

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520131153482

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

雷帕霉素衍生物（依维莫司、地磷莫司、佐他莫司）对胰岛毒性的研究

The toxicity of Rapamycin derivatives—Everolimus,
Deforolimus, Zotarolimus on islet

张 娟

指导教师姓名: 黄 昭 穗 教 授

专 业 名 称: 内 科 学

论文提交日期: 2016 年 5 月

论文答辩日期: 2016 年 5 月

2016 年 5 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

摘要

目的: 免疫抑制剂的开发与运用一直推动着器官移植领域的发展。自 21 世纪初, Edmonto 方案被提出以后, 胰岛移植领域发生的质的飞跃, 尤其是雷帕霉素与他克莫司的开发与利用, 使得该方案得到广泛的认可与临床运用。然而随着研究的不断深入, 研究者们发现免疫抑制剂在延长移植物存活时间的同时, 也给胰岛本身带来了严重的毒性作用, 包括抑制胰岛细胞增殖, 促进胰岛细胞凋亡, 抑制胰岛细胞分泌胰岛素等。应用免疫抑制剂产生的这些不良反应在抗器官移植排斥反应时发生。它们作为抗肿瘤药物应用于临床时也会诱发高血糖的现象。所以, 如何避免免疫抑制剂对胰岛的毒副作用从而延长胰岛移植物的存活, 是胰岛移植面临的一大难题。一旦免疫抑制剂出现对胰岛的毒性, 使胰岛功能被破坏, 胰岛移植也就面临需要再次移植或使用胰岛素干预治疗。雷帕霉素是胰岛移植应用中最常用的免疫抑制剂之一, 但是由于它对胰岛本身存在毒性作用, 促使新型免疫抑制剂的不断开发。雷帕霉素衍生物包括依维莫司、地磷莫司、佐他莫司、替西罗莫司。它们目前主要应用于抗肿瘤治疗, 依维莫司同时应用于器官移植抗排斥反应的防治。这些衍生物是否与雷帕霉素一样也对胰岛具有毒性目前鲜有研究。本论文, 首次通过细胞系体外研究雷帕霉素衍生物依维莫司、地磷莫司、佐他莫司对胰岛的毒性作用。

方法: 采用小鼠胰岛 β 细胞株 MIN6 细胞作为体外研究胰岛细胞的对象。分别在含有不同浓度的依维莫司、地磷莫司、佐他莫司培养基中孵育 MIN6 细胞 24h、48h。将溶剂无水乙醇处理的 MIN6 细胞设为阴性对照组, 环孢素 A 和三氧化二砷处理的 MIN6 细胞设为阳性对照组, 观察三种雷帕霉素衍生物对 MIN6 细胞的增殖、细胞活力、细胞周期、凋亡的影响。

结果: 在增殖实验中, 我们发现, 从药物浓度升高至 1ng/ml 开始, 这三种雷帕霉素衍生物均对 MIN6 细胞的增殖产生抑制作用, 药物浓度呈剂量依赖性, 且三种衍生物抑制 MIN6 细胞增殖的效果比雷帕霉素更加显著。在细胞活力测定实验中, 三种衍生物在 100ng/ml 时能显著抑制细胞活力, 其中佐他莫司浓度在 10ng/ml 时, 就已经出现对细胞活力的抑制作用。流式细胞术结果显示, 在细胞周期和凋亡实验中, 三种衍生物对 MIN6 细胞的影响与阴

性对照相比组，呈现抑制 G1 期向 S 期转变的趋势和促进细胞凋亡的趋势，但差异没有统计学意义。

结论：通过体外研究依维莫司、地磷莫司、佐他莫司，我们对雷帕霉素这三种衍生物有了进一步的认识，它们与雷帕霉素一样均能抑制胰岛 β 细胞的增殖与细胞活力；并且我们发现，在对 β 细胞增殖与活力的影响中，三种衍生物与雷帕霉素相比具有更明显的抑制作用。因此，我们认为，三种衍生物具有比雷帕霉素更强的毒性，它们是否可替代雷帕霉素在 Edmonton 方案中的角色有待进一步的研究。本论文也对这三种衍生物的进一步的开发与临床应用提供了参考性的建议。

关键词：依维莫司 地磷莫司 佐他莫司 MIN6 细胞 毒性

Abstract

Background: The exploration and application of the immunosuppressants always has been promoting the development of the field of organ transplantation. Since the early 21th century, islet transplantation achieved the extraordinary leap after the Edmonton protocol coming out, especially the tacrolimus and rapamycin. However, the researchers found that the immunosuppressants not only prolong the islet transplantation graft survival, but also have the detrimental effects on islet proliferation, survival and function. Evidence for pancreatic β -cell toxicity - hyperglycemia can be reported in anti-tumor therapy. So, it is a huge challenge that how to avoid the β -cell toxicity of immunosuppressive agent. Once the destruction of the islet function appearing, the patients will be up against the second transplantation or continue to inject insulin. Though Rapamycin is one of the most common immunosuppressant in islet transplantation, there have been a number of studies investigating the direct effects of rapamycin on pancreatic β -cell function, survival, and proliferation. The fact makes us seek for the much more immunosuppressants to change the situation. Rapalogs include everolimus, deforolimus, zotarolimus, temsirolimus. These rapalogs are commonly used in anti-tumor therapy, and everolimus have been simultaneously applied to the anti-organ transplant rejection. At present, there is few studies about these derivatives whether the same toxicity as the rapamycin on islet β cell. In this work, we develop a method in vitro with cell lines to study the effect on islet of everolimus, deforolimus and zotarolimus.

Method: The mouse pancreatic β cell line MIN6 cell is our research object. We treated MIN6 cell in different concentrations and incubated for 24 hours and 48 hours. The ethanol-treated MIN6 cell was to be negative group, and cyclosporin A and arsenic trioxide group were to be positive control. MIN6 cell proliferation were detected by BrdU and cell viability were detected by CCK8. The cell cycle and apoptosis were analyzed by FACS.

Results: In the proliferation assay, we found that the MIN6 cell proliferation

would be inhibited when the concentration increased to 1ng/ml and the concentration was dose-dependent manner. Besides, the effect of the three kinds of derivatives on MIN6 inhibition were more significant than rapamycin. In the cell viability assay, the concentration at 100ng/ml of rapalogs could significantly inhibit cell viability. However, zotarolimus affected cell viability at 10ng/ml. The percent of G1 population in rapalogs group were higher than ethanol group by FACS, but the difference was not statistically significant. So did apoptosis cells.

Conclusion: We got a better understanding of these derivatives of rapamycin that all of them could inhibit the proliferation of MIN6 cell and cell viability. And, we found that it is more obvious that the rapalogs affected the proliferation and cell viability than rapamycin. Thus, we thought that the toxicity of the rapalogs were worse than rapamycin. Whether the rapalogs could replace the rapamycin in Edmonton protocol need further study. This result provides a promising advice for further development and clinical application.

Keywords: everolimus; deforolimus; zotarolimus; MIN6 cell; toxicity

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
第一章 前言	1
1.1 糖尿病与胰岛移植	1
1.1.1 糖尿病	1
1.1.2 胰岛移植	3
1.2 免疫抑制剂的方案	5
1.3. 雷帕霉素及其衍生物	8
1.3.1 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白	9
1.3.2 雷帕霉素	12
1.3.3 依维莫司	13
1.3.4 地磷莫司	14
1.3.5 佐他莫司	15
1.3.6 替西罗莫司	15
1.4 雷帕霉素对胰岛的毒性	16
1.5 研究目的、内容、意义	17
第二章 材料与方法	19
2.1 实验材料	19
2.1.1 实验细胞	19
2.1.2 主要试剂	19
2.1.3 主要仪器	21
2.2 研究方法	22
2.2.1 细胞培养	22
2.2.2 细胞增殖检测	25
2.2.3 细胞活力检测	26
2.2.4 PI 检测细胞周期	27

2.2.5 Annexin V/PI 双染法检测 MIN6 细胞的凋亡	28
2.2.6 葡萄糖刺激胰岛素分泌试验	31
2.2.7 统计学分析	32
第三章 结果与讨论	33
3.1 结果	33
3.1.1 雷帕霉素衍生物对 MIN6 细胞生长的影响	33
3.1.2 雷帕霉素衍生物影响 MIN6 的存活	37
3.1.3 雷帕霉素衍生物在 MIN6 细胞周期中的研究	40
3.1.4 雷帕霉素衍生物对 MIN6 细胞凋亡的影响	42
3.1.5 雷帕霉素衍生物抑制 MIN6 细胞分泌胰岛素	43
3.2 讨论	44
第四章 结论与展望	46
4.1 结论	46
4.2 展望	46
参 考 文 献	47
附录：缩略语及中英文对照	56
致谢	58

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 The diabetes and Islet transplantation	1
1.1.1 The diabetes	1
1.1.2 Islet transplantation	3
1.2 The situation of immunosuppressive drugs	5
1.3 Rapamycin and derivatives	8
1.3.1 mTOR	9
1.3.2 Rapamycin	12
1.3.3 Everolimus	13
1.3.4 Deforolimus	14
1.3.5 Zotarolimus	15
1.3.6 Temsirolimus	15
1.4 Rapamycin Toxicity on Islet	16
1.5 Purpose, significance and contents of this study	17
Chapter 2 Materials and Methods	19
2.1 Materials	19
2.1.1 Cell used in this article	19
2.1.2 Main reagents	19
2.1.3 Main instruments	21
2.2 Methods	22
2.2.1 Cell culture	22
2.2.2 Cellular proliferation assay	25
2.2.3 Cellular survival rate assay	26
2.2.4 Cell cycle assay	27
2.2.5 Annexin V/PI apoptosis detection	28

2.2.6 Glucose stimulated insulin secretion	31
2.2.7 Statistical analysis	32
Chapter 3 Results and Discussion	33
3.1 Result	33
3.1.1 The effect of rapalogs on MIN6 cell proliferation	33
3.1.2 The effect of rapalogs on MIN6 cell survival	37
3.1.3 The study of rapalogs on MIN6 cell cycle	40
3.1.4 The effect of rapalogs on MIN6 cell apoptosis	42
3.1.5 The effect of rapalogs on MIN6 cell function and insulin sensitivity	43
3.2 Discussion	44
Chapter 4 Conclusion and Prospect	46
4.1 Conclusion	46
4.2 Prospect	46
References	47
Appendix	56
Acknowledgement	58

第一章 前言

糖尿病是继心脑血管疾病、癌症后，成为当今威胁人类健康及影响人类生活质量的三大疾病之一。根据世界糖尿病权威组织——国际糖尿病联合会（International Diabetes Federation, IDF）在2013年发布的最新数据显示，当今全球已有3.82亿人口确诊为糖尿病。而中国已成为世界上第一糖尿病大国，且目前糖尿病患者数量仍呈逐渐上升趋势。预计至2035年，全球糖尿病患者将达到5.92亿。近年来，糖尿病病人死亡率也呈逐渐上升趋势^[1]。

1.1 糖尿病与胰岛移植

1.1.1 糖尿病

糖尿病是多种病因引起的代谢紊乱性疾病，其特点以高血糖为主，伴胰岛素绝对或相对分泌不足，导致碳水化合物、脂肪、蛋白质代谢紊乱，造成多器官的慢性损伤和功能障碍。它是由遗传和环境因素共同作用引起的复杂疾病，其临床特点为“三多一少”，即多饮多食多尿，体重下降。糖尿病的诊断一般不难，当空腹血糖大于或等于7.0mmol/L，和/或餐后两h血糖大于或等于11.1mmol/L即可确诊。糖尿病通常会累及其它组织或者器官，常见的有眼部（主要包括视网膜病变、白内障、青光眼）、肾脏（包括肾小球硬化、肾衰竭等）、神经系统（包括末梢神经炎、胃轻瘫、腹泻等）、心脏（主要有高血压、心肌梗塞）以及慢性病变（包括糖尿病足、阿尔茨海默病等）^[2]。

糖尿病临床上分为两型，即 I 型糖尿病（Type 1 diabetes mellitus, T1DM）和 II 型糖尿病（Type 2 diabetes mellitus, T2DM）。I 型糖尿病即胰岛素依赖性糖尿病，II 型糖尿病即非胰岛素依赖性糖尿病。其中 II 型糖尿病较更常见，在全部糖尿病病例中约占90%。据流行病学统计，I 型糖尿病在全部糖尿病中占约7%-10%。I 型糖尿病患者总数并无可靠资料。据估计，全球每年约有80,000儿童罹患该病；在美国，该病患者人数约为100万至300万人之间^[3]。I 型糖尿病病因尚不明确，可能的病因主要有：遗传易感性、糖尿病相关基因触发活化以及与外源性抗原的共同作用。I 型糖尿病与其他糖尿病可以根据 II 型自身抗体的检测

加以区分,也可以通过C-肽测定法,测量内源性胰岛素分泌情况加以区分^[4]。因为 I 型糖尿病主要由自身免疫细胞破坏胰岛细胞所致,所以其表现为胰岛细胞受损,胰岛素分泌素绝对不足; II 型糖尿病的病因而包含遗传和环境因素,并且呈显著的异质性。它主要表现为胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足并行存在。在治疗方面, I 型糖尿病由于自身免疫因素导致 β 细胞受损,常导致胰岛素绝对缺乏,所以需要依赖胰岛素治疗;而 II 型糖尿病可通过合理的饮食控制及口服降糖药物得到改善,当药物无法控制高血糖时则同样需胰岛素干预治疗。自1909年DeMayer命名了胰岛素后,糖尿病的治疗效果得到空前绝后的优化。尤其对于 I 型糖尿病而言,不但改善了 I 型糖尿病患者的症状,而且提高了 I 型糖尿病的生活质量。但无论是药物治疗还是胰岛素治疗,都可能引起糖代谢紊乱。很多 I 型糖尿病患者有过一定程度的不能感知低血糖的发生,即所谓的无症状低血糖倾向。如果患者不进行严格的血糖控制则有可能出现严重的低血糖等并发症,影响患者的生活质量^[5]。根据统计数据得出, I 型糖尿病患者死亡数中10%以上是无症状性低血糖导致的^[6]。

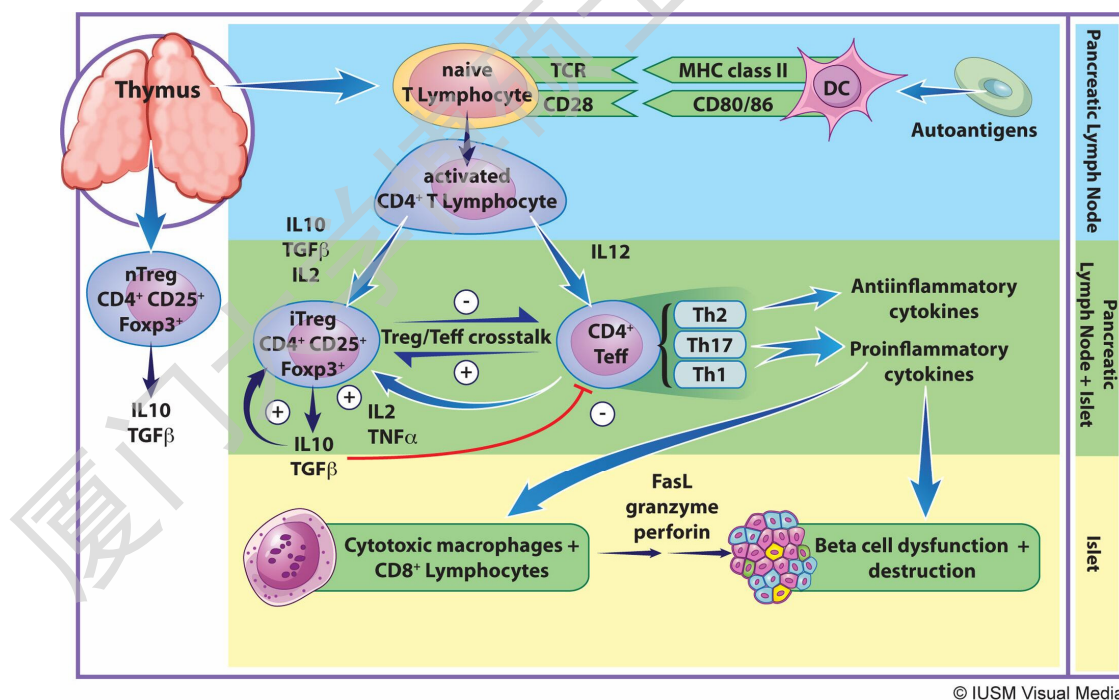


图1.1 I 型糖尿病的发病机制^[7]

Figure1.1 Pathogenesis of type 1 diabetes

尽管近些年来胰岛素的应用给糖尿病的治疗带来飞跃的进步,但是无症状性低血糖的发生率在过去20年也并没有下降^[8]。使用胰岛素的治疗过程中,除了

注射过多会导致低血糖的症状外，它还会导致其它严重的糖尿病并发症。急性并发症有糖尿病酮症酸中毒和非酮症高渗性昏迷等；较严重的长期并发症有糖尿病心血管疾病、肾衰竭、足溃疡及眼部损伤等。

目前，胰腺移植及胰岛移植成为治疗糖尿病的最有效手段，因为它们能让患者机体根据患者自身血糖水平来调整糖代谢变化。1966年，Kelly和Lillehei成功探索了世界首例胰腺移植^[9]。胰腺移植术得到快速的发展。但是由于胰腺移植手术困难、并发症多，导致胰腺移植术发展受到限制。

1.1.2 胰岛移植

胰岛移植，是将自体或异体胰腺组织中的胰岛分离提纯后，通过移植于患者体内治疗糖尿病的方法，目前已开始应用于临床治疗糖尿病。其目的在于通过移植足够数量的胰岛于 I 型糖尿病患者体内，以补充体内胰岛不足，提供体内所需的足量胰岛素，发挥正常胰岛功能，稳定糖代谢，阻止或逆转因糖代谢紊乱所导致各种并发症的发生和发展。外源性的人工胰岛素在治疗 I 型糖尿病方面无法完全模拟正常胰岛功能，因此以胰岛移植为首选的重建体内胰岛素分泌能力及分泌模式的治疗方案在理论上是治愈 I 型糖尿病最理想的方法^[10]。

胰岛移植与胰腺移植相比具有许多优点，胰岛移植具有手术方式简单、术后并发症少的优点；它还可以使用在不适于胰腺用来移植的胰腺进行胰岛分离、体外胰岛扩增、或生物工程技术制备胰岛细胞系，并且具有更方便保存与运输的明显优势。而且，对于身患严重糖尿病且不能耐受高度风险手术的病人来说，胰岛移植较胰腺移植来说显然安全系数更高。与胰岛素治疗相比，胰岛移植可以提供更为灵活的办法来控制血糖，它能有效地避免胰岛素治疗过程中多种并发症的发生。此外，胰岛移植物内容单纯，免疫源性低，且来源广泛^[11-15]，使得胰岛移植成为治疗 I 型糖尿病的最佳选择，并有望能彻底治愈 I 型糖尿病。

胰岛移植的概念很早就被提出^[16]。20世纪早期，英国外科医生Charles Pybus就已经将移植胰腺组织的方法治疗糖尿病。1967年，Paul Lacy的研究小组采用了一种新型胶原酶并成功的在胰腺中提取了胰岛细胞，这一重大进步为将来在体外和体内胰岛实验奠定了基础^[17]。1972年，Paul E. Lacy通过胰岛移植成功逆转了大鼠的糖尿病，这拉开了现代胰岛移植的序幕^[18]。经过胰岛提取方法和免疫抑制方案的持续改进后，1990年在匹兹堡大学成功进行了第一例胰岛移植实验^[19]。尽

管胰岛移植在短时间内取得了飞跃般的进步。但是胰岛移植取得的效果并不理想。2000年,加拿大埃德蒙顿阿尔伯塔大学的James Shapiro研究小组改进了胰岛的提取方法,并且采用不含糖皮质激素的新型免疫抑制剂方案(低剂量他克莫司和雷帕霉素两种免疫制剂联用)。这种方案使得同种异体胰岛移植成功率大为提高,该方案被称为埃德蒙顿方案。埃德蒙顿方案的提出,使得胰岛移植取得质的飞跃与进步。该方案的提出也被称为是胰岛移植里程碑式的成就^[11]。该方案的成功引起了近年来胰岛移植研究的热潮。

埃德蒙顿研究中心的经验主要包括以下几个方面:1.严格的病例选择。患者有多年的糖尿病病史,术前C肽阴性,反复发低血糖反应。患者术前均未致敏,PRA阴性,ABO血型相容,但未作HLA配型;2.足够的移植数量,为保证停用胰岛素,移植的胰岛数量至少为9000胰岛当量/kg,大多数病例均需2~3个供胰,2~3次移植,每次移植间隔时间小于1个月;3.胰岛的分离,在获得供胰后8h内完成;4.不含激素的免疫抑制方案,使用Daclizumab作免疫抑制剂诱导;以西罗莫司和FK506为主要免疫抑制剂。这种方案可达到预防排斥反应的目的而不造成致糖尿病的副作用。

2004年埃德蒙顿小组开展了一项包括65位患者的临床研究,在随访中发现胰岛移植后患者的 β 细胞功能会随着时间进行性丧失;随访结果显示在胰岛移植5年后,发现尽管有80%的患者的胰岛仍存在部分功能,但是只有10%的患者完全脱离胰岛素^[20]。同样,2006年,一项包括36名患者的国际多中心实验对埃德蒙顿方案进行验证。移植1年后随访结果显示只有16位患者完全脱离胰岛素,10位患者的移植物存在部分功能,而其余10位患者移植物的胰岛功能则完全丧失,移植3年后随访只有1位患者完全脱离胰岛素^[12]。随后,有研究者提出他克莫司和西罗莫司可能会抑制 β 细胞的再生,对胰岛产生毒性作用,长期使用还会导致出现肾毒性等副作用。

2004年,成立了临床胰岛移植协会,该协会是在在美国国立卫生研究院(NIH)和食品及药物管理局(FDA)的领导下,8家美国学术中心联合参与。该协会主要从事临床胰岛移植研究工作。他们对埃德蒙顿方案做了重大的改进,包括以下4个方面:1.在移植前对胰岛进行体外培养;2.使用改进的胶原酶混合物进行统一和标准化的胰岛分离;3.使用多克隆抗胸腺细胞球蛋白ATG和TNF- α 拮抗剂进行免

疫抑制诱导;4.采用不含糖皮质激素的免疫抑制维持方案(包括低剂量他克莫司和雷帕霉素);该协会进行的两项研究结果均证实胰岛移植能有效性的治疗1型糖尿病患者严重的无症状性低血糖,而且研究结果显示移植后1年患者不发生严重低血糖、脱离胰岛素以及糖化血红蛋白(HbA1c)低于总比重的7%^[21]。

目前,改进胰岛移植胰岛分离方法、寻找新的胰岛移植供体来源以及免疫抑制剂的开发,成为胰岛移植研究领域的热点。

1.2 免疫抑制剂的方案

免疫抑制剂(immunosuppressant)是通过抑制体液免疫反应和细胞免疫反应减轻组织损伤的化学或生物物质,主要应用于器官移植后抗排斥反应、自身免疫性疾病和移植物抗宿主病的治疗。免疫抑制剂存在自身的优点与不足,不同免疫抑制剂的疗效与不良反应均不同,目前临床上也多采用联合用药的方法来减少用药的剂量和不良反应。免疫抑制剂自20世纪70年代后开始发展,到目前为止取得了很大的进步与成就。

目前用于临床的免疫抑制剂主要包括以下几类:激素类如泼尼松、甲泼尼松、甲泼松龙;抗代谢物类,如吗替麦考酚酯、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、咪唑立宾;烷化剂,常见有环磷酰胺、苯丁酸氮芥;钙调神经氨基酶抑制剂如环孢菌素、他克莫司;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂,如西罗莫司、依维莫司;核苷酸还原酶或酪氨酸激酶抑制剂如来氟米特、羟基脲、青霉胺;植物药主要有雷公藤多苷、白芍总苷、FTY720;以及近些年发展迅速的生物药品和单克隆抗体,如抗胸腺细胞免疫蛋白、达利珠单抗。各类免疫抑制剂中如糖皮质激素、硫唑嘌呤、吗替麦考酚酯、环孢素、他克莫司、西罗莫司等常见应用于预防移植免疫排斥反应。

在上述免疫抑制剂中最早研究及应用最多的是激素类药物。20世纪60年代,糖皮质激素类药物开始应用于器官移植并取得可观的治疗效果。糖皮质激素在器官移植的临床应用中主要用于诱导缓解及维持治疗,它对多种细胞如单核巨噬细胞、中性粒细胞、T淋巴细胞和B淋巴细胞均有较强的抑制作用。而且与其他免疫抑制剂联用可有效降低排斥反应的发生率。尽管免疫抑制剂发展迅速,但糖皮质激素仍是目前免疫抑制方案中的基础用药。虽然激素类药物应用效果显著,但其副作用如“三高”、骨质疏松等明显,且副作用随着服用时间日益加剧使得激

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.