

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520091153007

UDC _____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

**TIPE2 在尼古丁抗炎通路中的作用机制
研究**

**The mechanism study of TIPE2 in nicotine mediated
anti-inflammatory pathway**

隋华秀

指 导 教 师 : 高丰光 教授

专 业 名 称 : 微 生 物 学

论文提交日期 : 2012 年 5 月

论文答辩时间 : 2012 年 5 月

学位授予日期 : 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

缩略语索引

缩略语	英文全名	中文全名
ACh	Acetylcholine	乙酰胆碱
$\alpha 7$ nAChR	$\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor	$\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体
BCA	bicinchoninic acid	二喹啉甲酸
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BTX	α -bungarotoxin	α 银环蛇毒素
CAP	cholinergic anti-inflammatory pathway	胆碱能抗炎通路
CTL	cytotoxic T lymphocyte	杀伤性 T 淋巴细胞
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FCM	flow cytometry	流式细胞术
IFN- γ	interferon- γ	干扰素- γ
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
M-CSF	microphage colony- stimulating factor	巨噬细胞集落刺激因子
MODS	multiple organ dysfunction syndrome	多脏器功能障碍综合症
MAPK	mitogen activated protein kinase	丝裂原活化的蛋白激酶
MFI	mean fluorescent intensity	平均荧光密度
nAChR	Nicotinic Acetylcholine Receptor	烟碱型胆碱能受体
OVA	ovalbumin	鸡卵白蛋白
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate	佛波酯
SIRS	systemic inflammatory response syndrome	全身炎症反应综合征
TCR	T cell receptor	T 细胞受体
TLR	toll like receptor	Toll 样受体
TMB	tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TNFAIP8	tumor necrosis factor- α -induced protein-8	肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白
TNFAIP8L-2	tumor necrosis factor- α induced protein-8-like 2, TIPE2	肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 8 型-2

摘要

“胆碱能抗炎通路”是新近发现的神经-免疫调节通路，其激活可有效减少多种促炎因子的释放，对全身和局部炎症均具有明显抑制作用。尼古丁，作为一种胆碱能受体激动剂，其药理作用与乙酰胆碱 ACh 相似，可有效减轻炎症反应。已有文献报道尼古丁能够降低促炎因子所引起的细胞因子 TNF- α 、IL-12、IL-6 的释放。但到目前为止，尼古丁抗炎通路的分子机制尚不清楚。TIPE2 是最近发现的一种免疫负调节分子，属于 TNFAIP8 家族，主要表达在胸腺、脾脏、淋巴结以及小肠粘膜等免疫器官和淋巴组织中，对适应性免疫和固有免疫起到负性调控作用。但 TIPE2 是否参与尼古丁所介导的抗炎过程，以及在其中可能所起的作用及机制尚没有文献报道。本课题首先采用皮下注射的方法给予小鼠持续的尼古丁刺激，以流式细胞术、ELISA 检测小鼠脾细胞在抗原刺激下 TNF- α 、IL-4、IL-2 及 IL-12 的表达情况；其次，体外诱导的巨噬细胞，尼古丁刺激后，以流式细胞术检测 LPS 所致的细胞因子 TNF- α 的释放；再次，以 Western blot、激光共聚焦研究尼古丁对巨噬细胞、RAW264.7 细胞 NF- κ B 通路的影响；继以 Western blot、流式细胞术探究尼古丁对巨噬细胞、RAW264.7 细胞中 TIPE2、 $\alpha 7$ nAChR 表达的调控，以及 $\alpha 7$ nAChR 在尼古丁调控 TIPE2 表达中的作用；最后，以 Western blot 检测 TIPE2 过表达对 NF- κ B 通路的影响，从而初步阐明尼古丁通过 NF- κ B 通路调控炎症反应的机制。结果发现：① 体内持续尼古丁刺激可使促炎因子所致的小鼠脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞 TNF- α 、IL-4、IL-2 以及 IL-12 的阳性细胞率分别由 20%、14%、36%和 75%降为 13%、6%、15%和 19%，细胞培养上清中 IL-12、IL-4 的浓度分别由 1625、425 pg/ml 降为 139、153 pg/ml；在体外，尼古丁刺激降低 LPS 引起的巨噬细胞 TNF- α 的表达，这种降低可以被尼古丁受体阻断剂 BTX 逆转。② 尼古丁处理可明显抑制 LPS 所致的巨噬细胞及 RAW264.7 细胞 I κ B α 的磷酸化、降解以及 p65、p50、p52 的核转位。③ 在蛋白水平上，尼古丁刺激可明显上调 RAW264.7 细胞、小鼠巨噬细胞 TIPE2 的表达。④ 尼古丁刺激可上调巨噬细胞及小鼠脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞 $\alpha 7$ nAChR 的表达；同时，尼古丁 $\alpha 7$ nAChR 特异性拮抗剂 α 银环蛇毒素 BTX 或非特异性

阻断剂筒箭毒碱 Tc 能够阻断尼古丁对 TIPE2 的上调作用，且 BTX 阻断效果更明显。⑤ TIPE2 过表达明显抑制 I κ B α 的磷酸化、降解以及 p65、p50、p52 的核转位。

通过以上研究，我们发现尼古丁可以通过 α 7 nAChR 上调 TIPE2 的表达，进而负调控 NF- κ B 的活化，从而起到下调促炎因子所引起的 TNF- α 等细胞因子的释放。本课题揭示了 TIPE2 在尼古丁抗炎通路中的作用及机制，为进一步探讨神经系统与免疫系统之间的联系，为人们采取新的抗炎策略和干预手段提供依据。

关键词：炎症；尼古丁；胆碱能抗炎通路；TIPE2；NF- κ B

Abstract

“Cholinergic anti-inflammatory pathway” is a newly discovered nerve-immune regulation pathway. Its activation can effectively reduce the release of a variety of pro-inflammatory cytokines and significantly inhibit systemic and local inflammation. Nicotine is an acetylcholine receptor agonist, and its pharmacological effect is similar to acetylcholine Ach, which exerts its effect by acting on cholinergic receptors. TIPE2 is an immune negative regulatory molecule, which is found recently and belongs to a molecule of the TNFAIP8 family. It plays a negative regulatory role on adaptive immunity and innate immunity, and mainly expresses in the thymus, spleen, lymph nodes, small intestinal mucosa and other immune organs and lymph organization. But the effect of TIPE2 in nicotine-mediated anti-inflammatory process is still not clear. In our experiments, firstly, female BALB/c mice at 3 weeks were subcutaneous injection of PBS or nicotine twice daily for 9 days. Splenocytes were prepared and TNF- α , IL-4, IL-2 or IL-12 were determined by flow cytometry and ELISA. Secondly, in vitro, macrophages induced from murine bone marrow were treated with nicotine, TNF- α was measured by flow cytometry. Thirdly, we explored the effect of nicotine on NF- κ B pathway in macrophages and RAW264.7 by Western blot and confocal microscope. Then, we investigated the regulation of nicotine on TIPE2 and α 7 nAChR expression as well as the effect of α 7 nAChR on TIPE2 expression by Western blot and flow cytometry in macrophages and RAW264.7. Finally, the role of TIPE2 overexpression on NF- κ B activation was determined by Western blot. Our results demonstrated that, firstly, in vivo, nicotine could decrease LPS-induced TNF- α , IL-4, IL-2 and IL-12 production from 20%, 14%, 36% and 75% to 13%, 6%, 15% and 9% in CD4⁺ splenocytes which stimulated by nicotine for 9 days, and decrease the concentration of IL-12 and IL-4 from 1625, 425 pg/ml to 139, 153 pg/ml respectively in culture supernatant. In vitro, nicotine stimulation could decrease LPS-induced TNF- α production of

macrophages, which could be reversed by nicotine receptor inhibitor BTX. Secondly, nicotine treatment could inhibit the phosphorylation and degradation of I κ B and the translocation of p65、 p50、 p52 in macrophages and RAW264.7 cells. Thirdly, nicotine stimulation could upregulate TIPE2 expression at the level of protein in macrophages and RAW264.7. Furthermore, nicotine could enhance the expression of α 7 nAChR in CD4⁺ T cells and macrophages. TIPE2 upregulation by nicotine stimulation could be inhibited by pretreatment with nicotine receptor specific and non-specific inhibitor BTX and Tc. Finally, overexpression of TIPE2 could inhibit the phosphorylation and degradation of I κ B and the translocation of NF- κ B.

Above all, we conclude that nicotine could upregulate TIPE2 expression through its α 7 nAChR receptor and negatively regulate NF- κ B activation, which lead to decrease TNF- α and other cytokines production. Our experiments reveal that the mechanism of TIPE2 in nicotine anti-inflammatory pathway and provide the basis for exploring the link between the nervous system and the immune system, and adopting new anti-inflammatory strategies and interventions.

Key words: Inflammatory; Nicotine; CAP; TIPE2; NF- κ B

目 录

缩略语索引.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	IV
前言.....	1
实验材料.....	3
实验方法.....	8
实验结果.....	18
讨论.....	28
结论.....	34
参考文献.....	35
文献综述.....	40
攻读学位期间所发表文章.....	50
致谢.....	51

Table of Contents

Abbreviations.....	I
Abstract in Chinese.....	II
Abstract in English.....	IV
Introduction.....	1
Materials.....	3
Methods.....	8
Results.....	18
Discussion.....	28
Conclusion.....	34
References.....	35
Article Review.....	40
Achievements.....	50
Acknowledgement.....	51

前言

外界刺激（如细菌、创伤、烧伤等）可引起致炎因子释放并导致炎症反应，适度的炎症反应有利于消灭细菌、清除坏死组织、促进修复及伤口的愈合，是宿主防御机制的重要组成部分。

在受到感染时，机体会通过高度保守的内源性机制调节天然免疫反应程度，使致炎和抗炎反应趋于平衡，从而维持内环境稳定。2000年由 Borovikova 提出的“胆碱能抗炎通路” (cholinergic anti-inflammatory pathway, CAP)^[1]是新近发现的神经-免疫调节通路，其激活可有效减少多种促炎因子的释放，对全身和局部炎症具有明显的抑制作用。“胆碱能抗炎通路”机制的阐明，不仅可深刻理解机体的神经-免疫调节通路，而且也会为炎症相关的疾病提供潜在的作用靶点。

炎症信号通过传入迷走神经传输到脑，当中枢接收到机体的免疫刺激信息后，可将信号投射到各个迷走神经核团，激活传出迷走神经纤维，由交感神经的节前纤维、副交感神经节前和节后纤维释放乙酰胆碱(Acetylcholine, ACh)继而通过毒蕈碱型受体 (M 受体) 或烟碱型受体 (N 受体) 发挥作用。已有文献报道，毒蕈碱型受体 (M 受体)、烟碱型受体 (N 受体) 可存在于淋巴细胞和其他免疫细胞或可产生细胞因子的非免疫细胞上。本世纪初，Tracy 等发现，副交感神经释放的乙酸胆碱可与免疫细胞上具有 $\alpha 7$ 亚单位的 N 型 ACh 受体结合，有效抑制 LPS 刺激外周巨噬细胞释放致炎介质肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF α)、IL-1 β 、IL-6 及 IL-18 而调控炎症反应^[1,2]。作为胆碱能受体激动剂的尼古丁，其药理作用与乙酰胆碱 ACh 相似，可通过作用于胆碱能受体来发挥效应。尼古丁处理不仅可明显抑制 CD3 刺激人外周血单核细胞所致 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 的释放^[3]，而且也可减少 LPS 所致的小鼠脾细胞 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 释放^[4,5,6]。独立研究的另一小组的实验也发现，尼古丁还可促进李斯特菌在 MH-S 肺泡巨噬细胞中的增殖，并能下调巨噬细胞 IL-6、IL-12、TNF- α 的释放^[7]。

NF- κ B 通路激活剂包括肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-1(IL-1)、脂多糖(LPS)、氧自由基和佛波脂(PMA)、植物血凝素、血管紧张素 II (Ag II) 等^[8]。核因子 κ B (NF- κ B) 是一种广泛存在于真核细胞内的基因多向性转录因子，属于

Rel 家族，哺乳动物细胞中核转录因子(nuclear factor kappa B, NF- κ B)蛋白家族中的成员，以同源或异源二聚体的形式存在，主要包括 NF- κ B1(p50/p105)、NF- κ B2(p52/p100)、RelA(p65)、RelB 和 C-Rel 这 5 种亚基。在静息状态下，NF- κ B 通常与其抑制蛋白 (inhibitor of nuclear factor kappaB, I κ B) 结合成无活性的三聚体复合物存在于细胞质中^[9]，而在细胞内外的信号刺激下，上游 NF- κ B 抑制蛋白激酶(inhibitor of nuclear factor kappaB kinase, IKK)被激活后可使 I κ B 被磷酸化并由 26S 蛋白酶体泛素化降解，NF- κ B 就被迅速释放出来，激活并从胞质易位到胞核，与靶基因上的顺式调节元件 κ B 位点发生特异性结合，调控一系列基因的表达。

TIPE2 (TNFAIP8L-2, tumor necrosis factor- α induced protein-8-like 2, 肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 8 型-2)，是最近发现的一种免疫负调节分子，属于 TNFAIP8 家族中的一个分子^[10]。人 TIPE2 基因位于染色体 1q21.2-lq21.3，由 184 个氨基酸构成，具有与死亡受体结构域(DED)相似的结构域和 6 个保守的 α 螺旋结构^[11]。TIPE2 主要表达在胸腺、脾脏、淋巴结以及小肠粘膜等免疫器官和淋巴组织中，通过下调 NF- κ B 通路，维持体内免疫平衡及预防高反应应答^[10]。但是，TIPE2 作为新发现的固有免疫和适应性免疫应答的负性调控因子，是否参与了胆碱能抗炎通路，目前尚无报道。

本研究中，我们对尼古丁调控 TIPE2 表达以及 TIPE2 在尼古丁抗炎通路中的作用进行了初步探讨。首先以皮下注射的方法给予小鼠持续的尼古丁刺激，以流式细胞术胞内染色、ELISA 分别检测小鼠脾脏细胞在抗原刺激下细胞因子的分泌情况；其次，对体外诱导的巨噬细胞以尼古丁刺激后，流式细胞术胞内染色检测 LPS 所致的细胞因子释放；再次，以 Western blot、激光共聚焦检测尼古丁对巨噬细胞、RAW264.7 细胞 NF- κ B 通路的影响；继以 Western blot 检测尼古丁刺激下巨噬细胞、RAW264.7 细胞中 TIPE2 的表达情况；再以流式细胞术、Western blot 检测尼古丁对小鼠脾脏 CD4⁺T 细胞、巨噬细胞 α 7 nAChR 的表达影响及 α 7 nAChR 在尼古丁调控 TIPE2 表达中的作用；最后，通过建立 TIPE2 过表达细胞株，以 Western blot 检测 TIPE2 过表达对 NF- κ B 通路的影响。结果显示：第一，在体内，尼古丁连续刺激九天后，促炎因子所引起的小鼠脾脏 CD4⁺T 淋巴细胞 TNF- α 、IL-4、IL-2 以及 IL-12 的阳性细胞率分别由 20%、14%、36%

和 75%降为 13%、6%、15%和 19%，降低率分别为 35%、57%、58%和 75%；细胞培养上清中 IL-12、IL-4 的浓度分别由 1625、425 pg/ml 降为 139、153 pg/ml；在体外，尼古丁刺激降低 LPS 引起的巨噬细胞 TNF- α 的表达，这种降低可以被尼古丁受体阻断剂 BTX 逆转。第二，对于巨噬细胞及 RAW264.7 细胞，尼古丁处理可明显抑制 I κ B α 的磷酸化、降解以及 p65、p50、p52 的核转位。第三，在蛋白水平上，尼古丁刺激可明显上调 RAW264.7 细胞、小鼠巨噬细胞 TIPE2 的表达。第四，尼古丁刺激可上调巨噬细胞及小鼠脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞 α 7 nAChR 的表达，同时，尼古丁 α 7 nAChR 特异性拮抗剂 α 银环蛇毒素 BTX 或非特异性阻断剂筒箭毒碱 Tc 能够阻断尼古丁对 TIPE2 的上调作用，且 BTX 阻断效果更明显。第五，TIPE2 过表达抑制 I κ B α 的磷酸化、降解以及 p65、p50、p52 的核转位。

通过以上研究，我们发现尼古丁可以通过 α 7 nAChR 上调 TIPE2 的表达，进而负调控 NF- κ B 的活化，从而起到下调促炎因子所引起的 TNF- α 等细胞因子的释放。本课题揭示了 TIPE2 在尼古丁抗炎通路中的作用及机制，为进一步探讨神经系统与免疫系统之间的联系，为人们采取新的抗炎策略和干预手段提供依据。

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞系

C57BL/6 (H-2K^b) 近交系小鼠、BALB/c 近交系小鼠，3-4 周左右，雌性。购自中国科学院上海实验动物中心，饲养于厦门大学实验动物中心 SPF 级的动物房中。

RAW 264.7 小鼠巨噬细胞系，购自上海中科院细胞库

1.1.2 主要试剂

1.1.2.1 细胞培养相关试剂

(1) 巨噬细胞集落刺激因子 (Mouse macrophage colony-stimulating factor Recombinant Protein, M-CSF) (eBioscience)

(2) DMEM 培养液 (DMEM Medium) (HyClone)

- (3) RPMI 1640 培养液 (RPMI Medium 1640) (Gibco)
- (4) 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco)
- (5) HEPES (Sanland Chemical)
- (6) β -巯基乙醇 (鹭隆生物)
- (7) 胰酶 (Trypsin) (鹭隆生物)
- (8) 尼古丁 [Nicotine, (S)-3-(1-甲基-2-吡咯烷基)吡啶] (Sigma)
- (9) α 银环蛇毒素 (α -Bungarotoxin, α -BTX) (EMD Biosciences)
- (10) 筒箭毒碱 (Tubocurarine, Tc) (Sigma)
- (11) LPS (Sigma)
- (12) 红细胞裂解液:

NH_4Cl 8.025 g, KHCO_3 1 g, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.037 g

800 mL 双蒸水溶解, 调节酸碱度为 pH 7.2, 双蒸水补至 1 L, 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌。

- (13) 磷酸盐缓冲液 (PBS):

NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g

溶于 800 ml 双蒸水, 用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 双蒸水定容至 1 L。

- (14) BFA (1000 \times Brefeldin A Solution) (eBioscience)
- (15) 生理盐水 (0.9%NaCl)
- (16) PMA/TPA (PKC 激活剂) (Beyotime)
- (17) ionomycin (Beyotime)
- (18) G418 sulfate (上海生工)

1.1.2.2 Western Blot 相关试剂

- (1) 蛋白裂解液 (M-PER $^\circledR$ Mammalian Protein Extraction Reagent) (Thermo)
- (2) RIPA 裂解液 (强) (碧云天)
- (3) 磷酸蛋白酶抑制剂 (北京普利莱基因技术有限公司)
- (4) BCA 试剂 A、B (碧云天)
- (5) 鼠抗 β -Actin 一抗 (Anti β -Actin Mouse Polyclonal Antibody) (Santa Cruz Biotechnology)
- (6) 兔抗 I κ B- α 一抗 (Anti I κ B- α Rabbit Polyclonal Antibody) (CST)
- (7) 兔抗 Phospho-I κ B- α (Ser32)一抗 (Anti Phospho-I κ B- α (Ser32) Rabbit

monoclonal Antibody) (CST)

- (8) 兔抗 P65 一抗 (NF- κ B p65 (E498) Antibody) (CST)
- (9) 兔抗 p-p65 一抗 (Anti Phospho-p65 Rabbit Polyclonal Antibody) (CST)
- (10) 兔抗 p100/p52 一抗 (NF- κ B2 p100/p52 Antibody) (CST)
- (11) 兔抗 p50 一抗 (Anti-NF- κ B p50 Antibody) (millipore)
- (12) 羊抗 Histone H3 一抗 (Histone H3 (C-16)) (Santa Cruz Biotechnology)
- (13) 鼠抗 TNFAIP8L2 一抗 (Anti TNFAIP8L2 purified MaxPad Mouse Polyclonal Antibody) (Abnova)
- (14) 兔抗 α 7 一抗 (Anti Rabbit Nicotine Receptor Alpha7) (millipore)
- (15) HRP-羊抗兔二抗 (Goat Anti-Rabbit IgG(H&L)-HRP) (联科生物)
- (16) HRP-羊抗鼠二抗 (Goat Anti-Mouse IgG(H&L)-HRP Conjugate secondary antibody) (Abnova)
- (17) HRP-驴抗羊二抗 (Donkey Anti-Goat IgG(H&L)-HRP Conjugate secondary antibody) (Santa Cruz)
- (18) 化学发光底物试剂盒 (ImmobilonTM Western HRP Substrate Luminol Reagent Kit) (Millipore)
- (19) 核质分离试剂盒 (NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents) (Thermo)
- (20) 预染蛋白 Marker (PageRulerTM Prestained Protein Ladder) (Fermentas)
- (21) Loading Buffer (5 \times):

溴酚蓝 25 mg, SDS 0.5 g, 甘油 2.5 mL

用 2.5 ml 0.5 M Tris (pH 6.8) 溶液溶解后再加 2.5 mL 甘油混匀, 500 μ L/份分装, 每份使用前加 25 μ L β -巯基乙醇。

- (22) 电泳缓冲液 (1 \times):

Tris 碱 3.03 g, 甘氨酸 18.8 g, SDS 1 g

溶于 800 mL 双蒸水中, 用少量浓 HCl 调酸碱度为 pH 8.3, 双蒸水定容至 1 L。

- (23) 半干转液 (1 \times):

Tris 碱 2.9 g, 甘氨酸 14.4 g, 甲醇 200 mL

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts 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.

厦门大学博硕士论文摘要库