



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116874622 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 13

(21) 申请号 202310727090.3

(22) 申请日 2023.06.19

(71) 申请人 西华师范大学

地址 637009 四川省南充市顺庆区师大路1号

(72) 发明人 侯怡铃 丁祥 周丽倩 赵倪慧
王艺学 卢睿加

(74) 专利代理机构 北京领科知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 11690
专利代理师 王立红 杨晞

(51) Int. Cl.

C08B 37/00 (2006.01)

A23L 33/125 (2016.01)

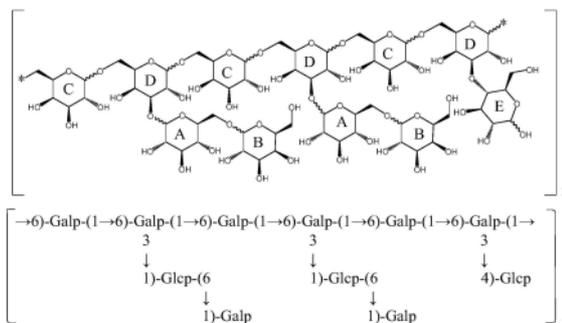
权利要求书2页 说明书8页 附图8页

(54) 发明名称

一种假蜜环菌多糖及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明具体公开了一种假蜜环菌多糖(AT-P)及其制备方法和应用。将假蜜环菌子实体经热水浸提、乙醇醇沉、除蛋白、离子交换柱层析和透析,最后浓缩得到纯化的假蜜环菌多糖(AT-P)。本发明还公开了假蜜环菌多糖(AT-P)的组成:半乳糖、葡萄糖;半乳糖与葡萄糖残基的摩尔比为8:3,其中(1→6)-半乳糖残基、(1→3,6)-半乳糖残基和→1)-半乳糖残基的摩尔比为3:3:2,(1→6)-葡萄糖残基和→4)-半乳糖残基的摩尔比为2:1。本发明制备的假蜜环菌多糖(AT-P)具有显著的免疫调节活性,可应用在药品、保健品或食品中。该应用为假蜜环菌的开发提供了一种新的途径。



柱,其填料为DEAE-52纤维素;

优选地,所述洗脱所用的洗脱剂为NaCl溶液;

优选地,所述洗脱为梯度洗脱,洗脱剂浓度为0.01-1.0mol/L。

9.如权利要求6所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,所述透析袋的截留分子量为5000-10000Da,优选为7000Da。

10.根据权利要求1-5任一项所述的多糖在制备增强免疫保健品和食品中的应用。

一种假蜜环菌多糖及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及真菌多糖应用技术领域,特别涉及一种假蜜环菌多糖及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 食用菌俗称蘑菇,是一种大型真菌,其子实体中富含蛋白质、维生素、矿质元素、氨基酸以及多糖等营养物质。

[0003] 食用菌多糖具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、降血脂、促进免疫细胞的增殖分化和淋巴因子的分泌、激活补体等免疫调节等生物活性等特点,安全无毒,使其在保健食品和生物医药等领域受到广泛的关注。而且食用菌多糖是一种非特异性免疫增强剂,它可通过多种途径提高机体免疫功能,而对机体没有副作用。

[0004] 假蜜环菌[*Armillariella tabescens* (Scop.ex Fr.) Sing],也称作亮菌,树秋,青杠菌等,属担子菌门、伞菌目、白蘑科、蜜环菌属。主要分布于四川、云南、广西等地。具有治疗肝炎、抗肿瘤、免疫调节等生理活性。

[0005] 假蜜环菌子实体为棕褐色,丛生或单生于林内地表枯桩或根上,其菌丝具隔、具分枝,无色透明,无锁状联合。

[0006] 目前假蜜环菌的研究主要集中于菌丝体发酵工艺的优化,对于假蜜环菌多糖的研究较少。冉靛等通过微波协助提取假蜜环菌多糖得率可达9.42%,显著高于热水浸提法(5.93%),并发现假蜜环菌多糖有一定的抗氧化活性。日本的纪保中志从假蜜环菌中提取分离纯化得到两种多糖,由 β -(1 \rightarrow 6)-连接的D-吡喃葡萄糖、D-半乳糖组成的水溶性多糖AT-HW;以及水不溶性的以(1 \rightarrow 3)- α -D-葡聚糖为主的AT-AL,并发现AT-HW能影响巨噬细胞,以及T细胞等参与免疫,AT-AL主要活化巨噬细胞产生SOA并激活溶酶体酶从而介导免疫调节机制,达到抗肿瘤的作用。

[0007] 可见,现有技术中缺少对假蜜环菌多糖的精细结构、假蜜环菌多糖在免疫调节活性中应用的研究。

发明内容

[0008] 本发明克服了现有技术中存在的缺陷,提供了一种假蜜环菌多糖及其制备方法和应用。

[0009] 本发明的第一方面提供了一种假蜜环菌多糖(AT-P),其为由半乳糖和葡萄糖组成的杂多糖,其中半乳糖和葡萄糖的残基的摩尔比为8:3。

[0010] 进一步地,所述多糖的化学结构中包含(1 \rightarrow 6)-半乳糖残基、(1 \rightarrow 3,6)-半乳糖残基、 \rightarrow 1)-半乳糖残基、(1 \rightarrow 6)-葡萄糖残基和 \rightarrow 4)-半乳糖残基。

[0011] 在本发明的一个实施方式中,所述的多糖由(1 \rightarrow 6)-半乳糖残基、(1 \rightarrow 3,6)-半乳糖残基、 \rightarrow 1)-半乳糖残基、(1 \rightarrow 6)-葡萄糖残基和 \rightarrow 4)-葡萄糖残基构成。

[0012] 进一步地,所述(1 \rightarrow 6)-半乳糖残基、(1 \rightarrow 3,6)-半乳糖残基和 \rightarrow 1)-半乳糖残基的

- [0027] (3)将步骤(2)所得洗脱液用透析袋进行透析浓缩。
- [0028] 优选地,(4)将步骤(3)完成后的透析袋内液体冷冻干燥。
- [0029] 进一步地,步骤(1)中,所述浸提的温度可以为80-100℃(如80、85、90、95、100℃);在本发明的一个实施例中,该浸提温度为98℃。
- [0030] 进一步地,步骤(1)中,假蜜环菌子实体粉末与水的料液比(W/V,mg/mL)为1:1-10(如1:1、1:2、1:3、1:5、1:8、1:10);在本发明的一个实施例中,该料液比为1:3。
- [0031] 进一步地,步骤(1)中,所述浸提的次数为1次或多次(如2、3、4、5次);在本发明的一个实施例中,该浸提次数为3次。
- [0032] 进一步地,步骤(1)中,每次浸提时间为1-10小时(如1、3、6、8、10小时);在本发明的一个实施例中,每次浸提时间为6小时。
- [0033] 在本发明的一个实施例中,步骤(1)中的浸提步骤可以包括:取假蜜环菌子实体粉末,与水混合,并置于水浴中煮沸。
- [0034] 进一步地,步骤(1)中,醇沉步骤中,醇与水提物的浓缩液的体积比为1-10:1(如1:1、3:1、4:1、5:1、10:1);在本发明的一个实施例中,该体积比为4:1;
- [0035] 在本发明的一个实施例中,上述醇沉步骤中,醇为乙醇。
- [0036] 在本发明的一个实施方式中,步骤(1)包括:取假蜜环菌子实体粉末,热水浸提,收集上清液,浓缩,加入无水乙醇,收集沉淀,烘干,除去其中蛋白质,得到粗多糖。
- [0037] 进一步地,步骤(2)中,离子交换柱可以为纤维素柱,该纤维素柱的填料如DEAE-52纤维素。
- [0038] 进一步地,步骤(2)中,洗脱所用洗脱剂可以为NaCl溶液;具体地,该NaCl溶液浓度为0.01-1.0mol/L(如0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、1.0)mol/L。
- [0039] 进一步地,步骤(2)中,洗脱可以为梯度洗脱,洗脱剂浓度可以为0.01-1.0mol/L(如0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0)mol/L。
- [0040] 在本发明的一个实施方式中,步骤(2)包括:将步骤(1)所得粗多糖的水溶液通过纤维素柱,梯度洗脱,收集洗脱液,浓缩。
- [0041] 进一步地,步骤(3)中,透析袋的截留分子量为5000-10000Da(如5000、6000、7000、8000、9000、10000Da);在本发明的一个实施例中,该截留分子量为7000Da。
- [0042] 在本发明的一个实施例中,步骤(3)包括:将步骤(2)所得洗脱液置于透析袋中进行透析,透析两天。
- [0043] 本发明的第三方面提供了一种如第二方面所述方法制备得到的粗多糖。
- [0044] 本发明的第四方面提供了一种如第一方面所述的假蜜环菌多糖在制备增强免疫的保健品和食品中的应用。
- [0045] 进一步地,所述应用中,所述多糖可单独使用,可也与其他活性成分联合使用。
- [0046] 本发明的发明人自假蜜环菌分离纯化得到多糖AT-P,并对其分子量、单糖组成、化学结构等进行了分析鉴定,确定了其重均分子量和结构组成。细胞实验表明,该多糖具有显著的免疫调节活性,特别在20 μ g/mL浓度时,B细胞的增殖率最高;特别在10 μ g/mL浓度时,T细胞促增殖率最高;2.5 μ g/mL浓度时,RAW264.7细胞的增殖率最高。
- [0047] 基于此,该多糖可用于制备增强免疫的保健品和食品,具有较佳的应用前景和商业价值,还可提假蜜环菌的利用价值。

附图说明

- [0048] 图1所示为AT-P的HPGPC谱图。
- [0049] 图2所示为AT-P的红外谱图。
- [0050] 图3所示为AT-P的HLPC谱图(其中,(A-G):单糖标准品,(H):假蜜环菌多糖(AT-P))。
- [0051] 图4所示为AT-P的¹H NMR谱图。
- [0052] 图5所示为AT-P的¹³C NMR谱图。
- [0053] 图6所示为AT-P的¹H-¹H-COSY谱图。
- [0054] 图7所示为AT-P的HMQC谱图。
- [0055] 图8所示为AT-P的HMQC谱图。
- [0056] 图9所示为AT-P的化学结构。
- [0057] 图10所示为AT-P对B细胞增殖的影响的实验结果。
- [0058] 图11所示为AT-P对T细胞增殖的影响的实验结果。
- [0059] 图12所示为AT-P对RAW264.7细胞增殖的影响的实验结果。

具体实施方式

[0060] 除非另有定义,本发明中所使用的所有科学和技术术语具有与本发明涉及技术领域的技术人员通常理解的相同的含义。

[0061] 在本发明中,“假蜜环菌(*Armillariella tabescens*)”是指担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、白蘑科、蜜环菌属真菌,其包含子实体和菌丝体。

[0062] 下面将结合本发明实施例,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0063] 实施例1假蜜环菌多糖AT-P的分离提取

[0064] 1、假蜜环菌多糖AT-P的分离提取

[0065] 1.1、水提醇沉法提取假蜜环菌粗多糖

[0066] 称取干燥的假蜜环菌子实体200g粉碎,于烧杯中以料液1:3的比例加入粉碎后的假蜜环菌子实体与蒸馏水,在98℃水浴6小时,收集上清液浓缩,重复3次,最终将全部的上清液浓缩至200mL。加入三倍体积的无水乙醇,使其沉淀,收集沉淀并干燥,除去提取液中的蛋白质,从而获得假蜜环菌粗多糖。

[0067] 1.2、DEAE-52纤维素柱层析法分离纯化假蜜环菌粗多糖

[0068] 精确称取50g DEAE纤维素,并将其溶解在1L的超纯水中,充分搅拌,若无肉眼可见的纤维素颗粒则停止搅拌。静置24h,弃去上清液,待用。配置0.5mol/L NaOH,浸泡纤维素6h,用超纯水洗涤至中性后,弃去上清,再加入0.5mol/L HCl浸泡6h,蒸馏水洗涤至中性,弃去上清;再加入0.5mol/L NaOH再次浸泡6h,用蒸馏水洗涤至中性,静置待用。

[0069] 将活化的纤维素装柱后,经蒸馏水压柱平衡24h后即可进行粗多糖的分离纯化。将粗多糖稀释后的上清液(5mL)加入DEAE纤维素柱中,加入不同浓度的NaCl(0.01mol/L, 0.05mol/L, 0.1mol/L)进行洗脱。多糖用硫酸-苯酚法测定。将洗脱液浓缩至5mL,将样品在

纤维素柱上纯化。用透析袋 ($M_w \geq 7kDa$) 透析,持续48h,冷冻干燥,得到假蜜环菌多糖,命名为AT-P。

[0070] 2、假蜜环菌多糖AT-P的结构鉴定

[0071] 运用酸水解、甲基化分析、高效凝胶渗透色谱法、高效液相色谱、气相色谱和质谱联用技术、红外谱技术、核磁共振技术,对假蜜环菌多糖(AT-P)进行结构解析。

[0072] 2.1、分子量的测定

[0073] 将10mg假蜜环菌多糖AT-P样品用1mL ddH₂O溶解,超声5min,进行HPGPC分析。

[0074] 2.2、假蜜环菌多糖AT-P的红外谱分析

[0075] 将2mg AT-P与KBr混合压片,通过红外分光光度计扫描 $4000cm^{-1}$ - $400cm^{-1}$ 范围。

[0076] 2.3、假蜜环菌多糖AT-P的单糖组成分析

[0077] 将7种标准品和经TFA酸水解后的AT-P样品用流动相(75%乙腈)溶解后进行HPLC分析。

[0078] 2.4、假蜜环菌多糖AT-P的核磁共振分析

[0079] 取50mg AT-P样品溶于0.6mL重水(D₂O)中,装入核磁管中,在核磁共振仪上检测。

[0080] 2.5、假蜜环菌多糖AT-P的甲基化与硅烷化衍生后进行GC-MS分析

[0081] 称取20mg AT-P样品,将烧杯密封,向密封的烧杯中加入2mL DMSO(二甲基亚砷),轻轻振荡烧杯,使AT-P充分溶解。然后加过量的NaOH,直至NaOH刚好不溶解为止并将其放置在摇床中室温振荡1h。振荡完成后,加入1.5mL碘甲烷,避光反应1h,反应后加水终止反应。用氯仿萃取产物,干燥后得甲基化多糖。甲基化多糖经TFA完全酸水解后,水洗三次,得甲基化完全酸水解产物。

[0082] 将上述样品与2mL六甲基二硅烷胺、1mL三甲基氯硅烷以及2mL的无水吡啶充分反应,并在50℃条件下水浴20min,采用低温高速离心机在转速12000rpm/min,4℃条件下离心10min,弃去沉淀,用0.22μm过滤器过滤,取上层溶液用于GC-MS分析。

[0083] 3、结果

[0084] 3.1、假蜜环菌多糖AT-P的基本性质结果

[0085] PC--1的HPGPC谱图如图1所示,其显示AT-P的重均分子量为17600Da。

[0086] 3.2、假蜜环菌多糖AT-P的FTIR谱分析

[0087] 采用傅里叶红外光谱对AT-P进行初级结构表征,结果如图2所示,波数在 $3425cm^{-1}$, $2928cm^{-1}$ 以及 $1400\sim 1200cm^{-1}$ 等处内有典型的多糖吸收峰,且无其他杂峰,说明分离纯化的AT-P为一种多糖物质。表4-1为AT-P的官能团分析表。 $4000\sim 1250cm^{-1}$ 为特征峰区, $3425.88cm^{-1}$ 处出现的宽而强烈的吸收峰,指定为O-H伸缩振动。 $2928.49cm^{-1}$ 的信号峰指定为-CH₂伸缩振动峰,在 $1632.92cm^{-1}$ 和 $1404.47cm^{-1}$ 处的信号峰分别指定为C=O伸缩振动峰和C-H弯曲振动峰。在 $1250\sim 400cm^{-1}$ 的指纹峰区域, $1077.59cm^{-1}$ 处信号峰指定为C-O伸缩振动峰。以上表明AT-P含有吡喃糖。此外,在 $1730cm^{-1}$ 附近无吸收峰,说明AT-P不含糖醛酸。

[0088] 3.3、假蜜环菌多糖AT-P的单糖组成分析

[0089] 将AT-P完全水解后,采用HPLC对其进行单糖组成分析,结果如图3所示,各单糖标准品出峰时间分别为Rha(4.838min)、Xyl(5.638min)、Ara(6.363min)、Fru(7.120min)、Man(8.704min)、Glc(8.386min)、Gal(8.949min)。AT-P完全水解后的HPLC结果中有7.934和8.486min两个保留时间,与单糖标准品的出峰时间相比对,分别指定为Glc、Gal。表明AT-P

由Glc和Gal组成,峰面积比约为3:8。

[0090] 3.4、假蜜环菌多糖AT-P的NMR谱分析

[0091] AT-P的¹H NMR结果如图4所示。结果显示,AT-P有五个异头氢信号,分别为:δ5.24、δ5.01、δ4.94、δ4.86和δ4.38,且积分面积比为2.52:2.03:3.52:2.65:0.61。δ3.0~4.2之间的信号归属为糖残基中C2-C6的氢信号。

[0092] AT-P的¹³C NMR结果如图5所示,AT-P在δ102.64、δ101.61、δ99.27、δ98.21和δ97.83处有五个异头碳信号。δ60~78之间的信号归属为糖残基中C2-C6的碳信号。

[0093] AT-P的¹H-¹H-COSY谱图如图6所示,据其可以鉴定相邻氢核间的耦合关系。A部分H1/H2的信号为δ5.24/3.53,B部分H1/H2的信号为δ5.01/3.81,C部分H1/H2的信号为δ4.94/3.66,D部分H1/H2的信号为δ4.86/3.71,E部分H1/H2的信号为δ4.38/3.18。

[0094] 所有的氢的化学位移都总结于表1中。

[0095] AT-P的HMQC光谱图如图7所示,据其可以鉴定近程相关的¹H和¹³C间的耦合关系。A部分H1/C1的信号为δ5.24/99.27,B部分H1/C1的信号为δ5.01/98.21,C部分H1/C1的信号为δ4.94/101.61,D部分H1/C1的信号为δ4.86/97.83,E部分H1/C1的信号为δ4.38/102.64。

[0096] AT-P的HMBC光谱图如图8所示,据其可以鉴定远程相关的¹H和¹³C间的耦合关系。A残基的H2/C3的信号为δ3.53/77.05,B残基的H3/C4的信号为δ3.96/68.33,C残基的H3/C5的信号为δ3.91/72.84,D残基的H1/C3的信号为H1/C4的信号δ4.86/66.55、H4/C5的信号为δ3.54/71.77、H5/C6的信号为δ3.75/68.19,E残基的H2/C1的信号为δ3.18/102.64。

[0097] 所有的碳的化学位移都总结于表2中。

[0098] 表1AT-P的¹H的化学位移

糖残基	化学位移, δ (ppm)					
	H1	H2	H3	H4	H5	H6
1,6-Glcp (A)	5.24	3.53	3.83	3.65	3.78	3.57
[0099] 1-Galp (B)	5.01	3.81	3.96	3.66	3.80	3.53
1,6-Galp (C)	4.94	3.66	4.00	3.82	4.08	3.96
1,3,6-Galp (D)	4.86	3.71	3.93	3.54	3.75	3.69
4-Glcp (E)	4.38	3.18	3.34	3.26	3.41	3.30

[0100] 表2AT-P中¹³C的化学位移

糖残基	化学位移, δ (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
1,6-Glcp (A)	99.27	72.82	77.05	72.73	69.48	66.61
[0101] 1-Galp (B)	98.21	76.95	73.75	68.33	60.9	70.46
1,6-Galp (C)	101.61	69.8	61.16	73.00	68.58	70.38
1,3,6-Galp (D)	97.83	74.72	61.11	66.55	71.77	68.19
4-Glcp (E)	102.64	75.48	76.37	76.37	66.82	61.08

[0102] 3.5、假蜜环菌多糖AT-P的气相色谱与质谱分析

[0103] 甲基化结果如表3所示,表明AT-P的主要重复结构单元由(1→6)-半乳糖残基、(1

→3,6)-半乳糖残基为主链,(1→6)-葡萄糖残基,(→4)-葡萄糖残基构成支链,(→1)-半乳糖作为末端糖。综上可初步推断AT-P的结构如图9所示。

[0104] 表3AT-P甲基化结果分析

	Methylated sugar	Linkage	m/z
[0105]	2,3,4-tris-O-methy-1,6-di-O-trimethylsilyl-Glcp	1,6-	71 73 75 88 89 101 116 131 133 146 341 590
	2,6-di-O-methy-1,3,4-tris-O-trimethylsilyl-Galp	1,3,4-	73 75 89 116 131 133 146 147 159 191 303 595
	1,2,3,6-tetrakis-O-methy-4-O-trimethylsilyl-Glcp	4-	71 73 75 88 89 101 116 131 133 159 174
[0106]	2,4-di-O-methy-1,3,6-tris-O-trimethylsilyl-Galp	1,3,6-	59 73 75 89 116 131 146 147 159 191 287 421
	4,6-di-O-methy-1,2,3-tris-O-trimethylsilyl-Galp	1,2,6-	71 73 75 88 101 131 133 146 147 159 281 400 502

[0107] 实施例2:假蜜环菌多糖AT-P的免疫调节活性研究

[0108] 在体外运用两种CCK-8法测定假蜜环菌多糖AT-P的免疫调节活性。

[0109] 1、试剂

[0110] CCK-8试剂盒、RPIM1640、FBS、DMSO、双抗等,均为市售产品。

[0111] 2、仪器

[0112] 酶标仪;细胞培养箱。

[0113] 3、方法

[0114] AT-P对免疫细胞(B细胞、T细胞和RAW264.7细胞)的增殖影响

[0115] 通过细胞计数试剂盒(CCK-8)法测定假蜜环菌多糖(AT-P)对T细胞、B细胞和RAW264.7细胞增殖的影响。体外培养T细胞、B细胞和RAW264.7细胞至对数生长期,细胞计数板计数后,用新的培养液将细胞悬液稀释至 1×10^5 个/mL,将细胞悬液加入96孔板,每孔100 μ L,将96孔板放入CO₂培养箱中培养24h。24h后,实验组分别加入不同质量浓度的AT-P溶液(最终质量浓度为2.5、5、10、20 μ g/mL),阳性对照加入100 μ L LPS溶液(最终质量浓度10 μ g/mL),空白组加入100 μ L细胞培养液。在CO₂培养箱中培养24h后,分别向每孔加入10 μ l的CCK-8,放入CO₂培养箱中孵育2h后在酶标仪上检测(450nm)吸光度值并拍摄图像。

[0116] 4、结果

[0117] 4.1AT-P对B细胞的增殖影响

[0118] 结果如图10所示,与空白组相比,在AT-P终浓度1.25~20 μ g/mL范围内,AT-P能显著($P < 0.05$)刺激B细胞增长,且随着药物浓度增加,增殖率也随之增长,增殖率分别为26.33%、26.33%、34.54%、51.96%、70.16%。其中,当AT-P为20 μ g/mL时,其增殖率达到最高值70.16%,远高于阳性对照组LPS(10 μ g/mL)42.58%的增殖率。

[0119] 4.2AT-P对T细胞的增殖影响

[0120] 结果如图11所示,与空白组相比,AT-P在终浓度1.25~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,均能明显促进细胞增殖,差异具有统计学意义($P<0.05$)。当AT-P终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对T细胞的增殖效率达到最大,增殖率为38.28% ($P<0.01$),接近阳性对照组LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的增殖率40.84%。

[0121] 4.3AT-P对RAW264.7细胞的增殖影响

[0122] 结果如图12所示,与空白组相比,当AT-P终浓度为1.25~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,均能显著提高细胞增殖率,且差异显著($P<0.05$)。当AT-P浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,能极显著促进RAW 264.7细胞增殖($P<0.0001$),且增殖率达到最高49.65%。

[0123] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0124] 本发明中描述的前述实施例和方法可以基于本领域技术人员的能力、经验和偏好而有所不同。

[0125] 本发明中仅按一定顺序列出方法的步骤并不构成对方法步骤顺序的任何限制。

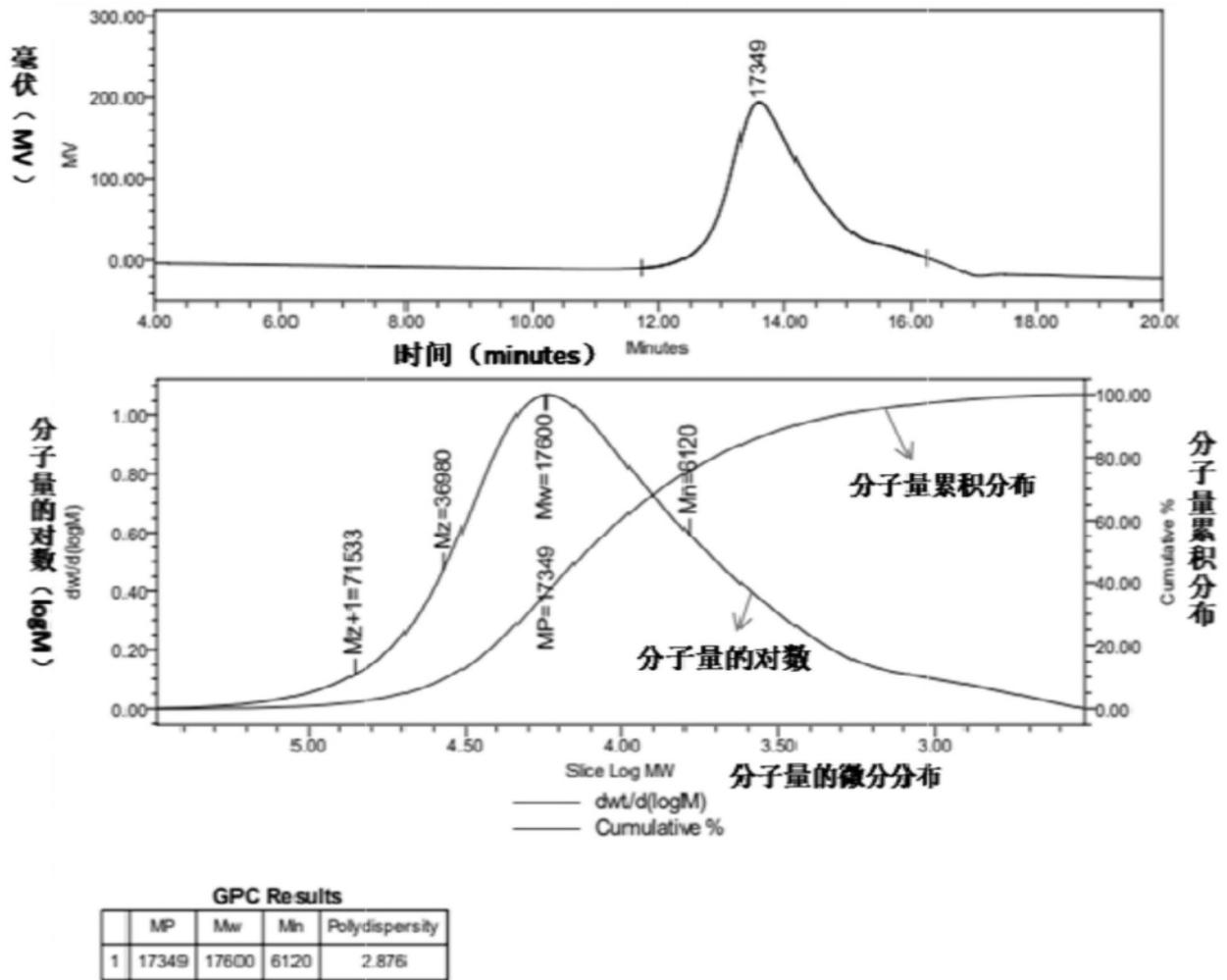


图1

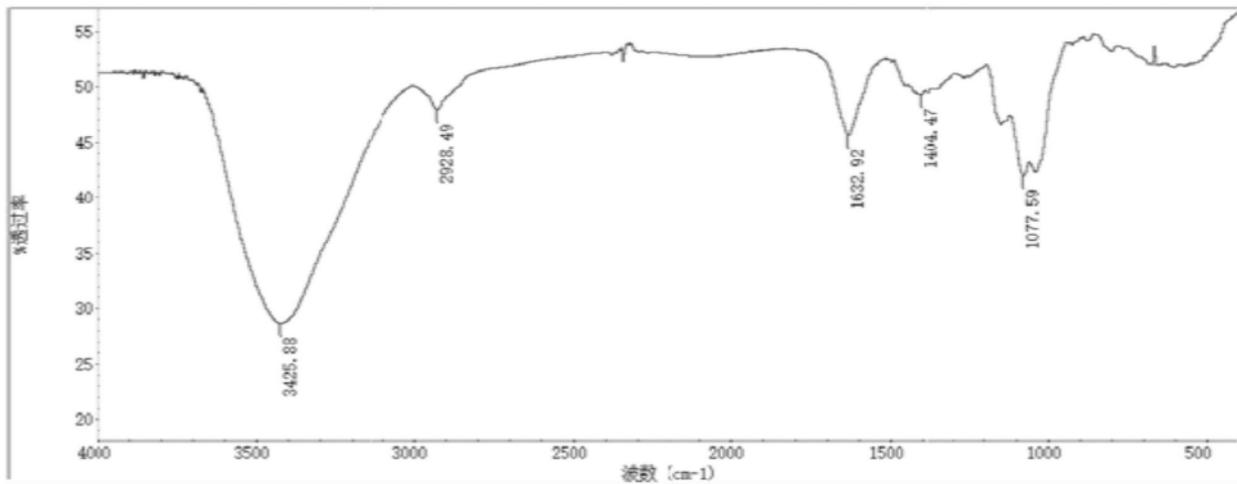


图2

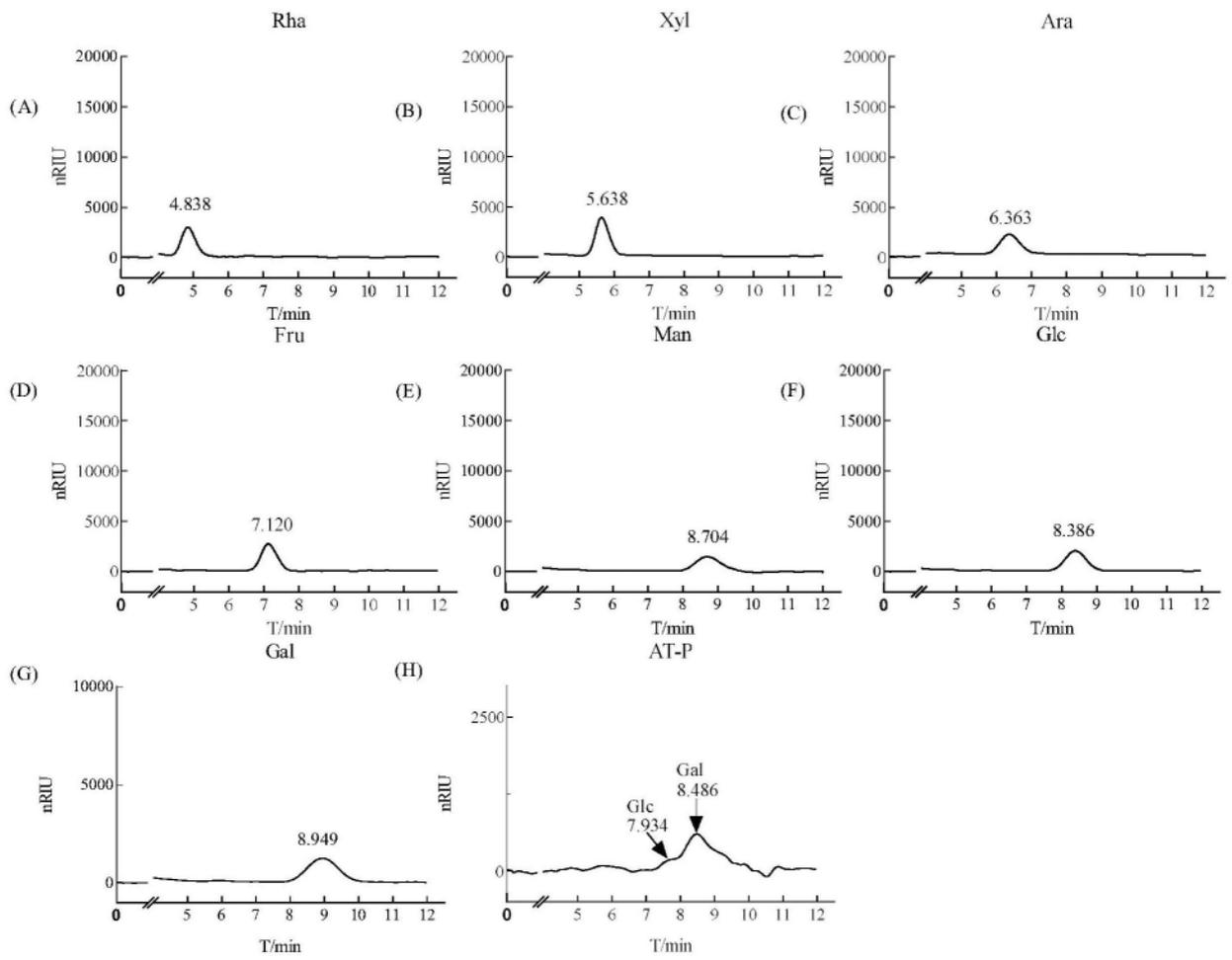


图3

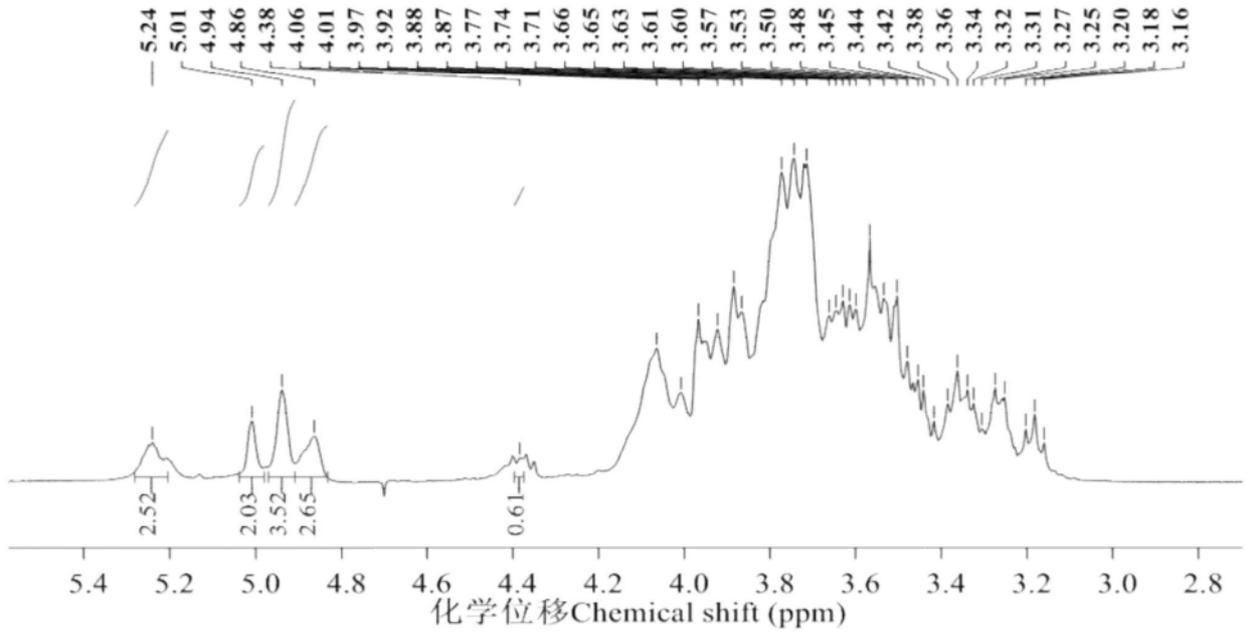


图4

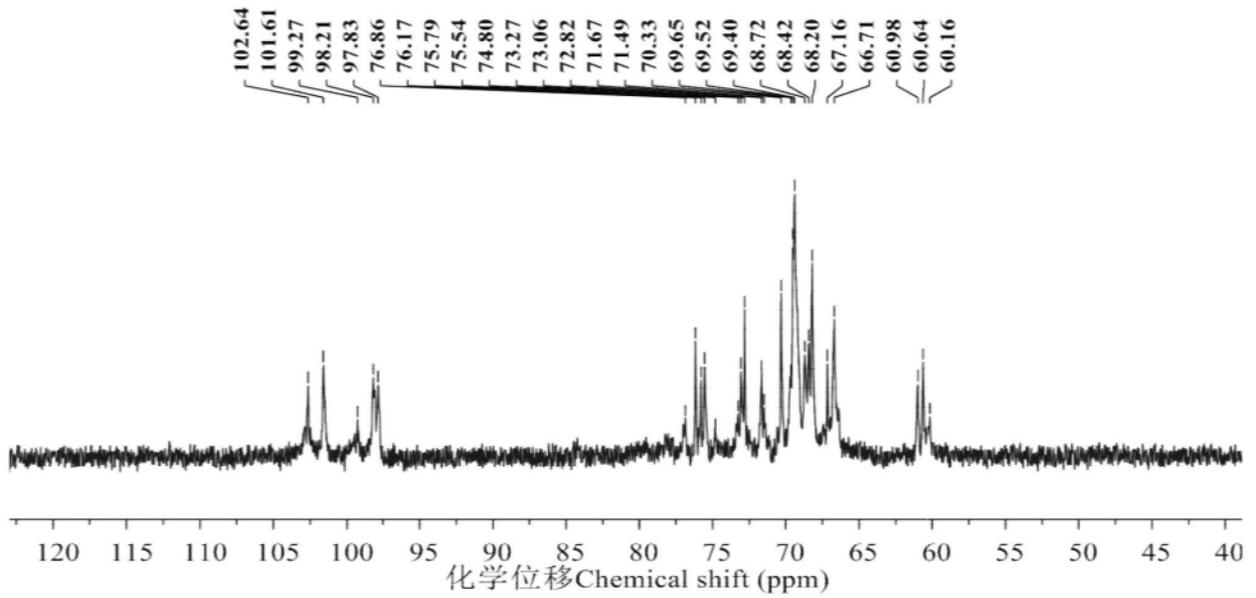


图5

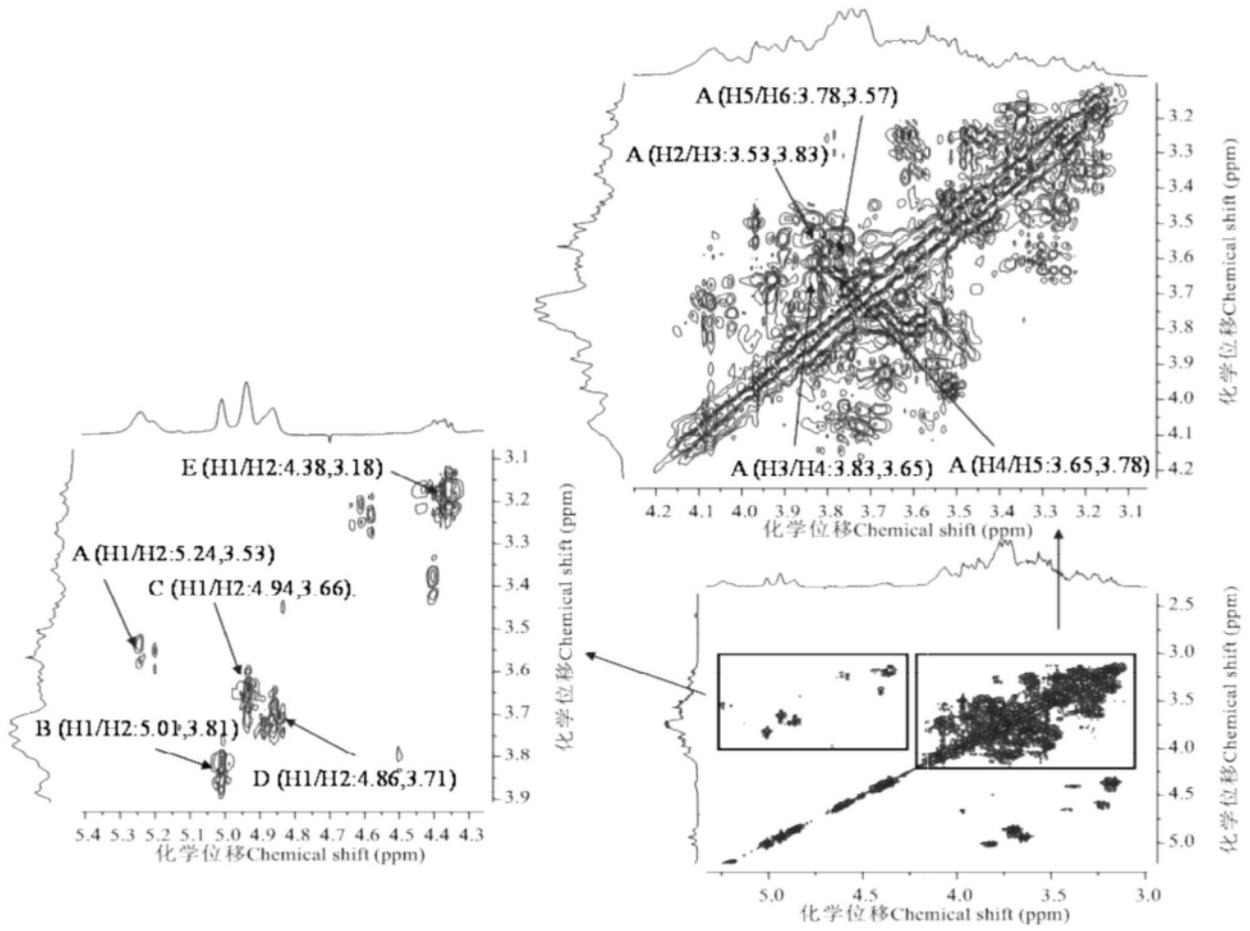


图6

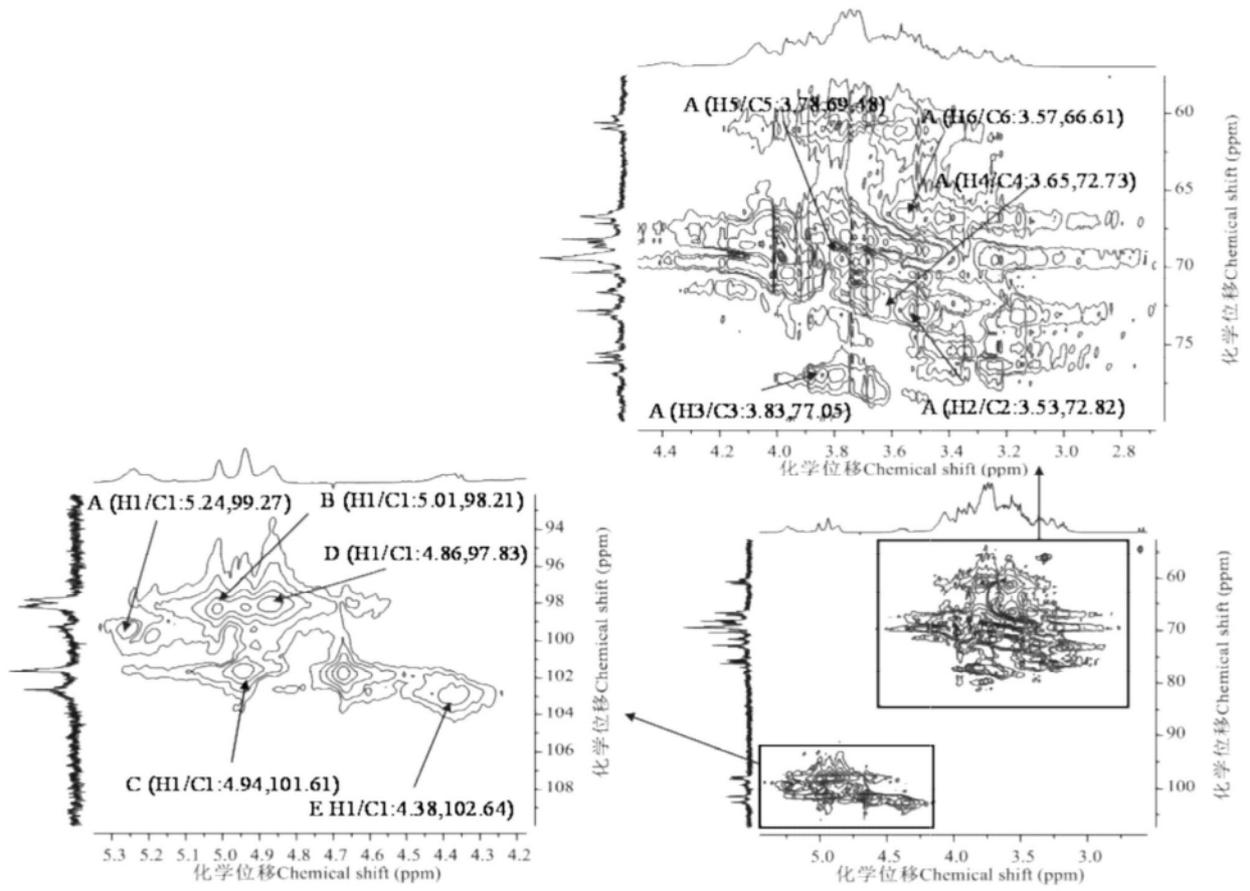


图7

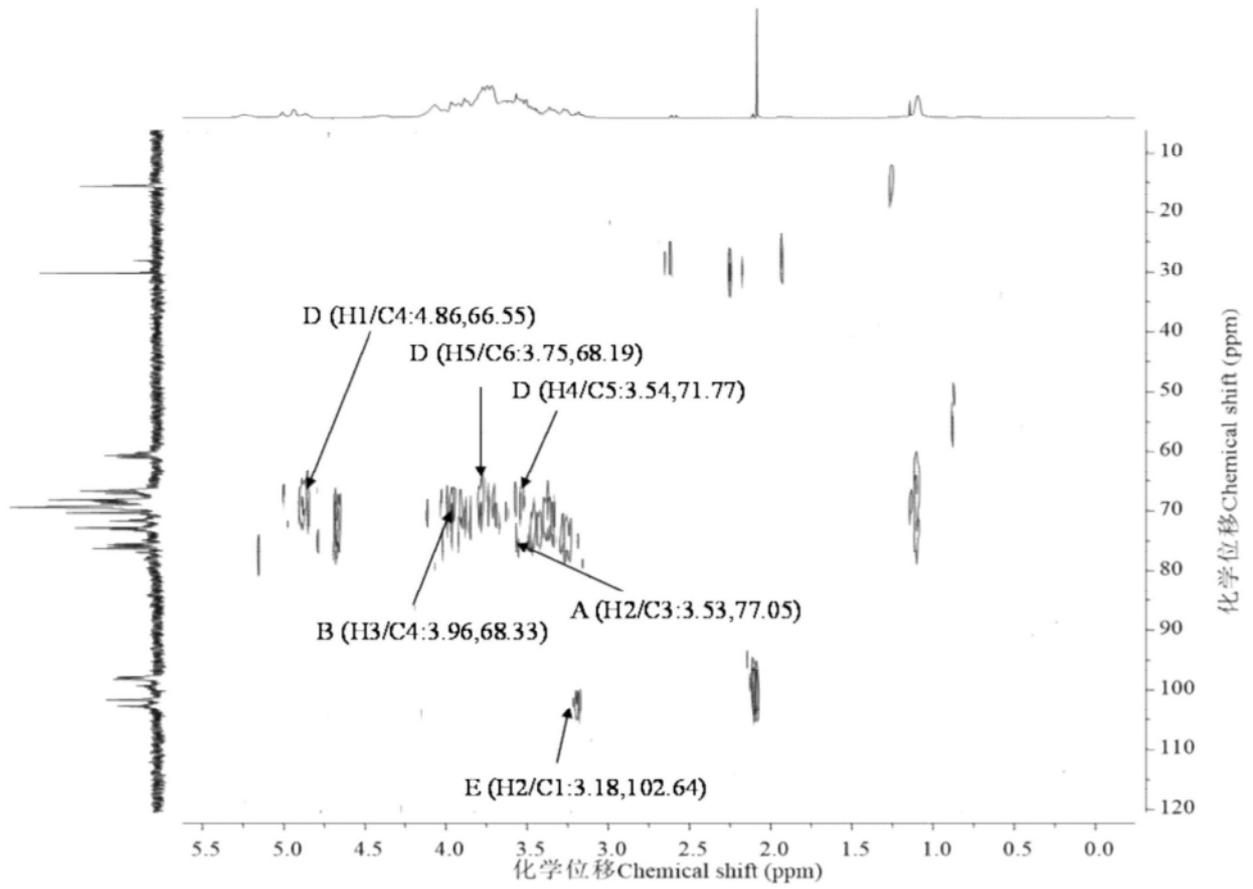


图8

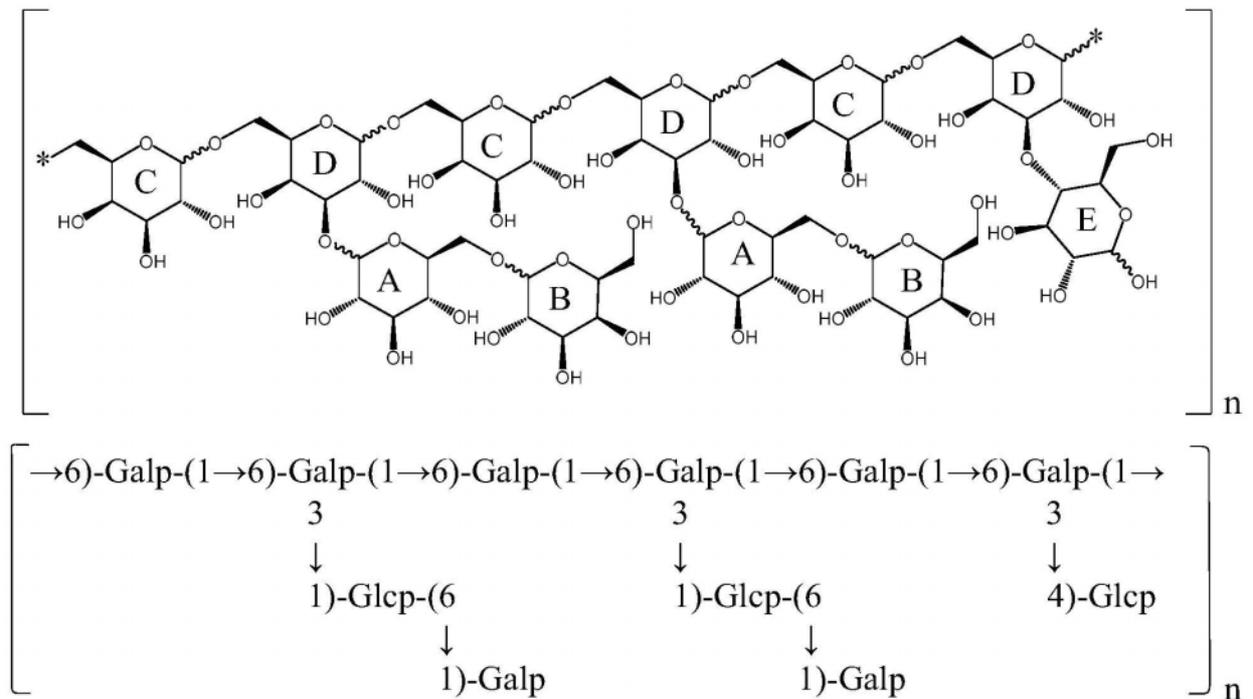


图9

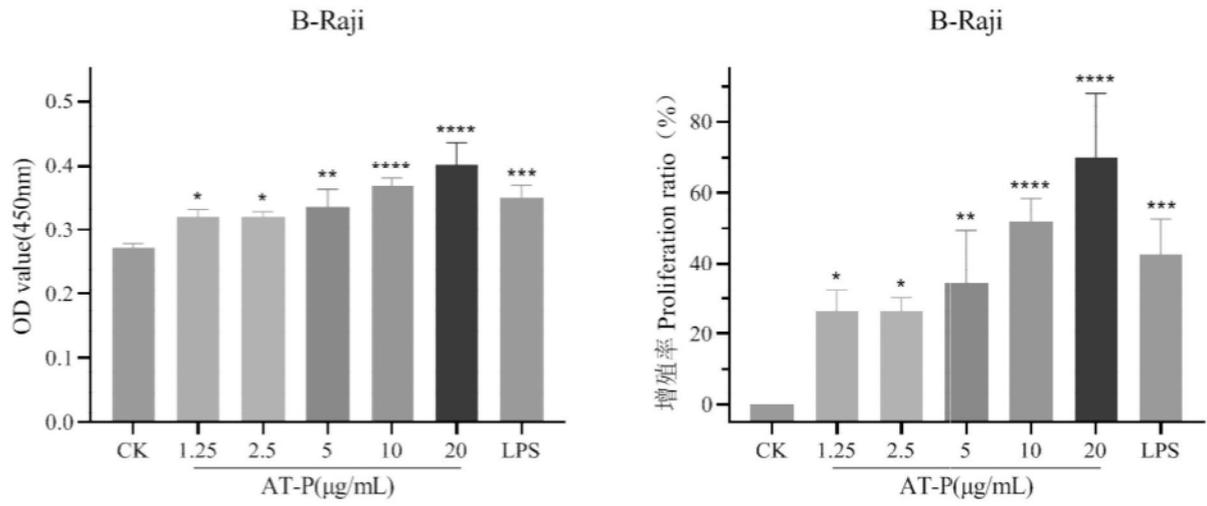


图10

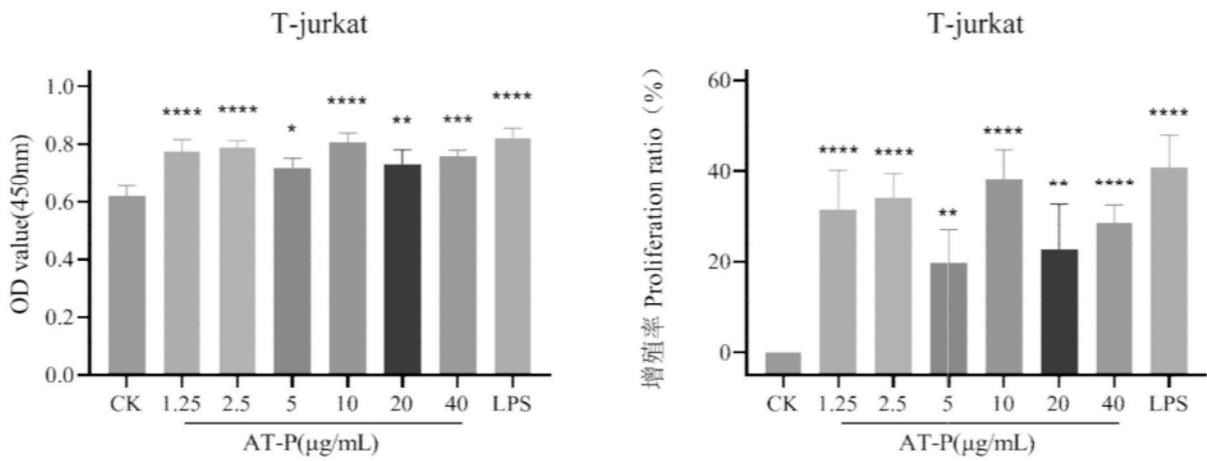


图11

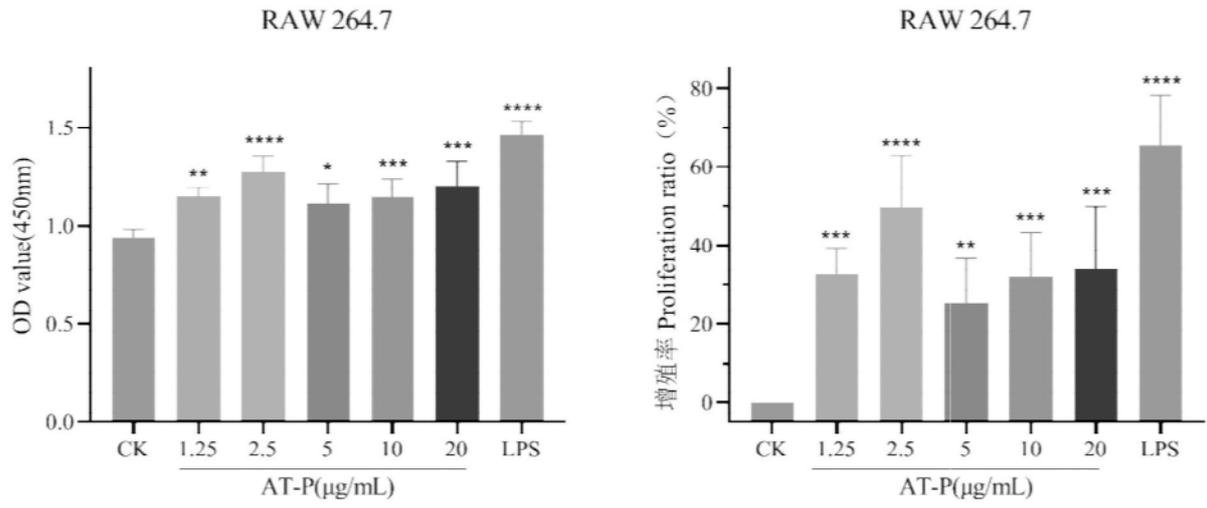


图12