

单细胞表观遗传成像方法研究进展

王梦灵, 郝 翟, 张左玲, 王 琛, 宋沁馨, 邹秉杰*

中国药科大学 江苏南京

【摘要】表观遗传修饰在调控基因表达、细胞命运决定及疾病发生中扮演关键角色,其时空动态特性与细胞异质性密切相关,需要利用合适的分析技术进行精准解析。对此,传统均质样本分析方法难以捕捉单细胞层面的表观调控差异,而单细胞表观遗传成像技术在细胞异质性分析方面已展示出良好的应用,并随着该领域技术发展,其在空间分辨率与动态监测方面也已取得突破。本文对近几年开发的基于光学显微技术的免疫荧光成像、基于核酸扩增的原位标记荧光成像、基于基因编码的荧光蛋白成像等单细胞表观遗传成像方法进行了系统总结,并对它们的成像原理作简要说明。文章重点关注了这些方法的检测通量性能、成像分辨率以及信号放大性能,并概述了它们在实际科研和临床工作中的应用,以期新的单细胞表观遗传成像方法的开发提供参考,同时推动相关技术向疾病机制解析、表观药物筛选等生物医学与精准医疗的转化应用。

【关键词】单细胞成像; 表观遗传; 免疫荧光; 荧光成像; 荧光蛋白; 进展

【收稿日期】2025 年 4 月 25 日

【出刊日期】2025 年 5 月 22 日

【DOI】10.12208/j.ijmd.20250022

Progress of single-cell epigenetic imaging methods

*Mengling Wang, Di Hao, Zuoling Zhang, Chen Wang, Qinxin Song, Bingjie Zou**

China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu

【Abstract】 Epigenetic modifications play a crucial role in regulating gene expression, cell fate determination, and disease occurrence. Their spatiotemporal dynamic characteristics are closely related to cellular heterogeneity, which requires the use of appropriate analytical techniques for precise interpretation. Traditional homogeneous sample analysis methods are difficult to capture epigenetic regulatory differences at the single-cell level, while single-cell epigenetic imaging techniques have shown good applications in the analysis of cellular heterogeneity. With the development of this field, they have also achieved breakthroughs in spatial resolution and dynamic monitoring. This article systematically summarizes the single-cell epigenetic imaging methods developed in recent years based on optical microscopy technology, such as immunofluorescence imaging, in situ labeling fluorescence imaging based on nucleic acid amplification, and fluorescent protein imaging based on gene encoding. It briefly explains their imaging principles and focuses on the detection throughput performance, imaging resolution, and signal amplification performance of these methods. It also provides an overview of their applications in actual scientific research and clinical work, with the aim of providing references for the development of new single-cell epigenetic imaging methods and promoting the transformation and application of related technologies in the fields of disease mechanism analysis and epigenetic drug screening in biomedicine and precision medicine.

【Keywords】 Single-cell imaging; Epigenetics; Immunofluorescence; Fluorescence imaging; Fluorescent protein; Progress

恶性肿瘤一直是人类面临的重大健康威胁之一,经典的“Peter Nowell 克隆演化理论”^[1]认为,癌细胞是由人体内发生致癌基因突变的正常细胞逐渐转变而来,这一过程经过不断地克隆扩增和筛选积累,

*通讯作者: 邹秉杰

最终形成肿瘤。然而,值得注意的是,在一些恶性肿瘤案例中,基因组学的研究结果缺乏强致癌基因的突变,且肿瘤内遗传异质性难以完全解释耐药、转移等恶性表型^[2]。这一矛盾促使研究人员将研究视角从传统的遗传调控转向非遗传调控层面,尤其是表观遗传修饰。研究表明,表观遗传修饰的变化是恶性生物学结果的重要原因,包括肿瘤增殖、分化、自我更新、治疗抗性和肿瘤转移。

“表观遗传学(epigenetics)”一词,是由著名的遗传学家 Conrad Waddington 于 1942 年首次提出^[3],用于描述基因表型发生可遗传变化而基因的 DNA 序列没有相应变化的现象。通过研究 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质可及性等可遗传的分子标记,表观遗传学揭示了基因表达调控的时空特异性及其在发育、疾病中的核心作用^[4-6]。然而,传统的表观遗传分析往往聚焦于群体细胞(bulk cells)的平均信号,掩盖了细胞间表观调控的异质性。尽管当前的单细胞表观遗传检测技术通过高通量测序方法,在解析细胞异质性方面取得了显著进展,但其技术框架仍存在关键局限:基于组织解离的单细胞分选流程会破坏细胞原有的空间组织结构,导致表观遗传特征在复杂组织中的三维空间定位信息产生不可逆丢失。而此类空间信息对理解表观基因组如何在天然组织微环境中调控细胞命运具有不可替代的生物学意义。因此,开发保留空间分辨率的单细胞表观遗传成像技术已成为突破现有方法瓶颈、揭示表观调控网络时空动态的核心方向。

本文系统梳理和总结了近几年涌现的单细胞表观遗传成像技术,并对它们的基本原理和应用优势等作简要介绍,重点对比了不同方法的信号放大性能和成像分辨率,以期优化单细胞表观遗传成像的灵敏度与时空精度提供参考,同时推动相关技术向疾病机制解析、表观药物筛选等生物医学与精准医疗的转化应用。

1 基于光学显微技术的单细胞表观遗传成像

光学显微技术是基于可见光与荧光探针,对生物样本实现亚细胞至纳米级成像的核心手段。传统的宽场荧光显微镜利用特定波长激发荧光标记物,通过物镜收集发射光生成二维图像,但其分辨率往往受限于衍射极限(约 200 nm)。超分辨显微技术如随机光学重建显微镜(stochastic optical

reconstruction microscopy, STORM)等,突破了传统光学显微镜的衍射极限,使成像分辨率达到纳米级(20-50 nm),为单细胞表观遗传修饰和亚细胞结构研究提供了革命性工具^[7]。

Franek 等^[8]提出的一种结合超分辨显微镜与单分子 DNA 纤维分析的技术方案,利用 FISH 探针定位和免疫荧光成像,结合 STED/STORM 技术突破衍射极限,实现了对表观遗传标记的高分辨率可视化与定量分析。Xu 等^[9]展示了基于 STORM 的超分辨成像技术,通过免疫荧光标记 10 种组蛋白修饰,结合三维定位算法,首次在单细胞哺乳动物细胞核中揭示了三种由组蛋白修饰驱动的高阶染色质结构。Xie 等^[10]展示的三维染色质可及性光激活定位显微镜技术(3D ATAC-PALM),利用携带光激活荧光探针的 Tn5 转座酶标记染色质开放区域,结合晶格光片显微镜,在甲醛固定的细胞中解析了可及染色质结构域(ACDs)的空间分布,为理解基因组的空间组织和基因表达调控机制提供了新视角。

这类方法都是基于超分辨成像显微技术,通过免疫荧光标记来实现表观遗传修饰的单细胞高分辨率成像。然而,这些方法仍然依赖抗体特异性,且成像过程较为复杂,需要定制的设备 and 专业的操作技能,限制了这些技术的广泛应用。

Farhy 等^[11]开发的基于高内涵显微成像的表观遗传学景观多参数分析(microscopic imaging of the epigenetic landscape, MIEL)平台,通过整合免疫荧光染色与机器学习算法,实现了表观遗传药物的高通量分类和剂量反应评估。Alvarez-Kuglen 等^[12]介绍了基于高内涵显微成像的染色质和表观遗传年龄评估方法(imaging-based chromatin and epigenetic age, ImAge),通过整合免疫荧光成像、自动化显微镜与机器学习算法,实现了单细胞水平表观遗传标记空间组织的衰老轨迹分析。这类技术体系通过整合免疫荧光标记、高内涵显微成像系统与机器学习驱动的图像解析算法,实现了单细胞分辨率下表观遗传修饰的定量空间分析。然而,其实际应用仍面临抗体特异性不足、技术门槛较高、结果的可重复性受限于成像参数的挑战。

上述方法通过整合传统免疫荧光法和先进的显微技术,突破传统荧光显微镜的衍射极限,在单细胞水平实现了染色质结构与表观遗传修饰的纳米级

空间解析。然而,其广泛应用仍面临多重挑战:抗体的表位特异性不足可能引入交叉反应信号;依赖先进的显微成像仪器,成像成本高昂;高通量成像产生的大量数据需依赖定制化算法,数据处理复杂。

2 基于核酸扩增方法的单细胞表观遗传成像

DNA 碱基配对的可编程特性为单细胞表观遗传成像提供了分子编码基础。通过点击化学反应或生物素-链霉亲和素系统,可将特异性单链 DNA 探针共价偶联至靶向抗体或直接修饰于表观遗传标记上,形成“抗体-DNA”或“表观标记-DNA”复合探针。这些修饰了 DNA 的复合探针进一步结合等温核酸扩增策略可线性放大荧光信号,无需结合先进的显微技术和复杂的自定义算法就能实现单拷贝表观修饰的原位可视化。

Chen 等^[13]提出的基于碱基编码扩增的荧光原位杂交 (base-encoded amplifying FISH, BEA-FISH)

方法(如图 1 所示),通过酶促反应或化学标记将修饰位点转化为 DNA 条形码,并触发滚环扩增反应放大荧光信号,实现了单细胞内 5-羟甲基尿嘧啶 (5hmU) 等低丰度修饰的原位数字化定量分析。然而,该方法只能应用于固定细胞样本与丰度较低的靶标的单次成像,无法考察不同的 DNA 甲基化修饰之间潜在的联系。

为进一步研究不同的 DNA 甲基化修饰之间的潜在联系,Xue 等^[14]介绍的基于邻位连接的差异化可视化 (pairwise proximity-differentiated visualization) 方法(如图 2 所示),通过 DNA 纳米技术实现了单细胞内 DNA 表观遗传修饰 5fC 和 5hmC 的空间定位及邻近关系分析。然而,该方法仍然有着只能应用于固定细胞样本和检测通量有限的局限性,且由于化学或酶促标记的使用,依旧无法对特定的 DNA 或 RNA 序列进行成像。

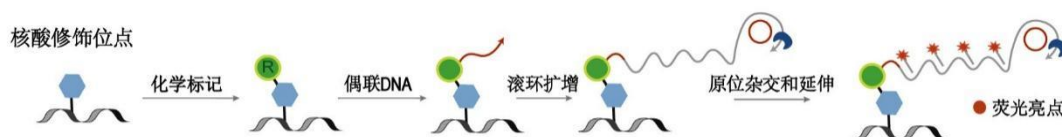


图 1 基于碱基编码扩增的荧光原位杂交 (BEA-FISH) 方法原理

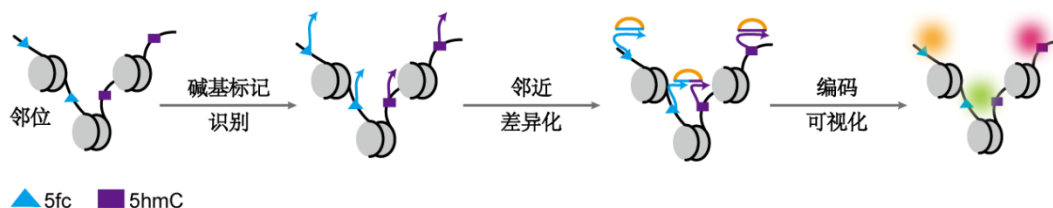


图 2 基于邻位连接的差异化可视化方法原理

Kint 等^[15]提出的表观遗传可视化分析 (epigenetic visualization assay, EVA) 方法,通过原位生化反应和 RNA-FISH 技术实现了单细胞水平上特定基因表观遗传标记的定量检测以及与基因转录状态相关联的研究。虽然该方法可以对单细胞中特定基因的表观遗传标记进行检测和定量分析,但成像通量与分辨率均有限。

上述方法主要依赖化学标记或酶促反应对 DNA 表观遗传修饰进行成像分析,无需借助先进的显微技术,有着较好的检测灵敏度。但是此类方法难以精准定位特定基因位点,且基于酶促标记的方

法原理无法应用于 RNA 表观遗传修饰的检测,技术应用推广受限。

在 RNA 表观遗传修饰成像检测方面,Ren 等^[16]提出了基于邻位连接的原位杂交 m^6A 成像 (m^6A -specific in situ hybridization mediated proximity ligation assay, m^6A ISH-PLA) 方法(如图 3 所示)。该方法利用一对邻近探针分别靶向 RNA 序列和 m^6A 修饰位点,通过抗体介导的邻近连接反应结合原位滚环扩增反应生成可检测的荧光纳米簇,实现了对特定基因 m^6A 修饰的成像分析。然而,该方法的成像通量相对较低,一次实验能够检测的样本数

量有限, 难以满足大规模高通量的检测需求。

Mao 等^[17]提出的邻近交换辅助多色编码 (proximity exchange-assisted encoding of multichrome, PREEM) 方法 (如图 4 所示), 利用 “AND” 布尔逻辑识别和多色编码来实现单细胞

RNA 表观遗传修饰的多重、空间分辨成像。虽然 PREEM 方法在一定程度上有效提高了 m^6A RNA 的多重检测能力, 但是在细胞内环境中进行的高度多重检测往往会导致多个扩增子的空间重叠, 影响对紧密定位的 m^6A RNA 的区分。

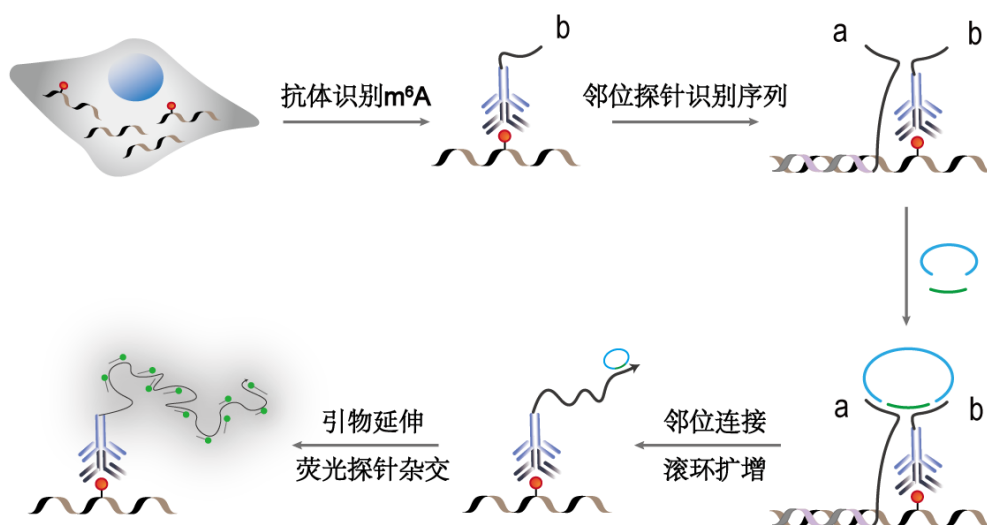


图 3 基于邻近连接的原位杂交 m^6A 成像 ($m^6AISH-PLA$) 方法原理

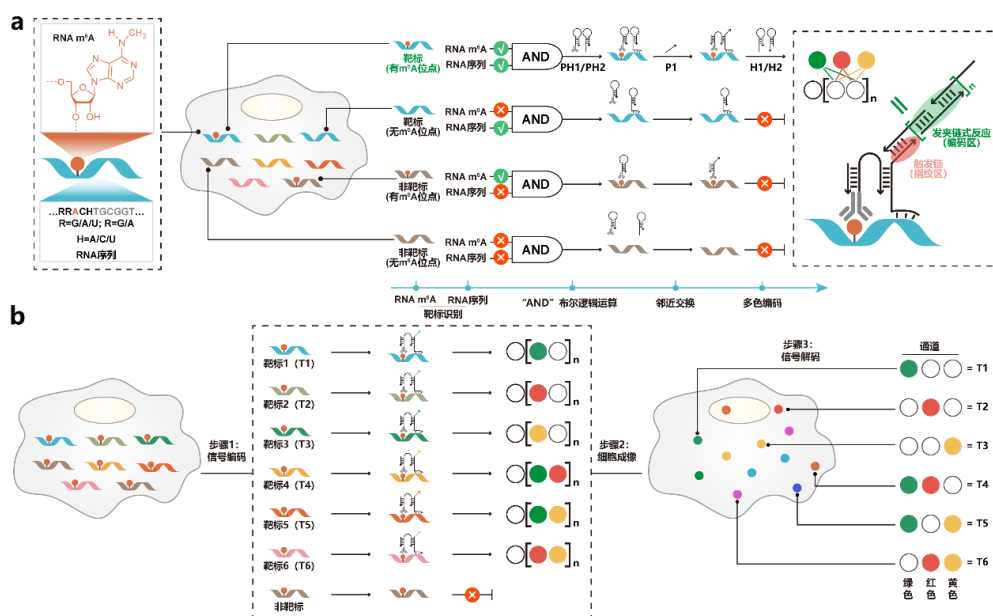


图 4 邻近交换辅助多色编码 (PREEM) 方法原理

Fan 等^[18]提出的分子差异化编码显微镜 (molecule differentiation encoding microscopy, MDEM) 结合正交串联重复 DNA 标识符 (orthogonal tandem repeat DNA identifiers, OTRDI) 方法, 通过

差异化 DNA 标记与随机多重反应实现了纳米尺度下密集生物分子的数字化定量成像。

上述方法主要通过抗体和探针的双重识别, 在 RNA 表观遗传修饰检测中实现了高特异性定位 (如

m⁶A 等), 可在常规荧光显微系统下准确解析特定 RNA 分子在细胞内的空间分布特征, 且具备较高检测灵敏度。然而, 受标记效率的限制, 检测通量仍有待提升, 且难以同步整合多种表观遗传信息与染色质可及性等分子特征。

为探测含有多种染色质修饰的纳米环境, Chen 等^[19]提出了细胞大分子锚定 DNA 步行索引(cellular macromolecules-tethered DNA walking indexing, Cell-TALKING)方法。该方法通过标记 DNA 修饰位点和组蛋白 PTM 位点, 实现了对多种染色质修饰组合模式及其亚核分布的分析, 克服了当前 DNA 邻近连接分析技术只能记录单个探针组合的局限性, 在临

床标本检测中展现出应用潜力。

为了在复杂组织中对单细胞进行空间分辨的表观基因组分析, Lu 等^[20]介绍了表观基因组高通量多发性荧光原位杂交 (multiplexed error robust fluorescence in situ hybridization, MERFISH) 方法(如图 5 所示)。其特点是通过酶促 DNA 标记、RNA 扩增与多轮荧光探针杂交和解离, 将传统表观遗传检测的测序步骤转化为原位成像, 保留组织空间背景的同时, 实现了数百个基因组位点的亚核分辨率染色质修饰定位。然而, 该技术是一种靶向方法, 需要事先了解或假设来选择表观基因组位点, 无法像测序方法那样进行无靶向的全基因组检测。

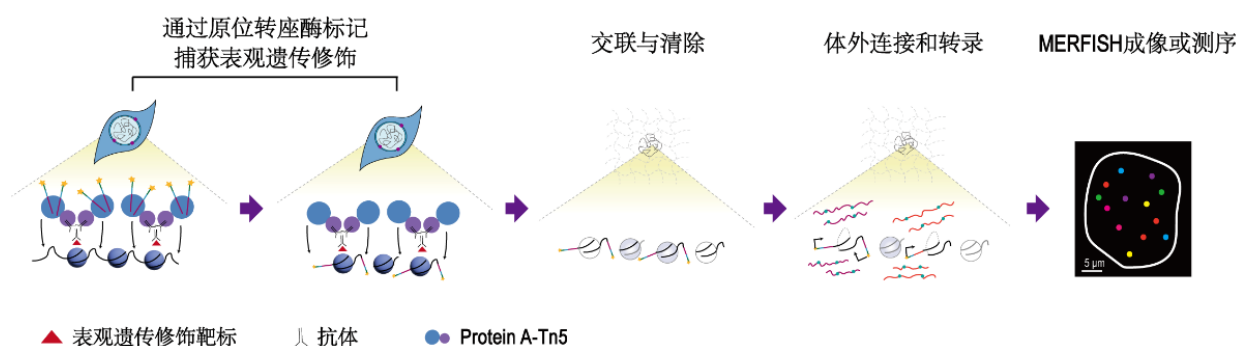


图 5 高通量多发性荧光原位杂交 (MERFISH) 方法原理

基于核酸扩增方法的单细胞表观遗传成像技术通过 DNA 条形码循环迭代突破了荧光光谱限制。结合 DNA 条形码的可编程性与可扩增特性, 此类方法将单细胞内染色质修饰、RNA 甲基化及蛋白质等生物分子的成像通量提升至数十至上百种, 实现了单分子或单位点分辨率的可视化。然而, 该类技术受限于固定细胞样本, 无法实时追踪活细胞内生物分子的动态行为。且这些方法的实现依赖抗体特异性及复杂的探针设计, 在多标记同步检测时存在潜在交叉干扰风险。

3 基因编码的单细胞表观遗传成像

活细胞中表观遗传修饰的动态监测是解析细胞命运决定机制的核心挑战, 其难点在于精准捕获时空维度上快速且低丰度的表观遗传波动。传统单细胞表观遗传成像技术多依赖固定细胞或染色质片段化处理, 难以捕捉生理状态下修饰位点的时空动态特性。近年来, 基因编码的荧光成像系统的开发为实时追踪表观遗传事件提供了可能。

在 RNA 甲基化成像方面, Zhang 等^[21]开发了活

细胞 RNA 甲基化传感器系统(如图 6 所示), 当传感器中的 RNA m⁶A 阅读器与 RNA m⁶A 结合时, 此传感器会因结合亲和力而滞留在细胞质中, 否则, 传感器会因核定位信号(NLS)而转移至细胞核。该传感器通过细胞质与细胞核荧光信号比值来指示 m⁶A 的动态水平, 实现活细胞内 RNA m⁶A 的动态、单细胞分辨率的监测。然而, 该传感器的构建依赖基因工程技术, 操作相对复杂, 且只能反映整体的 RNA m⁶A 水平变化, 无法精确到特定 RNA 分子。

Muñoz-López 等^[22]开发了基于 TALEs 的荧光标记可编程受体, 利用其模块化重复单元对碱基的选择性识别能力, 成功实现了对人 SATIII DNA 5mC 的核苷酸分辨率成像分析。该技术具有核苷酸分辨率, 可在不依赖整体靶标可及性差异的情况下分析 5mC, 但在临床样本应用中可能存在样本出来、信号干扰等问题。

在染色质修饰的动态变化监测方面, Stepanov 等^[23]开发了一种基因编码的荧光探针 MPP8-Green, 用于检测 H3K9me3 组蛋白修饰, 实现了活细胞内染

色质状态的动态成像。该方法所需样本量小, 实验成本相对较低, 但由于探针设计复杂, 目前只能检测一种组蛋白修饰, 无法同时获取多种修饰的信息。

Feng 等^[24]开发了 EpiGo (epigenetic perturbation induced genome organization) -KRAB 系统, 该系统通过 CRISPR 技术将 dCas9-KRAB 与荧光标记的

gRNA 结合, 能够在活细胞中同时实现对特定基因组区域的表观遗传扰动和成像, 实时观察 H3K9me3 修饰对基因组组织和转录的影响。不过, 该方法实验操作较为复杂, 对实验人员的技术水平要求较高, 且 CRISPR 技术的应用可能存在脱靶效应, 影响实验结果的准确性和可靠性。

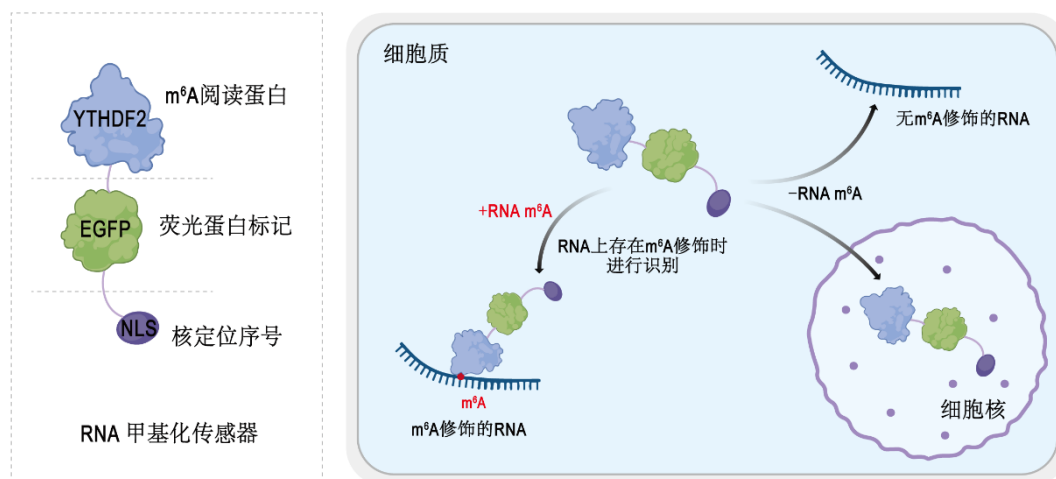


图6 活细胞 RNA 甲基化传感器系统

基因编码的单细胞成像技术凭借其高时空分辨率与活细胞兼容性, 在表观遗传动态过程研究中展现有着独特的优势和广阔的应用前景, 尤其适用于染色质修饰、DNA 互作等生理事件的实时追踪。然而, 该技术依赖靶标蛋白的基因工程改造, 操作流程复杂且可能干扰天然分子功能; 另一方面, 基于基因编辑的标记策略难以直接应用于临床肿瘤样本的原位表观遗传分析, 导致其在疾病诊断场景中的实用性受限。

4 总结与展望

单细胞表观遗传成像技术作为解析表观遗传异质性与动态调控网络的核心手段, 已发展为构建亚细胞分辨率表观遗传修饰图谱的关键研究范式。当前技术体系涵盖抗体介导的超分辨成像、核酸扩增驱动的原位标记及基因编码的荧光蛋白传感器三大类方法, 能够从空间分布、修饰丰度及动态互作等多维度解析 DNA 甲基化、RNA 甲基化、组蛋白翻译后修饰及染色质拓扑结构等表观遗传信息。伴随显微成像技术的革新, 该领域正突破光学衍射极限。越来越多的方法将基于抗体的 DNA 条形码与 RCA、HCR 等信号放大策略结合起来, 成功实现了单分子

水平的高特异性检测。此外, 基因编码的荧光蛋白传感器的引入显著改善了活细胞兼容性, 可同步追踪数十种表观标记的动态重编程过程。

单细胞表观遗传成像技术的未来突破将围绕三个核心方向展开: 开发非基因编码的活细胞原位标记策略, 以提升临床样本的兼容性; 构建多组学整合成像平台, 通过空间转录组与表观修饰的共定位解析基因调控网络, 揭示疾病分子机制; 同时结合深度学习算法实现自动化图像分析, 精准量化表观异质性特征。此外, 新型信号放大技术与跨尺度成像方法的协同应用, 将进一步增强单分子检测精度, 支撑多维数据的高效整合, 最终推动该技术向临床诊断与个体化治疗的转化。

参考文献

- [1] Nowell P C. The clonal evolution of tumor cell populations [J]. Science, 1976, 194(4260): 23-8.
- [2] Turajlic S, Sottoriva A, Graham T, et al. Resolving genetic heterogeneity in cancer [J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(7): 404-16.
- [3] Waddington C H. The epigenotype. 1942 [J]. Int J Epidemiol,

- 2012, 41(1): 10-3.
- [4] Lister R, Pelizzola M, Dowen R H, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences [J]. *Nature*, 2009, 462(7271): 315-22.
- [5] Buenrostro J D, Giresi P G, Zaba L C, et al. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(12): 1213-8.
- [6] Johnson D S, Mortazavi A, Myers R M, et al. Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions [J]. *Science*, 2007, 316(5830): 1497-502.
- [7] Fuhrmann M, Gockel N, Arizono M, et al. Super-Resolution Microscopy Opens New Doors to Life at the Nanoscale [J]. *J Neurosci*, 2022, 42(45): 8488-97.
- [8] Franek M, Kilar A, Fojtík P, et al. Super-resolution microscopy of chromatin fibers and quantitative DNA methylation analysis of DNA fiber preparations [J]. *J Cell Sci*, 2021, 134(15).
- [9] Xu J, Ma H, Jin J, et al. Super-Resolution Imaging of Higher-Order Chromatin Structures at Different Epigenomic States in Single Mammalian Cells [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(4): 873-82.
- [10] Xie L, Dong P, Chen X, et al. 3D ATAC-PALM: super-resolution imaging of the accessible genome [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(4): 430-6.
- [11] Farhy C, Hariharan S, Ylanko J, et al. Improving drug discovery using image-based multiparametric analysis of the epigenetic landscape [J]. *Elife*, 2019, 8.
- [12] Alvarez-Kuglen M, Ninomiya K, Qin H, et al. ImAge quantitates aging and rejuvenation [J]. *Nat Aging*, 2024, 4(9): 1308-27.
- [13] Chen F, Li X, Bai M, et al. Visualizing epigenetic modifications and their spatial proximities in single cells using three DNA-encoded amplifying FISH imaging strategies: BEA-FISH, PPDA-FISH and Cell-TALKING [J]. *Nat Protoc*, 2025, 20(1): 220-47.
- [14] Xue J, Chen F, Su L, et al. Pairwise Proximity-Differentiated Visualization of Single-Cell DNA Epigenetic Marks [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(7): 3428-32.
- [15] Kint S, Van Criekinge W, Vandekerckhove L, et al. Single cell epigenetic visualization assay [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(8): e43.
- [16] Ren X, Deng R, Zhang K, et al. Single-Cell Imaging of m(6) A Modified RNA Using m(6) A-Specific In Situ Hybridization Mediated Proximity Ligation Assay (m(6) AISH-PLA) [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(42): 22646-51.
- [17] Mao D, Tang X, Zhang R, et al. Multichrome encoding-based multiplexed, spatially resolved imaging reveals single-cell RNA epigenetic modifications heterogeneity [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 958.
- [18] Fan S, Li X, Liu H, et al. Molecule Differentiation Encoding Microscopy to Dissect Dense Biomolecules in Cellular Nanoenvironments Below Spatial Resolution [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2025: e202425136.
- [19] Chen F, Bai M, Cao X, et al. Cellular macromolecules-tethered DNA walking indexing to explore nanoenvironments of chromatin modifications [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1965.
- [20] Lu T, Ang C E, Zhuang X. Spatially resolved epigenomic profiling of single cells in complex tissues [J]. *Cell*, 2022, 185(23): 4448-64.e17.
- [21] Zhang T, Yang H, Yu Q, et al. Dynamic, Single-cell Monitoring of RNA Modifications Response to Viral Infection Using a Genetically Encoded Live-cell RNA Methylation Sensor [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2025, 64(9): e202418003.
- [22] Muñoz-López Á, Buchmüller B, Wolffgramm J, et al. Designer Receptors for Nucleotide-Resolution Analysis of Genomic 5-Methylcytosine by Cellular Imaging [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(23): 8927-31.
- [23] Stepanov A I, Shuvaeva A A, Putlyaeva L V, et al. Tracking induced pluripotent stem cell differentiation with a fluorescent genetically encoded epigenetic probe [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 381.
- [24] Feng Y, Wang Y, Wang X, et al. Simultaneous epigenetic perturbation and genome imaging reveal distinct roles of H3K9me3 in chromatin architecture and transcription [J]. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 296.

版权声明: ©2025 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS