



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110241046 A

(43)申请公布日 2019.09.17

(21)申请号 201910558554.6 *A23L 33/135*(2016.01)
(22)申请日 2019.06.26 *A23L 27/60*(2016.01)
(83)生物保藏信息 *A23C 9/123*(2006.01)
CGMCC No.15604 2018.04.11 *C12R 1/225*(2006.01)

(71)申请人 河北一然生物科技有限公司
地址 050000 河北省石家庄市正定高新技术
产业开发区北区邦秀东路16号

(72)发明人 赵林森 赵星 孙新凯 路江浩
杨美景 霍文敏 李云旭 梁丛丛
贾晓蒙

(74)专利代理机构 石家庄元汇专利代理事务所
(特殊普通合伙) 13115
代理人 李彤晓

(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)

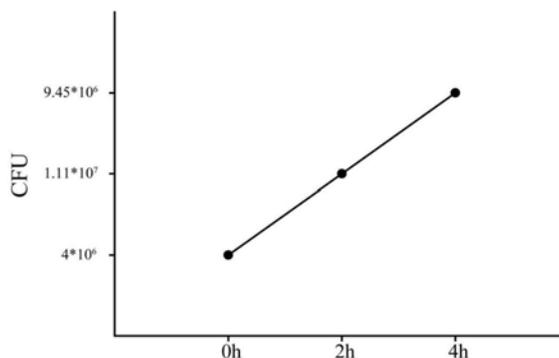
权利要求书1页 说明书6页 附图6页

(54)发明名称

一种能够缓解酒精性肝损伤的瑞士乳杆菌
及应用

(57)摘要

一种能够缓解酒精性肝损伤的瑞士乳杆菌及应用,属于微生物的技术领域,分类名称为瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC NO.15604,保藏日期为2018年4月11日。本发明的瑞士乳杆菌L551具有耐酸性,对酒精造成的血清ALT和AST增多有抑制作用;对酒精造成的肝脏MDA增多有抑制作用,并恢复肝脏GSH和SOD活性;对酒精造成的血清内毒素增多有抑制作用;对酒精造成的肝脏细胞炎症因子升高有抑制作用;减轻肝脏脂肪泡,减轻炎症细胞浸润。本发明瑞士乳杆菌L551可以有效缓解酒精造成的肝脏损伤。



1. 一种能够缓解酒精性肝损伤的瑞士乳杆菌,其特征在於,分类名称为瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC NO.15604,保藏日期为2018年4月11日。

2. 如权利要求1所述的瑞士乳杆菌缓解酒精性肝损伤的食品中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,包括以瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551为活性成分,或者以瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551为配料制成的食品。

4. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述的食品的剂型包括粉剂、颗粒剂、乳剂、片剂中的任一种。

5. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述的食品为即时性食品,采用低聚果糖、乳糖醇、水苏糖、维生素C中的一种或任意组合,与瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551复配制得,控制瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551的活菌数达到 10^9 CFU/ml。

6. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,将瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551的冻干粉与沙拉酱混合,控制瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551的活菌数达到 10^9 CFU/ml,沙拉酱用量100g。

7. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,将牛奶、白砂糖、奶油与稳定剂混合,化料后进行均质杀菌,将瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551与嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌复配后,接种发酵,破乳后分装于4℃后熟,得到发酵乳制剂。

8. 根据权利要求4所述的应用,其特征在於,所述的瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551的冻干粉由下述方法制备:将冻存于-80℃的瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551接入MRS液体培养基中,37℃培养18h,连续活化三代后,在4℃下6000rpm离心10min,弃上清,将菌体用灭菌的生理盐水洗涤三次后,重悬于生理盐水中并调整细胞浓度为 1.0×10^9 CFU/mL,得到细胞悬液,在4℃低温中保藏待用;将所得细胞悬液经冷冻干燥制得粉剂。

一种能够缓解酒精性肝损伤的瑞士乳杆菌及应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物的技术领域,涉及一种瑞士乳杆菌,具体涉及一种能够缓解酒精性肝损伤的瑞士乳杆菌及其应用。

背景技术

[0002] 我国是世界上最早酿酒的国家,也是酒文化的发源地,拥有悠久的饮酒历史,是酒类产品的消费大国。近些年来,由于社交需要和生活压力的增大,我国酒精消费人群增多,据统计已超过5亿人次。酒精依赖已经成为当今世界日益严重的公共卫生问题,在我国酒精所致的肝损伤呈逐年上升趋势,酒精已成为造成肝脏损伤的主要因素之一。由酒精造成的肝脏损伤主要包括酒精性脂肪肝,酒精性肝炎,酒精性肝纤维化及酒精性肝硬化;不仅如此,通过酒精对肝脏造成的损伤后,还会引发一系列的并发症,例如高血压、高血脂、糖尿病、动脉粥样硬化等等。因此,探索酒精性肝病的发生机制及干预措施具有十分重要的意义。

[0003] 酒精造成肝脏损伤的作用机制:(1)乙醇代谢产物及氧化应激,在肝脏中,乙醇的氧化代谢通过三个酶系统催化完成,即ADH、细胞色素P450系统(主要为CYP2E1)、过氧化氢酶系统。乙醛是引起酒精性肝脏损伤(ALD)最主要的毒性物质,可以引起肝细胞损伤、炎症以及细胞外基质产生和纤维化的形成。乙醇代谢的过程中产生较大数量的活性氧,其抑制抗氧化能力肝细胞,降低过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽、增加脂质过氧化加合物的形成。引起线粒体损伤、相关蛋白酶失活、DNA蛋白修复功能障碍,机体在此作用下会产生ALD特异性抗体,引起肝细胞免疫损伤,引发肝纤维化。(2)肠源性内毒素血症,内毒素可经门静脉进入肝脏内,通过TLR4途径产生炎症因子对肝脏产生“二次攻击”,诱导和加重肝损伤,同时又加剧肠道黏膜屏障的损害,形成恶性循环。(3)免疫细胞激活与细胞因子释放,酒精通过多途径激活肝内Kupffer细胞,肠道来源的LPS可以通过Kupffer细胞表面的TLR4受体途径的信号通路激活Kupffer细胞,产生一系列的促炎因子TNF- α 、TGF- β 、IL-6、IL-10等导致肝损伤和炎性的发展。

[0004] 总之,酒精性肝损伤的分子机制主要集中在:酒精及其代谢产物诱导的氧化应激,氧化产物和抗氧化能力的下降造成了肝损伤;酒精中毒引起肠道通透性增加和肠道微生态失调,从而使得内毒素含量增加,带来相应的免疫反应和炎性因子的释放;乙醛的直接毒性,阻碍脂肪酸的氧化、促进脂肪在肝脏的积累。

发明内容

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种乳杆菌,本发明的第二个目的是提供所述瑞士乳杆菌L551的用途,可用于缓解酒精性肝脏损伤。

[0006] 本发明为实现其目的采用的技术方案是:

[0007] 一种能够缓解酒精性肝损伤的瑞士乳杆菌,分类名称为瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物

中心,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏编号为 CGMCC NO.15604,保藏日期为2018年4月11日。

[0008] 如上述所述的瑞士乳杆菌缓解酒精性肝损伤的食品中的应用。

[0009] 包括以瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551为活性成分,或者以瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551为配料制成的食品。

[0010] 所述的食品的剂型包括粉剂、颗粒剂、乳剂、片剂中的任一种。

[0011] 所述食品为即时性食品,采用低聚果糖、乳糖醇、水苏糖、维生素C中的一种或任意组合,与瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551复配制得,控制瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551的活菌数达到 10^9 CFU/ml。

[0012] 将瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551的冻干粉与沙拉酱混合,控制瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551的活菌数达到 10^9 CFU/ml,沙拉酱用量100g。

[0013] 将牛奶、白砂糖、奶油与稳定剂混合,化料后进行均质杀菌,将瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551与嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌复配后,接种发酵,破乳后分装于4℃后熟,得到发酵乳制剂。

[0014] 所述的瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551的冻干粉由下述方法制备:将冻存于-80℃的瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)L551接入MRS液体培养基中,37℃培养18h,连续活化三代后,在4℃下6000rpm离心10min,弃上清,将菌体用灭菌的生理盐水洗涤三次后,重悬于生理盐水中并调整细胞浓度为 1.0×10^9 CFU/mL,得到细胞悬液,在4℃低温中保藏待用;将所得细胞悬液经冷冻干燥制得粉剂。

[0015] 本发明的有益效果是:

[0016] 本发明的瑞士乳杆菌用于缓解酒后造成机体不适及保护酒后肝脏健康具有非常广泛的应用前景。本发明的植物乳杆菌L551具有耐酸性,对酒精造成的血清ALT和AST增多有抑制作用;对酒精造成的肝脏MDA增多有抑制作用,并恢复肝脏GSH和SOD活性;对酒精造成的血清内毒素增多有抑制作用;对酒精造成的肝脏细胞炎症因子升高有抑制作用;减轻肝脏脂肪泡,减轻炎症细胞浸润。所述瑞士乳杆菌可以有效缓解酒精造成的肝脏损伤。

[0017] L551可以抑制由乙醇导致的肠道内致病菌的增殖,减少内毒素的产生,保护肠道屏障,减少内毒素进入血液引起机体的炎症反应,同时检测结果显示瑞士乳杆菌L551可以通过降低肝脏炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)的表达,来抑制酒精导致的肝脏炎症反应,从而缓解以及预防肝炎、肝硬化以及肝癌的发生及发展。

[0018] 所述的瑞士乳杆菌L551具有下述性质:

[0019] (1) 具有耐酸性,在pH3.0的环境条件下生长良好;

[0020] (2) 可以有效抑制慢性酒精肝损伤小鼠血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的升高;

[0021] (3) 有效地降低肝脏MDA浓度,并恢复肝脏GSH含量和SOD活性,有效抑制慢性酒精引起的肝脏氧化损伤;

[0022] (4) 有效抑制慢性酒精引起的血清中LPS含量的升高;

[0023] (5) 有效抑制慢性酒精引起的肝脏中炎症因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量的升高,阻止酒精造成的肝脏炎症反应。

[0024] (6)有效减少肝脏脂肪泡,减轻炎症细胞浸润,减轻核固缩。

附图说明

[0025] 图1是瑞士乳杆菌L551的耐酸性。

[0026] 图2是瑞士乳杆菌L551对慢性酒精引起的小鼠血清中AST变化的影响。

[0027] 图3是瑞士乳杆菌L551对慢性酒精引起的小鼠血清中ALT变化的影响。

[0028] 图4是瑞士乳杆菌L551对慢性酒精引起的小鼠肝脏中MDA变化的影响。

[0029] 图5是瑞士乳杆菌L551对慢性酒精引起的小鼠肝脏中GSH变化的影响。

[0030] 图6是瑞士乳杆菌L551对慢性酒精引起的小鼠肝脏中SOD变化的影响。

[0031] 图7是瑞士乳杆菌L551对慢性酒精引起的小鼠肝脏中LPS变化的影响。

[0032] 图8是瑞士乳杆菌L551对慢性酒精引起的小鼠肝脏中TNF- α 变化的影响。

[0033] 图9是瑞士乳杆菌L551对慢性酒精引起的小鼠肝脏中IL-1 β 变化的影响。

[0034] 图10是瑞士乳杆菌L551对慢性酒精引起的小鼠肝脏中IL-6变化的影响。

[0035] 图11是瑞士乳杆菌L551对慢性酒精暴露小鼠肝脏组织病理损伤的影响,其中A:空白组;B:酒精组;C:酒精+药物组;G:酒精+L551组。

[0036] 图12是本发明应用实施例3发酵乳制剂的酸味、香气、粘稠度、饱满度、细腻度、油脂感、顺滑度图。

具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步的说明。下述实施例中所述试验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所述试剂和生物材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)菌株编号:L551。

[0038] 实施例:瑞士乳杆菌L551对酒后肝脏保护作用试验

[0039] 1、瑞士乳杆菌L551菌种的活化

[0040] 将冻存于-80℃的瑞士乳杆菌L551接入MRS液体培养基中,37℃培养18h,连续活化三代后,在4℃下6000rpm离心10min,弃上清,将菌体用灭菌的生理盐水洗涤三次后,重悬于生理盐水中并调整细胞浓度为 1.0×10^9 CFU/mL,即为细胞悬液,在4℃低温中保藏待用。

[0041] 2、动物模型的建立与分组

[0042] SPF级C57BL/6健康小鼠40只,雄性,适应性饲养一周后随机分成4组,每组10只。采取一天两次的灌胃方式:空白对照组,每日两次灌服生理盐水;酒精性肝损伤模型组,上午灌胃酒精,下午灌胃生理盐水;阳性药物对照组,上午灌胃酒精,下午灌胃护肝片溶液;益生菌干预组,上午灌胃酒精,下午灌胃瑞士乳杆菌L551菌液。

[0043] 酒精浓度按照20%-25%-30%-35%-40%逐渐增加,在两周内增至40% (v/v)后维持此浓度至实验结束;药物为葵花牌护肝片,根据剂量换算至小鼠相应浓度;瑞士乳杆菌L551制成浓缩冻干粉,每次灌胃前用生理盐水重悬,调整浓度分别为 1.0×10^9 CFU/mL,在37℃水浴中复苏30min后使用。所有样品均按照10mL/kg BW进行灌胃,实验时间为3个月。每天定时补充饮水和饲料,每周更换一次垫料,灌胃完成后对动物进行连续观察,及时记录实验动物的中毒表现及死亡情况,必要时对其进行解剖并作肉眼病理观察。

[0044] 末次给样后禁食24h,迅速摘眼球采集血液,解剖取肝脏、不同肠段等 测定各项指标。

[0045] (1) 检测各项生化指标

[0046] 通过测定小鼠的血清转氨酶的活性、脂肪含量、肝脏的氧化指标、血清内毒素的含量、炎症细胞因子的表达等,并进行肝组织的病理学观察,从而对益生菌干预慢性酒精性肝损伤的效果进行体内评估。

[0047] ①小鼠血清与肝匀浆样品的制备

[0048] 将所取血液于4℃静置1h,2500rpm离心15min,小心收集上层透明液体即为血清。血清获取后尽量立即使用或低温储藏待用,一般需要在-20℃ ~-70℃超低温保存,若存放在4℃下则不要超过一个月。

[0049] 将解剖后小鼠的肝脏于冰冷的生理盐水中漂洗拭干,称重,用眼科剪 将组织块剪碎,倒入玻璃匀浆管中,加入9倍组织块重量的冷生理盐水充分研磨,使肝组织匀浆化,将制备好的10%匀浆3000rpm离心15min,弃沉淀,得上清即为肝匀浆液,肝匀浆的保藏条件与血清相同。

[0050] ②各项生化指标的测定

[0051] 小鼠血清谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)的含量,肝匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的浓度的测定,均严格按照相应试剂盒说明书的具体操作步骤进行;

[0052] 血清转氨酶ALT、AST的活性是乙醇所致肝损伤最敏感的标志。由图1和图2可知,慢性酒精暴露导致小鼠血清中ALT活性和AST活性明显升高,而益生菌干预后可以有效恢复ALT、AST的活性。这一结果表明所选瑞士乳杆菌L551能够有效抑制慢性酒精肝损伤小鼠血清转氨酶的升高。

[0053] MDA被认为是机体脂质过氧化的重要产物和指示物,而GSH和SOD在宿主抗氧化防御系统里起到重要作用,该物质的减少会导致线粒体功能损伤,进一步导致活性氧自由基(ROS)的过量增加,从而引起氧化损伤。对小鼠肝脏中氧化指标进行分析,结果如图3、4、5所示,慢性酒精处理后,与对照组相比,酒精模型组小鼠肝脏中MDA浓度明显升高,而GSH含量SOD活性显著降低。相对于模型组,瑞士乳杆菌L551处理可以有效地降低MDA浓度,并恢复了GSH含量和SOD活性。这一结果表明所述瑞士乳杆菌L551能够有效抑制慢性酒精引起的氧化损伤。

[0054] ③血清内毒素含量的测定

[0055] 血清内毒素的测定采用酶联免疫分析法,按照ELISA试剂盒说明书进行操作。

[0056] 内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁外膜上的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)成分,具有广泛的生物活性,能够引起严重的炎症级联反应,是革兰氏阴性菌的主要致病成分之一。已有研究证实内毒素是各种原因诱导的肝损伤的共同物质基础,可以直接或间接地造成肝脏的损害。对小鼠血清中LPS含量进行分析,由图6可知,慢性酒精处理后,酒精模型组小鼠血清中LPS含量明显升高,而所述益生菌摄入后显著降低了LPS含量。这一结果表明所选瑞士乳杆菌L551能够抑制慢性酒精引起的血清中LPS含量的升高。

[0057] ④炎症因子表达的测定

[0058] 肝脏中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等的表达水平采用ELISA检测。

[0059] 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素 (Interleukin, IL)-1 β 、IL-6被普遍认为是机体组织分泌的促炎性细胞因子 (proinflammatory cytokines, 又称为前炎性细胞因子)。对小鼠肝脏中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量明显增加, 而益生菌处理后大大降低了TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。这一结果表明所选瑞士乳杆菌L551能够抑制慢性酒精引起的肝脏中炎症因子含量的升高。

[0060] ⑤肝组织病理学观察

[0061] 取小鼠肝脏左叶同一位置的组织用10%甲醛溶液固定后, 经过石蜡包埋, 切片, 然后用苏木精和伊红染料进行染色, 在显微镜下观察拍照。

[0062] 慢性酒精暴露对小鼠肝脏造成了严重的病理损伤, 如图11。空白组肝细胞结构较完整, 肝细胞有明显的界限且胞浆均匀, 有轻微脂肪空洞, 无炎症浸润; 而造模组脂肪变性明显, 有大片的脂肪空洞, 肝细胞肿胀变形, 有网状结构, 出现炎症细胞浸润; 益生菌干预则有效地缓解了这些病理损伤, 表现为脂肪泡减少, 轻度炎症细胞浸润, 核固缩轻微。

[0063] 下面将对这些性质进行详细描述。

[0064] 1、具有耐酸性, 在低pH下可以生长

[0065] 将活化好的所述菌株瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551, 10% 接种于pH3.0的改良MRS培养基中, 于37 $^{\circ}$ C, 分别于0h、2h、4h记录活菌数, 验证其耐酸性能。改良MRS的配制方法为: 葡萄糖: 20g, 蛋白胨: 10g, 牛肉粉: 6.5g, 酵母浸粉: 5g, 乙酸钠: 5g, 柠檬酸氢二铵: 2g, 磷酸氢二钾: 2g, MgSO₄ · 7H₂O: 0.58g, MnSO₄ · H₂O: 0.25g, 半胱氨酸盐 酸盐: 0.5g, 吐温80: 1ml, 蒸馏水1000mL。

[0066] 2、有效抑制慢性酒精肝损伤小鼠ALT和AST的升高

[0067] 小鼠灌胃酒精后, 本发明所述的瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551与空白组、模型组及药物组相比, 可以有效降低小鼠血清中ALT和AST的升高。

[0068] 3、有效降低肝脏MDA浓度, 恢复肝脏GSH含量和SOD活性

[0069] 小鼠灌胃酒精后, 本发明所述的瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551与空白组、模型组及药物组相比, 可以有效降低小鼠肝脏中MDA浓度, 并且恢复肝脏GSH含量和SOD活性, 有效抑制慢性酒精引起的肝脏氧化损伤。

[0070] 4、有效抑制慢性酒精引起的血清中LPS含量的升高

[0071] 小鼠灌胃酒精后, 本发明所述的瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551与空白组、模型组及药物组相比, 可以有效降低小鼠血清中LPS含量的升高, 保护肠道生态平衡, 保护肠道黏膜屏障, 保护肝脏健康。

[0072] 5、有效抑制慢性酒精引起的肝脏中炎症因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量的升高。

[0073] 小鼠灌胃酒精后, 本发明所述的瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551与空白组、模型组及药物组相比, 可以有效抑制慢性酒精引起的肝脏中炎症因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量的升高, 阻止酒精造成的肝脏炎症反应。

[0074] 6、有效减少肝脏脂肪泡, 减轻炎症细胞浸润, 减轻核固缩。

[0075] 小鼠灌胃酒精后, 本发明所述的瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) L551与空白组、模型组及药物组相比, 有效地缓解了肝脏病理损伤, 表现为脂肪泡减少, 轻度炎症细胞浸润, 核固缩轻微。

[0076] 本发明瑞士乳杆菌L551在实验过程中以护肝药物作为阳性对照组, 本发明乳杆

菌的保护肝脏的作用甚至优于阳性对照组。

[0077] 应用实施例1:利用本发明瑞士乳杆菌L551制造解酒护肝即食型乳酸菌粉剂。

[0078] 将本发明的瑞士乳杆菌L551使其活菌数达到 10^9 CFU/ml,与低聚果糖、水苏糖、益生元配合组成解酒护肝即食型乳酸菌粉制剂。

[0079] 应用实施例2:利用本发明瑞士乳杆菌L551冻干所得菌粉,使其活菌数达到 10^9 CFU/ml,与100g沙拉酱混合均匀,制作蔬菜沙拉,用于酒前菜品,酒前食用,保护酒后肝脏健康。

[0080] 应用实施例3:利用本发明所述的瑞士乳杆菌L551制作复合益生菌发酵乳,用于酒前服用,缓解酒后肝脏损伤。具体方法,首先将牛奶、白砂糖、奶油与稳定剂混合,化料后进行均质杀菌,将所述的瑞士乳杆菌L551与嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌复配后,接种发酵,破乳后分装于4℃后熟,得到用于缓解酒后不适症状的发酵乳制剂,本制剂酸味、香气、粘稠度、饱满度、细腻度、油脂感、顺滑度详见图12。

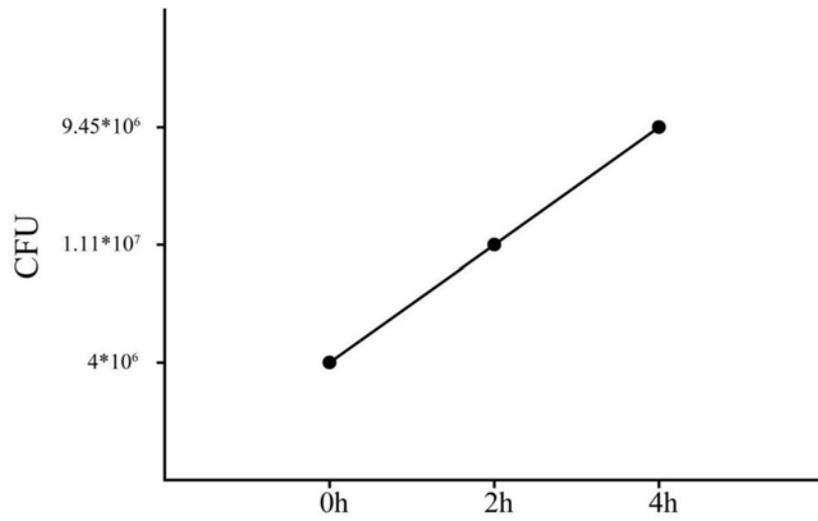


图1

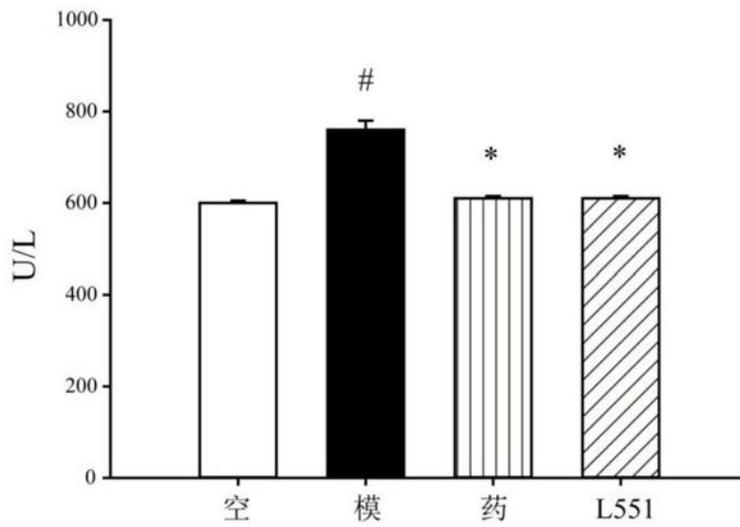


图2

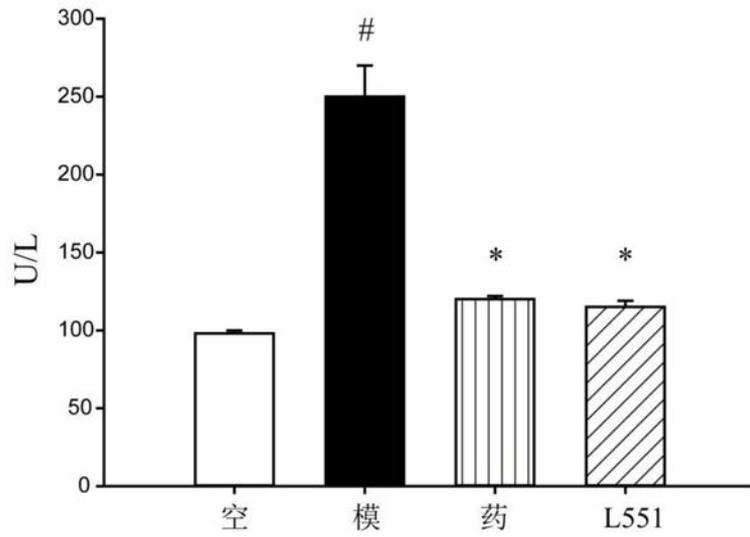


图3

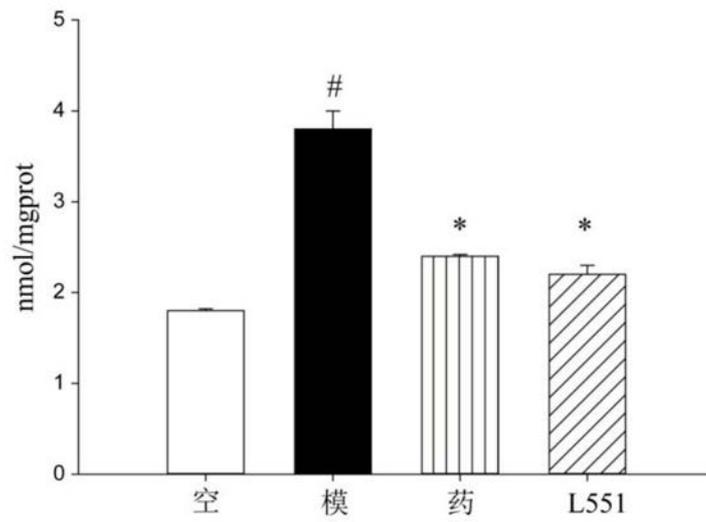


图4

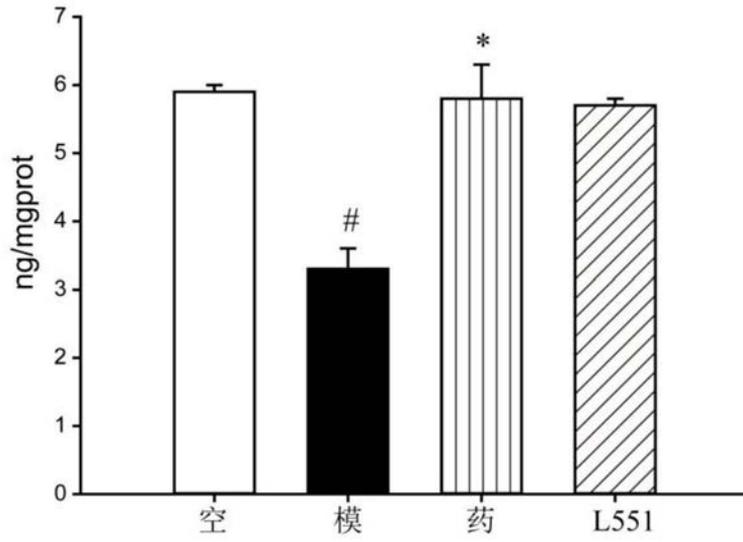


图5

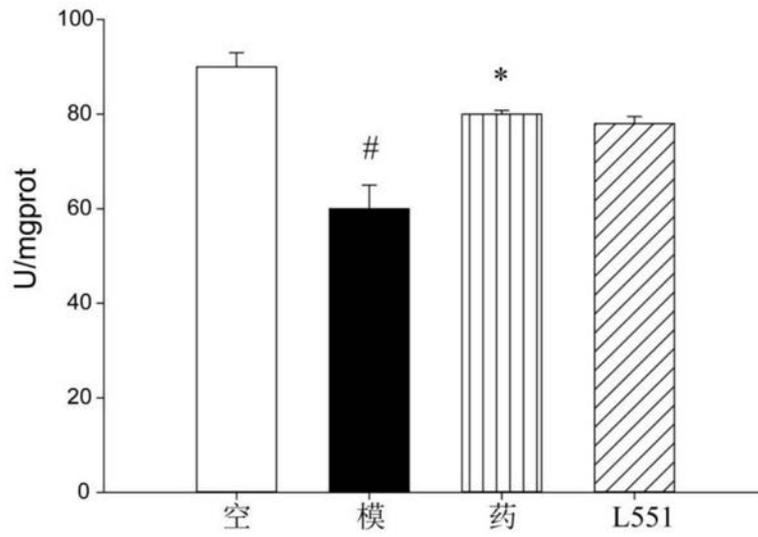


图6

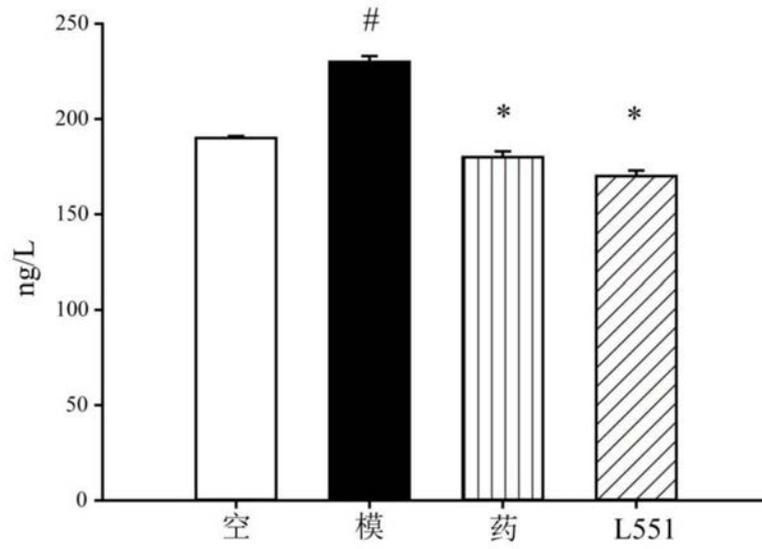


图7

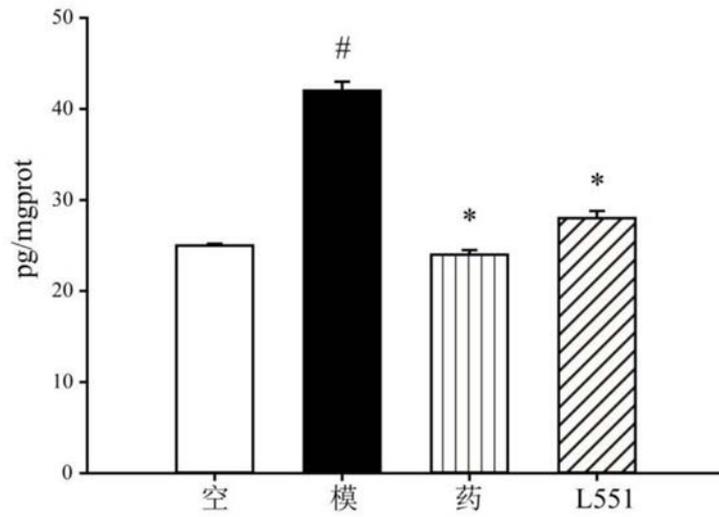


图8

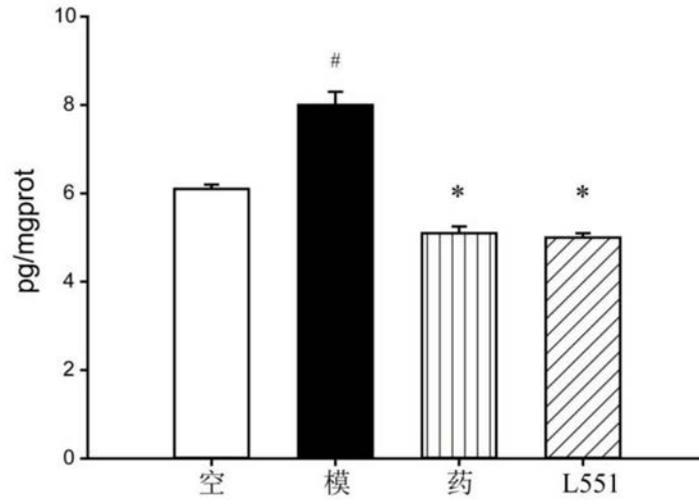


图9

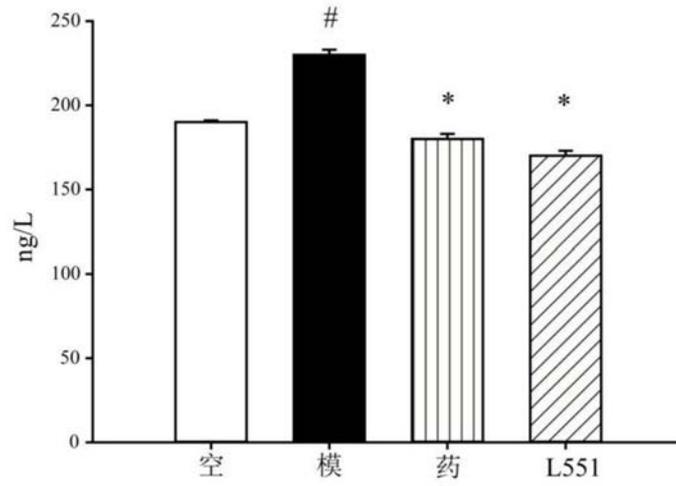


图10

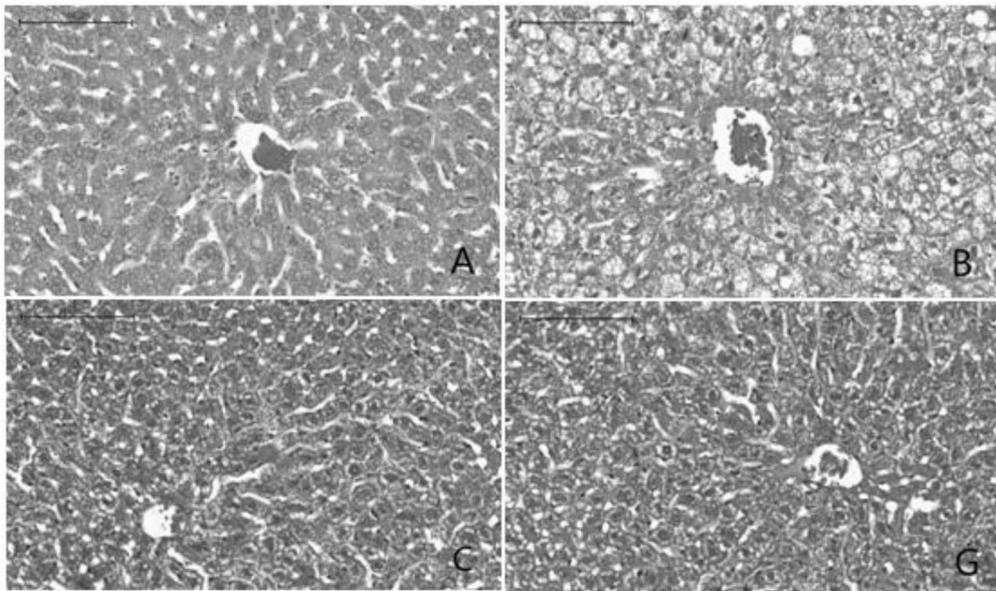


图11

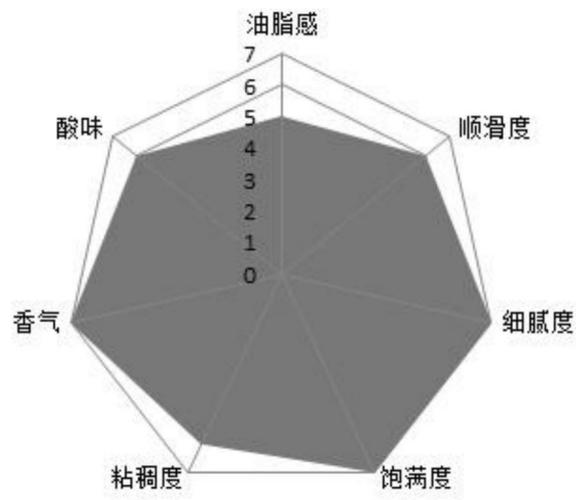


图12