

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20194491

· 综述 ·

噬菌体治疗细菌性疾病的研究进展及发展方向

邹秀月, 蔡德周

(大理护理职业学院微生物学教研室, 云南 大理 671000)

[摘要] 耐药性“超级细菌”的出现将使我们步入“后抗菌药物时代”。面对日益严重的细菌耐药性, 寻找新的抗菌药物及治疗方案已成为目前急需解决的难题。本文通过查阅国内外大量噬菌体临床治疗的成功病例, 对噬菌体治疗的优势进行了详尽的阐述, 充分说明使用噬菌体裂解耐药菌株是治疗细菌性疾病的有效方法, 同时指出噬菌体治疗技术的优势和劣势, 并提出了今后的发展方向。

[关键词] 噬菌体; 细菌感染; 耐药性; 临床治疗

[中图分类号] R978

Research progress and development direction of bacteriophage therapy for bacterial infection

ZOU Xiu-yue, CAI De-zhou (Department of Microbiology, Dali Nursing Vocational College, Dali 671000, China)

[Abstract] The emergence of “superbugs” resistance will bring us into “the post-antimicrobial era”. In the face of the increasingly serious bacterial resistance, finding new antimicrobial agents and therapy options has become an urgent problem to be solved. This paper elaborates in detail the advantage of bacteriophage therapy by consulting a large number of successful cases of bacteriophage therapy at home and abroad, fully illustrates that bacteriophage lysis of drug-resistant strains for bacterial disease therapy is an effective method, points out advantage and disadvantage of bacteriophage therapy technology, and puts forward the future development direction.

[Key words] bacteriophage; bacterial infection; drug resistance; clinical therapy

噬菌体是寄生细菌、放线菌、真菌等微生物体内的病毒。噬菌体与宿主菌之间具有严格的特异性, 其特异性取决于噬菌体吸附器官和受体菌表面受体的分子结构和互补性。噬菌体只有在活菌内才能增殖, 在病毒中分布广泛, 通常有细菌存在的地方就可以找到噬菌体。

从 2009 年 12 月开始, 国际学者相继在世界各地发现一种携带 NDM-1 耐药基因的新型“超级细菌”, 这种细菌能够对全球上市的近 200 种抗菌药物产生耐药性^[1]。2010 年 10 月中国疾病预防控制中心和中国军事医学科学院宣布中国宁夏和福建两省发现携带有“超级细菌”的 3 例病例^[2]。美国每年有 200 多万例耐药菌感染患者, 直接导致 23 000 例患者

死亡^[3]。在日本, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的检出率 > 30%^[4]。据国家食品药品监督管理局药品审评中心的调查研究^[5]显示: 多年来我国抗菌药物临床用量高居各类药物之首, 每年有 20 万例死于药物不良反应, 其中因抗菌药物滥用导致的死亡占 40%。奥尼尔委员会(O'Neil commission)对消除抗菌药物耐药性全球威胁的手段进行了评估, 预计至 2050 年, 全球将有 1 000 万例患者死于耐药菌感染^[3]。耐药菌株越来越多, 耐药性越来越强, 在这样的医疗环境中, 研究新的抗菌药物及治疗方案来对抗耐药菌感染已成为全球亟待解决的问题。在 G20 杭州峰会上, 抗菌药物耐药性问题已被提上议程。因噬菌体具有特殊的生物活性和强大的

[收稿日期] 2018-12-17

[作者简介] 邹秀月(1966-), 女(白族), 云南省大理市人, 副教授, 主要从事医学微生物及免疫学教学研究。

[通信作者] 邹秀月 E-mail: 2716025591@qq.com

抗菌功能,重新进入了科学家的视野,科学家也开展了广泛的试验研究和临床实践。2014、2016年第一届和第二届噬菌体国际学术研讨会相继在南京、武汉召开,标志着全球开始重视噬菌体临床治疗。

1 噬菌体的特性

噬菌体分为毒性噬菌体和温和噬菌体两类。能在宿主菌体内增殖并导致宿主菌死亡的噬菌体称为毒性噬菌体。毒性噬菌体复制产生子代噬菌体,当子代噬菌体达到一定数量时,由于噬菌体合成酶类的溶解,菌体细胞裂解,释放出的噬菌体再感染其他敏感细菌,再度裂解细菌。温和噬菌体是指感染宿主菌后并不增殖,其基因整合于细菌染色体上即前噬菌体,随细菌染色体的复制而复制,并随细菌分裂而分配至子代细菌的染色体中。带有前噬菌体基因组的细菌称为溶原性细菌,温和噬菌体也可偶尔自发地或在某些理化或生物因素的影响下,将整合的前噬菌体脱离宿主菌染色体,进入溶菌性周期导致细菌裂解,并产生新的成熟噬菌体。

2 噬菌体治疗技术的优势

噬菌体是自然的产物,是微生物食物链中的一个环节。噬菌体可以侵染细菌,利用细菌新陈代谢自我复制,对细菌具有天然的裂解能力和与生俱来的适应优势,这种噬菌体的裂解能力不受细菌耐药性和生存环境的影响,是大自然一物降一物的杰作,使用噬菌体作为抗菌剂,符合自然规律和丛林法则。

抗菌药物不易突破血脑屏障进入脑组织,噬菌体感染小鼠脑部并能原位增殖说明噬菌体可通过血脑屏障^[6]。抗菌药物的广谱抗菌性,既能杀灭敏感的致病菌又能杀灭非致病菌,还能引起非敏感菌发生耐药变异。长期使用将导致人体正常菌群紊乱,出现菌群失调,甚至导致机会感染。噬菌体特异性强,其特异性由噬菌体和菌体本身决定。一种噬菌体只侵染相应的细菌,并在细菌感染部位裂解该细菌,不会扩散,随着宿主菌的裂解而死亡,不会单独留存在体内,更不会繁殖。而且对哺乳类动物细胞无任何影响,不会影响人体的正常菌群。如果抗菌药物对患者治疗无效,那么噬菌体制剂替代抗菌药物可能会有较好的治疗效果^[7]。

噬菌体在宿主菌体内繁殖速度快,在短时间内能复制出许多子代噬菌体。每个子代噬菌体与亲代

噬菌体具有相同的侵染、复制能力,通过多代增殖,少量噬菌体就可杀灭许多细菌。一次给药,连续有效,直至消灭全部细菌^[8]。噬菌体还可根据宿主菌的分裂速度调整复制速度和裂解能力,动态适应宿主菌。抗菌药物若不能杀死细菌,将使细菌的耐药性越来越严重。试验证明细菌对噬菌体产生对抗的突变频率为 10^{-7} ,而细菌对抗菌药物产生对抗的突变频率为 10^{-5} ^[9],因此,对于那些多重耐药菌、泛耐药菌甚至“超级细菌”感染,抗菌药物的选择非常有限,甚至无药可选,在这种情况下,噬菌体治疗将大有用武之地。

噬菌体存在自然界的各个角落,包括河水、土壤、污水中都存在。可以说,凡是有细菌的场所,就有相应噬菌体的存在,在健康人体的正常菌群中也广泛存在^[10]。在微生物生态环境中,噬菌体是细菌的克星,能杀死细菌并伴随细菌的存在而存在,死亡而死亡。在人类寻找抗菌药物、治疗细菌性感染疾病中,噬菌体容易获取,是取之不尽的自然资源^[11]。筛选裂解耐药菌株新噬菌体的周期短,有时仅需几周或几个月的时间。通过人工培养细菌、过滤除菌、纯化噬菌体、制备高效价噬菌体即可获得^[12]。研发成本较低,制剂常温保存即可。而开发一种新抗菌药物则可能需要几年甚至十几年。Spellberg等^[13]对全球最大的15家跨国制药公司调查后获悉:目前只有5种抗菌药物制剂处于研发阶段。细菌耐药变异发生的速度远超过人类研发出新型抗菌药物的速度,研究生产全新抗菌药物势在必行。

3 噬菌体临床治疗历程

1915年英国科学家Edward Twort发现了噬菌体(bacteriophage)。1919年,加拿大科学家Felix D'Herelle用噬菌体制剂对4例细菌性痢疾患者进行治疗,获得成功。第一次证实噬菌体可作为药物裂解细菌^[14]。1921年Bruynoghe等最先使用噬菌体制剂治疗皮肤葡萄球菌化脓性感染,病情在2d内有所好转^[14]。1931年,D'Herelle和DEliava在印度初次使用噬菌体治疗消化道烈性传染病霍乱,噬菌体治疗试验组的病死率为6.8%,而对照组的病死率为62.7%^[14]。二十世纪三十年代美国制药公司开始销售以噬菌体为基本成分的治疗药物。二十世纪六十年代,葡萄球菌噬菌体的溶菌液(SPL)被许可用于治疗人类疾病^[15],应用噬菌体治疗抗菌药物治疗失败的600多例患者,80%的患者被治愈。

治疗过程中患者未出现副作用。第二次世界大战期间德国和苏联军队用噬菌体治疗腹泻,取得很好效果。

进入二十世纪七十年代末期,Eliava 研究中心使用葡萄球菌噬菌体制剂用于局部治疗,效果显著。仅采用噬菌体治疗的脓毒症患者中有 41% 的患者痊愈,采用噬菌体与抗菌药物联合使用治疗的脓毒症患者中有 78% 的患者被彻底治愈,而仅用抗菌药物治疗的脓毒症患者中治愈率仅为 23%。2009 年英国皇家耳鼻喉专科医院对噬菌体治疗 I 期和 II 期慢性耳炎进行临床研究^[16],安全性及效果均较好。噬菌体蛋白鼻腔喷雾剂还能有效预防中耳感染^[17]。Weber-Dabrowska B 等使用噬菌体治疗肿瘤患者 20 例和细菌感染患者 27 例,发现所有患者的肺炎及化脓性创伤感染等并发症明显好转^[18]。噬菌体可激活免疫应答,促进细胞因子的分泌,提高免疫。

噬菌体药物在前苏联、波兰及其他国家的医院一直在广泛使用,噬菌体鸡尾酒疗法已被成功应用数十年,普通药店已有噬菌体药物出售,包括喷雾剂、粉末剂、伤口贴、液体制剂等,有效的治疗了伤口细菌感染。美国食品药品监督管理局(FDA)批准使用噬菌体对多种细菌感染引起的下肢静脉性溃疡进行临床试验,治疗效果好又安全^[19]。化脓性脑膜炎和疖病治愈率甚至达到了 100%。2016 年,美国加利福尼亚大学教授 Thomas Patterson 感染多重耐药鲍曼不动杆菌而处于昏迷,使用鲍曼不动杆菌敏感的噬菌体鸡尾酒及工程噬菌体治疗,完全被治愈,轰动一时。

早在 1958 年,我国第一位细菌学博士余贺教授就利用噬菌体成功治疗了 1 例铜绿假单胞菌感染的烧伤患者。抗美援朝时期,由于抗菌药物极度匮乏,我国战地医院也曾利用噬菌体治疗战伤。据李宏鸣等^[20]报道,3 例确诊为结核性口腔溃疡患者涂抹分枝杆菌噬菌体软膏后,在 1 周内开始好转,半年后复查已完全恢复。成都生物制品研究所研究人员使用国内自行研制的多价痢疾噬菌体治疗 23 例痢疾患者,总有效率达 95.66%。解放军第 175 医院的一项研究也发现,将 22 例痢疾患者分为两组,分别用多价噬菌体和黄连素治疗,发现两组之间的治愈率差别无统计学意义,而噬菌体治疗组的复发率较黄连素组低。

2012 年的噬菌体治疗回顾性研究^[21]表明,153 例各种感染性疾病患者曾接受噬菌体治疗,40% 的患者获得满意的治疗效果(根除病原菌),

6 例患者因不良反应而停止治疗,其他未发现安全隐患。目前抗菌噬菌体的研究大多针对耐药性细菌,实验对象多为动物,治疗主要应用于局部治疗。想要使噬菌体抗菌治疗得到广泛应用,需要加快噬菌体在临床实践中的应用研究。

4 噬菌体治疗技术的劣势

噬菌体伴随细菌存在而存在,伴随细菌裂解而死亡。噬菌体死亡后,其蛋白质成分在细菌感染部位残留,这些成分作为抗原物质,可激发机体产生免疫应答。免疫应答产生的抗体可阻止噬菌体吸附于细菌表面,从而影响噬菌体在细菌内的复制,会降低裂解细菌的能力。此外,机体的天然免疫也会将噬菌体清除。

噬菌体携带一些毒素基因可能会给机体带来不利影响,噬菌体在感染宿主菌时,基因组上编码的遗传信息在感染细菌过程中能够表达,倘若噬菌体基因组上存在有毒素基因,噬菌体杀死细菌的同时可能会产生毒素,对人体有毒害作用,存在安全隐患^[22]。在治疗感染性疾病时,敏感的抗菌药物用得越早,杀菌效果越好。而细菌内的噬菌体只有达到一定浓度时才开始增殖。噬菌体接种过早或剂量不当时,可能会在开始增殖之前就被免疫系统消灭^[23]。因此,把握噬菌体的最佳接种时间和接种方式与剂量将成为实施噬菌体治疗技术的难点。

噬菌体识别宿主菌时的高度特异性,决定了噬菌体的抗菌谱很窄。噬菌体的特异性不是表现在细菌的种水平,而是表现在型的水平^[24]。某一型的噬菌体只能侵染并裂解相应型的细菌,对其他型的细菌不起作用,一定程度上限制了噬菌体在临床上的广泛应用。病原菌种属多、型多,均需要研究得到相应的噬菌体。将多种噬菌体制成混合制剂,应用范围才会扩大。如果将其他国家和地区研发的噬菌体产品应用于我国耐药菌的控制,可能并不一定有效。

噬菌体治疗技术几乎都使用烈性噬菌体,目前因没有足够数量和种类的烈性噬菌体,使噬菌体治疗技术不能在临床治疗中广泛推行^[25]。现在分离到的噬菌体多针对革兰阴性菌,针对革兰阳性菌的报道则比较少。

细菌与人类有广泛的相互作用,而噬菌体与人类还没有直接的关系。韩晗等^[26]认为:由于病毒的本质,噬菌体常呈现出较为负面的公众印象,始终遭受部分学者质疑,甚至日后可能面临极大的公众

阻力。在治疗人类疾病方面,噬菌体还未获得大部分国家的授权和许可。在后抗菌药物时代,噬菌体疗法有望成为治疗细菌感染的未来趋势,但是受科技发展水平、法律法规的监管理念以及伦理和生物安全等因素制约,噬菌体治疗依然面临着诸多挑战。

5 噬菌体治疗发展方向

细菌遗传学的创始人、诺贝尔奖获得者 Lederberg 博士在美国科学院院报(PNAS)的评论中指出:因耐药性细菌的出现,抗菌药物治疗感染性疾病不再像曾经的那么有效,应该重视噬菌体作为生物抗菌制剂的研究,各国政府必须高瞻远瞩、未雨绸缪,做好顶层设计^[27]。

一个理想的可用于治疗的噬菌体应具备强大的裂解能力,较好的环境适应性和稳定性,基因组上不携带毒素基因,具有相对广谱的裂解范围,至少应能裂解某个属的绝大部分细菌,易于分离和纯化,对人的免疫系统无负面影响等。

目前研究噬菌体的单位和学者逐渐增多,如果将各地区所有收集的噬菌体信息展示在一个共享平台上,形成一个噬菌体库,那么在需要某种噬菌体进行治疗时,就可以实现快速资源共享。这可能是未来应对超级细菌或者恐怖袭击等紧急状况时一个恰当的选择,是国家生物安全的一项保障措施^[24]。

利用现代分子生物学技术,采用适当的基因改造策略,提取噬菌体中细胞壁裂解酶、噬菌体内溶素等有效成份作为抗菌药物,这样既可保持噬菌体杀菌活性,又不会引起免疫反应。研究^[28]还发现,这些活性成份与其他抗菌制剂联合使用可提高抗菌效果,对目标细菌产生协同治疗效应。郑旭东等^[29]认为,活性成分非噬菌体本身的成分,不具有自我复制或基因整合能力,克服了噬菌体的免疫原性及微生物的耐药性,排除了对人类自身构成的潜在威胁,极有可能成为全新作用机制的抗菌药物。

噬菌体的作用谱比较窄,一定程度上限制了噬菌体在临床上的应用。目前常见的解决方案是用噬菌体鸡尾酒制剂来控制不同型别细菌的感染^[30]。鸡尾酒制剂内包含的噬菌体种类越多,其宿主谱覆盖度就越大。另外一个方法是通过已有噬菌体的改造,扩大其宿主范围^[31]。同时,利用连续传代筛选出变异后能在体内长期循环的噬菌体,该噬菌体一定程度能抵抗机体免疫系统的清除,可延长在体内的生存时间。

专家提出将噬菌体作为药物的运输工具,将药物运输到目标菌体内发挥杀菌作用。方法一:将抗菌药物直接连接到噬菌体上,借助噬菌体与宿主菌之间的特异性,将抗菌药物引导至细菌感染处,提高抗菌药物的局部浓度,从而杀灭耐受常规药物剂量的目标细菌;方法二:利用生物技术,依靠噬菌体将外源致死性基因注入细菌内并表达为杀菌蛋白,由杀菌蛋白直接杀死细菌^[32]。噬菌体作为药物载体,既能提高细菌感染部位药物的浓度,又能提高药物的利用率,还能作为部分噬菌体杀菌活性不足的补充。因此,最理想的抗菌药物就是药物载体噬菌体。

此外,筛选有效的噬菌体剂型,建立科学的针对噬菌体制剂的药学标准,纯化噬菌体制剂,降低毒素水平,利用噬菌体与白细胞、抗菌药物的协同作用,都是当前研究和发展的方向。

6 噬菌体抗体技术

免疫血清抗体和杂交瘤抗体都不是人源性抗体,生产量有限,而且有免疫原性。随着基因工程技术的发展,出现了噬菌体展示技术。应用噬菌体展示技术对抗体进行表达和克隆,针对亿万种不同特异性抗体可变区的基因,组建噬菌体基因文库,形成噬菌体抗体库^[33]。噬菌体抗体库实现了不同特异性抗体的表达和基因型的统一,把抗原识别和抗体无限制生产能力结合在一起,在人源性抗体的获得和筛选方面突显其优势^[34]。噬菌体抗体库技术是迄今发展最成熟、应用最广泛的抗体制备技术。

[参考文献]

- [1] 房咪,郑珩,顾觉奋.“超级细菌”NDM-1的发现及研究进展[J].国外医药抗生素分册,2011,32(6):253-258.
- [2] 黄留玉.关于超级细菌NDM-1的若干思考[J].解放军医学杂志,2010,35(12):1409-1411.
- [3] 张江.家畜中抗菌素耐药性:抗生素的进展与替代[J].国外畜牧学—猪与禽,2018,38(6):77-79.
- [4] 杨健,陈升汶,吴伟元,等.葡萄球菌属临床分离菌的耐药性检测[J].中国抗感染化疗杂志,2003,3(5):302-304.
- [5] 程玉燕,唐利利,杨森.沙眼衣原体噬菌体的研究进展[J].中国医学文摘—皮肤科学,2016,33(3):339-343.
- [6] 张立丽,李宇,赵秀英.噬菌体治疗研究进展[J].北京医学,2011,33(3):232-235.
- [7] Burrowes B, Harper DR, Anderson J, et al. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011, 9(9): 775

- 785.

- [8] 徐焰,熊鸿燕.噬菌体溶菌机制研究进展[J].重庆医学,2003,32(1):106-108.
- [9] 陈晓春,王继文,曹永长,等.噬菌体在疾病治疗方面的应用与研究[J].动物医学进展,2005,26(1):32-35.
- [10] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(12): 6578-6583.
- [11] 李刚,胡福泉.噬菌体治疗的研究历程和发展方向[J].中国抗生素杂志,2017,42(10):807-813.
- [12] 罗侠平.铜绿假单胞菌噬菌体的筛选与纯化[J].制剂与工艺,2018(3):234.
- [13] Spellberg B, Powers JH, Brass EP, et al. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future[J]. Clin Infect Dis, 2004, 38(9): 1279-1286.
- [14] 孙伟,朱春宝.噬菌体治疗细菌感染的研究[J].国外医药(抗生素分册),2005,26(2):54-58,69.
- [15] Salmon GG Jr, Symonds M. Staphage lysate therapy in chronic staphylococcal infections[J]. J Med Soc N J, 1963, 60: 188-193.
- [16] 王静,王劲,孙运峰,等.治疗性噬菌体制剂的研究进展[J].食品与药品,2011,13(9):366-369.
- [17] 陈敏,史久华.噬菌体蛋白鼻腔喷雾剂能预防中耳感染[J].国际生物制品学杂志,2007(5):83.
- [18] 孙荣华.大肠埃希菌噬菌体生物学特性及其抗感染特性初步研究[D].长春:吉林大学,2009.
- [19] 李菁华,孙延波.噬菌体疗法在耐药性细菌感染中应用的研究进展[J].吉林大学学报(医学版),2013,39(3):630-633.
- [20] 李宏鸣,万学勤,李伟忠.噬菌体辅助治疗结核性口腔溃疡的初步观察[J].口腔颌面外科杂志,2009,19(2):151-152.
- [21] Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, et al. Clinical aspects of phage therapy[J]. Adv Virus Res, 2012, 83: 73-121.
- [22] Beutin L, Hammerl JA, Strauch E, et al. Spread of a distinct Stx2-encoding phage prototype among *Escherichia coli* O104:H4 strains from outbreaks in Germany, Norway, and Georgia [J]. J Virol, 2012, 86(19): 10444-10455.
- [23] Pagne RJ, Jansen VA. Understanding bacteriophage therapy as a density dependent kinetic process[J]. J Theor Biol, 2001, 208(1): 37-48.
- [24] 中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会.噬菌体治疗的前世、今生与未来 [J]. 科学通报, 2017, 62(23): 2577-2580.
- [25] Krylov VN. Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: Long-term prospects for use in phage therapy[J]. Adv Virus Res, 2014, 88: 227-278.
- [26] 韩晗,李雪敏,王爽,等.噬菌体作抗菌剂使用的安全性评价研究进展[J].江苏农业科学,2017,45(22):18-23.
- [27] 万学勤,李宏鸣,白杨.噬菌体用于治疗幽门螺杆菌感染的研究进展[J].世界华人消化杂志,2009,17(35):3623-3626.
- [28] 袁王玉,丛聪,王丽丽,等.噬菌体与抗菌剂联合应用研究进展[J].中国抗生素杂志,2017,42(10):842-848.
- [29] 郑旭东,肖春玲.抗菌药物研究新方法[J].中国抗生素杂志,2009,34(8):449-453.
- [30] 邹亭亭.分枝杆菌噬菌体鸡尾酒制剂应用于耐药结核病治疗的探索性研究[D].重庆:重庆医科大学,2012.
- [31] Barbu EM, Cady KC, Hubby B. Phage therapy in the era of synthetic biology[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(10), pii: a023879.
- [32] Norris JS, Westwater C, Schofield D. Prokaryotic gene therapy to combat multidrug resistant bacterial infection[J]. Gene Ther, 2000, 7(9): 723-725.
- [33] 张爱华,余模松.噬菌体抗体库技术[J].国际生物制品学杂志,2006,29(1):13-16.
- [34] 蔡家利,孙加燕,扈国达.噬菌体抗体库技术应用研究进展[J].重庆理工大学学报(自然科学),2011,25(12):22-27.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式:邹秀月,蔡德周.噬菌体治疗细菌性疾病的研究进展及发展方向[J].中国感染控制杂志,2019,18(9):888-892. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20194491.

Cite this article as: ZOU Xiu-yue, CAI De-zhou. Research progress and development direction of bacteriophage therapy for bacterial infection[J]. Chin J Infect Control, 2019, 18(9): 888-892. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20194491.