mL 离心管中加入 40mL PBS 进行重悬,2000rpm 离心 5min,弃上清。

[0098] 4、往六孔板中加入 0.1%明胶,1mL/孔,常温下孵育 30min,结束后弃去明胶溶液。

[0099] 5、用 F12/DMEM+10% FBS 培养基重悬沉淀,调整细胞密度为 5×10^5 cell/mL,接种至孵育过明胶的六孔板中,2mL/孔;转移至细胞培养箱进行培养。

[0100] 6、培养 12h 后,将培养液转移至新的六孔板中(切勿吹打,贴壁的均为内皮细胞),转移至细胞培养箱进行培养。

[0101] 7、24h 后观察到贴壁的细胞多为间充质干细胞,共培养 72h。

[0102] 二、传代培养:

[0103] 待原代细胞融合率达 85%时,用 0.25%胰酶 -0.02% EDTA 进行酶解传代。

[0104] 调整细胞密度为 1×10^5 cell/mL,接种 8mL 至 9cm 平皿中,转移至细胞培养箱进行培养 4h。

[0105] 4h 后,取出平皿,吸弃上清,加入新 F12/DMEM+10% FBS 培养基进行培养。

[0106] 继续培养 4h 至细胞贴壁,弃除培养液,贴壁的细胞为进一步纯化的间充质干细胞。

[0107] 经检测,间充质干细胞纯度为 85.6%。

[0108] 对比例 2

[0109] 本发明提供的羊水间充质干细胞的纯化过程具体为:

[0110] 一、原代培养:

[0111] 1、取剖腹产产妇的羊水,用无菌容器盛装后,放入超净台中。

[0112] 2、把羊水分装至 50mL 离心管中,2000rpm 离心 5min,弃上清。

[0113] 3、每个 50mL 离心管中加入 40mL PBS 进行重悬,2000rpm 离心 5min,弃上清。

[0114] 4、往六孔板中加入 0.1%明胶,1mL/孔,常温下孵育 30min,结束后弃去明胶溶液。

[0115] 5、用 DMEM 高糖 +10% FBS 培养基重悬沉淀,调整细胞密度为 5×10^5 cell/mL,接种至孵育过明胶的六孔板中,2mL/孔;转移至细胞培养箱进行培养。

[0116] 6、培养 12h 后,将培养液转移至新的六孔板中(切勿吹打,贴壁的均为内皮细胞),转移至细胞培养箱进行培养。

[0117] 7、24h 后观察到贴壁的细胞多为间充质干细胞,共培养 72h。

[0118] 二、传代培养:

[0119] 待原代细胞融合率达 85%时,用 0.25%胰酶 -0.02% EDTA 进行酶解传代。

[0120] 调整细胞密度为 1×10^5 cell/mL, 接种 8mL 至 9cm 平皿中, 转移至细胞培养箱进行培养 4h。

[0121] 4h 后, 取出平皿, 吸弃上清, 加入新 DMEM 高糖 +10% FBS 培养基进行培养。

[0122] 继续培养 4h 至细胞贴壁, 弃除培养液, 贴壁的细胞为进一步纯化的间充质干细胞。

[0123] 经检测, 间充质干细胞纯度为 93.5%。

[0124] 实施例 4

[0125] 观测实施例 1 ~ 3 和对比例 1 ~ 2 的细胞生长情况, 并绘制细胞增殖曲线。其中, 对实施例 1 和对比例 1 ~ 2 细胞生长情况所绘制的曲线如图 2 所示。结果表明, 实施例 1 培养细胞的增殖速度显著优于对比例 1 ~ 2。(p<0.05)

[0126] 实施例 5

[0127] 原代培养 12h 后, 细胞到达对数期, 取处于对数生长期的羊水干细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 cell/mL。按细胞悬液 : 0.4% 台盼蓝 = 3:1 (v:v) 充分混匀, 取 20uL 细胞混匀液加入细胞计数板中, 用 Countstar 细胞计数器进行细胞活率及体积检测。每组细胞检测 3 次。对实施例 1 ~ 3 及对比例 1 ~ 2 培养后的干细胞的活力如表 1 所示:

[0128] 表 1 干细胞活力

[0129]

	总数 (个)	活力%
实施例 1	3.14×10^4 cell	92.53%
实施例 2	2.33×10^5 cell	90.46%
实施例 3	6.89×10^5 cell	86.74%
对比例 1	3.41×10^5 cell	80.36%
对比例 2	3.28×10^5 cell	83.49%

[0130] 结果表明, 随着接种密度增大, 细胞的贴壁数量也增多。接种密度为实施例 1 原代接种密度 5×10^5 cell/mL, 间充质干细胞贴壁数量为 3.14×10^5 cell, 细胞获取量为 62.8%; 细胞纯度较纯。

[0131] 实施例 2 原代接种密度为 1×10^5 cell/mL, 间充质干细胞贴壁数量为 2.33×10^4 cell, 细胞获取量为 23.3%, 获取细胞数量较少; 但细胞纯度较纯。

[0132] 实施例 3 原代接种密度为 1×10^6 cell/mL, 间充质干细胞贴壁数量为 6.89×10^5 cell, 细胞获取量为 68.9%; 由于细胞接种密度过大, 在初步换液时, 仍有相当一部分内皮细胞在没有贴壁存在上清液中, 不能起到初步纯化细胞的作用, 在二次贴壁时, 除了间充质干细胞贴壁以外, 还有相当一部分的是内皮细胞; 大大增加了传代纯化的难度。

[0133] 对比例 1 和对比例 2 由于培养体系营养成分不高, 细胞在培养过程中活力较低。

[0134] 实施例 6

[0135] 经传代 3 代, 取处于对数生长期的羊水干细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 的细胞悬

液,分别取抗人 CD105、CD90、CD73、CD45、CD34、HLA-DR 的单克隆抗体各 2.5 μ L,加入细胞悬液 500 μ L,室温下避光孵育 20min,同时设立空白同型对照,1500r/min 离心 5min,弃上清,用含 10% FBS 的 PBS 洗涤 2 遍,用 500 μ L 1640 重悬后上机检测。对实施例 1~3 及对比例 1~2 检测的结果如表 2 所示。对实施例 1 检测的结果如图 3-a~图 3-b 所示:

[0136] 表 2 流式细胞检测结果

[0137]

	表达量%					
	CD105	CD90	CD73	CD45	CD34	HLA-DR
实施例 1	99.3%	99.3%	99.3%	0.0%	0.0%	0.4%
实施例 2	99.5%	99.1%	98.4%	0.1%	0.0%	0.2%
实施例 3	93.1%	98.2%	96.4%	2.1%	3.4%	5.7%
对比例 1	95.4%	93.6%	89.9%	3.9%	4.6%	0.4%
对比例 2	96.7%	90.6%	94.1%	5.7%	4.3%	0.7%

[0138] 间充质干细胞高表达 CD73、CD90、CD105(表达率均高于 95%);低表达 CD34、CD45、HLA-DR(表达率低于 2%)。只有符合上述的表达情况,才能认定为间充质干细胞。结果显示,以本发明提供方法分离培养的干细胞经传代 3 代仍保持良好的干性。

[0139] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

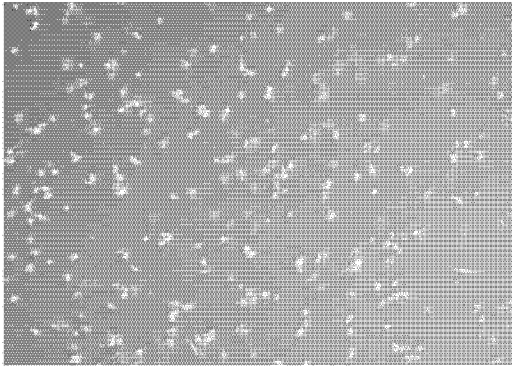


图 1-a

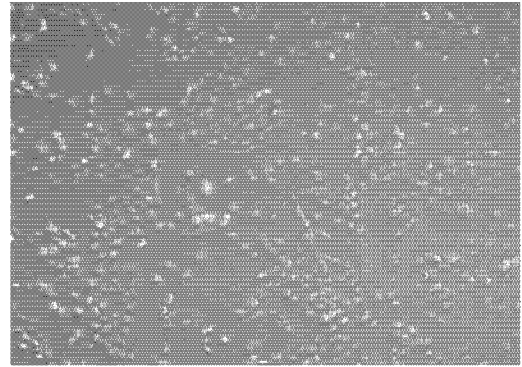


图 1-b

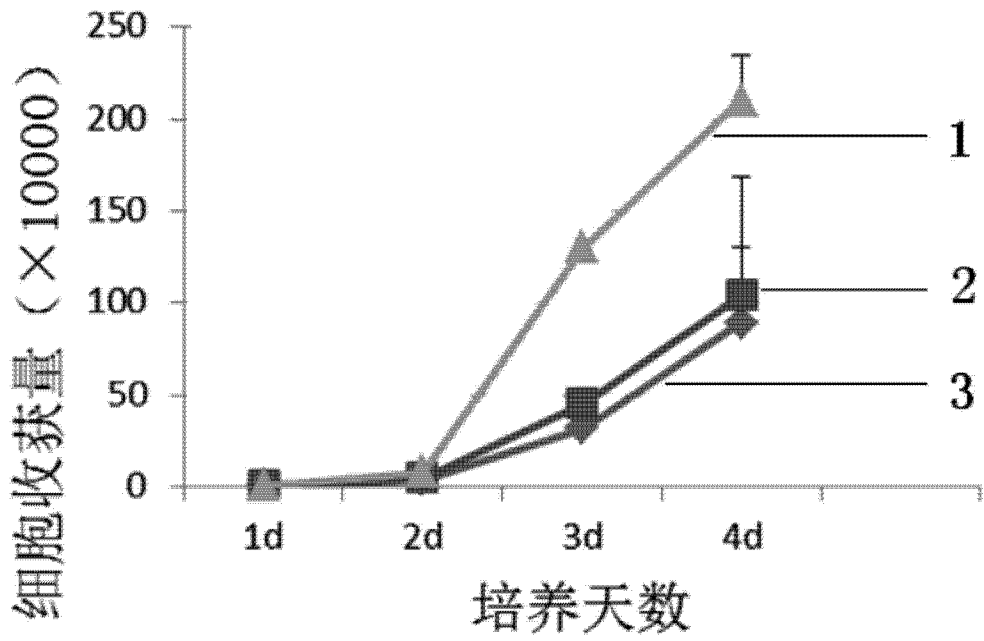


图 2

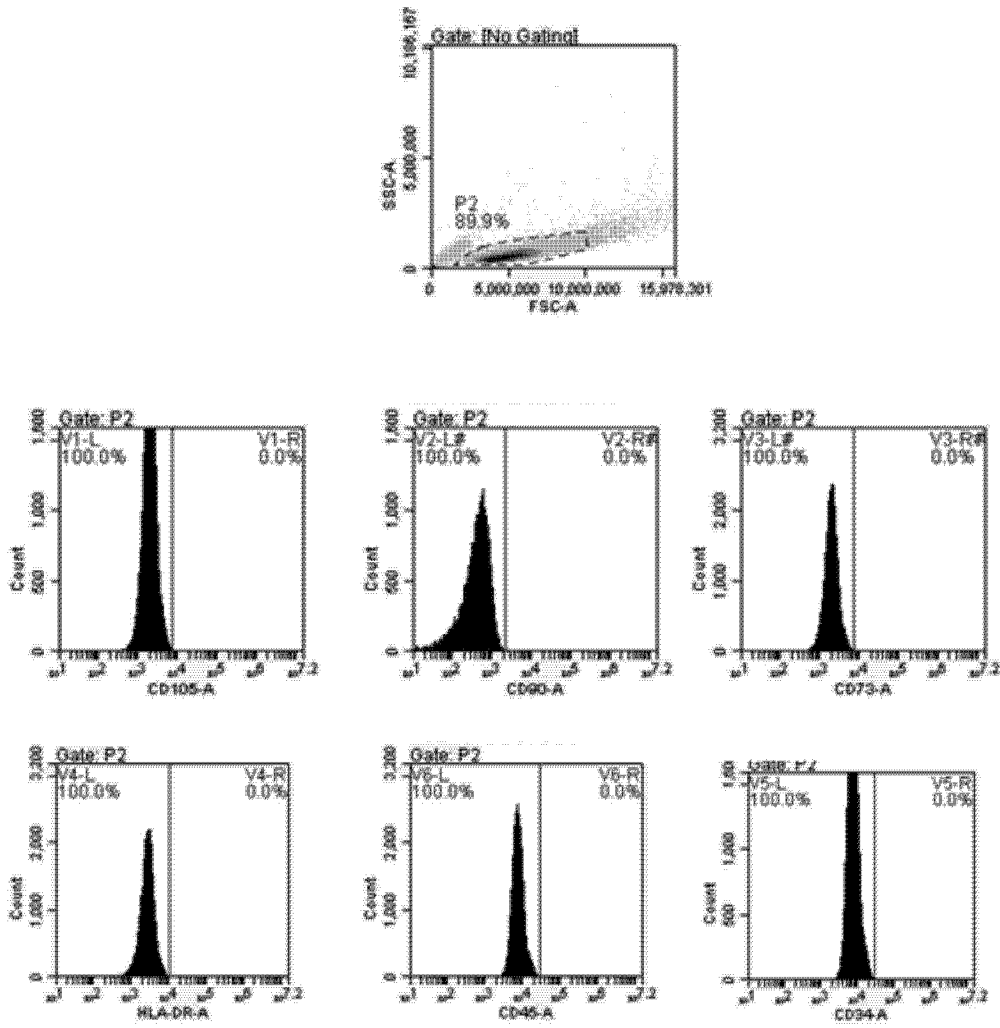


图 3-a

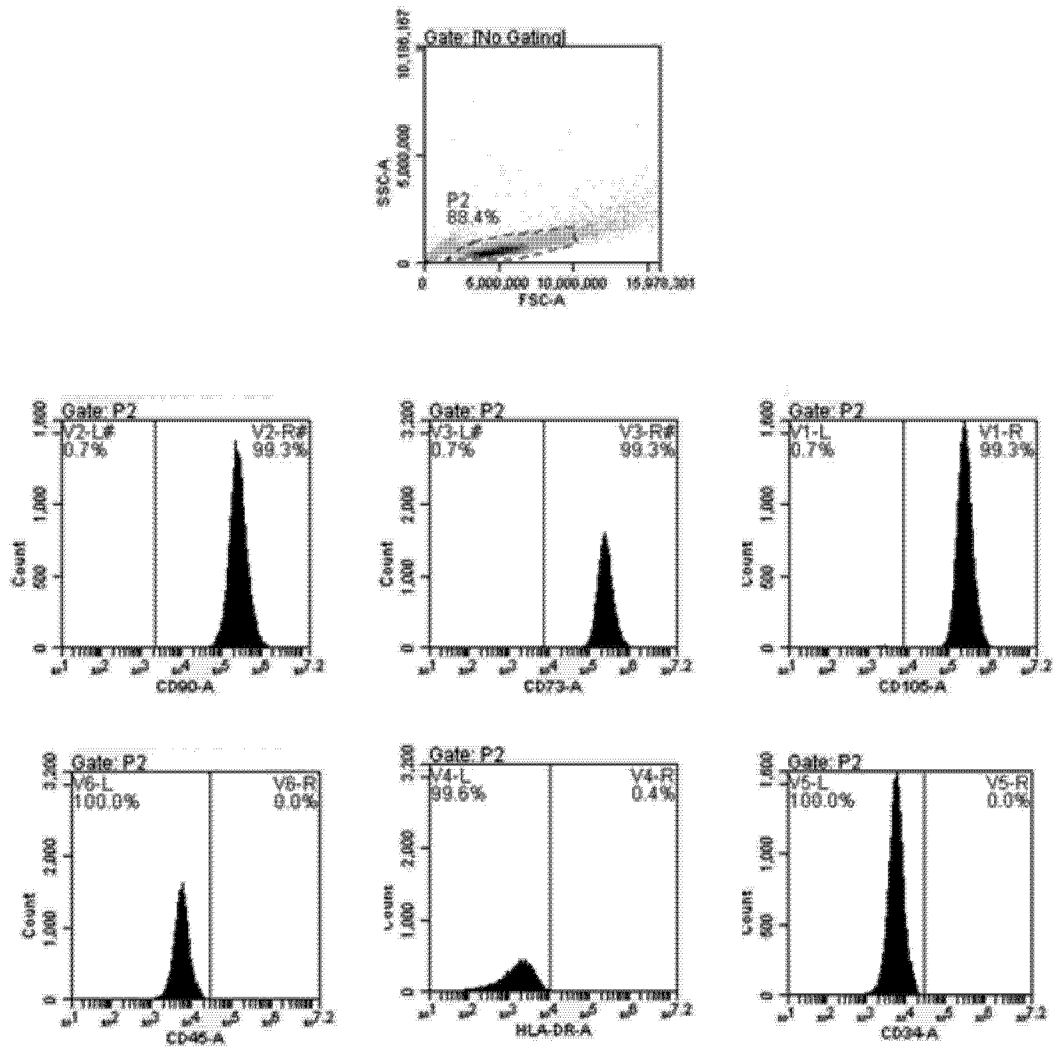


图 3-b