



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111172104 A

(43)申请公布日 2020.05.19

(21)申请号 202010026904.7

(22)申请日 2020.01.10

(71)申请人 陕西九州细胞基因工程有限公司
地址 710000 陕西省西安市高新技术产业
开发区科技六路196号

(72)发明人 何婷婷 聂苏秦 肖轩 戴博
朱艳丽

(74)专利代理机构 北京汇信合知识产权代理有
限公司 11335

代理人 吴甘棠

(51)Int.Cl.

C12N 5/0775(2010.01)

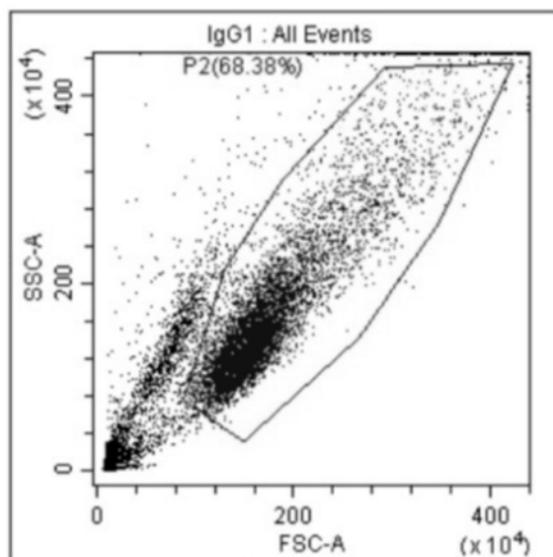
权利要求书1页 说明书6页 附图8页

(54)发明名称

一种脐血间充质干细胞的分离培养方法

(57)摘要

本发明公开了一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,属于生物技术领域。该分离培养方法包括以下步骤:对脐血进行离心处理,取上层得到血浆,下层为细胞;对血浆进行灭活处理后,再进行离心处理,取上清得到自体血清;将下层细胞与生理盐水混合后,再置于淋巴细胞分离液中进行离心处理,得到脐血单个核细胞;用无血清培养基重悬脐血单个核细胞,并置于自体血清包被的培养皿中进行原代培养,得到原代的间充质干细胞往原代间充质干细胞中添加细胞消化液进行细胞消化处理后,再进行传代培养。上述方法在分离及培养过程中不添加双抗,故不会对细胞产生毒性。另外,上述方法是采用离心分离的自体血清包被培养皿,故其不会引入动物源性的病毒。



1. 一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其特征在于,包括以下步骤:
对脐血进行离心处理,取上层得到血浆,下层为细胞;
对所述血浆进行灭活处理后,再进行离心处理,取上层得到自体血清,备用;
将所述下层细胞与生理盐水混合后,再置于淋巴细胞分离液中进行至少一次的离心处理,弃上清,得到脐血单个核细胞;
用所述自体血清包被培养皿,得到自体血清包被的培养皿,备用;
用无血清培养基重悬所述脐血间单个核细胞,并置于所述自体血清包被的培养皿中进行原代培养,得到原代间充质干细胞;
往所述原代间充质干细胞添加细胞消化液进行细胞消化处理后,再进行传代培养。
2. 根据权利要求1所述的一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其特征在于,所述步骤中,灭活处理的温度为 56°C 。
3. 根据权利要求1所述的一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其特征在于,所述步骤中,生理盐水中氯化钠的质量百分比浓度为 0.9% 。
4. 根据权利要求1所述的一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其特征在于,所述步骤中,无血清培养基为添加有L-谷氨酰胺的Lonza无血清培养基。
5. 根据权利要求1所述的一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其特征在于,所述步骤中,细胞消化液为胰酶细胞消化液。
6. 根据权利要求5所述的一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其特征在于,所述步骤中,所述胰酶细胞消化液中胰酶的质量百分比浓度为 0.125% 。
7. 根据权利要求1所述的一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其特征在于,所述步骤中,原代培养的细胞接种密度为 $(1\sim 2) \times 10^6 \text{cells}/\text{cm}^2$ 。
8. 根据权利要求1所述的一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其特征在于,所述步骤中,传代培养的细胞接种密度为 $(0.5\sim 1) \times 10^4 \text{cells}/\text{cm}^2$ 。

一种脐血间充质干细胞的分离培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体是一种脐血间充质干细胞的分离培养方法。

背景技术

[0002] 人脐血间充质干细胞(Human umbilical cord blood-derived MSCs,hUCB-MSCs)是存在于人脐带血中的一种成体干细胞,其具有旺盛的自我更新能力以及向多胚层分化的潜能,在适宜的条件下,hUCB-MSCs能定向分化成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等,并且能够分泌多种细胞活性因子,具有免疫调节、抑制炎症、减少凋亡等机能。另外,hUCB-MSCs还具有免疫原性低、来源广泛、伦理争议少等优点。与骨髓来源及脂肪来源的间充质干细胞相比较,人脐血来源的间充质干细胞增殖能力强,更容易诱导分化为软骨细胞、有更强的抗炎效果。与人脐带来源的间充质干细胞相比较,人脐血间充质干细胞较小,且生长速度较快,因此,治疗膝关节炎,人脐血来源的间充质干细胞更具有优势,可以作为治疗膝骨关节炎等疾病的理想干细胞来源。

[0003] 然而,由于人脐血中所含的间充质干细胞含量较少,其分离及培养的要求较高,目前在国内对分离人脐血间充质干细胞的报道较少;另外,现有传统的体外脐血间充质干细胞的培养方法,都会在培养基里加入一定浓度的胎牛血清,主要是为了给间充质干细胞的生长增殖提供养分如激素、生长因子、转运蛋白等,但这种方法存在多种缺点:如血清批次间的差异波动,成分不明确,来源不稳定等各种原因,使用前需要进行大量的验证工作,因此会促使生产和科研工作变得复杂。因此,研究一种无需血清的人脐血间充质干细胞的分离培养方法对于治疗膝关节炎等骨科疾病有重要的意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0005] 为实现上述目的,本发明实施例提供如下技术方案:

[0006] 一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,包括以下步骤:

[0007] 对脐血进行离心处理,取上层得到血浆,下层为细胞;

[0008] 对所述血浆进行灭活处理后,再进行离心处理,取上层得到自体血清,备用;

[0009] 将所述下层细胞与生理盐水混合后,再置于淋巴细胞分离液中进行至少一次的离心处理,弃上清,得到脐血单个核细胞;

[0010] 用所述自体血清包被培养皿,得到自体血清包被的培养皿,备用;

[0011] 用无血清培养基重悬所述脐血单个核细胞,并置于所述自体血清包被的培养皿中进行原代培养,得到原代间充质干细胞;

[0012] 往所述原代间充质干细胞中添加细胞消化液进行细胞消化处理后,再进行传代培养。

[0013] 作为本发明实施例的一个优选方案,所述步骤中,灭活处理的温度为50~60℃。

[0014] 作为本发明实施例的另一个优选方案,所述步骤中,生理盐水中氯化钠的质量百分比浓度为0.9%。

[0015] 作为本发明实施例的另一个优选方案,所述步骤中,无血清培养基为添加有L-谷氨酰胺的Lonza无血清培养基。

[0016] 作为本发明实施例的另一个优选方案,所述步骤中,细胞消化液为胰酶细胞消化液。作为本发明实施例的另一个优选方案,所述步骤中,所述胰酶细胞消化液中胰酶的质量百分比浓度为0.125%。

[0017] 作为本发明实施例的另一个优选方案,所述步骤中,原代培养的细胞接种密度为 $(1\sim 2)\times 10^6\text{cells}/\text{cm}^2$ 。

[0018] 作为本发明实施例的另一个优选方案,所述步骤中,传代培养的细胞接种密度为 $(0.5\sim 1)\times 10^4\text{cells}/\text{cm}^2$ 。

[0019] 与现有技术相比,本发明实施例的有益效果是:

[0020] 本发明实施例提供了一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其使用无血清培养基对脐血间充质干细胞进行培养,具有过程简单,成本低,易操作等特点。其中,该方法在分离及培养过程中不添加双抗,故不会对细胞产生毒性。另外,该方法是采用离心分离的自体血清包被培养皿,故其不会引入动物源性的病毒。

附图说明

[0021] 图1为未染色的六孔板的显微镜图(100*10倍镜)。该图显示了培养后贴壁的人脐血间充质干细胞。

[0022] 图2为成骨测试染色后的六孔板的显微镜图(100*10倍镜)。该图显示了将人脐血间充质干细胞诱导形成成骨细胞,用茜素红染液对其形成的骨矿化结节进行染色的结果图。结果显示人脐血间充质干细胞能分化为成骨细胞,形成骨矿化结节,具有成骨分化的特性。

[0023] 图3为成脂测试染色后的六孔板的显微镜图(100*10倍镜)。该图显示了将人脐血间充质干细胞诱导形成脂肪细胞,用油红O染液对其形成的脂肪细胞进行染色的结果图。结果显示人脐血间充质干细胞能分化为脂肪细胞,具有成脂分化的特性。

[0024] 图4为流式检测的散点图。该图显示了进行流式分析时细胞的分布情况,黑色线条框定区域是被选定作为后续分析的细胞。

[0025] 图5为流式检测中同型对照组(IgG-PE)的测试图。使用与PE荧光染料标记的抗体相同种属来源、相同亚型、相同剂量和相同的免疫球蛋白,用于消除由于PE荧光染料标记的抗体非特异性与细胞结合而产生的背景染色。同型对照实际上就是阴性对照。

[0026] 图6为流式检测中同型对照组(IgG-FITC)的测试图。使用与FITC荧光染料标记的抗体相同种属来源、相同亚型、相同剂量和相同的免疫球蛋白,用于消除由于FITC荧光染料标记的抗体非特异性与细胞结合而产生的背景染色。同型对照实际上就是阴性对照。

[0027] 图7为流式检测中CD34-PE的测试图。用于检测CD34的表达情况。

[0028] 图8为流式检测中CD45-FITC的测试图。用于检测CD45的表达情况。

[0029] 图9为流式检测中CD105-PE的测试图。用于检测CD105的表达情况。

[0030] 图10为流式检测中CD166-PE的测试图。用于检测CD166的表达情况。

具体实施方式

[0031] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。另外,下述实施例中所涉及的设备 and 试剂未经特别注明的话,均可采用市售的设备和试剂。

[0032] 实施例1

[0033] 该实施例提供了一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其包括以下步骤:

[0034] (1) 采集人的脐血,并在2h内将该脐血置于50mL的离心管中,配平后,以2000rpm的转速进行离心处理10min,取上层,收集得到血浆,下层为细胞。

[0035] (2) 将上述上层收集的血浆添加到新的离心管中,并置于56℃的水浴锅中进行灭活处理30min后,再以4000rpm的转速进行离心处理5min,收集上层得到自体血清,储存于4℃的冰箱中,以备用于后续的包被培养皿以及传代时的终止消化处理;备用

[0036] (3) 往上述步骤1离心得到的下层细胞中补加生理盐水至原体积,混合均匀后,取25mL缓慢加入含有20mL淋巴细胞分离液的离心管中(需注意不要破坏两相界面),配平后,以2000rpm的转速进行离心处理20min;接着,吸取该离心管中白膜层细胞至50mL新的离心管,并补加生理盐水至45mL后,再以2000rpm的转速进行离心处理5min,弃上清,并继续用生理盐水重悬补至45mL,然后再以2000rpm的转速进行离心处理5min,弃上清,得到脐血单个核细胞。其中,上述生理盐水中氯化钠的质量百分比浓度均为0.9%。

[0037] (4) 用上述备用的自体血清包被培养皿,得到自体血清包被的培养皿,备用;具体的,先向10cm×10cm的培养皿中加入2mL自体血清,并摇晃使自体血清完全覆盖皿底;接着,在室温下,将培养皿静置30min后,吸弃多余的自体血清,并进行晾干处理,即可得到自体血清包被的培养皿。

[0038] (5) 用15mL无血清培养基重悬上述脐血间充质干细胞,并置于上述自体血清包被的培养皿中进行原代培养,培养12d后得到原代脐血间充质干细胞;其中,原代培养的细胞接种密度为 1×10^6 cells/cm²;上述的无血清培养基均可采用现有市售的Lonza无血清培养基,Lonza无血清培养基可按照其使用说明添加血清替代品及L-谷氨酰胺。

[0039] (6) 根据细胞生长情况,原代培养12d后,再往原代细胞中添加胰酶细胞消化液进行细胞消化处理后,再将消化处理后的细胞进行传代培养;其中,胰酶细胞消化液中胰酶的质量百分比浓度为0.125%;传代培养的细胞接种密度为 0.5×10^4 cells/cm²。另外,传代培养的过程中,每3~4天需更换培养基,且当细胞的融合率达到80%时,即可进行下一代的传代培养或冻存备用。

[0040] 实施例2

[0041] 该实施例提供了一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其包括以下步骤:

[0042] (1) 采集人的脐血,并在2h内将该脐血置于50mL的离心管中,配平后,以2000rpm的转速进行离心处理10min,取上层得到血浆,下层得到细胞。

[0043] (2) 将上述收集的血浆添加到新的离心管中,并置于56℃的水浴锅中进行灭活处理30min后,再以4000rpm的转速进行离心处理5min,收集上层得到自体血清,储存于4℃的冰箱中,以备用于后续的包被培养皿以及传代时的终止消化处理。

[0044] (3) 往上述步骤1离心得到的下层细胞中补加生理盐水至原体积,混合均匀后,取25mL缓慢加入含有20mL淋巴细胞分离液的离心管中(需注意不要破坏两相界面),配平后,以2000rpm的转速进行离心处理20min;接着,吸取该离心管中白膜层细胞至50mL新的离心管,并补加生理盐水至45mL后,再以2000rpm的转速进行离心处理5min,弃上清,并继续用生理盐水重悬补至45mL,然后再以2000rpm的转速进行离心处理5min,弃上清,得到脐血单个核细胞。其中,上述生理盐水中氯化钠的质量百分比浓度均为0.9%。

[0045] (4) 用上述备用的自体血清包被培养皿,得到自体血清包被的培养皿,备用;具体的,先向10cm×10cm的培养皿中加入2mL自体血清,并摇晃使自体血清完全覆盖皿底;接着,在室温下,将培养皿静置30min后,吸弃多余的自体血清,并进行晾干处理,即可得到自体血清包被的培养皿。

[0046] (5) 用15mL无血清培养基重悬上述脐血单个核细胞,并置于上述自体血清包被的培养皿中进行原代培养,得到原代脐血间充质干细胞;其中,原代培养的细胞接种密度为 2×10^6 cells/cm²;原代培养12d后,需倒掉培养皿中的培养基,并补加10mL新鲜的无血清培养基进行培养;上述的无血清培养基均可采用现有市售的Lonza无血清培养基,Lonza无血清培养基可按照其使用说明添加血清替代品及L-谷氨酰胺。

[0047] (6) 根据细胞生长情况,原代培养12d后,再往原代细胞中添加胰酶细胞消化液进行细胞消化处理后,再将消化处理后的细胞进行传代培养;其中,胰酶细胞消化液中胰酶的质量百分比浓度为0.125%;传代培养的细胞接种密度为 1×10^4 cells/cm²。另外,传代培养的过程中,每3~4天需更换培养基,且当细胞的融合率达到90%时,即可进行下一代的传代培养或冻存备用。

[0048] 实施例3

[0049] 该实施例提供了一种脐血间充质干细胞的分离培养方法,其包括以下步骤:

[0050] (1) 采集人的脐血,并在2h内将该脐血置于50mL的离心管中,配平后,以2000rpm的转速进行离心处理10min,取上层得到血浆,下层得到细胞。

[0051] (2) 将上述收集的血浆添加到新的离心管中,并置于56℃的水浴锅中进行灭活处理30min后,再以4000rpm的转速进行离心处理5min,收集上层得到自体血清,储存于4℃的冰箱中,以备用于后续的包被培养皿以及传代时的终止消化处理。

[0052] (3) 往上述步骤1得到的下层细胞中补加生理盐水至原体积,混合均匀后,取25mL缓慢加入含有20mL淋巴细胞分离液的离心管中(需注意不要破坏两相界面),配平后,以2000rpm的转速进行离心处理20min;接着,吸取该离心管中白膜层细胞至50mL新的离心管,并补加生理盐水至45mL后,再以2000rpm的转速进行离心处理5min,弃上清,并继续用生理盐水重悬补至45mL,然后再以2000rpm的转速进行离心处理5min,弃上清,得到脐血单个核细胞。其中,上述生理盐水中氯化钠的质量百分比浓度均为0.9%。

[0053] (4) 用上述备用的自体血清包被培养皿,得到自体血清包被的培养皿,备用;具体的,先向10cm×10cm的培养皿中加入2mL自体血清,并摇晃使自体血清完全覆盖皿底;接着,在室温下,将培养皿静置30min后,吸弃多余的自体血清,并进行晾干处理,即可得到自体血清包被的培养皿。

[0054] (5) 用15mL无血清培养基重悬上述脐血单个核细胞,并置于上述自体血清包被的培养皿中进行原代培养,得到原代细胞;其中,原代培养的细胞接种密度为 1.5×10^6 cells/

cm²; 原代培养12d后, 需倒掉培养皿中的培养基, 并补加10mL新鲜的无血清培养基进行培养; 上述的无血清培养基均可采用现有市售的Lonza无血清培养基, Lonza无血清培养基可按照其使用说明添加血清替代品及L-谷氨酰胺。

[0055] (6) 根据细胞生长情况, 原代培养12d后, 再往原代细胞中添加胰酶细胞消化液进行细胞消化处理后, 再将消化处理后的细胞进行传代培养; 其中, 胰酶细胞消化液中胰酶的质量百分比浓度为0.125%; 传代培养的细胞接种密度为 0.8×10^4 cells/cm²。另外, 传代培养的过程中, 每3~4天需更换培养基, 且当细胞的融合率达到85%时, 即可进行下一代的传代培养或冻存备用。

[0056] 对上述实施例3传代培养得到的脐血间充质干细胞分别进行以下实验:

[0057] 一、使用赛业生物市售的脐血间充质干细胞成骨试剂盒(包括脐血间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基)上述传代培养的脐血间充质干细胞进行成骨能力测试, 具体包括以下步骤:

[0058] (1) 将上述传代培养得到的脐血间充质干细胞置于37℃, 5%CO₂的培养箱中进行培养; 当细胞融合度达到85%时, 用含0.25%胰酶和0.04%乙二胺四乙酸(EDTA)的细胞消化液进行消化。

[0059] (2) 将消化下来的脐血间充质干细胞按照 2×10^4 cells/cm²的细胞密度接种在事先包被0.1%明胶的六孔板中, 并在每孔加入2mL完全培养基, 然后置于37℃, 5%CO₂的培养箱中进行培养; 当细胞融合度达到65%时, 小心地将孔内完全培养基吸走, 并向六孔板中加入2mL的脐血间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基进行诱导。每隔3天换用新鲜的脐血间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基(使用前需预热至37℃)。

[0060] (3) 诱导3周后, 视细胞的形态变化及生长情况, 并用茜素红进行染色。

[0061] (4) 成骨诱导分化结束后, 吸走六孔板中的成骨诱导分化完全培养基, 用1×磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗2次, 接着, 每孔加入2mL的4%中性甲醛溶液进行固定30min后, 再吸走中性甲醛溶液, 并用1×PBS冲洗2次, 然后, 每孔中加入1mL茜素红染液染色处理4min。

[0062] (5) 吸走茜素红染液, 并用1×PBS冲洗2次, 然后, 将上述六孔板置于显微镜下观察成骨染色效果, 如附图2所示, 从图中可以看出, 本发明实施例分离培养得到的脐血间充质干细胞具有良好的成骨能力。另外, 未染色的六孔板在显微镜下的观察照片如附图1所示。

[0063] 二、使用赛业生物市售的脐血间充质干细胞成脂试剂盒(包括脐血间充质干细胞成脂诱导分化培养基A液和脐血间充质干细胞成脂诱导分化培养基B液)对上述传代培养的脐血间充质干细胞进行成脂能力测试, 具体包括以下步骤:

[0064] (1) 将上述传代培养得到的脐血间充质干细胞置于37℃, 5%CO₂的培养箱中进行培养; 当细胞融合度达到85%时, 用含0.25%胰酶和0.04%乙二胺四乙酸(EDTA)的细胞消化液进行消化。

[0065] (2) 将消化下来的脐血间充质干细胞按照 2×10^4 cells/cm²的细胞密度接种在事先包被0.1%明胶的六孔板中, 并在每孔加入2mL完全培养基, 然后置于37℃, 5%CO₂的培养箱中进行培养; 每隔三天换液, 直到细胞融合度达到100%或者过融合后, 再小心地将间充质干细胞完全培养基吸走, 并向六孔板中加入2mL脐血间充质干细胞成脂诱导分化培养基A液进行诱导。

[0066] (3) 用A液诱导3天后, 吸走六孔板中的A液, 接着, 加入2mL脐血间充质干细胞成脂

诱导分化培养基B液进行诱导24h后,再吸走B液,换回A液进行诱导;A液和B液交替作用4次后(16天),继续用B液维持培养5天直到脂滴变得足够大、圆,完成对脐血间充质干细胞成脂诱导分化。其中,B液维持培养期间,每隔2天需要换用新鲜的B液。

[0067] (4) 成脂诱导分化结束后,吸走六孔板中的A液和B液,并用1×PBS冲洗2次,接着,每孔加入2mL的4%中性甲醛溶液进行固定30min后,再吸走中性甲醛溶液,并用1×PBS冲洗2次;然后,每孔中加入1mL的油红O染料工作液染色30min后(油红O染料工作液配制方法为:将油红O贮存液和蒸馏水按照3:2的体积比混匀后,再用中性滤纸过滤即可得到),再吸走油红O染液,并用1×PBS冲洗3次。

[0068] (5) 将上述冲洗后的六孔板置于显微镜下观察成脂染色效果,如附图3所示,从图中可以看出,本发明实施例分离培养得到的脐血间充质干细胞具有良好的成脂能力。

[0069] 三、使用流式检测法检测上述传代培养得到的脐血间充质干细胞的表面标志物,具体包括以下步骤:

[0070] (1) 取上述实施例3传代培养得到的第5代单细胞悬液,并置于1000rpm转速下离心5min,弃上清,得到细胞沉淀。

[0071] (2) 用PBS重悬细胞沉淀,将细胞浓度调节为 1.0×10^6 cells/100 μ L,得到细胞液。

[0072] (3) 分别往上述细胞液中添加抗体CD105+、CD166+、CD34-、CD45-进行混匀,并置于4 $^{\circ}$ C避光孵育30min,同时,设置二组同型对照组(IgG-PE和IgG-FITC);

[0073] (4) 将上述添加抗体的细胞液和1mL的PBS加入到流式检测管中,并置于1000rpm转速下离心5min,弃上清;然后,添加100 μ L的PBS,轻轻吹打混匀后,用流式细胞仪进行上机检测。其中,流式检测的散点图如附图4所示,同型对照组(IgG-PE)的测试结果如附图5所示,同型对照组(IgG-FITC)的测试结果如附图6所示,CD34-PE的测试结果附图7所示,CD45-FITC的测试结果附图8所示,CD105-PE的测试结果附图9所示,CD166-PE的测试结果附图10所示。从图可以看出,各抗体的流式检测结果如下表1所示。

[0074] 表1

抗体	颗粒数	总数/%	父群/%
CD34-	106	1.06	1.79
CD45-	76	0.76	1.28
CD105+	6583	68.83	95.91
CD166+	6285	62.85	94.48

[0076] 从上表1可以看出,本发明实施例分离培养得到的脐血间充质干细胞用流式检测表面抗体CD105+和CD166+均可达到94%以上。其中,上表1中的颗粒数表示表达某种抗原的细胞总数;总数表示被用于流式检测的所有细胞数;父群表示图4中用黑色线条框定区域用于分析结果的细胞数,其说明本发明实施例分离得到的细胞就是间充质干细胞。

[0077] 以上述依据本发明的理想实施例为启示,通过上述的说明内容,相关工作人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内,进行多样的变更以及修改。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容,必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。



图1

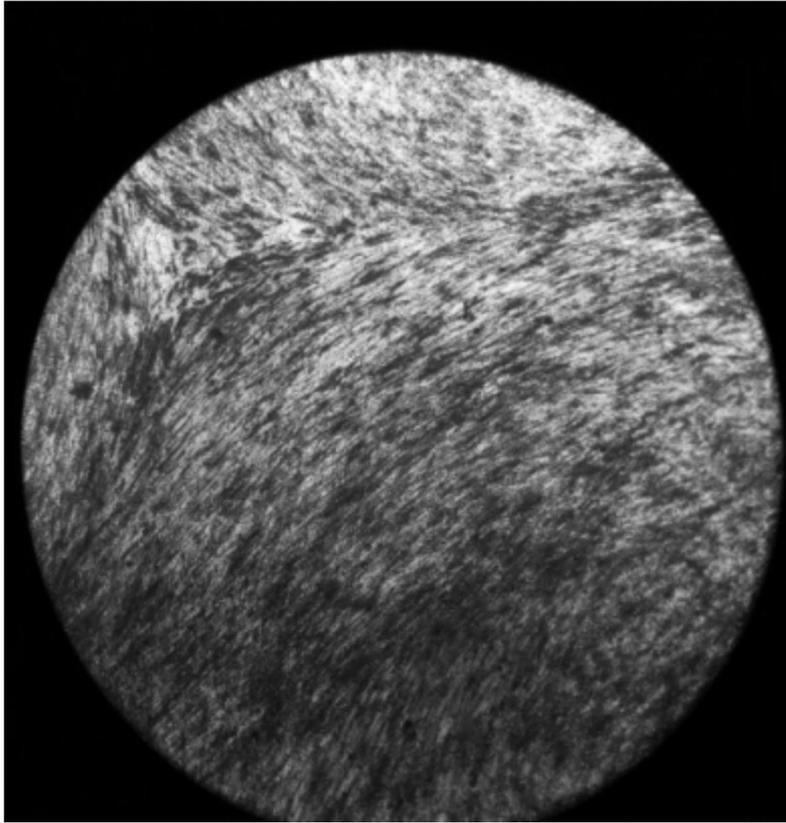


图2

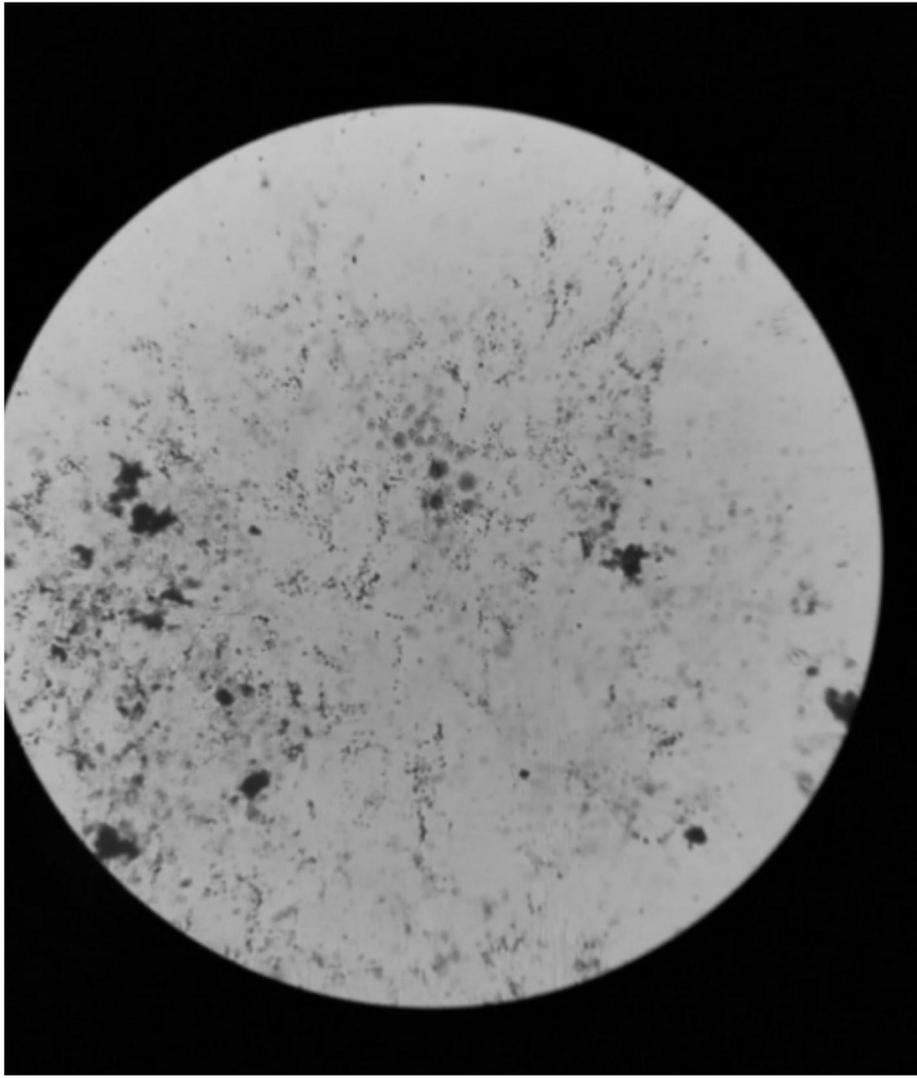


图3

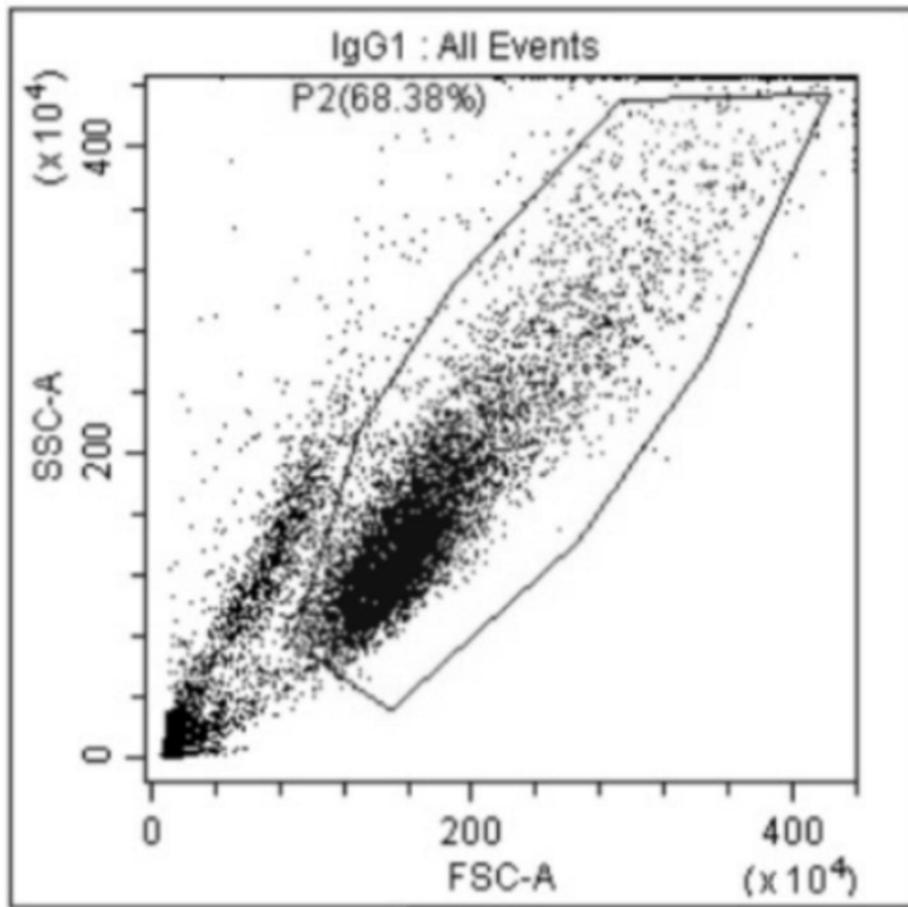


图4

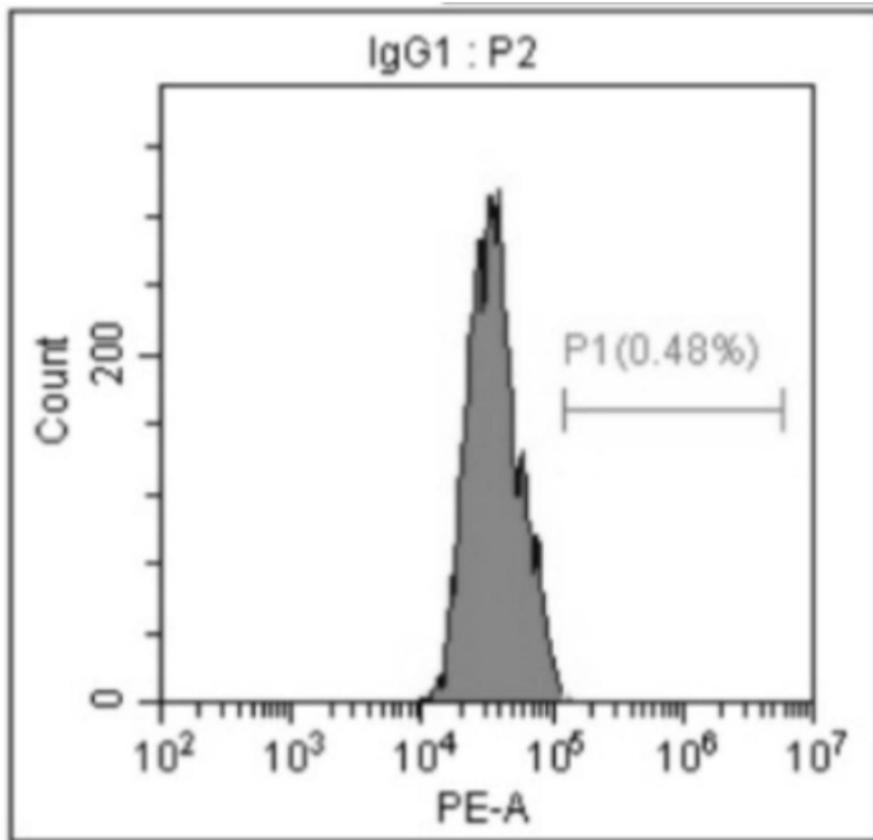


图5

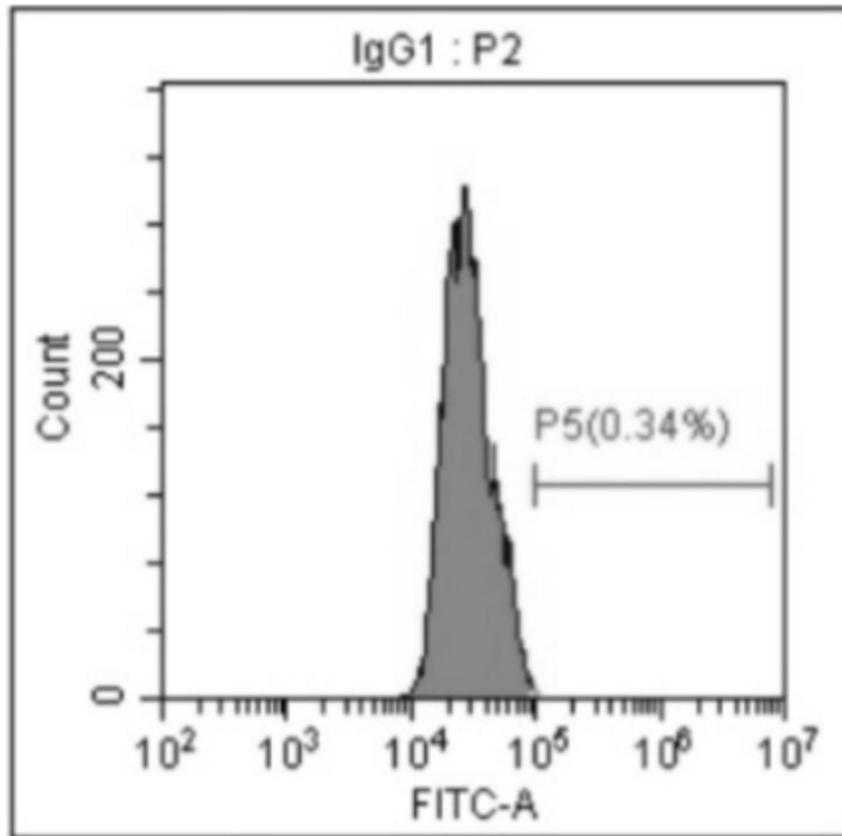


图6

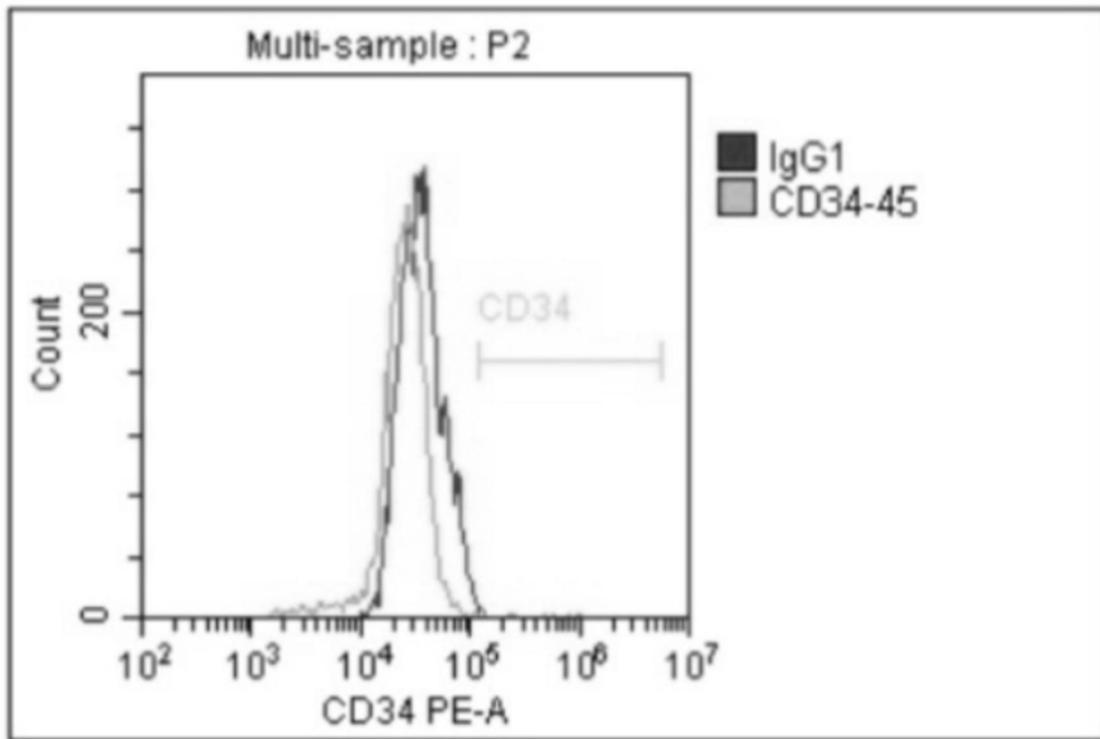


图7

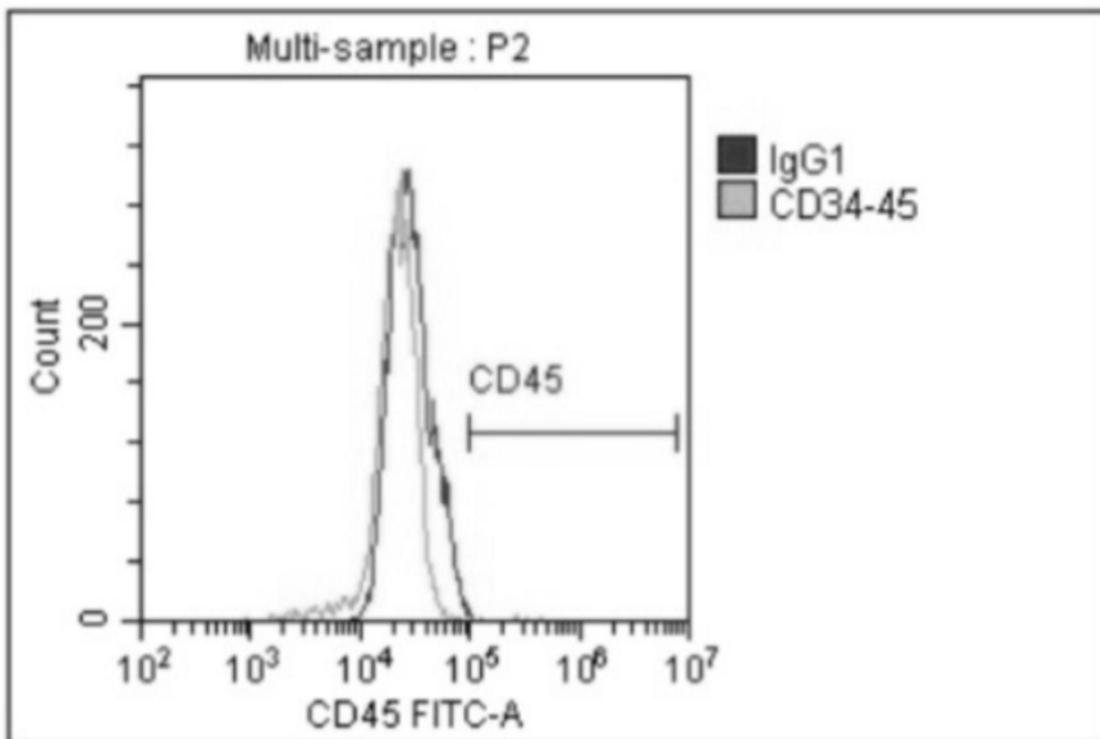


图8

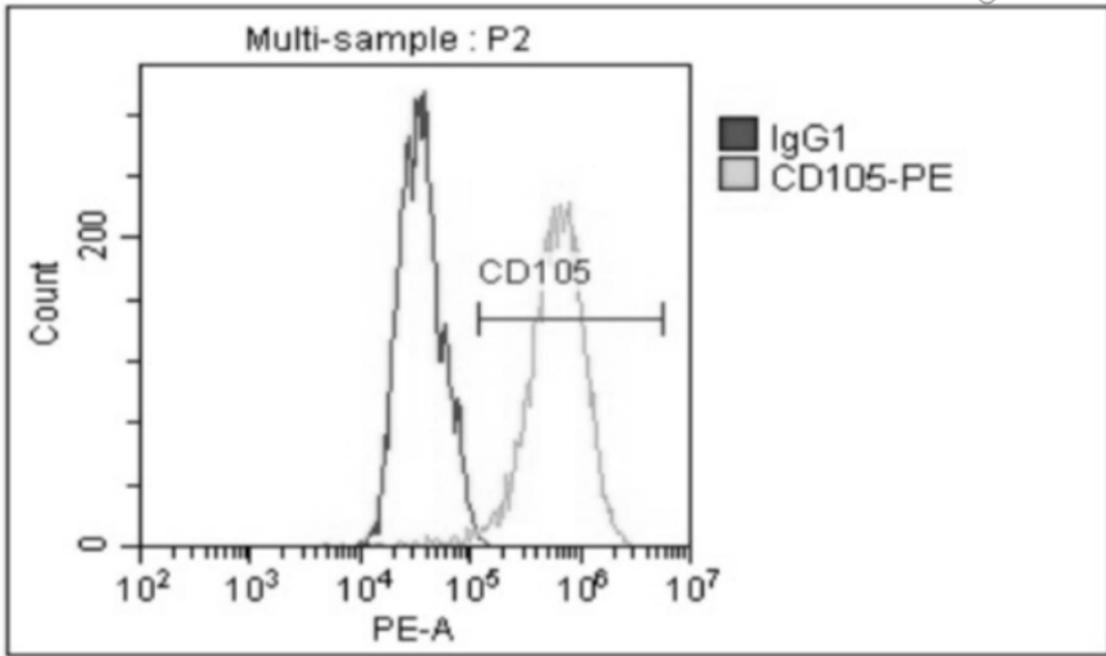


图9

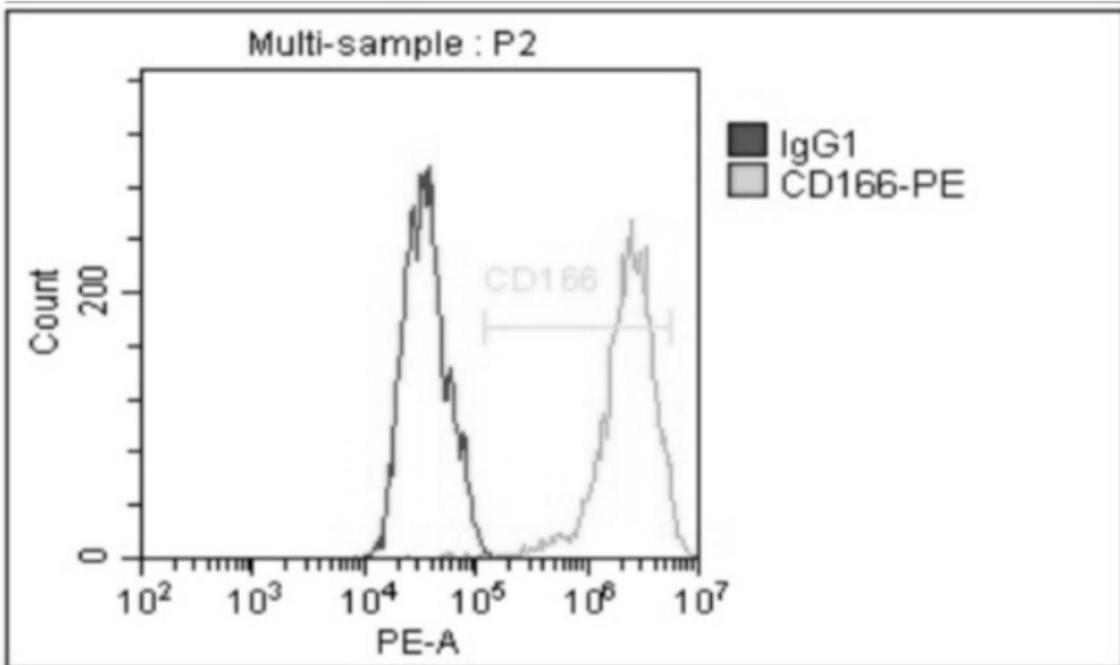


图10