

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620130154125

UDC _____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

**Mixed Lineage Kinase domain Like 蛋白向
细胞质膜的迁移定位导致细胞坏死**

**Translocation of Mixed lineage kinase domain-like protein
to plasma membrane leads to necrotic cell death**

李文娟

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: 2016年03月

论文答辩时间: 2016年05月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016年 04 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

摘要

在最近的研究结果中,混交激酶域蛋白 Mik1 (mixed lineage kinase domain-like protein)被确认为 Rip3 蛋白在细胞坏死信号通路中的下游蛋白。然而, Mik1 如何在细胞坏死信号通路中行使怎样的功能, 尚未明晰。通过在 Mik1 基因敲除的细胞中回补 Mik1 蛋白进行一系列的研究, 实验数据表明, Mik1 蛋白氨基端结构域是其在坏死通路中行使功能的必要部分。在坏死过程中, Mik1 蛋白形成多聚体; 或者在细胞中利用分子生物学手段人为地诱导形成 Mik1 蛋白多聚体, 也能够引起细胞坏死。并且, 只有 Mik1 蛋白的氨基端结构域, 而非羧基端结构域部分的多聚, 可以引起细胞坏死。进一步深入研究表明, Mik1 蛋白的氨基端结构域中的四个 α -螺旋束, 前 130 位氨基酸大小, 是其中真正起作用的部分, 它的多聚化足以引起细胞坏死。在该氨基端结构域中, 第一个和第二个 α 螺旋相连接的连桥部分是 Mik1 同源多聚转移和定位到细胞质膜上所必需的。Mik1 或者 Mik1 氨基端多聚转移到细胞质膜上似乎能够引起钠离子内流, 在 Mik1 基因敲除的 L929 细胞中回补能够人工诱导形成多聚体的 Mik1 蛋白, 加药物刺激使 Mik1 多聚之后, 通过免疫荧光共聚焦显微镜可以观察到 Mik1 多聚体向细胞质膜脂筏迁移富集, 使用钠离子指示荧光染料指征胞质钠离子浓度, 可以看到荧光信号的大幅度提升; 而在细胞培养液中去掉钠离子能够有效地延缓细胞坏死。以上这些现象在细胞凋亡中并不出现。所以我们认为, Mik1 多聚后能够转运到细胞质膜脂筏上, 在质膜上, Mik1 多聚体或者依靠自己或者借助别的蛋白, 使钠离子内流增加, 使细胞渗透压上升, 吸水, 最终导致细胞膜破裂。

关键词: Mik1; 细胞坏死; 钠离子浓度上升; Rip3; 向细胞质膜富集的定位转移。

Abstract

Mixed lineage kinase domain-like protein (Mkl) was identified as downstream of Receptor interaction protein 3 (Rip3) in Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) induced necrosis. However, the exact function of Mkl in necrosis is largely unknown. By reconstituting exogenous Mkl in Mkl-KO cell, we found the integrity of N-terminus domain of Mkl was required for its normal function. Oligomerization of mkl was essential for necrosis, as artificially forced Mkl oligomers by fusing hormone-binding domain (HBD*) triggered necrosis. Notably, artificially forced oligomers of N-Terminal domains (ND-mkl) but not C-terminal kinase like domain caused necrosis. Further deletion mutations showed that the four- α -helix bundle of Mkl (1-130 amino acids) is sufficient for necrosis. Both TNF α induced endogenous Mkl oligomers in wild type cell or HBD* mediated ND-mkl oligomers were tetramers. Both of the homo-oligomers were observed to translocate to lipid rafts on cellular plasma membrane via immunofluorescence confocal microscopy. The membrane translocated signal sequence was in the junction of the first and second α -helices. Plasma membrane translocation of Mkl or ND-mkl leads to increased cellular plasma sodium concentration, indicated by CoroNa Green signal strength largely enhanced detected via immunofluorescence confocal microscopy. Depletion of sodium in cell culture medium inhibited necrosis. All of the above phenomena were not observed in apoptosis. Thus, we came to conclusion that, Mkl oligomerization leads to translocation to lipid rafts on cellular plasma membrane, after that, Mkl complex acts either by itself or via other proteins to increase sodium influx, which increased cellular osmotic pressure and kept cell intaking more water, eventually led to plasma rupture.

Keywords: Mkl; necrosis; increased plasmic sodium concentration; Rip3; translocation to plasma membrane.

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
目录.....	III
第一章 前言.....	1
1.1 细胞坏死.....	1
1.2 Mik1 蛋白.....	3
1.2.1 Mik1 蛋白结构.....	3
1.2.2 Mik1 蛋白在坏死细胞信号通路上的作用.....	4
1.3 细胞膜通透性和细胞死亡之间的关系.....	5
第二章 材料与方 法.....	9
2.1 药品, 试剂.....	9
2.2 DNA 相关实验及其操作方法.....	10
2.2.1 真核细胞表达质粒的构建.....	10
2.2.2 大肠杆菌感受态细胞的转化.....	12
2.2.3 中等规模质粒 DNA 的提取 (SDS-碱变性法).....	12
2.2.4 质粒测序鉴定.....	13
2.3 细胞株的构建、培养及相关实验操作方法.....	13
2.3.1 细胞培养.....	13
2.3.2 基因敲除细胞株的构建.....	13
2.3.3 慢病毒包装.....	15
2.3.4 细胞的慢病毒感染.....	16
2.4 细胞存活率的测定.....	16
2.4.1 流式细胞仪检测法.....	16
2.4.2 CellTiter-Glo Luminenscent Cell Viability Assays.....	17
2.5 蛋白免疫共沉淀和组分分离实验.....	18
2.5.1 蛋白免疫共沉淀和免疫印迹.....	18
2.5.2 细胞质膜脂筏组分分离.....	19
2.6 免疫荧光共聚焦细胞成像.....	20
2.6.1 固定型式的免疫荧光样品的制作.....	22
2.6.2 活细胞样品的制作.....	23

2.7 全内反射荧光显微镜.....	24
2.7.1 TIRF 的基本原理.....	24
2.7.2 TIRF 系统设立的注意事项.....	25
2.7.3 TIRF 系统的使用.....	26
2.7.4 单分子蛋白复合体的观测和定量分析.....	28
2.8 图像及数据分析.....	31
第三章 结果与讨论	33
3.1 Mik1 的氨基端引发细胞坏死.....	33
3.2 HBD 介导的 Mik1 或 Mik1 氨基端聚合足以引发细胞坏死.....	35
3.3 Mik1 在坏死中形成四聚体.....	38
3.4 Mik1 向细胞质膜转移并伴随质膜破泄.....	42
3.5 完整的 Mik1 氨基端四聚体迁移至质膜上是坏死的充要条件.....	47
3.6 Mik1 质膜定位引起细胞质钠离子浓度升高，最终导致细胞坏死.....	50
3.7 讨论.....	54
附录 1 图表索引	57
附录 2 缩略语及中英文对照.....	58
参考文献.....	60
致谢.....	64

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Index	III
Chaper 1 Introduction	1
1.1 Necrosis.....	1
1.2 Mkl1 Protein infromation	3
1.2.1 Mkl1 protein structure	3
1.2.2 Mkl1's function in necrosis	4
1.3 Cell plasm membrane intergrity in necrosis	5
Chaper 2 Materials and Methods	9
2.1 Reagents and antibodies.....	9
2.2 Experiments and methods for DNA.....	10
2.2.1 Plasmids constructed for Eukaryocyte	10
2.2.2 Transfection on E.Coli component cells	12
2.2.3 Preparation of plasmid DNA	12
2.2.4 Constructs sequencing	13
2.3 Experiments and methods for cell.....	13
2.3.1 Cell culture.....	13
2.3.2 Gene knock out cell lines.....	13
2.3.3 Packing lentivirus	15
2.3.4 Infected cell with lentivirus	16
2.4 Cell survival	16
2.4.1 Cytomer for cell death	16
2.4.2 CellTiter-Glo Luminenscent Cell Viability Assays	17
2.5 Experiments and methods for proteins	18
2.5.1 Immunoprecipitation and WersternBlot	18
2.5.2 Lipid raft isolation	19
2.6 Immunofluenscence Confocal microscopy	20
2.6.1 Fixed samples preparation	22
2.6.2 Live cell sample for live time detection	23
2.7 TIRF and determination of bleaching steps	24
2.7.1 TIRF basic princeples	24

2.7.2 TIRF system setup	25
2.7.3 TIRF operation.....	26
2.7.4 Single-molecular protein pull-down and detection	28
2.8 Image analysis and statistical analysis	31
Chapter 3 Results and Discussion	33
3.1 Mkl1 ND is responsible for triggering necroptosis	33
3.2 Forcing the proteins of Mkl1 or ND of Mkl1 together triggers necroptosis	35
3.3 Up to four ND per 4-OHT-induced ND complex	38
3.4 Translocation of Mkl1 to the plasma membrane is associated with plasma membrane breakage	42
3.5 Translocation of an intact four-helix bundle of Mkl1 ND to plasma membrane is necessary and sufficient for necroptosis	48
3.6 Translocation of Mkl1 to the plasma membrane leads to increased sodium concentration in necrotic cells	50
3.7 Discussion	54
Appendix I Index of figures and tables	57
Appendix II Abbreviations	58
References	60
Acknowledgement.....	64

第一章 前言

1.1 细胞坏死

炎症因子肿瘤坏死因子 TNF (tumor necrosis factor- α) 在某些细胞株 (例如 HeLa, MEF 等细胞株) 中会引起凋亡, 而在另一些细胞中能够引起坏死 (例如 L929, U937 等细胞株) [1, 2]。

细胞凋亡, 通常表现为半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族激活, 细胞核皱缩, 细胞质膜出泡, 形成凋亡小体。曾经一度被认为是程序性细胞死亡的唯一形式。

细胞坏死, 病理形态表现为细胞器的肿胀, 细胞质膜完整性缺失, 细胞内容物释放。曾经被认为是不受调控和无特异性的死亡方式。然而, 近年来越来越多有力的证据表明, 细胞坏死是受 Rip1 等蛋白参与调控的 [3-5]。目前最为经典的坏死信号通路由 TNF 引起。在 TNF 刺激下, 细胞质膜上的 TNFR 被激活, 胞质部分的区域募集接头蛋白, 形成“信号传递复合体一” [6], 包括 TRADD、RIP1、TRAF2/5、LUBAC 和 cIAP1/2 [7]。“复合体一”可以作为支架招募下游激酶和执行蛋白, 启动 NF- κ B 和 MAPK 激活信号通路 [8, 9]。配体结合的 TNFR 的内吞和“信号传递复合体二”的形成同时发生, “复合体二”中包含去泛素化的 Rip1、Caspase-8 和接头蛋白 TRADD 和 FADD [10]。“复合体二”可以激活凋亡途径, 或者在有 Rip3 存在的情况下 [11-14] 形成“信号传递复合体三”, 引起细胞坏死, 也被称为“坏死复合体”。简明信号通路图见图 1.1。

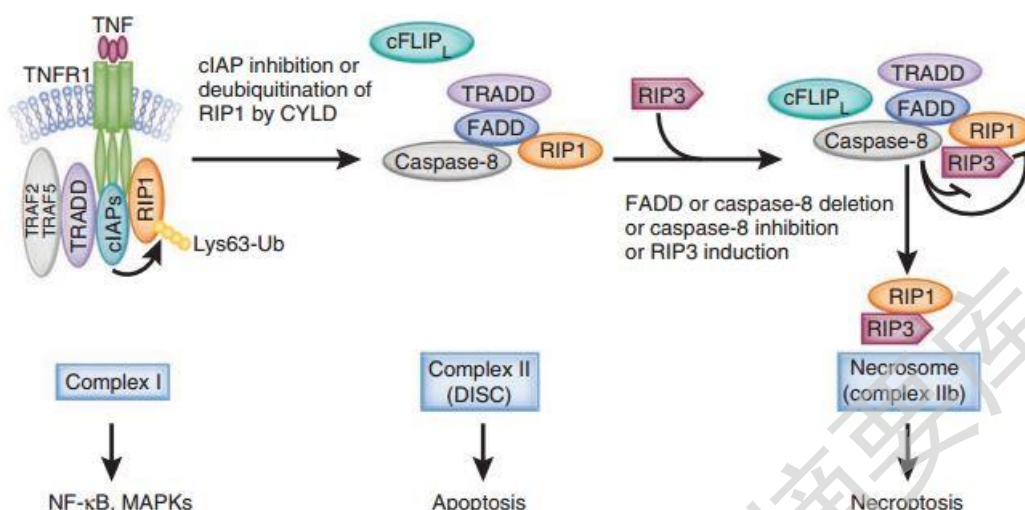


图1.1 TNF 诱导形成的信号蛋白复合体

Fig1.1 TNF-induced formation of apoptotic and necroptotic signaling complexes^[6]

在复合体中 RIP1 激酶活性的作用一直存在争议，因为 RIP3 坏死所必需的磷酸化被证实是自己的激酶结构域所磷酸化^[15]。当把 RIP3 的 RHIM domain 中保守的、与 RIP1 的 RHIM domain 相互作用的 QIG449-451AAA 后，RIP3 再不能够与 RIP1 相互作用^[16-18]，此时细胞对 TNF+zVAD 无反应。然而，如果将 RIP3-RHIM mut 与同源二聚蛋白或异源二聚蛋白相融合，加入刺激使其二聚化，Rip3 能够磷酸化自己；如果一个 WT 的融合 RIP3 和激酶活性丧失的融合 RIP3 二聚，则只有 WT 的融合 RIP3 能够体现出第 231 位丝氨酸和第 232 位苏氨酸的磷酸化，而激酶活性丧失的 RIP3 并不能被检测到被磷酸化。由此可以说明，在坏死进程中所必需的 Rip3 磷酸化来自于自己的激酶活性，而 RIP1 的激酶活性在此可能并不需要。

而且，RIP3 在细胞坏死进程中形成二聚以上的同源多聚体，而且二聚以上的同源多聚体是坏死所必需的，如果只能够形成二聚体，则细胞坏死进程缓慢并且不彻底^[19]。

在坏死复合体中，Rip1 和 Rip3 被磷酸化，磷酸化的 Rip3 能够募集 Mlkl^[20, 21] (Mixed Lineage Kinase domain-Like, 以下缩写 Mlkl 同此)。最近的研究结果表明，被募集的 Mlkl 能够被 Rip3 磷酸化其假激酶结构域，该磷酸化是坏死所必

需的^[20]。和 Rip1, Rip3 一样, Mik1 是坏死所必须的关键性蛋白。然而, Mik1 是如何调控坏死的具体在机制尚未清楚。

1.2 Mik1 蛋白

1.2.1 Mik1 蛋白结构

Mik1 蛋白根据蛋白氨基酸保守结构域的预测, 被认为是个激酶相似蛋白。在功能正常的激酶结构中, VAIK 保守序列中的赖氨酸 K 负责与 ATP 的 alpha, beta 磷酸基团发生相互作用以实现磷酸基团的转移; 在催化活性中心的 HRD 保守序列中的天冬氨酸担任催化中心; 活化中心的 DFG 保守序列中的天冬氨酸结合 Mg²⁺离子以协调 ATP 上 beta 和 gamma 磷酸基团。而 Mik1 在进化过程中 HRD 和 DFG 保守序列中的天冬氨酸均丢失^[22], 而且 VAIK 序列的晶体结构表现出与正常激酶相应部位空间结构及其不同的构象。具体为, 在正常的激酶活性中心, 赖氨酸 K 与另一个在 helix alpha C 的谷氨酸 G 单相互定位, 然而在 Mik1 蛋白中, 这个 helix alpha 被另一个非典型的由第 340 位丝氨酸 S 和 346 位亮氨酸 L 替换的 helix alpha 替换。综上, 即便 Mik1 的 ATP 结合口袋依旧可以结合 ATP, 但是因为缺失 HRD 和 DFG 这两个区域正常功能, 将没有底物能够被催化和激活, 所以 Mik1 的激酶结构域被称为激酶模拟结构域, 而非真正的激酶结构域。

而鼠源的 Mik1 全长结晶显示 Mik1 的氨基端结构域(从第 1 位氨基酸到第 170 位氨基酸)形成四个 alpha 螺旋束和两个螺旋联接链; 羧基端为假激酶结构域, 具体晶体结构可见图 1.2。

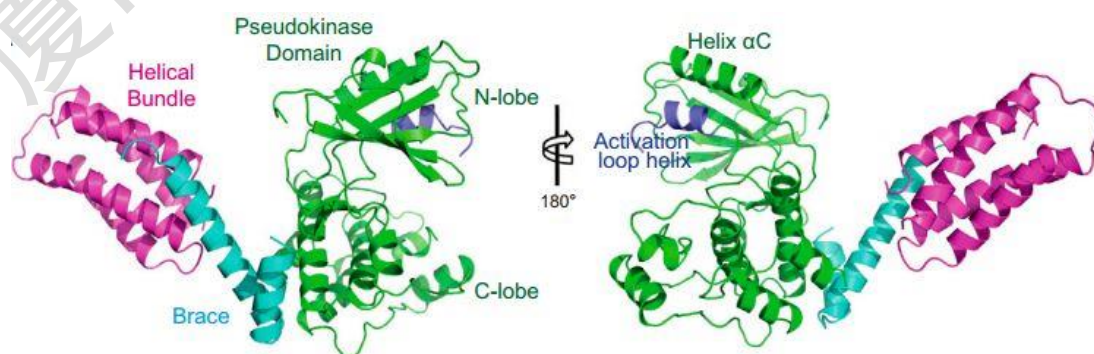


图1.2 鼠源 Mik1 蛋白结构

Fig1.2 Structure of Mouse Mkl1^[22]**1.2.2 Mkl 蛋白在坏死细胞信号通路上的作用**

在坏死进程中，Rip1 和 Rip3 蛋白能够形成淀粉样蛋白聚集，这种行为被认为是坏死进程所必需的^[23]。然而这种超分子复合体在坏死中体现的功能尚未被了解清楚。

在 2011 年，北京 NIBS 王晓东教授^[20]及 NIH 刘正刚教授^[24]分别独立发现了人源 MLKL 蛋白，作为人源 RIP3 的下游蛋白，在执行细胞坏死上起着至关重要的作用。

他们的研究发现，MLKL 主要通过 kinase-like domain 与 RIP3 的 Kinase domain 相互作用。而且当人源 MLKL 蛋白的 kinase-like domain 与 RIP3 完整的 kinase domain 共同表达时，会发现 MLKL 蛋白在蛋白凝胶电泳上出现两条带，一条在正常大小的位置，另一条比正常大小稍微大一些。当使用磷酸水解酶处理后，稍大的条带消失，则可以推断是 MLKL 被 RIP3 的 kinase domain 磷酸化^[25]。

近来研究发现只有带有激酶活性的 Rip3 才具有和 Mkl1 结合的能力^[26]，当把 Rip3 的激酶活性突变缺失之后，就不能再和 Mkl1 结合。在体外直接表达 Rip3 kinase domain，和 Mkl1 蛋白，利用同位素磷 32 标记 ATP，可以发现 Rip3 能够将磷 32 基团标记到 Mkl1 蛋白上^[20]。说明 Mkl1 确实是 Rip3 的底物。

而且 RIP3 的激酶活性不仅是磷酸化 Mkl1 所必须的，丧失激酶活性的 Rip3 也不能够与 Mkl1 相互结合^[26]。进一步探究表明，乃是因为 RIP3 需要在第 227 位丝氨酸（对应的鼠源的 Rip3 则为第 231 位苏氨酸和第 232 位丝氨酸）必须通过自己的激酶活性自磷酸后才能够与 MLKL 相互结合^[27]。

在近来的研究报道中，人源 MLKL 蛋白被发现在 357 位苏氨酸和第 358 位丝氨酸在坏死过程中被磷酸化^[25]。如果将这两位氨基酸突变成不能够被磷酸基团修饰的丙氨酸，则重构的细胞不能坏死。这种现象在多种人源细胞中都能够起作用，表示了这两个磷酸化位点在人源细胞坏死中是保守重要的。在鼠源的 Mkl1 蛋白中这两点被磷酸化位点主要体现在第 349 位苏氨酸和比较次要的在第 345 位丝氨酸上^[28]。

即便 MLKL 能够结合 ATP，然而这项能力并不贡献于细胞坏死中，因为有实验证实将 ATP 结合口袋中的第 219 位赖氨酸 K 突变为甲硫氨酸 M，使之不能够结合 ATP，回补到 Mik1 基因敲除的 MEF 细胞中，仍然对 TNF+Smac+QVD-OPH 引起的坏死敏感^[27]。说明 ATP 结合对 MLKL 蛋白执行坏死的能力没有影响。

然而如果同时或单独把第 345 位丝氨酸替换成天冬氨酸，通常这种替换可以用模拟丝氨酸的磷酸化，这时的 Mik1 蛋白单独过表达能够引起细胞死亡，而且是 caspase 家族抑制剂 QVD-OPH 不能够抑制的。这些证据让我们推测假激酶结构域的 K219M 和 Q343A 突变引起的 Mik1 构象变化可能与被 Rip3 激酶活性磷酸化引起的构象改变一致或类似。

在 MLKL 假激酶结构域的 C-lobe 中，第 398 位苯丙氨酸和第 291 位亮氨酸十分保守（在鼠源 Mik1 蛋白中体现为第 385 位苯丙氨酸和第 280 位亮氨酸），其突变在临床胃腺癌病例中发现突变，分别突变为异亮氨酸和脯氨酸。前者突变体尚能对 TSQ 响应，后者突变则使 Mik1 的坏死功能丧失^[22]。这可能提示我们，Mik1 蛋白中的 C-lobe 在坏死进程中有相应的改变，而 L280P 使这项能力丧失。

这些结构上变化到底能够使 Mik1 有怎样的功能变化从而导致细胞坏死，是个令人非常感兴趣的问题。

1.3 细胞膜通透性和细胞死亡之间的关系

从病理形态上，细胞无论是凋亡还是坏死，都会发生细胞体积形态上的变化，具体如图 1.3 所示，和植物细胞拥有机械的细胞壁外围保护不同，哺乳动物细胞需要利用一套庞大复杂的离子通道和离子泵工作来使细胞内外的离子保持梯度差，进而维持正常的细胞体积形态和功能运作^[29]。

在这一系列离子通道和离子泵中，钠钾泵是普遍存在于大部分细胞种类及数量最多的一种离子泵。在正常生理情况下，由于细胞环境中有较高浓度的钠离子和较低浓度的钾离子，细胞需要不断地将胞内过多的钠离子泵出，将钾离子泵入，从而维持胞质内高钾（约 140nM）低钠（10mM）的状态。凋亡晚期细胞的病理形态，细胞皱缩及出泡，被证实是与钾离子通道激活和钾/氯离子外流有关^[30]。

在一组实验中，当 Jurkat 细胞接受 anti-Fas 刺激时，细胞发生凋亡，在常规细胞培养液中，细胞呈现正常的皱缩及出泡的典型凋亡形态。而将这样的细胞放置于钠离子缺失（渗透压由胆碱或 NMDG 保持正常）的细胞培养液中，细胞形态将于皱缩向肿胀变圆转换，再将细胞培养液置换成含有钠离子的常规培养液，肿胀变圆的细胞形态将再次回复为皱缩出泡的凋亡形态，如图 1.3 所示。这预示我们细胞死亡的病理形态和外界环境中的离子浓度有着重要的关系。

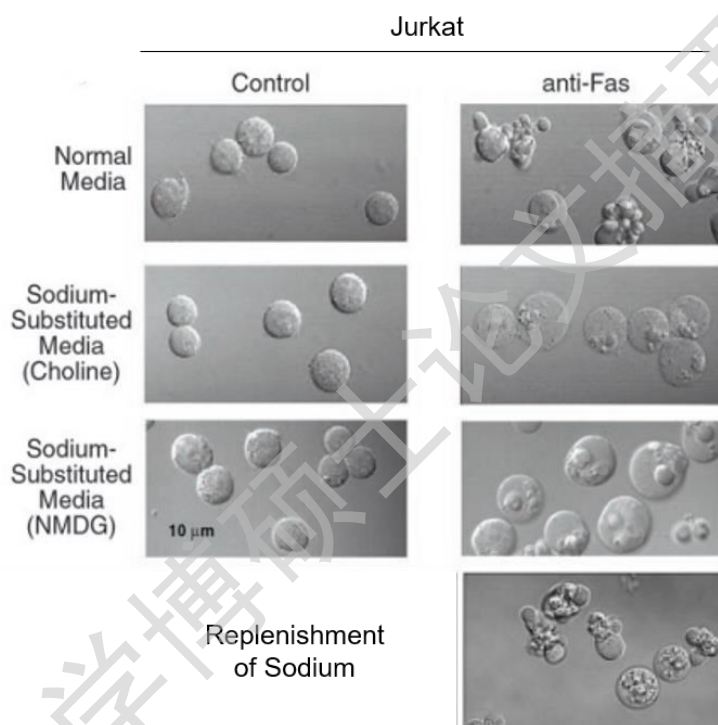


图1.3 胞外钠离子浓度控制凋亡细胞的病理形态

Fig1.3 The Presence of extracellular sodium controls apoptotic volume decreases^[31]

相对于细胞皱缩是由于胞质水分外流引起的，在坏死中出现的细胞肿胀，如图 1.4 中所示的 L929 细胞株施以 TNF+zVAD 刺激引起的坏死，很可能是由于胞质吸水过多引起的。所以我们推测，细胞坏死最终的病理形态可能有渗透压的改变导致，而且对比图 1.3 与图 1.4 中细胞的病理形态，我们推测渗透压的变化很可能是有钠离子的浓度变化承担。

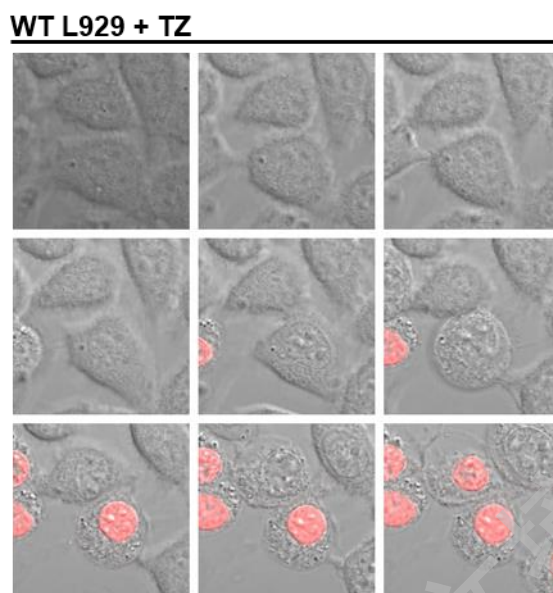


图1.4 L929 细胞株接受 TNF+zVAD 刺激后的坏死细胞形态

Fig1.4 The morphology of necrosis induced by TNF+zVAD in L929

细胞焦亡，由 caspase-1 介导的细胞死亡，与细胞坏死共享多项病理形态学特征，例如细胞膜的迅速破裂，细胞内容物泄露。在细胞焦亡，导致这一现象，是因为由 *Salmonella* 或者其它病原体的侵染导致细胞质膜上形成孔洞，使细胞膜内外离子梯度丧失，水分内流，导致细胞肿胀和渗透性胀破^[32-34]。细胞保护剂甘氨酸可以阻止即将死亡的细胞膜上的非选择性的离子通透，从而避免发生细胞肿胀和裂解。

为了更好地探究 Mik1 在坏死信号通路中行使的下游功能，我们对 L929 细胞进行基因编辑，敲除 Mik1 基因之后，向细胞中回补各种不同修饰形式的 Mik1 片段，以确定其中真正行使坏死功能的区域。我们发现，Mik1 的氨基端结构域是其执行坏死功能所必需的部分。Mik1 被 Rip3 募集并磷酸化之后，能够形成多聚体，这个多聚体可以使 Mik1 蛋白复合体转移到细胞质膜脂筏上，引起钠离子内流，渗透压失衡，最终导致细胞过多吸水胀破。这个复合体由 Mik1 同源蛋白组成，为四聚体，而且我们的数据表明 Mik1 氨基端结构域的四聚就已经足够引起复合体转移和细胞坏死。在 Mik1 执行细胞坏死的功能中，复合体的形成和细胞质膜定位转移是非常关键的环节。

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.