

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 24020051302555

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

明胶-硅氧烷纳米颗粒作为基因载体的应用

Preparation and Characterization of Gelatin-Siloxane Nanoparticles as Gene Delivery System

赵 阳

赵 阳

指导教师姓名: 任 磊 教 授

专 业 名 称: 生 物 医 学 工 程

论文提交日期: 2008 年 7 月

论文答辩日期: 2008 年 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

指 导 教 师 任 磊 教 授

厦 门 大 学

2008 年 7 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 .....                          | II |
| 第一章 绪论.....                             | 1  |
| 1.1 引言.....                             | 1  |
| 1.2 病毒载体.....                           | 2  |
| 1.3 非病毒载体.....                          | 2  |
| 1.4 基因治疗的关键问题.....                      | 10 |
| 1.5 本课题的背景和研究内容.....                    | 11 |
| 参考文献.....                               | 15 |
| 第二章 以氨水为催化剂合成明胶-硅氧烷纳米颗粒作为基因载体的研究.....   | 22 |
| 2.1 引言.....                             | 22 |
| 2.2 实验试剂和仪器.....                        | 23 |
| 2.3 实验方法.....                           | 25 |
| 2.4 结果.....                             | 32 |
| 2.5 讨论.....                             | 47 |
| 2.6 本章小结.....                           | 51 |
| 参考文献.....                               | 53 |
| 第三章 引入 APTMS 合成明胶-硅氧烷纳米颗粒作为基因载体的研究..... | 55 |
| 3.1 引言.....                             | 55 |
| 3.2 实验试剂和仪器.....                        | 56 |
| 3.3 实验方法.....                           | 58 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.4 结果.....                                  | 62        |
| 3.5 讨论.....                                  | 75        |
| 3.5 本章小结.....                                | 77        |
| 参考文献.....                                    | 78        |
| <b>第四章 活性多肽修饰的明胶-硅氧烷纳米颗粒作为基因治疗载体的研究.....</b> | <b>77</b> |
| 4.1 引言.....                                  | 79        |
| 4.2 实验试剂和仪器.....                             | 80        |
| 4.3 实验方法.....                                | 83        |
| 4.4 结果.....                                  | 88        |
| 4.5 讨论.....                                  | 106       |
| 4.6 本章小结.....                                | 108       |
| 参考文献.....                                    | 109       |
| 全文结论及展望.....                                 | 111       |
| 硕士期间发表论文情况.....                              | 113       |
| 致 谢.....                                     | 114       |

厦门大学博硕

## Contents

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abstract in Chinese</b> .....  | <b>I</b>  |
| <b>Abstract in English</b> .....  | <b>II</b> |
| <b>Chapter 1 Reviews</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1 Instruction .....   | 1         |
| 1.2 Viral vector .....  | 2         |
| 1.3 Non-viral vector .....  | 2         |
| 1.4 Key points in gene therapy .....  | 10        |
| 1.5 The Proposal and Contents of This Study .....   | 11        |
| Reference .....   | 15        |
| <b>Chapter 2 Preparation and characterization of GS-N nanoparticles as gene delivery system</b> ..... | <b>22</b> |
| 2.1 Introduction .....  | 22        |
| 2.2 Materials .....   | 23        |
| 2.3 Experimental .....  | 25        |
| 2.4 Results .....   | 32        |
| 2.5 Discussion .....  | 47        |
| 2.6 Conclusions .....   | 51        |
| References .....  | 53        |
| <b>Chapter 3 Preparation and characterization of GS-A nanoparticles as gene delivery system</b> ..... | <b>55</b> |
| 3.1 Introduction .....  | 55        |
| 3.2 Materials .....   | 56        |
| 3.3 Experimental .....  | 58        |
| 3.4 Results .....   | 62        |
| 3.5 Discussion .....  | 75        |
| 3.5 Conclusions .....   | 77        |
| References .....  | 78        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Chapter 4 Preparation and characterization of Tat-GS-A nanoparticles as gene delivery system</b> ..... | <b>79</b>  |
| <b>4.1 Introduction</b> .....   | <b>79</b>  |
| <b>4.2 Materials</b> .....  | <b>80</b>  |
| <b>4.3 Experimental</b> .....   | <b>83</b>  |
| <b>4.4 Results</b> .....  | <b>88</b>  |
| <b>4.5 Discussion</b> .....   | <b>106</b> |
| <b>4.6 Conclusions</b> .....  | <b>108</b> |
| <b>References</b> .....   | <b>109</b> |
| <b>Conclusions and Future Works</b> .....   | <b>111</b> |
| <b>Publications</b> .....   | <b>113</b> |
| <b>Acknowledgements</b> .....   | <b>114</b> |

廈門大學博碩

## 摘 要

基因治疗的主要目的是研制安全有效的基因转染载体。在基因转染载体中，非病毒载体以其低毒性、低免疫原性、低致瘤性及易于制备等优点具有良好的应用前景。本文以新型有机-无机杂化材料——明胶-硅氧烷纳米颗粒为基础，探讨了此种材料的合成机制，将其应用于基因治疗，并以活性多肽修饰表面增强功能性。取得的主要成果有：

1. 以明胶、GPSM 和氨水作为反应物，或以明胶、GPSM 和 APTMS 作为反应物，通过溶胶-凝胶法，制得两种阳离子明胶-硅氧烷颗粒。探讨了两种纳米颗粒的合成机制，探索了一种全新材料的合成和表征方法。
2. 利用明胶-硅氧烷纳米颗粒与质粒 DNA 的相互作用，系统地研究了明胶-硅氧烷纳米颗粒作为基因载体的理化性质。纳米颗粒/DNA 复合物，能够稳定存在于血清、核酸酶 DNase I、弱酸性和中性的环境中，对 DNA 具有很好的保护作用，是优良的非病毒基因载体。
3. 从提高明胶-硅氧烷纳米颗粒的转染效率的角度出发，借助 Tat 多肽，对纳米颗粒表面进行修饰，系统地考察了多肽-明胶-硅氧烷载体作为非病毒载体的潜力。多肽修饰后的纳米颗粒，表面电位升高，纳米颗粒/DNA 复合物，能够稳定存在于血清、核酸酶 DNase I、弱酸性和中性的环境中，对 DNA 具有很好的保护作用，具有进行基因转染的巨大潜力。

关键词：明胶-硅氧烷；非病毒载体；基因转染



## Abstract

The main objective in gene therapy is the development of efficient, non-toxic gene carriers. Non-viral vectors provide opportunities for improved lower toxicity, non-pathogenic and more facile manufacturing. In this work, the new hybrid nanoparticles with organic-inorganic contents of gelatin and siloxane were successfully synthesized. We described the synthesis of gelatin-siloxane nanoparticles and tested these vectors based on those NPs as vectors for gene therapy. The main results are as follows:

1. Preparing gelatin-siloxane nanoparticles by a sol-gel process in gelatin, GPSM, ammonia system or gelatin, GPSM, APTMS system. The synthetic scheme was also studied.
2. A systemic study of nanoparticles/DNA complexes in gene therapy was conducted. The complexes with nanosized diameters could protect DNA from digestion in phosphate buffer solution (pH 7.0 and pH 6.0), serum and DNase I solution.
3. The strategie to improve transfection ability of gelatin-siloxane nanoparticles comprise functionalizing the surface of the NPs with biofunctional peptide. A systemic study of peptide-NPs/DNA complexes in gene therapy was conducted. The peptide-NPs with higher surface charges and nanosized diameters could protect DNA from digestion in phosphate buffer solution (pH 7.0 and pH 6.0), serum and DNase I solution.

Key words: Gelatin-siloxane; Non-viral vector; Gene therapy

## 第一章 绪论

### 1.1 引言

基因治疗 (gene therapy) 是把治疗用的基因或核酸传送到病患的特定细胞中, 在基因水平上对遗传缺陷进行纠正, 达到治疗疾病目的的一种方法[1]。多种由基因缺陷导致的疾病, 血友病[2], 肌肉萎缩症[3]或囊胞性纤维症[4]都可以通过校正感染细胞中的缺陷基因进行治疗。基因治疗还可以通过增强天然蛋白的效用, 改变原有基因的表达, 产生细胞毒素或具有酶活性的前药去除病变细胞[5, 6]等方式, 对心血管疾病[7]、神经官能症[8, 9]、传染性疾病[10]、创伤[11]和癌症[12]进行治疗。

由于基因治疗的巨大潜力, 近二十年来, 它一直是众多研究者的重点。正如 Richard Roblin—美国总统生物伦理学委员会科学总监在 1979 年所提出的: “有某种东西在巧妙地驱使着我们从疾病根源, 即分子水平上治疗疾病, 从而深入问题的核心” [13]。1990 年, 基因治疗的首个临床病例用于治疗多种免疫缺陷综合症 (SCID) [14]。2000 年 4 月, 基因治疗的首个成功病例是 Cavazzana-Calvo 等人治愈了两个患  $\gamma$ c-SCID 的婴儿[15]。Khuri 等人报道了以基因治疗和传统的化疗相结合的手段治疗头颈再发性鳞状细胞癌, 已经成功完成 II 期临床实验[16]。

近年来, 分子生物学和生物技术的飞速发展, 以及人类基因组计划的完成, 给研究疾病的基因本质提供了前所未有的机会, 并将迅速推动人类疾病的 DNA 诊断及基因治疗研究, 从而导致在将来把基因治疗作为治愈疾病的一种整体策略的实现[17]。人类有十万个基因, 基因病有四千多种, 基因缺陷是造成 25% 的生理缺陷, 50% 儿童死亡和 60% 成年人疾病的原因。因此, 一旦基因治疗在临床上的应用得以实现, 将改变医药界的面貌, 开创基因作为药物的新纪元, 对医药工业产生深远的影响。

基因治疗体系包括治疗性基因和基因载体。载体可以运载治疗基因, 保护其不被体内外环境所降解, 最终达到目的细胞中, 完成基因表达。寻找长效、靶向性、高效和生物安全的可控载体成为目前基因治疗研究中的最大难点[18]。

基因载体可分为两种: 病毒载体和非病毒载体。

## 1.2 病毒载体

病毒载体，就是将野生型病毒加以改进，使其可以携带外源基因并包装成病毒颗粒导入人体，同时必须去除其致病性。逆转录病毒（retrovirus, Rt）、慢病毒（lentivirus）、腺病毒（adenovirus, Ad）、腺相关病毒（adeno-associated virus, AAV）、单纯疱疹病毒（herpes simplex virus, HSV）和痘病毒（pox virus）都可以经过重新整合，在基因组中嵌入治疗基因，从而作为基因载体使用。病毒载体转染效率较高，可达 90%以上。病毒载体是目前报道的基因治疗的主要手段，约有 69%已经应用于临床实验[19]。

由于病毒载体是由活性病毒重新整合获得，因此仍然具有致病可能性，免疫原性，较高毒性，目的基因容量小，靶向特异性差等缺点，并且制备复杂，实现大规模生产十分困难。大多数逆转录病毒载体可感染处于有丝分裂期的细胞[20]。慢病毒如人类免疫缺陷病毒（HIV）载体可以感染非分裂期细胞[21]。人类基因治疗史上首例被确认为因基因治疗而死亡的病例就是采用的腺病毒载体[22]。2003年1月，由于在9例患缺陷免疫疾病的患者进行治疗后，出现了2例急性T细胞性淋巴瘤白血病，FDA延期了所有类似临床研究，调查结果表明，是由于病毒出现插入性诱变引起的[22]。

## 1.3 非病毒载体

非病毒载体具备生物安全性，灵活性以及易于生产制造等特点。非病毒载体是表面带有正电荷的物质，通过静电引力作用结合表面带有负电荷的DNA或RNA，包裹治疗用基因，形成几十到几百个纳米的正电性复合物颗粒，如图1-1。复合物可以保护基因不被细胞内外物质降解。复合物表面的正电荷可以使其被负电性的细胞膜吸附，通过内吞途径进入细胞[23]。

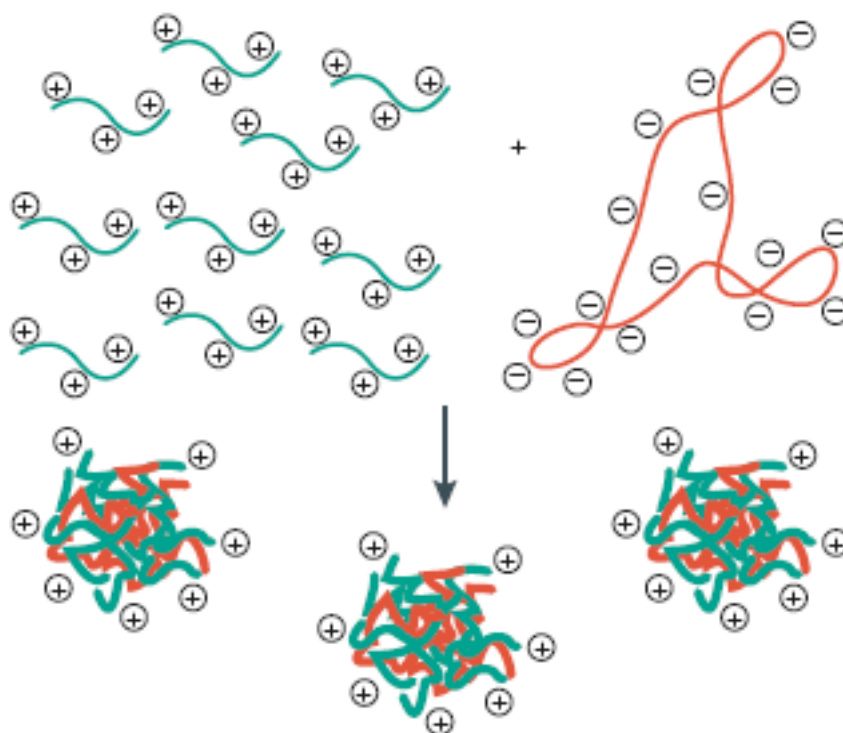


图 1-1 非病毒载体和基因物质结合形成复合物的过程图[18]

Fig. 1-1 Scheme of complex with non-viral vector and genetic material

### 1.3.1 阳离子脂质体

阳离子脂质体的基本结构是一个带正电荷的头部基团（亲水基团）连接在一个疏水基团上，因此所有的阳离子脂质体都是两亲性化合物。头部基团一般是带有一个或数个氨基的长链胺类基团，疏水基团则主要有两类——脂肪酰链和胆固醇环。阳离子脂质体介导核酸转运的机制是带正电荷的阳离子脂质体与带负电荷的核酸序列通过静电作用形成缀合物，利用其亲脂性进入细胞，在细胞内核酸序列被慢慢释放出来并在细胞核表达或控制基因表达[24, 25]。

阳离子脂质体载体最早被应用于 1987 年[26]，Felgner 等用阳离子脂质体 Lipofectin 进行基因转染，Lipofectin 是由脂质体 N[1 (2, 3)二油烯氧基]丙基 N, N, N 三甲基胺（DOTMA）与中性脂质二油酰磷脂酰乙醇胺（DOPE）按摩尔比 1:1 组合而成。

阳离子脂质体主要有以下优点：较高的转运能力和转染效率；形成复合物时，不受基因体积大小等限制[27]；将原来 DNA 螺旋结构的庞大空间体积缩合至原

有体积百万分之一以下，加强了系统穿透能力[28]；合成方法简单。因此，至今仍是被研究的最为广泛的非病毒载体。但是阳离子脂质体的体内表达不稳定，极易被体内蛋白影响[29]。

### 1.3.2 阳离子聚合物

阳离子聚合物分为两种：天然聚合物，如蛋白质、多肽和聚糖；合成聚合物，如聚乙烯亚胺（PEI）、枝状高分子和聚氨酯。阳离子聚合物利用自身的氨基或铵盐，与 DNA 通过静电作用形成复合物。聚合物中的氨基和 DNA 中的磷酸根的比率（N/P）决定了复合物的形貌和粒径[30]。

近期关于阳离子聚合物的研究重点集中在生物相容性和生物可降解性的聚合物，如聚乳酸（PLGA）[31]和聚胺酯[32]。Yi 等人合成了 PLGA 纳米颗粒（粒径 100–300 nm）和 VEGF 质粒 DNA 结合后，可以对心肌细胞进行基因转染[31]。Zugates 等人合成了侧链含有二硫吡啶基团的聚 $\beta$ -胺酯。此种材料可通过二硫键氧化进而修饰多肽或配基[33]。

#### 1.3.2.1 壳聚糖

天然聚合物中，壳聚糖是最常用的基因载体之一[34]。不同分子量的壳聚糖都显示出良好的生物相容性，可以高效的包裹核酸。壳聚糖/DNA 复合物的转染效率由以下因素决定：壳聚糖的脱乙酰度和分子量，质粒 DNA 浓度，壳聚糖中的氨基和 DNA 中的磷酸根的比值（N/P），血清浓度，pH 和细胞种类[35, 36]。Ishii 等人系统研究了壳聚糖/荧光素酶质粒在不同条件下的转染效率[35]。结果表明，在 SOJ 细胞（胰腺癌细胞系）中，在壳聚糖分子量是 40 kDa，N/P 是 5，pH 7.0，含有 10%小牛血清的条件下，转染效率最高。研究表明，同样培养条件下，不同细胞系中，壳聚糖介导的基因治疗最佳转染效率不同[37, 38]。

由于壳聚糖具有易于制备凝胶的特点，因此基于壳聚糖的基因治疗已被成功应用于口鼻治疗中。以壳聚糖/ pIFN- $\gamma$ （表达干扰素 IFN- $\gamma$ 的质粒）颗粒作为基因疫苗，治疗卵蛋白致敏小鼠，过敏反应被有效抑制，可避免感染哮喘[39]。用壳聚糖/ pIFN- $\gamma$ 颗粒进行预防治疗后，小鼠的脾细胞中 IFN- $\gamma$ 分泌物增加，IL-5 和 IL-4 分泌物减少。Kumar 等人将呼吸道合胞病毒（RSV）的 DNA 和壳聚糖进行

复合,以纳米颗粒的形式作为基因疫苗注入小鼠体内。当小鼠处于可以感染 RSV 的环境中,与裸 DNA 疫苗组比较,壳聚糖组可显著降低 RSV 的感染率和抗原含量[39]。

壳聚糖/DNA 基因治疗体系还具备应用于组织工程和医学再生领域的潜力。为增进转染效率,对壳聚糖进行改性,得到的衍生物主要有乙胺基甲壳素(AEC)[40], 巯基化壳聚糖[41], 壳聚糖-甲基聚乙二醇-胆固醇(LCP-Ch)[42]和低分子量羧甲基壳聚糖[43]。为增加对细胞和组织的靶向性,壳聚糖和叶酸(FA)共价结合形成的载体,可通过叶酸受体,特异性识别肿瘤细胞并成功实现内化[44, 45]。

Liu et 等人报道了壳聚糖作为载体,递送小分子干扰 RNA (siRNA),最终沉默特定基因,防止病毒感染[46]。研究表明,高分子量(114 and 170 kDa)和高脱乙酰度(84%)的壳聚糖可以在 N/P 是 150 的条件下,和 siRNA 结合,形成最稳定的复合物。与商品化载体相比,壳聚糖载体表现出最高的基因沉默率(80%)。

### 1.3.2.2 聚醚酰亚胺(PEI)

PEI 的表面带有大量正电荷,可以更为高效的结合 DNA 分子并具有缓冲能力,因此转染效率较高。

利用 PEG 修饰 PEI (PEG-PEI) 是目前最常用的方法[47]。Sethuraman 等人合成了 PEI 的聚合物和 pH 敏感性的共聚物 PSD 的共价结合物[48]。在 pH 7.4 的环境中,PSD 表面修饰后的 PEI/DNA 复合物显示出低毒性和低转染效率。但是在肿瘤胞外基质的 pH 6.6 的环境中,此种复合物显示出高毒性和高转染效率。Nimesh 等人报道了两种新型 PEI 纳米颗粒:PEI 以离子键与 PEG-磷酸双酯交联,PEI 以共价键与 PEG-二硝苯碳酸交联[49]。同脂质体和 PEI 相比,在 COS-1 细胞中,这两种纳米颗粒均表现出较高的转染效率和较低的毒性。

Wightman 等人系统的比较了枝状和线性的 PEI 在不同的 N/P 和盐浓度的条件下,与 DNA 结合成复合物后的转染效率[50]。研究发现,不含盐时,线性 PEI (22 kDa) 和 DNA 形成小颗粒,在肺部进行高效转染;加入盐后,颗粒迅速聚集。枝状 PEI (25 kDa) 则相反,在大多数器官中的转染效率较低,加入盐后,

小颗粒不会聚集。线性 PEI 体内的高效转染可能是由于在高盐浓度的血液中, PEI 结构发生改变。

### 1.3.2.3 明胶

明胶是由胶原变性得到的一种蛋白质高分子, 也是一种常用的基因载体。在囊肿性纤维化模型中, 在缺陷型支气管上皮细胞内进行体外实验, 以明胶/ pCFTR (囊肿型纤维控制基因质粒) 进行的基因治疗, 结果显示出其对细胞的功能性修复[51]。近来, 有研究表明阳离子明胶可以通过输尿管, 在肾脏中靶向到肾间质组织[52, 53]。阳离子明胶可以递送 siRNA, 对 TGF-h 受体基因进行沉默。携带 siRNA 的质粒 DNA 和明胶形成复合物, 导入输尿管, 最后进入肾组织。以胶原替代明胶, 基因沉默效率降低。以上结果表明, 明胶不仅可以作为基因载体, 而且可以承载 siRNA 进而沉默特定基因, 因此明胶在组织再生领域具有应用潜力[54, 55]。

### 1.3.3 无机化合物

#### 1.3.3.1 纳米金

近十年来, 金纳米颗粒因其容易制备和表面多功能化而日益受到关注。Rotello 小组研究了在模拟细胞内谷胱甘肽浓度的环境中, DNA 可从其与纳米金形成的复合物中释放, 得到了一种全新的 DNA 的控释体系[56]。此种体系还可应用于哺乳动物细胞的转染[57]。优化的纳米金在 293T 细胞中, 10%血清和 100 mol/L 氯喹的环境下, 转染效率是 60 kDa PEI 的 8 倍。最近, 他们以光敏性的 O-硝基苯酯为配基构建了一种阳离子纳米金, 实现了以紫外光照射对 DNA 的控释[58], 过程如图 1-2。体内实验显示了此种材料在鼠胚胎层纤维细胞中, 可高效递送和控释 DNA。Niidome 小组以 2-氨基乙烷修饰纳米金, 得到了一种简单的基因载体[59]。这种载体可以对 HeLa 细胞进行转染, 转染效率高于裸 DNA 100 倍。之后, 他们用 PEG 进行表面修饰, 显著降低了血液清除率并增加了基因表达率[60]。Thomas 等人将 PEI (约 2 kDa MW) 和纳米金共价结合, 得到的载体可将质粒 DNA 递送至 COS7 细胞中[61]。

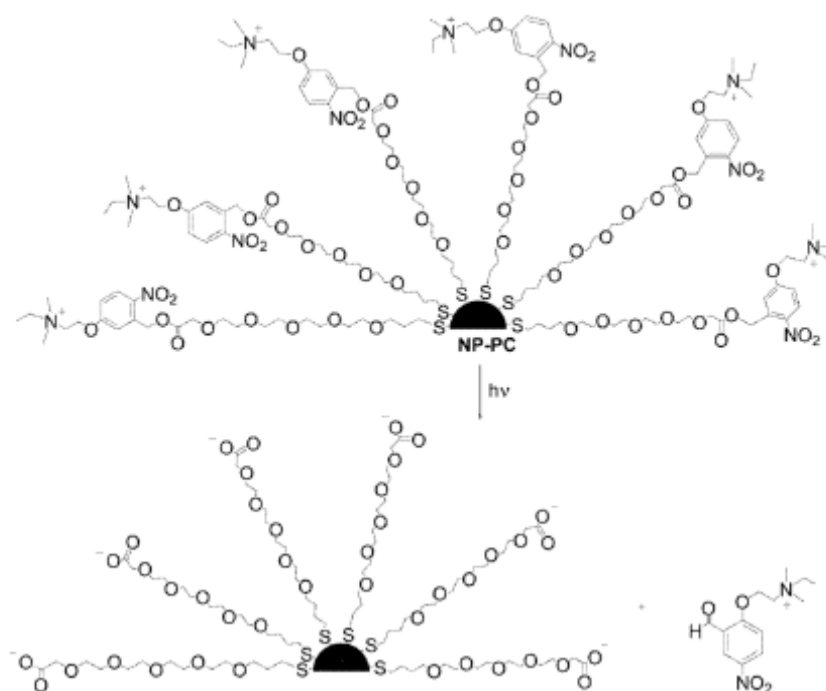


图 1-2 光敏性纳米金的光照转化过程图[58]

Fig. 1-2 Representation of light-induced transformation of photolabile gold nanoparticles (NP-PC) by Han et al [58]

### 1.3.3.2 磁性纳米颗粒

作为磁性纳米颗粒，利用体外磁场的效应可以引导其在体内定向移动，定位集中的到靶向组织、器官或特定细胞，从而使其递送的 DNA 可以准确和高效的进入治疗部位，如图 1-3，显著增进了转染效率[62]。Plank 小组最早将磁性纳米颗粒应用于基因治疗[63]。最常用的磁性物质是超顺磁性的铁氧纳米颗粒 (IONPs)，主要有 $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ，其他金属如  $\text{Co}(\text{II})$ ， $\text{Mn}(\text{II})$ ， $\text{Cu}(\text{II})$ ， $\text{Ni}(\text{II})$ ， $\text{Cr}(\text{III})$ 和  $\text{Gd}(\text{III})$ 。

铁氧磁性纳米颗粒已被广泛的应用于磁性共振成像，并且药代动力学和毒性也已经有部分研究[64]。这些纳米颗粒极易进行合成和表面修饰。在表面修饰一层生物相容性的聚合物或生物分子可以使此种材料具备多种活性。Scherer 等人报道了一种以 PEI 修饰的磁性铁氧纳米颗粒，研究了其进入细胞的过程[65]。体外磁场可将载体/DNA 复合物快速聚集至细胞膜附近，易于内化并且不干扰内吞



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩