

学校编码: 10384

分类号密级

学号: 21620120153781UDC

廈門大學

博士学位论文

活性氧通过促进 RIP1 蛋白的自磷酸化进而增强肿瘤坏死因子诱导的坏死小体形成和程序性细胞坏死

ROS via promoting RIP1 auto-phosphorylation to enhance TNF-induced necrosome formation and subsequent necroptosis

张荧荧

指导教师姓名: 韩家淮 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2015 年 7 月

论文答辩时间: 2015 年 8 月

学位授予日期: 2016 年 12 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2015 年 8 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.....	2
第一章前言.....	3
1.1 细胞程序性死亡的概述.....	3
1.2 程序性细胞坏死的自上而下的信号传递.....	4
1.3 程序性细胞坏死中的 RIP1.....	6
1.4 程序性细胞坏死中的磷酸化调控.....	8
1.5 ROS 在程序性细胞坏死中的作用.....	8
第二章材料与方法.....	10
2.1 实验材料.....	10
2.2 实验仪器.....	11
2.3 主要的实验技术与方法.....	11
2.3.1 感受态细胞的制备.....	12
2.3.2 质粒 DNA 的提取方法.....	13
2.3.3 主要质粒的构建.....	16
2.3.4 细胞相关的实验.....	20
2.3.5 蛋白质相关的实验方法.....	22
2.3.6 活细胞内 ROS 的测定.....	24
2.3.7 细胞存活率的测定.....	25
2.3.8 细胞耗氧的测定.....	26
第三章实验结果与讨论.....	27
3.1 科学问题的提出（立题背景）.....	27
3.2 ROS 是否参与到细胞程序性坏死中，取决于该细胞在 TNF 的刺激下，能否诱发有 氧呼吸水平的显著增强.....	27
3.2.1 BHA 和 Amytal 对细胞程序性坏死的有无抑制作用与该细胞的类型有关.....	27
3.2.2 某种细胞发生程序性坏死时对 BHA/Amytal 的敏感性，与其在 TNF 刺激下有 氧呼吸被激活的程度成正相关关系.....	29
3.2.3 程序性坏死过程中，有氧呼吸水平决定了 ROS 产生的水平，并且这种 ROS 的产生是 RIP3 依赖的.....	32
3.3 TNF 诱导产生的 ROS 可以增强程序性坏死中坏死小体的形成.....	35
3.4 ROS 通过影响 RIP1，进而促进 TNF 诱导的程序性细胞坏死.....	40
3.5 ROS 可以促进 RIP1 在第 161 位丝氨酸的自磷酸化，而第 161 位丝氨酸的磷酸化对 于 RIP1 介导的程序性细胞坏死是必需的.....	43
3.5.1 BHA 和 Amytal 对程序性坏死的抑制作用和 RIP1 激酶活性缺失后造成的现象 一致.....	43
3.5.2 第 161 位丝氨酸确实是 RIP1 上行使功能的磷酸化位点，并且这个位点的磷酸 化对于 RIP1 介导的 TNF 引起的程序性细胞坏死是必需的。.....	45
3.5.3 第 161 位丝氨酸的磷酸化对于 RIP1 募集 RIP3 是必需的.....	49
3.5.4 ROS 水平的升高可以促进第 161 位丝氨酸的磷酸化，进而促进细胞的程序性 坏死.....	51
3.5.5 利用双点突变，进一步证实 ROS 的作用靶点在第 161 位丝氨酸的自磷酸化之 上.....	53

3.6 ROS 介导的 RIP1 活性的增强, 是通过 RIP1 上三个关键的半胱氨酸对 ROS 的感知实现的.....	56
3.6.1 RIP1 上的半胱氨酸参与到了 ROS 对程序性细胞坏死的增强调节中	56
3.6.2 RIP1 上的三个半胱氨酸——第 257 位、第 268 位和第 586 位半胱氨酸, 共同介导了 ROS 对程序性细胞坏死的增强作用	58
3.7 小结与讨论.....	64
附录一图表索引.....	67
附录二缩略语及中英文对照.....	69
参考文献:	73
致谢	79

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of content

Abstract in Chinese	错误！未定义书签。
Abstract in English.....	错误！未定义书签。
Chapter 1Introduction	错误！未定义书签。
1.1 A summary of necroptosis.....	错误！未定义书签。
1.2 The signaling transduction of necroptosis.....	错误！未定义书签。
1.3 RIP1 in necroptosis	错误！未定义书签。
1.4 Phosphorylation regulation during necroptosis.....	错误！未定义书签。
1.5 Function of ROS in necroptosis	错误！未定义书签。
Chapter 2Materials and methods.....	错误！未定义书签。
2.1 Materials	错误！未定义书签。
2.2 Instruments.....	错误！未定义书签。
2.3 Major techniques and methods.....	错误！未定义书签。
2.3.1 Preparation for competent cells.....	错误！未定义书签。
2.3.2 Extraction of plasmid DNA	错误！未定义书签。
2.3.3 Construction of major plasmids	错误！未定义书签。
2.3.4 Cell culture related	错误！未定义书签。
2.3.5 Protein related techniques	错误！未定义书签。
2.3.6 Detection of ROS in live cells.....	错误！未定义书签。
2.3.7 Measurement of cell survival rate.....	错误！未定义书签。
2.3.8 Measurement of cell oxygen consumption rate.....	错误！未定义书签。
Chapter 3Results and discussion.....	错误！未定义书签。
3.1 The raise of the scientific question (Background).....	错误！未定义书签。
3.2 The cell type-dependent participation of ROS in necroptosis correlates well with whether TNF induces an increase of aerobic respiration in the given type of cell.....	错误！未定义书签。
3.2.1 Cell type decides whether it will respond to BHA and Amytal inhibition during necroptosis	错误！未定义书签。

3.2.2 The sensitivity of a cell to inhibition of BHA and Amytal during necroptosis is in positive correlation with whether its aerobic respiration is activated by TNF treatment.....	错误！未定义书签。
3.2.3 Aerobic respiration level decides the ROS production level during necroptosis, and this ROS production is RIP3-dependent	错误！未定义书签。
3.3 TNF-induced ROS can enhance necrosome formation during necroptosis	错误！未定义书签。
3.4 ROS can promote necroptosis through its function on RIP1 activity	错误！未定义书签。
3.5 ROS can enhance autophosphorylation of Ser161 of RIP1, and phosphorylation of Ser161 is essential for RIP1 mediated necroptosis.....	错误！未定义书签。
3.5.1 The inhibition of BHA and Amytal on necroptosis is similar to the phenotype caused by RIP1 kinase-dead.....	错误！未定义书签。
3.5.2 Ser161 is indeed a functional phosphorylation site of RIP1 and phosphorylation on Ser161 is essential for RIP1-dependent necroptosis	错误！未定义书签。
3.5.3 Phosphorylation on Ser161 is essential for RIP1 to recruit RIP3	错误！未定义书签。
3.5.4 The production of ROS can promote necroptosis through enhancement of Ser161 phosphorylation.....	错误！未定义书签。
3.5.5 Further confirmation of ROS targeting on Ser161 autophosphorylation by double-point mutation	错误！未定义书签。
3.6 Three key cysteines on RIP1 are responsible for sensing ROS and mediating its function on RIP1 activity	错误！未定义书签。
3.6.1 Cysteines on RIP1 participate in ROS function on necroptosis	错误！未定义书签。
3.6.2 Cys257, Cys268 and Cys586 on RIP1 work together to mediate ROS enhancement on necroptosis	错误！未定义书签。
3.7 Summary and discussion.....	错误！未定义书签。
Appendix I Figure index	错误！未定义书签。
Appendix II Abbreviation and Chinese-English Translation	错误！未定义书签。
Reference	错误！未定义书签。
Acknowledgement	错误！未定义书签。

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 的产生存在于生物体的众多生理病理过程中。大量的实验数据表明, 活性氧还参与到了细胞凋亡和程序性坏死的进程里。丁基羟基苯甲醚 (Butylated hydroxyanisole, BHA) 是公认的活性氧清除剂, 异戊巴比妥 (Amytal) 是线粒体上电子传递到泛醌的抑制剂, 二者都曾被广泛报道, 可以抑制或者延缓肿瘤坏死因子 (Tumor Necrotic Factor α , TNF- α) 诱导的小鼠成纤维细胞系 L929 的程序性细胞坏死。然而, BHA 和 Amytal 都不能抑制 TNF 诱导的人结肠腺癌细胞系 HT-29 的程序性细胞坏死。经过大量的研究, 我们发现, 不仅鼠源细胞系的细胞坏死可以被 BHA 和 Amytal 所抑制, 只要该细胞的有氧呼吸能被 TNF 所增强, 那么该细胞的程序性细胞坏死就能被 BHA 和 Amytal 所抑制。我们进一步证实了 ROS 可以增强坏死小体的形成, 并鉴定受体相互作用丝氨酸-苏氨酸激酶 1 (receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1, RIP1) 是信号传递主轴上, 负责感应 ROS 的关键分子。由氧化还原介导的细胞坏死信号的增强, 是和 RIP1 蛋白的自磷酸化相偶联的。我们确定了三个能够感应 ROS 的功能性半胱氨酸, 并且鉴定第 161 位丝氨酸为 RIP1 的功能性的自磷酸化位点。因此, 我们的工作为 ROS 对细胞坏死的调节提供了分子机制上的解释。

关键词: ROS; 程序性细胞坏死; 自磷酸化

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) emerge during a number of physiological and pathological processes and their involvement in apoptosis and necroptosis has been widely reported. Butylated hydroxyanisole (BHA), an ROS scavenger, has been demonstrated to block or delay tumor necrotic factor α (TNF)-induced necroptosis in murine cell line L929, so as to Amytal, which can block electron flow to ubiquinone at complex I (NADPH-ubiquinone oxidoreductase). However, BHA/Amytal cannot inhibit TNF-induced necroptosis in HT-29, a human colorectal adenocarcinoma cell line. Here, we show that the sensitivity to BHA/Amytal inhibition is not restricted in murine cells, but rather, it depends on whether TNF boosts aerobic respiration in the given cells. Furthermore, we verified ROS to enhance the formation of necrosome and identified RIP1 on the signaling axis of TNF-induced necroptosis to sense ROS. The redox-mediated enhancement of necroptotic signaling is coupled with auto-phosphorylation of RIP1 and we have identified three cysteines as effector residues to sense ROS and S161 as the functional auto-phosphorylation site. Our work provides a molecular mechanism for the regulation of necroptosis by ROS.

Key words: ROS; necroptosis; autophosphorylation

第一章前言

1.1 细胞程序性死亡的概述

细胞死亡是一个重要的生物学过程，免疫系统里的细胞死亡，在免疫细胞的发育和抵抗病原体的过程中，扮演了很重要的角色。细胞凋亡是一种有序的细胞死亡形式，它的特征是染色质固缩，脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid, DNA）片段化，和细胞膜出泡形成凋亡小体。细胞凋亡可以被肿瘤坏死因子（Tumor necrosis factor, TNF）家族的受体激活（所谓的外源通路，extrinsic pathway），或者通过线粒体上的效应分子的直接激活（即内源通路，intrinsic pathway）。细胞凋亡信号通路中的关键分子半胱天冬酶（caspase）是一种半胱氨酸蛋白酶，它作用的结果是，细胞膜上的磷脂酰丝氨酸（phosphatidyl serine, PS）外翻，这就为垂死的细胞带上了标记，从而被巨噬细胞等识别和清除^[1]。凋亡细胞的快速清除尽可能地保证了机体免受有害的炎症反应。这也解释了为何细胞凋亡是多细胞有机体在发育中，清除无用细胞最常见的方式。与之不同的，细胞的另一种死亡方式——细胞坏死的标志之一是细胞膜的完整性迅速丧失，这个过程早于或者相当于磷脂酰丝氨酸外翻，细胞膜的破裂释放出了内源的危险信号或者危险相关的分子模式（danger-associated molecular patterns, DAMPs），进而强烈地激发炎症反应。因此，细胞坏死经常在感染或炎症性疾病中被检测到，并且是公认的病理性细胞死亡方式，而细胞凋亡则是生理性的死亡方式^[2]。长期以来，细胞坏死被认为是创伤的结果，然而，最近的研究结果表明，细胞坏死也是有一系列精细的分子通路调控的。并且，传统的用来界定细胞凋亡的特征，也能在细胞坏死过程中被检测到^[3]。这表明，形态学上的差异是不足以很好地区分这两种细胞死亡方式的。因此，目前领域内对受体相互作用蛋白激酶（receptor interacting protein, RIP）诱导的细胞坏死，更公认的表述是受精细调控的程序性细胞坏死（programmed necrosis, necroptosis）^[4]。

大量报道显示，细胞程序性坏死参与到了众多疾病的发生发展中，包括病毒感染，如牛痘病毒（vaccinia virus），单纯疱疹病毒（herpes simplex virus type 1, HSV1）和鼠的巨细胞病毒（murine cytomegalovirus）；细菌感染，如结核分枝杆菌（mycobacterium tuberculosis）；^[5-8]和无菌损伤导致的炎症反应，如银屑病

(psoriasis), 炎性肠病 (inflammatory bowel disease), 缺血再灌注导致的肾损伤 (ischemia-reperfusion kidney injury), 视网膜退化 (retinal degeneration), 胰腺炎 (pancreatitis), TNF 诱导的系统性炎症反应综合征 (TNF-induced systemic inflammatory response syndrome (SIRS)) 和动脉粥样硬化等^[9-16]。

1.2 程序性细胞坏死的自上而下的信号传递

程序性细胞坏死可以被多种受体诱导, 如肿瘤坏死因子 (TNF) 受体家族, Toll 样受体 3 和 4 (Toll-like receptor 3, Toll-like receptor 4, TLR3, TLR4) 和干扰素受体 (interferon receptor) ^[17]。其中, TNF 受体 1 (TNFR1) 介导的程序性细胞坏死是目前解析得最清楚的。TNFR1 是该家族中最典型的代表, 它含有一个必需的蛋白相互作用结构域, 称为死亡结构域 (Death domain, DD)。带有 DD 的死亡受体包括 CD95/FAS/APO-1, TNF 相关的凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 受体 1 和 2, 死亡受体 3 (death receptor 3, DR3), DR6 和外异蛋白 A 受体 (ectodysplasin A receptor)。然而, 这些受体不仅介导了细胞死亡, 更多时候介导的是核因子- κ B (NF- κ B) 的激活。TNFR1 就是这类受体的代表。TNFR1 先形成三聚体, 之后与胞外的 TNF 相结合, 导致 TNFR1 发生构象改变, 进而形成了短期的所谓的膜信号复合物, Micheau 和 Tschopp 命名为复合物 I (complex I) ^[18]。Complex I 由接头蛋白 TNF 受体相关死亡结构域 (TNF receptor-associated death domain, TRADD), TNF 受体相关因子 2 (TNF receptor-associated factor 2, TRAF2), RIP1, 凋亡细胞抑制物 1 (cellular inhibitor of apoptosis 1, cIAP1), cIAP2 和线性泛素链整合复合物 (the linear ubiquitin chain assembly complex, LUBAC) 组成。其中, E3 连接酶 cIAP1, cIAP2, 和 LUBAC 里的 HOIL-1 调控着复合物 I 中许多接头分子的泛素化, 是重要的调节分子。复合物 I 的泛素化调控对于 κ B 激酶抑制物 (IKK) 复合物的募集和激活是必需的。被激活的 IKK 会磷酸化 I κ B α , 进而导致 I κ B α 被蛋白酶体降解和 NF- κ B 二聚体的入核。

复合物 I 的形成很短暂, 它的快速内移对之后的接头蛋白 FADD 和半胱天冬酶 caspase-8 的锚定很重要^[18]。这个包含了 FADD 和 caspase-8 的胞质复合物被称为复合物 IIa (complex IIa)。cFLIPL 是 caspase-8 酶活缺失的同系物, 它和

caspase-8 的二聚化会抑制 caspase-8 的充分活化，进而抑制细胞凋亡，但是仍然保留有 caspase-8 剪切坏死关键蛋白 RIP1, RIP3 的能力，因此 cFLIP_L 的激活，既可以抑制细胞凋亡，也可以抑制程序性细胞坏死^[19-23]。复合物 IIa 里有活性的 caspase-8 会剪切和抑制 RIP1, RIP3 等，因此用 caspase-8 抑制剂可以保持 RIP1 等的完整性，进而诱发程序性细胞坏死。RIP1 和 RIP3 在复合物 IIa 上的稳定结合，将复合物 IIa 转变成了复合物 IIb，或者所谓的坏死复合物（图 1）。RIP1 和 RIP3 通过彼此的 RIP 同源相互作用模块（RIP homotypic interaction motif, RHIM）形成一种淀粉样复合物，这个复合物的形成对于 RIP3 下游底物混合线性激酶结构域类似物（mixed lineage kinase domain-like, MLKL）的募集和激活是必需的^[24-26]。RIP3 会磷酸化 MLKL 的第 357 位苏氨酸和第 358 位丝氨酸，促使 MLKL 多聚化并且转移到细胞内膜结构和细胞膜上（图 1）^[25, 27-30]。

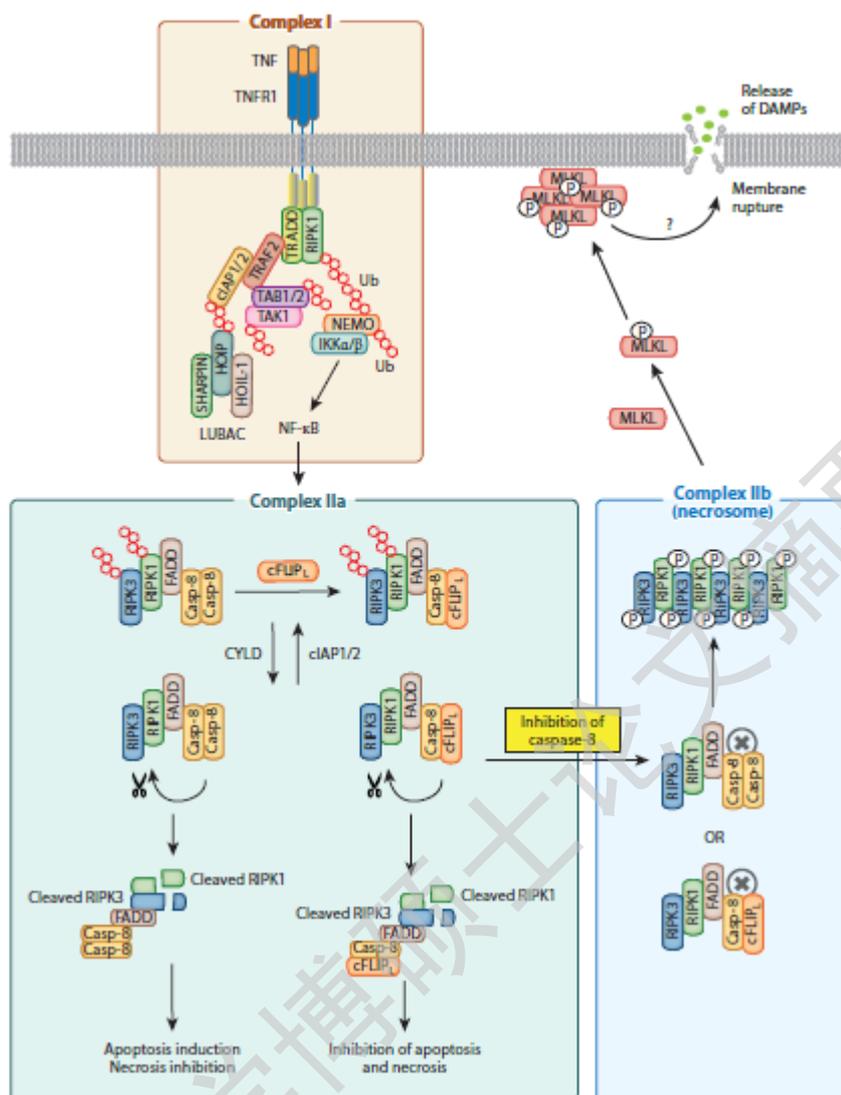


图 1 程序性细胞坏死的分子机制

Fig.1 Molecular mechanism of programmed necrosis (by Francis Ka-Ming Chan, 2015^[2])

1.3 程序性细胞坏死中的 RIP1

当 caspase-8 被苄氧羰基-缬氨酰-丙氨酸-门冬氨酸氟甲基酮 (Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone, z-VAD) 所抑制, 或者当 caspase-8 缺失时, 在死亡信号的刺激下, RIP1 起了促进细胞程序性坏死的作用^[31-34]。有激酶活性的 RIP1 通过 RHIM-RHIM 模块和 RIP3 相互作用, 进而导致 RIP3 的激活和程序性细胞坏死, 并且这种细胞坏死在 RIP1 缺失或者 RIP1 激酶活性缺失的情况下是不能发生的^[35-37]。另一方面, RIP1 的抑制剂 Necrostatin 可以通过抑制 RIP1 的激酶活性, 进而有效地抑制死亡受体介导的程序性细胞坏死

[38, 39]。然而，RIP1 的激酶活性是如何调控程序性细胞坏死的，仍然是个待解决的问题。体外实验证实，RIP1 可以自磷酸化，但是无法磷酸化 RIP3^[5]。这就提出了一个可能性：RIP1 通过自磷酸化，使得构象打开，进而可以通过 RHIM 模块和 RIP3 相互作用，亦或者，RIP1 还存在其他重要的底物，用以调控细胞坏死。

然而，RIP1 的作用并非如此简单。在不加 caspase-8 抑制剂的情况下，RIP1 会通过死亡结构域（Death domain, DD）和 FADD 相互作用，进而募集 FADD-caspase-8-FLIP。Caspase-8-FLIP 异二聚体的存在尽管抑制了细胞凋亡，但是仍然保留 caspase-8 的剪切活性^[22]，因而能剪切 RIP1 和 RIP3 以及坏死通路上的其他分子^[21, 23, 40]，破坏信号的向下传递，抑制程序性细胞坏死。

除了需要抑制住 caspase-8 介导的剪切作用，RIP1 和 RIP3 之间通过 RHIM 介导的相互作用也是细胞发生程序性坏死所必需的。含有 RHIM 模块的接头蛋白之间强烈地倾向于形成淀粉样构象，这种特殊的结构对信号的传递很重要。在 RIP1 和 RIP3 的相互作用中，如果破坏了这种淀粉样构象，就会严重破坏 RIP1 的自磷酸化和 RIP1 和 RIP3 的激活，进而影响到细胞程序性坏死的实现^[24]（如图 2 所示）。

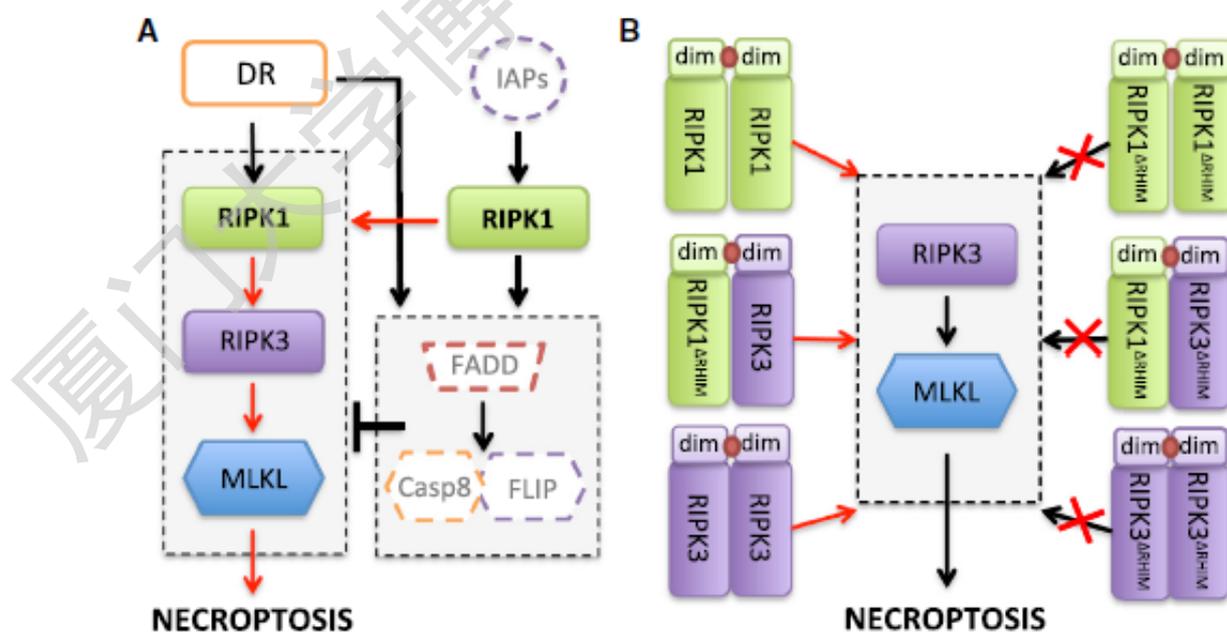


图 2 程序性细胞坏死中的 RIP1

Fig.2 Roles of RIP1 in Necroptosis (By Douglas R. Green, 2014[41])

1.4 程序性细胞坏死中的磷酸化调控

蛋白的磷酸化是一种消耗 ATP 的，主动的蛋白修饰方式，并且在细胞信号转导过程中起了很重要的作用，因为通过激酶对底物的磷酸化作用，可以导致信号的级联放大的效果，进而保证信号快速、强烈地向下传递。在细胞程序性坏死的过程中，存在于坏死小体里的 RIP1 和 RIP3 都是被多重磷酸化的。RIP3 的第 199 位、第 357 位和第 358 位丝氨酸被证实是它的磷酸化位点，并且在细胞的程序性坏死中，发挥了重要的作用^[42, 43]。MLKL 的第 357 位苏氨酸、第 358 位丝氨酸也被清晰地证实能够被 RIP3 磷酸化，并且这些磷酸化与程序性坏死的执行密切相关^[44]。然而，尽管多家实验室都通过质谱的手段打到很多自磷酸化位点，但是这些位点的磷酸化与程序性坏死的关系，仍然是一个有待解决的问题^[38, 42]。

1.5 ROS 在程序性细胞坏死中的作用

早在 19 世纪 80 年代，就有研究人员发现，L929 小鼠成纤维细胞系发生的程序性细胞坏死，能够被 ROS 清除剂，例如丁基羟基苯甲醚（Butylated hydroxyanisole, BHA）和 N-乙酰-L-半胱氨酸（N-Acetyl-L-cysteine, NAC）所抑制，越来越多的实验证据表明，细胞的程序性坏死伴随有 ROS 的产生^[45-49]。斑马鱼中的肺结核感染模型在体内水平上验证了 ROS 对细胞程序性坏死的贡献^[8]。然而，也有实验数据表达了不同的观点。线粒体是细胞内 ROS 产生的最主要的来源，在 SVEC 或者 3T3-SA 细胞系中，通过线粒体自噬（mitophagy）清除线粒体 ROS 的数据表明，线粒体 ROS 跟细胞程序性坏死无关^[50]。另外，也有数据显示，BHA 对细胞程序性坏死的影响，可能是由于其“脱靶效应”（off-target effect）导致，通过影响线粒体上复合物 I 的功能，或者影响到磷酸脂酶 A2 (PLA2)/LOX 信号通路的激活，而非清除 ROS，达到抑制细胞程序性坏死的效果。近期，一个研究小组通过在 FADD 缺失的急性淋巴细胞白血病（T-ALL）细胞系 Jurkat 中，用 TNF- α 和二价 Smac 类似物 BV6 共同刺激，报道了程序性细胞坏死中氧化还原调控的可能的机制^[51]，即胞内的 ROS 稳定了 RIP1-RIP3-MLKL 复合体，而信号向 MLKL 的传递也增强了 ROS 的产生，进而推进了细胞程序性坏死的发生。即便如此，这种相关性的验证还是没能清楚地从分子水平上，解析 ROS/氧

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.