

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520130154320

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

排斥导向分子 RGMb/Dragon 在结直肠癌发生
发展中的作用与机制研究

Function and mechanism of Repulsive Guidance Molecule
RGMb/Dragon during Colorectal Cancer progression

施 颖

指导教师姓名: 任建林 教授

专 业 名 称: 生理学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 6 月

答辩委员会主席: 李建生 教授

评 阅 人: _____

2016 年 月

排斥导向分子 RGMb/Diagon 在结直肠癌进程中的作用及机制研究

施颖

指导教师

任建林
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(任建林)课题(组)的研究成果,获得(任建林)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学消化疾病研究所、厦门大学附属中山医院消化内科)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

中文摘要.....	IX
英文摘要.....	XI
第一章 绪论.....	1
1.1 结直肠癌研究进展.....	1
1.1.1 结直肠肿瘤的发生发展过程.....	1
1.1.2 结直肠肿瘤的致癌机制.....	1
1.1.2.1 基因和表基因不稳定性.....	1
1.1.2.2 微生态与结直肠肿瘤.....	2
1.1.3 结直肠肿瘤中信号通路的改变.....	3
1.1.3.1 APC/ β -Catenin/WNT 通路.....	3
1.1.3.2 TGF- β 通路.....	4
1.1.3.3 EGFR/RAS/RAF/MAPK 通路.....	4
1.1.3.4 PI3K/AKT 通路.....	4
1.1.4 结直肠肿瘤筛查及诊疗新思路.....	5
1.1.4.1 结肠镜及诊断新技术.....	5
1.1.4.2 粪便 DNA 筛查.....	5
1.1.4.3 临床常规肿瘤标志物及治疗新靶点.....	6
1.2 RGMb/Dragon 与排斥导向分子家族.....	7
1.2.1 排斥导向分子简介.....	7
1.2.2 RGMb/Dragon.....	8
1.2.2.1 RGMb/Dragon 的蛋白结构.....	8
1.2.2.2 RGMb/Dragon 受体 Neogenin.....	8
1.2.2.3 RGMb/Dragon 的表达及功能.....	9
1.2.2.4 RGMb 与肿瘤.....	10
1.3 结直肠癌中的 RGM 家族与 BMP 信号通路.....	11
1.3.1 BMP 信号通路与 Smad 信号分子.....	11
1.3.2 RGMb/Dragon 相关 BMP 信号通路.....	11
1.3.2.1 RGMb/Dragon-Neogenin-Rho 信号通路.....	11

1.3.2.2 RGMb/Dragon-BMP-Smad1/5/8 信号通路	12
1.3.2.3 RGMb/Dragon-BMP-MAPK 信号通路	12
1.3.3 BMP 通路 与 肠道 肿瘤 的 发生 发展	13
1.3.3.1 BMP 信号 与 肠 息肉 病	13
1.3.3.2 BMP 通路 与 结 直 肠 腺 瘤 - 腺 癌 转 变	14
1.3.3.3 BMP 通路 与 结 直 肠 癌 的 发生 发展	14
第二章 材料 与 方法	16
2.1 实验 材料 与 试剂	16
2.1.1 细胞 株	16
2.1.2 实验 小鼠	16
2.1.3 结 直 肠 癌 患 者 标 本 及 伦 理 声 明	16
2.1.4 质 粒 载 体	16
2.1.4.1 慢 病 毒 载 体	16
2.1.4.2 RNA 干 扰 载 体	17
2.1.5 细胞 培 养 基 细胞 实验 相关 试剂	17
2.1.6 核 酸 及 蛋 白 实验 相关 试剂	18
2.1.7 相 关 抗 体	19
2.1.7.1 一 抗 列 表	19
2.1.7.2 二 抗 列 表	21
2.1.8 相 关 引 物 序 列	21
2.1.9 其 他 相 关 试 剂	21
2.2 实验 仪 器 与 设 备	22
2.2.1 细胞 培 养 相关 仪 器 设 备	22
2.2.2 其 他 相 关 仪 器 设 备	23
2.3 实验 方 法	24
2.3.1 检 测 RGMb/Dragon 的 表 达	24
2.3.1.1 检 测 RGMb/Dragon 在 小 鼠 不 同 器 官 的 表 达	24
2.3.1.2 检 测 RGMb/Dragon 在 小 鼠 结 直 肠 正 常 与 肿 瘤 组 织 中 的 表 达	25
2.3.1.3 检 测 RGMb/Dragon 在 结 直 肠 癌 患 者 中 的 表 达	26
2.3.2 构 建 稳 定 干 扰 RGMb/Dragon 的 肠 癌 细胞 株	28
2.3.2.1 构 建 RGMb/Dragon 的 干 扰 质 粒	28
2.3.2.2 构 建 稳 定 干 扰 RGMb/Dragon 的 肠 癌 细胞 株	30

2.3.3 构建稳定表达 RGMb/Dragon 的肠癌细胞株	31
2.3.3.1 构建 RGMb/Dragon 的表达质粒	31
2.3.3.2 RGMb/Dragon 表达质粒的慢病毒包装与感染	33
2.3.3.3 构建稳定表达 RGMb/Dragon 的肠癌细胞株	34
2.3.4 细胞生物学实验	34
2.3.4.1 CCK-8 细胞增殖实验	34
2.3.4.2 BrdU 细胞增殖实验	35
2.3.4.3 流式细胞术检测肿瘤干细胞标志物 CD133	35
2.3.4.4 细胞迁移及侵袭实验	35
2.3.4.5 细胞生长抑制实验	36
2.3.4.6 细胞耐药性集落形成实验	36
2.3.4.7 TUNEL 法检测细胞凋亡	37
2.3.4.8 流式细胞术检测细胞凋亡	37
2.3.5 动物实验	38
2.3.5.1 肠炎相关性结直肠癌小鼠模型的构建	38
2.3.5.2 小鼠皮下肠癌移植瘤模型的构建	38
2.3.5.3 BMP2/4 中和抗体实验	39
2.3.5.4 小鼠 microPET/CT 扫描成像	39
2.3.5.5 荷瘤小鼠抗肿瘤药物治疗模型构建	39
2.3.5.6 小鼠细胞因子抗体芯片实验	40
2.3.6 统计学分析	40
第三章 结果与讨论	41
3.1 RGMb/Dragon 在结直肠癌组织中的表达检测	41
3.1.1 RGMb/Dragon 在结直肠组织中表达量上调	41
3.1.1.1 RGMb/Dragon 在小鼠结肠组织中低表达	41
3.1.1.2 RGMb/Dragon 在小鼠肠炎相关性结直肠癌中表达上调	42
3.1.1.3 RGMb/Dragon 在人结直肠癌中表达上调	43
3.1.1.4 RGMb/Dragon 表达定位于结直肠黏膜上皮	44
3.1.2 讨论	45
3.2 RGMb/Dragon 是促进结直肠癌发生发展的新型基因	46
3.2.1 RGMb/Dragon 促进肠癌细胞增殖	46
3.2.1.1 稳定干扰 RGMb/Dragon 抑制肠癌细胞增殖	46

3.2.1.2 稳定表达 RGMb/Dragon 促进肠癌细胞增殖.....	48
3.2.1.3 RGMb/Dragon 促进小鼠肠癌移植瘤生长.....	50
3.2.2 RGMb/Dragon 激活 Smad1/5/8 和 Erk1/2 磷酸化促进肠癌细胞增殖	52
3.2.2.1 稳定干扰 RGMb/Dragon 抑制 Smad1/5/8 和 Erk1/2 磷酸化.....	52
3.2.2.2 稳定表达 RGMb/Dragon 激活 Smad1/5/8 和 Erk1/2 磷酸化.....	54
3.2.2.3 抑制 Smad1/5/8 或/和 Erk1/2 降低 RGMb/Dragon 介导的肠癌细胞增殖	55
3.2.3 RGMb/Dragon 促进肠癌细胞增殖依赖于 BMP4.....	57
3.2.3.1 阻断 BMP4 抑制 RGMb/Dragon 介导的肠癌细胞增殖	57
3.2.3.2 阻断 BMP2/4 抑制 RGMb/Dragon 介导的小鼠肠癌移植瘤增殖	60
3.2.4 讨论.....	62
3.3 RGMb/Dragon 介导结直肠癌对抗肿瘤药物耐药.....	64
3.3.1 RGMb/Dragon 介导结直肠癌对抗肿瘤药奥沙利铂耐药	64
3.3.1.1 稳定表达 RGMb/Dragon 介导肠癌细胞对奥沙利铂耐药.....	64
3.3.1.2 稳定干扰 RGMb/Dragon 增加肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性.....	66
3.3.1.3 RGMb/Dragon 介导小鼠肠癌移植瘤对奥沙利铂耐药.....	67
3.3.2 RGMb/Dragon 抑制奥沙利铂诱导的细胞凋亡	68
3.3.2.1 稳定表达 RGMb/Dragon 抑制奥沙利铂诱导的细胞凋亡.....	68
3.3.2.2 稳定干扰 RGMb/Dragon 促进奥沙利铂诱导的细胞凋亡.....	71
3.3.3 RGMb/Dragon 抑制奥沙利铂激活 JNK 和 p38 MAPK	73
3.3.3.1 稳定表达 RGMb/Dragon 抑制奥沙利铂激活 JNK 和 p38 MAPK... 73	73
3.3.3.2 稳定干扰 RGMb/Dragon 促进奥沙利铂激活 JNK 和 p38 MAPK... 74	74
3.3.4 讨论.....	75
结论和展望	77
附 录.....	79
参考文献	87
在学期间发表的论文	95
致 谢.....	97

Table of Contents

Abstract in Chinese	II
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Research process of CRC	1
1.1.1 CRC progression.....	1
1.1.2 Mechanism of colorectal tumorigenesis.....	1
1.1.2.1 Gene and epigene instability.....	1
1.1.2.2 Microbiomes and CRC.....	2
1.1.3 Signal pathways in CRC.....	3
1.1.3.1 APC/ β -Catenin/WNT pathway.....	3
1.1.3.2 TGF- β pathway.....	4
1.1.3.3 EGFR/RAS/RAF/MAPK pathway.....	4
1.1.3.4 PI3K/AKT pathway.....	4
1.1.4 Novel strategies of screening, diagnosis and therapy for CRC.....	5
1.1.4.1 Colonoscopy and new technologies.....	5
1.1.4.2 Fecal DNA screening.....	5
1.1.4.3 Clinical tumor biomarkers and therapy targets.....	6
1.2 RGMb/Dragon and RGMs	7
1.2.1 Introduction of RGMs.....	7
1.2.2 RGMb/Dragon.....	8
1.2.2.1 Protein structure of RGMb/Dragon.....	8
1.2.2.2 Receptor Neogenin of RGMb/Dragon	8
1.2.2.3 Expression and biological effects of RGMb/Dragon.....	9
1.2.2.4 RGMb/Dragon and cancer.....	10
1.3 RGMs and BMP pathway in CRC	11
1.3.1 BMP pathway and Smad.....	11
1.3.2 BMP pathways related with RGMb/Dragon.....	11
1.3.2.1 RGMb/Dragon-Neogenin-Rho.....	11
1.3.2.2 RGMb/Dragon-BMP-Smad1/5/8.....	12
1.3.2.3 RGMb/Dragon-BMP-MAPK.....	12
1.3.3 BMP pathways involved in CRC.....	13

1.3.3.1 BMP and colorectal polyposis.....	13
1.3.3.2 BMP and transition from adenoma to carcinoma.....	14
1.3.3.3 BMP and tumorigenesis.....	14
Chapter 2 Materials and methods.....	16
2.1 Materials and reagents.....	16
2.1.1 Cell lines.....	16
2.1.2 Mice.....	16
2.1.3 Samples of CRC patients and ethical statement.....	16
2.1.4 Plasmid vectors.....	16
2.1.4.1 Lentiviral vector.....	16
2.1.4.2 RNA interference vector.....	17
2.1.5 Reagents for cell culture.....	17
2.1.6 Reagents for nucleic acid and protein.....	18
2.1.7 Antibodies.....	19
2.1.7.1 Primary antibodies.....	19
2.1.7.2 Secondary antibodies.....	21
2.1.8 Primer sequences.....	21
2.1.9 Other reagents.....	21
2.2 Laboratory apparatus and equipment.....	22
2.2.1 Apparatus and equipment for cell cultures.....	22
2.2.2 Other apparatus and equipment.....	23
2.3 Methods.....	24
2.3.1 Detection of RGMb/Dragon Expression.....	24
2.3.1.1 RGMb/Dragon expression in murine organs.....	24
2.3.1.2 RGMb/Dragon expression in CAC mice.....	25
2.3.1.3 RGMb/Dragon expression in CRC patients.....	26
2.3.2 Establishment of stable RGMb/Dragon knockdown cells.....	28
2.3.2.1 RGMb/Dragon knockdown plasmid.....	28
2.3.2.2 Stable RGMb/Dragon knockdown cells.....	30
2.3.3 Establishment of stable RGMb/Dragon over-expression cells.....	31
2.3.3.1 RGMb/Dragon over-expression plasmid.....	31
2.3.3.2 Lentivirus Package and infection.....	33
2.3.3.3 Stable RGMb/Dragon over-expression cells.....	34
2.3.4 Biological experiments.....	34
2.3.4.1 CCK-8 cell proliferation assay.....	34

2.3.4.2 BrdU cell proliferation assay.....	35
2.3.4.3 CD133 analysis by FCM.....	35
2.3.4.4 Cell migration and invasion assay.....	35
2.3.4.5 Cell growth inhibition test.....	36
2.3.4.6 Colony formation assay.....	36
2.3.4.7 Apoptosis analysis by TUNEL.....	37
2.3.4.8 Apoptosis analysis by FCM.....	37
2.3.5 Animal experiments.....	38
2.3.5.1 CAC mouse model Generating Generation.....	38
2.3.5.2 Xenograft tumor implantation mouse model.....	38
2.3.5.3 BMP2/4 neutralization.....	39
2.3.5.4 microPET/CT scans.....	39
2.3.5.5 Oxaliplatin therapy of xenografts-bear mouse model.....	39
2.3.5.6 Mouse cytokine antibody array assay.....	40
2.3.6 Statistical analysis.....	40
Chapter 3 Results and discussion.....	41
3.1 RGMb/Dragon expression in CRC.....	41
3.1.1 RGMb/Dragon expression is increased in CRC.....	41
3.1.1.1 RGMb/Dragon expression in colorectal tissues of mouse.....	41
3.1.1.2 RGMb/Dragon expression is increased in CAC mice.....	42
3.1.1.3 RGMb/Dragon expression is increased in CRC patients.....	43
3.1.1.4 RGMb/Dragon localizes to the glandular epithelium of colon.....	44
3.1.2 Discussion.....	45
3.2 RGMb/Dragon is a novel gene to promote colorectal cancer growth...46	
3.2.1 RGMb/Dragon increases colon cancer cell proliferation.....	46
3.2.1.1 RGMb/Dragon knockdown inhibits colon cancer cell proliferation...46	
3.2.1.2 RGMb/Dragon over-expression increases colon cancer cell proliferation.....	48
3.2.1.3 RGMb/Dragon promotes xenograft tumor growth <i>in vivo</i>	50
3.2.2 RGMb/Dragon activates Smad1/5/8 and Erk1/2 in colon cancer cells...52	
3.2.2.1 RGMb/Dragon knockdown reduces phosphorylation of Smad1/5/8 and Erk1/2.....	52
3.2.2.2 RGMb/Dragon over-expression increases phosphorylation of Smad1/5/8 and Erk1/2.....	54
3.2.2.3 Inhibition of Smad1/5/8 or/and Erk1/2 suppress colon cancer cell proliferation induced by RGMb/Dragon.....	55

3.2.3 RGMb/Dragon-mediated colon cancer proliferation is dependent on BMP4.....	57
3.2.3.1 BMP4-blocking inhibits RGMb/Dragon over-expression cells proliferation <i>in vitro</i>	57
3.2.3.2 BMP2/4- neutralization inhibits xenograft tumor growth induced by RGMb/Dragon <i>in vivo</i>	60
3.2.4 Discussion.....	62
3.3 RGMb/Dragon induces resistance to antineoplastic agents in colon cancer.....	64
3.3.1 RGMb/Dragon over-expression induces resistance to oxaliplatin.....	64
3.3.1.1 RGMb/Dragon over-expression induces resistance to oxaliplatin <i>in vitro</i>	64
3.3.1.2 RGMb/Dragon knockdown increases sensitivity to oxaliplatin <i>in vitro</i>	66
3.3.1.3 RGMb/Dragon induces oxaliplatin-resistance <i>in vivo</i>	67
3.3.2 RGMb/Dragon inhibits oxaliplatin-induced apoptosis in colon cancer...68	
3.3.2.1 RGMb/Dragon over-expression inhibits oxaliplatin-induced apoptosis.....	68
3.3.2.2 RGMb/Dragon knockdown promotes oxaliplatin-induced apoptosis...71	
3.3.3 RGMb/Dragon inhibits oxaliplatin-induced JNK and p38 activation...73	
3.3.3.1 RGMb/Dragon over-expression inhibits oxaliplatin-induced JNK and p38 MAPK activation.....	73
3.3.3.2 RGMb/Dragon knockdown increases oxaliplatin-induced JNK and p38 MAPK activation.....	74
3.3.4 Discussion.....	75
Conclusion and future direction.....	77
Appendix.....	79
Reference.....	87
Publications.....	95
Acknowledgement.....	97

摘要

结直肠癌是我国甚至全球范围内最常见的肿瘤之一，也是肿瘤相关死亡的主要原因之一。及时而有效的诊断是降低结直肠癌死亡率的重要措施。除了临床上常规的诊断及治疗方法外，人们也在不断致力于新型肿瘤标志物的研究，以进一步明确结直肠癌发生发展的机制。排斥导向分子(RGM)家族成员 RGMb，又名 Dragon，作为骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)通路的辅助受体，不但承载着胚胎发生、神经修复和肾脏正常生理功能，还与各种上皮来源肿瘤的发生发展密切相关。然而，RGMb/Dragon 在结直肠癌发生发展中的作用及其机制尚未明确。

本课题首先对比了正常小鼠结直肠、小肠、胃部、肝脏、脾脏及肾脏中 RGMb/Dragon 的表达量。RGMb/Dragon 在小鼠的肾脏和小肠组织中的表达量相对较高，而在小鼠结直肠组织中表达相对较低。在构建的炎症相关性结直肠癌(CAC)小鼠模型中，RGMb/Dragon 在结直肠肿瘤组织中的表达量与正常结直肠组织相比显著上调。其次，在结直肠癌患者的手术标本中分别提取蛋白和 RNA 并检测了 RGMb/Dragon 的表达量，与正常组织相比，其在肿瘤组织中，尤其在进展期结直肠癌组织中的表达显著上调。再次，构建了过表达及干扰 RGMb/Dragon 的肠癌细胞和小鼠皮下移植瘤模型，并分别通过体内及体外实验证明 RGMb/Dragon 具有促进肠癌细胞增殖的作用，该效应主要通过调控 Smad1/5/8 和 Erk1/2 磷酸化实现。此外，配体沉默实验及小鼠中和抗体实验证明，RGMb/Dragon 促进肠癌增殖作用还依赖于其配体 BMP2/4 的介导。

进展期结直肠癌面临诸多挑战，其中之一便是肿瘤对化疗药物产生耐药性。因此，本课题还进一步探讨 RGMb/Dragon 与结直肠癌对抗肿瘤药物奥沙利铂耐药之间关系的研究。体外实验表明，稳定表达 RGMb/Dragon 能够降低肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性，提高肠癌细胞的生存率。通过构建奥沙利铂治疗皮下肠癌细胞移植瘤的小鼠模型证明，RGMb/Dragon 诱导小鼠皮下肠癌移植瘤对奥沙利铂产生耐药。RGMb/Dragon 削弱奥沙利铂介导的 JNK 和 p38 MAPK 激活，及 Caspase-3 和 PARP 的剪切，从而抑制奥沙利铂诱导的肠癌细胞凋亡。

综上，本课题研究结果揭示，排斥导向分子 RGMb/Dragon 是一种与肿瘤相关的新基因，它可以通过 BMP 通路促进结直肠癌进展，同时也是介导结直肠癌耐药的关键因子之一。RGMb/Dragon 有望成为结直肠癌筛查诊断标志物及分子治疗的新靶点。

关键词：结直肠癌；排斥导向分子；肿瘤增殖；奥沙利铂；耐药

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most commonly diagnosed cancers and a major cause of cancer death. Effective screening and early diagnosis are essential strategies to reduce the mortality of the colorectal cancer. The molecular mechanisms underlying CRC initiation, growth, metastasis or even drug resistance are still poorly understood. As a member of the repulsive guidance molecule (RGM) family, RGMb (a.k.a. Dragon) has been recently identified as a co-receptor for bone morphogenetic protein (BMP) signaling, contributing to the embryogenesis, neural repairing and renal biological function. However, the role of RGMb/Dragon in CRC development is undetermined.

In this thesis, we first analyzed RGMb/Dragon expression in different organs in normal mice and found that RGMb/Dragon was expressed in the colon and rectum although the expression levels were not as high as those in the stomach, intestine and kidney. We also showed that RGMb/Dragon expression was increased in colorectal cancer tissues compared to control tissues in colitis-associated colorectal carcinoma (CAC) mouse model and in human patients, especially in the advanced colorectal cancer. And then, we demonstrated RGMb/Dragon promoted proliferation of colon cancer cells *in vitro* and accelerated mice xenograft tumor growth *in vivo*. RGMb/Dragon's action on colorectal cancer development was mediated via the BMP4-Smad1/5/8 and Erk1/2 pathways.

Chemotherapy resistance remains a major challenge for the therapy of the advanced CRC. Explore novel targets is essential to develop the anti-tumor agents and to avoid drug resistance. Thus, at last, we analyzed the drug resistance mediated by RGMb/Dragon in colorectal cancer. RGMb/Dragon expression increases with CRC progression in human patients. In the thesis, we showed that RGMb/Dragon inhibited apoptosis and increased cell viability in colon cancer cells in the presence of oxaliplatin. RGMb/Dragon induced resistance of xenograft tumor to oxaliplatin treatment in mice. Mechanistically, RGMb/Dragon inhibited oxaliplatin-induced JNK and p38 MAPK activation, and caspase-3 and PARP cleavage.

Therefore, our results have revealed that RGMb/Dragon is a novel gene that promotes CRC growth through the BMP pathway, and is a novel target that induces

drug resistance in CRC. RGMb/Dragon may be exploited as a potential therapeutic target for CRC treatment.

Keywords: colorectal cancer; RGMb/Dragon; proliferation; oxaliplatin; resistance

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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.