doi:10.11659/jjssx.04E017073

·综述·

海藻糖低温保护血小板的研究进展

黄梅莓,赵树铭 (第三军医大学西南医院输血科,中国人民解放军重庆血站,重庆 400038)

Research development of platelets protection with trehalose at low temperature

HUANG Mei-mei,ZHAO Shu-ming (Blood Transfusion Department,Southwest Hospital,Third Military Medical University,Chongqing Blood Station of PLA,Chongqing 400038,China)

[摘 要] 细胞治疗已经成为临床广泛采用的治疗方法,其中输注血小板制剂是治疗各种原因导致的血小板减少、外科急创伤和手术大出血的重要手段。常规使用的22 ℃震荡保存法会使血小板制剂存在细菌繁殖和血小板活化的风险。为了提高血小板制剂储存质量,减少储存损伤的发生,人们尝试在低温条件下用海藻糖保存液保护血小板,取得了一定效果。本文就低温条件下海藻糖保护血小板的研究进展进行综述。

[关键词] 血小板;海藻糖;储存损伤;低温保存;血液安全

[中图分类号] R558+.2;R457.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-04-25

临床上多种血液系统疾病、外科急创伤和手术大出血患者都需要输注血小板制剂。虽然22~24 ℃震荡保存血小板制剂具有相当的可靠性和稳定性,但其存在细菌繁殖和血小板活化的风险。为了延长血小板制剂的体外保存时间,提高患者输注血小板的治疗效果,人们尝试使用不同的方法保存血小板制剂,其中低温保存是重要的研究方向。海藻糖被誉为"生命之糖",广泛应用于多种细胞、组织、器官及生物制品的保存。近年来有研究表明,海藻糖在低温条件下可起到保护血小板的作用,但保护机制尚不明确[1]。本文就低温条件下海藻糖保护血小板的研究进展综述如下。

[基金项目] 国家自然科学基金(81570167);西南医院院管课题(swh2014-sx01)

[通信作者] 赵树铭,E-mail:shumingzhao123@qq.com

[16] 杨 阳,金振晓,段维勋,等.缺血再灌注前后人心肌组织中Notch信号通路相关分子的变化[J].中国体外循环杂志,2010,8(4):236-238.doi:10.3969/j.issn.1672-1403.2010.04.013.

[17] Wagner SJ,Skripchenko A,Seetharaman S,et al.Amelioration of lesions associated with 24-hour suboptimal platelet storage at 16°C by a p38MAPK inhibitor,VX-702[J].Vox Sang,2015,108(3):226-232.doi:10.1111/vox.12221.

[18] 刘 霖,王智超,丁洪涛.p38MAPK信号途径抑制剂对缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞中MAPK通路的调控[J].临床心血管病杂志,2014,30(6):538-541.

[19] 邵晓轶,周 芸,路丽明,等.p38 MAPK信号通路在B7H1-Ig融合蛋白诱导Tr1细胞分化中的作用[J].上海交通大学学报(医学版),2012,32(11):1448-1454.doi:10.3969/j.issn.1674-8115.2012.11.012.

[20] 吴建龙,巨积辉,周广良,等.SB202190对皮瓣缺血再灌注损伤时TNF-α和IL-10影响的实验研究[J].中国临床解剖学杂志,2014,32(6):698-703.doi:10.13418/j.issn.1001-165x.2014.06.017.

[21] 陈砚芬,徐海帆.P38MAPK信号传导通路与卵巢癌关系的研究进展[J].现代生物医学进展,2012,12(4):780-783.

[22] 谭金锋.p38MAPK信号通路与肝缺血再灌注损伤的关系研究[J].胃肠病学和肝病学杂志,2014,23(1):104-106.doi:10.3969/j.issn.1006-5709.2014.01.030.

[23] 杨清高,刘绍能.P38MAPK信号通路与肝纤维化[J].世界华人消化杂志,2012,20(24):2231-2236.

[24] Bordonaro M,Lazarova DL.CREB-binding protein,p300,butyrate,and Wnt signaling in colorectal cancer[J].World J Gastroenterol,2015,21(27):8238-8248.doi:10.3748/wjg.v21.i27.8238.

[25] Bertrand M,Alsaid B,Benoit G,et al.Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation[J].EMBO J,2002,21(14):3760-3769.doi:10.1093/emboj/cdf374.

[26] 李盛村,鲍 捷,王国祥.Wnt/β-连环蛋白信号通路在骨关节炎发生过程中的作用[J].中国组织工程研究,2012,16(13):2407-2410.doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.13.029.

[27] 苏金玲,姜希娟,郭茂娟,等.Wnt信号通路对酒精性肝纤维化中肝星状细胞活化的影响以及整合素连接激酶的调节作用[J].实用医学杂志,2013,29(5):718-720.

[28] Liu X,Luo G,Jiang J,et al.Signaling through hepatocyte vasopressin receptor 1 protects mouse liver from ischemia-reperfusion injury[J].Oncotarget,2016,7(43):69276-69290.doi:10.18632/oncotarget.12472.

[29] Essers MA,de VriesSmits LM,Barker N,et al.Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling[J].Science,2005,308(5725):1181-1184.doi:10.1126/science.1109083.

[30] 尹定子,宋海云.Wnt信号通路:调控机理和生物学意义[J].中国细胞生物学学报,2011,33(2):103-111.

[31] Lehwald N,Tao GZ,Jang KY,et al.Wnt-β-catenin signaling protects against hepatic ischemia and reperfusion injury in mice[J].Gastroenterology,2011,141(2):707-718.doi:10.1053/j.gastro.2011.04.051.

(编辑:周小林)

1 低温保存是血小板储存损伤研究的热点

血小板在离体储存过程中,细胞结构和功能会随着时间的延长发生各种变化,统称为血小板贮存损伤(platelet storage lesion,PSL)[1],主要表现包括:血小板形态改变,血小板颗粒分泌,细胞表面糖蛋白 GPIb-α/GPV 脱落,胞浆膜外层磷酯酰丝氨酸暴露,对效应剂(如 ADP、血栓素 A2、肾上腺素)的反应能力减弱等。此外,也会发生一些类似细胞凋亡的现象[2],如抗凋亡蛋白 Bcl-xl 水平降低(可使血小板死亡的 Bak 蛋白自杀,提高血小板的存活率)、细胞色素 C 释放、促凋亡蛋白(caspase)活化和凝溶胶蛋白(gelsolin)降解等均可在血小板贮存过程中发生,同时线粒体损伤、胞浆和器膜内吞、代谢衰竭、胞内 pH 变化、膜裂解和 LDH 释放等现象也有发生。总之,贮存损伤在功能上降低了血小板黏附能力,增加了凝集活力,降低了输注到受者后的存活率。现有的血小板制剂依靠采集献血者无偿捐献的血小板,单采血小板或浓缩血小板现有的保存条件是常温震荡保存。但由于 20 ~ 24 ℃震荡保存存在细菌繁殖风险,因而其应用受到限制[3],美国食品药品监督管理局规定,血小板储存时限为 3 ~ 5 d,超过 5 d 的血小板须予以废弃,这使得珍贵的血小板制剂有时不得不被浪费,这个比例在有的区域竟高达 30%[4]。因此,如何延长血小板保存期限,保证充足的血小板制剂库存,是输血领域面临的重要课题。

低温保存可以降低细菌污染导致败血症发生的风险,同时便于大量储存运输,还能延长血小板保存的时限,因此多年来人们致力于血小板低温保存的研究。但是,血小板在低温条件下,尤其是在 4 ℃储存时,其活性下降很快,6 h 后大约只有 40% 活性保留,12 h 后其活性更是骤减至 20%,同时形态功能也会发生显著的改变,这些改变最终导致血小板治疗无效,有证据表明该现象与血小板保存温度低于 20 ℃密切相关[5]。因此,为提高血小板在体外的存活率,避免低温对血小板膜的损伤导致血小板活性降低的问题,研究者们尝试在血小板低温保存过程中加入血小板低温保护剂(cryoprotectants,CPAs)。

血小板低温保护剂可以按照其最终位置分布的情况分为胞内保护剂和胞外保护剂。胞内保护剂又称为渗透性保护剂,大多是一些小分子物质,可以进入细胞内增加胞质浓度和渗透压,同时减少水分含量,多为糖类或多元醇类等;胞外保护剂也称为血小板非渗透性保护剂,主要有大分子聚合物类、蛋白质类、脂类等物质,可以起固形防止膜损伤的作用。常见的渗透性保护剂,主要有乙二醇、丙二醇、二甲基亚砜(DMSO)等,这些渗透性低温保护剂会使血小板经历不同的渗透压,同时伴随体积的变化,可能对血小板造成损伤。常见的非渗透性低温保护剂包括聚乙二醇(PEG)、海藻糖、羟乙基淀粉(HES)、聚乙烯砒咯烷酮(PVP)、葡聚糖和蔗糖等。非渗透性低温保护剂主要是通过降低渗透压差,同时稳定细胞膜蛋白成分,防止冰晶进一步形成,间接发挥对细胞的保护作用[6-7]。为了保护血小板、减少活性破坏,同时兼顾生物安全性,无毒保护剂海藻糖凭借其在低温保护中的重要作用已经成为近年来输血研究的热点。

2 低温保护剂海藻糖引起人们关注

海藻糖是一种天然的 α 偶联双糖,是由一个 1,1-葡萄糖苷键连接两个单位的 α-葡萄糖而形成的一种高亲水性小分子。1832 年,在黑麦麦角中第一次发现了海藻糖。Marcellin Berthelot 第一次从虫茧蜜甘露(一种由象鼻虫生成的物质)中分离得到并且命名为海藻糖[8]。它可以由细菌合成[9],也可以是真菌、植物和无脊椎动物。

海藻糖还是一种由两分子葡萄糖通过 1,1-葡萄糖苷键结合形成的非还原双糖,分子间结合非常紧密,使得海藻糖耐酸性水解的能力很强,在高温溶液,甚至酸性条件下性状都很稳定。该化学键同时促进非还原糖保持闭环结构形式,从而使得以醛基、酮基为端的基团无法结合到含有赖氨酸、精氨酸残基的蛋白质上(即糖化作用)。海藻糖在非高温条件下(小于 80 ℃)可溶性低于蔗糖。海藻糖二水合物构成一个菱形晶体,含有蔗糖 90% 的热容量。无水形式的海藻糖很容易重新吸收水分形成二水化合物,加热后会显示出有趣的物理特性。海藻糖水溶液浓度依赖的集群化趋势。由于他们彼此之间形成氢键的能力,他们在水中能自相联合形成大小不同的簇合物。原子分子动力学模型表明,当浓度达到 1.5 ~ -2.2 mol/L 时,海藻糖分子簇可以渗透,并在大范围系统中形成连续的聚合物[10]。海藻糖直接与核酸相互作用,促进了双链 DNA 的融断和单链核酸的稳定[11]。

营养代谢方面,海藻糖营养相当于葡萄糖,因为机体内海藻糖酶能迅速将海藻糖分解成两分子葡萄糖参与吸收代谢。因此,还可作为一种新的能量来源。海藻糖酶广泛存在于杂食动物(包括人类)和食草动物的肠道黏膜刷状缘。人类海藻糖酶缺乏比较少见,除了在格陵兰因纽特人,大约有 10% ~15% 发生率。有学者通过大白鼠长期毒性试验证实了海藻糖毒性极低,长期使用也对人体安全无害,不会引起迟发性毒性反应[12]。

在自然界中,海藻糖可以存在于动物、植物和微生

物体内。海藻糖是昆虫体内储存能量使用的主要碳水化合物。一个可能的原因是,海藻糖的糖苷键受到昆虫海藻糖酶的作用能快速释放两个分子的葡萄糖,满足飞行的能量需求。相比断开一个普通糖苷键只释放一分子葡萄糖,海藻糖释放葡萄糖的效能是普通淀粉多聚物的2倍。另外,海藻糖是一种典型的应激代谢物,可以在高温、高寒、高渗透压、有毒试剂等恶劣环境下,表现出极高的抵抗性,对机体内蛋白质大分子的活性起到至关重要的保护作用。例如缓步类动物(水熊)对环境有超强的抵抗力,当他们进入隐生状态时,其体内的葡萄糖变成海藻糖,外表看上去就像是死了。然而,当他们重新获得水,就会复苏并恢复代谢状态。人们也认为之所以摇蚊幼虫和卤虫(海猴子、盐水虾)能够承受脱水是因为他们的细胞内存储了一定数量的海藻糖。又比如卷柏(也称为复活植物),常年生长在沙漠和山区,可能脱水干涸进入假死状态,但因为体内存在海藻糖,经降雨补充水分后就会重新复活[13]。蔗糖、果糖和葡萄糖等均不具备这一功能。

同时,海藻糖的应用还十分广泛。海藻糖通过一种mTOR非依赖途径诱导自噬,可用于治疗亨廷顿氏病、帕金森病,可能纠正这些疾病存在的自噬缺陷,促进这些已经聚合变性蛋白质的移除[14]。这也可阻止果糖进入肝和可能引发自噬的高脂肪的肝细胞,从而治疗脂肪肝。口服海藻糖在抑郁症的小鼠模型上显示出抗抑郁性能,可能是通过减少p62/Beclin-1比率,提高额叶皮质自噬活动发挥作用[15]。海藻糖是一种新的结合透明质酸来创建一个人工眼泪(Thealoz Duo)治疗干眼的物质。海藻糖不是一种抗氧化剂,因其是一个非还原糖和不包含在其分子亲核组,但有抗氧化的作用[16]。

3 海藻糖被广泛应用于血小板低温保存

海藻糖在环境变化导致的应激状态下,对机体内蛋白质大分子的活性起到至关重要的保护作用。有针对隐生生物的研究表明,他们能复活正是由于其体内具有高浓度的海藻糖[17],故而有人称之为生命之糖。同时,由于海藻糖本质为二糖,且通常可被人体分解为葡萄糖,无毒副作用,优于传统的低温保护剂二甲亚砜(DMSO)。因此,人们将海藻糖广泛应用于细胞、组织、器官以及生物制品的保存,并取得了良好的保护效果。原虫低温保存实验表明,与DMSO相比海藻糖表现出相当甚至更好的低温保护作用[18];Mercado等[19]用海藻糖冻存骨肉瘤细胞时预先加入两性分子PP-50之后,低温保护效率明显提高,研究显示,这一结果与细胞对海藻糖的吸收增加有密切关系。Sun等[20]用海藻糖冻干状态的组织工程皮肤取得很好的保护效果,为组织工程皮肤的运输及应用提供了支持。

海藻糖参与了生物体低湿休眠的过程,使植物和动物能够承受长时间的干燥,人们将海藻糖作为冻干法保存血小板的首选保护剂,广泛应用于血小板的冻干保存。2001年Wolkers等[21]发现海藻糖在37 ℃时能快速跨越细胞膜进入血小板内部,负载海藻糖达50%以上,该方法冻干保存的血小板再水化存活率达到85%,细胞完整性保存良好,且活性与新鲜血小板无显著差异。傅里叶变换红外光谱分析证实了该方法成功保护血小板膜、膜蛋白效果非常显著。研究者认为,高于25 ℃的温度即可激活细胞内部途径,是海藻糖快速进入细胞内部的原因[3]。

也有人在冷藏或冰冻条件用海藻糖保存血小板。Yang等[22]通过比较海藻糖组、DMSO组和混合组冷藏保存血小板的CD41、CD42b、CD61和CD62p,得出DMSO和海藻糖在低温贮藏血小板的联合使用中具有协同保护作用,可进一步提高血小板临床输注的有效性。Wang等[23]进行了海藻糖10 ℃冷藏血小板的可行性研究,加入海藻糖与磷酸盐混合添加液在10 ℃保存时能够减缓代谢,抑制了形变、CD62p表达等活化现象,延长了保存时间,降低了血小板在体内的清除率,动物实验表明输注24 h后血小板存活率可高达(79.9±2.6)%。Liu等[24]对海藻糖冷藏保存血小板的吞噬活动进行评价,结果显示海藻糖能阻止凋亡发生,抑制体外冷藏血小板的吞噬活动。

4 海藻糖的作用机制亟待阐明

迄今为止,人们尽管对海藻糖的神奇作用广泛认可并加以利用,但是,海藻糖低温保护的作用机制之谜仍未解开,目前为止主要形成了以下3种假说,3种机制之间的关系可能是相互独立,也可能是互相协同,海藻糖具体作用机制仍然不清楚,亟待人们去研究揭示。

4.1 “水替代”假说

冷冻、干燥、高温等环境下,生物体内的多种生物大分子的水化膜会消失,而水化膜是维持机体大分子结构与功能的重要物质。Crowe等[17]认为在脱水过程中,海藻糖通过羟基与生物大分子极性基团结合,在分子表面形成氢键保护膜,替代失去的水化膜,帮助维持分子原有的空间结构,不会丧失生物活性[25]。由此冻干态磷脂基本保留了血小板磷脂层的物理性质。

4.2 “玻璃态”假说

“玻璃态”是指海藻糖溶液随着水分的减少,液体黏度和浓度都大大提高,当达到某一临界点时出现的一种结晶将要形成但尚未形成的“玻璃样”状态。有研究认为海藻糖通过形成“玻璃态”,溶液内扩散系数明

显降低,海藻糖紧密包裹分子,形成类似夹板固定空间位置,抑制其内部结构的延伸和聚焦,从而起到维持空间结构的作用,防止内部细胞细胞器的破坏。同时,由于海藻糖的玻璃化温度很高,能防止低温冷冻时冰晶形成,减少细胞内蛋白质聚合,从而使生物大分子结构得以保持稳定[26]。

4.3 “优先排阻”假说

Timasheff 等[27]认为海藻糖是通过增加分子表面张力,从而维持分子构象的稳定性。海藻糖等小分子糖类保护剂并不与大分子空间结构直接作用,而是与水分子结合,降低分子表面稳定剂浓度,增加分子表面张力,从而维持分子构象稳定。海藻糖相较于蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖等具有更强的水合能力,在溶液中可以结合更多的水分子,因此海藻糖保护生物分子的效果优于其他低聚糖。

5 展望

海藻糖在血小板低温保存中的优异表现让人们对其寄予厚望,通过对海藻糖低温保护血小板的机制进行研究,有望进一步揭示血小板储存损伤过程的机理及关键分子,为延长血小板制剂的保存时限和提高血小板输注效果,为找到新的突破点提供理论依据。

[参考文献]

[1] Mittal K, Kaur R. Platelet storage lesion: an update[J]. Asian J Transfus Sci, 2015, 9(1): 1-3. doi: 10.4103/0973-6247.150933.

[2] 李怀营,余唯琪,庞立红,等. 高胆红素血症新生儿血小板活化率与心肌酶的关系[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(18): 1421-1422.

[3] Crowe JH, Tablin F, Wolkers WF, et al. Stabilization of membranes in human platelets freeze-dried with trehalose[J]. Chem Phys Lipids, 2003, 122(1-2): 41-52. doi: 10.1016/S0009-3084(02)00177-9.

[4] Devine DV, Serrano K. The platelet storage lesion[J]. Clin Lab Med, 2010, 30(2): 475-487. doi: 10.1016/j.cll.2010.02.002.

[5] Tablin F, Oliver AE, Walker NJ, et al. Membrane phase transition of intact human platelets: correlation with cold-induced activation[J]. J Cell Physiol, 1996, 168(2): 305-313. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199608)168:2<305::AID-JCP9>3.0.CO;2-T.

[6] Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice[J]. Transfusion, 2007, 47(5): 935-945. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01212.x.

[7] Pegg DE. Principles of cryopreservation[J]. Methods Mol Biol, 2007, 368: 39-57. doi: 10.1007/978-1-59745-362-2_3.

[8] Tillequin F. Trehala, a meeting point between zoology, botany, chemistry, and biochemistry[J]. Rev Hist Pharm(Paris), 2009, 57(362): 163-172.

[9] Streeter JG. Accumulation of alpha, alpha-trehalose by Rhizobium bacteria and bacteroids[J]. J Bacteriol, 1985, 164(1): 78-84. PMID: 4044531/PMCID: PMC214213.

[10] Sapir L, Harries D. Linking trehalose self-association with binary aqueous solution equation of state[J]. J Phys Chem B, 2011, 115(4): 624-634. doi: 10.1021/jp109780n.

[11] Bezrukavnikov S, Mashaghi A, van Wijk RJ, et al. Trehalose facilitates DNA melting: a single-molecule optical tweezers study[J]. Soft Matter, 2014, 10(37): 7269-7277. doi: 10.1039/c4sm01532k.

[12] 梁春华,孙海涛,侯 放,等. 海藻糖的长期毒性试验研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2000, 28(3): 58-61.

[13] Zentella R, Mascorro-Gallardo JO, Van DP, et al. A Selaginella lepidophylla trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast tps1 mutantt[J]. Plant Physiol, 1999, 119(4): 1473-1482. doi: 10.1104/pp.119.4.1473.

[14] Sarkar S, Davies JE, Huang Z, et al. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein[J]. J Biol Chem, 2007, 282(8): 5641-5652. doi: 10.1074/jbc.M609532200.

[15] Kara NZ, Toker L, Agam G, et al. Trehalose induced antidepressant-like effects and autophagy enhancement in mice[J]. Psychopharmacology (Berl), 2013, 229(2): 367-375. doi: 10.1007/s00213-013-3119-4.

[16] Herdeiro RS, Pereira MD, Panek AD, et al. Trehalose protects Saccharomyces cerevisiae from lipid peroxidation during oxidative stress[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1760(3): 340-346. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.01.010.

[17] Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose[J]. Science, 1984, 223(4637): 701-703. doi: 10.1126/science.223.4637.701.

[18] Wen YZ, Su BX, Lyu SS, et al. Trehalose, an easy, safe and efficient cryoprotectant for the parasitic protozoan Trypanosoma brucei[J]. Acta Trop, 2016, 164: 297-302. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.09.024.

[19] Mercado SA, Slater NK. Increased cryosurvival of osteosarcoma cells using an amphipathic pH-responsive polymer for trehalose uptake[J]. Cryobiology, 2016, 73(2): 175-180. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.08.002.

[20] Sun M, Jiang M, Cui J, et al. A novel approach for the cryodesiccated preservation of tissue-engineered skin substitutes with trehalose[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 60: 60-66. doi: 10.1016/j.msec.2015.10.057.

[21] Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F, et al. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying[J]. Cryobiology, 2001, 42(2): 79-87. doi: 10.1006/cryo.2001.2306.

[22] Yang TH, Zhao RB, Shen XM, et al. Protection of cryopreserved platelets by dimethyl sulfoxide combined with trehalose[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2009, 17(5): 1373-1379.

[23] Wang X, Fan X, Shi R, et al. Quality assessment of platelets stored in a modified platelet additive solution with trehalose at low temperature (10 ℃) and in vivo effects on rabbit model of thrombocytopenia[J]. Platelets, 2015, 26(1): 72-79. doi: 10.3109/09537104.2013.872772.

[24] Liu Q, Xu L, Jiao SX, et al. Trehalose inhibited the phagocytosis of refrigerated platelets in vitro via preventing apoptosis[J]. Transfusion, 2009, 49(10): 2158-2166. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02254.x.

[25] Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, et al. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state[J]. Cryobiology, 2001, 43(2): 89-105. doi: 10.1006/cryo.2001.2353.

[26] Olsson C, Jansson H, Swenson J. The role of trehalose for the stabilization of proteins[J]. J Phys Chem B, 2016, 120(20): 4723-4731. doi: 10.1021/acs.jpcb.6b02517.

[27] Timasheff SN. Solvent stabilization of protein structure[J]. Methods Mol Biol, 1995, 40: 253-269. doi: 10.1385/0-89603-301-5:253.

(编辑:左艳芳)