

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520071152535

廈門大學

硕士学位论文

载紫杉醇的聚乳酸-卵磷脂纳米级微泡的制备及其超声介导下对荷瘤小鼠的抑瘤研究

Preparation of paclitaxel loaded PLA-lecithin nanobubbles
and study of ultrasound-mediated antitumor effect on
bearing tumor mice

刘欣欣

指导教师姓名: 张其清 教授/博士生导师

侯振清 讲师

专业名称: 生物医学工程

论文提交日期: 2010年 月

论文答辩日期: 2010年 月

2010年 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

摘要

超声造影剂 (ultrasound contrast agent, UCA) 除了应用于增强声学造影外, 目前已经广泛地应用于基因治疗、药物输送、溶栓治栓及肿瘤治疗等领域, 并向纳米级和功能性方向发展。由于超声破坏载药微泡可使微泡在特定组织释放药物, 超声介导治疗开创了靶向药物传递的新途径。具有超声造影和载药双功能的常规微泡平均粒径为 2~5 μm , 不能透过血管, 且载药率较低; 纳米级载药微泡由于其尺寸小而具有极强的穿透力, 可穿过血管内皮细胞间隙实现血管外的靶向诊断与治疗, 具有巨大的发展潜力。

对此, 本文以 PLA 和卵磷脂为药物载体, 以紫杉醇为模型药物, 采用改良的超声复乳-溶剂挥发法结合冷冻干燥技术制备载紫杉醇的聚乳酸-卵磷脂纳米级微泡, 考察主要制备参数即卵磷脂含量和超声时间对载药微泡理化特性(包括: 形态、粒径、载药量、包封率和超声介导下体外释药特性)的影响, 优化制备高载药率的纳米级微泡的最佳条件; 利用激光共聚焦、透射电镜等证明微泡的空心结构, 利用 X-射线衍射分析 (XRD) 考察药物在微泡中的状态; 考察载药微泡对人肝癌细胞的细胞毒性, 及其载药纳米级微泡在超声介导下对荷瘤小鼠的抑瘤率和治疗效果。

结果表明, 在制备初乳和复乳的超声时间均为 100 s、PLA 与卵磷脂质量比为 250:50 时可制备得到平均粒径 615 nm、内部空心的纳米级微泡, 药物包封率达 $(90.90\pm 5.79)\%$, 载药率达 $(8.26\pm 0.53)\%$, 紫杉醇以无定型状态分布在微泡的壳中; 载紫杉醇的 PLA-卵磷脂微泡的体外药物释放具有缓释、零级释放以及超声介导加快药物释放的特性, 在紫杉醇浓度为 11.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 Bel-7402 人肝癌细胞的增值率仅为 $(53.37\pm 3.23)\%$, 而通过对 H22 肝癌荷瘤小鼠的治疗实验研究表明, 相对于对照组, 21 d 的抑瘤率达 75.38%, 相对于紫杉醇注射剂而言, 超声介导下载药纳米级微泡注射剂能减小对小鼠的毒副作用, 提高抑瘤率。

关键词: 超声造影剂 纳米级微泡 聚乳酸-卵磷脂 紫杉醇

Abstract

Ultrasound contrast agents (UCA) are multifunctional bubbles that not only applied in enhancing ultrasound contrast imaging, but also in gene-therapy, drug delivery, thrombolysis and oncotherapy. Ultrasound induced destruction of drug-loaded microbubbles is beneficial for drug being released in specific tissues, which develops a new direction of controlled release for drug delivery. Drug loaded microbubbles that combine properties of ultrasound imaging contrast agents and drug carriers suffer from low encapsulation efficiency and do not allow effective extravasation into tumor tissue. Drug loaded nanobubbles with small size can get through cell clearance of vascular endothelial, and achieve targeted diagnosis and treatment in extra vascular, and have great potential for development.

In this paper, a new type of paclitaxel-loaded poly lactide-lecithin (PLA-lecithin) nano-scale bubbles has been developed with a method of modified ultrasonic double emulsion solvent evaporation technology (UDES). The impacts of lecithin content and preparing ultrasonic time on physical and chemical properties of drug-loaded microbubbles (including: morphology, particle size, drug loading, encapsulation efficiency and in vitro release characteristics) were investigated, drug state encapsulated in the bubble was detected using X-ray diffraction analysis (XRD), finally, drug loaded nanobubbles inhibitory rate of human hepatoma cell and ultrasound-mediated inhibitory rate of H22 tumor-bearing mice were evaluated. The results show that the desirable formulated paclitaxel-loaded PLA-lecithin nano-scale bubbles were characterized to inner hollow and with relatively uniform size of around 615 nm, with drug entrapment efficiency up to 90.90% and drug loading content of 8.26%, the lipophilic drug paclitaxel was amorphously dispersed within the shell of the bubble. The in vitro drug release showed retained, zero-order release profile and could be speeded up under ultrasound trigger. With the paclitaxel concentration at 11.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Bel-7402 cell only obtained a reproductive rate of $(53.37 \pm 3.23)\%$; and drug-loaded nanobubbles injection combining with ultrasound exposure presented enhanced inhibition rate and reduced side effects compared with the paclitaxel-injection. The results illustrated that the PLA-lecithin nanobubbles have

great potential in targeted delivery to tumor tissue and ultrasound mediated anticancer therapy.

Key words: Ultrasound contrast agent; nano-scaled bubble; poly lactid (PLA)-lecithin; paclitaxel

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
目 录.....	IV
Table of Contents	VI
第一章 绪 论	1
1.1 超声造影剂的发展.....	1
1.2 超声造影物理学原理.....	2
1.3 超声治疗.....	2
1.4 纳米超声造影剂.....	6
1.5 载药超声造影剂的制备.....	8
1.6 紫杉醇理化性质及药理学性质.....	10
1.7 本课题的提出和研究内容.....	13
参 考 文 献.....	15
第二章 载紫杉醇微泡的制备及表征	21
2.1 仪器与材料.....	22
2.2 实验方法.....	23
2.3 结果与讨论.....	26
2.4 结论.....	45
参 考 文 献.....	47
第三章 载紫杉醇的PLA-卵磷脂纳米级微泡对Bel-7402 人肝癌细胞 的MTT实验.....	50
3.1 仪器和材料.....	50
3.2 MTT原理.....	51
3.3 试剂配制及耗材处理.....	51
3.4 实验方法及步骤.....	53

3.5 实验结果.....	54
参 考 文 献.....	56
第四章 超声介导下紫杉醇的PLA-卵磷脂微泡对荷瘤小鼠的抑瘤研究.....	57
4.1 仪器与材料.....	58
4.2 实验方法.....	60
4.3 结果与讨论.....	63
4.4 结论.....	72
参 考 文 献.....	73
全文总结与展望	76
全文总结.....	76
展望.....	77
硕士期间科研成果及所获奖励	79
致 谢.....	80

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Contents in Chinese	V
Table of Contents	VI
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Development of Ultrasound Contrast Agents(UCA).....	1
1.2 Ultrasonic Contrast Principles	2
1.3 Ultrasound Mediated Therapy	2
1.4 Nano-scale UCA.....	6
1.5 Preparation of Drug Loaded UCA	8
1.6 The Physicochemical and Pharmacological Properties of PTX	10
1.7 Main Focus of This Thesis.....	13
References.....	15
Chapter 2 Preparation and Characterization of PTX Bubbles	21
2.1 Apparatus and Materials	22
2.2 Experiments	23
2.3 Results and Discussion.....	26
2.4 Summary.....	45
References.....	47
Chapter 3 MTT Test of PTX loaded PLA-lecithin nanobubbles on Bel-7402 cells	50
3.1 Apparatus and Materials	50
3.2 Principle of MTT	51
3.3 Reagent and Consumables Treatment.....	51
3.4 Experiments	53
References.....	56
Chapter 4 ultrasound mediated PTX loaded PLA-lecithin bubbles anticancer study on tumor beared mice	57
4.1 Apparatus and Materials	58

4.2 Experiments	60
4.3 Results and Discussion	63
4.4 Summary	71
References	73
Conclusions and Future Works	76
Conclusions	76
Future Works	77
Publications and Rewards	79
Acknowledgements	80

厦门大学博硕士学位论文摘要

第一章 绪论

1.1 超声造影剂的发展

近年来,新型声学造影剂及造影成像技术的研究进展成功开辟了全新的超声造影领域。超声造影多用于肝脏、肾脏、心脏及血管等疾病方面的临床诊断治疗,近来的研究表明,其在治疗方面也有很大的潜力。

1.1.1 超声造影剂的发现

1968年 Gramiak 等^[1]在做超声心动图过程中偶然发现的微泡成为超声造影剂的研究开端,随着对微泡深入研究,新型造影剂的问世使超声造影得到了广泛应用,超声造影技术被称为继 B 型超声、彩色多普勒超声之后的第三次革命。超声造影技术已成为现代超声医学发展的一个重要方向。

1.1.2 超声造影剂的发展历程

超声造影剂的发展经历了 3 个阶段^[2-4]:

第一阶段为自由气体,无成膜物质,不稳定,不能经外周静脉注射,而通过心导管插入主动脉或心腔内,属创伤性检查方法;加之微泡在血液循环中持续时间极为短暂、制剂成泡太大、不能通过肺循环,导致左心不能显影,只能使右心显影,因此使用受到限制。

第二阶段是以白蛋白、脂类或多糖等作为膜材料包裹空气气泡,商品化的造影剂以 Albunex、Levovist 等为代表。这类造影剂的膜材料比较稳定,直径较小($<8\ \mu\text{m}$),在血液中的持续时间明显延长,经外周静脉注射不仅可以增强右心室显影,也可稳定地通过肺毛细血管显影左心腔及外周血管,实现由创伤性向非创伤性的发展。

第三阶段是分子较大、溶解度和弥散度及生物活性低的氟碳气体或氟化气体代替空气、氧气、二氧化碳、氮气等气体,新的抗压性和稳定性高的膜材料,如磷脂、脂质体、非离子表面活性剂及可生物降解的高分子多聚物等的引入,使得新一代超声造影剂微泡直径更为缩小并趋于一致,理化性能稳定,稳定性、抗压

性进一步提高。

1.2 超声造影物理学原理

1.2.1 背向散射机制

超声进入人体，组织微细结构构成散射体，散射的强度与入射声波强度及散射体的面积呈函数关系。对超声造影来说，有效散射能与造影剂气泡半径的6次方成正比，与波数的4次方成正比，与造影剂的浓度成正比^[5-7]。

1.2.2 共振机制

游离气泡在液体中会产生强烈的共振运动，共振频率产生的散射能比气泡本身产生的散射能大 10^3 倍，因此可以获得巨大的散射能。在单纯的造影剂成像技术中，因探头的发射/接受均为基频率 f_0 ，此时由于微气泡的存在与周围组织声学差异较大，微泡具有较强的散射能力，再加上共振引起的共振散射，增强注有造影剂的区域与周围组织在超声图像上的对比度。

1.2.3 声速效应

悬浮有粒子的溶液，其声速与粒子密度、相关成分的可压缩性及粒子的容积百分比有关。如果造影剂的声速与周围介质的声速明显不同，声速将会随造影剂浓度而变化。

1.2.4 谐波成像

造影剂气泡在超声作用下，呈非线性振动。在声场交替声压作用下，发生收缩与膨胀，并产生机械性共振现象。微泡的共振现象称基波反应，或称第一次谐波。在声场中微泡还可以产生第二次共振或称二次谐波，其发生频率正好是基波频率的一倍。在所有谐波和非谐波成分中，二次谐波是仅次于基波的次极大值。先用探头向注有造影剂的区域发射基波超声，通过带通滤波提取散射波中的二次谐波成像即谐波成像。由于频率提高，故图像的分辨率相应提高，同时由于抑制不含造影剂的周围组织的信号干扰，使成像质量明显提高。

1.3 超声治疗

1.3.1 超声造影剂的治疗机制

目前, 超声造影剂已经应用于基因治疗、药物输送、溶栓治栓及肿瘤治疗等领域, 其主要原理是利用超声的空化效应和微泡的增强作用。最近, 越来越多的研究已经逐渐开始转入对微泡的靶向表面修饰与改性, 使其功能基化, 在靶向输送与治疗方面显示了独特的功能, 有着广泛的应用前景。

1.3.1.1 超声空化效应

当声波通过液体时, 液体各处的声压会发生周期性的变化, 相应地, 液体中的微泡核也会随超声频率发生周期性的振荡。在低声强下, 气泡的径向振荡受声压控制, 微气泡沿着平衡半径左右振荡多次, 在每一个振荡的微气泡周围将产生辐射压力和微束流。微束流能在气泡表面附近产生非常高的切变应力, 使气泡变形甚至破裂, 可导致邻近的细胞或生物大分子受到影响, 产生一定的生物学效应。这种微泡随声压以其半径为平衡半径做周期性的振荡运动称为稳态空化。当作用声强增大, 使气泡的振荡幅度可与其平衡尺寸相比拟时, 气泡的振动即转而是由其周围媒质的惯性所控制。空化核在超声场负压相半周期迅速膨胀, 而在正压相半周期又急剧收缩至内爆, 这种空化称作瞬态空化或惯性空化。瞬态空化时气泡振荡十分猛烈, 最初气泡先是爆炸式地膨胀, 随后又迅速萎陷。在最后萎陷阶段, 会产生局部高温、高压现象(泡内部的压力和温度可以达到几百上千个大气压和数千开), 此外还伴随强大冲击波、高速微射流、自由基的产生^[8]。这些极端的物理条件和化学基团的形成对正常细胞的结构和酶的生物活性有极大的破坏作用, 但同时对于肿瘤细胞可进行有效的杀伤。与稳态空化相比, 瞬态空化除了微气泡发生剧烈的崩溃外, 另一个不同之处在于瞬态空化的产生须具有一定的阈值, 即当超声的声压达到一定值时, 才会引发瞬态空化过程。研究表明, 在瞬态空化下, 细胞和组织受到生物学损伤的危险性较高。高强度的压力波会使细胞损伤、破裂、DNA 断裂, 以及血液溶血、组织损伤、出血等^[9-10]。

1.3.1.2 靶向作用

超声造影剂能用于诊断和治疗, 除了利用超声的空化效应外, 在很大程度上还利用了超声造影剂微泡的被动靶向和主动靶向作用。微泡即使不加处理修饰, 也可利用其化学和电荷特性使之滞留于病变部位, 从而在一定程度上具有一定的靶向作用(被动靶向); 若再加以不同的方法处理修饰(如在微泡表面连接能特异性识别病变部位或组织的细胞所表达的特异性抗原或受体的特异性抗体或配

体, 或者利用亲和素-生物素桥间接将微泡与靶细胞结合), 造影剂可选择性地识别、结合靶细胞、靶组织或病变组织, 达到靶向显影诊断、给药治疗的目的(主动靶向)。

1.3.2 超声治疗的分类

1.3.2.1 介导基因治疗

基因治疗是人类征服许多疑难疾病如遗传病、肿瘤、心血管疾病等的一种新的治疗手段, 人们对之寄予厚望。但目前进展缓慢, 在许多治疗方案中极少具有临床疗效。究其原因, 缺乏安全、高效的基因载体及基因转移方法是主要问题所在。近年来研究表明, 超声造影剂介导基因输送, 可明显地提高外源基因的转染和表达, 有望成为一种高效、安全、操作简便的无创治疗手段。大多数学者认为超声的空化效应一方面导致局部毛细血管和临近组织细胞膜的通透性增高, 细胞膜短暂地形成可逆性小孔; 另一方面微泡破裂时产生的冲击波、高速微射流和团块物质等加速基因进入细胞, 从而增强基因转染与表达^[11-13]。超声造影剂的加入大大增加了空化核的数量, 降低了空化阈值, 增强空化效应^[14]。这一观点在一定程度上也得到一些实验研究的支持。Ward等^[15]用淋巴细胞悬浮液, 引入造影剂且使其浓度可变, 加以超声, 观察到2种声孔, 即可修复性声孔和致死性声孔。冉海涛^[16]等发现, 微泡造影剂联合超声辐照体外培养的血管平滑肌细胞膜上出现直径约1~2 μm 、形态不规则的小孔; 有的小孔周边细胞膜局限性隆起, 呈弹坑样或火山口样; 少数细胞膜表面的孔洞直径较大可达5~8 μm ; 并且发现细胞膜上出现的小孔是可逆的, 细胞能在24 h内自行修复。

另外, 在超声照射条件下, 外源基因表达增高的同时伴随着与细胞损伤修复有关基因的表达明显增高, 有学者认为后者表达增高上调了外源基因表达水平, 这也是超声波增强基因表达的主要机制之一^[17]。

1.3.2.2 药物输送

微泡超声造影剂作为一种能携带微粒穿过内皮层进入靶组织的非创性载体, 可增加靶组织的药物浓度和基因表达量。运用超声破坏含有载体的微泡可在特定组织释放药物^[18]。同口服药物治疗相比, 用超声破坏携带药物的微泡的治疗方法可以实现在特定组织靶向释放药物, 达到减少全身药物用量、提高局部药物浓度、增强药物疗效的目的, 还可以避免药物受到外部环境的破坏、延缓药物的释放、

保持药物原有的代谢性质及降低外源性药物引起的毒副作用和免疫反应等。由于脂类造影剂具有天然的靶向功能，生物相容性好、稳定性高、使用安全，被广泛用于药物输送。如目前在美国和欧洲上市的包载抗癌药物阿霉素与道诺霉素的就是由脂质体构成的膜材料。当然，就微泡成膜材料而言，高分子材料韧性高、抗压性能突出、显影时间长，在携带基因或药物治疗中也具有极大的发展潜力。另外，纳米级微泡由于能在尽可能低的背景噪声下明显增强回声信号从而强化突出靶区病灶；以及因其纳米级的小尺寸而具有极强的穿透力，可穿过血管内皮细胞间隙实现血管外的靶向诊断与治疗等特性，也具有巨大的发展潜力。

1.3.2.3 评价血栓性疾病及增强治疗性超声的溶栓作用

血栓形成和血栓栓塞是许多心脑血管疾病如急性心梗、中风等的病理机制。治疗心脑血管疾病的关键是血栓和栓塞的准确诊断及血栓的软化、溶解。目前临床上治疗血栓的方法有静脉注射大量溶栓剂、血管内超声消融和体表治疗性超声助融等。静脉注射大量溶栓剂容易引起出血等并发症，因而具有较大的局限性。血管内超声消融也存在有创、操作复杂、不能用于治疗极细小的血管栓塞、易发生血管壁损伤和远端小血管栓塞等缺点。

研究发现，将溶栓药物与微泡结合再连接能识别纤维素或血凝块成份的配体，则可实现靶向结合血栓。若再在体表加以一定条件的超声作用，利用空化效应破坏微泡，可加速血栓软化、溶解。这比超声与药物联合应用或单独使用药物溶栓效果更好、更快，并且能减少所需的溶栓药剂量，从而减轻或避免其不良反应。血栓是引起动静脉栓塞以及相应脏器梗死的重要危险因素，早期准确地检出血栓对于降低死亡率及并发症发生率非常重要。Hamilton等^[19]进行兔左心室血栓试验研究。经兔静脉注入造影剂后进行超声检查，显示微泡顺利通过肺循环并迅速聚集于血栓发生部位，增强栓子与周围组织的显像对比度。实验后处死动物行荧光显微镜检查，证实携带经罗丹明荧光标记抗体的微泡造影剂大量粘附于血栓表面。造影剂微泡在声场中破坏时产生空化作用有助于溶解血栓，超声造影能够增强超声的空化效应，造影剂同时能加速体内尿激酶（UK）等向血栓内渗透，增强治疗性超声的溶栓作用，有明显的溶栓功效^[20-21]。

1.3.2.4 肿瘤治疗

造影剂微泡的破坏可促使供应肿瘤的微血管破裂而引起肿瘤退变；携带血

栓形成物的造影剂在肿瘤内被超声破坏，可形成血栓或阻塞血管，使肿瘤坏死。靶向微泡超声造影剂可引导药物由外周进入肿瘤组织，又可进行肿瘤部位局部药物治疗^[22]。

肿瘤细胞较正常细胞体积大，导热性差；依赖于丰富的氧和其他营养物质，因此需要通过新生血管来增加血液供应^[23]；同时，在新生血管内皮细胞上表达大量的特异性抗原，如VEGF， $\alpha_v\beta_3$ 等，这些抗原与肿瘤滋养血管的生长和肿瘤侵袭性有密切关系。根据这些特点，超声可以通过以下途径在肿瘤诊断和治疗中发挥作用：①在微泡上结合抗肿瘤相关抗原的单克隆抗体，通过抗体与抗原的结合达到肿瘤新生血管的靶向显影。Howard等^[24]首先将抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的单克隆抗体通过生物素桥结合到脂质体微泡表面，制备出能与 $\alpha_v\beta_3$ 特异结合的微泡，第一次在肿瘤血管模型中实现了靶向显影，但由于特异性结合的靶向微泡数量有限，仅实现了彩色信号增强。②利用结合有 $\alpha_v\beta_3$ 抑制剂的超声造影剂微泡选择性到达肿瘤血管，抑制肿瘤特异性抗原的表达，从而阻断肿瘤性血管的生成，促进肿瘤相关小血管的凋亡，达到靶向治疗的目的^[25]。也可利用包载有治疗基因和药物的微泡在空化效应下靶向释放治疗基因和药物，从而达到治疗的目的。Unger等^[26]在瘤体内注入超声造影剂和p53基因后再用超声照射，既可有效地控制肝癌基因治疗的靶向性，又能提高外源基因的表达量。③利用空化效应及造影剂微泡破碎供给肿瘤营养的微血管和周围部分组织，一方面可激发增强凝血酶活性，形成血栓阻塞血管。切断肿瘤组织的血液供给；另一方面可使肿瘤细胞膜结构破损、增殖活性降低、转移能力下降并易受到免疫细胞攻击及放化疗的杀伤，从而达到抑制肿瘤生长的目的^[27]。④利用超声热效应、机械效应和空化效应直接杀死肿瘤细胞或组织。如高强度聚焦超声，就是将高功率声波聚焦于深部肿瘤组织，通过超声空化效应、热效应、机械效应对深部肿瘤组织造成不可逆性损伤，使之发生凝固性坏死，达到治疗肿瘤的目的^[28]。

1.4 纳米超声造影剂

纳米级造影剂是指粒径在纳米尺度范围内的造影剂，通常将粒径小于 1000 nm 的造影剂均称为纳米级造影剂。常规微泡超声造影剂是一种微米级造影剂，微泡的平均直径约 2~5 μm ，小于红细胞，可以自由通过肺循环，但不透过血管，是一种血池显像剂，限制了其对血管外疾病的诊断和治疗^[29]。随着分子成像技术

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