

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 24520130154328

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

脂质过氧化致新生开睑大鼠角膜缘干细胞缺
乏的机理研究

The Mechanisms of Forcing- Eye-Open-at-Birth Rats Limbal
Stem Cell Deficiency Caused by Lipid Peroxidation

张 兆 强

指导教师姓名: 陈永雄 教授

专业名称: 生 理 学

论文提交日期: 2016 年 11 月

论文答辩时间: 2016 年 12 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: 刘祖国教授

评 阅 人: _____

2016 年 12 月

脂质过氧化致新生开睑大鼠角膜缘干细胞缺乏的机理研究

张兆强

指导教师:

陈永雄

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

中文摘要

背景: 角膜 (cornea) 是眼睛前端的一层透明组织, 角膜上皮 (corneal epithelium) 位于角膜的最外层, 传统观点上认为角膜上皮的自我更新能力主要依赖于角膜缘干细胞, 角膜缘干细胞缺乏 (limbal stem cell deficiency, LSCD) 可导致角膜混浊、结膜化、血管化和视力下降。多种因素可导致角膜缘干细胞缺乏, 但目前角膜缘干细胞缺乏的发病机制尚未明确。脂类代谢 (lipid metabolism) 是机体的重要的三大代谢之一, 过氧化物酶体增殖物激活受体 alpha (peroxisome proliferators-activated receptor alpha, PPAR α) 在脂代谢中发挥着重要作用, 非诺贝特 (fenofibrate, Fen) 是 PPAR α 的激动剂, 可以促进脂肪 β 氧化。脂类代谢异常可导致脂质过氧化 (lipid peroxidation), 对机体造成损伤。

目的: 我们利用新生大鼠强行开睑 (forcing- eye-open-at-birth, FEOB) 角膜缘干细胞缺乏模型, 研究脂类代谢和脂质过氧化在 LSCD 病变中的变化和影响, 探讨脂类代谢和角膜缘干细胞缺乏的关系。

方法: 本课题实验分为两个部分, 第一部分为研究角膜脂类代谢和脂质过氧化在角膜缘干细胞缺乏病变过程中的变化, 其实验大鼠随机分为正常对照组和 FEOB 实验组两个组, 每组按出生天数分为 P0、P1、P5、P10、P15、P30, 每组 15 只; 第二部分实验采用非诺贝特处理 FEOB 大鼠角膜 10 天, 观察其对 FEOB 角膜缘干细胞缺乏是否有治疗作用, 本实验共分为 3 组: Normal 组、(FEOB+PBS) 组和 (FEOB+Fen) 组, 每组大鼠 15 只。实验采用裂隙灯检查, HE 染色和 PAS 染色观察其组织病理学形态; 采用油红 O 染色检测角膜表面的中性游离脂肪酸; 实时荧光定量逆转录-聚合酶链式反应 (Real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 和蛋白免疫印迹 (Western blotting) 检测 LSC 的标志物 (P63、ABCG2)、脂类代谢相关因子 [PPAR α 、肉碱棕榈酰基转移酶 (carnitine palmitoyltransferase 1 alpha, Cpt1)、脂酰辅酶 A 合酶 (long chain acyl-CoA synthetase, Acsl)、脂酰辅酶 A 脱氢酶 (medium chain acyl-CoA dehydrogenase, Acadm)、烯酰辅酶 A

水合酶（short chain enoyl-CoA hydratase, Ech）、脂质过氧化相关因子 5-脂氧合酶（5-lipoxygenase, ALOX5）；采用原位杂交（in situ hybridization, ISH）检测 PPAR α 在角膜的定位，采用免疫组织化学（immunohistochemistry, IHC）的方法检测炎症细胞的标记物（ED1、PMN）；采用试剂盒检测丙二醛（malonaldehyde, MDA）的含量和超氧歧化酶（superoxide dismutase, SOD）的活性。

结果：第一部分：与正常大鼠相比，在发育过程中，FEOB 大鼠角膜角膜透明性降低，出现新生血管，角膜上皮细胞病理性增生、细胞排列紊乱，PAS 染色阳性，LSC 标志物 P63、ABCG2 表达下调，角膜特异性角蛋白 K12 表达下降，K10、K13 表达上调，角膜上皮基底层 PCNA 阳性细胞数显著下降，符合角膜缘干细胞缺乏诊断标准；FEOB 大鼠角膜表面油红 O 染色阳性，说明角膜表面出现脂类沉积，与此同时调控脂类代谢的核受体 PPAR α 表达下调，脂质代谢相关酶类 Cpt1 α 、Acsl、Acadm 和 Ech 的表达也下调；脂质过氧化酶 ALOX5 表达上调，脂质过氧化产物 MDA 增多，表明脂类代谢异常，脂质发生过氧化；

第二部分：与 FEOB+PBS 组对照，Fenofibrate 处理 FEOB 大鼠后，角膜未见溃疡，新生血管数量减少，PCNA 阳性细胞增多，角蛋白 K12 表达上调，K10、K13 表达下调，说明 Fenofibrate 可以减轻 LSCD 病症；处理后油红 O 染色转为阴性，Fenofibrate 作为 PPAR α 的激动剂，可以激活 PPAR α 表达，上调 Cpt1 α 、Acsl、Acadm 和 Ech 的表达，促进脂类 β 氧化；角膜中的 ALOX5 和 ALOX5ap 均表达下调，脂质过氧化的产物 MDA 含量下降。

结论：新生大鼠开睑之后，角膜微环境发生改变，角膜表面出现脂类沉积，同时脂类代谢相关调控因子 PPAR α 下调，脂类 β 氧化被抑制，脂类代谢异常，脂质发生过氧化导致损伤，是引起角膜缘干细胞缺乏的可能关键因素；

Fenofibrate 通过激活 PPAR α ，促进脂类代谢，降低脂质过氧化，是病理状态下角膜缘干细胞的新型保护剂。

关键词：角膜上皮细胞；角膜缘干细胞缺乏；脂质代谢；PPAR α ；脂质过氧化；非诺贝特

Abstract

Background: Corneal epithelium is located at the outermost layer of cornea, a transparent tissue in front of the eye. The traditional view believes that cornea epithelia are renewed constantly by the adult stem cells which are located in the limbus. Limbal stem cell deficiency (LSCD) is clinically characterized by a classic triad of signs, including corneal opacity, conjunctivalization, neovascularization and vision impairments. LSCD is caused by a number of genetic, environmental or incidental factors; however, the pathogenesis of LSCD is not well illustrated. Lipid is one of the major metabolisms in the body. Peroxisome proliferators-activated receptor alpha (PPAR α) plays an important role in lipid metabolism. Fenofibrate, as a PPAR α agonist, promotes fatty acid β oxidation. Abnormal lipid metabolism causes lipid peroxidation, which harms the body.

Objective: To uncover the relationship between abnormal lipid metabolism and LSCD, lipid accumulation, peroxidation and the role of PPAR α in corneal epithelium were thoroughly analyzed during the process of LSCD induced by FEOB.

Methods: The study were divided into two parts: the first part was to study the alterations of corneal lipid metabolism and lipid peroxidation in the process of LSCD induced by FEOB, the second part was to investigate the therapeutic effect of fenofibrate in FEOB rat cornea. For the first study, the rats were randomly divided into normal and FEOB group, and in each group rats were further divided into six subgroups: P0, P1, P5, P10, P15 and P30. Each group contained 15 animals. In the second study, the experiments were conducted to compare three groups: normal control group, (FEOB + PBS) group and (FEOB + Fen) group, with 15 animals in each group. Histopathological changes were monitored by slit lamp examination, H&E staining and PAS staining. The neutral free fatty acids in the surface of cornea were detected by Oil Red O staining. The expression of LSC markers (P63, ABCG2), cytokeratin (K10, K12, K13), factors of lipid metabolism (PPAR α , Cpt α , Acs, Acadm and Ech), and enzyme of lipid peroxidation (ALOX5) were detected by qRT-PCR and Western blotting. The localization of PPAR α in cornea was measured by in situ hybridization. TUNEL staining was used to detect cell apoptosis. The expression and localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and markers of

inflammatory cells (ED1 and PMN) were detected by immunohistochemistry. Moreover, the content of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) were measured with assay kits.

Results: In the first part of study, the cornea of FEOB rats demonstrated low transparency, neovascularization, corneal epithelium pathological hyperplasia and arrangement disorder compared with normal rats. PAS staining was positive, indicating corneal conjunctivalization. The expression level of LSC markers P63 and ABCG2 was reduced; corneal specific keratin K12 was down-regulated while ectopic K10 and K13 were upregulated. The number of PCNA-positive cells in central epithelium and limbus was significantly reduced. Compared with normal cornea, the deposition of lipid was detected on the corneal surface of FEOB rats, observed by positive Oil Red O staining. Furthermore, the expression of PPAR α , Cpt1 α , Acs, Acadm and Ech were down-regulated, while ALOX5 expression and lipid peroxidation product (MDA) were increased, indicating the occurrence of abnormal lipid metabolism. In second part of study, after treatment of Fenofibrate (Fen) the FEOB rats showed no corneal ulcer and neovascularization in the (FEOB+Fen) group, compared with (FEOB + PBS) group. It was also demonstrated that the number of PCNA positive cells were increased, together with up-regulation of K12 expression and down-regulation of K10 and K13. The Oil Red O staining was negative in the (FEOB+Fen) group. Fenofibrate activated PPAR α , Cpt1 α , Acs, Acadm and Ech expression. In addition, the expression of ALOX5 and the content of MDA were decreased in the FEOB rats.

Conclusion: Corneal microenvironment was altered by FEOB, and lipid was deposited in the surficial corneal epithelium. Meanwhile, PPAR α was down-regulated and consequently lipid β oxidation was inhibited, and lipid peroxidation which was found on the surface leads to limbal stem cell damage, and eventually LSCD. Fenofibrate activated the expression of PPAR α , accelerated lipid metabolism, and reduced lipid peroxidation, Therefore, fenofibrate shows the potential to protect limbal stem cell and treat LSCD in ocular surface disorders.

Key words: Corneal epithelium; limbal stem cell deficiency; lipid metabolism; PPAR α ; lipid peroxidation; fenofibrate

目 录

中文摘要	I
关键词	II
Abstract	III
Key words	IV
目 录	V
Catalogue	VIII
第一章 前言	1
1.1 角膜缘干细胞缺乏	1
1.1.1 干细胞概述.....	1
1.1.2 角膜缘干细胞.....	2
1.1.3 角膜缘干细胞缺乏 (limbal stem cell deficiency, LSCD).....	5
1.1.4 角膜缘干细胞缺乏动物模型.....	8
1.2 脂类代谢	9
1.2.1 脂类的吸收.....	9
1.2.2 分解代谢.....	10
1.2.3 合成代谢.....	11
1.2.4 脂类代谢调控因子.....	11
1.3 脂质过氧化 (lipid peroxidation)	14
1.4 本论文的研究目的和意义	15
第二章 实验材料与方法	16
2.1 实验材料	16
2.1.1 实验动物.....	16
2.1.2 主要实验试剂与耗材.....	16
2.1.3 实验仪器.....	19
2.1.4 抗体.....	21
2.1.5 引物设计.....	21
2.2 实验方法	22

2.2.1 实验主要溶液的配制	22
2.2.2 实验技术路线	29
2.2.3 新生大鼠的开睑手术操作	29
2.2.4 正常大鼠和新生开睑的裂隙灯观察	30
2.2.5 蛋白免疫印迹法 (Western Blotting)	30
2.2.6 石蜡切片的制备	35
2.2.7 苏木素-伊红染色 (HE 染色)	37
2.2.8 PAS 染色	37
2.2.9 TUNEL 法检测细胞凋亡	38
2.2.10 免疫组织化学染色法	40
2.2.11 qRT-PCR 检测基因转录水平	41
2.2.12 大鼠 PPAR α 原位杂交	43
2.3 实验数据处理和统计学分析	52
第三章 结果与分析	53
3.1 大鼠出生后强行开睑诱发角膜缘干细胞缺乏	53
3.1.1 Normal 和 FEOB 大鼠角膜发育过程	53
3.1.2 FEOB 大鼠角膜各发育时间点 P63、ABCG2 的表达	59
3.1.3 FEOB 大鼠角膜 PCNA 的表达	60
3.1.4 FEOB 大鼠生长发育时间点角膜中细胞角蛋白的表达	62
3.2 FEOB 大鼠角膜脂质代谢异常与脂质过氧化	64
3.2.1 新生开睑大鼠角膜上皮表面有脂类沉积	64
3.2.2 脂肪酸结合蛋白 (FABPs) 在新生开睑模型中角膜的表达	67
3.2.3 FEOB 大鼠角膜中脂类代谢下调	67
3.2.4 FEOB 大鼠角膜沉积的脂质发生过氧化	70
3.2.5 FEOB 大鼠角膜各发育时间点细胞凋亡的检测	72
3.2.6 FEOB 大鼠角膜各发育时间点 ED-1、PMN 免疫组化染色	73
3.2.7 FEOB 大鼠角膜 SOD2 mRNA 表达和 SOD 酶活性	73
3.3 非诺贝特对 FEOB 角膜缘干细胞缺乏有改善作用	78
3.3.1 Fenofibrate 对 FEOB 角膜病理学观察	78
3.3.2 Fenofibrate 可提高 FEOB 角膜缘干细胞标记物 P63、ABCG2 的表达 ...	80
3.3.3 Fenofibrate 可以提高 FEOB 大鼠角膜 PCNA 的表达	80

3.3.4 Fenofibrate 对 FEOB 角膜角蛋白 K10、K12 和 K13 表达的影响.....	81
3.3.5 Fenofibrate 实验组大鼠角膜表面未见脂类沉积.....	83
3.3.6 脂肪酸结合蛋白 (FABPs) 的表达.....	83
3.3.7 Fenofibrate 激活 FEOB 大鼠角膜中脂类代谢相关因子的表达.....	84
3.3.8 Fenofibrate 可以抑制 FEOB 角膜表面的脂质过氧化.....	87
3.3.9 Fenofibrate 可以抑制 FEOB 大鼠角膜上皮细胞凋亡.....	87
3.3.10 Fenofibrate 可以减缓 FEOB 大鼠角膜炎症细胞浸润.....	87
3.3.11 Fenofibrate 可以降低 FEOB 大鼠角膜 SOD2 的表达和 SOD 酶活性.....	87
第四章 讨 论.....	92
第五章 总 结.....	97
参考文献.....	99
附录一 英文缩略索引.....	112
附录二 在学期间发表论文.....	113
致 谢.....	114

Catalogue

Abstract in Chinese	I
Key words in Chinese.....	II
Abstract	III
Key words.....	IV
Catalogue in Chinese.....	V
Catalogue.....	VIII
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Limible Stem Cell Deficiency.....	1
1.1.1 The Concept of Stem Cell	1
1.1.2 Limble Stem Cell.....	2
1.1.3 Limbal Stem Cell Deficiency	5
1.1.4 The Animal Models of LSCD.....	8
1.2 Lipid Metabolism	9
1.2.1 Lipid Absorption.....	9
1.2.2 Lipolysis	10
1.2.3 Lipid Synthesis	11
1.2.4 Lipid Metabolism Regulation Factor.....	11
1.3 Lipid Peroxidation	14
1.4 The Purpose and Significance.....	15
Chapter 2 Materials and Methods.....	16
2.1 The Materials.....	16
2.1.1 The Experimental Animals	16
2.1.2 Reagents and Consumables	16
2.1.3 Experiment Instrument	19
2.1.4 Antibodys.....	21
2.1.5 Primer Design.....	21
2.2 Experimental Methods	22
2.2.1 The Main Solution Preparation.....	22
2.2.2 The Technical Route	29
2.2.3 Operation of FEOB.....	29

2.2.4 Slit Lamp Observation.....	30
2.2.5 Western Blotting	30
2.2.6 The Preparation of Paraffin Section	35
2.2.7 Hematoxylin-Eosin Staining (HE Staining)	37
2.2.8 Periodic Acid-Schiff Staining.....	37
2.2.9 TUNEL Staining	38
2.2.10 Immunohistochemical Staining	40
2.2.11 Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction	41
2.2.12 Hybridization In Situ	43
2.3 The Experimental Data Processing and Statistical Analysis.....	52
Chapter 3 Results and Analysis	53
3.1 LSCD Induced by FEOB.....	53
3.1.1 Corneal Development in Normal and FEOB rat	53
3.1.2 The Expression of P63、ABCG2.....	59
3.1.3 The Expression of PCNA	60
3.1.4 The Expression of cytokeratin	62
3.2 Abnormal Lipid Metabolism and Lipid Peroxidation	64
3.2.1 Lipid Deposition on Surface of Corneal Epithelium	64
3.2.2 The Expression of FABPs.....	67
3.2.3 Down-Regulated Expression of factors of lipid Metabolism	67
3.2.4 Lipid Peroxide in FEOB	70
3.2.5 The Results of TUNEL Staining.....	72
3.2.6 IHC of ED1、PMN	73
3.2.7 The Expression of SOD2 and SOD Activity	73
3.3 Fenofibrate could improve LSCD	78
3.3.1 Pathological Observation by Fenofibrate Treatment.....	78
3.3.2 The Expression of P63、ABCG2 by Fenofibrate Treatment	80
3.3.3 The Expression of PCNA by Fenofibrate Treatment	80
3.3.4 The Expression of K10、K12、K13 by Fenofibrate Treatment	81
3.3.5 No Lipid Deposition on Surface of Corneal Epithelium	83
3.3.6 The Expression of FABP by Fenofibrate Treatment.....	83
3.3.7 Fenofibrate Improve the Expression of factors of lipid Metabolism	84
3.3.8 Fenofibrate Suppressed the Lipid Peroxide in FEOB	87

3.3.9 Fenofibrate Supressed the Apoptosis in FEOB	87
3.3.10 Fenofibrate alleviated soakage of inflammation cell	87
3.3.11 Fenofibrate Decrease SOD2 Expression and SOD activity	87
Chapter 4 Discussion.....	92
Chapter 5 Conclusion.....	97
References	99
Appendix 1 The Index of English Abbreviations	112
Appendix 2 Papers Published during the Learning.....	113
Acknowledgement	114

第一章 前言

角膜是眼睛前端呈横椭圆形的一层透明薄膜，角膜上皮是角膜的最外层结构，它主要由4-6层无分泌功能、非角质化鳞状上皮细胞层构成，传统观点上认为角膜上皮是可以自我更新的组织，而它的自我更新主要依赖于角膜缘的单能干细胞，即角膜缘干细胞（Limbal Stem Cell, LSC）^[1]。目前，很多疾病都可以造成角膜缘干细胞功能发生障碍或缺失，这种功能障碍或缺失在组织病理学上称为角膜缘干细胞缺乏（limbal stem cell deficiency, LSCD）。角膜缘干细胞缺乏一直是角膜领域的研究热点，尽管从病理学、流行病学、统计学、分子生物学等方面对角膜缘干细胞缺乏的发病机制已经有较深入的研究，但是角膜缘干细胞缺乏的病因和发病机制仍然不明确^[2]。角膜上皮是角膜的第一道屏障，可以阻止大部分的微生物的入侵，阻止泪液中的液体、脂类和电解质侵入角膜基质层，由于角膜暴露在外面，角膜上皮很容易遭受损伤^[3]，而脂类在角膜上皮细胞层的沉积很容易发生过氧化，脂质的过氧化进一步引发角膜上皮的屏障功能逐渐丧失，进而影响角膜缘干细胞的结构和功能。本文主要从角膜缘干细胞缺乏的临床和基础研究，角膜上脂质代谢异常、脂质过氧化与角膜缘干细胞缺乏来介绍最新的研究现状。

1.1 角膜缘干细胞缺乏

1.1.1 干细胞概述

干细胞（Stem Cell）通常被认为是一类未分化、慢周期、具有增殖和分化潜力的多功能细胞，干细胞具有自我更新复制的能力，在一定条件下可以高度分化成功能细胞^[4]。根据发育阶段的不同，可以将干细胞分为两类：胚胎干细胞（embryonic stem cell, ESC）和成体干细胞（somatic stem cell, SSC）^[5]；根据发育潜能不同，干细胞可以分为以下三类：全能干细胞（totipotent stem cell, TSC）、多能干细胞（pluripotent stem cell, PSC）和单能干细胞（unipotent stem cell, USC）^[6]。

胚胎干细胞是早期胚胎的一类细胞，可以来源于畸胎瘤细胞、桑椹球细胞、囊胚内细胞团、拟胚体细胞和生殖原基细胞等。当受精卵分裂发育成囊胚时，将内细胞团分离，在体外培养条件下可以无限增殖、自我更新和多向分化的特性，同时还保持其全能性，它具有发育全能性，无论在体外还是体内环境，胚胎干细胞都能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型，能分化成成体动物的所有组织和器官，包括生殖细胞，即胚胎干细胞是一种高度未分化的细胞^[7]。

成体干细胞：成体干细胞是一种已经分化组织中的未分化细胞，这种细胞能够自我更新并且能够特化形成组成该类型组织的细胞。成体干细胞主要存在于机体的各种组织器官中，比如表皮和造血系统^[8]。在特定条件下，成体干细胞或者产生新的干细胞，或者按一定的程序分化，形成新的功能细胞，从而使组织和器官保持生长和衰退的动态平衡。成年个体组织中的成体干细胞在正常情况下大多处于休眠状态，在病理状态或在外因诱导下可以表现出不同程度的再生和更新能力。

全能干细胞：具有形成完整个体的分化潜能，如精子卵子结合成的受精卵，它可以分化为三个胚层所有的细胞类型和细胞滋养层细胞层或层合体滋养层的胎盘，因此被认为是全能干细胞^[9]；多能干细胞：具有分化出多种细胞组织的潜能，如胚胎干细胞，受精卵及随后几次分裂而来的细胞受精卵继续分裂为桑椹胚，这些细胞仍然可以分化为三个胚层的细胞类型，但失去了分化为胎盘的潜力^[10]；单能干细胞：大多数成体干细胞只能向一种细胞类型分化，如神经干细胞、造血干细胞和角膜缘干细胞^[11]。

1.1.2 角膜缘干细胞

角膜上皮是角膜的最外层结构，它是一种高度分化、无分泌功能的非角质化鳞状上皮细胞层，同时角膜上皮的细胞排列比较致密，而这种致密结构为角膜的第一道屏障提供保护，即可以阻止大部分的微生物的入侵，又阻止泪液中的液体、脂类和电解质侵入角膜基质层。传统观点上认为角膜上皮是可以自我更新的组织，而它的自我更新主要依赖于角膜缘的单能干细胞，即角膜缘干细胞^[1]，角膜缘干细胞的是角膜上皮细胞自我更新修复与再生的基础，对于维持角膜透明性、稳定性和正常生理功能的发挥具有极其重要的作用^[12]。

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.