



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101310772 B

(45) 授权公告日 2012.02.08

(21) 申请号 200810090374.1

(22) 申请日 2000.06.14

(30) 优先权数据

60/138971 1999.06.14 US

(62) 分案原申请数据

00811769.1 2000.06.14

(73) 专利权人 亨利福特保健系统公司

地址 美国密执安州

(72) 发明人 M·乔普 张瑞兰

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 刘玥

(51) Int. Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/195(2006.01)

A61K 31/21(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

(56) 对比文件

US 5385940 A, 1995.01.31, 第3栏第6段至第4栏第2段.

Lefter A. M. et al.. 一氧化氮供体在心血管疾病治疗中的作用. 国外医学药学分册 22. 1995, 22(2), 82-85.

Van Wagenen S. et al.. Regulation of neuronal growth cone filopodia by nitric oxide. Journal of Neurobiology 39. 1999, 39168-185.

审查员 郑少君

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 12 页

(54) 发明名称

用于诱导神经发生的氧化氮供体

(57) 摘要

本发明提供了用于诱导神经发生的氧化氮供体。本发明提供了促进神经发生的方法，它可通过对需要促进神经发生的患者给药以治疗剂量的氧化氮供体来达到促进神经发生的目的。并且对于促进神经发生来讲，本发明也提供了一种化合物，它含有足以促进神经发生的剂量的氧化氮供体。也提供了可促进神经发生的氧化氮化合物。此外，本发明也提供了一种方法，它通过对需要进行增强的位点给药以有效剂量的氧化氮供体就可增强脑细胞的产生和加快细胞结构和受体的改变。本发明还提供了一种方法，它可通过对患者给药以有效剂量的氧化氮供体来提高患者的神经功能和认知功能。

1. 氧化氮供体化合物在制备药物中的用途,所述药物用于促进神经发生,其中所述氧化氮供体化合物选自 DETANONOate、PAPANONOate、S- 亚硝基 -N- 乙酰青霉胺、硝普钠、硝化甘油钠、L- 精氨酸、磷酸二酯酶抑制剂和它们的混合物。
2. 权利要求 1 的用途,其中所述药物用于促进中风后的神经发生。
3. 氧化氮供体化合物在制备药物中的用途,所述药物用于增强神经细胞产生,其中所述氧化氮供体化合物选自 DETANONOate、PAPANONOate、S- 亚硝基 -N- 乙酰青霉胺、硝普钠、硝化甘油钠、L- 精氨酸、磷酸二酯酶抑制剂和它们的混合物。
4. 权利要求 3 的用途,其中所述药物用于促进中风后的神经细胞产生。
5. 氧化氮供体化合物在制备药物中的用途,所述药物用于提高神经功能,其中所述氧化氮化合物供体选自 DETANONOate、PAPANONOate、S- 亚硝基 -N- 乙酰青霉胺、硝普钠、硝化甘油钠、L- 精氨酸、磷酸二酯酶抑制剂和它们的混合物。
6. 权利要求 5 的用途,其中所述药物用于促进中风后的神经功能。
7. 氧化氮供体化合物在制备药物中的用途,所述药物用于提高认知功能和神经功能,其中所述氧化氮供体化合物选自 DETANONOate、PAPANONOate、S- 亚硝基 -N- 乙酰青霉胺、硝普钠、硝化甘油钠、L- 精氨酸、磷酸二酯酶抑制剂和它们的混合物。
8. 权利要求 7 的用途,其中所述药物用于提高中风后的认知功能和神经功能。

用于诱导神经发生的氧化氮供体

[0001] 本申请是申请日为 2000 年 6 月 14 日的发明创造名称为“用于诱导神经发生的氧化氮供体”的中国专利申请（国家申请号为 No. 00811769.1, 国际申请号为 PCT/US00/16353）的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明申请涉及在神经损伤和神经变性之后促进神经发生和恢复的方法和化合物。更明确的讲,本发明涉及促进神经系统的神经发生和可塑性的方法和组合物。

背景技术

[0003] 如果大脑部分梗塞就会发生中风,就会由于脑部供血中断而造成脑组织坏死。伴随急性中风的脑血栓可造成突然和剧烈的神经损伤。在美国的成年人中,中风是第三大死因,也是致残的重要因素。

[0004] 药理学上的各种干涉试图使那些有可能存活下去的受中风影响的大脑区域血流量达到最大,但是临床效果让人很事困惑。正如 Harrison 的 Principles of Internal Medicine (9th ED., 1980, p. 1926) 中所讲的,尽管实验证明... (脑血管扩张) 增加了脑部血液流量,正如氧化氮方法检测的结果,它们还没有证明这在对瞬时局部缺血攻击、血栓形成或慢性中风阶段的人类中风的仔细研究是有帮助的。给药烟酸、烟酸苄唑啉、乙醇、罂粟碱和吸入 5% 二氧化碳是对的... 与应用这些方法相反的建议就是血管扩张药物是有害的,而不是有益的,因为他们降低了系统血压,从而降低了与颅腔相吻合的血流,或者通过扩张大脑正常区域的血管来从梗阻处窃取血流。

[0005] 因此,开发一种化合物和方法,通过产生神经发生来缓解中风的影响是有用的。

发明内容

[0006] 按照本发明,它提供了一种方法,可通过对需要促进神经发生的患者给药以治疗剂量的氧化氮供体来促进神经发生。在没有受到损伤的大脑中也可促进神经发生。并且提供了一种化合物,它含有足以促进神经发生的有效剂量的氧化氮供体来诱导神经发生。也提供了一种促进神经发生的氧化氮化合物。此外,本发明也提供了一种方法,它通过对需要增强神经细胞产生的位点给药以有效剂量的氧化氮供体化合物就可增强此处神经细胞的产生。本发明提供了一种方法,它通过对患者给药以有效剂量的氧化氮供体化合物来增强神经功能和认知功能。

附图说明

[0007] 结合其中的图表,只要通过参考下面的发明详述你就可更好的理解本发明,你也就很容易的意识到本发明的其他优点。

[0008] 图 1 是一张照片,它展示了所选区域的 BrdU- 阳性细胞核;

[0009] 图 2A 和 2B 是两个图表,它们显示了在 subventricular 区 (SVZ) 的 BrdU- 阳性细

胞数量；

[0010] 图 3 显示了在锯齿状脑回中的 BrdU- 阳性细胞数量；

[0011] 图 4A 和 4B 是两个图表,它显示在锯齿状脑回中 BrdU 细胞的分布百分比；

[0012] 图 5 是一张照片,它展示了免疫反应性细胞相对于粒细胞层中的粒细胞的大小；

[0013] 图 6A 和 6B 显示了 SVZ 中的 BrdU- 阳性细胞数量；

[0014] 图 7A 和 7B 显示了嗅觉球 (OB) 中的 BrdU- 阳性细胞数量；

[0015] 图 8A 和 8B 显示了锯齿状脑回中的 BrdU- 阳性细胞数量；

[0016] 图 9 显示了损害体积研究；

[0017] 图 10 显示了时间相对于粘连性去除检测的结果 -MCAo 变化；

[0018] 图 11 显示了 Rotarod 检测的结果；

[0019] 图 12 显示了 NSS 检测的结果；

[0020] 图 13 显示了重量百分比；

[0021] 图 14 显示了 Rotarod 检测的结果；

[0022] 图 15 显示了 Rotarod 检测的进一步结果；

[0023] 图 16 显示了 footfault 检测的结果；以及

[0024] 图 17 显示了进一步的粘连性去除检测的结果。

[0025] 发明详述

[0026] 一般的讲,本发明提供了促进神经发生的方法和化合物。更明确的讲,本发明提供了可促进神经发生的方法和化合物,它是通过利用有效剂量的可促进神经发生的氧化氮供体来促进神经发生的。多种部位可需要神经发生,这包括但不限于大脑、CNS、耳或其中含有损伤的神经细胞的部位。

[0027] ‘氧化氮供体’是指一类化合物,它能提供氧化氮或促进氧化氮浓度的增加.. 有多类化合物可提供氧化氮。这些化合物包括: DETANONOate (DETANONO, NONOate 或 1- 取代 diazen-1-ium-1,2-diolate 是含有 [N(NO)NO]- 功能基团的化合物;DEA/NO;SPER/NO;DETA/NO;OXI/NO;SULF/NO;PAPA/NO;MAHMA/NO 以及 DPTA/NO);PAPANONOate, SNAP (S- 亚硝基 -N- 乙酰青霉胺), 硝普钠, 硝化甘油钠。这些化合物可促进氧化氮的提高,例如磷酸二酯酶抑制剂和 L- 精氨酸。

[0028] 此处所用的‘促进神经发生’是指促进或增强神经增长。它可包括但不限于,新神经细胞的生长或增强已存在的神经细胞的生长,以及实质细胞和可促进组织可塑性的细胞的增殖和生长。神经发生也包括,但并不局限于,轴突和树突延伸和突触发生。

[0029] 此处所用的‘增强’指在特定条件下,按照要求对生长进行增强和抑制。因此,如果需要额外的神经元生长,添加氧化氮供体就能提高这种生长。氧化氮供体,或氧化氮源,通过增强受体活化和促进细胞形态改变和细胞增殖使脑组织准备来补偿由于损伤、神经变性或老化引起的损伤。

[0030] 此处所用的‘神经’和‘认知’功能指大脑中的神经生长增强了患者思考、官能或其他的能力。接受氧化氮治疗的正常人增强了脑细胞的产生,加快了认知、记忆和运动神经的功能。此外,当进行氧化氮治疗之后,遭受神经疾病或损伤的患者可提高认知、记忆和运动神经细胞的功能。

[0031] 本发明的目的就是通过对神经发生和细胞变化来促进功能的提高,从而促进在

局部缺血性脑损伤或其他神经损伤治疗中取得改良性的成果。在患有中风、CNS 损伤和神经变性疾病之后,患者会遭受神经和功能性缺陷。这些发现提供了一种方法来增强大脑在 CNS 损伤或恶化之后的补偿机制。在患者遭受中风、损伤、老化和退化疾病之后,通过对氧化氮给药来诱导神经元和细胞的变化就可促进患者的功能性改进。这种方法也有益于遭受其他神经疾病,例如,但又不局限于 ALS、MS 和 Huntingtons 的患者。

[0032] 在遭受 CNS 损伤之后,在适当的时间对氧化氮给药可促进大脑的神经发生,并且能加快神经发生。这种效果的主要机制是 NO 活化了谷氨酸受体。这些谷氨酸受体促进了长期增强作用,并且随后诱导了神经元的再生。在最初的实验中,选用一种长半衰期(约为 50 小时)并可产生 NO 的化合物——DETA/NO 来进行实验。在从中风起始计 24 小时和 24 小时以外时对这种化合物给药,检测新神经元增加的数目。

[0033] 本文包括的实验数据表明一种设计来诱导 NO 产生的药理学介入能促进神经发生。选用两种化合物,DETANONOate 和 SNAP,这两种化合物成功的诱导了中风后的神经发生和提高了功能性结果(functional outcome)。选用的这些化合物可能跨过了血脑屏障。在神经科学研究中,神经发生是主要的最后目标。发明一种方法来促进神经元的产生将会为治疗多种神经疾病、CNS 损伤和神经变性提供机会。也可能在非损伤大脑中增强神经元的产生,从而可提高其功能。

[0034] 能促进神经元产生的一族药物的市场是巨大的。氧化氮供体,其中 DETANONO 是一个例子,可促进神经发生。提高神经发生可转化为一种方法,它可随着年龄增长和在损伤与疾病后提高、改进神经、行为和认知功能。

[0035] 上述讨论为使用氧化氮来促进神经发生提供了一个事实基础。应用的方法和这些方法在本发明中的应用可通过随后的这些非限制性示例和图表来展示。

[0036] 方法

[0037] 分子生物学中的一般方法:本领域中熟知的和没有特别描述的标准分子生物学技术一般是按照 Cold Spring Harbor Laboratory press, New York (1989) 出版的、Sambrook 等编写的 Molecular Cloning: A Laboratory Manual 和 John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) 出版的、Ausubel 等编著的 Current Protocols in Molecular Biology, 以及 Perbal 编著的、John Wiley & Sons, New York (1988) 出版的 A Practical Guide to Molecular Cloning, 以及 Watson 等编著的、Scientific American Books, New York 出版的 Recombinant DNA, 以及 Birren 等编著、Cold Spring Harbor Laboratory press, New York (1998) 出版的 Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vols. 1-4 中的技术, 并且美国专利 4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659 和 5,272,057 中提出的方法也在此处一并应用作为参考。多聚酶链式反应(PCR)一般时按照 Academic Press, San Diego, CA (1990) 出版的 PCR protocols: A Guide to Methods and Applications 中的方法进行。将原位(in-cell)PCR 和流动血细胞计数结合来检测含有特定 DNA 和 mRNA 序列的细胞(Testoni et al, 1996, Blood 87:3822)。

[0038] 免疫学中的一般方法:本领域中熟知的和没有特别描述的标准免疫学方法一般是参考 Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) 出版的、Stites 等编著的 basic and Clinical Immunology (8th Edition) 和 W. H. Freeman and Co., New York (1980) 出版的、Mishell 和 Shiigi (eds) 编著的 Selected Methods in Cellular Immunology。

[0039] 治疗剂的传送

[0040] 本发明中的化合物的给药和剂量确定是按照良好的医学实践进行的,要考虑到医生已知的个体患者的医疗条件、给药位点和方法、给药的时间安排、患者年龄、性别、体重以及其他的因素。在此处来讲,药理学上的有效剂量是通过这些本领域中熟知的考虑事项来确定的。这个剂量必须能够取得有效成果。它包括但并不局限于增加的存活率或更快的恢复、或增加或减少一些症状或由本领域中的熟练技术人员精选出来作为适当标准的其他的指标。

[0041] 在本发明的方法中,本发明中的化合物可以多种方式给药。应该指出的是他们可以化合物或药物上可接受的盐的形式给药,也可单独给药或作为活性组分与药物上可接受的载体、溶剂、助剂和媒介物结合给药。这些化合物可通过口、皮下或包括静脉内、动脉内、肌肉、腹膜内和鼻内在内的肠胃外注射,以及鞘内注射和输注技术来给药。将化合物植入的给药方式也是有效的。接受治疗的患者是温血动物,并且特别是哺乳动物,包括人。药物上接受的载体、溶剂、助剂和媒介物以及植入载体一般指惰性的、无毒的固态或液态填充物、溶剂或不与本发明中的活性成分反应的胶囊包被物质。

[0042] 必须指出的是对人进行的治疗时间要比对鼠或此处示例中的其他实验动物的治疗时间要长,这些治疗时间是与患病时间和药效成比例的。这些药剂可以是长时间的单独给药或重复给药,但优选的是单独给药。

[0043] 这些药剂可以是长时间的单独给药或重复给药。治疗时间是与患病时间和药效以及接受治疗的患者的种类相适合的。

[0044] 当对本发明中的化合物进行肠胃外给药时,一般是将这些化合物制备为单位剂量的可注射形式(溶液,悬浮液,乳状液)。适于注射的药物制剂包括无菌水溶液或悬浮液以及可重构于无菌可注射溶液或悬浮液中的无菌粉。载体可以是溶剂或分散介质,包括如水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、液态丙二醇等等)、它们的适当混合物以及植物油。

[0045] 适当的流动性是可以维持的,例如,可通过应用糖衣如卵磷脂、通过在悬浮液中维持所要求的颗粒大小以及通过使用变性剂。非水媒介物,如棉籽油、芝麻油、大豆油、玉米油、向日葵油或花生油以及酯如异丙基豆蔻酸酯也可用做复合组合物的溶剂体系。此外,也可添加多种可增强组合物的稳定性、无菌状态以及等张性的添加剂,包括抗菌防腐剂、抗氧化剂、螯合剂以及缓冲液。通过添加多种抗真菌和抗细菌药物,如对羟基苯甲酸酯类、酚、山梨酸等可保证预防微生物的作用。在很多情况下最好是包括等张因子,如糖、氯化钠等。对可注射药物形式的延长吸收可通过应用延缓吸收的药物如单硬脂酸铝和凝胶来实现。然而,按照本发明,应用的所有稀释剂或添加剂都要与这些化合物相协调。

[0046] 将本发明示例中使用的化合物连同其他需要的多种成分溶解到所要求量的溶剂中,就可制备无菌注射溶液。

[0047] 本发明中的药剂可以含有多种载体,如多种媒介物、助剂、添加剂以及稀释剂的注射制剂形式对患者给药;或者本发明中的化合物可以缓释皮下植入物或靶定传送体系,如单克隆抗体、载体传送、离子电渗析、聚合物基质、脂质体和微球体等形式进行肠胃外给药。本发明中有效的传送体系示例包括:5, 225, 182 ;5, 169, 383 ;5, 167, 616 ;4, 959, 217 ;4, 925, 678 ;4, 487, 603 ;4, 486, 194 ;4, 447, 233 ;4, 447, 224 ;4, 439, 196 ;以及 4, 475, 196。

许多其他的植入物、传送体系和组件对于本领域中的熟练技术人员来讲是熟知的。

[0048] 本发明中的化合物药剂可以口服形式对患者给药。传统的给药方法入对这些化合物以片剂、悬浮液、溶液、乳剂、胶囊、粉剂、糖浆等都是适用的。优选的是那些已知可经口或皮下传送药物并且能保留药物的生物活性的技术。

[0049] 在本发明的一个实施方案中,本发明中的药物最初是通过皮下注射给药使血液水平达到一个合适的水平。然后再通过口服药剂的形式来维持患者体内的水平,其他依赖患者身体情况的给药形式以及上面提到的给药形式都可使用。给药量因接受治疗的患者不同而不同,大约为 100ng/kg 体重 / 天 -100mg/kg 体重 / 天,优选的使 10mg/kg 体重 / 天 -10mg/kg 体重 / 天。

[0050] 示例

[0051] 示例 1

[0052] 发明了一种药理学方法来促进大脑的神经发生。通过在雄性 Wistar 鼠的右 MCA 的起端放入动脉内凝块使得大鼠患中脑动脉 (MCA) 梗塞。在诱导中风之后的第 24 和 48 小时对动物给药 (iv/ip) 以氧化氮供体化合物 (DETANONO) (组 1), 或者在 24 小时之后每天注射 (ip) NO 供体化合物 (组 2)。BrdU 是一种胸苷类似物, 它可检测新细胞的形成, 从局部缺血后开始每天注射 (ip) BrdU, 并持续 14 天。通过特异细胞的免疫活性标记来确定细胞类型。因此, 可通过表达 NeuN 和 MAP2 来检测神经细胞, 通过 GFAP 来检测星形胶质细胞。在大脑特定区域、subventricular zone 和锯齿状脑回检测神经发生。

[0053] 结果: 数据表明, 相对于没有进行治疗的组, 接受 DETANONO 治疗的大鼠中可观察到 BrdU 阳性细胞数量的显著增加。对于组 2 来讲, 结果如下: subventricular zone: $2748 \pm 326 / 1653 \pm 91.4$, 锯齿状脑回: 粒状细胞层, $135 \pm 18.9 / 37.3 \pm 3.6$; $53.7 \pm 6.3 / 34.9 \pm 2.8$, 解门, $43.8 \pm 10.2 / 10.1 \pm 2.4$ 。对组 1 来讲, 分别在接受治疗的鼠的粒状细胞层和未接受治疗的鼠的粒状细胞层中检测到 $89.5 \pm 12 / 37.3 \pm 3.6$ 的 BrdU 细胞数量显著增加。在锯齿状脑回中绝大多数新形成的细胞 (> 90%) 是神经细胞。在大脑的其他区域, 新形成的细胞具有神经胶质细胞和星形胶质细胞表型。

[0054] 对非局部缺血大脑的 DETANONO 治疗: 对没有接受任何外科手术的大鼠进行 DETANONO 治疗。药物是以单剂量 (iv 0.12mg) 给药的。在开始治疗后持续 14 天每天注射 BrdU。一组大鼠 (组 3) 在 BrdU 注射的最后一天处理。另一组 (组 4) 在最后的 BrdU 注射后 4 星期处理。按照与接受 DETANONO 治疗的鼠 (组 5) 的方法对不进行 DETANONO 给药的动物进行 BrdU 注射。

[0055] 组 3/ 组 5 的结果如下: 在 subventricular zone 结果分别是 $2952 \pm 102.6 / 1432 \pm 104.6$ 和 $2725.3 \pm 115.5 / 1655.2 \pm 102.9$; 在锯齿状脑回 (粒状细胞层) 是 $73.7 \pm 6.11 / 39.9 \pm 7.26$ 。

[0056] 在组 4/ 组 5 中, 在 subventricular zone 结果分别是 $456.5 \pm 42.3 / 214.6 \pm 67.9$ 和 $518.4 \pm 67.2 / 233.1 \pm 49.2$; 在锯齿状脑回 (解门) 是 $7.71 \pm 89 / 3.23 \pm 1.22$ 。相对于没有接受处理的组, 接受 DETANONO 治疗的大鼠在两个时间点都表现出新形成细胞的显著增加。新形成细胞在 subventricular zone 和海马状突起有明显增加。用神经标记物 NeuN 和 MAP2 以及星形胶质细胞标记物 GFAP 对 BrdU 活性细胞进行双重标记。新形成的细胞表达神经细胞或星形胶质细胞蛋白。

[0057] 图 1 表明遭受中风并且接受 DETANONO 治疗的鼠中,在海马状突起通过 BrdU 和神经标记物 NeuN 和 MAP2、BrdU 和星形胶质细胞标记物以及 GFAP 进行双重标记免疫组织化学。细胞对这些标记都表现了免疫组织活性,这表明新形成细胞是神经细胞元 (neuronal cell) 和星形胶质细胞表型。估计在海马状突起中新形成的细胞大于 90% 是神经细胞表型。

[0058] 这些数据表明对 NO 供体给药促进了局部缺血大脑的神经发生。这种方法适用于多种形式的 CNS 病理和损伤。此外,NO 液促进了正常成人脑中的神经发生。

[0059] 本发明的目的是通过诱导神经发生来促进在对大脑局部缺血损伤或其他神经损伤进行的治疗方面取得改进性成果。在患有中风、CNS 损伤和神经变性疾病之后,患者会遭受神经和功能缺陷。这些发现提供了一种方法来增强大脑补偿性机制以提高遭受 CNS 损伤和神经变性后的大脑功能。神经元诱导将促进中风后官能提高。

[0060] 在遭受 CNS 损伤之后,在适当的时间对氧化氮给药可促进大脑的神经发生,并且能加快神经发生。这种效果的主要机制是 NO 活化了谷氨酸受体。这些谷氨酸受体促进了长期增强作用,并且随后诱导了神经元的再生。在最初的实验中,选用一种长半衰期(约为 50 小时)并可产生 NO 的化合物——DETA/NO 来进行实验。在从中风起始计 24 小时和 24 小时以上时对这种化合物给药,检测新神经元增加的数目。

[0061] 本文包括的实验数据表明一种设计来诱导 NO 产生的药理学介入能促进神经发生。选用两种化合物,DETANONOate 和 SNAP,这两种化合物成功的诱导了中风后的神经发生和提高了功能性成果。选用的这些化合物可能跨过了血脑屏障。在神经科学研究中,神经发生时主要的最后目标。发明一种方法来促进神经元的产生将会对治疗多种神经疾病、CNS 损伤和神经变性提供机会。也可能在非损伤大脑中增强神经元的产生,从而可提高其功能。

[0062] 能促进神经元产生的一族药物的市场时巨大的。氧化氮供体,其中 DETANONO 是一个例子,可促进神经发生。提高的神经发生可转化为一种方法,它可随着年龄增长和在损伤与疾病后提高、改进神经、行为和认知功能。

[0063] 在此之前没有 NO 供体或药物,尤其是中风后可诱导神经发生的药物的专利申请。

[0064] 在成年啮齿类动物的整个生命过程中,在其大脑的 subventricular zone (SVZ) 和海马状突起的锯齿状脑回能够产生神经祖细胞。然而,祖细胞增殖和分化的信号还不为所知。氧化氮 (NO) 是生物体系中的一种化学信使,可作为大脑中的一种神经递质。在本发明的研究中,探讨了 NO 对成年鼠 SVZ 和锯齿状脑回的神经祖细胞增殖的影响。

[0065] 进行了两个实验。在第一个实验中,检测了 NO 对非局部缺血成年鼠的 SVZ 和锯齿状脑回的神经祖细胞增殖的影响,在第二个实验中,检测了 NO 对局部缺血成年鼠的 SVZ 和锯齿状脑回的神经祖细胞增殖的影响。

[0066] 本发明中选用的是体重为 300-350 克的成年 Wistar 鼠 (Charlesriver Breeding Company, Wilmington, MA)。从 ALEXIS Biochemical Corporation 购买了生理状态的、半衰期为 20 小时的 NO 供体 -DETANONOate。从 Sigma chemical 购买了作为有丝分裂标记的胸苷类似物 - 溴尿苷 (BrdU)。从 Boehringer Mannheim 购买了抗 BrdU 的鼠单克隆抗体。

[0067] 将体重为 300-350 克的雄性 Wistar (n = 28) 鼠通过面罩用氟烷 (在 70% N₂O 和 30% O₂ 混合物中的浓度为 1-3.5%) 进行麻醉。在整个外科手术过程中,通过反馈调节水加热系统将鼠直肠温度控制在 37 ± 1°C。在右股动脉和静脉中插入 PE-50 导管来分别进行

血压持续监测和测量血液中的气体 (pH、pO₂、pCO₂)，以及给药。DETANONOate 是通过静脉或腹膜注射的方式对鼠给药的。

[0068] DETANONO 治疗：将鼠随机分为 4 组。在组 1 (单 Rx) 中，每 15 分钟就皮下注射一个 DETANONO 大丸剂 (每个 0.1mg/kg)，共注射 4 次 (总共 0.4mg/kg)。在组 2 (2Rx) 中，每 15 分钟就皮下注射一个 DETANONO 大丸剂 (每个 0.1mg/kg)，共注射 4 次 (总共 0.4mg/kg)，并且在 24 小时之后重复进行第二次治疗。在组 3 (7Rx) 中，在第一个实验日，每 15 分钟就对鼠皮下注射一个 DETANONO 大丸剂 (每个 0.1mg/kg)，共注射 4 次 (总共 0.4mg/kg)，以后每天腹膜注射一个 DETANONO 大丸剂 (每个 0.4mg/kg)，连续注射 6 天。在组 4 (对照) 中，仅仅对鼠注射盐水 (单剂量)。

[0069] 在进行 DETANONO 治疗的第一天，对鼠进行腹膜注射 BrdU (50mg/kg)，每天注射，连续 14 天。为了确定 SVZ 和锯齿状脑回中的细胞分化和增殖是否受到了 NO 的影响，在第一剂 DETANONO 治疗后分别在第 14 天 (n = 3-5/组) 和第 42 天 (n = 3-5/组) 将鼠杀死。将鼠利用含在 pH7.4 的 100 毫升磷酸缓冲液中的 4% 多聚甲醛进行经心灌注。将脑取出并固定在 4% 甲醛中。

[0070] 对于 BrdU 免疫染色来讲，首先通过将脑切片 (6um) 在 65°C、50% 甲酰胺 2X SSC 中培育 2 小时进行变性，然后在 37°C 的 2N HCl 中培育 30 分钟。然后用 Tris 缓冲液冲洗脑切片，并且用 1% H₂O₂ 处理来阻断内源过氧化物酶。脑切片在室温与抗 BrdU (1 : 100) 的第一种抗体培育 1 小时，然后与生物素化的第二种抗体 (1 : 200, vector, burlingame, CA) 共培育 1 小时。利用 3' 3' - 二氨基联苯胺 - 四氢氯化物 (DAB, Sigma)。

[0071] 在 40X 显微镜 (OlympusBX40) 下通过 MCID 计算机成像分析系统 (Imaging Research, St. Catharines, Canada) 将 BrdU 免疫染色切片进行数字化显示。在计算机监视器上进行 BrdU 核技术以提高可见性，并且使用单焦平面来避免重复计数。对结构的取样是通过选择每个切片 (RMS 和 OB) 上预先确定的区域或通过分析每个切片 (锯齿状脑回和 SVZ) 的整个结构来确定的。

[0072] 选取每只鼠在 AP+10.6mm 处的胼胝体膝和 AP+8.74mm 处的前联合交叉点之间总共 7 个切片的每个第 40 冠状部分 (Paxinos and Waston, 1986)。对在侧心室壁上的 BrdU 免疫反应阳性细胞核进行计数。在这些区域的所有 BrdU 免疫反应阳性细胞核都以 BrdU 免疫反应细胞数 /mm² 表示。将这七个切片的密度进行平均以获得每只鼠的平均密度。

[0073] 选取每只鼠在 OB 前沿皮层前后向上的连续总共 6 个切片的每个第 20 部分。如图 1 中所描述的，在每个部分上，对 RMS 中的两个预先确定区域 (100×100um) 和 OB 的粒状细胞层 (GCL) 中的四个区域进行了分析。在这些选定区域中，所有 BrdU 性细胞核都以 BrdU 免疫反应细胞数 /mm² 表示。将这 6 个切片的密度进行平均以获得每只鼠的平均密度。

[0074] 选取每只鼠在 AP+5.86mm 和 AP+2.96mm 间，包括解门、亚粒状区 (SGZ) 和内部第一、第二、第三粒状细胞层 (GCL) 在内总共 8 个切片的每个第 50 冠状切片。SGZ 是 GCL 和解门交界处的一个有两个细胞厚的带，它一直是与 GCL 结合进行计数的。在这些选定区域中，所有 BrdU 阳性细胞核都以 BrdU 免疫反应细胞数 /mm² 表示。将这 8 个部分的密度进行平均以获得每只鼠的平均密度。

[0075] 结果

[0076] 相对于接受盐水治疗的鼠，在进行治疗后的第 14 天和第 42 天，接受 DETANONO 治

疗的鼠的 SVZ 中的 BrdU 免疫反应细胞数量显著增加 ($P < 0.05$) (图 2a)。相对于在治疗后 14 天给药 1 和 2 剂 DETANONO 的鼠, 给药 7 剂 DETANONO 的鼠显示了更高数量的免疫反应细胞。在给药 1 剂和 7 剂 DETANONO 鼠之间检测到 BrdU 细胞数量有显著的差异 (图 2b), 这表明 BrdU 细胞数量的增加是以剂量依赖形式进行的。虽然相对于在处理第 14 天给药的鼠相比, BrdU 细胞数量下降了, 但是相对于对照的盐水组鼠 BrdU 细胞数量还是显著增加了 (图 2a)

[0077] 在处理第 42 天和第 14 天进行 DETANONO 治疗的鼠的 RMS 中, BrdU 细胞数量没有显著增加 (表 1)。然而, 相对于对照组, 在接受单剂 DETANONO 治疗后第 42 天的 OB 中, 以及在接受 2 剂和 7 剂 DETANONO 治疗后第 42 天的 OB 中检测到 BrdU 细胞数量显著增加 (表 1), 这表明 SVZ 祖细胞的迁移增加。

[0078] 在处理第 14 天和第 42 天, 单剂量的 DETANONO 治疗没有显著增加锯齿状脑回中的 BrdU 免疫反应细胞数量 (图 3)。相反, 相对于对照组, 在处理第 14 天和第 42 天, 接受 2 剂量和 7 剂量 DETANONO 治疗的鼠锯齿状脑回中的 BrdU 免疫反应细胞数量显著增加 (图 3)。相对于对照组, 在处理第 42 天和第 14 天, 锯齿状脑回中的 BrdU 免疫反应细胞百分比表明 DETANONO 治疗显著降低了 BrdU 免疫反应细胞在亚粒状区域的百分比, 但显著增加了在粒状细胞层的 BrdU 免疫反应细胞百分比 (图 4a 和 4b), 这暗示了 NO 促进了 BrdU 免疫反应细胞的迁移。在粒状细胞层中的 BrdU 免疫反应细胞是卵圆形的和圆形的, 大小与粒状细胞的细胞核相同或比其小。

[0079] 数据表明, 对成年鼠进行 DETANONO 治疗不仅增加了 SVZ 和锯齿状脑回祖细胞的增殖, 而且延长了增殖的祖细胞的存活。在锯齿状脑回中的一些 BrdU 免疫反应细胞具有粒状细胞的形态学特征。因此, 数据表明 NO 增强了成年鼠大脑的神经发生。

[0080] 基于以上数据, 进行了第二个实验来探讨 NO 对 focal embolic cerebral ischemic brain 的影响。除下列操作外, 其他所有操作与第一个实验相同。

[0081] 体重为 300-350 克的雄性 Winstar 鼠 ($n = 30$) 都遭受中脑动脉 (MCA) 栓塞。通过在 MCA 起端处放置栓塞物使 MCA 栓塞。简单的讲, 就是利用 15mm 长、已经修饰过的 PE-50 导管在 MCA 起端放置一个完整且富含血纤维蛋白、形成时间为 24 小时的血栓 (约 1 μ l)。实验分为四组。组 I (对照组) 中的鼠接受 MCA 血栓处理, 并且在局部缺血后的第 24 小时接受连续 4 次皮下注射盐水大丸药 (每次 0.52ml, 每隔 15 分钟一次)。组 II (DETNO/NO 预处理) 中的鼠在栓塞前 24 小时接受连续 4 次对 DETANONO 大丸剂的皮下给药 (每次 0.1mg/kg, 每隔 15 分钟一次, 总剂量 0.4mg/kg)。组 III (DETANONO 两次组) 中的鼠在栓塞后 24 小时和 48 小时接受连续四次 DETANONO 大丸剂皮下给药 (每次 0.1mg/kg, 每隔 15 分钟一次, 总剂量 0.4mg/kg)。组 IV (DETANONO 七次组) 中的鼠在栓塞后 24 小时接受连续 4 次对 DETANONO 大丸剂的皮下给药 (每次 0.1mg/kg, 每隔 15 分钟一次, 总剂量 0.4mg/kg)。随后, 每天对鼠进行腹膜内注射 0.4mg/kg DETA/NO, 持续 6 天。

[0082] 相对于非局部缺血鼠, 在 MCA 栓塞后的第 14 天, 栓塞性 MCA 栓塞造成同侧 SVZ 和 OB 的 BrdU 免疫反应细胞数量显著增加 ($p < 0.05$) (表 2)。在 MCA 栓塞后第 42 天, BrdU 免疫反应细胞数量降低, 这表明灶性大脑局部缺血诱导了同侧 SVZ 的祖细胞增殖的暂时增加 (表 2)。MCA 栓塞没有影响 SVZ 和 OB 对侧祖细胞和锯齿状脑回两侧的祖细胞的增殖 (表 2)。

[0083] 相对于没有处理的 MCA 栓塞组,在预处理组中,在进行 MCA 栓塞后的第 14 天,在 SVZ 的对侧和在第 42 天在 SVZ 的两侧面检测到 BrdU 免疫反应细胞数量显著增加 ($p < 0.05$) (图 6A,6B)。两剂量组的鼠中,在进行 MCA 栓塞后第 14 天,在 SVZ 的同侧面和第 42 天在 SVZ 两侧面的 BrdU 免疫反应细胞数量都有显著的增加 (图 6A,6B)。在 MCA 栓塞后的第 14 天和第 42 天,进行七次 DETANONO 注射组中的鼠的 SVZ 同侧和对侧面就表现 BrdU 免疫反应细胞数量的显著增加 (图 7A,7B)。

[0084] 在 MCA 栓塞后的第 14 天和 42 天,进行 DETANONO 处理的缺血大鼠的 OB 中,检测到明显增加的 BrdU 免疫反应细胞 (图 7A,7B)。

[0085] 相对于 MCA 栓塞对照组,在进行 MCA 栓塞之后的第 14 天和第 42 天,接受 DETANONO 处理的局部缺血鼠的锯齿状脑回中 BrdU 免疫反应细胞数量显著增加 (图 8A,8B)。

[0086] 接受 DETANONO 处理的局部缺血鼠没有表现出局部缺血损伤体积的显著减小 (图 9)。

[0087] 这些数据说明栓塞性 MCA 栓塞本身增加了 SVZ 同侧面祖细胞的增殖。许多在 SVZ 产生的细胞沿 RMS 迁移进 OB,它们在那里分化为神经元。因此,OB 同侧面 BrdU 免疫反应细胞数量增加表明 SVZ 同侧面祖细胞迁移的增加。这些数据也表明 MCA 栓塞后祖细胞增殖信号是短暂的和局部的。然而,但进行 MCA 栓塞后对局部缺血鼠进行 DETANONO 处理时的祖细胞增殖显著增加至少持续 42 天。祖细胞增殖的增加是由 NO 诱导的,因为 BrdU 免疫反应细胞数量增加不仅涉及到 SVZ 两侧面,而且涉及到锯齿状脑回的两侧面。然而,在接受 DETANONO 处理的非局部缺血鼠和接受处理的局部缺血鼠的 BrdU 细胞数量还是有区别的。在 MCA 栓塞后第 14 小时和 42 小时,接受 DETANONO 处理的非局部缺血鼠锯齿状脑回中的 BrdU 免疫反应细胞绝对数量要多于接受 DETANONO 处理的局部缺血鼠锯齿状脑回中的 BrdU 免疫反应细胞数量,这表明 NO 可通过局部缺血来增强已产生的信号以增加祖细胞的增殖。因此,数据暗示病灶性大脑局部缺血产生了短暂的祖细胞增殖,并且 NO 增强了局部缺血大脑中祖细胞的增殖。

[0088] 示例 2

[0089] 对正常和局部缺血鼠给药以氧化氮供体 (DETA/NO) 促进了非局部缺血大脑和局部缺血大脑中的神经发生。此后,进行了额外实验来检验 DETA/NO 诱导的神经发生促进了中风后的大脑功能性改进这一假说;同时提供了数据。在诱导中风后第一天 (组 1) 或第 7 天 (组 2) 对实验鼠给药 DETA/NO (iv/ip),随后是为时 7 天的每日给药 DETA/NO (ip)。另一种 NO 供体化合物 (SWAP) 在诱导中风后的第一天和第二天对局部缺血鼠给药 (iv) (组 3)。组 1 和组 2 中是选用的幼鼠 (3 月)。组 3 中是选用中等年龄的鼠 (10-12 个月)。从诱导中风后的第一天到第 42 天,进行了一系列神经功能检验。这些检验包括 1) 神经严重性分数 (NSS) 检测运动功能、感觉功能和反射功能,它类似于用来描述人的对侧忽略实验。分数越高,损伤越严重;2) Rotard 检验检测前后肢运动协调和平衡。给出的数据是以下限值的百分数来表示的;3) footfault 检验检测前后肢的运动协调作用。数值越高,损伤越严重;4) 结合去除检验检测运动传感器损伤。数据以时间 (秒) 来表示。时间越长,损伤越严重;5) 动物体重。

[0090] 结果

[0091] 组 1:相对于对照组鼠,在接受 DETA/NO 处理的鼠中检测到运动和运动传感功能

(图 10 为 Rotard 检验,图 11 为结合去除检验,图 12 为 NSS 检验)和实验鼠体重(图 13)的显著提高。

[0092] 组 2:相对于对照组鼠,在诱导中风后第 28 和 42 天仅仅在 Rotard 检验中检测到神经功能的显著提高(图 14)。

[0093] 组 3:相对于对照组鼠,接受 SNAP 处理的实验鼠表现了在运动和运动传感功能上的显著提高(图 15 为 Rotard 检验,图 16 为 footfault 检验,图 17 为结合去除检验)。

[0094] 结论

[0095] 这些数据表明 1) 对大脑局部缺血的鼠给药 DETANONO 可提高神经功能的恢复,并且甚至在中风七天后也能取得这些提高;2) 除给药 DETANONO 外,对大脑局部缺血的鼠给药 SNAP 也提高了神经功能,这表明对 NO 供体化合物给药可增强神经功能的恢复;以及 3) 对中等年龄的鼠给药 SNAP 有效的促进了功能恢复,这是很重要的,并且是与临床相关的,因为中风患者是中年或更老。结合上述的数据,这些数据表明 NO 供体促进了神经发生,暗示 NO 供体化合物通过促进局部缺血大脑中的神经发生来增强中风后的神经功能恢复。

[0096] 在本专利申请中,多种出版物,包括美国专利是按照作者和年代来参考引用的,而专利是按照申请号来参考引用的。全文引用的文献如下所列。因此,全文引用这些出版物和专利作为参考文献以便更加全面的描述与本发明相关的领域的现状。

[0097] 本发明是以例证性的方式来描述的,应该明白,本专利中用到的术语在词汇本身是说明本发明,而不是进行限制本发明的。

[0098] 很显然,本发明可能按照上述学说进行多种修饰和变动。因此,应该理解为在本发明描述的范围,而不是明确描述,本发明是可以实施的。

[0099]

表1. 大脑中新产生的细胞的密度

区域	盐水对照组	1次	2次	7次
Rostral migratory stream (BrdU 50mg/kg ip/天 X 14天)				
最后一次BrdU注射后一天(14天) 右侧	869.2 ± 98.25	950.25 ± 99.55	991 ± 98.25	1169.4 ± 218.85
最后一次BrdU注射后1天(14天) 左侧	841.9 ± 230.4	998.55 ± 59.7	1070.85 ± 160.1	1312.5 ± 265
最后一次BrdU注射后4周 右侧	21.85 ± 6.55	22.5 ± 5.95	32.9 ± 8.15	45 ± 11.35
最后一次BrdU注射后4周 左侧	21.2 ± 5.2	26.25 ± 6.9	37.8 ± 5.15	47.5 ± 15.6
嗅觉球 (BrdU 50mg/kg ip /天 X 14天)				
最后一次BrdU注射后一天(14天) 同侧	45.15 ± 7.4	41.4 ± 5.55	91.65 ± 12.35*	106.25 ± 17.7**
最后一次BrdU注射后一天(14天) 对侧	31.55 ± 8.45	39.75 ± 6.2	99.6 ± 10.5**	116.55 ± 16.45**
最后一次BrdU注射后4周 同侧	12.95 ± 2.6	75.65 ± 10.85**	85 ± 15.95 **	84.4 ± 7.1**
最后一次BrdU注射后4周 对侧	9.95 ± 2.85	80 ± 12.3**	98.4 ± 19.95**	100.65 ± 19**

新产生的细胞的密度是以BrdU阳性细胞平均如/mm² ± SEM来表示的, 它们的值与盐水处理不同, *p<0.05, **p<0.01.

[0100] 表2. 大脑中新产生细胞的密度
[0101]

区域	仅仅局部缺血	无局部缺血
Subventricular 区 (BrdU 50mg/kg ip/天 X 14天)		
最后一次BrdU注射后一天(14天) 右侧	3237.77 × 179.14**	2301.64 × 171.37
最后一次BrdU注射后一天(14天) 左侧	2361.49 × 156.55	2094.06 × 229.20
最后一次BrdU注射后4周 右侧	272.96 × 32.66	222.07 × 21.81
最后一次BrdU注射后4周 左侧	206.16 × 13.00	191.86 × 15.88
Rostral migratory stream (BrdU 50mg/kg ip/天 X 14天)		
最后一次BrdU注射后一天(14天) 右侧	1185 × 197.65	869.2 × 98.25
最后一次BrdU注射后一天(14天) 左侧	1008.75 × 137.1	841.9 × 230.4
最后一次BrdU注射后4周 右侧	38.15 × 20.65	21.85 × 6.55
最后一次BrdU注射后4周 左侧	18.75 × 7.2	21.2 × 5.2
Olfactory bulb (BrdU 50mg/kg ip/天 X 14天)		
最后一次BrdU注射后一天(14天) 右侧	90.7 × 8.6**	45.15 × 7.4
最后一次BrdU注射后一天(14天) 左侧	48.45 × 5.9	31.55 × 8.45
最后一次BrdU注射后4周(42天) 右侧	11.4 × 1.45	12.95 × 2.6
最后一次BrdU注射后4周(42天) 左侧	8.85 × 0.95	9.95 × 2.85
Dentate gyrus (BrdU 50mg/kg ip/天 X 14天)		
最后一次BrdU注射后一天(14天) 右侧	55.11 × 4.06	61.31 × 4.49
最后一次BrdU注射后一天(14天) 左侧	57.00 × 3.99	64.44 × 4.13
最后一次BrdU注射后4周(42天) 右侧	30.20 × 4.81	36.99 × 2.73
最后一次BrdU注射后4周(42天) 左侧	29.80 × 4.32	40.33 × 3.72

[0102] 新产生的细胞的密度是以 BrdU 阳性细胞平均如 /mm² ± SEM 来表示的。

[0103] 它们的值不同于非局部缺血组, *p < 0.05, **p < 0.01.

[0104] 参考文献

[0105] Burke and Olson, “在酵母人工染色体载体上制备克隆库” in Methods in Enzymology, Vol. 194, “Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology”. Eds. C. Guthrie and G. Fink, Academic Press, inc., Chap. 17, pp. 251-270 (1991).

[0106] Capecchi, “利用同源重组方法来修饰基因组” science 244:1288-1292 (1989).

[0107] Davies et al., 酵母人工染色体中用于种间基因传递的靶定改造, Nucleic Acids Research, Vol. 20, No. 11, pp. 2693-2698 (1992).

[0108] Dickson et al., “通过可插入载体进行的高频基因靶定” Human Molecular Genetics, Vol. 2, No. 8, pp. 1299-1302 (1993).

[0109] Duff and Lincoln, “将病原变异基因插入携带有人 APP 基因的酵母人工染色

体中并在 ES 细胞中表达, Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders, 1995.

[0110] Huxley et al., “通过细胞融合技术将酵母染色体上的人 HPRT 基因转移入鼠细胞中后的基因是有功能的基因, Genomics, 9 ;742-750 (1991).

[0111] Jokobovits et al., “起源于人的酵母人工染色体的细菌系传递和表达”, Nature, Vol. 362, pp. 255-261 (1993).

[0112] Lamb et al., “在转基因鼠中引入和表达 400kb 前体淀粉体蛋白基因”, Nature Genetics, Vol. 5, pp. 2-29 (1983).

[0113] Pearson and Choi., “在转基因鼠中表达取自酵母人工染色体的人 b-淀粉体前体蛋白基因”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993. 90 :10578-82

[0114] Rothstein, “靶定、破坏、替代、等位基因拯救: 酵母中的整合 DNA 转化” in Methodology in Enzymology, vol. 194, “Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology”. Eds. C. Guthrie and G. Fink, Academic Press, inc., Chap. 17, pp. 281-301 (1991).

[0115] Schedl et al., “在转基因鼠中包含有酪氨酸酶基因的酵母人工染色体赋予了拷贝数量依赖型表达”, Nature, Vol. 362, pp. 258-261 (1993).

[0116] Strauss et al., “鼠科动物中酵母人工染色体的细菌系传递, (1) 胶原质位点”, Science, Vol. 259, pp. 1904-1907 (1993).

[0117] Gibola, E, Eglitis, MA, Kantoff, PW, anderson, WF :利用逆转录酶病毒来转移和表达克隆的基因”. Biotechniques 4(6) :504-512, 1986.

[0118] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC :在 Pichia pastoris 中表达外源基因的进展, Bio/Technology 11 ;905-910, 1993.

[0119] Culver, 1998. 用来修复人 ADA 基因突变的位点介导的重组. (Abstract) Antisense DNA & RNA based therapeutics, February, 1998, Coronado, CA.

[0120] Hutson et al, 1991 “单链 Fv 类似物和融合蛋白的蛋白质工程” in Methods in Enzymology (JJ Langone, ed. ; Academic press, New York, NY) 203 :46-88.

[0121] Johnson and Bird, 1991 “单克隆抗体单链 fvb 衍生物的构建以及它们在大肠杆菌中的表达” in Methods in Enzymology (JJ Langone, ed. ; Academic press, New York, NY) 203 :88-89.

[0122] Memaugh and Mernaugh, 1995 “噬菌体展示的重组抗体概观” in Molecular Methods in plant Pathology (RP Singh and US Singh, eds. ; CRC Press Inc. , Boca Raton, FL) pp. 359-365.



图 1

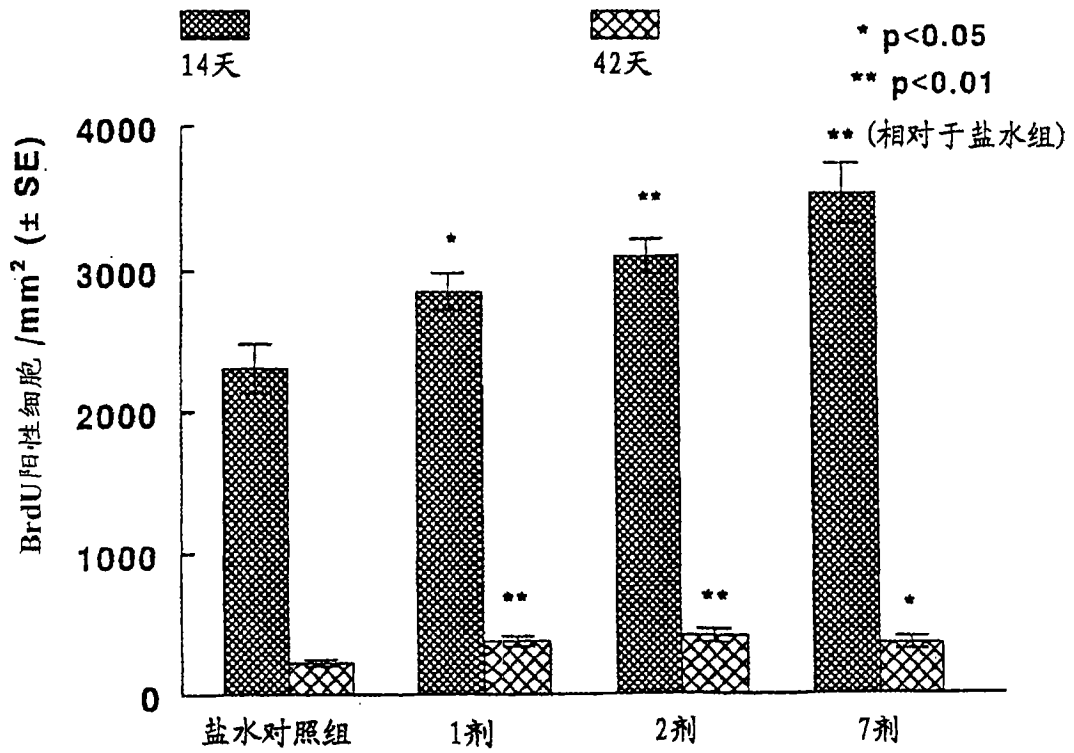


图 2a

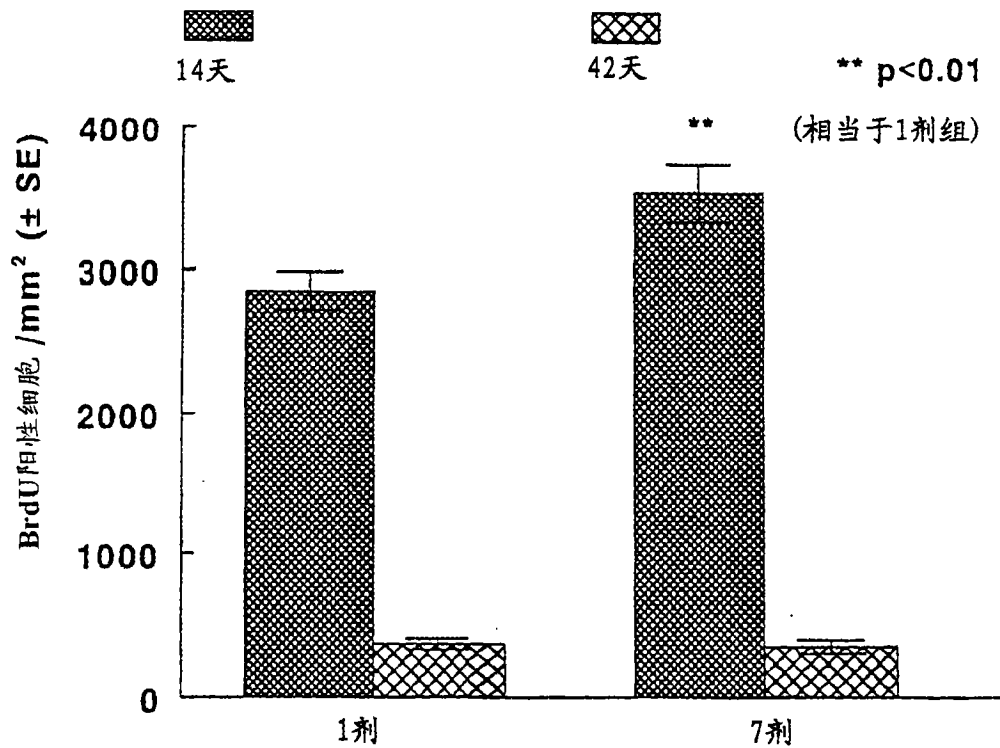


图 2b

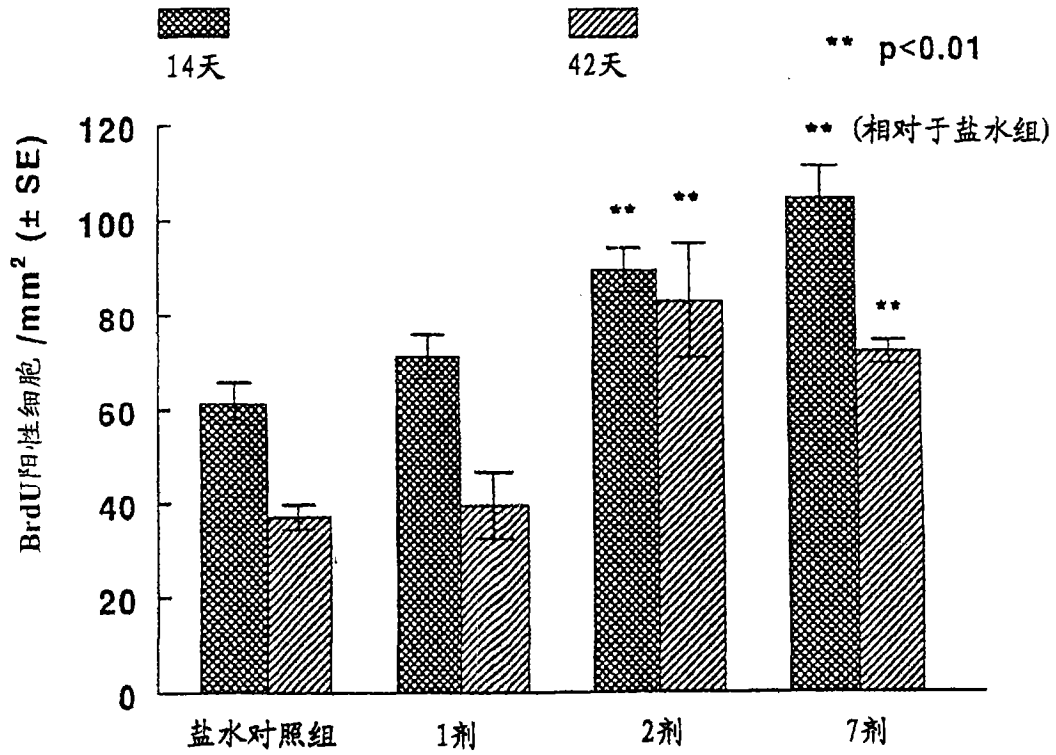


图 3

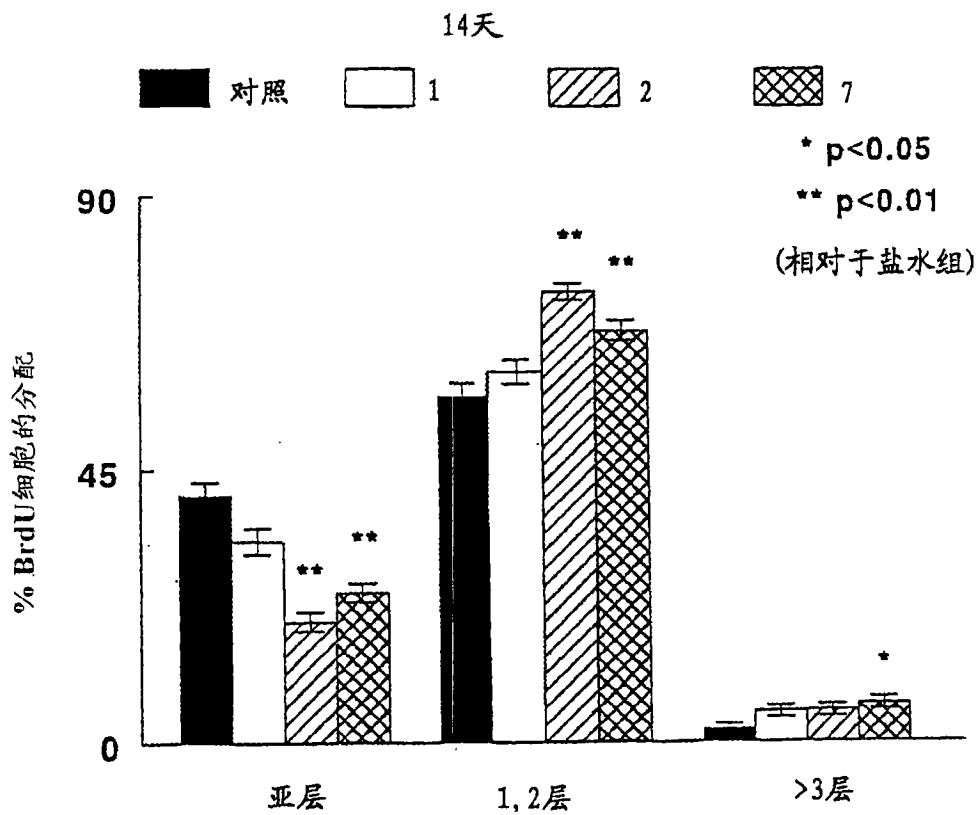


图 4a

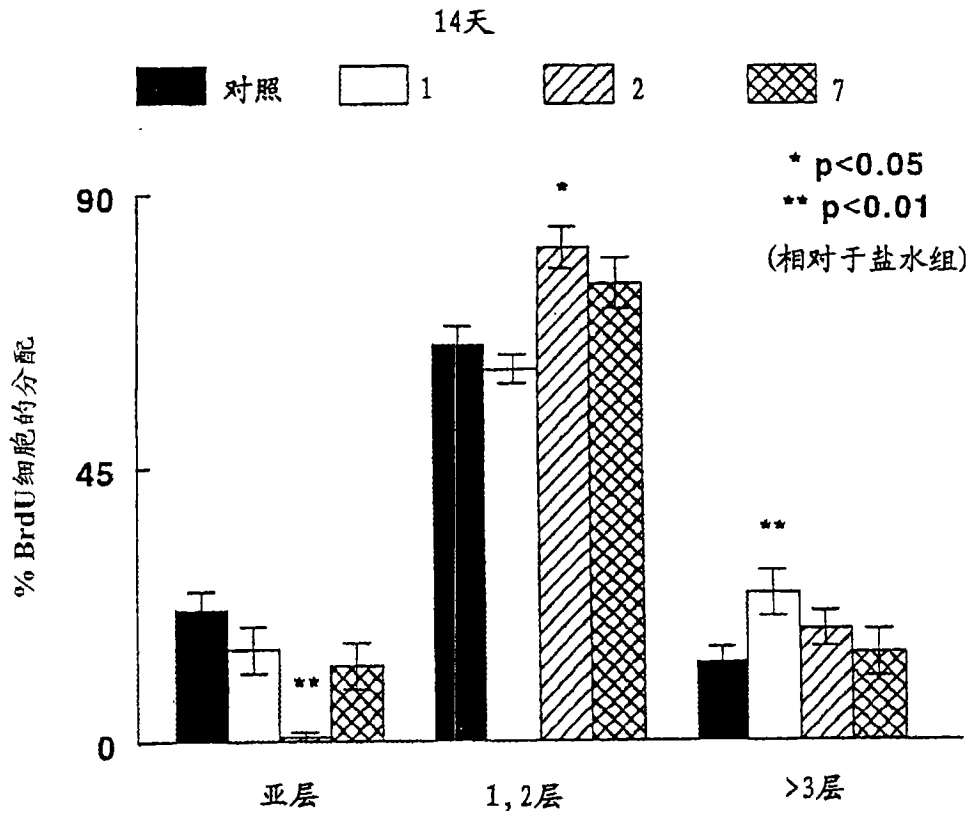


图 4b



图 5

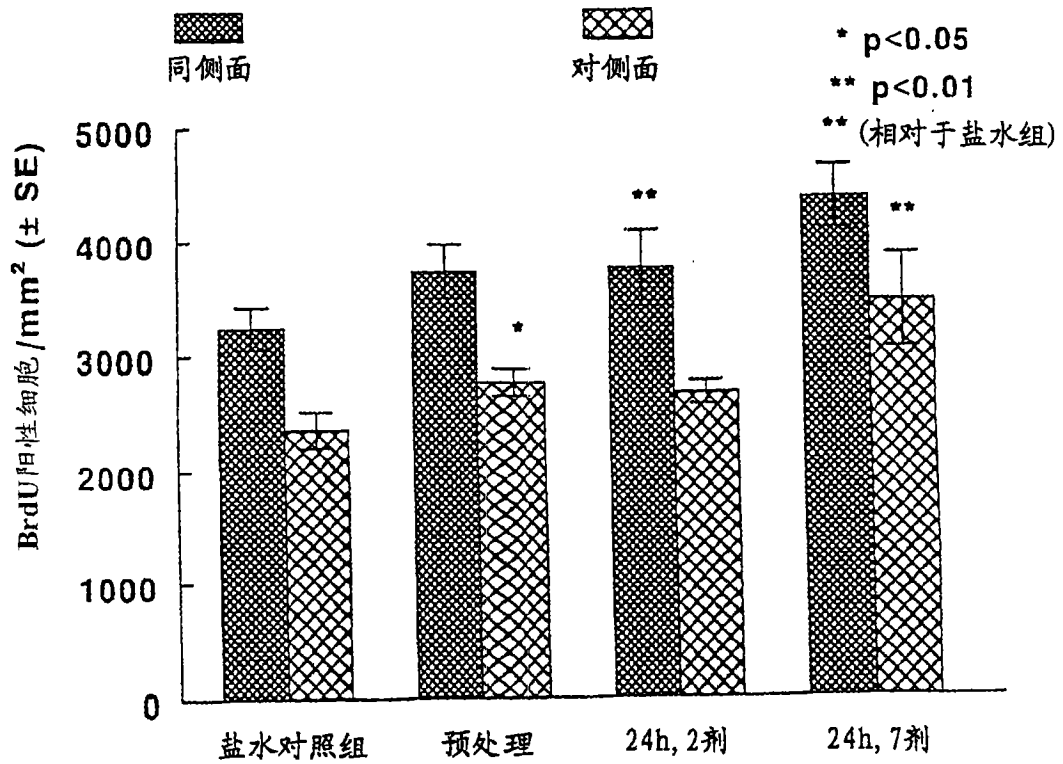


图 6a

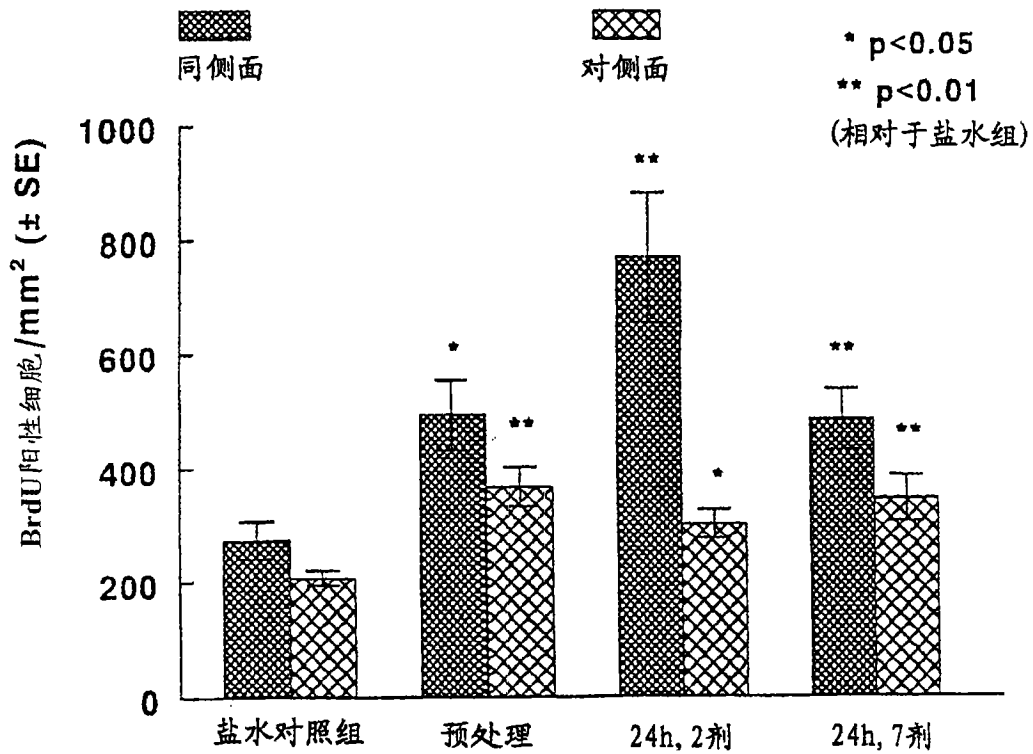


图 6b

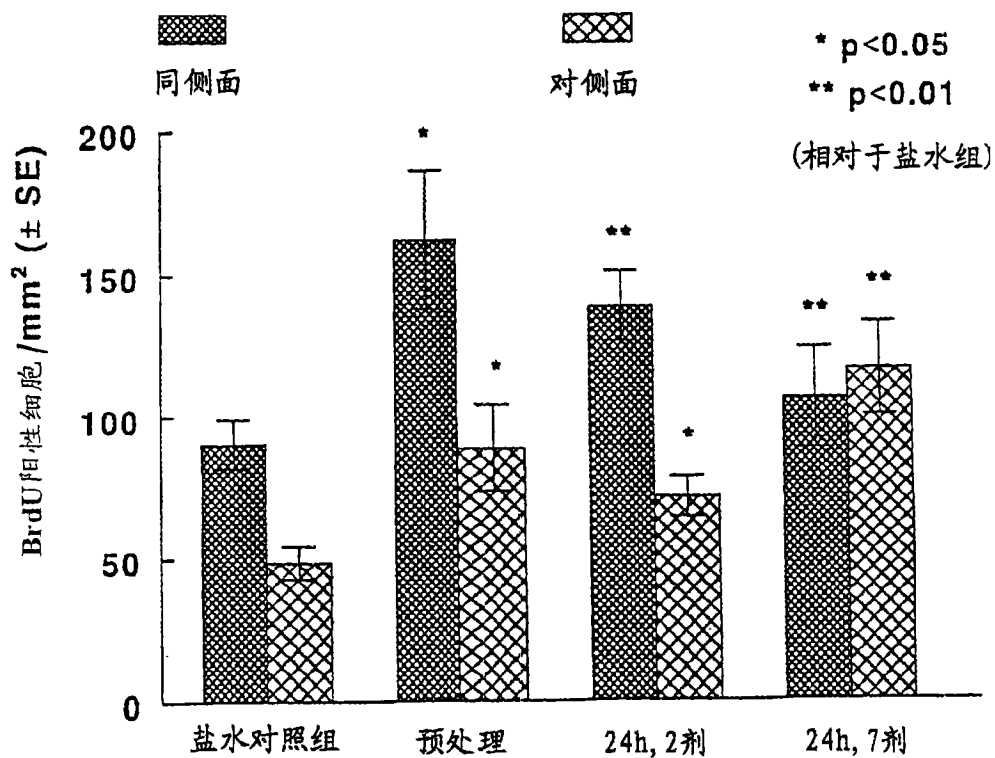


图 7a

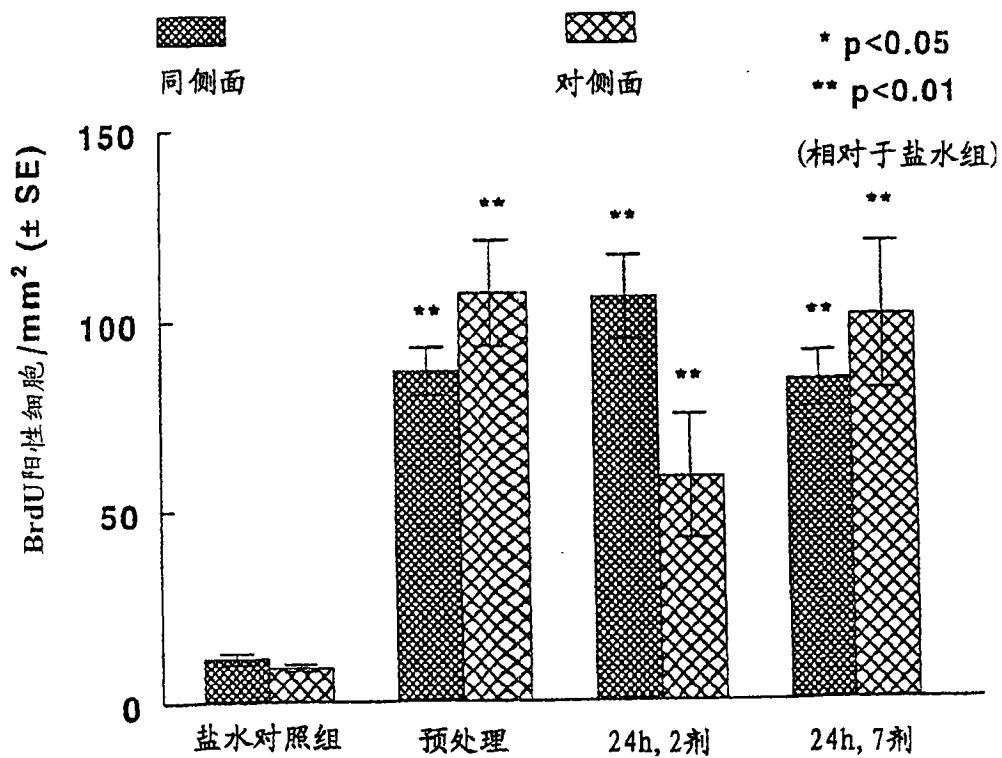


图 7b

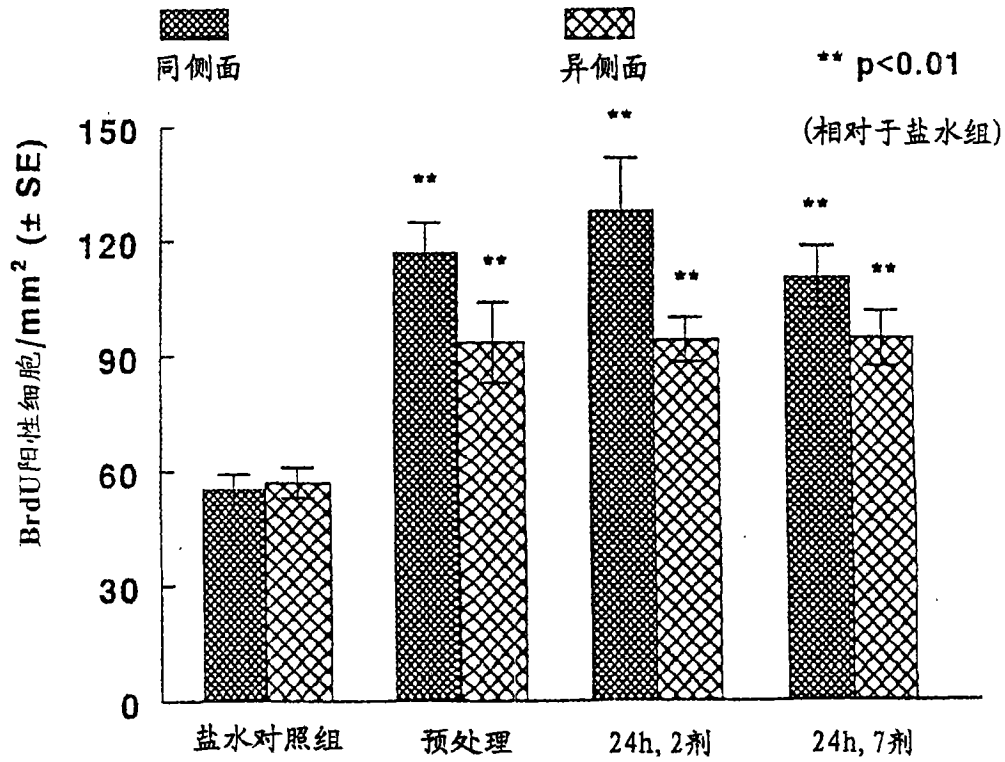


图 8a

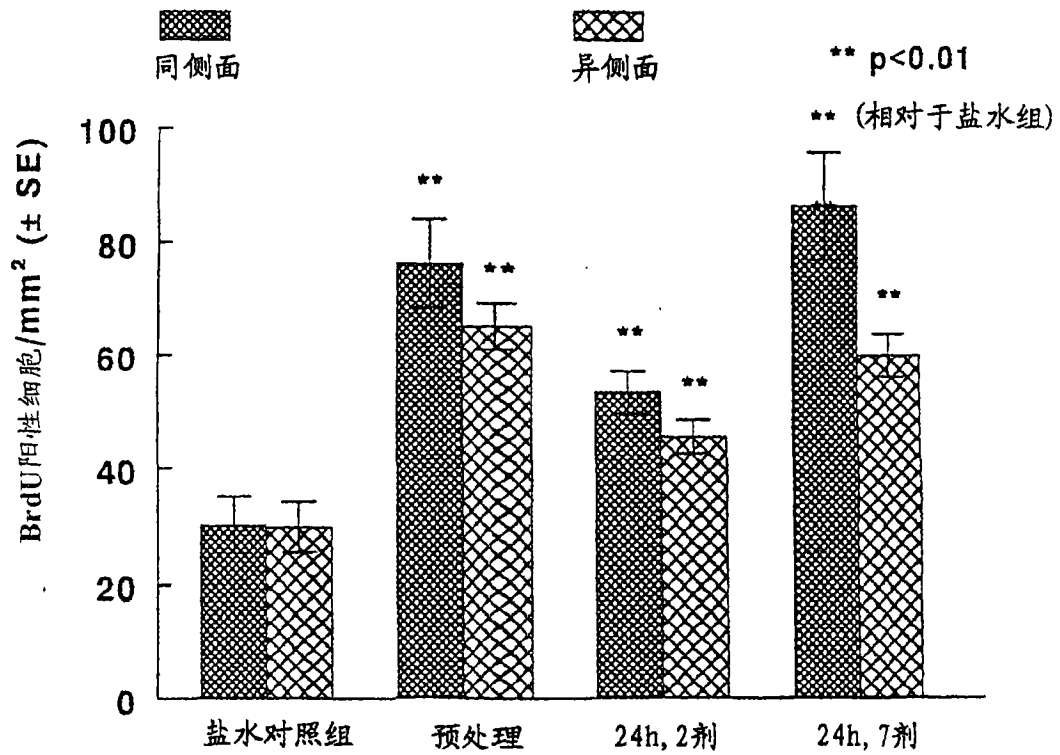


图 8b

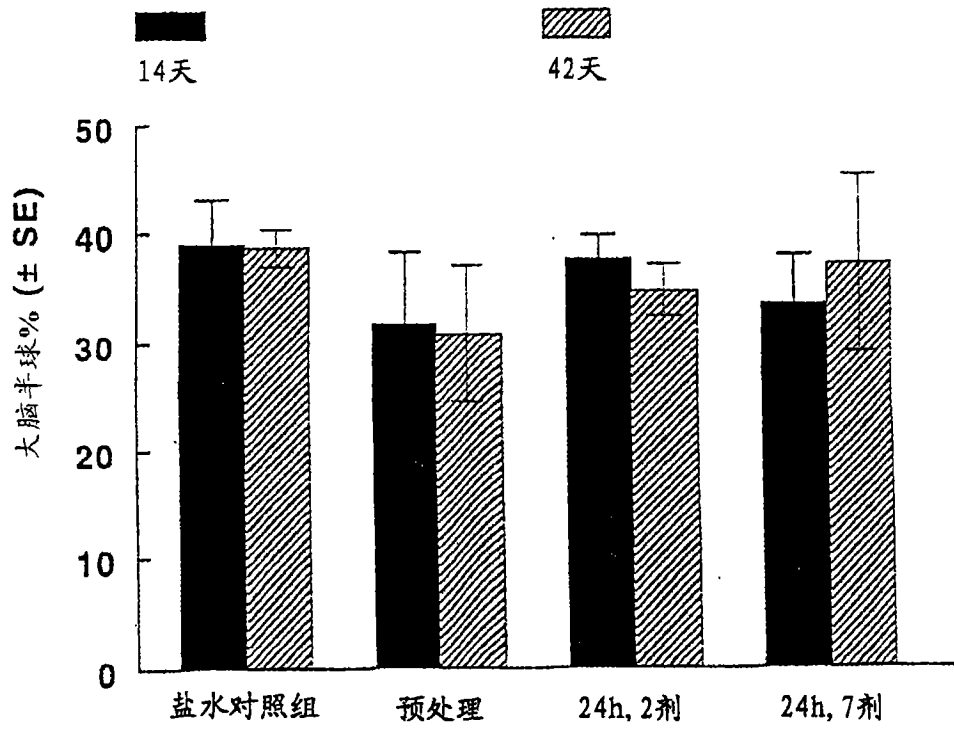


图 9

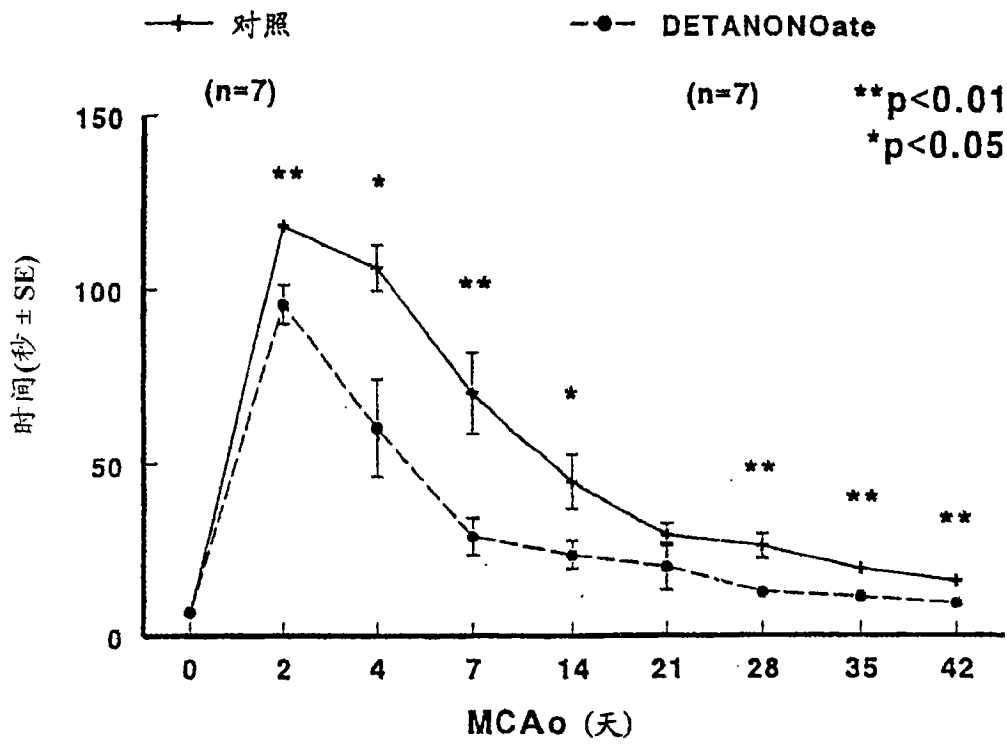


图 10

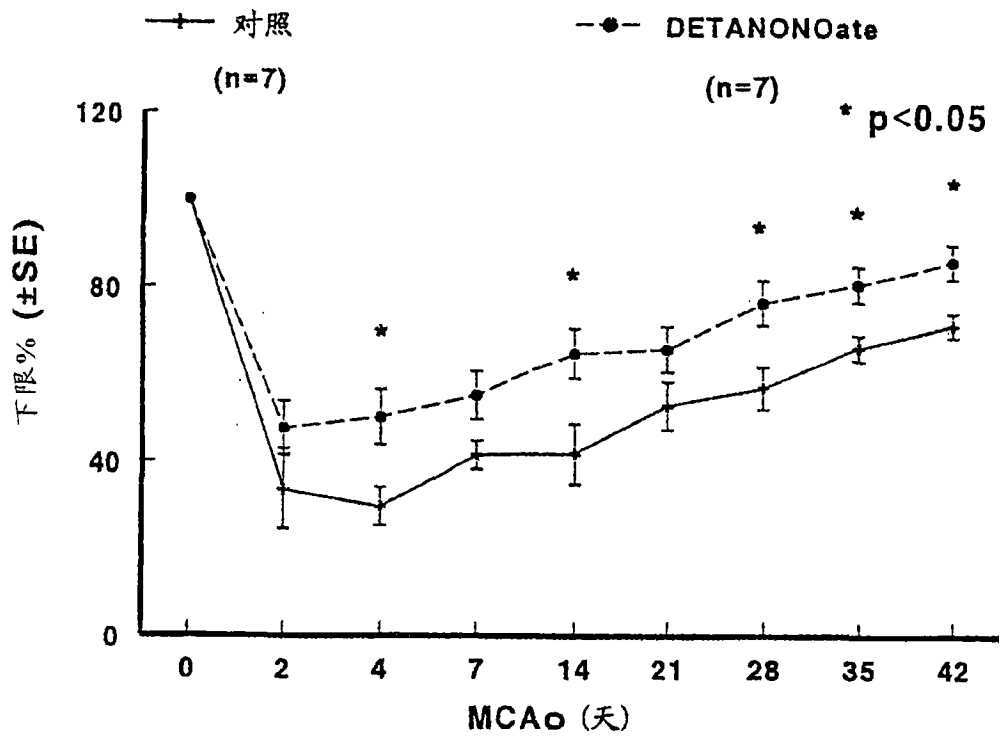


图 11

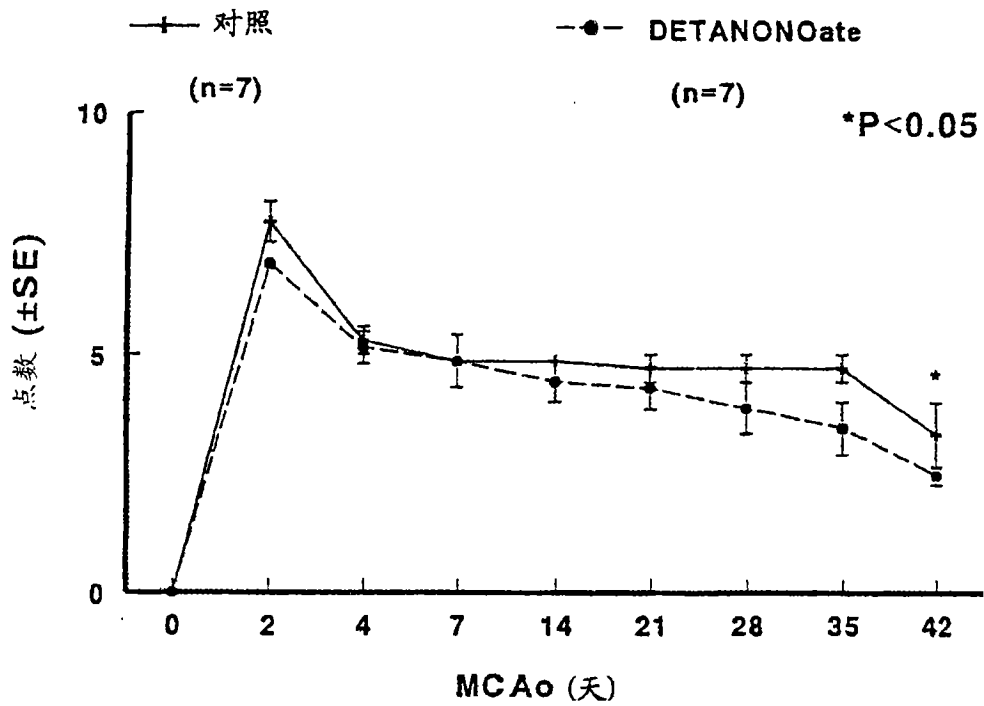


图 12

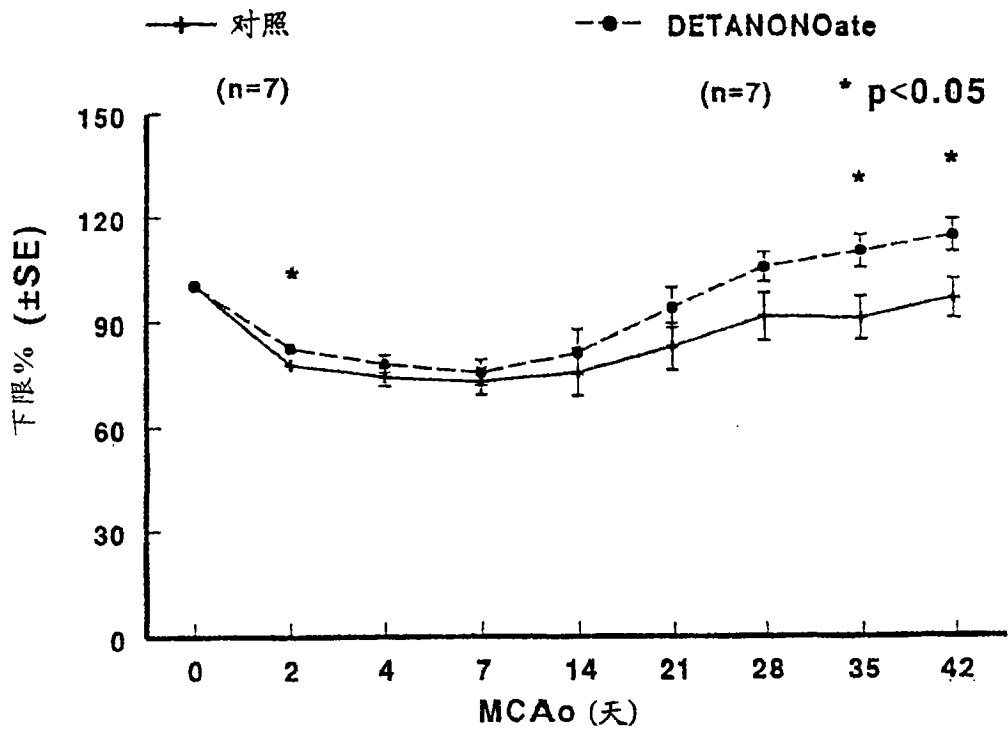


图 13

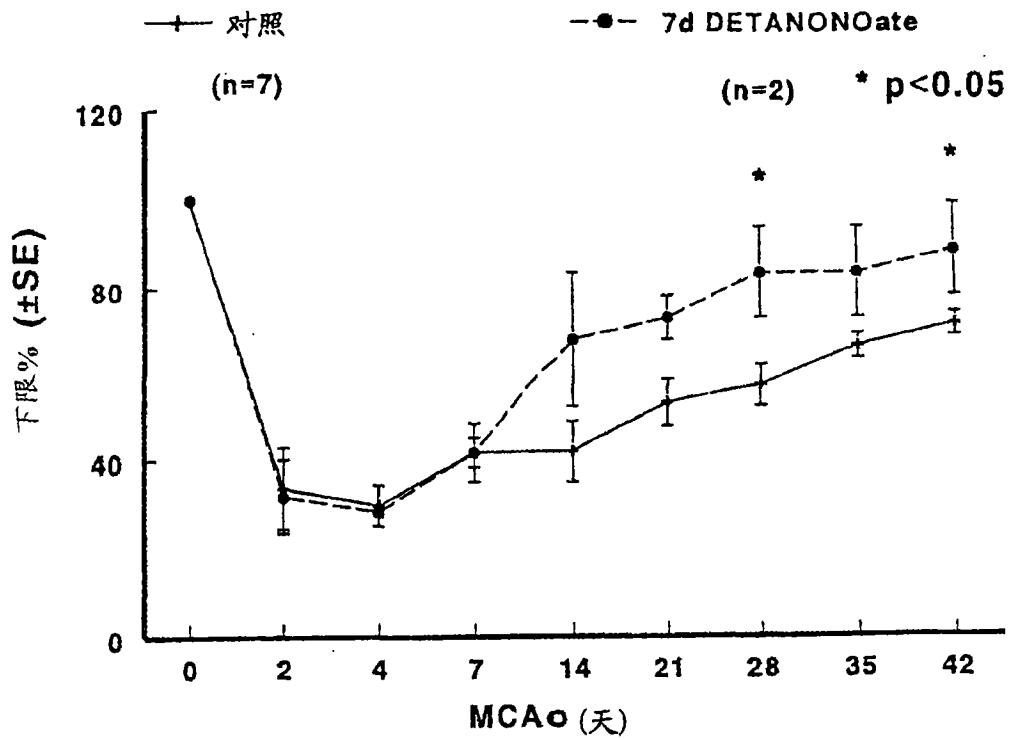


图 14

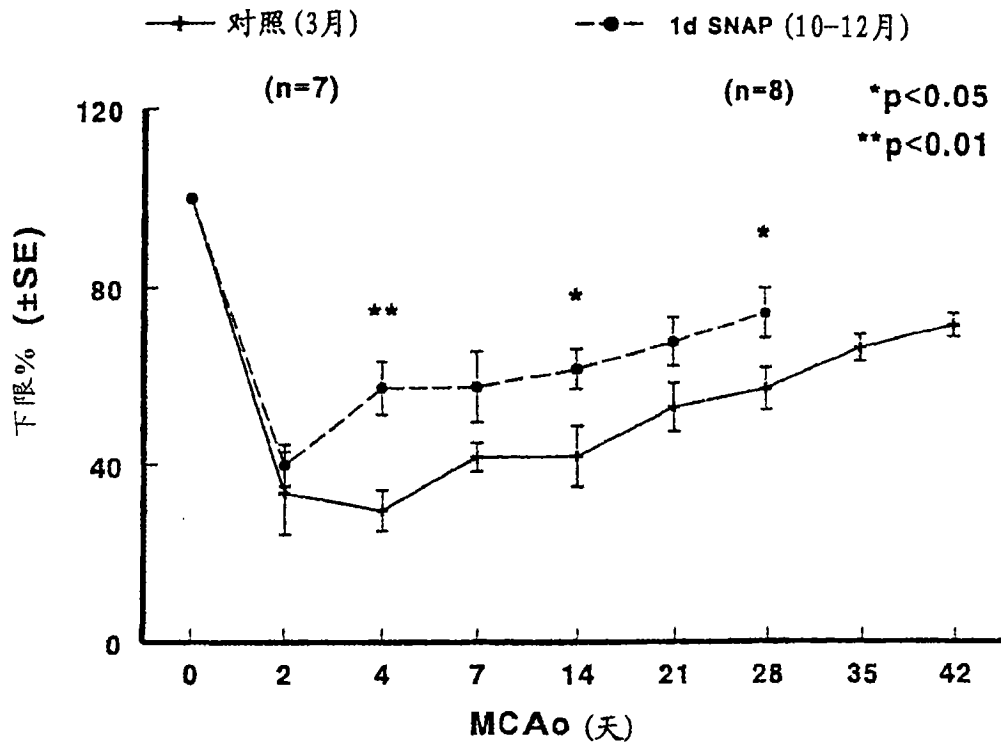


图 15

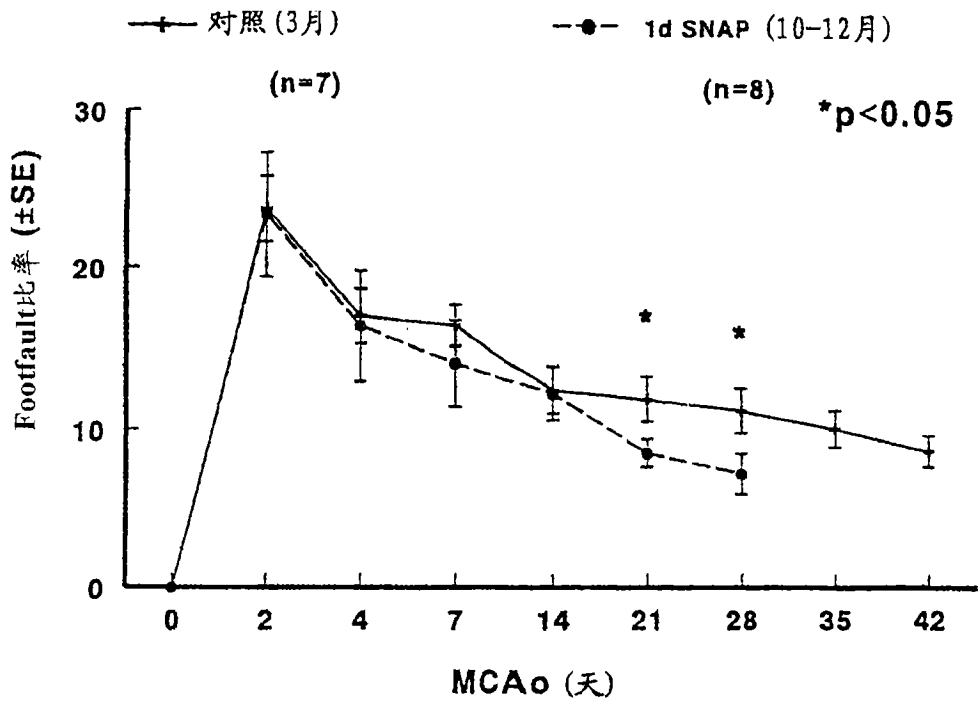


图 16

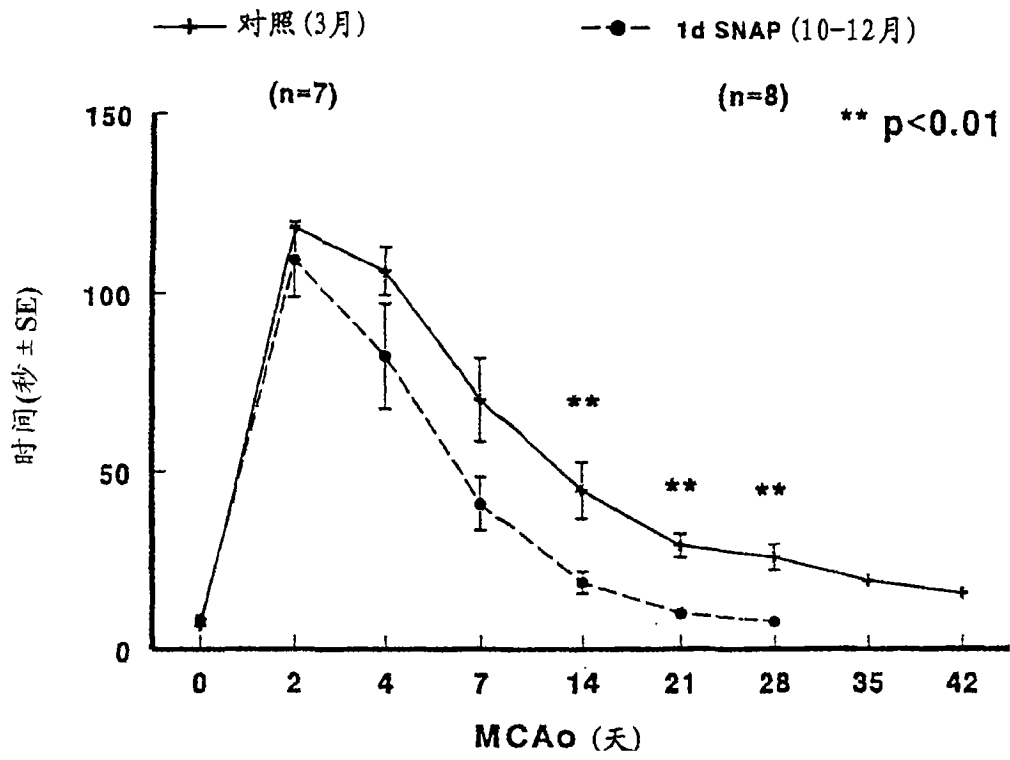


图 17