

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 21620120153780

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

溶酶体上的 v-ATPase-Ragulator 复合体是
AMPK 和 mTORC1 共同的激活因子

The Lysosomal v-ATPase-Ragulator Complex Is a Common
Activator for AMPK and mTORC1

张宸崧

指导教师姓名: 林 圣 彩 教 授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2015 年 月

论文答辩时间: 2015 年 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

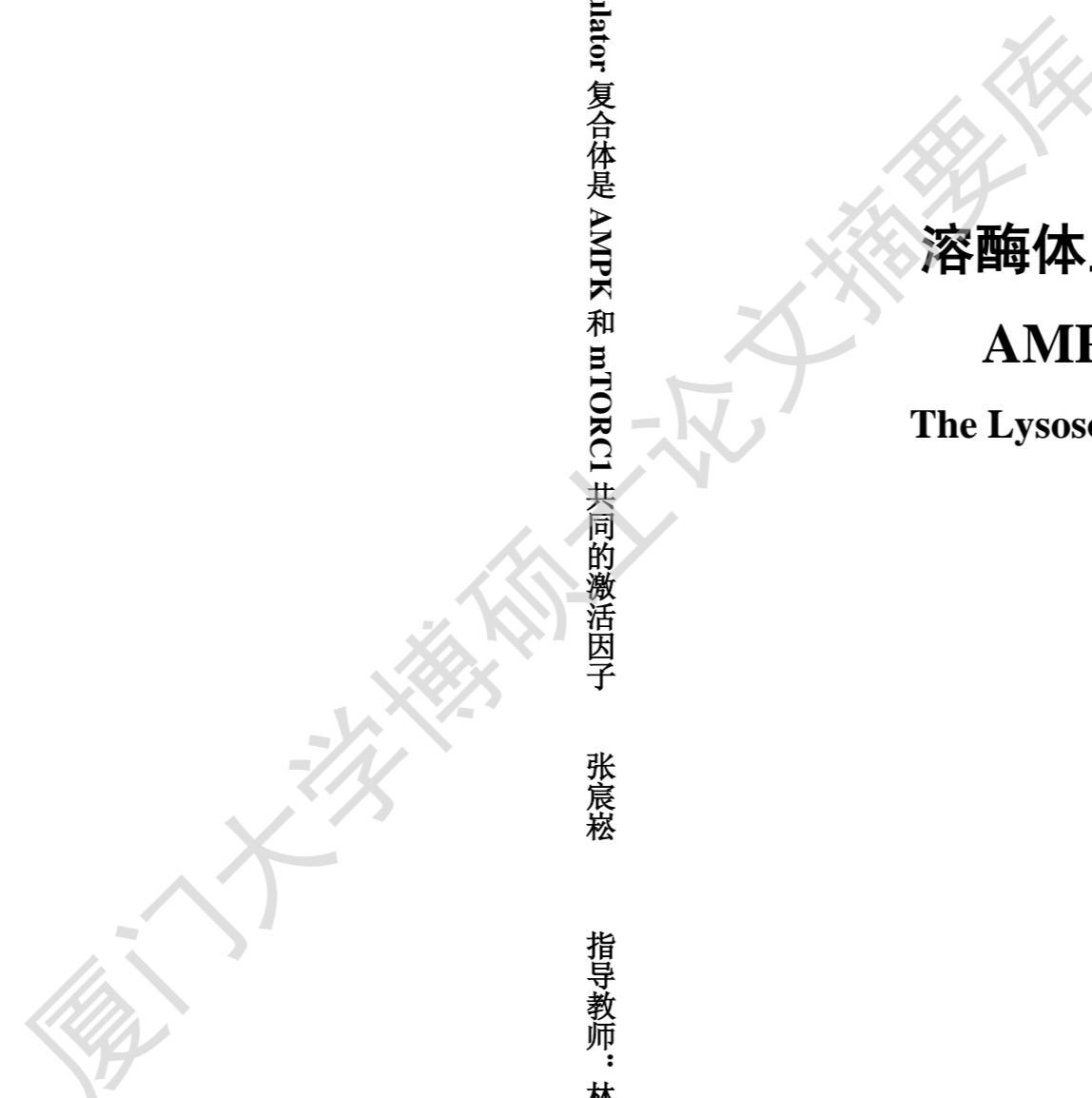
2015 年 月

溶酶体上的 v-ATPase-Ragulator 复合体是 AMPK 和 mTORC1 共同的激活因子

张宸崧

指导教师: 林圣彩 教授

厦门大学



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

厦门大学博士

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

中文目录.....	I
英文目录.....	IV
中文摘要.....	VII
英文摘要.....	VIII
第一章.前言.....	9
1.1 AMP 激活的蛋白质激酶 (AMPK)	9
1.1.1 AMPK 简介	9
1.1.2 AMPK 复合体的组成	9
1.1.3 AMPK 的调控	11
1.1.4 AMPK 对代谢的调控	14
1.2 哺乳动物的雷帕霉素靶体 (mTOR)	17
1.2.1 mTORC1 和 mTORC2 复合体的组成.....	17
1.2.2 mTORC1 的调控	18
1.2.3 mTORC1 对代谢的调控	22
1.3 立题背景.....	25
第二章. 材料和方法.....	26
2.1 质粒.....	26
2.2 细胞培养.....	26
2.2.1 细胞系	27
2.2.2 瞬时转染和慢病毒的包装.....	27
2.2.3 原代肝细胞的分离	27
2.2.4 免疫荧光染色	28
2.3 蛋白质相关实验.....	28
2.3.1 免疫共沉淀和免疫印迹	28
2.3.2 重组蛋白的表达	29
2.3.3 蔗糖梯度分离晚期内吞体/溶酶体	29
2.3.4 蔗糖梯度分离不溶于去污剂的膜成分 (DRM)	30

2.3.5	Light organelles 的分离	30
2.3.6	体外磷酸化/去磷酸化实验	30
2.3.7	体外重构实验	31
2.3.8	核苷酸交换实验	31
2.4	小鼠相关实验	32
2.4.1	小鼠运动实验	32
2.4.2	实时荧光定量 PCR	32
第三章	结果与讨论	34
3.1	结果	34
3.1.1	LAMTOR1 是一个新的 AXIN 相互作用蛋白	34
3.1.2	LAMTOR1 肝脏和肌肉特异性敲除小鼠的构建和检验	37
3.1.3	LAMTOR1 敲除的小鼠肝脏或细胞失去了响应饥饿信号引 起的 AMPK 激活的能力	40
3.1.4	Ragulator 作为一个整体参与了 AMPK 的激活过程	51
3.1.5	葡萄糖饥饿引起了溶酶体上的 Ragulator-AXIN/LKB1-AMPK 复合体的形成	52
3.1.6	溶酶体结构本身是 AMPK 激活的重要因素	64
3.1.7	LAMTOR1 的存在降低了激活 AMPK 所需要的 AMP 浓 度	71
3.1.8	AXIN 对于葡萄糖饥饿状态下 LKB1 向溶酶体上迁移的过程 起到了重要的作用	76
3.1.9	AMPK 和 TSC2 都和葡萄糖饥饿条件下 AXIN-LKB1 的溶酶 体迁移过程无关	80
3.1.10	V-ATPase 和 Ragulator 一起促进了 AXIN/LKB1 向溶酶体迁 移	88
3.1.11	葡萄糖饥饿的条件下 AXIN 促进了 v-ATPase 对 mTORC1 的抑制	97
3.1.12	AXIN 通过抑制了 Ragulator 的 GEF 活力	110

3.2 讨论.....	116
参考文献.....	119
致谢.....	133
图表索引.....	135
在学期间发表论文.....	142

厦门大学博

TABLE OF CONTENT

TABLE OF CONTENT	IV
ABSTRACT IN CHINESE.....	VIII
ABSTRACT IN ENGLISH	VIII
CHAPTER 1 INTRODUCTION	9
1.1 AMP-activated protein kinase (AMPK)	9
1.1.1 A general introduction to AMPK	9
1.1.2 Composition of AMPK complex	9
1.1.3 Regulation of AMPK	11
1.1.4 Metabolic controls of AMPK.....	14
1.2 Mechanistic/Mammalian target of rapamycin (mTOR)	17
1.2.1 Composition of mTORC1 and mTORC2	17
1.2.2 Regulation of mTORC1	18
1.2.3 Metabolic control of mTORC1	22
1.3 Background.....	25
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS	26
2.1 Plasmids	26
2.2 Cell culture.....	26
2.2.1 Cell lines	27
2.2.2 Transient transfection and lentivirus packaging	27
2.2.3 Isolation of primary hepatocytes.....	27
2.2.4 Immunofluorescence.....	28
2.3 Protein-related experiments	28
2.3.1 Immunoprecipitation and immunoblotting	28
2.3.2 Protein expression.....	29
2.3.3 Sucrose gradient centrifugation for preparation of late endosomes.....	29

2.3.4	Sucrose gradient centrifugation for preparation of detergent resistant membrane (DRM).....	30
2.3.5	Isolation of light organelles	30
2.3.6	In vitro phosphorylation/dephosphorylation assays.....	30
2.3.7	In vitro reconstitution.....	31
2.3.8	Nucleotide exchange assays.....	31
2.4	Mouse-related experiments.....	32
2.4.1	Mouse exercise studies	32
2.4.2	Quantitative real-time PCR.....	32
CHAPTER 3 RESULTS AND DISCUSSION		34
3.1	Results.....	34
3.1.1	LAMTOR1 is a novel AXIN interacter	34
3.1.2	Generation and verification of LAMTOR1 liver- and muscle-specific knockout mice.....	37
3.1.3	LAMTOR1 deficiency eliminates AMPK activation in mouse liver and cells upon starvation	40
3.1.4	Ragulator functions as an integral regulator to AMPK activation.....	51
3.1.5	Glucose starvation induces Ragulator-AXIN/LKB1-AMPK complex formation on lysosome.....	52
3.1.6	Lysosome per se is important for AMPK activation.....	64
3.1.7	LAMTOR1 lowers AMP threshold concentrations for activation of AMPK.....	71
3.1.8	AXIN plays important roles in glucose-starvation triggered translocation of LKB1 to lysosome	76
3.1.9	Neither AMPK nor TSC2 plays a part in glucose-starvation induced lysosomal translocation of AXIN-LKB1.....	80

3.1.10 V-ATPase and Ragulator together facilitate endosomal translocation of AXIN/LKB1	88
3.1.11 AXIN facilitates v-ATPase inhibition-triggered inhibition of mTORC1 upon glucose starvation.....	97
3.1.12 AXIN inhibited the GEF activity of Ragulator	110
3.2 Discussion	116
REFERENCE.....	119
LIST OF FIGURES AND TABLES	135
PUBLICATIONS	142

廈門大學博

摘要

AMPK 和 mTORC1 是机体和细胞内最重要的调节代谢稳态的分子。人们已经发现, AMPK 复合体能够通过与其体内 AMP 结合从而感知体内 AMP/ATP 的水平, 并在该水平较高(即能量水平较低)的情况下引发其复合体活性的增加。该结果直接导致了多条信号通路的抑制或激活, 从而引起一系列的生理变化。其结果是增加体内的产能代谢从而达到稳定体内能量水平的作用。与 AMPK 相反, mTORC1 的激活需要在细胞内能量水平较高的情况下才能发生。mTORC1 激活进一步激活了一系列下游分子, 这些激活的分子造成的结果也恰恰和 AMPK 所造成的结果相反: 增加耗能的合成代谢从而促进细胞增殖。目前的研究还表明, AMPK 和 mTORC1 在肿瘤发生中都有极其关键的作用。这两个蛋白也的确是近年来代谢调节、肿瘤发生领域的研究热点。

之前的研究中, 我们发现了 AXIN 为 LKB1 激活 AMPK 所必需。AMP 作为能量缺乏信号启动了 AXIN-AMPK-LKB1 复合体的组装, 促进了 LKB1 对 AMPK 的激活。在本文中, 我们通过酵母双杂交的手段, 发现了 Ragulator 复合体中的重要组成成分 LAMTOR1 是 AXIN 的相互作用蛋白。之后的研究进一步发现, LAMTOR1 和 AXIN 一样, 是能量缺乏(如葡萄糖饥饿)的情况下 AMPK 激活所必须。LAMTOR1 和 AXIN 之间的相互作用也随着葡萄糖饥饿而增加。相应地, 我们发现 AXIN-LKB1 复合体在葡萄糖饥饿的情况下迁移到 LAMTOR1 所在的溶酶体上, 而这一过程依赖于 LAMTOR1 的存在。作为感知细胞能量和营养状态的成员, 和 Ragulator 相互作用的 v-ATPase 对于 AXIN 在能量缺乏的情况下的迁移也起到了至关重要的作用。AXIN-LKB1 迁移到溶酶体上能够进一步促进了 mTORC1 的解离, 这一过程是通过抑制 Ragulator 对 RAGs 的 GEF 活力而达到的。于是, 在能量缺乏的情况下, v-ATPase-Ragulator-AXIN-LKB1 复合体促进了 AMPK 的激活和 mTORC1 的抑制, 从而关闭合成代谢途径, 开启分解代谢途径。

关键词: v-ATPase-Ragulator; AMPK; mTORC1

ABSTRACT

AMPK and mTORC1 are the most important regulators that control metabolic homeostasis in cells and organisms. AMPK complex binds AMP thus sensing intracellular AMP/ADP levels and is activated when AMP/ADP levels increased. Activated AMPK activates or inhibits various signaling pathways, promotes ATP production and balances intracellular energy state. In comparison to AMPK, mTORC1 is activated when energy supplies are sufficient. mTORC1 activates a series of downstreams, which, opposite to AMPK, promotes catabolism thus facilitating cell proliferation. Recently, AMPK and mTORC1 have been identified as two important molecules that tightly associated with tumorigenesis. They become “hotspot” in the fields of metabolic control and tumorigenesis.

We have identified AXIN as an important regulator that is required for the activation of AMPK by LKB1. AMP acts as a low-energy signal that initiates the assembly of AXIN-LKB1-AMPK complex. Here, we identified LAMTOR1, a component of Ragulator complex, as a novel interactor of AXIN through yeast two hybrid screening. Similar to AXIN, LAMTOR1 plays critical roles in activating AMPK upon energy stresses such as glucose starvation. In addition, the interaction between AXIN and LAMTOR1 is increased upon glucose starvation. Accordingly, we found that AXIN-LKB1 complex translocated to lysosomal surface upon glucose starvation in a LAMTOR1-dependent manner. As a sensor of energy and nutrient state, v-ATPase-Ragulator functions as a critical trigger for facilitating the lysosomal translocation of AXIN-LKB1. Furthermore, lysosomal localized AXIN facilitates the dissociation of mTORC1 from lysosome through inhibiting the GEF activity of Ragulator towards RAGs. Taken together, upon energy stress, the complex formation of v-ATPase-Ragulator-AXIN-LKB1 facilitates the activation of AMPK and the inhibition of mTORC1, thereby switching anabolism to catabolism.

Key words: v-ATPase-Ragulator; AMPK; mTORC1

第一章. 前言

CHAPTER 1 INTRODUCTION

1.1 AMP 激活的蛋白质激酶 (AMPK)

1.1 AMP-activated protein kinase (AMPK)

1.1.1 AMPK 简介

1.1.1 A general introduction to AMPK

AMPK 是机体和细胞内最重要的调节代谢稳态的分子之一，近年来，它已经成为该领域研究的核心分子。在细胞中，ATP 作为“能量货币”，供给了众多基本的生命活动，如运动、蛋白质合成、神经系统的传导的进行。ATP 水解形成 ADP 和磷酸的过程同时提供了上述活动所需的能量。由此可见，ATP 是维持机体正常功能的“必备分子”，其稳态的维持就显得尤其重要。在饥饿等能量胁迫的条件下，线粒体的 ATP 产生受到影响，ADP 开始积累。为了维持 ATP 的稳态，机体内的腺苷酸激酶 (adenylate kinase) 催化两分子 ADP 生成 ATP 和 AMP，从而补充 ATP 的产生。在这样的情况下，体内 AMP 的水平就迅速提高。AMPK 复合体能够通过体内 AMP 结合从而感知体内 AMP/ATP 的水平，并在该水平较高的情况下被激活。这一结果直接导致了多条信号通路的抑制或激活，从而引起一系列的生理变化。总的来说，这些生理作用的结果是增加体内的产能代谢从而达到稳定体内能量水平的作用。由此可见，AMPK 作为体内能量的“感知着”，直接调节了机体内的能量平衡和代谢稳态[1]。

1.1.2 AMPK 复合体的组成

1.1.2 Composition of AMPK complex

AMPK 复合体由三个亚基组成，分别是 α (63kDa)、 β (37kDa)和 γ (30-63kDa)亚基。每个亚基行使着不同的功能但又相互协作。三种亚基存在不同的亚型，如

$\alpha 1$ 和 $\alpha 2$, $\beta 1$ 和 $\beta 2$, $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 和 $\gamma 3$ 。尽管目前发现在大部分细胞中普遍表达的是 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 和 $\gamma 1$ 组合, 但是 $\alpha 2$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 2$ 和 $\gamma 3$ 已经被发现表达于心肌和骨骼肌中[2]。

α 亚基由典型的 Ser/Thr 激酶结构域 (Ser/Thr kinase domain, KD) 组成, 其后紧随着的是一个自抑制结构域 (autoinhibitory domain, AID) 并与 β 亚基相连 (图 1.1) [3]。 α 亚基的激活需要其高度保守的 Thr172 (大鼠中) 残基被上游的 AMPK 激酶 (AMPKK) 磷酸化, 该区域称为“T-loop”[5]。这一磷酸化的残基可以在 γ 亚基结合了 AMP 并引起一系列构型变化之后传导至 α 亚基从而抑制其被去磷酸化的过程[6]。 γ 亚基是结合 AMP 并感受体内 AMP/ATP 水平的亚基。该亚基上具有的 CBS 结构域 (cystathionine beta synthase domain) 组成了两个 AMP 结构域, 称之为 Bateman 结构域。一个 AMP 分子结合在 Bateman 结构域上导致了第二个 AMP 分子结合能力的增强[8]。最近的研究表明, 别构效应是由于 AMP 结合到高亲和力的 1 号位点引起的, 这种结合导致了 γ 亚基的结构出现细微的变化, 并通过 β 亚基传导到 α 亚基上, 从而解除了 α 亚基的自抑制作用, 保持 pThr172 的磷酸化水平并在该情况下使 α 亚基的活性达到最高[6], 相反地, ATP 结合到 γ 亚基上则直接导致 AMPK 的失活[6]。 β 亚基是一个架构蛋白 (scaffold protein), 通过其 C 末端结构域与另外两个亚基相连。 β 亚基的另一个重要功能是提供了一种 AMP 非依赖性 (AMP independence) 的全酶激活功能, 其含有的非催化的 GBD 结构域 (glycogen-binding domain) 能够感知细胞内类似于糖原类的物质的水平从而采取一种与 AMP 水平互补的方式激活全酶[12]。

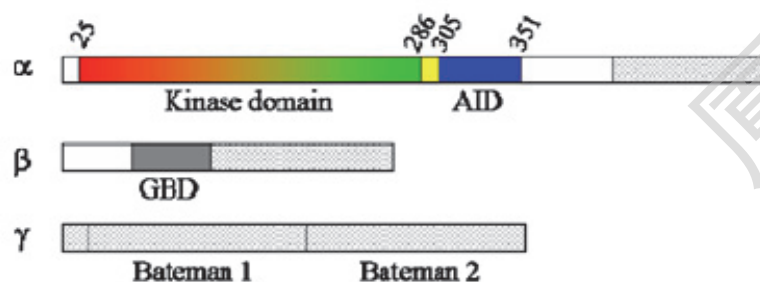


图 1.1 AMPK 复合体的结构域组成

Figure 1.1 Domain organization of AMPK complex

1.1.3 AMPK 的调控

1.1.3 Regulation of AMPK

相对于体内许多重要的调节因子，AMPK 的调节比较简单，已知的 AMPK 的调节方式主要有三种：AMPK α 亚基 T-172 残基的磷酸化；T-172 残基的去磷酸化和 AMP 结合 γ 亚基对 AMPK 的别构激活（图 1.2），以下分别说明这三个过程的具体调控机制。

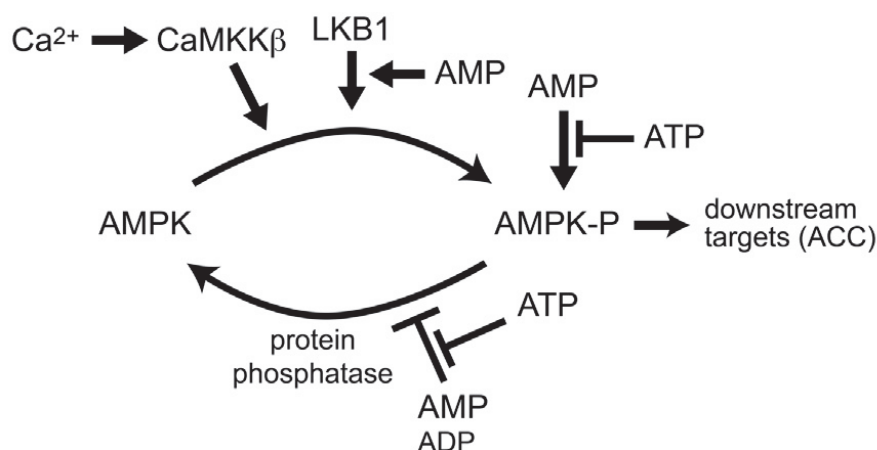


图 1.2 AMPK 的调节模式图[14]

Figure 1.2 Model for the regulation of AMPK

AMPK α T-loop 上的 T172 残基的磷酸化是 AMPK 激活的最主要的途径。目前已经知道，在大肠杆菌中表达出来的完全不带磷酸化的 AMPK 复合体完全没有活力，这种形式的 AMPK 也不能被 AMP 别构激活[15]。一旦 T172 残基被磷酸化，AID 结构域就与 KD 结构域解离使得 AMPK 被激活，完全的磷酸化可以使 AMPK 的活力大约增加到 100 倍以上，在此基础上，AMP 可以继续行使对 AMPK 的别构激活[3]。

T172 残基的磷酸化主要依赖于两个上游激酶，即 LKB1 和 CamKK，其中，LKB1 承接了大部分激活 AMPK 的信号对 AMPK 的激活，CamKK 则只介导细胞质内钙离子浓度升高时对 AMPK 的激活。在发现 AMPK 是 LKB1 的底物之前，LKB1 被鉴定为是一个肿瘤抑制因子因而引起了人们广泛的兴趣[16]，接下来的研究表明，除了 AMPK 外，LKB1 还可以磷酸化并激活 12 种和 AMPK 同源的激

酶, 这些激酶的 KD 结构域与 AMPK 非常接近, 被统称为 ARK 家族[19]。LKB1 和 STRAD、MO25 两个蛋白结合, 形成复合体后才具有催化活力[21]。

LKB1-STRAD-MO25 复合体是组成型激活的[16], 与之相反的是, AMPK 的激活需要如能量胁迫条件的诱发。这一独特的现象一直以来吸引了人们很大的注意力。目前已经发现, AMP 通过结合 γ 亚基可能引起了 AMPK 的变构, 这一变构的过程使得 LKB1 更容易磷酸化 AMPK[6], 也就是说, AMP 作为激活 AMPK 的重要分子, 其引起 AMPK 磷酸化的原理并不是通过激活其上游激酶, 而是通过调节 AMPK 本身达到的。

AMP 激活 AMPK 的需要 AMPK beta 亚基 N 末端的脂酰化 (豆蔻酰化), 缺少这一重要的修饰, AMPK 不能响应 AMP 的结合并加强 LKB1 对其的磷酸化[23]。这充分表明, 在体内, AMPK 可能受到更加深层次的因素的调节。

AMP 的浓度很低, 大约只有 ATP 含量的千分之一左右 (μM 级别), 以至于不能直接通过 HPLC 等方法准确测量而需要通过 ADP: ATP 的比值得到, 此外, 不论能量胁迫与否, 体内 ATP 的含量始终保持在 5 mM 左右, 这一浓度的 ATP 对 AMP 结合 γ 亚基形成了极其强烈的竞争作用。尽管如此, 生理浓度的 AMP 仍然能够结合 γ 亚基并且引起 AMPK 的别构激活[14], 可见, AMP 确实是 AMPK 真正的调节因子。

CaMKK 只在细胞内 Ca^{2+} 浓度升高时才会显著磷酸化 AMPK 的 T-172 残基[25]。生理状态下, 如神经元细胞的去极化过程[28]; 磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 (PLC) 偶联的受体激活, 以及 IP_3 的产生引起钙离子释放的过程[29]; 以及 T 淋巴细胞中 HMC 激活的过程都能够引起 CamKK 介导的 AMPK 的激活[32]。

值得一提的是, 除了引起钙离子升高的药物是通过 CamKK 引起 T-172 的磷酸化之外, 目前发现的大部分能够激活 AMPK 的药物, 包括模拟 AMP 结合 γ 亚基的 AICAR, 导致细胞能量水平下降, 产生过量 AMP 的二甲双胍类药物、2-DG、berberine 和直接结合 beta 亚基的 A-769662 等药物都是通过 LKB1 促进了 AMPK 的磷酸化[33]。其广泛的, 不完全依赖于 γ 亚基的对 AMPK 的别构调节的具体机制还有待将来进一步的研究。

AMP 结合 AMPK 同时保护了 AMPK 的 α 亚基的 T-172 不被去磷酸化而使得 AMPK 保持活力[6]。除了 AMP, ADP 也有抑制 AMPK 去磷酸化的作用[34], 但效果不如 AMP 那么强。在体外, 人们一般采用 PP2C 作为去磷酸化酶。但是, 在体内究竟是哪一个去磷酸化酶介导了这一过程目前还是未知的。研究发现, 在酵母中有两种磷酸酶可以去磷酸化 T-172。一种是 Glc7, 该蛋白是单个的 PP1 催化亚基, 可以和它的调节亚基 Reg1 形成复合体[35], 在哺乳动物中, 抑制 PP1 能够加强 AMPK 的磷酸化, 另一种是哺乳动物磷酸酶 PP6 的同源蛋白 Sit4[36]。在小鼠 MIN6 细胞中通过 siRNA 敲低实验发现, PP1 和它的靶向亚基 PPP1R6 形成的复合体可以去磷酸化 T-172, 不过需要强调的是, 在 DNA 序列上并没有发现 PPP1R6 和 Reg1 具有相关性[38]。另外一项实验发现在 HEK293 细胞中用 RNAi 技术敲低 PPM1E (属于 PPM 蛋白磷酸酶家族) 可以增加 T-172 的磷酸化水平, 这一蛋白与 PP1 和 PP6 所在的 PPP 家族并没有相关性[39]。

AMP 结合在被磷酸化的 AMPK 的 γ 亚基上能够进一步促进 AMPK 的活力 (激活 2-4 倍左右)。目前, 关于 AMP 结合在 γ 亚基上引起 AMPK 的别构激活的具体机制已经被很清楚地阐明了。AMP 结合在 γ 亚基上可以直接通过 γ 亚基和 α 亚基相连接的 RIM 结构域直接引起 AID 的变构, 在 T-loop 被磷酸化的情况下, 促进 AID 进一步远离 KD 从而引起 AMPK 的别构激活[40]。AMP 对于 AMPK 直接的别构激活在体内具有十分重要的地位, 目前已知, berberine 可以在 LKB1 不存在的细胞中直接激活 AMPK, 加强其对 ACC 的磷酸化。这一直接的别构激活依赖于 CamKK 提供的本底磷酸化[14]。

除了 AMP 之外, ADP 也被发现是 AMPK 的一个重要的调节分子。ADP 对 AMPK 的调节的重要性体现在酵母中, ADP 是唯一能够调节 AMPK 活力 (包括全部三种方式的调节) 的小分子[41]。尽管在哺乳动物体内 ADP 只能影响 AMPK 的去磷酸化而不影响其它两种调节方式[34], 但 ADP 作为细胞内含量较高的核苷酸, 其对 AMPK 的调节作用仍然值得重视。

除了 AMP、ADP 等核苷酸之外, 前述的糖原也可以通过结合 β 亚基起到抑制 AMPK 活力的作用[42], 糖原对 AMPK 的结合可以直接使得 AMPK 定位在糖原表面[43], 但是这一现象的生理意义尚不明朗。除了 AMPK, 体内还有另一

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.

廈門大學博