

谢晓露,陈秀,寇利秋,等. AD 动物模型及其相关指标评价方法研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 145-154.
Xie XL, Chen X, Kou LQ, et al. Research progress on animal models and evaluation methods of Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 145-154.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.08.020

AD 动物模型及其相关指标评价方法研究进展

谢晓露^{1,2}, 陈 秀^{1,2}, 寇利秋^{1,2}, 李亚玲^{1*}

(1.西南医科大学附属医院药学部,四川 泸州 646000;2.西南医科大学药学院,四川 泸州 646000)

【摘要】 阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是临床常见中枢神经系统退行性病变,其病因不明、病机不清,并对患者家庭和社会造成了巨大负担。成功建立一个符合人类疾病发生、发展进程的动物模型用于 AD 研究,对探索疾病发生机制、开发疾病相关治疗药物或其他干预措施尤为重要。因此,本文对国内外 AD 动物模型构建的技术方法、作用原理、当前应用进行了综述,总结了其相关指标的评价方法,分析了转基因 AD 动物模型与非转基因 AD 动物模型的优缺点,概述了认知行为学方法、免疫学方法与影像学方法的应用前景及特点,以期有关领域的研究者选择合适的动物模型提供参考,为构建新型动物模型和发展新的模型指标评价方法提供新思路。

【关键词】 AD 动物模型;指标评价方法;A β ;tau;认知和记忆障碍

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 08-0145-10

Research progress on animal models and evaluation methods of Alzheimer's disease

XIE Xiaolu^{1,2}, CHEN Xiu^{1,2}, KOU Liqiu^{1,2}, LI Yaling^{1*}

(1. Department of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

2. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000)

【Abstract】 Alzheimer's disease (AD) is a common degenerative disease of the central nervous system with unknown etiology and pathogenesis that has a large negative effect on the lives of patients and their families. The successful establishment of an animal model of AD in line with the occurrence and progression of human disease is particularly important for the exploration of the pathogenesis of the disease and the development of therapeutic drugs or other interventions. Therefore, to provide a reference for researchers in related fields to select appropriate animal models and to contribute ideas for the construction of new animal models and the development of new model index evaluation method, we reviewed the technical method, functional principles, and current applications of animal models of AD globally, summarized the evaluation method of relevant indicators, analyzed the advantages and disadvantages of transgenic and non-transgenic models of AD, and generalized the application prospects and characteristics of cognitive behavioral method, immunological method and imaging method.

【Keywords】 AD animal models; evaluation methods; A β ; tau; cognitive and memory impairment

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性记忆力下降、认知功能障碍、行为异常和人

格失常等为主要临床表现的神经退行性疾病^[1]。AD 的典型病理改变包括神经元丢失、 β -淀粉样蛋白

[作者简介] 谢晓露(1998—),男,硕士研究生,研究方向:临床药学及药理学。E-mail: xiaolu_x619@163.com

[通信作者] 李亚玲(1979—),女,主任药师,硕士,硕士生导师,研究方向:临床药学及药理学。E-mail: lylapothecary@swmu.edu.cn

(amyloid β , A β) 沉淀形成的老年斑 (senile plaque, SP) 及 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 等^[2]。全世界约 3000 多万人患有 AD, 到 2050 年预计其患病人数将达 1.15 亿^[3]。据美国阿尔兹海默协会统计, AD 已成为美国第六大致死原因, 其导致的死亡人数从 2000 到 2019 年间增加了 145% 以上, 在 2021 年造成的经济损失高达 3550 亿美元^[4], 给患者及其家属带来巨大的经济负担和身心压力。到目前为止, 临床上还没有任何一种有效的方法能治愈或有效的预防和缓解此病的发生发展, 主要是因为 AD 病因多样、病机复杂。因此, 阐明 AD 发病机制、探索治疗 AD 药物是脑科学研究的重要课题。在医学研究中, 根据疾病构建动物模型对疾病发生机制、治疗评价、前沿研究有着极为重要的意义, 故而寻求一种合适的动物模型来模拟 AD 患者的病理特征和临床表现及选择恰当的方法来评估模型相关指标就十分重要。本文通过总结目前国内外常见 AD 动物模型及其相关指标的评价方法, 以期对相关课题的研究选择合适的动物模型和评价方法做参考, 并为构建新型动物模型和发展新的模型指标评价方法提供新思路。

1 国内外常见 AD 动物模型的构建

目前, 国内外常见 AD 动物模型分为转基因 AD 动物模型和非转基因 AD 动物模型。转基因 AD 动物模型是通过重组 DNA 技术, 将一个或多个外源性突变基因整合到动物的基因组中, 从而表达 AD 的某些特征。常引入的突变基因包括淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 基因、早老蛋白 (presenilin, PS) 基因和 tau 蛋白基因等。非转基因 AD 动物模型主要通过注射 A β 或 tau 蛋白、化学物质损伤胆碱能神经或致神经炎症、金属灌胃、老化、破坏肠道菌群平衡和物理手段制作而成。

1.1 转基因 AD 动物模型

根据模型所表达的 AD 主要病理特征和使用动物, 目前转基因动物模型分为 APP 与 PS 转基因小鼠、tau 转基因小鼠、APP/PS/tau 转基因小鼠、特殊转基因小鼠、基因敲入小鼠和转基因大鼠。

1.1.1 APP 与 PS 转基因小鼠

APP 为一种 I 型跨膜蛋白, 由 21 号常染色体上的 APP 基因编码, 该基因上有 25 个与 AD 相关突变, 常用的包括印第安纳突变 (V717F)、瑞典突变 (K670N/M671L) 和伦敦突变 (V717I)。PS 基因分

为 14 号常染色体上的 PS1 和 1 号常染色体上的 PS2, 目前对 PS1 的研究居多。这可能是因为 PS1 在脑内的表达量更高, 表达 PS1 的小鼠发病年龄更早且疾病进展更为快速^[5]。虽然 PS 单转基因小鼠能形成 AD 相关的神经元和突触丧失及血管病变, 但不能形成淀粉样斑块, 而将 PS 突变基因引入 APP 转基因模型后, A β 和斑块显著表达。

根据模型所携带的突变基因种类和数量, APP 与 PS 转基因小鼠可分为 APP 单转基因小鼠、APP 双转基因小鼠与 APP/PS 转基因小鼠。这些模型以 A β 斑块与认知和记忆功能障碍为主要特征, 但因模型所携带的突变基因和启动子不同, 在形成时间和部位上有所差异, 具体见表 1。APP 单转基因小鼠至今已使用二十多年, 特性明确, 在繁殖与管理上更加简便, 但出现 AD 特征的时间较晚。APP 双转基因小鼠与 APP/PS 转基因小鼠虽然大多能相对较早地表现 AD 特征, 但由于这些小鼠多为两种携带单个或两个突变基因小鼠杂交而来, 遗传背景的改变可能会对实验结果产生影响。

1.1.2 tau 转基因小鼠

tau 转基因小鼠通过表达 tau 蛋白突变基因 P301L 和 P301S, 出现过表达的 tau 蛋白、NFTs、脑萎缩和行为障碍等, 主要用于 tau 蛋白和治疗药物的相关研究。此类模型主要形成与额颞叶痴呆和帕金森病相关的 tau 蛋白病理, 因此突变基因产生的 tau 蛋白在毒性和初始形成部位上与 AD 患者有差异, 并且在小鼠上观察到未在 AD 患者中出现的明显的 tau 蛋白相关行为障碍^[12]。

1.1.3 APP/PS/tau 转基因小鼠

为了更全面地模拟 AD 特征, 通过杂交或转入 APP/PS/tau 突变基因, 研发出了能产生淀粉样斑块和 NFTs 的小鼠。这些小鼠与表达单一突变基因的小鼠相比, 无论是在淀粉样斑块或 NFTs 的产生时间、面积或是数量上都占有一定优势。但是淀粉样斑块的产生通常明显先于 NFTs。本类模型中, 3XTg 小鼠使用较为广泛, 其携带 PS1^{M146V}、APP^{Swe} 和 tau^{P301L} 突变基因, 在 6 月龄便出现淀粉样沉积、神经炎症变、记忆和认知障碍, 12 月龄形成 NFTs^[13]。近来将 5XFAD 小鼠与 tau^{P301L} 小鼠杂交得到的 6XTg 小鼠较 5XFAD 小鼠具有明显优势, 在 2 月龄时出现更加显著的淀粉样斑块, 4 月龄时在皮质与海马体中的形成 NFTs, 认知和记忆缺陷也更早出现^[14], 但还需要更多的实验证据支持和完善。

表 1 常用 APP 与 PS 转基因小鼠
Table 1 Commonly used APP and PS transgenic mice

模型 Model	突变基因 Mutation	启动子 Promotor	斑块 Plaque	认知记忆损伤 Cognitive and memory impairment	其他特征 Other features	应用 Application	
APP 单转 基因小鼠 APP single transgenic mice	PDAPP ^[6]	APP ^{V717F}	PDGF	8 月龄;额叶皮层、 海马 CA1 区 8 months: frontal cortex, hippocampal CA1 region	MWM:6~8 月龄 MWM: 6~8 months	营养不良的神经元突起,斑 块周围大量的胶质细胞,空 泡化细胞 Dystrophic neuronal protuberants, large numbers of glial cells around plaques, vacuolated cells	神经退行性变和斑 块形成机制的研究 Mechanisms of neurodegeneration and plaque formation
	Tg2576 ^[7]	APP ^{K670N/M671L}	PrP	7~8 月龄:皮质; 11 月龄:额颞叶、 内嗅皮质、海马 7 ~ 8 months: cortex; 11 months: frontotemporal lobe, entorhinal cortex, hippocampus	MWM:5~6 月龄 MWM: 5~6 months	海马神经元活动改变,步态 异常,可溶性 Aβ 寡聚体 Altered hippocampal neuronal activity, abnormal gait, and soluble Aβ oligomer	早期 AD 研究 Early AD research
	TgCRND8 ^[8]	APP ^{K670N/M671L} APP ^{V717F}	PrP	3 月龄;皮质、海马 3 months: cortex, hippocampus	MWM:3 月龄 MWM: 3 months	致密斑、神经炎性病变 Dense plaques, neuroinflammatory lesions	AD 短期研究 Short-term AD study
APP 双转 基因小鼠 APP double transgenic mice	J20 ^[9]	APP ^{K670N/M671L} APP ^{V717F}	PDGF	5~7 月龄;深层大 脑皮层 10 月龄: 海马 5~7 months: deep cerebral cortex 10 months: hippocampus	MWM:3~4 月龄 MWM: 3~4 months	神经炎性改变, Aβ 寡聚 体,CAA Neuroinflammatory changes, Aβ oligomer, CAA	AD 相关的 Aβ 沉 积、血管样变与神 经炎性变的研究 Study on Aβ deposition, vasculoid and neuroinflammatory changes associated with AD
APP/PS 转 基因小鼠 APP/PS transgenic mice	APP/ PS2 ^[10]	APP ^{K670N/M671L} PS2 ^{N141I}	Tg2576 小鼠; 朊病毒; PS2 ^{N141I} 小鼠;CAG Tg2576 mouse: prions; PS2 ^{N141I} mouse CAG	2~3 月龄;海马、 大脑皮层 2 ~ 3 months: hippocampus and cerebral cortex	MWM:4~5 月龄 Y 型迷宫;4 月龄 MWM: 4~5 months Y maze: 4 months	大量纤丝状和不溶性的 Aβ、 星形胶质细胞和小胶质细胞 Abundant filamentous and insoluble Aβ, astrocytes, and microglia	淀粉样蛋白降低疗 法的研究 Study about myloid protein reduction
	5XFAD ^[11]	APP ^{K670N/M671L} APP ^{I716V} APP ^{V717I} PS1 ^{M146L} PS1 ^{L286V}	Thy-1	2 月龄;皮质,随年 龄逐渐累积到海 马等其他脑区 2 months old; cortex, gradually accumulated with age to other brain areas such as hippocampus	Y 型迷宫:4~5 月龄 Y maze: 4~5 months	神经元丢失、突触改变、神经 炎性变 Neuronal loss, synaptic changes, neuroinflammatory changes	神经元内 Aβ ₄₂ 诱 导的神经变性和淀 粉样斑块形成相关 研究 Aβ ₄₂ induced neurodegeneration and amyloid plaque formation in neurons

注:PDGF:血小板衍生生长因子;CAG:巨细胞病毒早期增强子与鸡 β -肌动蛋白启动子结合体;PrP:朊病毒蛋白;MWM:莫里斯水迷宫;CAA:血管淀粉样蛋白病;Thy-1:胸腺细胞分化抗原 1。

Note. PDGF, Platelet-derived growth factor. CAG, Cytomegalovirus early enhancer coupled with chicken β -actin promoter. PrP, Prion protein. MWM, Morris water maze. CAA, Cerebral Amyloid Angiopathy. Thy-1, Thymocyte differentiation antigen 1.

1.1.4 特殊转基因小鼠

一些转基因模型能特异性地表达 AD 某种特征,如 Tg-SwDI 小鼠和 A β -GFP 小鼠。Tg-SwDI 小鼠表达 APP^{Swe693Q/D694N} 突变基因,在 3 月龄时出现纤维血管 A β 的大量积累和较不明显的弥漫性实质斑块,可用于 CAA 研究^[15]。A β -GFP 小鼠携带人 A β ₁₋₄₂ 与 GFP 融合蛋白的 DNA 片段,在鸡 β -肌动蛋白启动子的控制下,能在神经细胞内高表达 A β 寡聚体^[16]。

1.1.5 基因敲入小鼠

为了避免上述转基因模型的突变基因过度表达导致产生人为表型和影响疾病相关基因表达的研究,研发出了更为生理化的模型,即基因敲入小鼠。此类模型包括 hA β 基因敲入小鼠、APP 基因敲入小鼠、htau 基因敲入小鼠和 APP/tau 双基因敲入小鼠,具体见表 2,可用于临床前 AD 相关基因分子病理研究与 AD 预防研究。

1.1.6 转基因大鼠

转基因大鼠也能表现出 AD 特征,与小鼠相比,在生理、基因和形态学上更接近人类,具有更加复杂的行为表现,脑部操作更容易^[20]。但因其制作更加困难,有着更高的工艺要求而使用较少。TgF344-AD 大鼠和 McGill-R-Thy1-APP 大鼠较常使用,前者通过表达 APP^{Swe}/PS1 ^{Δ E9} 突变而呈现 AD 完整的病理特征^[21],后者通过表达 APP^{Swe/V717F} 突变出现明显的认知行为障碍^[22]。

1.2 非转基因 AD 动物模型

1.2.1 A β 或 tau 蛋白损伤模型

脑内注射 A β 或 tau 蛋白能快速产生 AD 病理模型,大鼠因体积大、在海马和脑室注射更加方便而最为常用。在单侧或双侧海马注射 A β ,短期内出现显著的记忆力下降、A β 沉积和磷酸化 tau 蛋白^[23],用于研究 SP 所致的记忆障碍和神经炎症病变以及 A β 亚型在 AD 病变过程中的作用。当注射 tau 蛋白时可产生 NFTs 样结构,并会加快 tau^{P301S}、5XFAD 小鼠模型病理特征的形成^[24-25]。这些模型虽能快速形成 AD 病理,但需反复注射达到稳定,很容易因注射不当导致 A β 或 tau 蛋白难以扩散至脑内,使局部浓度过高,造成局部损伤。

1.2.2 化学物质损伤胆碱能神经或致神经炎症模型

该类模型以啮齿类动物造模最为常见,少数研究使用斑马鱼和非人灵长类动物。根据化学物质造模的主要机制分为神经炎症模型和胆碱能神经损伤模型,具体见表 3。这些模型多采用腹腔或脑室注射的方式构建,建模成功与否很大程度上与注射规范程度和化学物质浓度相关。该类模型操作

简单,成模时间较短,但都难以形成 NFTs。

1.2.3 铝损伤模型

铝损伤模型通过 AlCl₃ 灌胃致使小鼠出现学习和记忆功能障碍^[31]。该模型制作简单,经济,但只能表现单一的 AD 特征。通常与其他造模方法结合以加快 AD 病理形成。

1.2.4 老化模型

包括诱导老化模型、快速老化模型与自然衰老模型,具体见表 4。诱导老化模型通过 D-半乳糖诱导大鼠或小鼠产生,具有价格低、操作简单、可重复性高的优点。快速老化模型以 AKR/J 小鼠作为祖先近交繁殖得到,具有实验周期短,学习和记忆障碍的发生较诱导老化模型更加自然等优点,但发病机制复杂,对于单一机制的研究不太适宜。自然老化模型以非人灵长类动物或啮齿类动物自然衰老构建。非人灵长类动物最接近生理化,能表现出 SP,且大多能出现 CAA,与人类迟发型 AD 最为相似。与非人灵长类动物相比,啮齿类动物实验周期更短,相对更加经济且省时省力。

1.2.5 人源性肠道菌群模型

朱华等^[36]将 AD 患者粪便移植到小鼠体内,能表现出与 AD 患者相类似的肠道菌群结构,无 SP,可用于菌群与 AD 关系、相关微生态制剂评价。

1.2.6 物理损伤模型

此类模型通过物理手段造成机体损伤,进而发展出 AD 相关的病理特征。如手术摧毁双侧海马穹窿伞出现学习和记忆功能障碍^[37];长期脑缺血老年小鼠出现明显的脑组织萎缩与认知行为障碍^[38]。但上述模型均无 SP 和 NFTs,且造模成功率较低。

2 AD 动物模型相关指标评价方法

认知与记忆功能障碍、核心生物标志物(A β 和 tau 蛋白)与主要病理特征是否出现是评价动物模型制作成功与否的 3 个关键指标。认知与记忆功能障碍通过对实验动物行为的评价而间接确定,核心生物标志物与主要病理特征通过免疫学或影像学方法确定。

2.1 行为学方法

常用的包括 Morris 水迷宫、Y 型迷宫、Barnes 迷宫、条件恐惧实验(fear conditioning, FC)、新物辨别实验(novel object recognition test)、旷场试验(open field test),具体见表 5。

2.2 免疫学方法

常用的包括免疫组织化学染色、免疫荧光染色、免疫印迹分析(Western blot)与酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。

表 2 基因敲入小鼠
Table 2 Knock-in mice

模型 Model	构建方法 Construction	特点 Characteristic
hAβ 基因敲入小鼠 hAβ knock-in mice	小鼠 Aβ 肽人源化 Humanization of mouse Aβ peptide	Aβ 表达较野生型小鼠增加,但只有引入 PS1 ^{M146V} 突变 Aβ 斑块才形成 ^[17] 。 Compared with wild-type mice, the expression of Aβ is increased, but only with PS1 ^{M146V} mutant, Aβ plaques are formed.
APP 基因敲入小鼠 APP knock-in mice	hAβ 基因敲入小鼠中引入 APP ^{K670N/M671L} 、APP ^{E693G} 或 APP ^{I716F} APP ^{K670N/M671L} 、APP ^{E693G} or APP ^{I716F} are introduced into hAβ knock-in mice	淀粉样斑块和认知行为损伤,无 tau 蛋白和 NFTs 形成 ^[18] 。 Amyloid plaques and cognitive behavior impairment, no formation of tau protein and NFTs
htau 基因敲入小鼠 htau knock-in mice	人类 tau 基因替代小鼠 tau 基因 Human tau gene replaces mouse tau gene	对 tau 蛋白的生理与病理影响很小,无法形成人工表型,可用于创建 FTDP-17 相关模型 ^[19] 。 Physiological and pathological effects on tau protein are small, and artificial phenotypes cannot be formed, which can be used to create FTDP-17 related models
APP/tau 双基因敲入小鼠 APP/tau knock-in mice	hAβ 和 htau 基因敲入小鼠杂交 Hybridization of hAβ knock-in mice with htau knock-in mice	可产生一定 tau 蛋白,仍无磷酸化 tau 蛋白和 NFTs 形成 ^[19] 。 A certain amount of tau protein could be produced, but no phosphorylated tau protein and NFTs

注:小鼠 Aβ 肽人源化:将小鼠 Aβ 肽序列中的与人类不同的 3 个氨基酸改为人类氨基酸。
Note. Humanization of mouse Aβ peptide, Three amino acids in the sequence of mouse Aβ peptide which are different from human are changed into human amino acids.

表 3 化学物质损伤胆碱能神经或致神经炎症模型
Table 3 Chemical substances damage cholinergic nerves or cause neuroinflammatory models

模型 Model	造模物质 Substance	特征 Characteristic	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	应用 Application
神经炎症模型 Neuroinflammatory model	脂多糖 ^[26] Lipopolysaccharide	(1)神经炎症;胶质细胞激活、亚硝酸盐和 TNF-α 水平升高;(2)氧化应激激活;(3)Aβ 沉积(脂多糖缺乏);(4)磷酸化 tau 蛋白;(5)认知和记忆功能障碍			标准 AD 神经炎症模型 Standard neuroinflammatory model
	链脲佐菌素 ^[27] Streptozotocin	(1) Neuroinflammation; glial cell activation, increased nitrite and TNF-α levels. (2) Oxidative stress activation; (3) Aβ deposition (lipopolysaccharide deficiency); (4) Phosphorylation of tau protein; (5) Cognitive and memory dysfunction	(1)操作简单;(2)成模时间较短(一般约 1~3 月,因给药浓度、给药部位、给药次数而异)	(1)经脑室注射给药者,操作不当易致脑组织局部损伤;(2)缺乏 NFTs (1) Intraventricular injection is easy to cause local injury of brain tissue; (2) Lack of NFTs	葡萄糖参与 AD 发病相关研究、抗炎药对不同阶段迟发型 AD 的作用 Studies on the involvement of glucose in the pathogenesis of AD and the effect of anti-inflammatory drugs on delayed AD at different stages
	秋水仙碱 ^[28] Colchicine		(1)操作简便;(2)成模时间较短(一般约 1~3 个月,因给药浓度、给药部位、给药次数而异)		氧化应激、非认知功能障碍(如焦虑)相关研究 Study on oxidative stress, non-cognitive dysfunction (e. g., anxiety)
胆碱能神经损伤模型 Cholinergic nerve injury model	192-IgG-saporin ^[29]	胆碱能神经缺失,认知和记忆功能障碍 Cholinergic nerve loss, cognitive and memory dysfunction		AD 特征较单一,难以形成 Aβ 沉积和 NFTs Single characteristic, difficult to form Aβ deposition and NFTs	基底前脑胆碱能神经元特异性损伤相关研究 Study on specific injury of cholinergic neurons in basal forebrain
	东莨菪碱 ^[30] Scopolamine	Ach 水平降低,认知与记忆功能障碍 Decreased Ach level, cognitive and memory dysfunction			抗老年痴呆药物研究 Research on anti-alzheimer's drugs

表 4 老化模型
Table 4 Aging models

模型 Model	建模方法 Construction	实验动物 Animal	AD 特征 Characteristic	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	应用 Application
诱导老化模型 ^[32] Induced aging model	D-半乳糖皮下注射,腹腔注射或灌胃 D-galactose is injected subcutaneously, intraperitoneally or by gavage	小鼠,大鼠 Mice, rats	氧化应激水平升高,剂量依赖性的认知行为障碍,部分免疫指标下降 Increased levels of oxidative stress, dose-dependent cognitive and behavioral disorders, and decreased immune indices	价格低,操作简单,可重复性高,与自然衰老相似 Low price, simple operation, high repeatability, similar to natural aging	行为、免疫学指标上与自然衰老有差异;无 SP 和 NFTs 形成 Behavior and immunological indexes are different from those of natural aging. No SP and NFTs are formed	行为学抗衰老药物药效的研究 Behavioral studies of the efficacy of anti-aging drugs
快速老化模型 ^[33] Senescence accelerated model	AKR/J 小鼠作为祖先近交繁殖得到 SAMP8 AKR/J mice were inbred as ancestors to obtain SAMP8	小鼠 Mice	学习和记忆功能障碍、A β 沉积,磷酸化 tau 蛋白,较高的氧化应激水平 Learning and memory dysfunction, A β deposition, phosphorylated tau protein, higher oxidative stress levels	寿命短,实验周期短,节省人力物力,学习和记忆障碍的发生较诱导老化模型更加自然 Short life and experimental time, save resources, the occurrence of learning and memory impairment induced aging model more natural	发病机制复杂,对于单一机制的研究不太适宜 This model's pathogenesis is complex, so it is not suitable to study a single mechanism	衰老相关的学习记忆功能障碍发病机制与治疗药物的研究 Study on pathogenesis and therapeutic drugs of age-related learning and memory dysfunction
		非人灵长类动物 ^[34] Nonhuman primate	SP, 认知行为障碍,大多数能出现 CAA SP, cognitive and behavior disorder, mostly CAA	最为生理化,与人类迟发型 AD 最为相似 Most physiological and similar to late-onset AD on human	实验动物寿命长,昂贵耗时,饲养困难,无 NFTs 形成 Long lifespan, expensive, time-consuming, difficult to feed, and no NFTs formation	
自然老化模型 Natural aging model	自然衰老 Natural aging	啮齿类动物 ^[35] Rodents	氧化应激与免疫指标降低,学习与记忆功能障碍 Oxidative stress and immune indicators decreased, learning and memory dysfunction	与非人灵长类动物相比,实验周期更短,相对更加经济且省时省力 Compared with non-human primates, the experiment period is shorter, relatively economical and time saving	与非人灵长类动物相比,与人类同源性更低,大脑结构与人类差异较大,认知功能、决策能力等更加低下,在表现 AD 特征上相对不足 Compared with non-human primates, rodents have lower homology with humans, and their brain structure is quite different from that of humans, with lower cognitive function and decision-making ability, and without adequate characteristics of AD	衰老相关机制与药物研究 Aging mechanism and drug research

注:SAMP;快速老化小鼠
Note. SAMP, Senescence accelerated mouse prone.

表 5 六种行为学评价方法
Table 5 Six behavioral evaluation methods

简介 Introduction	Morris 水迷宫 ^[39] Morris water maze	Y 型迷宫 ^[40] Y maze	Barnes 迷宫 ^[41] Barnes maze	条件恐惧实验 ^[42] Fear conditioning	新物辨别实验 ^[43] Novel object recognition test	旷场试验 Open field test
实验装置 Device	圆形水池及一水下平台 Circular pool with an underwater platform	三等分辐射式迷路段 Trisector radial labyrinth box	一个边缘有大小一致若干孔洞的平台 A platform with holes of uniform size at the edges	底部装有电栅的玻璃实验箱 A glass experimental chamber with an electric grid at the bottom	立方体箱子及 3 个用于识别的物体 Cube box and three objects for identification	立方体箱子 A cubic box
评价指标 Evaluation criteria	潜伏期、游泳轨迹、游泳路径长度、游泳速度及穿越原平台次数 Incubation period, swimming track, path length, swimming speed, and number of platform crossings	达标所需的训练次数与天数、错误反应次数、全天总反应时间 Number and days of training required to reach the standard, the number of wrong reactions, the total reaction time	找到目标箱的时间、错误次数、走过的总距离 Time to find the target box, number of errors, total distance	静止状态的时间 Time at rest	对两个物体探索时间的差异 Difference in the exploration time between the two objects	行走总路程 Total distance
优点 Advantage	(1) 数据全面, 评价客观, 检测灵敏。(2) 不受电击, 自身排泄物, 气味等干扰。(3) 比较适用于转基因动物 (1) Comprehensive data, objective evaluation and sensitive detection. (2) Not to be disturbed by electric shock, own excrement, smell (3) More suitable for transgenic animals	(1) 廉价。(2) 不受气候变化的影响。(3) 数据处理与操作较为简单 (1) Cheap. (2) Unaffected by climate change. (3) Data processing and operation are relatively simple	(1) 不需电和水刺激。(2) 对体力要求低。(3) 再现陆地啮齿类动物的生存环境, 避免游泳对实验动物空间学习与记忆的潜在影响 (1) No electrical and water stimulation. (2) Low physical demands. (3) Reproduce the living environment of terrestrial rodents to avoid the potential effects of swimming on spatial learning and memory	(1) 不费时费力。(2) 对于小样本的转基因 AD 小鼠的认知与记忆功能障碍的组间差异灵敏性比 Morris 水迷宫和 Barnes 迷宫高 (1) Spend less time and effort. (2) For a small sample of transgenic AD mice with cognitive and memory dysfunction, the sensitivity of inter-group differences was higher than that of Morris water maze and Barnes maze	(1) 操作和数据处理简单。(2) 无外在刺激作为行动动机, 完全依赖实验动物天生的探索行为, 对实验动物压力小。(3) 实验周期短 (1) Easy operation and data processing. (2) Action motivation isn't from external stimulus, but the innate exploration behavior with little pressure on animals. (3) Short experiment period	原理、操作与数据处理简单, 廉价, 实验效果较好 Simple principle, operation and data processing are, cheap, better outcomes
缺点 Disadvantage	(1) 对实验者数据处理与分析能力要求较高。(2) 实验条件要求较高。(3) 对实验动物的要求较高: 要求实验动物体力较好, 故年老难以完成实验; 近交系 BALB/c 小鼠和 129/SvJ 小鼠不会游泳, 不能用于该实验 (1) Higher requirements for data processing and analysis. (2) High requirements for experimental conditions. (3) High requirements for experimental animals: good physical strength for animals, so it is difficult for the elderly to complete the experiment; Inbred BALB/C mice and 129/SvJ mice cannot swim and cannot be used in the test	(1) 手动操作, 费时费力, 计算错误反应次数和总反应时间会受主观判断影响。(2) 训练次数多, 容易损坏仪器。(3) 实验动物受电刺激容易排泄, 导致底部电栅短路, 其气味也会对后续被试产生影响。(4) 个体差异大, 排除了对电刺激不敏感的实验动物 (1) Manual operation, time-consuming and laborious, and the calculation of wrong reaction times and total reaction time will be affected by subjective judgment. (2) Easy to damage to the instrument. (3) Experimental animals are prone to excretion due to electrical stimulation, resulting in short circuit of the bottom grid, and their odor will also affect subsequent subjects. (4) Large individual differences, experimental animals insensitive to electrical stimulation were excluded	(1) 受实验者主观判断影响(2) 情感行为为异常的实验动物会影响真实的空间学习与记忆能力; 高焦虑水平会使其被吓住不动, 低焦虑水平会使其探索迷宫, 而不是寻找暗箱。(3) 对于转基因动物模型不太适用(与 Morris 水迷宫相比) (1) Subjectively affected by experimenters. (2) Animals with abnormal emotional behavior can affect the spatial learning and memory: high anxiety level can make them freeze and low anxiety level can make them explore mazes instead of looking for boxes. (3) Not applicable to transgenic animal models (compared to the Morris water maze)	(1) 评价指标较为单一。 (2) 有些实验动物对电刺激不敏感, 实验结果受个体差异影响 (1) Evaluation index is single. (2) Some animals are not sensitive to electrical stimulation, results are affected by individual differences	(1) 实验动物的探索行为受实验装置影响。(2) 使用的物体间差异若不显著, 对实验效果的评估影响较大 (1) Animals' exploration behavior is affected by experimental devices. (2) If the difference between the objects used is not significant, it has a great influence on the evaluation of the experimental effect	(1) 评估指标单一。(2) 主要用于评估行为与活动能力和焦虑情况 (1) Single evaluation index. (2) Mainly used to evaluate behavior and activity ability and anxiety
应用 Application	评价空间学习与记忆 Evaluation of spatial learning and memory	评价空间学习与记忆 Evaluation of spatial learning and memory	评价空间参考记忆、工作记忆 Evaluation of spatial reference memory and working memory	评价条件恐惧记忆 Evaluation of conditional fear memory	评价工作记忆、注意力 Evaluation of working memory and attention	评价行为活动能力与焦虑状态 Evaluation of behavioral activity ability and anxiety state

免疫组织化学染色与免疫荧光染色主要操作步骤基本一致,经过组织切片的制备、抗原修复、双抗孵育、显色剂染色或抗荧光衰减剂封片,最后使用光学显微镜或荧光显微镜进行观察,记录目标抗原的分布与数量。这两种方法常用于肿瘤的病理组织观察分析。在 AD 动物模型应用上,常使用单克隆抗体(如 2G3、21F12、3D6、8E5、BS42、AT8 等)、抗氧化应激抗体、大鼠抗小鼠 CD45 抗体与牛抗小鼠 GFAP 抗体等用于 APP、A β 肽及其各种多聚体、SP、氧化应激、tau 蛋白及磷酸化 tau 蛋白、小胶质细胞、星形胶质细胞等的定位或定量分析。这两种方法应用较为广泛,能可视化地对病理组织进行分析,虽然使用二抗间接标记提高了方法的灵敏度和准确性^[44],但传统方法仍面临着抗体种属来源少,只能同时标记一到三种标记物与染料重叠带来的信号识别等问题^[45]。

Western blot 和 ELISA 主要用于蛋白质的定量分析,在低浓度蛋白的检测上更为敏感,具有更高的准确性与精确性。在 AD 模型的研究上,Western blot 和 ELISA 用于 APP 及其蛋白水解产物、突触蛋白、tau 蛋白等的定量检测,后者还用于白介素、碱性成纤维生长因子的定量分析。Western blot 主要操作步骤包括脑组织匀浆制备、BCA 法蛋白定量、凝胶电泳与湿法转膜、双抗孵育、化学发光显影与定影及测定蛋白表达。该方法操作复杂繁琐,实验变量多,结果不稳定,需要耗费大量时间与精力探索实验条件^[46]。ELISA 操作较为简单,分为间接 ELISA 和竞争或阻断 ELISA,主要包括制备脑组织匀浆、双抗孵育、加入底物与酶结合成色,酶标仪测试 OD 值。该方法不足之处在于会因显色不明确导致假阳性结果,或因与平板非特异性结合导致高阳性结果^[47]。

2.3 影像学方法

分子影像学方法即在分子和细胞层面对活体生物进行无创或微创的生物学过程的成像分析,主要用于肿瘤、冠心病等方面的诊治。在 AD 动物模型的应用上,常使用核磁共振成像(MRI)、功能磁共振成像(fMRI)、正电子发射断层扫描(PET)、荧光成像等对实验动物海马、大脑皮层、小脑、灰白质宏观与微观结构变化或淀粉样斑块进行评估。Sidiqi 等^[48]利用姜黄素进行荧光成像发现小鼠视网膜上淀粉样斑块可作为脑中淀粉样斑块用于 AD 早期诊断的替代。影像学方法具有灵敏性高、分辨率好等

特点,但价格偏高,荧光成像相对便宜。

3 总结与展望

多年来,研究人员已利用转基因技术与各种理化方法制备了大量的 AD 动物模型,各模型各有特点,但都无法完美复刻人类 AD;转基因动物模型具有复杂的生化、病理和认知行为学特征;采用理化手段制备的非转基因动物模型在进行单一致病因素导致的认知行为障碍相关研究上更具优势,且更具经济性;非人灵长类动物与人类具有遗传相似性,其病理生理发展过程和人类迟发型 AD 更相似,但受限于经济、伦理、表型和病理出现时间不一致等问题而较少进行相关研究^[34];基因敲入小鼠可能是更具代表性的生理化 AD 模型,但仍需在未来的研究中进一步证实。这些模型被广泛用于 AD 发病机制、影响因素和治疗药物的开发与验证中,并在药物临床前研究中取得了不错的成绩。但这些成果在临床的转换率却较低,可能是因为 AD 复杂的病因和病机及实验动物与人类间的种属差异,即使实验动物表现出相似的病理与症状,复杂的内在机制却有所差别。而将人类干细胞来源的神经细胞移植到啮齿类动物大脑中可能解决上述问题,得到最接近生理的 AD 动物模型,但难以用于研究免疫系统和神经间的相互作用,故该方法仍需未来的进一步开发研究^[49]。鉴于此,在进行 AD 相关研究时有必要根据各种建模方法的特点将多种方法结合进行动物模型的构建,或者在多个动物模型中进行研究,以确保临床前研究成果最大可能地转化为人类临床试验。在评定所制备的模型是否达标上,未发现统一的评价标准。并在对同一模型评价时,同一指标对不同方法的敏感性有所差异导致评价结果不同。因此,建议选用多种方法配合,如选用 1~2 种行为学方法评价认知与记忆功能以及 2~4 种免疫学或影像学方法评价脑内核心标志物和组织病理特征。

参考文献:

- [1] Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 5541-5554.
- [2] Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment [J]. Molecules, 2020, 25 (24): 5789.
- [3] Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, et al. Dementia prevention, intervention, and care [J]. Lancet, 2017, 390

- (10113); 2673–2734.
- [4] Alzheimer's Association. 2021 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(3): 327–406.
 - [5] Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R, et al. Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease [J]. *Brain Struct Funct*, 2010, 214(2–3): 127–143.
 - [6] Masliah E, Sisk A, Mallory M, et al. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein and Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(18): 5795–5811.
 - [7] Höfling C, Shehabi E, Kuhn PH, et al. Cell Type-specific human APP transgene expression by hippocampal interneurons in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 137.
 - [8] Chishti MA, Yang DS, Janus C, et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(24): 21562–21570.
 - [9] Mucke L, Masliah E, Yu GQ, et al. High-level neuronal expression of $A\beta_{1-42}$ in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(11): 4050–4058.
 - [10] Richards JG, Higgins GA, Ouagazzal AM, et al. PS2APP transgenic mice, coexpressing hPS2mut and hAPP^{swe}, show age-related cognitive deficits associated with discrete brain amyloid deposition and inflammation [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(26): 8989–9003.
 - [11] Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(40): 10129–10140.
 - [12] Lewandowski CT, Maldonado Weng J, LaDu MJ. Alzheimer's disease pathology in APOE transgenic mouse models: The Who, What, When, Where, Why, and How [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 139: 104811.
 - [13] Belfiore R, Rodin A, Ferreira E, et al. Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(1): e12873.
 - [14] Kang S, Kim J, Chang KA. Spatial memory deficiency early in 6xTg Alzheimer's disease mouse model [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 1334.
 - [15] Davis J, Xu F, Deane R, et al. Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(19): 20296–20306.
 - [16] Ochiishi T, Kaku M, Kiyosue K, et al. New Alzheimer's disease model mouse specialized for analyzing the function and toxicity of intraneuronal Amyloid β oligomers [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 17368.
 - [17] Baglietto-Vargas D, Forner S, Cai L, et al. Generation of a humanized $A\beta$ expressing mouse demonstrating aspects of Alzheimer's disease-like pathology [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2421.
 - [18] Sakakibara Y, Sekiya M, Saito T, et al. Amyloid- β plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits in App knock-in mouse models of Alzheimer's disease [J]. *BMC Neurosci*, 2019, 20(1): 13.
 - [19] Saito T, Mihira N, Matsuba Y, et al. Humanization of the entire murine Mapt gene provides a murine model of pathological human tau propagation [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(34): 12754–12765.
 - [20] Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, et al. A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric $A\beta$, and frank neuronal loss [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(15): 6245–6256.
 - [21] Petrasek T, Vojtechova I, Lobellova V, et al. The McGill transgenic rat model of Alzheimer's disease displays cognitive and motor impairments, changes in anxiety and social behavior, and altered circadian activity [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 250.
 - [22] Davis J, Xu F, Hatfield J, et al. A novel transgenic rat model of robust cerebral microvascular amyloid with prominent vasculopathy [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(12): 2877–2889.
 - [23] 彭小松, 陈晓春, 黄俊山, 等. $A\beta^{25-35}$ 注射诱导大鼠海马神经元 tau 蛋白异常磷酸化 [J]. *中华神经科杂志*, 2004, 37(6): 56–60.
 - [24] Miao J, Shi R, Li L, et al. Pathological tau from Alzheimer's brain induces site-specific hyperphosphorylation and SDS- and reducing agent-resistant aggregation of tau *in vivo* [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 34.
 - [25] Houben S, de Fisenne MA, Ando K, et al. Intravenous injection of PHF-Tau proteins from Alzheimer brain exacerbates neuroinflammation, amyloid beta, and tau pathologies in 5XFAD transgenic mice [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 106.
 - [26] Zhan X, Stamova B, Sharp FR. Lipopolysaccharide associates with amyloid plaques, neurons and oligodendrocytes in Alzheimer's disease brain: a review [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 42.
 - [27] Grieb P. Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(3): 1741–1752.
 - [28] Sil S, Ghosh T. Role of cox-2 mediated neuroinflammation on the neurodegeneration and cognitive impairments in colchicine induced rat model of Alzheimer's disease [J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 291: 115–124.
 - [29] Wenk GL, Stoehr JD, Quintana G, et al. Behavioral, biochemical, histological, and electrophysiological effects of 192 IgG-saporin injections into the basal forebrain of rats [J]. *J Neurosci*, 1994, 14(10): 5986–5995.
 - [30] Jafarian S, Ling KH, Hassan Z, et al. Effect of zerumbone on scopolamine-induced memory impairment and anxiety-like behaviours in rats [J]. *Alzheimers Dement (N Y)*, 2019, 5:

- 637-643.
- [31] 莫颂铁, 张丽凤, 黄彦峰, 等. 慢性铝中毒小鼠学习记忆与大脑皮层 ACh、 β -EP、SOD 及 MDA 关系的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 63-67.
- [32] Sadigh-Eteghad S, Majdi A, McCann SK, et al. D-galactose-induced brain ageing model: A systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0184122.
- [33] 周伟勤, 毕明刚, 杜冠华. 快速老化小鼠 SAMP8 研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(5): 565-568.
- [34] Heuer E, Rosen RF, Cintron A, et al. Nonhuman primate models of Alzheimer-like cerebral proteopathy [J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(8): 1159-1169.
- [35] 章子贵, 杜红燕, 陆汉新, 等. 自然衰老过程中小鼠学习记忆行为变化的动态观察 [J]. 中国老年学杂志, 1995, 6: 354-356, 384.
- [36] 朱华, 刘小海, 李卓, 等. 建立阿尔茨海默症人源肠道菌群动物模型 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 55-62.
- [37] Liu J, Zhang Z, Li JT, et al. Effects of NT-4 gene modified fibroblasts transplanted into AD rats [J]. Neurosci Lett, 2009, 466(1): 1-5.
- [38] de la Torre JC. Critically attained threshold of cerebral hypoperfusion: the CATCH hypothesis of Alzheimer's pathogenesis [J]. Neurobiol Aging, 2000, 21(2): 331-342.
- [39] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 848-858.
- [40] 王跃春, 王子栋. 大鼠 Y-型迷宫测试指标正常值的确定 [J]. 中国行为医学科学, 2003, 12(3): 93-94, 115.
- [41] Gawel K, Gibula E, Marszałek-Grabska M, et al. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2019, 392(1): 1-18.
- [42] 李芸, 梁轩, 王古岩, 等. 条件恐惧实验用于评价阿尔茨海默病转基因小鼠认知功能性别差异的实验研究 [J]. 北京医学, 2019, 41(8): 715-719.
- [43] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications [J]. Cogn Process, 2012, 13(2): 93-110.
- [44] Evilsizor MN, Ray-Jones HF, Lifshitz J, et al. Primer for immunohistochemistry on cryosectioned rat brain tissue: example staining for microglia and neurons [J]. J Vis Exp, 2015, 99: e52293.
- [45] 钱帮国, 焦磊. 多标记免疫荧光染色及多光谱成像技术在组织学研究中的应用 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2017, 26(4): 373-382.
- [46] 姜晨晨, 程军军, 黄梦昊, 等. 蛋白免疫印迹半定量分析在药理学研究中的影响因素 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(9): 758-762.
- [47] Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(9): e12.
- [48] Sidiqi A, Wahl D, Lee S, et al. *In vivo* retinal fluorescence imaging with curcumin in an Alzheimer mouse model [J]. Front Neurosci, 2020, 14: 713.
- [49] Cenini G, Hebisch M, Iefremova V, et al. Dissecting Alzheimer's disease pathogenesis in human 2D and 3D models [J]. Mol Cell Neurosci, 2021, 110: 103568.

[收稿日期] 2021-12-03

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!