

天然产物 Ectoine 与 Hydroxyectoine 的 生物工程及医学应用研究进展

张欣, 刘静, 朱德锐*

青海大学医学院基础医学研究中心, 西宁 810016

摘要: 四氢嘧啶及衍生物 (Ectoines, Ects) 是嗜盐或耐盐细菌胞内合成的一类能够抵抗外界高盐胁迫的有机相容溶质 (Compatible solute), 主要包括四氢嘧啶 (Ectoine) 与羟基化四氢嘧啶 (5-hydroxyectoine, 5-HE)。在高温、干旱、高 pH 值、高压和高盐等极端环境条件下, Ects 不仅能够平衡细胞的渗透压, 而且对蛋白质、DNA、细胞膜以及整个细胞提供抗逆协助作用。本文综述了 Ects 对生物大分子和细胞的保护与稳定作用, 以及在临床疾病治疗应用方面的辅助作用, 并讨论与展望了 Ects 在生物医药制剂和生物保健开发等方面的应用前景。

关键词: Ectoine; 羟基化四氢嘧啶; 有机相容溶质; 生物工程; 医学应用

中图分类号: Q939. 93

文献标识码: A

DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2017. 5. 028

Review on Bioengineering and Biomedical Applications of Natural Products Ectoine and Hydroxyectoine

ZHANG Xin, LIU Jing, ZHU De-rui*

Research Center of Basic Medical Science, College of Medical, Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: To counteract the deleterious effects of high salinity on cell osmotic pressure, halotolerant or halophilic microorganisms, a particular class of organic compatible solutes ectoines (abbreviated to Ects) was accumulated. Ects mainly includes ectoine and its hydroxylated derivative 5-hydroxyectoine (5-HE). Ects not only can balance the intracellular osmotic pressure, but also provide anti-reverse assistance for proteins, nucleic acids, cell membrane and even whole cells under the extreme conditions of high temperature, cold, drought, high pH value, high pressure or high salt. In this review, the importance of current and potential applications of ectoines as protecting agents for macromolecules and cells, together with their potential as therapeutic agents for certain diseases were summarized. In addition, its current prospects of biological medicine and health care application were also discussed.

Key words: ectoine; 5-hydroxyectoine; compatible solute; bioengineering; medical applications

四氢嘧啶 [Ectoine: (4S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid] 及羟基化四氢嘧啶 [5-HE: (4S,5S)-2-methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid] 是嗜盐或耐盐细菌胞内合成的一类能够抵抗外界高盐胁迫的相容溶质, 具有亲水性和两性离子特征, 在结构上属氨基酸的环化衍生物或部分氢化嘧啶衍生物 (图 1), 分子内电子离域化^[1]。生化特性方面, Ects 具有惰性、不干涉胞内大部分的酶促反应, 胞内高耐受性, 对热稳定, 易溶于水, Ectoine 与 5-HE 溶解度分别为 5.45

mol/kg 和 7.04 mol/kg。Ectoine 和 5-HE 的分子结构接近, 物理化学特征极为相似, 故分离鉴定存在一定困难^[2]。又因分子具有手性特征, 而难以用化学方法合成^[3]。

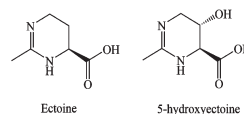


图 1 四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶分子结构

Fig. 1 Molecular structure of Ectoine and 5-HE

经过数十年的研究, 已在基因水平、酶水平和调控水平对 Ects 的生物合成途径进行了较为深入的研究。Ectoine 的生物合成是由 *ectA*、*ectB*、*ectC* 3 个基因编码的 L-2,4-二氨基苯甲酸 N γ -乙酰转移酶、

L-丙氨酸转氨酶、四氢嘧啶合成酶 3 种酶来调控^[4]。5-HE 通常作为 Ectoine 的羟基化衍生物存在于细胞内,是由 Ectoine 经 *ectD* 基因编码的羟基化酶 (EctD) 催化生成^[4];但是亦有研究发现,当人为阻断 EctD 的活性时,胞内仍有少许的 5-HE 合成,因此,5-HE 的生物合成可能存在其他未知途径^[5]。根据国内外文献报道,目前广泛应用于 Ectoine/5-HE 工业规模生产的模式菌株主要集中在 γ -变形菌纲海洋螺菌目盐单胞菌科 (Halomonadaceae),尤以盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和色盐杆菌属 (*Chromohalobacter*) 居多,其中典型代表分别为延长盐单胞菌 *Halomonas elongata* DSM 2581 与需盐色盐杆菌 *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^[6]。

Ects 作为细胞保护剂和稳定剂,在中度嗜盐菌或耐盐菌胞内大量积聚,可抵抗高渗透压的冲击,是微生物适应高盐环境的一种应对策略^[4],帮助细胞、蛋白质和核酸抵抗冷冻、高温、高盐、高压、干旱和辐射等各种逆境因素的影响。近年来,Ects 作为微生物重要的次级代谢产物,国外研究者已将其广泛地应用于消化道疾病、干眼综合征^[7]、鼻炎^[8]、过敏性鼻炎^[9]、器官移植与脏器保存^[10]、皮肤创伤与保健美容等生物医学领域,其开发产品诸如消化道药物、滴眼液、鼻喷剂、呼吸道渗透剂、器官保存液、皮肤创伤药、新型生物化妆品等,成为生物制剂研发的热点。

1 分子水平应用

1.1 对酶分子的稳定与增强活性作用

诸多研究表明 Ects 对蛋白酶具有良好的稳定作用,现已有相关酶稳定剂的研发产品问世^[11]。Ectoine 可作为生物工程酶的保护剂,提高工业产量,如:采用添加有 3 mmol/L Ectoine 的浸麦水进行微型制麦试验时,Ectoine 对经 82 °C 高温温焙后的淀粉酶、 β -葡聚糖酶和纤维素酶活性的保护效果十分明显;其中,对纤维素酶的保护作用最显著,活性可分别提高 34.3% (Gairdner) 和 28.1% (甘啤 3 号),提高了麦芽的酿造性能^[12]。Ectoine 作为公认的相容溶质渗透压保护剂,可以通过增强棉籽油中甘油三酯转化脂肪酶的活性,提高脂肪酶催化合成油酸乙酯的产率,与未添加 Ectoine 的相比,油酸乙酯酯化率提高了 24.8%^[13]。Ectoine 可以有效地防止因加热导致植酸酶失活的现象发生,使酶保持其生物学活性^[14];此外,在聚合酶链反应 (polymerase

chain reaction, PCR) 过程中,Ectoine 可保护 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 的稳定性不受温度升高的影响^[14]。5-HE 亦可保护乳酸脱氢酶 (Lactic dehydrogenase, LDH) 不被 H₂O₂ 氧化,且保护作用不受氧化源的影响^[15]。

1.2 对 DNA 结构稳定的影响

研究表明 Ects 可诱导 DNA 结构改变,抑制多种限制性内切酶的切割作用。Ects 在 PCR 过程中除可改变 DNA 构象的方式和影响引物退火温度外,还对 GC 含量较高的模板起到提高 DNA 解链温度的效果^[16];同时,在 PCR 体系中添加一定浓度 (模板含 72.6% GC;有效浓度为 0.1 ~ 0.5 M) 的 Ects 可以提高 PCR 特异性,保证 PCR 过程中 DNA 聚合酶与模板有效地结合,减少碱基的错误配对,以此避免非特异性 PCR 扩增产物的污染^[17]。Mascellani 等^[18]在 DNA 微阵列实验中发现添加较低浓度 (浓度为 10 ~ 25 mM) 的 5-HE 即可提高该实验的效率,此为 DNA 微阵列实验的改进提供了依据。一般情况下,DNA 结合蛋白如热不稳定蛋白 HU 的同源二聚体 H-NS 蛋白 (protein H-NS, hns) 可促进亮氨酸拉链 (leucine response protein, LRP) 的形成,而相容溶质 Ectoine 除可维持单细胞的水合作用外,亦可协助促进 LRP 形成,提高转录调控中 H-NS 蛋白和 LRP 的稳定性^[14]。

1.3 对蛋白质正确折叠的影响

Ectoine 具有的分子伴侣功能,可在肽链生物合成过程中指导新生肽链按特定方式进行正确的折叠。5-HE 可影响大肠杆菌 *E. coli* 的冻融纯化中细胞毒性蛋白的超量表达,并显著提高该蛋白的定向能力和折叠功能^[14]。Roychoudhury 等^[19]利用单分子光谱技术分析 Ectoine 对细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, BR) 的力学性能影响,发现 Ectoine 可缩短 BR 多肽链的伸展长度,并防止蛋白质的错误折叠。此外,Ectoine 还可降低外展应力对 BR 的结构影响,更加证实了 Ectoine 对蛋白质的保护作用。Ectoine 抑制错误折叠蛋白质产生的功能,在治疗与蛋白错误折叠相关疾病中发挥重要的作用^[20]。

2 细胞水平应用

Ects 不仅是有效的生物大分子稳定剂,而且是有效的细胞渗透保护剂和储存保护剂,维护细胞结构的稳定性^[20]。Bownik 等^[21]以牛红细胞为材料进行 Ectoine 体外影响实验,研究表明 Ectoine 能够降

低金黄色葡萄球菌释放的溶血素 A (Haemolysin A, HlyA) 对牛红细胞的破坏影响, 以及降低谷胱甘肽还原型/氧化型 (GSH/GSSG) 的比率。Thamm 等^[22] 采用 5-HE 干预脂肪干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 和角化细胞 (keratinocyte cell, KCs) 的体外培养, 实验结果发现, 5-HE 可增强 ADSCs 的活性和提高 MMP 家族成员-9 (matrix metalloprotein 9, MMP-9) 诱导血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的基因表达, 以此促进伤口愈合。

3 临床医学应用

3.1 淀粉样病变类疾病

在临床疾病治疗方面, Ectoine 可应用于治疗因淀粉样蛋白变性引起的相关疾病, 如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、马查多约瑟夫病 (Machado-Joseph's disease, MJD)、帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 等^[23]。Jorge 等^[23] 在体外实验研究中发现, Ectoine 可抑制 A β 肽的形成, 从而防止淀粉样蛋白形成; 此外, Ectoine 还可抑制和减少人类细胞中朊病毒诱导性缩氨酸的毒性。MJD1 基因的表达产物 ataxin-3 可引起神经系统特定区域的神经细胞核内包涵体 (neuronal intranuclear inclusions, NIIs) 的形成, 致使神经细胞变性退化。Ectoine 可通过减少细胞核内包涵体的总量和分布来降低神经细胞的凋亡, 即便形成包涵体也可将其转移至胞外, 阻止包涵体对神经细胞的危害, 从而有效地预防和减少 MJD 的发生。PD 是由于神经元内丧失多巴胺递质, 导致胞质内路易小体 (lewy body) 和营养障碍性神经突形成, Ectoine 可抑制两者内共有的 α -突触核蛋白 (α -synuclein) 的产生, 使多巴胺在递质间的传导趋于正常, 从而降低 PD 的发生^[23]。

3.2 肺部感染与消化道炎症

微粒是肺部感染的主要诱发因素, 中性粒细胞寿命的长短直接影响微粒诱导的肺部感染的持续时间和严重程度。Ectoine 可以通过抑制微粒的诱导信号来防止肺中性粒细胞参与抗凋亡作用而引起的炎症反应^[24]。最新研究表明: Ectoine 可促进体内中性粒细胞凋亡, 加快炎症部位上皮细胞的再生, 缩短病程, 减轻肺部感染^[24]。此外, Ectoine 亦有利于提高肺部给药药物的疗效, 促进吸收速率及吸收程度。Thomas 等^[25] 研究发现含有 Ects 的药物可以治疗慢性肠道炎症疾病, 如克罗恩病 (Crohn's dis-

ease), 并且含有 Ects 的口服膳食补充剂可以调节肠道菌群。此外, Ectoine 亦具有渗透保护功能, 保护细胞在极端环境下免受压力伤害, 如在化疗过程中 Ectoine 可提高患者对化疗药物的耐受剂量, 保护正常细胞免受破坏, 减轻化疗患者的痛苦^[26]。

3.3 小肠移植应用

Ectoine 能有效保护肠粘膜和肌层, 可作为小肠移植中肠粘膜损伤的辅助治疗。Ectoine 通过防止正常细胞的凋亡、氧化神经酰胺递质和减少线粒体损伤来提高肠粘膜屏障功能。Wedeking 等^[27] 通过研究 Ectoine 对大鼠的炎症肠平滑肌细胞和原始 264.7 巨噬细胞的生长影响, 发现 Ectoine 极大地降低了脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS)、白介素 (Interleukin, IL-1、IL-6)、肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor α , TNF- α) 和环氧合酶 (Cyclooxygenase 2, COX-2) 等炎症因子的基因表达, 从而降低肠上皮的炎症反应和组织损伤。

3.4 艾滋病的辅助应用

Tat 肽是人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 的复制过程中的重要调节蛋白之一。Ectoine 可抑制反式作用因子 Tat 肽与位于病毒 mRNA 5' 端顺式元件的结合, 降低病毒逆转录效率^[28]。此外, Ectoine 亦可促进子宫颈癌 HeLa 细胞和人成纤维细胞对¹⁴C 的摄取, 实现病毒治疗过程中的定量监测。5-HE 可使逆转录病毒载体长期存在, 若让其携带有效抗病毒药物进入靶细胞, 对 HIV 的治疗来说可能是一项新的突破^[14]。

4 生物药剂开发

4.1 干燥、过敏性疾病保护类药物

干眼症^[29] 是由于各种原因导致的泪液质或量的异常, 或泪液流体动力学异常引起的泪膜不稳定和眼表损害的一种多因素疾病, 它是常见的人体干燥性疾病之一。干眼症的常规治疗方法是提供润滑的滴眼液或泪液替代品。而 Ectoine 具有的亲水性和两性离子特性, 可以维护正常泪液的分泌, 减少角膜/结膜部位水分蒸发, 从而缓解和治疗干眼症。Dwivedi 等^[30] 运用人造眼球模型研究 Ectoine 对人脸板腺泪膜的影响作用, 原子显微镜定量技术分析表明: Ectoine 可引起泪膜结构外观改变, 使其变得更为柔软, 促进眼膜的稳定性, 此为研究新的滴眼液提供了参考。过敏性疾病如: 过敏性鼻炎、结膜炎、皮肤过敏反应等, 在过去几十年中发病率显著上升,

成为全球关注的公共卫生问题,其主要表现为炎症反应类症状^[31]。Eichel 等^[9]采用 Meta 分析(Meta-analysis,荟萃分析)的方法分析 Ectoine 鼻喷剂、滴眼液对过敏性鼻炎和过敏性结膜炎患者的疗效时发现,经过 7 d 的治疗,患者鼻部和眼部症状明显减轻,其中鼻溢症状减轻 31.76%,鼻塞症状减轻 29.94%。表明 Ectoine 的添加对炎症症状的减轻起到了一定的治疗作用,且把它作为天然抗炎药物开发的主要对象将具有广泛前景。目前,干燥、过敏性疾病的保护类药剂已有投入医药市场,如德国研发的干眼症滴眼液(Ectoine eye drops)、过敏性鼻炎(Ectoine allergy nasal sprays)、皮肤病面霜(dermatological crèmes)等^[32],可以有效预防和治疗上述疾病的发生发展。

4.2 皮肤创伤药剂

Ects 对皮肤创伤有显著的修复作用,能够加快伤口愈合,且能够抑制疤痕的形成。由于 Ects 极易溶于水,能够渗透扩散到细胞内,减缓和防治细胞胞内或胞间因寒冷而导致冰晶的形成,故可直接作用于冻伤局部,改善局部微循环,促进已冻伤皮肤的再生,并且防治炎症的发生,具有局部治疗的功效^[33]。目前,Ects 已被广泛开发和制备治疗皮肤冻伤药物,

如我国研发的冻疮药(以 Ectoine 或 5-HE 为主要有效成分,以甘油、尼泊金、油相成分为辅的预防冻伤和治疗冻伤药物)^[33]。

4.3 护肤品与保护剂产品

外部因素如辐射、风、干燥等,均可导致皮肤老化。诸多实验已证明 Ectoine 可以保护和稳定上皮细胞的细胞膜,防止表面活性剂对皮肤的破坏^[14]。在保湿方面,Ectoine 优于甘油三酯,可保护肌肤免受紫外线照射,阻止皮肤皱纹的形成^[14]。同时,Ectoine 还可减少因紫外线照射刺激酪氨酸酶活性增强而形成皮肤雀斑或晒斑等。目前,Ectoine 作为一种渗透压保护剂,已广泛应用于化妆品,诸如高端护肤品防晒霜、保湿乳、面膜等护肤品。Ects 作为一种细胞保护剂,能够防止细胞脱水,故可应用于头皮细胞的保护,其新型研发产品护发剂和洗发剂,以 Ectoine、5-HE 和表面活性剂为主要成分,它既能护发又不会造成大量硅油堆积^[34]。此外,Ectoine 具有延长保鲜期的应用,在蛋糕出炉冷却后喷洒 Ectoine 和海藻糖的混合液,能够将游离水络合形成结合水,稳定水分子,保持蛋糕的松软口感,且能抑制的细菌生长,延长保鲜期^[35]。Ects 的主要功能及应用总结,见表 1。

表 1 Ectoine 与 5-HE 的功能及应用研究

Table 1 Functions and applications of Ectoine and 5-HE

成份 Compound	功能及应用类型 Type of functions and applications	参考文献 Ref.
	分子水平应用 Application of Molecular level	
	对酶分子的稳定与增强活性作用 Stabilizing and enhancing the activity of enzyme molecules	
Ectoine	提高脂肪酶在油酸乙酯合成中的作用 Increasing the activity of lipase in ethyl oleate by enzyme	13
Ectoine	植酸酶的热稳定性 Thermostability of phytase	14
5-HE	对蛋白质氧化损伤的保护 Protection of oxidative protein damage(LDH)	15
	对 DNA 的影响 Effects on the stability of DNA structure	
Ectoine	有效降低 DNA 的解链温度 Effective lowering of DNA melting temperature	14
5-HE	PCR 增强剂 PCR enhancer	16
Ectoine	提高转录调控中 H-NS 蛋白和 LRP 的稳定性 Stabilization of the complex LRP and H-NS in transcription regulation	14
	对蛋白质折叠的影响 Effects on the correct folding of protein	
5-HE	冻融纯化过程中细胞毒性蛋白的表达 The expression of cytotoxic protein in the process of freezing and thawing	14
Ectoine	稳定膜蛋白 Stabilize membrane proteins against unfolding	19
Ects	抑制蛋白质错误折叠 Inhibition of protein folding	19
	细胞水平应用 Application of cellular level	
Ects	保持细胞结构的稳定 Maintain the stability of cell structure	20
Ectoine	阻止溶血素 A 对红细胞的破坏 Protection of erythrocytes from HlyA	21

成份 Compound	功能及应用类型 Type of functions and applications	参考文献 Ref.
5-HE	RNA 稳定剂 RNA stabilising effect	22
Ectoine	临床应用 Clinical application 淀粉样病变 Disease as amyloid disease 阿尔茨海默病 Alzheimer's disease, 马查多约瑟夫病 Machado-Joseph's disease, 帕金森氏病 Parkinson's disease 感染性疾病 Inflammatory disease	23
Ects	肺部感染 Pulmonary infection, 克罗恩病 Crohn's disease, 消化道炎症 Digest disease and so on	24, 25, 26
Ectoine	小肠移植的辅助治疗 Adjuvant therapy of small intestinal transplantation	27
Ectione	AIDS 的辅助治疗 Adjuvant treatment of AIDS	14
Ectoine	生物药剂开发 Biological pharmaceutical development 干燥、过敏性疾病保护类药剂 Protective agent for dry and allergic diseases 滴眼液 Ectoine eye drop products、过敏性鼻喷剂 (Ectoine allergy nasal sprays)、皮肤病面霜 (dermatological crèmes)	30, 32
Ects	皮肤冻伤药 Umguentum acid (including Ectoine and 5-HE) 保护剂产品 Protection products	33
Ectoine	化妆品 Cream, for instance, 防晒霜 Sunblock, 面膜 mask	14
Ects	护发产品 Hair conditioner	34
Ectoine	食用保鲜剂 Edible preservative agent	35

5 展望

目前, Ects 作为微生物重要的次级代谢物之一, 已被应用到各种生物工程及医学领域, 涉及到多种生物大分子和细胞的保护作用以及临床疾病的辅助治疗。筛选合成 Ectoine 的优势种群仍存在工作量大、筛选周期长、步骤繁琐等缺点, 且应用工业化生产的方式及保存条件亟待优化。在中度嗜盐菌株中, Ectoine 经 *ectD* 基因编码的羟基化酶 EctD 催化生成 5-HE 的生物合成途径已十分清晰, 但是在合成途径基因调控、发酵条件优化和过量化生产控制等方面, 尚需深入研究。随着对 Ects 的深入研究, 相应的优势菌株筛选及工业化生产的技术手段不断完善, 它的应用开发潜力将会更大。在工业酶学的应用方面, 将成为人们减少原料耗损、缩短生产时间以及提高生产效率的有利手段; 在美容护肤保健及皮肤疾病治疗方面, 通过深入了解 Ects 在表皮细胞新陈代谢中的作用机制将更加激发研究者研发各种皮肤疾病的治疗药物和生物保健产品, 从而预防和治疗皮肤恶性疾病的发生和发展, 并有效地减缓皮肤衰老。至此, 在生物酶工程、生物医药、美容保健、日化产品及临床应用等方面, Ects 将具有更为广泛的应用前景。

参考文献

1 Zhu DR (朱德锐), *et al.* Recombinant co-expression of the

- ectoine biosynthesis gene cluster *ectABC* in *Halomonas* from Qinghai Lake. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2015, 39:358-367.
- 2 Zhu DC (朱道辰), *et al.* Compatible solutes Ectoine and its derivate hydroxyectoine. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2011, 31:95-101.
- 3 He YZ, *et al.* High production of ectoine from aspartate and glycerol by use of whole-cell biocatalysis in recombinant *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2015, 14(1):1-10.
- 4 Ning YK, *et al.* Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2016, 36:10-18.
- 5 Canovas D, *et al.* Role of N γ -acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65:3774-3779.
- 6 Zhu DR (朱德锐). Diversity of halophilic bacteria in the Qinghai Lake and mechanism research of the ectoine biosynthesis. Wuhan: Central China Normal University (华中师范大学), PhD. 2014.
- 7 Dwivedi M, *et al.* Biophysical investigations of the structure and function of the tear fluid lipid layer and the effect of ectoine. Part A: natural meibomian lipid films. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838:2708-2715.
- 8 Sonnemann U, *et al.* Treatment of rhinitis sicca anterior with ectoine containing nasal spray. *J Allergy*, 2014:273219.
- 9 Eichel A, *et al.* Meta-analysis of the efficacy of ectoine nasal spray in patients with allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy*, 2014, 2014:292545.

- 10 Bill SA, *et al.* Organ storage solution containing (Hydroxy) ectoine. CN201380014682. 5, 2014-12-10.
- 11 Kaimunidiessi G, *et al.* Compatible solute ectoine as well as derivatives thereof for enzyme stabilization. CN201380012775. 4, 2013-03-05.
- 12 Zheng X (郑昕). Influence of ectoine in the process of malting barley with Gairdner and Ganpi No. 3. *Food Sci Technol* (食品科技), 2011, 36(8): 127-131.
- 13 Widderich N, *et al.* Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93809.
- 14 Pastor JM, *et al.* Ectoines in cell stress protection; uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv*, 2010, 28: 782-801.
- 15 Andersson MM, *et al.* Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, 32: 145-153.
- 16 Zhang Q (张庆), *et al.* Research process of ectoine hydroxylase. *Lett Biotech* (生物技术通讯), 2014, 25: 719-722.
- 17 Schnoor M, *et al.* Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322: 867-872.
- 18 Mascellani N, *et al.* Compatible solutes from hyperthermophiles improve the quality of DNA microarrays. *BMC Biotechnol*, 2007, 7: 82.
- 19 Roychoudhury A, *et al.* Effect of the compatible solute ectoine on the stability of the membrane proteins. *Protein Peptide Lett*, 2012, 19: 791-794.
- 20 Sadeghi A, *et al.* Diversity of the ectoines biosynthesis genes in the salt tolerant *Streptomyces* and evidence for inductive effect of ectoines on their accumulation. *Microbiol Res*, 2014, 169: 699-708.
- 21 Bownik A, *et al.* Protective effects of bacterial osmoprotectant ectoine on bovine erythrocytes subjected to staphylococcal alpha-haemolysin. *Toxicon*, 2015, 99: 130-135.
- 22 Thamm OC, *et al.* Adipose-derived stem cells and keratinocytes in a chronic wound cell culture model; the role of hydroxyectoine. *Int Wound J*, 2015, 12: 387-396.
- 23 Jorge CD, *et al.* Potential applications of stress solutes from extremophiles in protein folding diseases and healthcare. *Extremophiles*, 2016, 20: 251-259.
- 24 Harishchandra RK, *et al.* Compatible solutes Ectoine and hydroxyectoine improve functional nanostructures in artificial lung surfactants. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808: 2830-2840.
- 25 Thomas S, *et al.* Method of using compatible solutes containing ectoine and/or hydroxyectoine. US, 9089568, 2015-07-28.
- 26 Li LZ (厉凌子), *et al.* The application of oral mucositis drugs ectoine and its derivatives in preparation for prevention and treatment of chemotherapy. CN201110111449. 1, 2011-04-29.
- 27 Wedeking A, *et al.* Lipid anchor improves the protective effect of ectoine in inflammation. *Curr Med Chem*, 2014, 21: 2565-2572.
- 28 Cordingley MG, *et al.* Sequence-specific interaction of Tat protein and Tat peptides with the transactivation-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, 87: 8985-8989.
- 29 Zhang Z (张正), *et al.* New progress in the pathogenesis and treatment of dry eyes. *Chin J Ophthalmol Med* (中华眼科医学杂志), 2014, 4(2): 44-46.
- 30 Dwivedi M, *et al.* Biophysical investigations of the structure and function of the tear fluid lipid layer and the effect of ectoine. Part B; artificial lipid films. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838: 2716-2727.
- 31 Liu EM (刘恩梅), *et al.* Progress and prospect of allergic disease. *J Appl Clin Pediatr* (实用儿科临床杂志), 2007, 22: 1603-1604.
- 32 Kunte HJ, *et al.* Industrial production of the cell protectant ectoine; protection mechanisms, processes, and products. *Curr Biotechnol*, 2014, 3(1): 10-25.
- 33 Wu J (吴建), *et al.* A drug for preventing and treating skin frostbite. CN201110256095. X, 2011-09-01.
- 34 Zhu DC (朱道辰), *et al.* Hair care agent and shampoo containing ectoine. CN201310436664. 8, 2013-09-24.
- 35 Zhu DC (朱道辰), *et al.* Method for prolonging preservation period of grinding cake. CN201310474827. 1, 2013-10-12.