(19) 中华人民共和国国家知识产权局





(12) 发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101926823 A (43)申请公布日 2010.12.29

- (21)申请号 200910312094.5
- (22)申请日 2009.12.23
- (71)申请人 中南大学

地址 410083 湖南省长沙市河西麓山南路 1 号

- (72) 发明人 刘伏友 彭佑铭
- (74)专利代理机构 长沙市融智专利事务所 43114

代理人 颜勇

(51) Int. CI.

A61K 33/14 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

A61K 31/19(2006.01)

A61K 33/06 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种腹膜透析液用渗透剂及其透析液

(57) 摘要

本发明提供了一种腹膜透析液用渗透剂及其透析液,属于终末期肾病腹膜透析治疗中腹膜透析液的研究领域。所述渗透剂为 2.5-7.5%的麦芽糖水溶液;优选为 2.5%、4.25%或 7.5%的麦芽糖水溶液。所述的渗透剂制备的透析液,是在每 100ml 透析液中包括以下含量的成分:麦芽糖 2.5-7.5g,氯化钠 535mg,乳酸钠 448mg;氯化钙 25.7mg,氯化镁 5.08mg。优选每 100ml 透析液中包括麦芽糖 2.5g、4.25g 或 7.5g。本发明的渗透剂制备的透析液生物相容性好,能维持稳定的超滤效果,代谢后在体内产生较少的副作用且价格适宜。

- 1. 一种腹膜透析液用渗透剂,其特征在于,所述渗透剂为 2.5-7.5%的麦芽糖水溶液。
- 2. 根据权利要求1所述的渗透剂,其特征在于,所述渗透剂为2.5%的麦芽糖水溶液。
- 3. 根据权利要求1所述的渗透剂,其特征在于,所述渗透剂为4.25%的麦芽糖水溶液。
- 4. 根据权利要求 1 所述的渗透剂,其特征在于,所述渗透剂为 7.5%的麦芽糖水溶液。
- 5. 权利要求1所述的渗透剂制备的透析液,其特征在于,每100ml透析液中包括以下含量的成分:麦芽糖2.5-7.5g,氯化钠535mg,乳酸钠448mg;氯化钙25.7mg,氯化镁5.08mg。
- 6. 根据权利要求 5 所述的渗透剂制备的透析液, 其特征在于, 每 100m1 透析液中包括麦芽糖 2.5g。
- 7. 根据权利要求 5 所述的渗透剂制备的透析液, 其特征在于, 每 100m1 透析液中包括麦芽糖 4. 25g。
- 8. 根据权利要求 5 所述的渗透剂制备的透析液, 其特征在于, 每 100ml 透析液中包括麦芽糖 7.5g。

一种腹膜透析液用渗透剂及其透析液

技术领域

[0001] 本发明属于终末期肾病腹膜透析治疗中腹膜透析液的研究领域。涉及一种腹膜透析液用渗透剂及其透析液。

背景技术

[0002] 腹膜透析是一种有效治疗终末期肾病方法之一。在腹膜透析中,腹膜作为半透膜,表面有大量的血管和毛细血管。透析时,腹透液通过腹透管注入腹腔,溶质在腹透液和血管之间进行交换,同时腹透液提供一定的渗透压,血管中多余的液体会超滤到腹腔中,从而达到水、电解质和酸碱的平衡。而在腹膜透析液中起主要作用的是渗透剂。目前,国际上常规使用的腹透液的渗透剂主要为葡萄糖、氨基酸、艾考糊精等,它们的特点各异。

[0003] 以葡萄糖为渗透剂的透析液在形成超滤的同时,对人体产生诸多的不良后果。1. 葡萄糖在腹腔内的吸收可随治疗时间的延长而增加,由此导致高血糖、高胰岛素血症、高脂血症、高血压、体重质量增加等代谢紊乱。2. 高浓度葡萄糖以及葡萄糖降解产物可损伤腹膜间皮细胞 [1]。同时高糖能够抑制腹膜间皮细胞的增殖,损伤腹膜间皮细胞,并刺激腹膜间皮细胞分泌更多的转化生长因子 -β1(TGF-β1),结缔组织生长因子 (CTGF),纤维蛋白原(FN)和血浆酶原激活酶抑制因子(PAI-1),从而使腹膜间皮细胞的细胞外基质生成增多、降解减少,最终导致腹膜纤维化的形成 [2,3]。3. 葡萄糖在腹腔内的快速吸收会导致渗透梯度的减小或消失,致使超滤量减少,甚至出现反超滤。4. 由于腹透液中的葡萄糖并不完全稳定,可降解为 5-羟甲糠醛,后者易与阴离子物质结合形成希夫氏碱,这种化合物是一种早期糖基化产物,会改变许多组织成分的特性,最终可导致腹膜结构和功能发生不可逆变化,引起腹膜超滤功能下降 [4],最终出现超滤衰竭。

[0004] 以氨基酸作为渗透剂的透析液不仅具备与葡萄糖透析液相类似的毒素清除和超滤功能,并能有效改善终末期肾功能衰竭患者的各项营养指标^[5]。同时可减少腹膜与葡萄糖的接触,而且其酸碱度较高 (pH6. 2),更接近生理性,减少了对腹膜的刺激,而且氨基酸透析液无葡萄糖降解产物产生,进一步减少了对腹膜间皮细胞功能的影响^[6]。但是以下缺陷限制了氨基酸腹透液在临床中的应用。1. 氨基酸透析液的应用会发生轻微的胃肠道反应,如恶心、呕吐等,同时抑制食欲,并引起代谢性酸中毒。2. 氨基酸透析液改变腹膜表面的电荷性质,并增加血中尿素氮水平,抑制白细胞的功能,加重同型半胱氨酸血症,从而增加发生动脉粥样硬化的危险性。3. 由于氨基酸的分子量比葡萄糖更小,其被腹膜吸收的速度更快,造成渗透压迅速下降,超滤减少。

[0005] 艾考糊精是以淀粉类多糖为渗透剂的一种新型透析液。由于在人体内降解和吸收缓慢,有效超滤可保持8~12h,10h左右达高峰,延长留腹时间,超滤作用无明显减少^[7]。相对于传统透析液,艾考糊精透析液还具有其他优点,诸如具备良好的生物相容性,可通过降低碳水化合物的吸收而减少代谢并发症^[8],在增加超滤的同时改善患者液体状况,对患者的残余肾功能有保护作用等^[9]。其不足之处在于1. 在使用艾考糊精腹膜透析液中,由于测量方法的局限性,会产生血糖值的假性偏高而引起严重低血糖或死亡的不良后果^[10]。由

于艾考糊精在体内的蓄积,会过敏主要表现为皮肤过敏,如皮疹,严重时可为轻度剥脱性皮炎^[11]。3. 由于其价格昂贵,极大地限制了它在临床上的使用,尤其是在发展中国家。

[0006] 所以根据目前腹膜透析液的现状,寻找和研发新型的渗透剂,开发出生物相容性好,能维持稳定的超滤效果,代谢后在体内产生较少的副作用且价格适宜的腹膜透析液成为现在研究的一项重要内容。

[0007] 参考文献:

[0008] [1]Zoltzer. EKlesn, Ra, hidG, et al. Perit Dia Int, 2000, 20(6):66-61.

[0009] [2] 刘映红,刘伏友,张浩,等. 高糖对人腹膜间皮细胞的增殖和损伤及分泌细胞因子的影响. 中南大学学报(医学版)2006,31(4):575-579.

[0010] [3] RippiatC, Chen QM, Remacle J, et al Cell cycle regulating H202 inducedpremature scense of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papillomavirus E6 and E7 proteins. Exp Geronto, 2003, 35(6): 733-755.

[0011] [4] Witowski J, Wi; niew, ka J, Ko 叮 bal, ka K, et al. JAmsoe Ne Phrol, 2001, 12: 2434-2441.

[0012] [5] 王军,俞雨生,贾忠辉等. 氨基酸腹膜透析对腹透患者营养状况的影响. 肾脏病与透析移植杂志;2004,13(4):330-335.

[0013] [6]ChanTM, Leung JKH, SunYLet al. Different effectsof amino acid-based and glucose-based dialysate from peritoneal dialysis patients on mesothelial cellultrastructure and function[J]. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18(6): 1086-1094.

[0014] [7] Jel oka TK, Ers oy FF, YavuzM, et al. What is the optimal dwell time formaximizing ultrafiltrati on with icodextrin exchange in automated peritoneal dialysis patients [J] Perit Dial I nt, 2006, 26(3):336-340.

[0015] [8] Babaz ono T, Nakamoto H, Kasai K, et al. Effects of icodextrin onglycemic and lipid profiles in diabetic patients undergoing peritonealdialysis [J]. Am J Nephrol, 2007, 27(4):409-415.

[0016] [9] Adachi Y, Nakagawa Y, Nishi o A. Icodextrin preserves residual renalfunction in patients treated with automated peritoneal dialysis[J]. Perit DialInt, 2006, 26(3):405-407.

[0017] [10] Slim S, Griffiths MJ, Gama R. I codextrin-still a cause for concern withblood glucose monitoring in continuous ambulat ory peritoneal dialysis patients with diabetes [J]. Ann Clin Biochem, 2007, 44 (Pt2):196-197.

[0018] [11] Lee SH, Park HC, Sim SR, et al. Severe cutaneous hypersensitivity toicodextrin in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient[J]. JNephrol, 2006, 19(5):673-676.

发明内容

[0019] 本发明的目的是针对目前几种常用腹透液中渗透剂存在生物相容性差,在腹腔内

吸收速度快,在体内造成代谢紊乱以及价格昂贵的现状,提供一种以麦芽糖 (Maltose) 为原料的腹膜透析液用渗透剂及其透析液。以期克服上述缺点,提高腹膜透析液的效能和生物相容性。

[0020] 本发明的一种腹膜透析液用渗透剂为 2.5-7.5%的麦芽糖水溶液。

[0021] 所述渗透剂优选为 2.5%、4.25%或 7.5%的麦芽糖水溶液。

[0022] 所述的渗透剂制备的透析液,是在每 100m1 透析液中包括以下含量的成分:麦芽糖 2.5-7.5g,氯化钠 535mg,乳酸钠 448mg;氯化钙 25.7mg,氯化镁 5.08mg。

[0023] 优选每 100ml 透析液中包括麦芽糖 2.5g、4.25g 或 7.5g。

[0024] 麦芽糖作为腹膜透析液的渗透剂有以下特征:

[0025] 1. 麦芽糖是一种 2 分子葡萄糖通过 α –1–4 糖苷键连接而成的双糖。在自然界中来源广泛,价格便宜。其分子式 $C_{12}H_{22}O_{11}$,分子量 342. 296509D,分子量大于葡萄糖分子量 180D,分子式 $C_6H_{12}O_6$,同样大于氨基酸平均分子量 128D。小于艾考糊精平均分子量 13000 \sim 19000D。麦芽糖结构示意图(见图 1)。

[0026] 2. 腹膜透析液之所以产生超滤作用是来自于渗透剂产生的渗透压。不同浓度的葡萄糖透析液产生的渗透压在 346-478m0sm/L 之间,氨基酸腹膜透析液的渗透压在 365-396m0sm/L 之间,艾考糊精腹膜透析液的渗透压在 282-286m0sm/L,而本发明 2.5%-7.5%的麦芽糖腹透液的渗透压在 321-432m0sm/L 之间,可以产生有效的超滤效能。

[0027] 3. 传统的葡萄糖透析液的非生物相容性特点,可引起腹膜血管新生和细胞外基质堆积,造成腹膜的结构发生不可逆性改变,从而损伤腹膜功能损害。而麦芽糖腹膜透析液含有葡萄糖降解产物少,可以减少因为高糖、高渗、及含葡萄糖降解产物等对腹膜结构和功能的损害,延长腹膜透析的时间。

[0028] 4. 在代谢方面,传统的葡萄糖透析液会引起高脂血症、高血糖、高胰岛素血症等代谢紊乱的临场表现。艾考糊精透析液在体内代谢产物主要是麦芽 2 糖、麦芽 3 糖、麦芽 4 糖等,这些代谢产物的进一步降解不需要胰岛素的参与,所以能改善脂质谱,并且显示对代谢谱的有益作用,特别是对血糖控制不良的患者。麦芽糖透析液有类似于艾考糊精降解产物的代谢特点,故对代谢的影响较小。

[0029] 优点和有益效果

[0030] 1. 麦芽糖分子量在葡萄糖和艾考糊精之间,相同浓度的麦芽糖腹膜透析液产生的渗透压也在葡萄糖和艾考糊精腹膜透析液之间。麦芽糖腹膜透析液能维持稳定的渗透压,2.5%-7.5%的麦芽糖透析液的渗透压在 321-432mOsm/L 之间,可以产生有效的超滤效能。[0031] 2.4小时大鼠超滤实验结果显示,麦芽糖透析液能产生有效的超滤,其中 2.5%和 4.25%的麦芽糖透析液的超滤量大于 2.5%、4.25%的葡萄糖透析液以及 7.5%的艾考糊精腹透液,(P < 0.05),8小时的大鼠超滤实验结果显示 2.5%和 4.25%的麦芽糖透析液的超滤量大于 2.5%、4.25%的葡萄糖透析液, (P < 0.05),和艾考糊精透析液比较无统计学差异, (P > 0.05)。

[0032] 3. 通过体外实验观察含 2.5%、4.25%麦芽糖培养基和 2.5%、4.25%葡萄糖培养基以及 7.5%艾考糊精培养基对人腹膜间皮细胞的生物相容性及功能的影响,结果显示 48 小时和 72 小时,上述培养基对细胞的抑制作用以麦芽糖组最不明显,优于其它两种培养基,(P < 0.05),24 小时各组无明显统计学差异,(P > 0.05)。

[0033] 4. 传统的葡萄糖透析液具有高糖、高渗、及含葡萄糖降解产物等非生物相容性特点,可引起腹膜血管新生和细胞外基质堆积,长期使用会使腹膜的结构发生不可逆性改变,从而损伤腹膜功能损害。而麦芽糖腹膜透析液含有葡萄糖降解产物少,可以减少因为高糖、高渗、及含葡萄糖降解产物等对腹膜结构和功能的损害,延长腹膜透析的时间。正常大鼠长期腹膜透析实验结果显示麦芽糖透析液对腹膜增生和纤维化的影响优于葡萄糖透析液。

[0034] 5. 在代谢方面,传统的葡萄糖透析液会引起高脂血症、高血糖、高胰岛素血症等代谢紊乱的临场表现。艾考糊精透析液在体内代谢产物主要是麦芽 2 糖、麦芽 3 糖、麦芽 4 糖等,这些代谢产物的进一步降解不需要胰岛素的参与,所以能改善脂质谱,并且显示对代谢谱的有益作用,特别是对血糖控制不良的患者。麦芽糖透析液有类似于艾考糊精降解产物的代谢特点,故对代谢的影响较小。

附图说明

[0035] 图 1 为麦芽糖分子结构示意图;

[0036] 图 2 为正常大鼠 4 小时超滤实验中采用高效液相色谱法检测麦芽糖浓度的结果图:

[0037] GLU 是葡萄糖, MAL 是麦芽糖;

[0038] 图 3 为正常大鼠 4 小时超滤实验结果的统计学分析图;

[0039] 从左至右的分组为 0.9% 生理盐水,2.5% 葡萄糖透析液,4.25% 葡萄糖透析液,2.5% 麦芽糖透析液,4.25% 麦芽糖透析液,7.5% 艾考糊精透析液,*表示与 0.9% 生理盐水组相比,p < 0.05,#为与相同浓度葡萄糖组相比较,p < 0.05;

[0040] 图 4 为正常大鼠长期腹膜透析实验 IE 染色图;

[0041] A:0.9% NS;B:2.5% Maltose;C:4.25% Maltose;

[0042] 图 5 为正常大鼠长期腹膜透析实验 Masson 染色图;

[0043] A:0.9% NS;B:2.5% Maltose;C:4.25% Maltose;

[0044] 图 6 为不同透析液对人腹膜间皮细胞 48 小时细胞增殖实验;

[0045] 1:2.5% 葡萄糖透析液;2:4.25% 葡萄糖透析液;3:2.5% 麦芽糖透析液;4:4.25% 麦芽糖透析液;5:7.5% 艾考糊精透析液,* 表示与2.5% 葡萄糖透析液,4.25% 葡萄糖透析液及7.5% 艾考糊精透析液相比,p < 0.05。

[0046] 图 7 为不同透析液对人腹膜间皮细胞 72 小时细胞增殖实验;

[0047] 1:2.5% 葡萄糖透析液;2:4.25% 葡萄糖透析液;3:2.5% 麦芽糖透析液;4:4.25% 麦芽糖透析液;5:7.5% 艾考糊精透析液;*表示与2.5% 葡萄糖透析液,4.25% 葡萄糖透析液及7.5% 艾考糊精透析液相比,p < 0.05。

具体实施方式

[0048] 以下实施方式旨在进一步说明本发明,而不是限制本发明。

[0049] 1.2.5%、4.25%、7.5%麦芽糖透析液配方如下:(含量/100ml)

[0050]

麦芽糖	2.5 g/4.25 g/7.5 g
氯化钠	535mg
乳酸钠	448mg
氯化钙	25.7mg
氯化镁	5.08mg

[0051] 2. 灭菌方法:麦芽糖透析液用玻璃瓶包装,灭菌方法为 0. 1Mpa、111℃、灭菌时间为 60min。当温度降至 90℃以下时,进行自动水喷淋,经过 60min 左右温度降为 50℃,压力为零,打开消毒柜门。

[0052] 3. 实验 1 正常大鼠 4 小时超滤实验:

[0053] 比较 2.5%、4.25% 麦芽糖透析液与 0.9% 生理盐水、2.5% 和 4.25% 葡萄糖透析液以及 7.5% 艾考糊精透析液在 4 小时的超滤效果。

[0054] 检测方法:

[0055] 血浆和透析液中的尿素、蛋白和葡萄糖浓度用罗氏 modular DPP 自动生化分析仪测定。

[0056] 2) 渗透压检测:采用冰点渗透压检测方法,使用仪器为FM8P全自动冰点渗透压检测仪。

[0057] 3) 麦芽糖含量检测方法:对于麦芽糖浓度的检测采用高效液相色谱法,使用 Agilent1100色谱仪,Thermo 公司的 BioBasic AX,5um,150*4.6mm 检测柱,流动相为乙晴和水,比例为 75: 25,流速为 1m1/min,柱温为 25 °C,使用荧光和紫外两种方法检测。见图 2,第一个峰是葡萄糖,第二个峰是麦芽糖。

[0058] 实验结果:

[0059] 其中 2.5% 麦芽糖透析液的超滤量大于 2.5% 葡萄糖透析液的超滤量,差异有统计学意义 (P < 0.05); 4.25% 的麦芽糖透析液的超滤量大于 4.25% 的葡萄糖透析液以及 7.5% 的艾考糊精透析液,差异有统计学意义 (P < 0.05),见图 3。

[0060] 4. 实验 2 正常大鼠长期腹膜透析实验(时间为 1 个月左右):

[0061] 比较 2.5%、4.25% 麦芽糖透析液与 0.9% 生理盐水、2.5% 和 4.25% 葡萄糖透析液以及 7.5% 艾考糊精透析液对正常大鼠腹膜结构和功能的影响。

[0062] 检测方法:

[0063] 腹膜厚度检测:分别检测 IE 染色和 Masson 染色的腹膜厚度。由不同的三个经过培训的实验人员,在显微镜下,选择不同的五个点,测量从腹膜间皮细胞到肌肉层的厚度,取平均数作为所测腹膜的厚度。使用(01ympus BX-40, Melville, NY)光学显微镜。

[0064] 实验结果:

[0065] 1) 正常大鼠长期腹膜透析实验超滤结果同实验 1。

[0066] 2) IE 染色(图4)和 Masson染色(图5)结果显示与0.9%生理盐水相比,2.5%、

4.25%麦芽糖组对腹膜厚度的影响无明显统计学意义 (P > 0.05)。

[0067] 实验 3. 不同透析液对人腹膜间皮细胞增殖实验:

[0068] 比较 2.5%、4.25% 麦芽糖透析液与 0.9% 生理盐水、2.5% 和 4.25% 葡萄糖透析液以及 7.5% 艾考糊精透析液对人腹膜间皮细胞生长的影响。

[0069] 实验材料:

[0070] 1) 试剂及耗材

[0071]

中南大学遗传实验室冻存
杭州四季青生物技术公司
Sigma 公司 (4℃贮存)
Gibco
Corning 公司
Corning 公司
Solarbio
南京建成生物工程研究所
湘雅二医院中心实验室
Corning
Corning
Axygen
Axygen
长沙飘安医疗器材有限公司
长沙飘安医疗器材有限公司

[0072] 2) 实验设备:

[0073]

[0074]

CO ₂ 培养箱	Forma 公司
正压无菌操作系统	苏州康美净化空调设备公司
超净工作台	苏州净化工程公司
高速离心机 (各种型号)	美国Beckman公司
紫外分光光度计	Beckman 公司
Gel Doc1000凝胶成像分析系统	美国BIO-RAD公司
-80℃超低温冰箱	Beckman 公司
-20℃冰箱	海尔电器公司
超纯水仪	Millipore公司
低温微量离心机	Eppendorf 公司
酶标仪	Bio-Rad公司
Duc-640分光光度计	Beckman 公司
移液器 (10 μ 1、100 μ 1、1000 μ 1)	德国Eppendorf公司
无菌罩	Air Tech 公司
尼康显微镜	日本尼康公司
酶标仪	Bio-Rad公司
Kodak IS4000凝胶成像分析系统	美国Kodak公司

[0075] 3)2.5%、4.25%麦芽糖透析液以上述方法配制,0.9%生理盐水为湘雅二医院制剂室提供,2.5%、4.25%葡萄糖透析液及7.5%艾考糊精透析液由百特公司惠赠。

[0076] 实验步骤:

[0077] 1) 培养与传代

[0078] 正常人腹膜间皮细胞 (HPMC) 均用 F12 培养基进行培养,在 37%.5% CO₂ 条件下生长至 $80\%\sim90\%$ 汇合时进行传代。吸去除培养器皿内的培养基,用 PBS 洗涤细胞 1 次,弃去 PBS,根据培养面积加入适量 0.1% 胰酶溶液消化,37% 放置 $3\sim5$ min,并在倒置显微镜下观察,待到绝大部分细胞变圆即加入培养基终止消化,吹打几次以离散成团的细胞,HPMC 细胞按 $1:3\sim1:4$ 比例进行传代。传代后的细胞于 37%.5% CO₂ 培养 24h 后全数换液一次,以去除消化后死亡的细胞,以后每 2d 全数换液一次。

[0079] 2)细胞干预

[0080] 将 HPMC 细胞进行培养、传代。待细胞长至 80%融合时进行消化,加培养基终止后用血球记数板行细胞记数,调节细胞浓度至 1-5×10⁴ 后,接种到 96 孔培养板。待细胞长至约 70%~ 80%融合时,用无血清 DMEM 培养基培养过夜,再进行干预试验。

[0081] 分为 0.9% 生理盐水组, 2.5%、4.25% 葡萄糖透析液组, 2.5%、4.25% 麦芽糖透析液组及 7.5% 艾考糊精透析液组,各组设 3 个复孔,分别干预 24、48、72 小时。每孔加入 5mg/ml MTT 溶液 20 μ 1,37 \mathbb{C} 、5% CO_2 孵育箱继续孵育 4 小时,终止培养,小心吸弃各孔内培养

上清液;每孔加入150 µ1 DMSO,振荡10min,使甲臢充分溶解。

[0082] 检测方法:

[0083] 1) 在酶联免疫检测仪上用 570nm 波长比色,测定各孔 A 值,以空白孔调零。

[0084] 统计学分析:

[0085] 数值用均数 \pm 标准差表示,采用 SPSS17. 0 软件,组间比较用单因素方差分析或 T 检验, (P < 0.05) 为差异有统计学意义。

[0086] 实验结果:

[0087] 24 小时细胞增殖实验结果显示各组无明显差异 (P > 0.05),48 和 72 小时细胞增殖实验结果显示麦芽糖透析液组对人腹膜间皮细胞的增殖的影响小于其他各组,差异有统计学意义 (*P < 0.05)。(1 组 2.5%葡萄糖透析液,2 组 4.25%葡萄糖透析液,3 组 2.5%麦芽糖透析液,4 组 4.25%麦芽糖透析液,5 组 7.5%艾考糊精透析液。)

[0088] 见图6和图7。

图 1

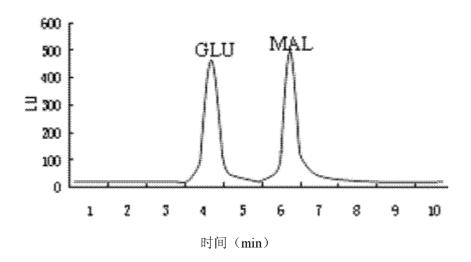
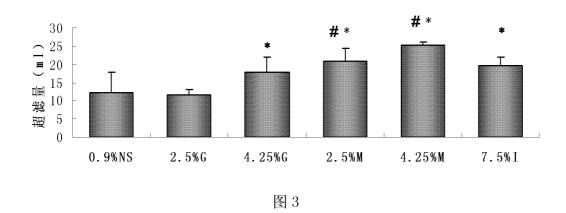


图 2



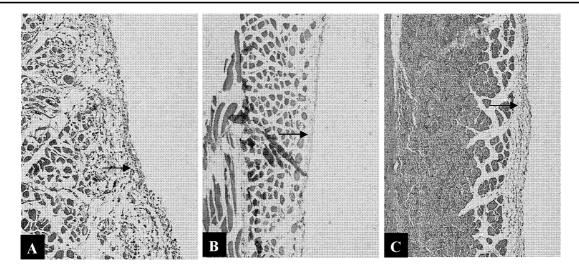


图 4

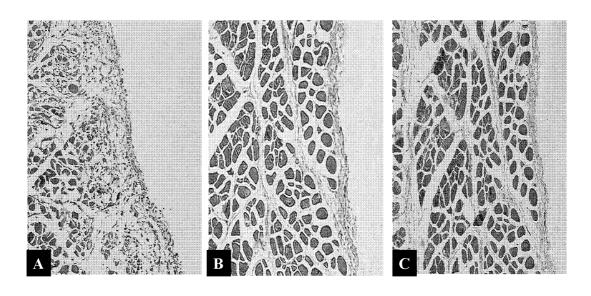


图 5

