



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113450873 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 08

(21) 申请号 202110531705.6

G16H 50/20 (2018.01)

(22) 申请日 2021.05.14

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 101386886 A, 2009.03.18

申请公布号 CN 113450873 A

CN 102175850 A, 2011.09.07

(43) 申请公布日 2021.09.28

CN 110499364 A, 2019.11.26

CN 112011616 A, 2020.12.01

(73) 专利权人 山东大学

审查员 刘坛首

地址 250199 山东省济南市历城区山大南路27号

(72) 发明人 贾继辉 刘奋 杨宗澄 付悦

(74) 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司 37219

专利代理师 陈桂玲

(51) Int. Cl.

G16B 30/00 (2019.01)

G16B 40/30 (2019.01)

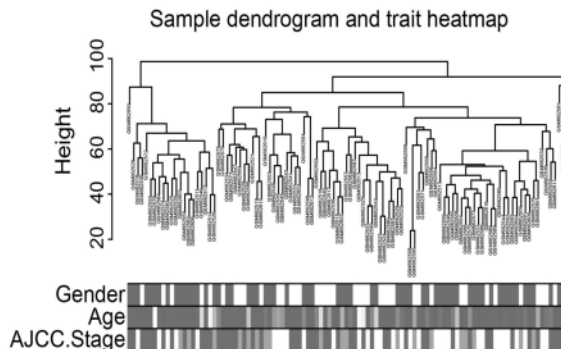
权利要求书1页 说明书6页 附图15页

(54) 发明名称

一种预测胃癌预后和免疫治疗适用性的标志物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种预测胃癌预后和免疫治疗适用性的标志物及其应用。所述标志物为mRNA标志物,所述mRNA标志物由APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXYLT2和SMPX组成。本发明还公开了预测胃癌预后和免疫治疗适用性的试剂盒,以及一种预测胃癌预后和免疫治疗适用性的方法。本发明通过生物信息学的技术找到与胃癌进展相关标志物APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXYLT2和SMPX,然后根据这7个基因构建的风险模型,进而获得风险评分,通过风险评分能预测胃癌的预后和预测免疫治疗的适用性,为分析胃癌患者的预后以及免疫治疗提供了可靠的方法。



1. 一种预测胃癌预后和免疫治疗适用性的标志物,其特征在于,所述标志物为mRNA标志物,所述mRNA标志物由APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXYLT2和SMPX组成;所述mRNA标志物通过风险评分计算公式计算出风险评分后预测预测胃癌预后和免疫治疗适用性;

所述风险评分计算公式为:风险评分=(0.1491×APOD的表达水平)+(0.3341×APOE的表达水平)+(-0.5133×CCDC80的表达水平)+(0.1787×CTHRC1的表达水平)+(0.4312×FERMT2的表达水平)+(0.1498×GXYLT2的表达水平)+(0.1102×SMPX的表达水平)。

2. 权利要求1所述的预测胃癌预后和免疫治疗适用性的标志物的应用,其特征在于,所述应用包括评价或预测预后风险、预测免疫治疗适用性、预测生存率、制定治疗/用药方案、构建预测胃癌预后风险的模型、构建免疫治疗适用性的模型、构建预测胃癌生存率的模型、制备用于预测胃癌预后风险的检测试剂或装置、制备预测胃癌生存率的检测试剂或装置中的任意一种或几种的组合。

3. 一种预测胃癌预后和免疫治疗风险的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含有权利要求1所述的标志物和风险评分计算公式。

4. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,使用所述试剂盒预测胃癌预后的方法,所述方法的步骤如下:

(1) 检测胃癌患者样本中APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXYLT2、SMPX的表达水平;

(2) 将步骤(1)所得的表达水平代入权利要求1所述的风险评分计算公式中,计算出风险评分;当风险评分高于cut-off值时,该胃癌患者属于高风险组,提示该胃癌患者预后不良,生存期短;当风险评分低于cut-off值时,该胃癌患者属于低风险组,提示该胃癌患者预后良好,生存期长。

5. 如权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述样本包括组织、体液;所述样本风险评分的cut-off值是风险评分的中位数。

6. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,用所述试剂盒预测免疫治疗风险的方法,所述方法包括如下步骤:

(1) 检测胃癌患者样本中APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXYLT2、SMPX的表达水平;

(2) 将步骤(1)所得的表达水平代入权利要求1所述的风险评分计算公式中,计算出风险评分;当风险评分高于cut-off值时,该胃癌患者属于高风险组,提示该胃癌患者适用于免疫治疗,当风险评分低于cut-off值时,该胃癌患者属于低风险组,提示该胃癌患者不适用于免疫治疗。

7. 如权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述样本包括组织、体液;所述样本风险评分的cut-off值是风险评分的中位数。

8. 如权利要求5或权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述体液为血液。

9. 一种胃癌生存率预测模型,其特征在于,所述预测模型根据权利要求1所述风险评分计算公式得出的风险评分结合年龄和患者分期构建列线图得到。

10. 如权利要求9所述的预测模型,其特征在于,所述预测模型可以预测患有胃癌后1年、3年、5年的生存率。

一种预测胃癌预后和免疫治疗适用性的标志物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种预测胃癌预后和免疫治疗适用性的标志物及其应用,属于生物医学领域。

背景技术

[0002] 胃癌是全球第五大常见癌症,也是第三大癌症相关死亡的原因。许多患者被诊断时已是晚期,另外25%-50%的患者在病程中会发生转移。尽管治疗方法不断改进,转移性胃癌的5年生存率仅为5%-20%。免疫治疗在胃癌中有着广阔的应用前景,免疫检查点阻断是目前公认的治疗化疗难治性胃癌的一种方法。单独或联合应用免疫治疗对胃癌的治疗有积极的影响,但由于胃癌的高度异质性,患者在免疫治疗期间的应答率并不令人满意。因此,有必要寻找生物标志物来确定最有可能对特异性免疫治疗有反应的胃癌亚群。

[0003] 肿瘤微环境(TME)由细胞和非细胞成分组成,包括外周血管、免疫细胞、成纤维细胞、肿瘤干细胞和细胞外基质(ECM)。研究充分表明,肿瘤的生长不仅依赖于原始癌细胞中异常遗传物质的积累,还依赖于TME,TME为癌细胞的生存、生长和迁移提供了条件。TME中的免疫细胞,尤其是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),已成为许多实体瘤的预后和预测因素。此外,TME中的免疫细胞也是影响免疫治疗反应的重要因素。TME中的免疫细胞在肿瘤的发生发展中起着重要的作用,肿瘤相关的免疫细胞可以拮抗或促进肿瘤的进展,具体作用取决于免疫细胞的组成和比例。与传统化疗相比,免疫治疗主要利用免疫细胞特异性识别和攻击癌细胞。因此,通过分析胃癌患者组织中免疫细胞的组成和比例,可以评价患者是否能从免疫治疗中获益。

[0004] 目前,美国癌症联合委员会(AJCC)分期仍是胃癌最基本的预后预测工具,高分期提示预后不良。然而,由于胃癌的高度异质性,同一肿瘤淋巴结转移(TNM)分期的患者可能有不同的预后。同样,患者对免疫治疗反应的差异也可能与其遗传和分子背景有关。因此,有必要充分了解每位患者的具体特点,综合其他重要因素,进行个体化治疗和预后预测。通过对大规模基因组或转录组数据的生物信息学分析,可以筛选出与胃癌发生、发展和预后相关的分子标记物,为精准医学提供可靠的治疗靶点,在个性化治疗和预后预测方面具有优势,前景广阔。

发明内容

[0005] 术语说明:

[0006] 表达水平:是指特定的mRNA序列从其基因组基因座被转录的程度,即mRNA在一个或多个被分析血清中的浓度。

[0007] 针对现有技术的不足,本发明提供一种预测胃癌预后和免疫治疗适用性的标志物及其应用。

[0008] 本发明的技术方案如下:

[0009] 一种预测胃癌预后和免疫治疗适用性的标志物,其特征在于,所述标志物为mRNA

标志物,所述mRNA标志物由APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXylT2和SMPX组成。

[0010] 本发明的预测胃癌预后和免疫治疗适用性的标志物的应用采用如下技术方案:如上所述的标志物在预测胃癌预后和预测免疫治疗适用性中的应用;所述应用包括但不限于评价或预测预后风险、预测免疫治疗适用性、预测生存率、制定治疗/用药方案、构建预测胃癌预后风险的模型、构建免疫治疗适用性的模型、构建预测胃癌生存率的模型、制备用于预测胃癌预后风险的检测试剂或装置、制备预测胃癌生存率的检测试剂或装置中的任意一种或几种的组合。

[0011] 一种预测胃癌预后和免疫治疗风险的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含有上述标志物和一个风险模型,所述风险模型包括风险评分计算公式,所述风险评分计算公式如下:风险评分 = $(0.1491 \times \text{APOD 的表达水平}) + (0.3341 \times \text{APOE 的表达水平}) + (-0.5133 \times \text{CCDC80 的表达水平}) + (0.1787 \times \text{CTHRC1 的表达水平}) + (0.4312 \times \text{FERMT2 的表达水平}) + (0.1498 \times \text{GXylT2 的表达水平}) + (0.1102 \times \text{SMPX 的表达水平})$ 。

[0012] 根据本发明优选的,使用所述试剂盒预测胃癌预后的方法,所述方法的步骤如下:

[0013] (1) 检测胃癌患者样本中APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXylT2、SMPX的表达水平;

[0014] (2) 将步骤(1)所得的表达水平代入风险评分计算公式中,计算出风险评分;当风险评分高于cut-off值时,该胃癌患者属于高风险组,提示该胃癌患者预后不良,生存期短;当风险评分低于cut-off值时,该胃癌患者属于低风险组,提示该胃癌患者预后良好,生存期长。

[0015] 进一步,所述样本包括但不限于组织、体液。在本发明的具体实施方案中,所述样本是体液,体液具体是血液;

[0016] 进一步优选的,所述cut-off值是风险评分的中位数。

[0017] 根据本发明的又一个方面,使用所述试剂盒预测免疫治疗风险的方法,所述方法包括如下步骤:

[0018] (1) 检测胃癌患者样本中APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXylT2、SMPX的表达水平;

[0019] (2) 将步骤(1)所得的表达水平代入风险评分计算公式中,计算出风险评分;当风险评分高于cut-off值时,该胃癌患者属于高风险组,提示该胃癌患者适用于免疫治疗,当风险评分低于cut-off值时,该胃癌患者属于低风险组,提示该胃癌患者不适用于免疫治疗。

[0020] 进一步,所述样本包括但不限于组织、体液。在本发明的具体实施方案中,所述样本是体液,体液具体是血液;

[0021] 进一步优选的,所述样本风险评分的cut-off值是风险评分的中位数。

[0022] 一种胃癌生存率预测模型,其特征在于,所述预测模型根据上述风险模型得出的风险评分结合年龄和患者分期构建列线图得到。

[0023] 进一步优选的,所述预测模型可以预测患有胃癌后1年、3年、5年的生存率。

[0024] 本发明上述7个基因的表达水平的测定遵循本领域熟知的已建立的标准程序(Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. et al. (2001)

Current Protocols in Molecular Biology. Wiley&Sons, Hoboken, NJ)。所述的测定可以在RNA水平进行,例如使用mRNA的探针进行Northern印记分析,或者在RNA逆转录后检测cDNA水平,例如通过实时荧光定量PCR技术。

[0025] 本发明中公开的APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXYLT2和SMPX的序列均储存基因表达综合数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中。

[0026] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0027] 本发明通过生物信息学的技术找到与胃癌进展相关标志物APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXYLT2和SMPX,然后根据这7个基因构建的风险模型,进而获得风险评分,通过风险评分能预测胃癌的预后和预测免疫治疗的适用性;并且进一步结合年龄、患者分期构建胃癌生存率预测模型,能够有效预测胃癌患者1年,3年,5年的生存率。

[0028] 本发明提出一种由7个基因作为生物标志物构成的预测胃癌患者的预后的模型。本发明为分析胃癌患者的预后以及免疫治疗提供了可靠的方法。

附图说明:

[0029] 图1、显示树状图和临床特征热图的邻接矩阵图。

[0030] 图2、显示选择最优软阈值的无尺度网络图;A:显示了无标度拟合指数(y轴)和软阈值(x轴)的关系,B:平均连接性(y轴)和软阈值(x轴)的关系。

[0031] 图3、基于拓扑重叠的相似基因层次聚类树状图。

[0032] 图4、模块特征基因与胃癌临床特征相关性的热图。

[0033] 图5、蛋白质相互作用(PPI)分析午夜蓝模块基因得到两个子网络图;A:子网络1, B:子网络2图6、午夜蓝模块中基因的模块识别身份与分期相关性散点图。

[0034] 图7、显示子网络1与模块识别身份(大于0.8)和临床分期(大于0.2)的基因交集图。

[0035] 图8、显示一致性聚类图(k=2)。

[0036] 图9、显示LASSO回归分析图。

[0037] 图10、显示用于建模的7-基因多因素分析图。

[0038] 图11、显示训练集中不同风险组患者的Kaplan-Meier生存分析图。

[0039] 图12、显示训练集中不同风险评分患者的时间依赖性ROC分析图。

[0040] 图13、显示验证集中不同风险组患者的Kaplan-Meier生存分析图。

[0041] 图14、显示GSE84437数据集中不同风险组患者的Kaplan-Meier生存分析图。

[0042] 图15、显示TCGA数据集中不同风险组患者的Kaplan-Meier生存分析图。

[0043] 图16、显示GSE15459数据集中不同风险组患者的Kaplan-Meier生存分析图。

[0044] 图17、显示GSE15460数据集中不同风险组患者的Kaplan-Meier生存分析图。

[0045] 图18、显示GSE62254数据集中不同风险组患者的Kaplan-Meier生存分析图。

[0046] 图19、显示风险分数临床因素的单因素和多因素分析图。

[0047] 图20、显示风险分数结合临床因素构建列线图。

[0048] 图21、显示列线图预测1年生存率的校正图。

[0049] 图22、显示列线图预测3年生存率的校正图。

[0050] 图23、显示列线图预测5年生存率的校正图。

- [0051] 图24、显示基于年龄、分期和风险评分的胃癌患者1年生存期的依赖性ROC分析图。
- [0052] 图25、显示基于年龄、分期和风险评分的胃癌患者3年生存期的依赖性ROC分析图。
- [0053] 图26、显示基于年龄、分期和风险评分的胃癌患者5年生存期的依赖性ROC分析图。
- [0054] 图27、显示高低风险组患者基质评分、免疫评分和总评分图。
- [0055] 图28、显示风险分数与肿瘤纯度相关性分析图。
- [0056] 图29、显示ssGSEA将胃癌患者分为高低免疫组结果图。
- [0057] 图30、显示高低风险组与高低免疫组卡方分析柱状图。
- [0058] 图31、高低风险组不同免疫标签差异图。
- [0059] 图32、高低风险组免疫抑制性检查点表达差异分析图。

具体实施方式：

[0060] 下面结合附图和实施例详细描述本发明，以下所述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，在不脱离本发明方法的前提下，还可以做出若干改进和补充，这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

[0061] 以下实施例中所涉及affy软件包、input R软件包、limma软件包、WGCNA R软件包、sva R软件包、rms R软件包、survcomp软件包和survival软件包均为现有技术，来源于<https://cran.r-project.org>或<http://www.bioconductor.org/>，加载后在R软件中运行。

[0062] 实施例1胃癌相关基因数据下载

[0063] 从基因表达综合数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载胃癌转录组芯片原始数据和临床数据GSE26901 (n=109)、GSE15460 (n=248)、GSE62254 (n=300)、GSE15459 (n=192)、GSE84437 (n=433)。从癌症基因组图谱 (TCGA) 下载胃癌转录组FPKM测序数据和临床数据。

[0064] 使用affy软件包和input R软件包处理转录组FPKM测序数据，使用limma软件包进行差异基因表达分析。使用ESTIMATE (利用表达数据估计恶性肿瘤组织中的基质和免疫细胞) 算法对肿瘤免疫微环境中基质和免疫细胞的浸润评估。使用sva R软件包将GSE62254和GSE15460数据集结合起来以消除批次效应，共获得548份样品。然后随机抽取276个样本作为训练集，其余272个样本作为验证集。采用gsva软件包基于29个免疫相关基因集对训练集进行ssGSEA (单样本基因富集分析) 分析，并根据得分使用sparcl R软件包对训练集进行层次聚类，将训练集分成高免疫组和低免疫组。

[0065] 实施例2胃癌相关基因数据处理

[0066] 2.1加权基因共表达网络 (WGCNA) 的构建

[0067] 利用WGCNA R软件包构建GSE26901基因表达的数据矩阵，选择方差在前25%的基因作为后续WGCNA的输入数据集。然后使用层次聚类剔除异常样本，然后构建无尺度网络，并计算基因的相异度，根据相异度将具有相似表达谱的基因进行模块化，计算模块与胃癌临床表型的相关性。

[0068] 2.2鉴定核心模块

[0069] 将模块中的基因输入到STRING (检索相互作用基因/蛋白质的搜索工具) 网站进行PPI (蛋白与蛋白相互作用) 分析，得到PPI评分，然后将PPI评分输入到Cytoscape中用MCODE插件进行分析，最后得到了两个子网路。

[0070] 2.3 风险模型的构建与验证

[0071] 首先,使用sva R软件包将GSE62254和GSE15460数据集合并后消除批次效应,共获得548个胃癌患者样本。随机选取276个胃癌患者样本作为训练集,剩余272个胃癌患者样本作为验证集。用survival软件包对训练集和验证集的差异基因进行单变量Cox回归分析,用glmnet软件包进行LASSO(最小绝对收缩和选择运算)回归分析,最后建立多因素Cox风险模型,并得到风险评分。

[0072] 2.4 构建和评估列线图

[0073] 使用rms R软件包根据风险评分、年龄和患者分期建立列线图和校准图。

[0074] 2.5 统计分析

[0075] 使用rms R软件包在R软件中绘制生存曲线并进行统计分析,使用survcomp软件包和survival软件包绘制ROC曲线并计算AUC值。

[0076] 实施例3 预后风险模型的构建

[0077] 3.1 WGCNA鉴定了与肿瘤进展相关的模块,并进一步筛选了核心基因。

[0078] 为了鉴定与胃癌进展相关的基因,使用WGCNA在GSE26901中构建了一个共表达网络。在去除5个离群胃癌患者样本后,剩余的104个胃癌患者样本被用来构建邻接矩阵图(图1)。选择 $\beta=9$ 作为软阈值来构建无尺度网络图(图2),最后构建了10个基因共表达模块(图3)。通过计算基因共表达模块与临床特征的相关性,发现midnight-blue模块与AJCC-分期相关性最强(图4)。为了获得核心基因,继续在STRING网站上分析了midnight-blue模块中的PPI网络,将结果导入Cytoscape软件,用MCODE插件进行处理后,获得两个子网络subnet1和subnet2(图5)。然后进一步选择更多基因的subnet1共33个基因作为研究对象。同时考虑midnight-blue模块中基因的重要性和临床分期的相关性,选择模块识别身份大于0.8,且与AJCC分期相关性大于0.2的基因16个基因(图6)。当上述两者基因取交集共得到9个核心基因(图7)。

[0079] 3.2 建立预后风险模型

[0080] 使用一致性聚类软件包根据9个基因表达值对胃癌患者样本聚类,将患者分成两类(图8)。接下来对两类患者的mRNA表达谱进行差异分析,共获得200个差异表达的基因($FDR < 0.05, |\log_2 \text{FoldChange}| > 1$),其中174个基因上调,26个基因下调。在训练集中对200个差异表达基因进行单因素Cox分析,得到88个具有预后价值的基因($P < 0.01$),使用LASSO回归分析去除共线性基因(图9),得到10个基因,经过多变量Cox回归优化后得到7个miRNA基因APOD、APOE、CCDC80、CTHRC1、FERMT2、GXYLT2和SMPX(图10),根据Cox的回归系数和优化的7个基因,得到风险评分公式:风险评分 = $(0.1491 \times \text{APOD}) + (0.3341 \times \text{APOE}) + (-0.5133 \times \text{CCDC80}) + (0.1787 \times \text{CTHRC1}) + (0.4312 \times \text{FERMT2}) + (0.1498 \times \text{GXYLT2}) + (0.1102 \times \text{SMPX})$,构建了风险模型。根据中位风险评分,将训练集中的患者分为高风险组和低风险组。Kaplan-Meier生存分析显示,高风险组患者的预后比低风险组差(图11)。时间依赖的ROC曲线显示,3年、5年的曲线下面积(AUC)值分别为0.759和0.738(图12),表明风险评分能够以较高的准确性预测患者生存率。接下来在验证集、GSE15459、GSE15460、GSE62254、GSE84437(此数据也是从基因表达综合数据库中下载)和TCGA数据集中进行验证,Kaplan-Meier总生存曲线显示高风险组预后不良(图13-18)。

[0081] 3.3 风险模型的临床价值

[0082] 结合性别、年龄、肿瘤分期以及劳伦分型在训练集中进行单变量Cox回归分析,发现年龄、患者分期和风险评分具有显著的预后意义(图19)。多变量Cox回归分析的结果表明,风险评分可以作为一个独立的预后因素(图19)。然后在训练集中构建了一个列线图,它综合了年龄,患者分期和风险评分(图20)。三个校准图中的线段都接近45度线,表明列线图在1年、3年和5年都显示出良好的预测性能(图21-23)。C-指数(一致性指数)为0.766,95%置信区间(CI)为0.730-0.801。ROC分析用于评估列线图的预测准确性:1年、3年和5年线图的曲线下面积(AUC)值分别为0.846、0.849和0.845(图24-26)。以上结果均表明列线图具有良好的预测性能。

[0083] 实施例4风险模型与免疫治疗适用性关系

[0084] 比较GSE62254数据集中高低风险组肿瘤微环境的差异。结果显示,高风险组的免疫评分、基质评分和总评分明显高于低风险组(图27),而肿瘤纯度与风险评分显著负相关(图28)。接下来使用ssGSEA根据GSE62254中的29个免疫特征将样本分为高免疫组和低免疫组(图29),卡方分析检验结果显示,高风险组中高免疫患者比例较高,而低风险组中低风险患者比例更高(图30)。进一步比较高风险组和低风险组中29种免疫特征的差异,发现大多数特征,如免疫应答相关特征、CD8+T细胞、NK细胞、检查点、TIL和IFN应答,在高风险组中表达水平较高(图31)。继续比较高低风险组免疫抑制性检查点分子的表达水平。发现高风险组的免疫检查点分子表达水平显著高于低风险组(图32)。以上结果表明,高风险组患者比低风险组患者更能从免疫治疗中获益,高风险组患者比低风险组患者更适合进行免疫治疗。

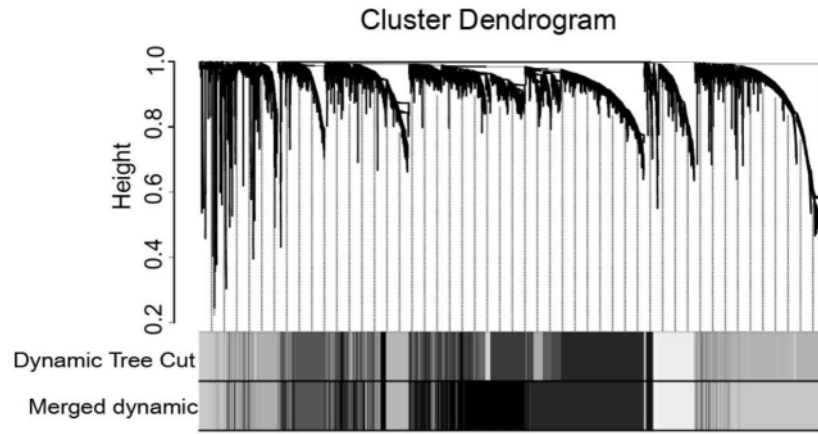


图3

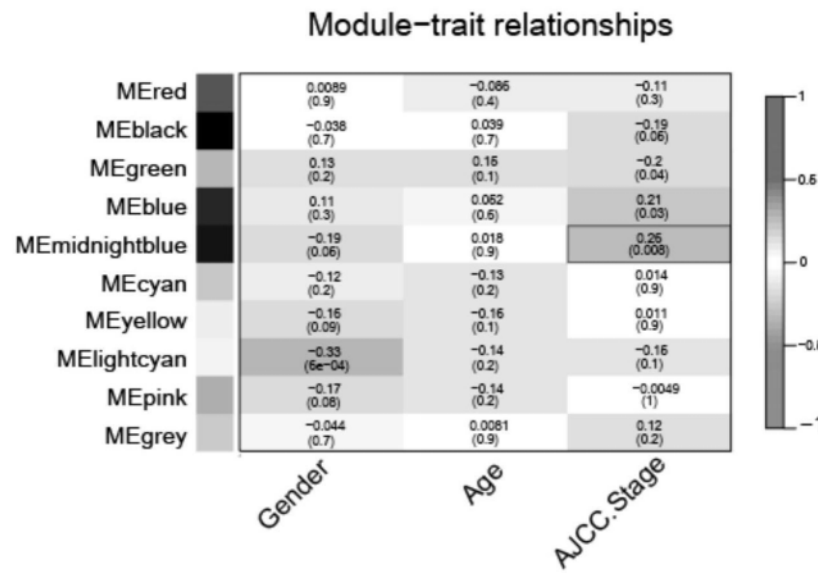


图4

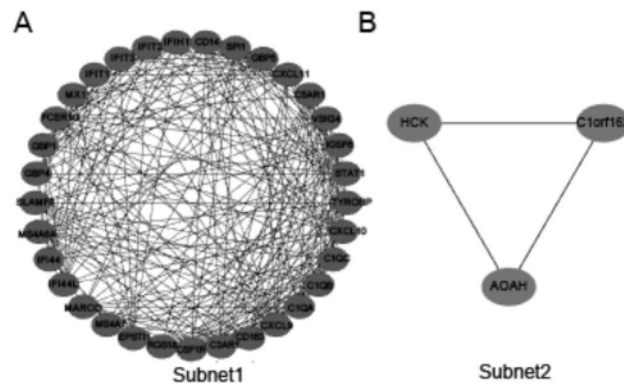


图5

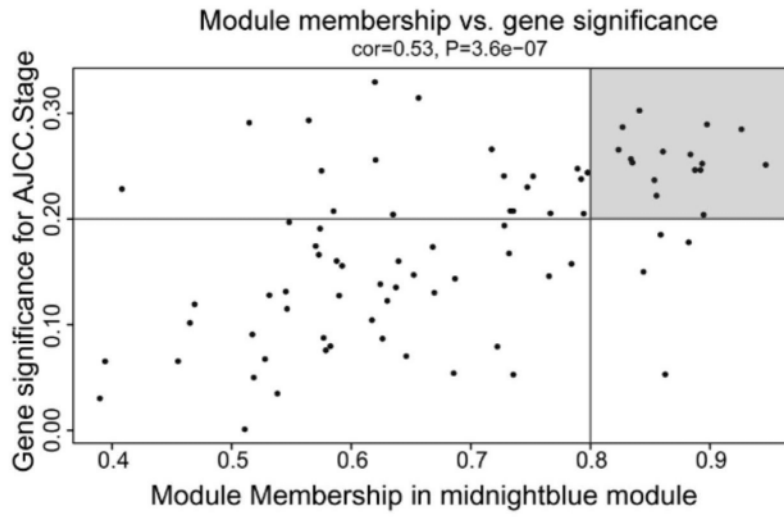


图6

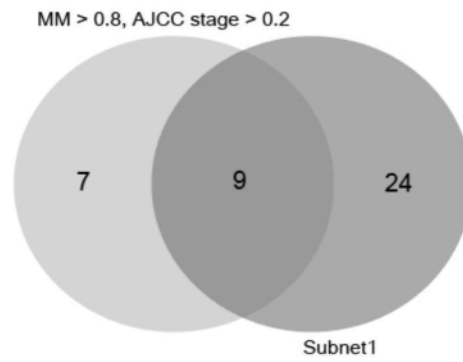


图7

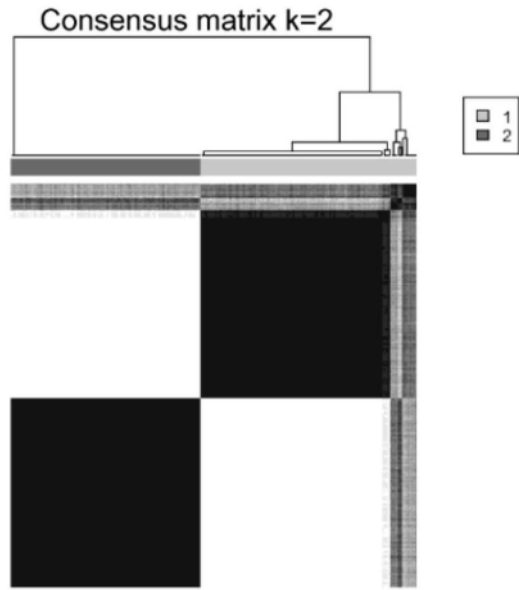


图8

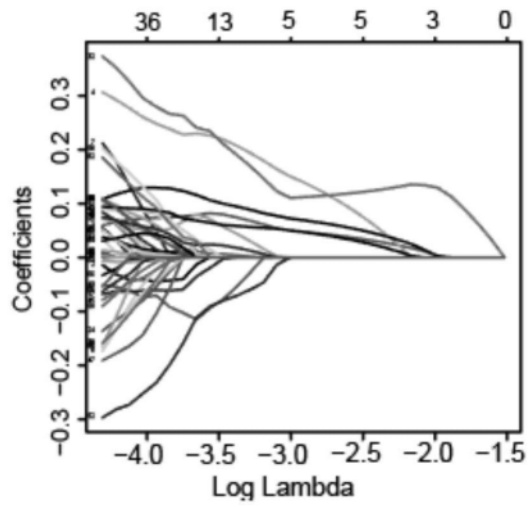


图9

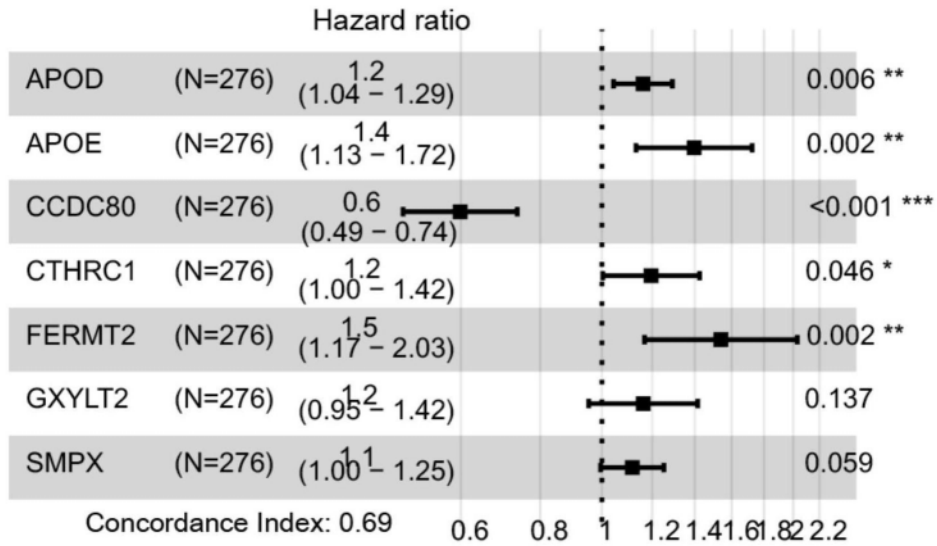


图10

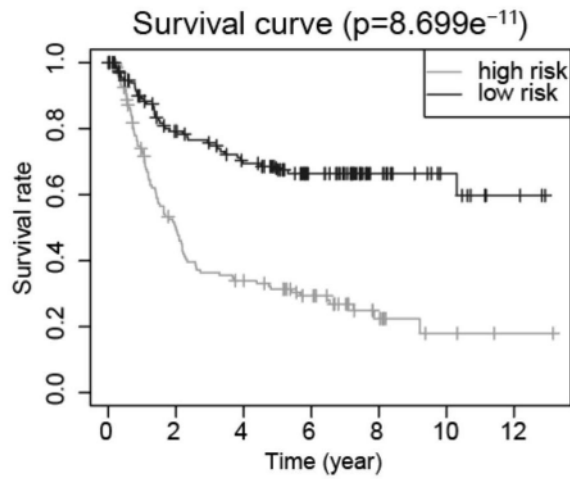


图11

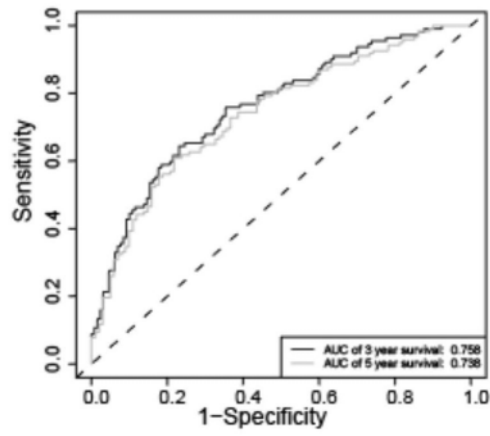


图12

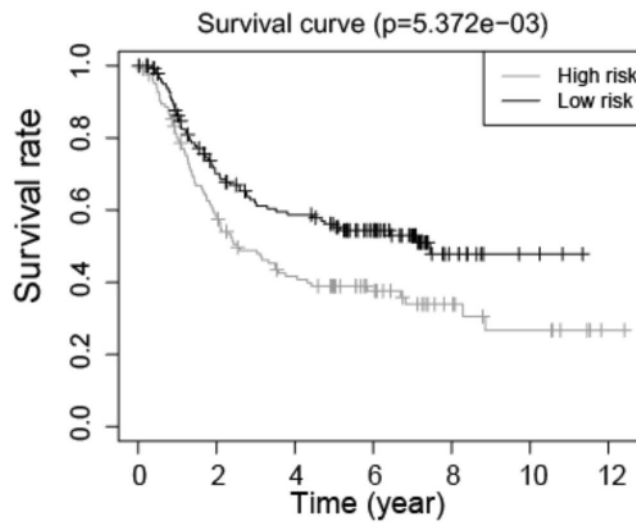


图13

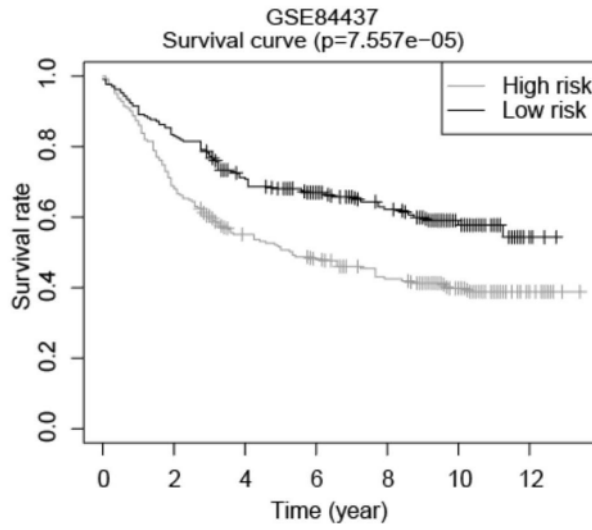


图14

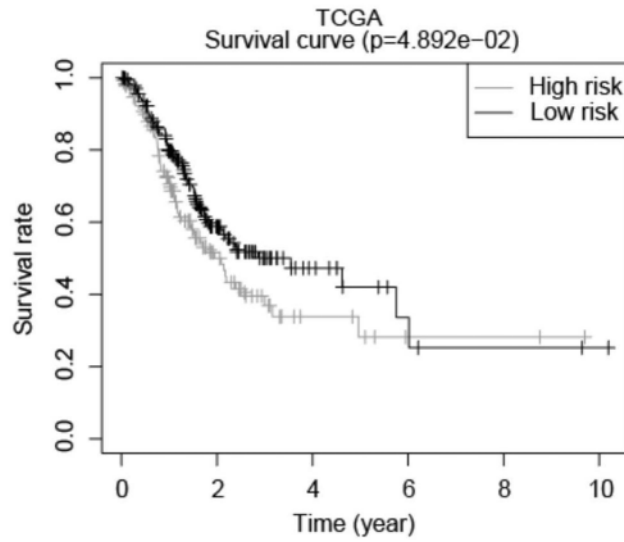


图15

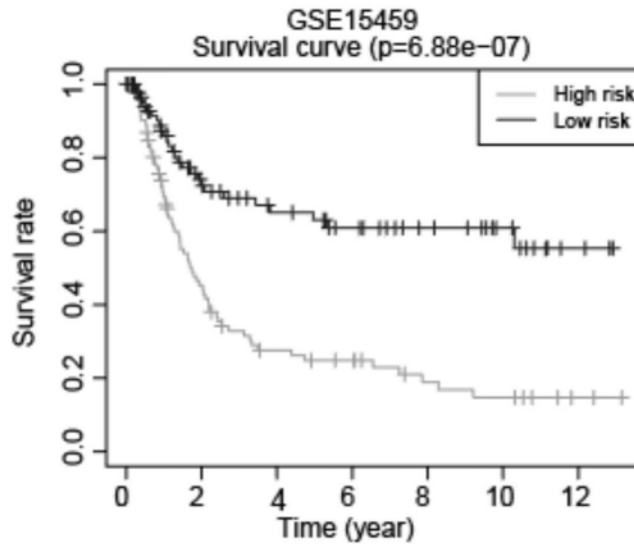


图16

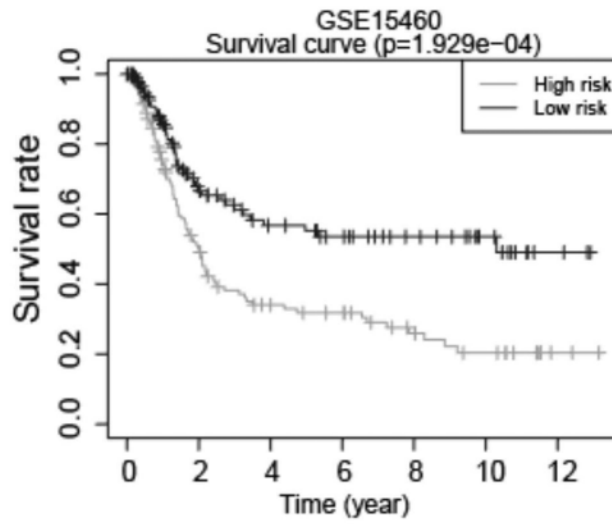


图17

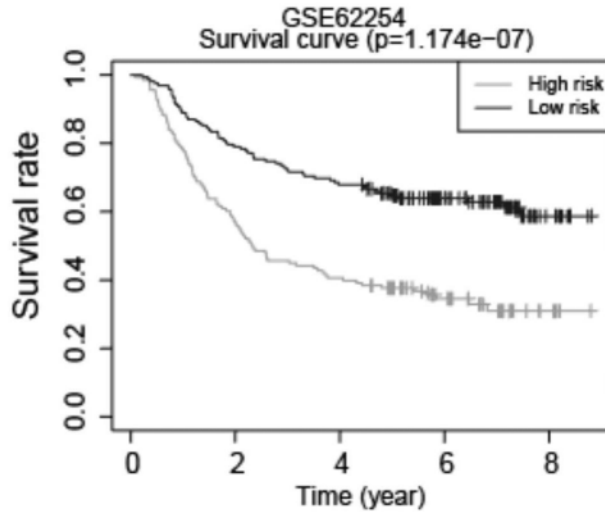


图18

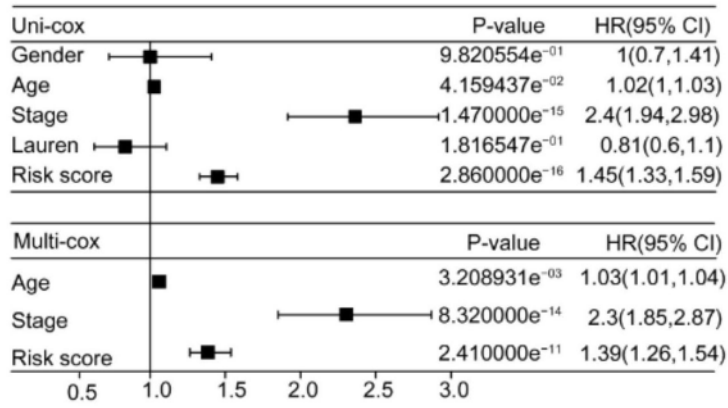


图19

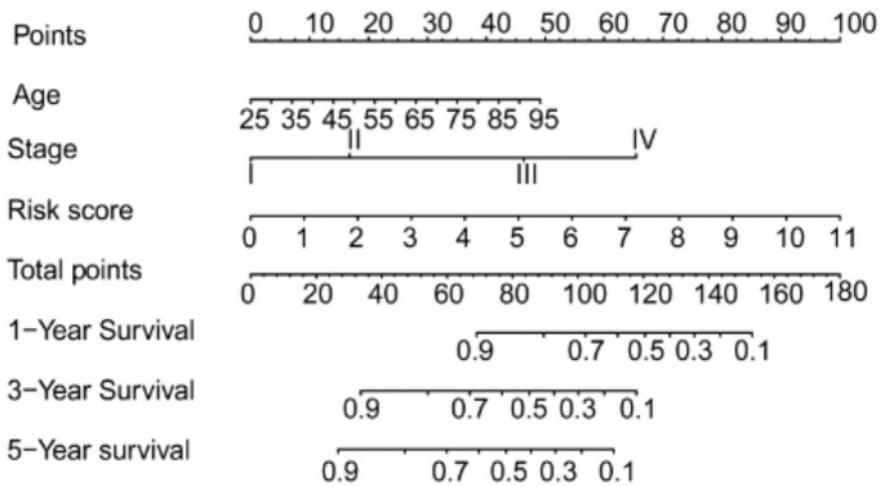


图20

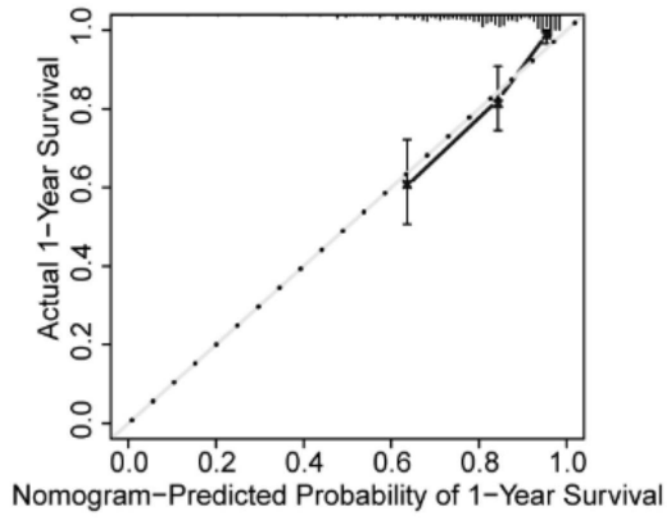


图21

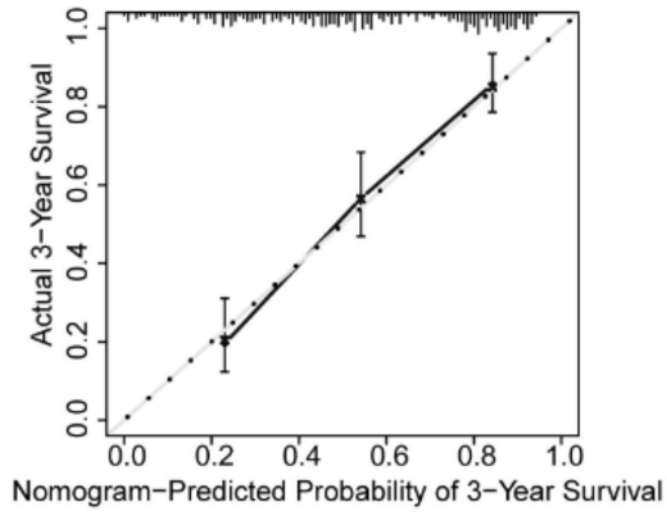


图22

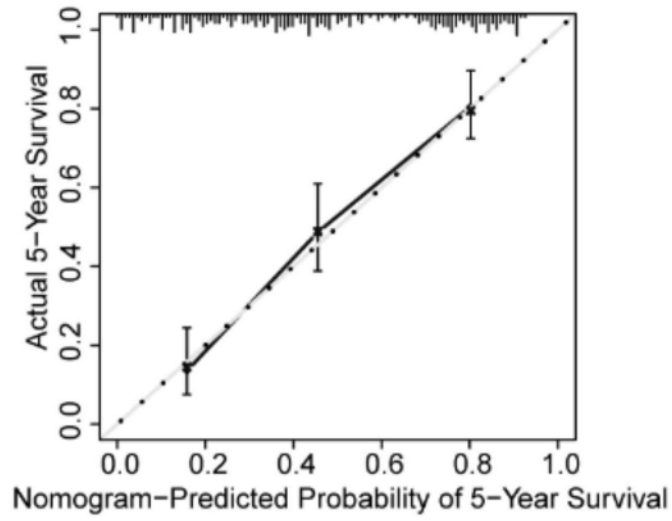


图23

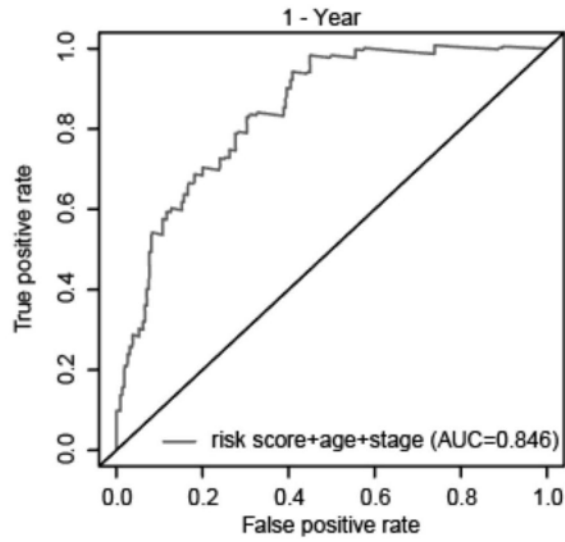


图24

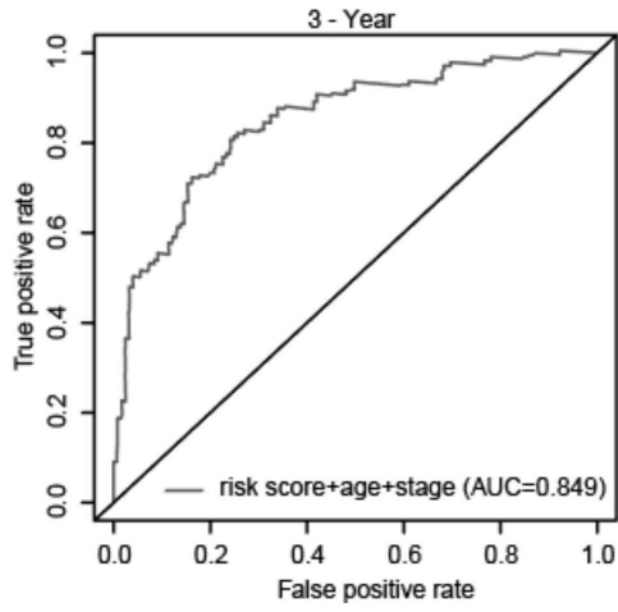


图25

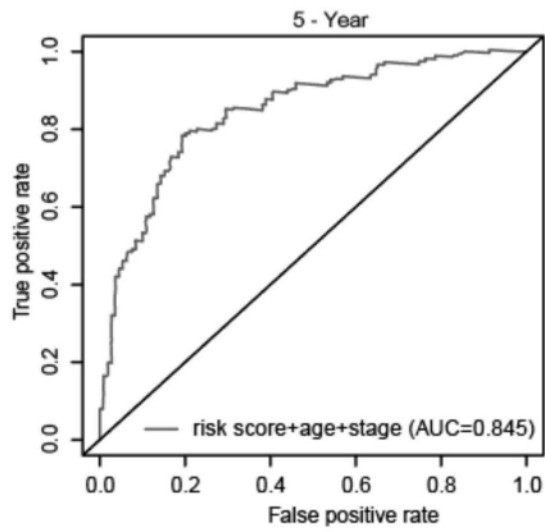


图26

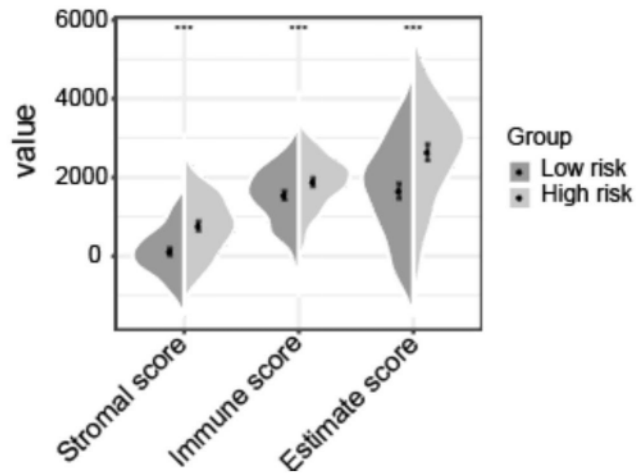


图27

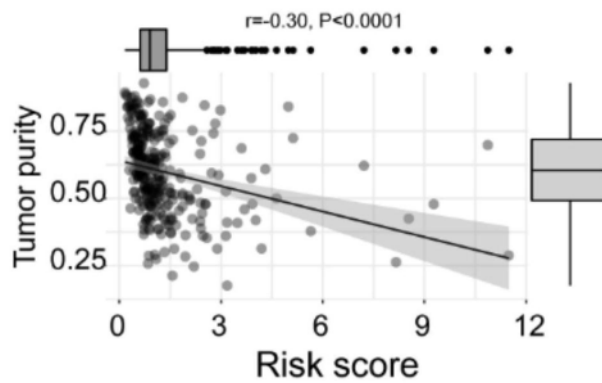


图28

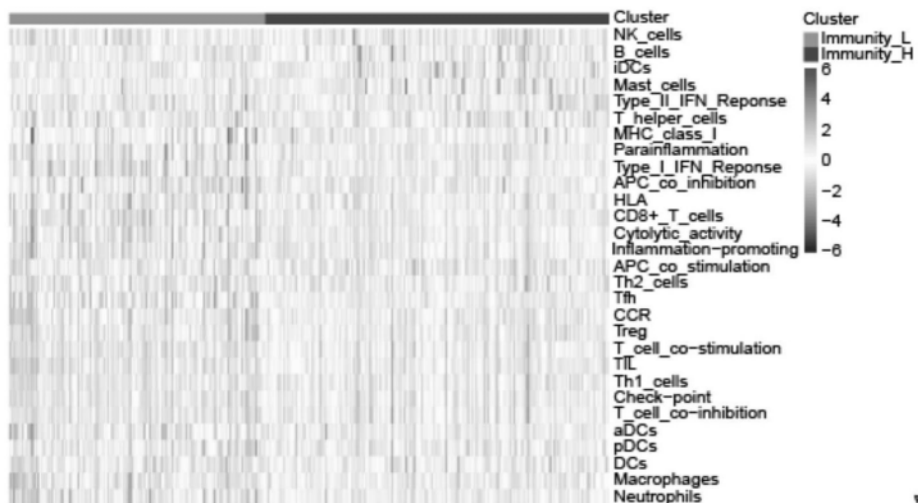


图29

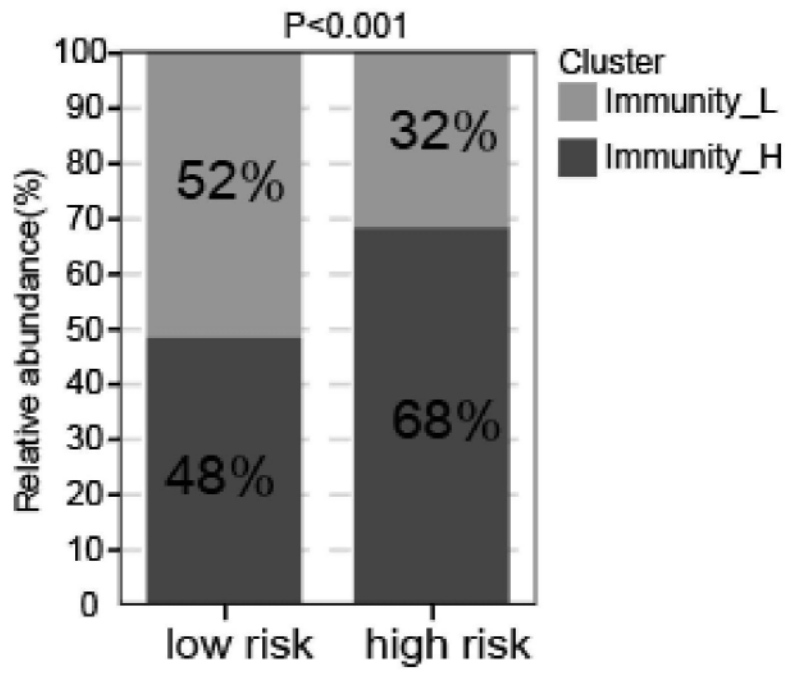


图30

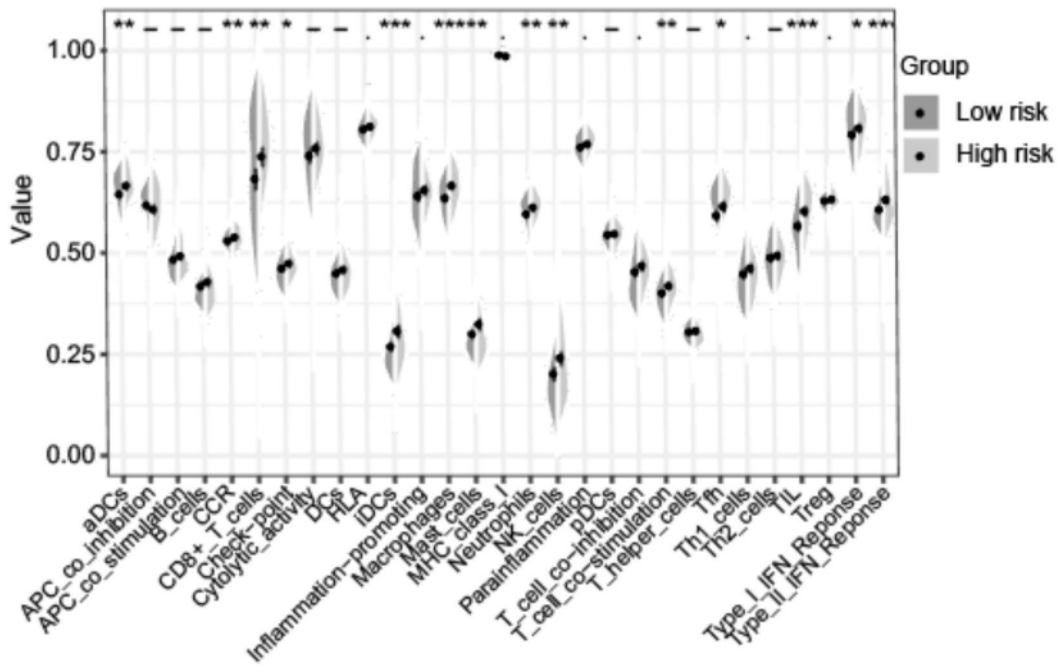


图31

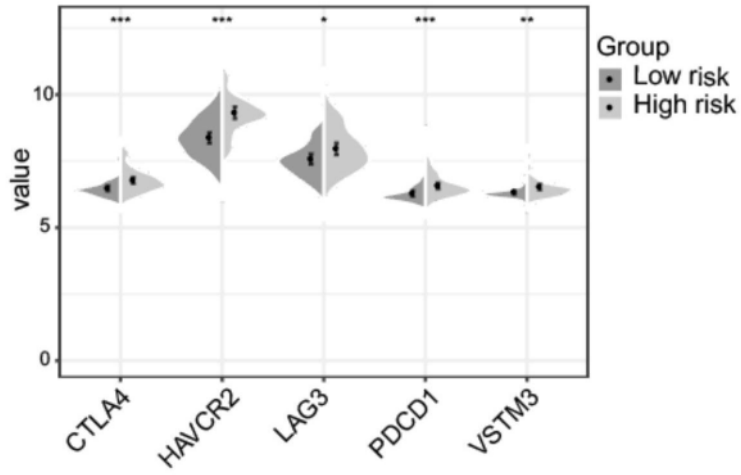


图32