



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112791102 A

(43) 申请公布日 2021.05.14

(21) 申请号 202110028074.6

(22) 申请日 2021.01.07

(71) 申请人 浙江工业大学

地址 310014 浙江省杭州市下城区潮王路
18号

(72) 发明人 余靓 王炜 赵帆 车声雷 李涓
应耀 李旺昌 郑精武 乔梁
蔡伟

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

代理人 邱启旺

(51) Int. Cl.

A61K 33/40 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图11页

(54) 发明名称

一种自增强化学动力学循环的肿瘤治疗材
料

(57) 摘要

本发明提供一种自增强化学动力学循环的
肿瘤治疗材料,该材料为 CaO_2 -过渡金属纳米材
料,其中过渡金属配位于 CaO_2 颗粒中,所述 CaO_2
与所述过渡金属的摩尔比为15:1~30:1。该材料
能为肿瘤治疗提供高细胞毒性的羟基自由基(\cdot
OH),清除过表达的谷胱甘肽(GSH),并在铁离子
的循环中不断增强CDT效果,为改善肿瘤细胞选
择性提供了新的策略。

1. 学循环的肿瘤治疗材料,其特征在于,该材料为 CaO_2 -过渡金属纳米颗粒,其中过渡金属配位于纳米 CaO_2 颗粒中,所述 CaO_2 与所述过渡金属的摩尔比为15:1~30:1。

2. 根据权利要求1所述的肿瘤治疗材料,其特征在于,所述过渡金属为铜(Cu)、锰(Mn)、铁(Fe)、钒(V)、铈(Ce)、铂(Pt)、钴(Co)、钯(Pd)、金(Au)、银(Ag)中的一种或多种。

3. 如权利要求1所述的肿瘤治疗材料在制备肿瘤治疗药物中的应用。

一种自增强化学动力学循环的肿瘤治疗材料

技术领域

[0001] 本发明属于纳米医学技术领域,具体涉及一种自增强化学动力学循环的肿瘤治疗材料。

背景技术

[0002] 近年来,癌症超过心血管疾病成为发达国家民众的第一大死因。化学动力学疗法(CDT)作为治疗癌症的主要手段之一,得到了广泛的关注和研究。其原理是使用芬顿反应催化剂将细胞内的 H_2O_2 转化为高细胞毒性的羟基自由基($\cdot OH$),从而杀死癌细胞。

[0003] 基于活性氧(ROS)的CDT是一种有效诱导肿瘤细胞凋亡的新兴治疗策略。 H_2O_2 在酸性环境中经芬顿反应产生的 $\cdot OH$ 是ROS中最具破坏力的一种。得益于肿瘤中 H_2O_2 的生成量($100\mu M \sim 1mM$)高于正常组织,且肿瘤微环境的酸度适中,CDT被认为是在亚铁离子(Fe^{2+}),锰离子(Mn^{2+})或亚铜离子(Cu^+)的催化下进行肿瘤选择性治疗的理想手段。

[0004] 但是近几年的研究显示化学动力学疗法存在一些急需克服的障碍。第一,内源性 H_2O_2 不足以达到令人满意的抗癌效果。虽然通过应用天然酶,例如葡萄糖氧化酶(GOx),烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NOX)和超氧化物歧化酶(SOD),在增加肿瘤内 H_2O_2 浓度方面取得了一些进展。但这些基于天然酶的 H_2O_2 补充剂存在生物活性不稳定,成本高以及对葡萄糖、超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$)、 O_2 等外源性 H_2O_2 前体的依赖等问题。第二,肿瘤内过表达的谷胱甘肽(GSH)表现出对高细胞毒性的 $\cdot OH$ 强大的清除能力,从而降低了CDT的功效。

发明内容

[0005] 本发明提供一种自增强化学动力学循环的肿瘤治疗材料,该材料为 CaO_2 -过渡金属纳米颗粒,该材料能为肿瘤治疗提供高细胞毒性的 $\cdot OH$,清除过表达的GSH,并在过渡离子的循环中不断增强CDT效果,从而克服化学动力学疗法的(主要是内源性双氧水不足的缺点,疗效欠佳)的缺陷。

[0006] 具体的,过氧化钙(CaO_2)由于存在过氧键($-O-O-$),可以在酸性条件下稳定释放大量的 H_2O_2 ,基于 CaO_2 的 H_2O_2 产生与其他前体无关。该发生器可有效地积聚具有肿瘤特异性的 H_2O_2 于肿瘤部位。负载的过渡金属铜(Cu)或锰(Mn)或铁(Fe)或钒(V)或铈(Ce)或铂(Pt)或钴(Co)或钯(Pd)或金(Au)或银(Ag)过渡金属离子,通过氧化作用消耗肿瘤细胞中过表达的GSH,避免了高细胞毒性的 $\cdot OH$ 被GSH除去的窘境,从而提高了CDT疗效。高价离子在除去GSH的过程中自身被还原为低价离子,即芬顿反应离子,低价离子与 H_2O_2 发生芬顿反应被氧化为高价的同时将 H_2O_2 分解为 $\cdot OH$ 和氢氧根($-OH$),至此过渡金属离子形成一个循环,并伴随着大量高细胞毒性的 $\cdot OH$ 的生成。

[0007] 其中过渡金属配位于尺寸为91-122nm CaO_2 颗粒中,所述 CaO_2 与过渡金属的摩尔比为15:1~30:1,有利于 CaO_2 -过渡金属纳米颗粒通过EPR效应进入肿瘤细胞并且提供充足的铁离子以除去谷胱甘肽和产生双氧水。

[0008] 本申请中,采用多巴胺辅助合成的 CaO_2 为原料,通过湿化学方法构造了结构和性

能稳定的 CaO_2 -过渡金属纳米颗粒,具体的,该方法为:将 CaO_2 颗粒和过渡金属盐溶解在乙醇(15mL)中搅拌得到 CaO_2 -过渡金属纳米颗粒。

[0009] 本发明的有益效果在于:本发明提供的 CaO_2 -过渡金属纳米颗粒能为肿瘤治疗提供高细胞毒性的羟基自由基($\cdot\text{OH}$),清除过表达的谷胱甘肽(GSH),并在铁离子的循环中不断增强CDT效果,为改善肿瘤细胞选择性提供了新的策略。

附图说明

[0010] 图1为 CaO_2 -Fe纳米粒子表征图像,其中1a为透射电镜图,1b为X射线衍射图,1c为X射线能量散射谱分析,1d为 CaO_2 -Fe的X射线光电子能谱,1e和1f分别为Fe 2p和O1s的高分辨X射线光电子能谱。

[0011] 图2为紫外-可见吸收光谱(UV-Vis)和电子自旋共振光谱(ESR),其中,2a为酸性环境下,用 H_2O_2 、 CaO_2 NPs和 CaO_2 -Fe NPs处理 KMnO_4 的比色分析,2b为不同浓度的GSH处理的 CaO_2 -Fe NPs在pH 5.4下降解MB后的紫外-可见吸收光谱,2c为在pH5.4条件下,不同浓度的GSH处理的 CaO_2 -Fe NPs的ESR谱(5,5-二甲基-1-吡咯啉N-氧化物(DMPO)作为自旋陷阱)。

[0012] 图3a为与 FeCl_3 、 CaO_2 NPs和 CaO_2 -Fe NPs孵育后,DCFH-DA染色的4T1细胞的荧光图像。比例尺为100 μm 。3b为与 FeCl_3 、 CaO_2 NPs和 CaO_2 -Fe NPs孵育24h后4T1细胞的存活率。3c为钙黄绿素AM(绿色,活细胞)和PI(红色,死细胞)染色的4T1细胞与 FeCl_3 、 CaO_2 NPs和 CaO_2 -Fe NPs孵育24h后的荧光图像。比例尺为100 μm 。3d为与 CaO_2 -Fe NPs孵育24h后L929细胞的存活率。3e为 CaO_2 -Fe NPs对L-BS0(左旋硫氨酸亚砷亚胺)的体外化学动力学毒性。3f为4T1细胞和L929细胞的细胞内GSH水平。3g为流式细胞仪分析的用 FeCl_3 、 CaO_2 NP和 CaO_2 -Fe NPs处理24小时的4T1细胞凋亡情况。3h为在NAC处理或没有处理的情况下, CaO_2 -Fe NPs的体外化学动力学毒性研究。

[0013] 图4a为用盐水(对照组), FeCl_3 、 CaO_2 NPs和 CaO_2 -Fe NPs处理后的4T1荷瘤小鼠的相对肿瘤生长曲线。4b为给药后第17天,不同组别的解剖肿瘤的代表性照片。4c为给药后第17天,不同组别的H&E和TUNEL染色的肿瘤切片的图像。4d为不同组的小鼠的时间依赖性体重曲线。4e为健康小鼠静脉注射生理盐水或 CaO_2 -Fe NPs 17天后的血液生化分析。

[0014] 图5为 CaO_2 -Fe NPs的高角度环形暗场扫描透射电子显微镜图像和Fe,Ca,O的元素映射。

[0015] 图6为动态光散射(DLS)测量 CaO_2 和 CaO_2 -Fe纳米粒子粒径。

[0016] 图7为 CaO_2 -Mn纳米粒子的透射电镜图。

[0017] 图8为X射线能量散射谱分析。

[0018] 图9为 CaO_2 -Mn NPs的高角度环形暗场扫描透射电子显微镜图像和Mn,Ca,O的元素映射。

[0019] 图10为铁氰化钾对 Fe^{2+} 的显色照片。

[0020] 图11a为不同浓度GSH处理的 CaO_2 NPs在pH 5.4下降解MB后的紫外-可见吸收光谱,11b为MB降解率的柱状图。

[0021] 图12a为不同浓度GSH处理的 CaO_2 NPs在pH 7.4下降解MB后的紫外-可见吸收光谱,12b为MB降解率的柱状图。

[0022] 图13为 CaO_2 -Fe NPs处理8h后4T1细胞内的GSH含量。

[0023] 图14为治疗后主要组织的组织学分析。比例尺为100 μ m。

[0024] 图15为健康小鼠静脉注射生理盐水或CaO₂-Fe NPs 17天后的血液学分析。

具体实施方式

[0025] 实施例1

[0026] 在本发明的一个具体实施方式中,以CaO₂-Fe为例,通过改进的多巴胺辅助的方法合成了CaO₂ NP,然后与氯化亚铁混合30分钟。具体如下:

[0027] (1) CaO₂的制备:超声波作用下将CaCl₂ (0.1g, 0.68mmol) 和多巴胺 (0.003g) 溶解在乙醇 (15mL) 中。然后,在搅拌下加入1ml NH₄OH (氨水)。随后逐滴加入0.2ml的H₂O₂溶液。通过8000rpm离心收集产物CaO₂,用乙醇洗涤3次,最后再分散在20mL乙醇中。

[0028] (2) CaO₂-Fe的制备:将上述50mg CaO₂颗粒和25mg氯化亚铁溶解在乙醇 (15mL) 中搅拌得到CaO₂-Fe。

[0029] 与原始CaO₂ NP相比,CaO₂-Fe NP的形态保持不变,并且其直径从91nm增加到122nm (图1a和图6),X射线衍射 (XRD) 证实,铁离子的引入不会影响CaO₂ NP的相 (图1b)。从能量色散X射线光谱 (EDS) 和EDS映射观察到强而均匀的铁信号,表明铁离子与CaO₂ NP之间的有效结合 (图1c),钙元素:铁元素 \approx 15:1。为了探索螯合铁离子的价态,使用了X射线光电子能谱 (XPS),中心峰位于约710.0eV (Fe 2p_{3/2}) 和摇动卫星峰位于约724.0eV (Fe 2p_{1/2}),表明Fe²⁺离子已转化为Fe³⁺离子,可能被CaO₂氧化 (图1d,e)。O 1s的532.5eV处的光电子峰可以归因于O-O键,表明存在过氧基团 (图1f)。

[0030] 实施例2

[0031] 在本发明的另一个具体实施方式中,以CaO₂-Co为例,通过改进的多巴胺辅助的方法合成了CaO₂ NP,然后与氯化钴混合30分钟。具体如下:

[0032] (1) CaO₂的制备:超声波作用下将CaCl₂ (0.1g, 0.68mmol) 和多巴胺 (0.003g) 溶解在乙醇 (15mL) 中。然后,在搅拌下加入1ml NH₄OH (氨水)。随后逐滴加入0.2ml的H₂O₂溶液。通过8000rpm离心收集产物CaO₂,用乙醇洗涤3次,最后再分散在20mL乙醇中。

[0033] (2) CaO₂-Co的制备:将上述50mg CaO₂颗粒和12mg氯化钴溶解在乙醇 (15mL) 中搅拌得到CaO₂-Co。

[0034] 与原始CaO₂ NP相比,CaO₂-Co NP的形态保持不变,并且其直径从91nm增加到126nm,X射线衍射 (XRD) 证实,Co离子的引入不会影响CaO₂ NP的相。从能量色散X射线光谱 (EDS) 和EDS映射观察到强而均匀的Co信号,表明Co离子与CaO₂ NP之间的有效结合),钙元素:钴元素 \approx 30:1。为了探索螯合铁离子的价态,使用了X射线光电子能谱 (XPS),中心峰位于约778.0eV (Co 2p_{3/2}) 和摇动卫星峰位于约795.0eV (Co 2p_{1/2}),表明Co²⁺离子已转化为Co³⁺离子,可能被CaO₂氧化。

[0035] 实施例3

[0036] 在本发明的一个具体实施方式中,以CaO₂-Mn为例,通过改进的多巴胺辅助的方法合成了CaO₂ NP,然后与氯化锰混合30分钟。具体如下:

[0037] (1) CaO₂的制备:超声波作用下将CaCl₂ (0.1g, 0.68mmol) 和多巴胺 (0.003g) 溶解在乙醇 (15mL) 中。然后,在搅拌下加入1ml NH₄OH (氨水)。随后逐滴加入0.2ml的H₂O₂溶液。通过8000rpm离心收集产物CaO₂,用乙醇洗涤3次,最后再分散在20mL乙醇中。

[0038] (2) $\text{CaO}_2\text{-Mn}$ 的制备:将上述50mg CaO_2 颗粒和20mg氯化锰溶解在乙醇(15mL)中搅拌得到 $\text{CaO}_2\text{-Mn}$ 。

[0039] 与原始 CaO_2 NP相比, $\text{CaO}_2\text{-Mn}$ NP的形态保持不变,并且其直径从91nm增加到102nm(图7)。从能量色散X射线光谱(EDS)和元素分布可以看出锰离子与 CaO_2 NP之间的有效结合(图8和图9),钙元素:铁元素 $\approx 18:1$ 。为了探索整合锰离子的价态,使用了X射线光电子能谱(XPS),中心峰位于约640.0eV ($\text{Mn } 2p_{3/2}$)和摇动卫星峰位于约652.0eV ($\text{Mn } 2p_{1/2}$),表明 Mn^{2+} 离子已转化为 Mn^{4+} 离子。

[0040] 性能表征

[0041] 过渡金属铜(Cu)或锰(Mn)或铁(Fe)或钒(V)或铈(Ce)或铂(Pt)或钴(Co)或钯(Pd)或金(Au)或银(Ag)过渡金属离子,均通过氧化作用消耗肿瘤细胞中过表达的GSH,避免了高细胞毒性的 $\cdot\text{OH}$ 被GSH除去的窘境,从而提高了CDT疗效。同时,前述的高价金属离子在除去GSH的过程中自身被还原为低价离子,即芬顿反应离子,低价离子与 H_2O_2 发生芬顿反应被氧化为高价的同时将 H_2O_2 分解为 $\cdot\text{OH}$ 和氢氧根($-\text{OH}$),至此上述过渡金属离子均形成一个循环,并伴随着大量高细胞毒性的 $\cdot\text{OH}$ 的生成。

[0042] 因此,下面仅仅以 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs为例,进行效果验证。本领域技术人员可以基于 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs的技术效果,毫无疑问的预见其他上述过渡金属也具有同等的技术效果。

[0043] 一、原位 H_2O_2 发生器

[0044] 以高锰酸钾为指示剂研究了 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs产生 H_2O_2 的效果。如图2a所示,加入 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NP后,溶液中高锰酸盐(MnO_4^-)的颜色消失,这表明生成的 H_2O_2 将 MnO_4^- 还原为无色的 Mn^{2+} 。结果表明, $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs在酸性环境下是补充 H_2O_2 的良好选择。这些 H_2O_2 可以通过Fenton反应进一步释放 $\cdot\text{OH}$ 。如图2b所示,用亚甲基蓝作为指示剂评估 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs触发生成的 $\cdot\text{OH}$ 。可以看出GSH对于生成ROS的生成是必不可少的。这是由于GSH将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 从而诱导了芬顿反应。

[0045] 用2',7'-二氯二氟荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)作为指示剂,对4T1细胞上进行荧光成像,显示 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs的荧光信号是剂量依赖性的。与相同剂量的 CaO_2 NPs和 FeCl_3 相比, $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs显示出明显更强的绿色荧光,表明肿瘤细胞中存在 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs触发的自增强 $\cdot\text{OH}$ 作用(图3a)。考虑到 $\cdot\text{OH}$ 的治疗作用,然后通过标准甲基噻唑基四唑鎓(MTT)测定法研究细胞活力。如图3b所示,增加 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs浓度可以诱导更多的细胞死亡, $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs组的细胞毒性作用大于相同浓度下的 FeCl_3 和 CaO_2 NPs。钙黄绿素AM和碘化丙啶(PI)进行活/死细胞染色测定的结果进一步证实了这些结果,这表明4T1细胞在 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs处理后,只有少量细胞保持活力,而用 FeCl_3 和 CaO_2 NPs处理24小时后只有部分细胞死亡(图3c)。

[0046] 通过膜联蛋白V-FITC/PI检测试剂盒和流式细胞仪进一步于研究细胞死亡的类型。如图3g所示,所有组别诱导的细胞死亡都是细胞凋亡,而 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs处理组的凋亡细胞比例(27%)高于其他组。由于ROS介导的细胞杀伤被认为是凋亡的主要途径,因此探究了一种ROS清除剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)对细胞活力的影响。加入NAC后, $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs诱导的细胞凋亡明显被逆转,表明细胞抑制作用源自癌细胞中产生的ROS(图3h)。所有这些结果表明, $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs是一种自增强的CDT治疗器,能够自我提供 H_2O_2 ,可通过 $\cdot\text{OH}$ 有效且选择性地诱导肿瘤细胞凋亡。

[0047] 二、谷胱甘肽清除剂

[0048] 谷胱甘肽对 $\cdot\text{OH}$ 有强大的清除能力,图2b中GSH达到10mM时的浓度时 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs依然表现出了优异的ROS释放能力以及较高的MB降解效率,是因为 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs消耗了GSH。如图11所示,没有 Fe^{3+} 螯合的裸 CaO_2 NPs相比 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs的MB降解效率降低。说明了 Fe^{3+} 与GSH发生了反应。 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs的细胞抑制作用是肿瘤细胞选择性的,对正常L929细胞系的细胞毒性较低(图3d)。这种现象归因于正常细胞中GSH的缺乏(图3e和13),而低GSH难以触发形成足够的 $\cdot\text{OH}$ (图12)。相比之下,用 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs处理后4T1细胞的细胞内GSH水平明显降低(图13),表明 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs诱导的 $\cdot\text{OH}$ 的产生与细胞内GSH的浓度有关。通过使用1-丁硫氨酸亚砷亚胺(1-BSO)作为抑制剂下调GSH后,在4T1上的细胞活力明显被逆转(图3f)。

[0049] 三、铁离子循环使用系统

[0050] Fe^{3+} 离子在除去GSH的过程中自身被还原为低价离子的即芬顿反应离子 Fe^{2+} , Fe^{2+} 与 H_2O_2 发生芬顿反应被氧化为 Fe^{3+} 同时将 H_2O_2 分解为 $\cdot\text{OH}$ 和氢氧根($-\text{OH}$),铁离子形成一个循环,并伴随着大量高细胞毒性的 $\cdot\text{OH}$ 的生成。用 Fe^{2+} 指示剂铁氰化钾检测 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ 与GSH反应后的溶液,溶液显蓝色,也验证了 Fe^{3+} 被还原为 Fe^{2+} 的猜测; Fe^{2+} 与 H_2O_2 发生芬顿后用电子顺磁共振(EPR)自旋捕获法进一步验证了 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs产生的ROS类型。如图2c所示,得到了一个特征为1:2:2:1的四重信号峰,表明 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs产生的ROS为 $\cdot\text{OH}$,同时也证明了 Fe^{2+} 到 Fe^{3+} 的转换($\text{Fe}^{2+}+\text{H}_2\text{O}_2=\text{Fe}^{3+}+\cdot\text{OH}+-\text{OH}$)

[0051] 四、自增强CDT循环治疗探针在肿瘤治疗中的应用

[0052] 由于ROS介导的细胞杀伤被认为是凋亡的主要途径,因此研究了一种ROS清除剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)对细胞活力的影响。加入NAC后, $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs诱导的细胞凋亡明显逆转,表明细胞抑制作用源自癌细胞中ROS的产生(图3h)

[0053] 通过静脉(i.v.)给药研究了探针的体内肿瘤生长抑制作用。如图4a,b所示,注射盐水(对照组), FeCl_3 和 CaO_2 NPs的小鼠肿瘤生长速度快,而用 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs处理的小鼠中的肿瘤大小被显著抑制。苏木精和曙红(H&E)染色以及末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)染色也证明了该探针的治疗效果,用 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs处理后的肿瘤细胞大量凋亡(图4c)。 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs显著的肿瘤生长抑制作用可归因于其在肿瘤部位的有效蓄积及其在酸性pH环境和过表达GSH时产生高细胞毒性的 $\cdot\text{OH}$ 的能力。接受静脉注射15天内观察小鼠的变化,注射 $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs的老鼠并没有表现出明显的体重变化(图4d),并且在主要器官中没有明显的组织学损伤(图14)。如血液生化和血液学分析所示, $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs没有明显的毒性(图4e和图15)。因此, $\text{CaO}_2\text{-Fe}$ NPs作为一种智能低毒的自增强CDT循环治疗器用于高效肿瘤治疗具有广阔前景。

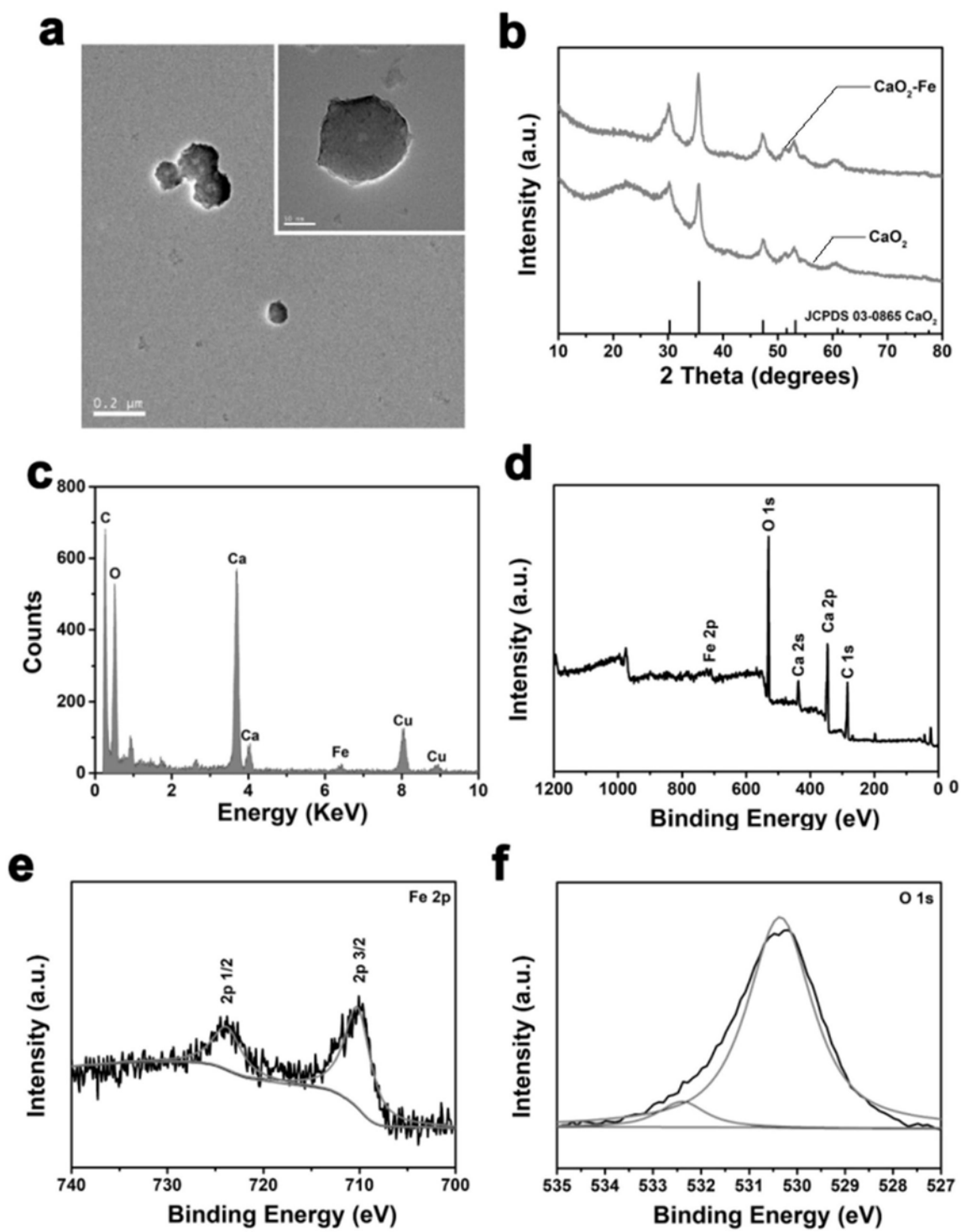


图1

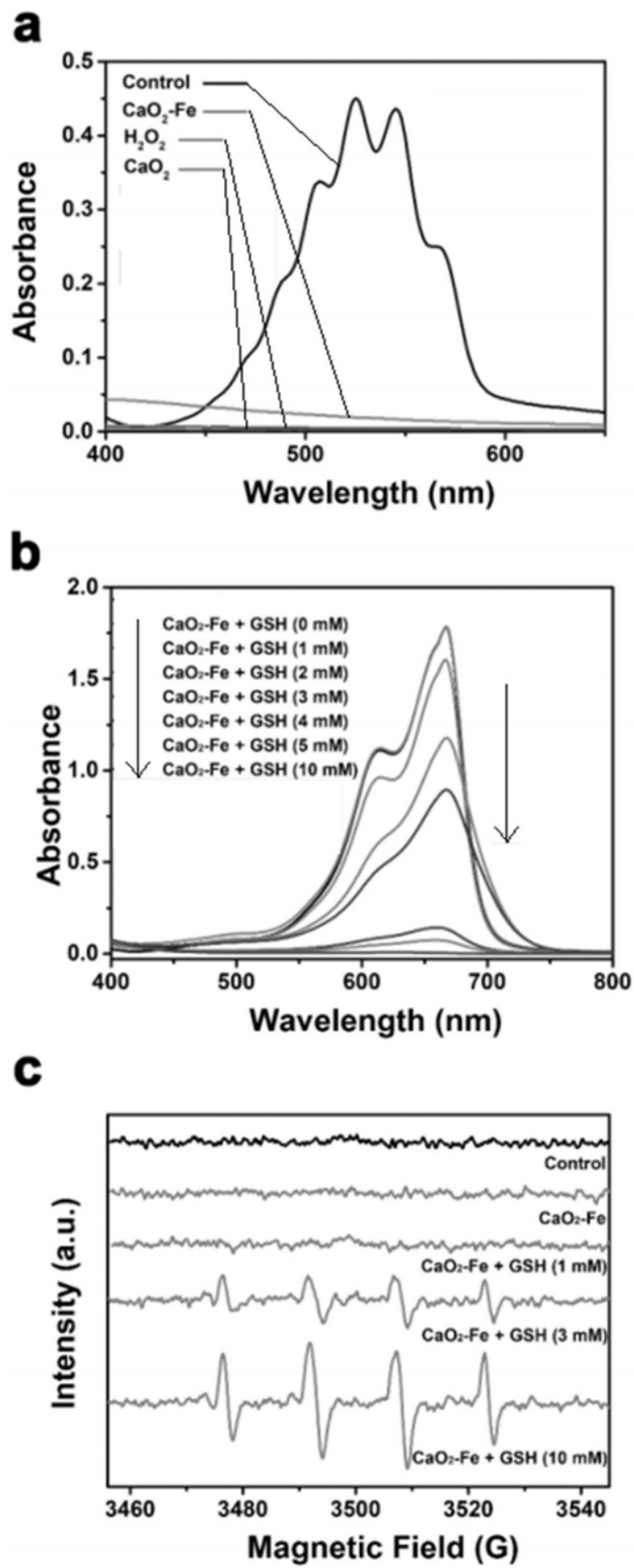


图2

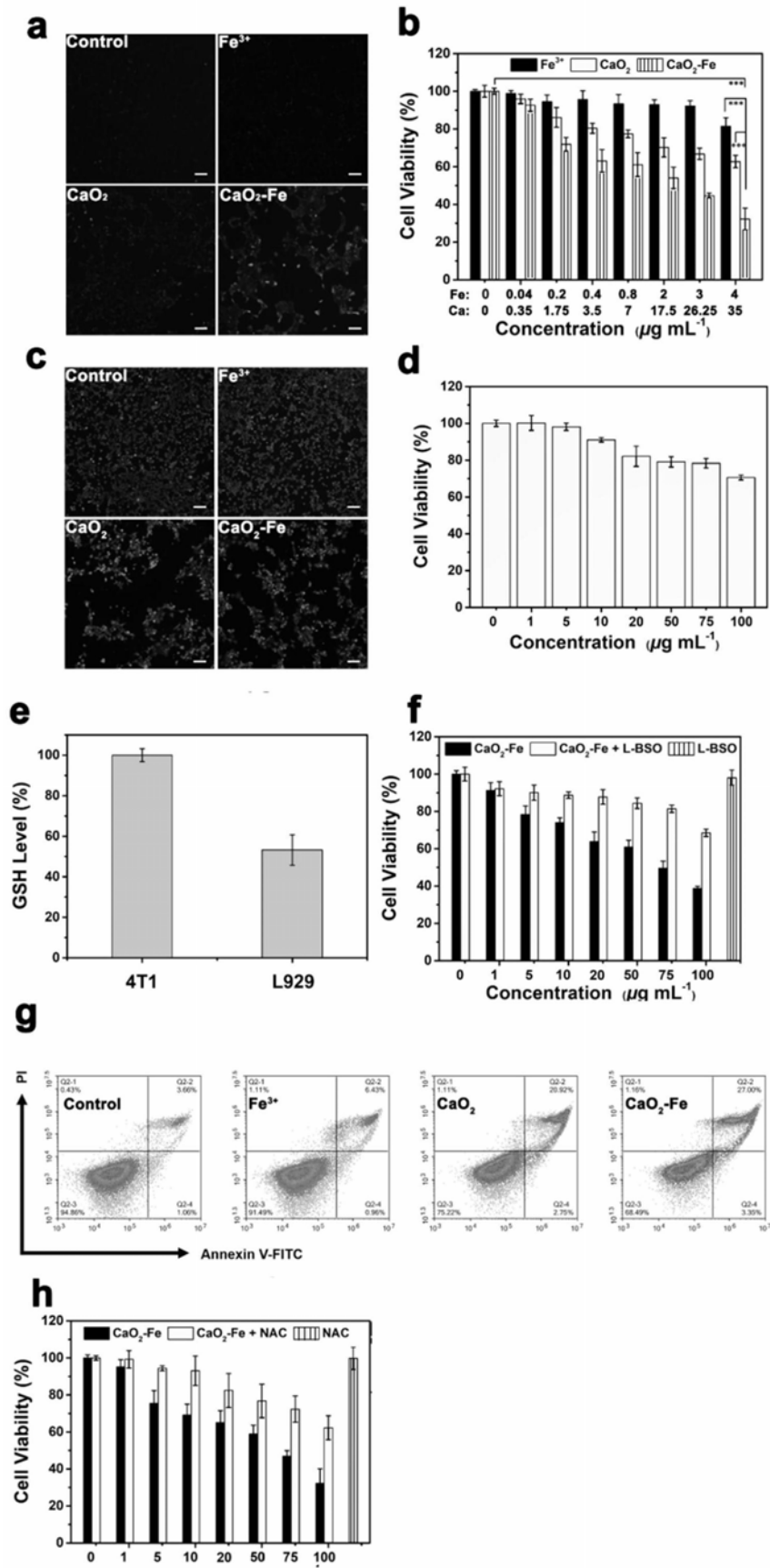


图3

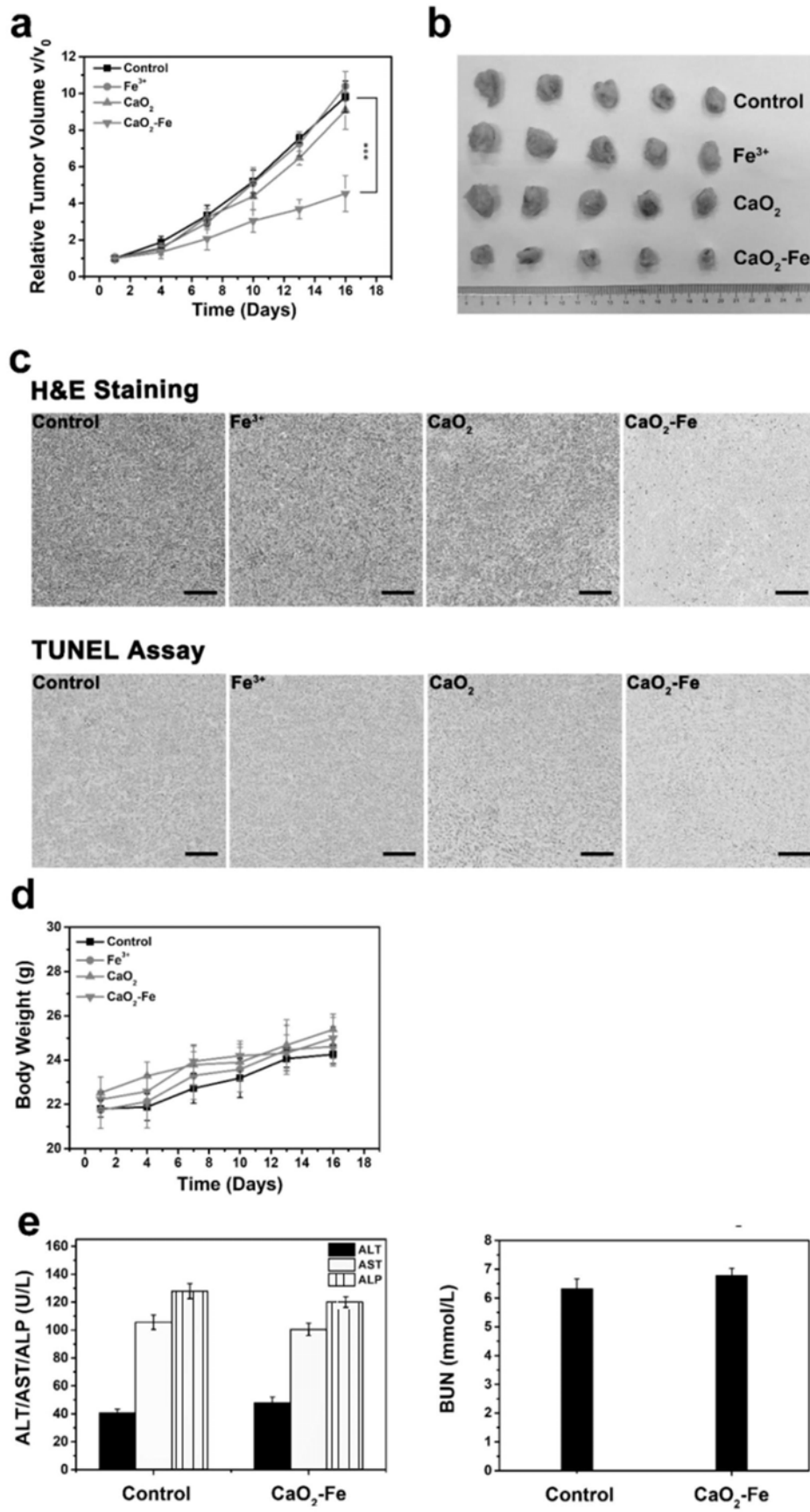


图4

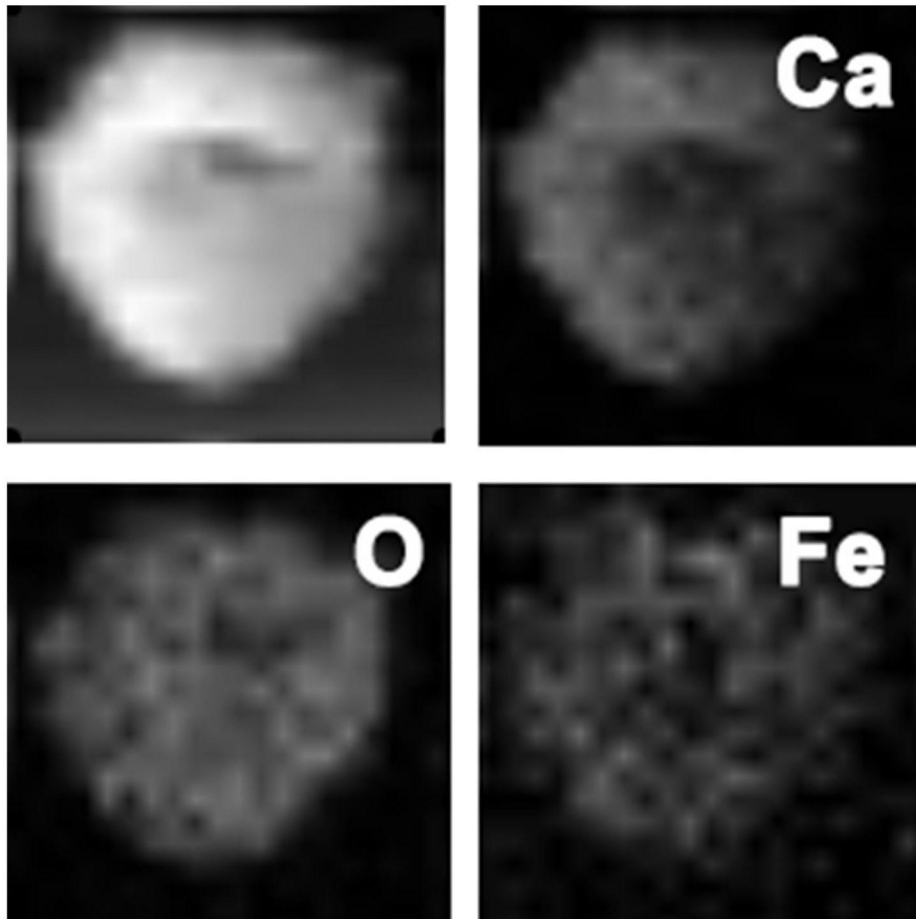


图5

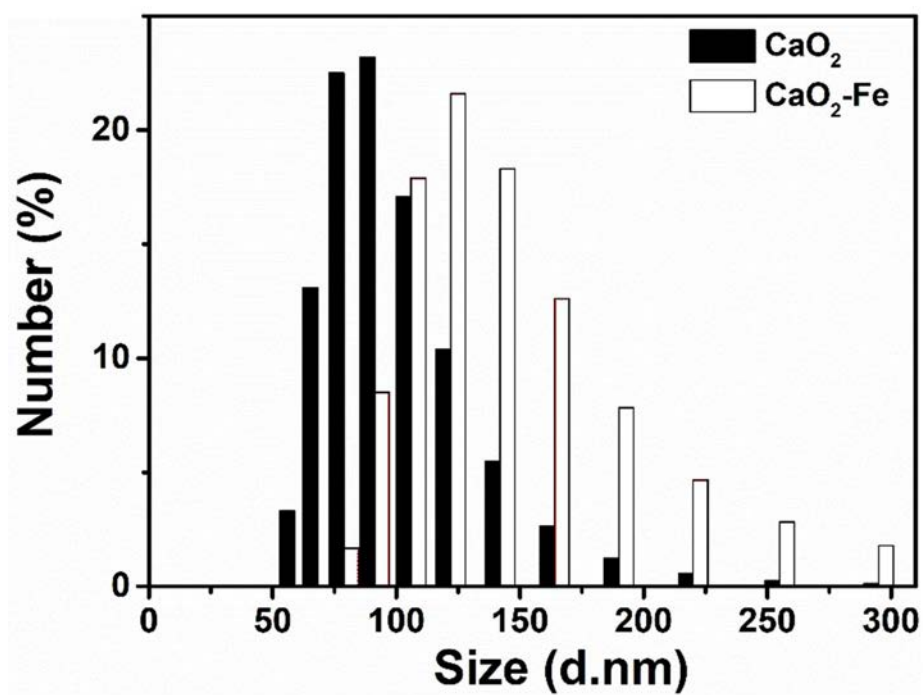


图6

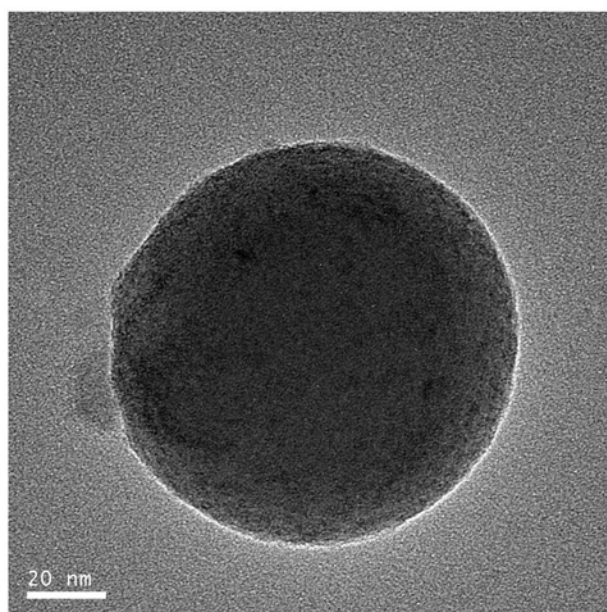


图7

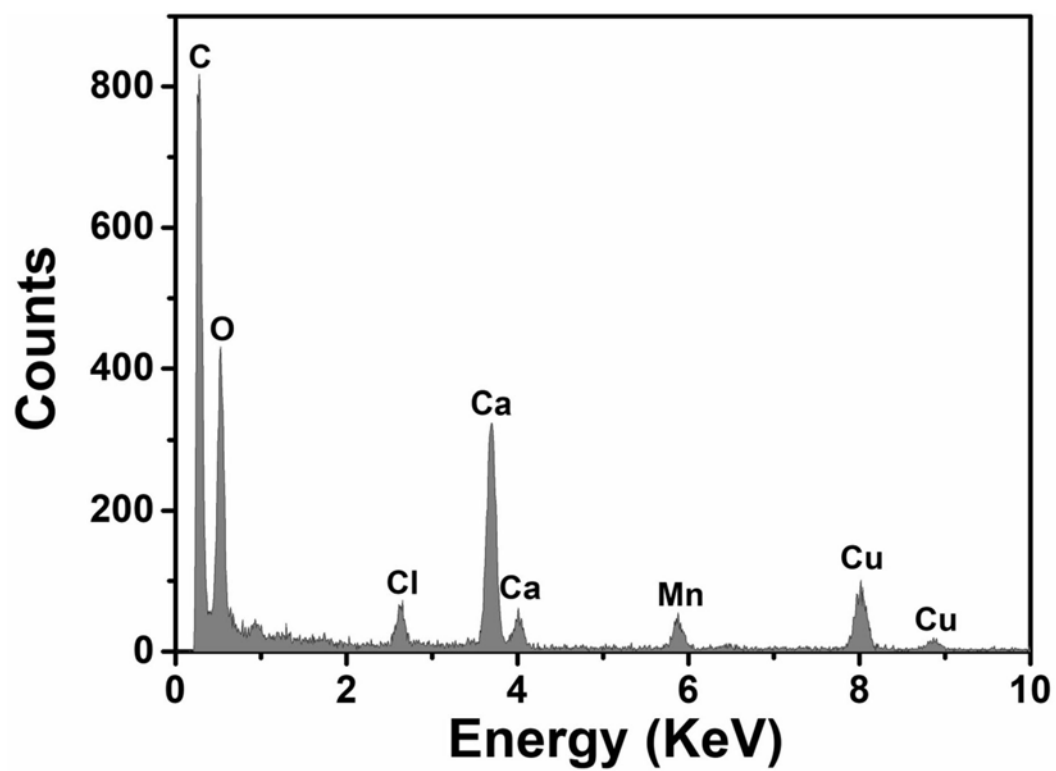


图8

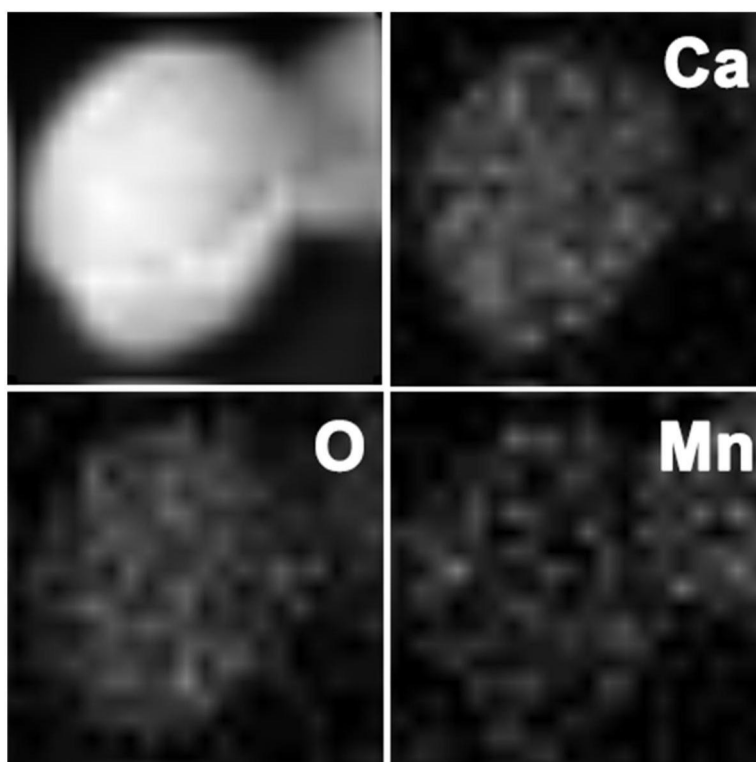


图9

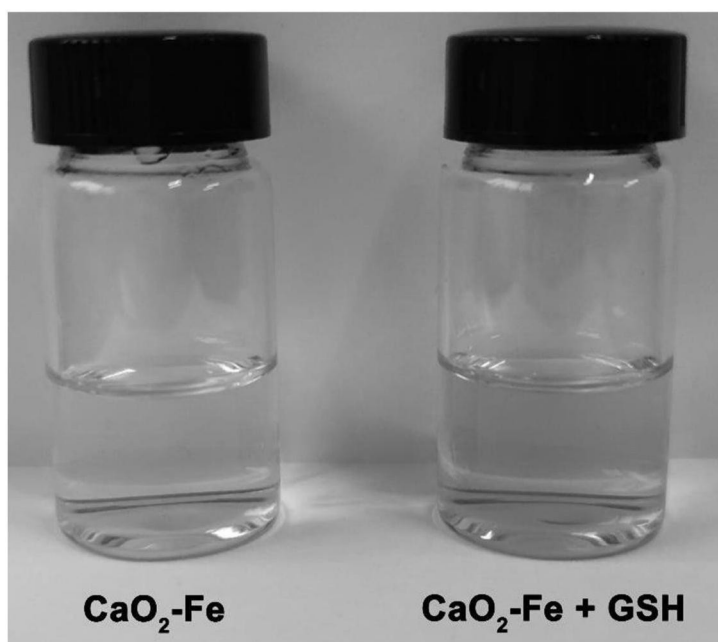


图10

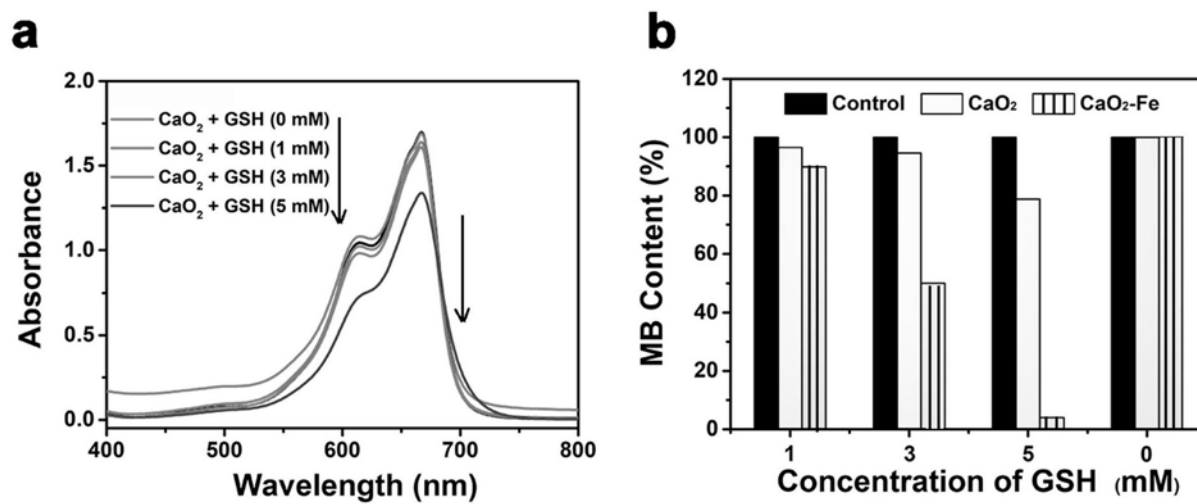


图11

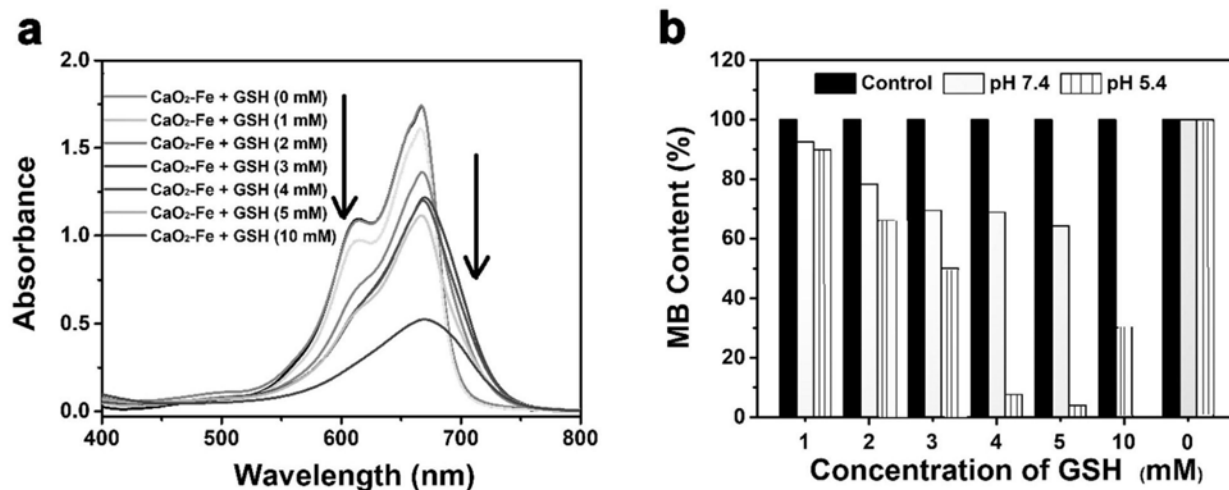


图12

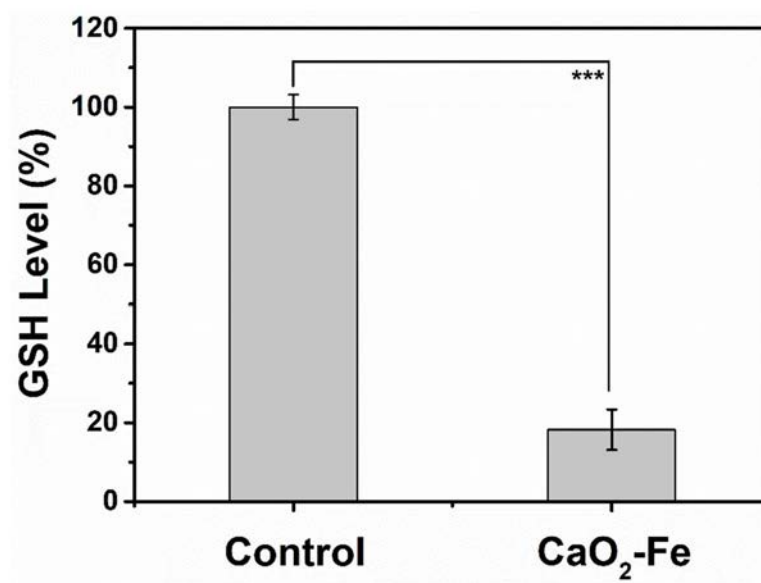


图13

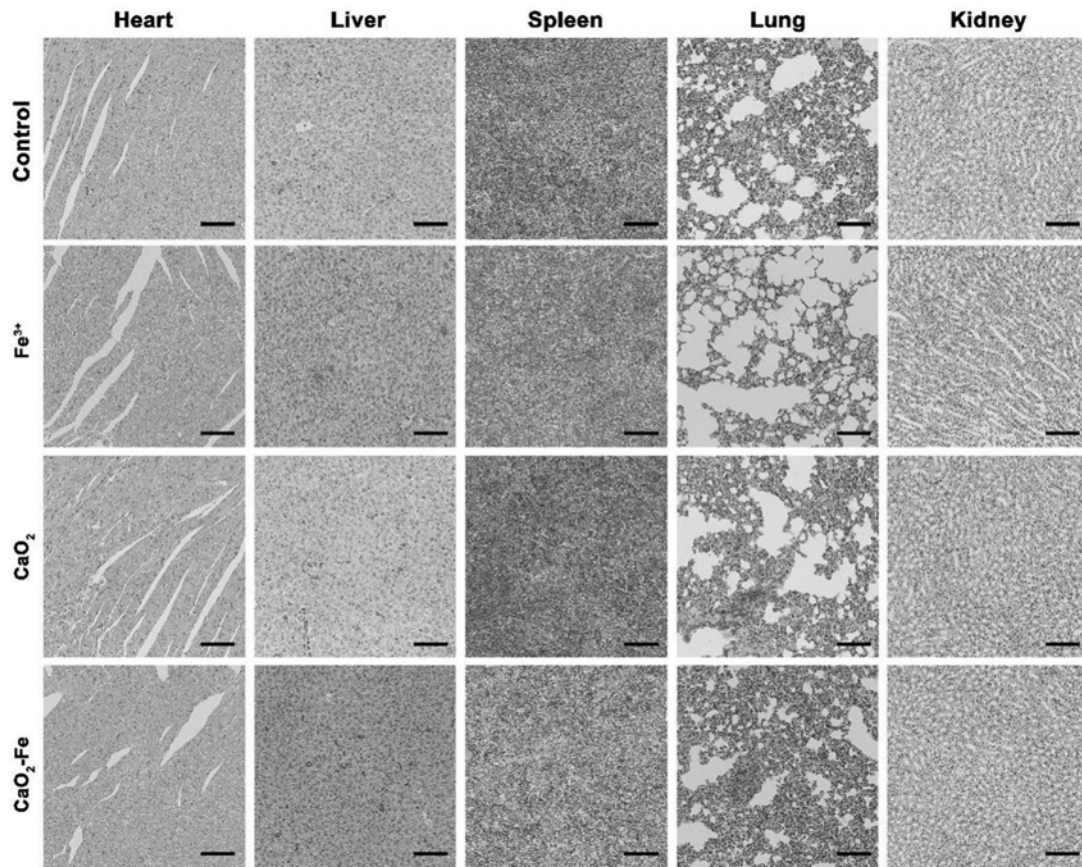


图14

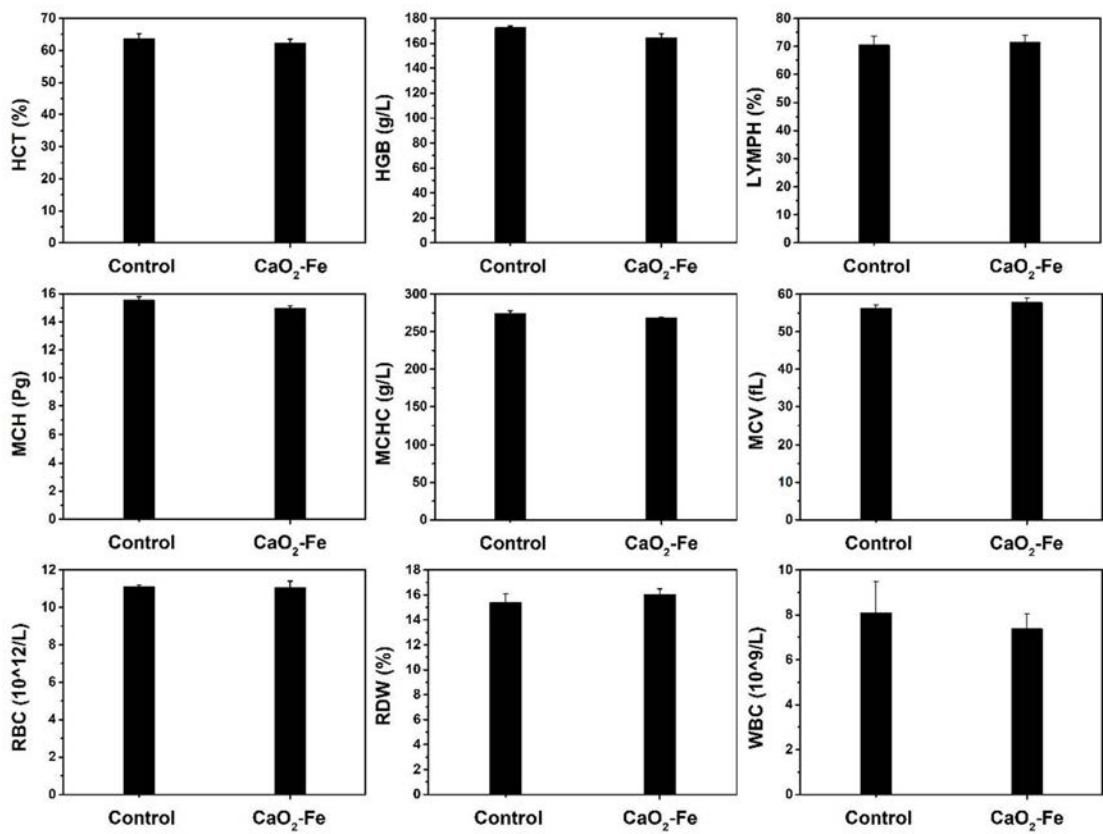


图15