

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：21620130154143

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

乙型肝炎病毒体外感染模型的构建、
优化及初步应用

Development, optimization and preliminary application of
in vitro models supporting HBV infection

赵菁华

指 导 教 师：夏宁邵 教授

专 业 名 称：生物化学与分子生物学

论 文 提 交 日 期： 年 月

论 文 答 辩 时 间： 年 月

学 位 授 予 日 期： 年 月

答 辩 委 员 会 主 席：_____

评 阅 人：_____

2016 年 11 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要	i
Abstract	v
缩略词	x
第一章 前言	1
1 乙型肝炎病毒	1
1.1 HBV 基因组	1
1.2 HBV 的病毒结构	3
1.3 HBV 生命周期	5
1.4 HBV 基因的编码蛋白	8
1.5 HBV 的基因型	15
2 乙型肝炎病毒感染	16
2.1 HBV 感染的全球流行情况	16
2.2 HBV 的传播方式	18
2.3 HBV 感染产生的免疫应答	18
2.4 急性乙型肝炎病毒感染和慢性乙型肝炎病毒感染	20
2.5 HBV 感染的预防	23
2.6 HBV 感染的抗病毒治疗	25
3 乙型肝炎病毒研究模型	28
3.1 HBV 体外研究模型	29
3.2 HBV 体内研究模型	36
4 本研究的目 的、意义和思路	44
第二章 材料和方法	46
1 材料	46
1.1 研究中用到的主要仪器	46
1.2 主要耗材	48
1.3 菌株、质粒、细胞株及实验动物	48

1.4	分子及细胞生物学实验常规试剂.....	49
1.5	实验常规溶液及培养基配制	50
2	方法	52
2.1	细胞培养	52
2.2	HBV 的 DNA、RNA 及病毒抗原检测	53
2.3	HBV 感染实验	57
2.4	慢病毒、腺病毒及腺相关病毒载体的构建与感染	59
2.5	肝细胞功能评估	61
2.6	基因表达检测	62
2.7	PreS1 结合实验	64
2.8	基于 WST-8 的细胞毒性检测	64
2.9	FRG 小鼠移植与免疫组化	65
2.10	转录组测序及分析	66
2.11	数据处理统计学分析	69
	第三章 结果与分析	70
	第一部分 HepG2-NTCP 感染模型的建立、优化与应用	70
1	HepG2-NTCP 细胞株的构建、筛选及性质鉴定	70
1.1	NTCP 慢病毒载体构建	70
1.2	HepG2-NTCP 细胞群的评估	71
1.3	不同 HepG2-NTCP 细胞株比较	73
1.4	HepG2-2B1 细胞株性质鉴定	75
2	HepG2-2B1 感染模型的优化	77
2.1	DMSO 可增强 HBV 对 HepG2-2B1 的感染水平	77
2.2	维甲酸受体激动剂可增强 HBV 对 HepG2-2B1 的感染水平	78
2.3	三种优化感染条件的比较	81
2.4	DMSO/DMSO+9-cis-RA/CD437 增强 HBV 感染的机制探索	85
3	HepG2-2B1 感染模型应用	93
3.1	血清来源 HBV 感染的优化	93
3.2	基线病毒感染性与干扰素治疗后发生联合应答相关性研究	94
4	第一部分小结	99

第二部分 可用于 HBV 感染先天免疫应答研究的新型感染模型	101
5 HepaRG-M14A 细胞模型的构建	101
5.1 利用睡美人转座子系统构建过表达 FoxM1 和 HNF4A 的 HepaRG 细胞株	101
5.2 稳定表达 FoxM1 和 HNF4A 细胞株的筛选	103
6 HepaRG-M14A 细胞株性质鉴定	104
6.1 HepaRG-M14A 细胞株的生长分化	104
6.2 HepaRG-M14A 诱导分化来源类肝细胞性质及功能鉴定	107
6.3 HepaRG-M14A 诱导分化来源类肝细胞在 FRG 小鼠体内重建	109
6.4 HepaRG-M14A 诱导分化来源类肝细胞可支持 HBV 感染	110
7 HepaRG-M14A 细胞株转录组测序分析	113
8 利用 HepaRG-M14A 细胞探索 HBV 感染的先天免疫应答特征	117
8.1 HepaRG-M14A 细胞针对 HBV 感染的先天免疫应答	117
8.2 维甲酸受体激动剂抑制 HBV 在 HepaRG-M14A 细胞中的感染	122
8.3 TLR 及 RLR 激动剂的抗病毒作用分析	126
9 第二部分小结	128
第四章 讨论	130
1 HepG2-2B1 细胞株特点	130
2 基于转录组测序研究参与 HBV 感染过程的宿主因子	133
3 基线血清病毒感染力在干扰素治疗应答预测中的价值	134
4 HepaRG-M14A 细胞株特点	135
5 细胞针对 HBV 感染的先天免疫应答反应	136
6 细胞模型在 Anti-HBV 新药研发中的应用	138
第五章 结论与展望	140
参考文献	144
在校期间的科研成果	164
致谢	165

Contents

Abstract in Chinese	i
Abstract in English	v
Abbreviations	x
Chapter 1 Introduction	1
1 Hepatitis B virus	1
1.1 HBV Genome	1
1.2 HBV viral structure	3
1.3 HBV Life cycle	5
1.4 HBV proteins	8
1.5 HBV Genotypes	15
2 Hepatitis B virus infection	16
2.1 Global prevalence of HBV infection	16
2.2 Transmission of HBV	18
2.3 Immune responses to HBV infection	18
2.4 Acute HBV infection and chronic HBV infection	20
2.5 Prevention of HBV infection	23
2.6 Antiviral therapy of HBV infection	25
3 Experimental models for the study of hepatitis B virus	28
3.1 <i>In vitro</i> models for HBV study	29
3.2 <i>In vivo</i> models for HBV study	36
4 Purpose and significance of the study	44
Chapter 2 Materials and methods	46
1 Materials	46
1.1 Instruments	46
1.2 Consumed materials	48

1.3	E.coli strains, plasmids, cell lines and animals	48
1.4	Reagents for routine molecular and cell biology experiments	49
1.5	Preparaten of solvents and medium	50
2	Materials	52
2.1	Cell culture	52
2.2	Detection of HBV DNA, RNA and antigens.....	53
2.3	HBV infection <i>in vitro</i>	57
2.4	Construction of Lentiviral, Adeonoviral and Adeno-associated viral vectors	59
2.5	Liver function assays	61
2.6	Detection of gene expression	62
2.7	PreS1 binding assay	64
2.8	Detection of cytotoxicity based on WST-8.....	64
2.9	FRG mice transplantation and Immunohistochemistry.....	65
2.10	Sequencing and analysis of transcriptome.....	66
2.11	Bioinformatic and statistical analysis	69
Chapter 2 Result and analysis		70
 Part I Development, improvement and application of HepG2-NTCP		
cell model		70
1 Construction, screening and evaluation of inducible HepG2-NTCP cell lines.....		70
1.1	Construction of Lentiviral vector carrying NTCP	70
1.2	Evaluation of HepG2-NTCP cell pools.....	71
1.3	Comparison of different HepG2-NTCP cell clones.....	73
1.4	Characterization of HepG2-2B1 cell line.....	75
2 Improvement of HepG2-2B1 cell line		77
2.1	DMSO enhances HBV infection of HepG2-2B1	77
2.2	RAR agonists enhances HBV infection of HepG2-2B1	78
2.3	Comparison of 3 optimized infection conditions.....	81
2.4	Mechanism exploraten of DMSO/9-cis-RA/CD437 enhancement of HBV infection.....	85

3 Application of optimized HepG2-2B1 infection model	93
3.1 Optimization of serum-derived HBV infection of HepG2-2B1.....	93
3.2 Study of Correlation between IFN-treatment baseline HBV infectivity and virological response.....	94
4 Summary of Part I	99

PART II Novel Cell modeling for studying innate responses against

HBV infection..... 101

5 Development of HepaRG-M14A cell line	101
5.1 Sleeping beauty transposon vector carrying FoxM1 and HNF4A delivery into HepaRG.....	101
5.2 Screening of HepaRG cell lines overexpressing FoxM1 and HNF4A.....	103
6 Characterization of HepaRG-M14A cell line	104
6.1 Proliferaten and Differentiation of HepaRG-M14A cell line.....	104
6.2 Characterization of HepaRG-M14A derived hepatocyte-like cells.....	107
6.3 Construction of humanized liver mice with HepaRG-M14A derived hepatocyte-like cells based on FRG mice.....	109
6.4 HBV infection of HepaRG-M14A derived hepatocyte-like cells.....	110
7 Gene expression profiling of HepaRG-M14A cell	113
8 Exploraten of innate immune response against HBV based on HepaRG-M14A cell model	117
8.1 Innate immune response against HBV infection in HepaRG-M14A cells.....	117
8.2 RAR agonists inhibits HBV infection of HepaRG-M14A cells.....	122
8.3 Effect of stimulation of some PRR receptors by ligands on HBV infection establishment.....	126
9 Summary of Part II	128

Chapter 4 Discussion.....130

1 Characterization of HepG2-2B1 cell line	130
2 Host factors involved in HBV infection based on gene expression profiling	133
3 The Value of baseline viral infectivity in predicting post-IFN-treatment response	134
4 Characterization of HepaRG-M14A cell line	135

5	Innate immune response against HBV /HDV infection in cells.....	136
6	Application of cell models in Anti-HBV new drug development.....	138
Chapter 5 Conclusion and perspective		140
References.....		144
Publications		164
Acknowledgement.....		165

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 感染是危害人类健康的重要公共卫生问题, 尽管现有的预防性疫苗已显著减少了新发 HBV 感染, 全球仍有约 2.4 亿的慢性 HBV 感染者需要得到有效的治疗。鉴于现有慢乙肝治疗药物只能控制病情发展而难以实现临床治愈, 发展更加有效的 Anti-HBV 新药是当前 HBV 的研究重点方向。建立和发展能实现 HBV 完整生命周期的细胞和动物模型对 Anti-HBV 治疗新技术的发展至关重要。其中, 支持 HBV 感染和复制的细胞模型是研究 HBV 与宿主相互作用、筛选和评估 HBV 感染治疗药物、评估抗体中和活性的重要工具。除原代肝细胞外, 分化的 HepaRG 细胞与外源表达 HBV 功能性受体人钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白 (Sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP) 的 HepG2 细胞 (HepG2-NTCP) 是目前最为常用的两种 HBV 易感细胞, 但现有基于上述两种细胞的体外 HBV 感染系统尚存在感染效率低、操作繁琐等不足, 有待进一步改进。本研究拟通过构建新的 HBV 易感细胞株、筛选能增强 HBV 感染的小分子促进剂和优化感染条件等手段建立更为高效的 HBV 细胞感染模型, 并初步应用于 Anti-HBV 药物的筛选评估和慢性乙肝病人血清病毒感染性与其治疗应答相关性的探索。

本研究分为两个部分, 分别对基于 HepG2-NTCP 和 HepaRG 的 HBV 体外感染模型进行系统优化和应用探索。其中第一部分针对是 HepG2-NTCP 细胞模型的构建、优化和应用。人钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白是 HepG2 细胞中缺少的 HBV 功能性受体。2012 年, Huan Yan 等最早发现在 HepG2、Huh7 等人肝癌细胞株中外源性表达 NTCP 可使其获得 HBV 易感性, 为构建新的 HBV 体外感染模型奠定了基础。但此前报道的基于 HepG2-NTCP 细胞株的体外感染模型感染效率较低, 仅为 10-20%左右, 且对病人血清 HBV 的易感性较差。本研究从下述三个方面对基于 HepG2-NTCP 细胞的感染模型进行了系统优化, 包括: (1) 构建了四环素诱导表达型的 HepG2-NTCP 细胞株, 将 NTCP 编码序列与 IRES 驱动红色荧光蛋白 (mCherry) 构建于四环素诱导启动子调控的双顺反子表达框中, 利用慢病毒系统将该表达框稳定整合至 HepG2-TetOn 细胞, 通过流式细胞分选

和细胞克隆化获得了稳定整合的 HepG2-2B1 细胞株。该细胞株在 Doxycycline (Dox) 诱导后, 能高水平表达 NTCP, 并支持 HBV 感染, 感染率为 30%左右。

(2) 评估了系列小分子化合物对 HBV 体外感染的作用。发现采用 9-cis-RA 和 CD437 两种维甲酸受体 (Retinoic acid receptors, RAR) 激动剂类药物处理 HepG2-2B1 细胞, 能显著提高其对 HBV 的易感性。其中, 9-cis-RA 需要与 DMSO 联合使用, 而 CD437 则无需 DMSO 协同即可大幅提高感染后细胞的 HBV 抗原 (HBeAg 和 HBsAg) 表达水平、HBcAg 免疫荧光染色阳性率及细胞内外病毒 DNA/RNA 水平。(3) 优化了感染程序, 发现在细胞处于悬浮状态时进行 HBV 孵育 (悬浮感染) 可显著提高易感性, 并可与药物处理产生协同增强作用。通过以上三个方面的改进, 我们建立了基于 HepG2-NTCP 的 HBV 高效感染体系, 其中 CD437 处理的悬浮感染条件, 可将 HBV 感染 HepG2-2B1 细胞的感染率 (感染后第 12 天细胞 HBcAg 免疫荧光染色阳性率) 从 34.5%提升到 98.3%, 同时显著提高 (>5 倍以上) 感染后细胞的 HBsAg、HBeAg 分泌水平及胞内 HBV RNA (包括 pgRNA 和 total HBV RNA)、HBV DNA (包括 core DNA 和 cccDNA) 水平。

为研究优化感染条件促进 HBV 感染的分子机制, 我们采用报告基因方法和 mRNA 转录组测序分析了药物处理对外源及内源基因表达水平的影响。结果显示, CD437 处理可显著增强多种外源启动子活性 (CMV、CAG、SV40、CMVTRE3G), 从而增强其下游基因表达水平。此外, 研究还发现 CD437 处理能同时增强转染了 HBV 1.3 倍基因组克隆的 HepG2 细胞的 HBeAg 和 HBsAg 表达水平, 表明其对 HBV 启动子也有促进作用。对 DMSO、DMSO+9-cis-RA、CD437 处理后 HepG2-HepG2-2B1 细胞进行 mRNA 转录组测序, 结果显示相比于未处理细胞, DMSO、CD437 处理均可显著增强包括 NTCP 在内的多个与 HBV 感染及早期复制相关的宿主基因的转录水平。我们构建了药物处理后显著上调的 14 个基因的 cDNA 表达质粒, 转染 HepG2-HepG2-2B1 细胞进行感染验证, 结果发现其中 9 个基因 (BCL2A1、BCL2L1、NUP155、CHORDC1、PON2、TRIM26、SART3、MTA2、HNF4A) 的过表达可以增强 HBV 在 HepG2-2B1 细胞中的感染。综上所述, 我们的研究结果表明 CD437 增强 HBV 感染复制相关宿主基因的表达, 同时促进 HBV 的转录和表达, 从而起到增强 HBV 感染的效果。

进一步评估发现,优化后的 HepG2-2B1 感染体系可以支持 HBV 携带者血清的直接感染分析,为进一步分析慢性乙肝病人血清病毒感染性特征提供了重要工具。采用此模型,本研究对 104 例接受长效干扰素治疗的 HBeAg 阳性的慢性乙肝患者基线血清病毒 (HBV DNA 水平均大于 10^8 copies/mL) 的体外感染能力进行了评估,其中 42 (40.3%) 例基线血清可检测到感染后 HBeAg 水平的升高 (成功感染标志)。结合基线血清能否实现体外成功感染与长效干扰素治疗应答结局进行分析,发现 HBeAg 阳性的慢乙肝病人基线血清病毒感染性与干扰素治疗后发生联合应答 (HBeAg 血清学转换及 HBV DNA 降至检测下限) 具有显著的相关性,基线血清病毒感染性越弱,干扰素治疗后越容易发生联合应答。因此,基线病毒感染性可能可以作为预测干扰素治疗应答的另一个指标。在本研究中,qAnti-HBc 预测干扰素治疗后发生联合应答的 AUROC 值为 0.677 (95% CI: 0.576-0.779, $p < 0.001$),基线病毒感染力预测的 AUROC 为 0.663 (95% CI: 0.558-0.767, $p < 0.001$),而两者联合预测的 AUROC 值为 0.724 (95% CI: 0.626-0.821, $p < 0.001$)。因此,两者联合预测的准确性高于 qAnti-HBc 或基线病毒感染力单独作为预测指标的准确性。

本研究第二部分是基于 HepaRG 细胞的 HBV 体外感染模型的优化和初步应用。HepG2 细胞恶性程度较高,许多先天免疫应答相关信号通路缺失,不适合用于宿主对 HBV 感染的先天免疫应答机制的研究,本部分研究旨在构建一个更接近原代肝细胞的细胞模型,与 HepG2-2B1 形成优势互补。通过对 HepaRG 进行基因改造,将 HNF4A 和 FoxM1 基因整合至 HepaRG 细胞,筛选获得一株不依赖于 DMSO 即可完成分化并支持 HBV 感染的 HepaRG-M14A 细胞株。与原始 HepaRG 相比,HepaRG-M14A 生长分化速率更快,并且全部分化成为类肝细胞而不向类胆管细胞方向分化。分化两周后的 HepaRG-M14A 细胞肝细胞特异基因的表达显著提升且具有成熟肝细胞的功能,并且能够在 FRG 小鼠中较快建立生长优势,实现重建。

分化两周的 HepaRG-M14A 与 HepaRG 相比,NTCP 及多个与 HBV 感染及早期复制相关的基因的表达均有不同程度的提升,且无须 DMSO 诱导即可支持 HBV 的感染。悬浮感染和病毒孵育时添加 DMSO 可以提升 HepaRG-M14A 细胞对 HBV 的易感性。利用 HepaRG-M14A 细胞对 HBV 感染先天免疫应答相关的

研究发现, HBV 感染早期存在较为短暂、微弱的干扰素反应和干扰素诱导基因 (Interferon stimulated genes, ISGs) 的表达, JAK/STAT 和 NF- κ B 信号通路都参与到 HBV 的免疫应答中。HepaRG-M14A 细胞中模式识别受体 (Pathogen recognition receptor, PRR) 的表达与 HepG2 相比更接近于原代肝细胞, 大部分 PRR 激动剂在 M14A 细胞中都具有抑制 HBV 感染的作用, 其中抑制效果最显著的是 TLR-1/2, 3, 4, 2/6 和 RIG-I/MDA-5 的激动剂。

综上所述, 本研究建立并发展了两种不同的 HBV 体外感染模型和感染方法, 并对 HBV 在细胞模型中的感染特征进行了系统的阐述。利用 HepG2-2B1 细胞发现了 HBV 感染力在干扰素治疗应答预测中的价值, 利用 HepaRG-M14A 细胞初步探讨了 HBV 感染的先天免疫应答特征。这两个体外感染模型互为补充, 适用于不同的研究范围, 为 HBV 感染机制研究及 Anti-HBV 新药研发提供了新工具。

关键词: 乙型肝炎病毒, HBV 体外感染模型, 维甲酸受体激动剂, 9-cis-RA, CD437, 分化, 类肝细胞, 先天免疫

Abstract

Chronic HBV (Hepatitis B virus, HBV) infection is a major public health concern affecting over 240 million people worldwide. Although suppression of HBV replication is achieved in the majority of patients with currently available antivirals, discontinuation of therapy prior to hepatitis B surface antigen loss or seroconversion is associated with relapse of HBV in the majority of cases. Thus, new therapeutic modalities are needed to achieve eradication of the virus from chronically infected patients, which depend on the establishment and development of cell and animal models that support the whole life cycle of HBV. Cell model is an important platform for the study of HBV infection, HBV and host interaction, screening and evaluation of drugs for treatment of chronic HBV infection and evaluation of antibody neutralization activity. Except for Primary hepatocytes, differentiated HeparG cells and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) overexpression HepG2 cells (HepG2-NTCP) are most commonly used for HBV infection. However, the low efficiency of infection and complex operations need to be further improved. The aim of this study was to establish novel HBV infection models by constructing new HBV susceptible cell lines, screen small molecule enhancers and optimize infection conditions for facilitating HBV infection, and preliminarily apply cell model to the screening of anti-HBV drugs as well as the study of correlation between serum-derived HBV infectivity and virological response post interferon treatment.

The first part of this study was development, optimization and application of HepG2-NTCP cell model. The sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the failing functional receptor of HBV in HepG2. In 2012, Huan Yan et al found that exogenous expression of NTCP in HepG2, Huh7 and other human hepatocellular carcinoma cell lines could acquire HBV susceptibility and lay the foundation for constructing novel HBV infection model *in vitro*. However, the reported *in vitro* infection model based on the HepG2-NTCP cell line presented a low infection

efficiency of only 10-20% and poor susceptible to serum-derived HBV. In this study, the infection model based on HepG2-NTCP cells was systematically optimized from the following three aspects: (1) NTCP and red fluorescent protein (mCherry) were constructed in a bicistronic expression cassette regulated by tetracycline-induced promoter, followed by integrated into HepG2-TetOn cell line by lentivirus transduction. The stable cell line HepG2-NTCP-HepG2-2B1 with high expression level of NTCP was obtained by fluorescence-activated cell sorting technology. HepG2-NTCP-HepG2-2B1 supported HBV infection and cccDNA formation. Despite the 100% positive rate of NTCP expression, the positive infection rate of HepG2-2B1 cells was only 20%-30%. (2) In order to facilitate HBV infection level of HepG2-2B1, we screened several retinoic acid receptors (RAR) and Retinoic X receptor (RXR) agonists for its effect on HBV infection. DMSO-dependent agonist 9-cis-RA and DMSO-independent agonist CD437 presenting the highest enhancement on secreted antigen level, intracellular and extracellular HBV DNA/RNA level and HBcAg-positive infection rate. (3) The infection procedure was also optimized. Suspension cell condition of infection could enhance HBV infectivity, producing synergistic enhancement with drug treatment. Through the above three improvements, we established HBV infection system with high efficiency based on HepG2-NTCP. CD437-treated suspension infection conditions could improve HBV infection rate from 34.5% to 98.3%, as well as the level of secreted HBsAg, HBeAg, HBV RNA (pgRNA and total HBV RNAs) and HBV DNA (core DNA and cccDNA) significantly (>5 times).

In order to investigate the molecular mechanism of optimized condition for promoting HBV infection and the host genes involved in HBV infection, the effects of drug treatment on exogenous and endogenous gene expression were analyzed by reporter gene method and RNA transcriptome sequencing. The results showed that CD437 could significantly enhance the activity of a variety of exogenous promoters (CMV, CAG, SV40, CMVTRE3G), thereby enhancing its downstream gene expression. In addition, CD437 treatment could also enhance the HBeAg and HBsAg expression levels in HepG2 cells transfected with HBV 1.3 times genomic clones,

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库