

typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from lung transplant recipients and aquatic environment-detected in-hospital transmission[J]. APMIS, 2014, 122(2): 85-91.

[23] Didelot X, Maiden MC. Impact of recombination on bacterial evolution [J]. Trends Microbiol, 2010, 18(7): 315-322.

[24] Gomila M, Del Carmen Gallegos M, Fernandez-Baca V, et al. Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain[J]. BMC Microbiol, 2013, 13(1): 138.

[25] Cho HH, Kwon KC, Sung JY, et al. Prevalence and genetic analysis of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. BMC Microbiol, 2013, 13(1): 138.

• 综述 •

噬菌体治疗细菌性感染的研究进展^{*}

高 静 综述, 刘 新[△] 审校

(沈阳医学院病原生物学教研室, 沈阳 110034)

关键词: 噬菌体; 细菌性感染; 多重耐药菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.033

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2016)23-3325-03

1915 年, Frederick 在研究牛痘病毒时,发现细菌被杀死的现象,但尚未进行深入研究^[1]。1917 年, Felix 发现了一种能够杀灭涂布在琼脂表面上细菌并且呈现独立噬斑的“微生物”,并认为这种微生物可以侵入细菌内并在其体内扩增,因此称之为“噬菌体”。此后,噬菌体的研究拉开了帷幕。噬菌体被定义为一类能够感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的病毒。1921 年, Bruynogh 和 Maisin 首次利用噬菌体治疗了由葡萄球菌引起的人类皮肤疖肿。在噬菌体研究的前十年里,研究者们因过多关注噬菌体的应用而忽视了噬菌体的生物学特性。起初,研究者们在噬菌体中只检测到蛋白质,直到 1936 年, Schlesinger 研究发现噬菌体中还存在 DNA,这才证实了噬菌体是由核酸和蛋白质组成的病毒颗粒。1940 年, Ruska 首次用电镜观察到噬菌体的形态。随后,陆续有研究者利用电镜观察到噬菌体的形态并得出了噬菌体的一般特征。噬菌体的生物学特性逐渐明了。近年来,随着抗菌药物的广泛使用,出现了越来越多的难以用抗菌药物治疗的多重耐药菌(MDR),现已成为全球许多重症监护室(ICU)一个迫在眉睫的医疗危机^[2]。人们不得不将关注点转向寻找抗菌药物的替代疗法。于是,噬菌体疗法成为了一个潜在的治疗细菌感染的可行性方案。

1 噬菌体的类型及其生物学特性

噬菌体根据生活方式分为毒性噬菌体和温和噬菌体^[3]。毒性噬菌体又称裂解性噬菌体,能够在敏感菌中增殖并引起细菌裂解;温和噬菌体又称为溶原性噬菌体,感染细菌后,将其基因整合于细菌染色体中,不引起宿主菌裂解,随宿主菌的繁殖将基因传到子代。

当噬菌体寄生在细菌细胞内时,可呈现出不同的生活状态。无论噬菌体处于何种生活状态,在进入细菌前,第一步都

nosa ST235 isolated from a hospital in Korea, 2008-2012 [J]. Ann Clin Lab Sci, 2013, 43(4): 414-419.

[26] Yoo JS, Yang JW, Kim HM, et al. Dissemination of genetically related IMP-6-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235 in South Korea[J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39(4): 300-304.

[27] Lim KT, Yasin RM, Yeo CC, et al. Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in Malaysia[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2009, 42(3): 197-209.

(收稿日期: 2016-05-28 修回日期: 2016-08-18)

是先与细菌细胞壁上的受体结合。这个特定的过程会影响噬菌体与细菌的相互作用。例如,噬菌体 λ 仅与大肠杆菌的 LamB 受体相互作用,并且此作用对于噬菌体成功侵入细菌非常重要,即噬菌体具有特异性,仅选择特异性受体才能侵入细菌^[4]。

研究表明,某些噬菌体在与特异性受体作用之前,能合成水解酶或多糖分解酶系及多糖裂解酶,这些酶可以降解宿主菌的多糖,为噬菌体治疗提供了潜在的意义,但目前尚在研究中,还未应用于临床^[5]。

噬菌体在与特定的受体结合后,通过细菌的细胞壁打开缺口,然后把噬菌体 DNA 注入细菌的细胞内,其蛋白质外壳留在菌体外。如果是温和噬菌体,噬菌体 DNA 插入到细菌的染色体上,成为细菌染色体的一部分,随细菌繁殖而传代。因此,温和噬菌体不产生子代噬菌体,但这种噬菌体 DNA 随着细菌 DNA 的复制进行复制,直到诱发裂解周期。当温和噬菌体因发生变异而失去进入裂解周期的能力,噬菌体 DNA 会成为细菌染色体的一部分,成为一个长期寄生于宿主染色体的噬菌体序列,即前噬菌体。如果是毒性噬菌体,感染宿主菌后马上进行噬菌体早期基因的表达,噬菌体利用细菌的细胞器复制子代噬菌体的核酸和蛋白质,然后组装、释放新合成的子代噬菌体。

噬菌体可通过转导作用传递细菌之间的遗传物质,因此,可以利用生物工程技术将抗菌药物敏感基因表达于目的菌中,通过转导作用转移抗菌药物敏感基因。例如, Lu 等^[6] 的研究表明,在体外通过 M13mp18 噬菌体靶向 SOS DNA 修复系统插入特定基因,增加了大肠杆菌对抗菌药物的敏感性。Edgar 等^[7] 利用转基因技术将特定的基因转入耐药菌内,增加耐药菌对链霉素和萘啶酸的敏感性。

* 基金项目: 辽宁省科学事业公益研究基金项目(GY2013-A-014); 沈阳医学院重点实验室研究基金项目(20135060)。

△ 通讯作者, E-mail: syliuxin141236@sina.cn。

2 噬菌体治疗的潜在优势

毒性噬菌体是天然的抗菌药物,能够裂解细菌,可作用于革兰阳性菌和革兰阴性菌,包括耐药菌。噬菌体具有严格的宿主专一性,不会破坏正常菌群,同时噬菌体的治疗效果不因细菌耐药性而改变^[8]。

2.1 噬菌体治疗的疗效 噬菌体具有的高度的特异性和严格的宿主专一性,使噬菌体能够有效控制细菌性感染。徐花等^[9]在小鼠经腹腔感染最小致死量(MLD)的黏质沙雷菌后,立即给予的噬菌体治疗能显著提高小鼠的存活率。Kumari 等^[10]用肺炎克雷伯菌 B5055 建立全层烧伤创面感染的小鼠模型,分别应用硝酸银、庆大霉素和肺炎克雷伯菌噬菌体 Kpn5 治疗,结果表明,单剂量的噬菌体 Kpn5 治疗显著降低了小鼠病死率,并且治疗效果优于硝酸银和庆大霉素治疗。

然而,由于噬菌体的高度特异性,使噬菌体具有较窄的宿主谱,限制了噬菌体治疗。随着研究的进展,国内外的一些研究人员利用多种噬菌体混合制剂(噬菌体鸡尾酒)治疗细菌感染,从而达到扩宽宿主谱、提高治疗效果的目的。例如,刘晓贺等^[11]应用噬菌体 GH15 和噬菌体 K 联合治疗由金黄色葡萄球菌感染引发的菌血症小鼠,结果表明,噬菌体 GH15 和 K 联合使用的治疗效果优于单一噬菌体治疗。Tamariz 等^[12]通过皮下和静脉接种的方式建立由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)引起的局部和全身性感染的小鼠模型,然后,选用噬菌体鸡尾酒法治疗,结果表明,噬菌体鸡尾酒法治疗能有效控制局部的 MRSA 感染。

2.2 噬菌体治疗细菌性炎症 孙利利等^[13]用金黄色葡萄球菌噬菌体对患有急性乳腺炎的奶牛进行治疗,结果表明,奶牛病灶内的细菌数量显著下降,经过治疗,奶牛的炎症得以治愈并恢复了正常的产奶能力。Miedzybrodzki 等^[14]对患有人工关节感染、皮肤和软组织感染或下呼吸道感染的患者进行噬菌体治疗,他们的 C-反应蛋白(CRP)和白细胞计数最初没有受到影响,而在第 9~32 天却显著减少。但研究中也发现,CRP 初始水平高于 10 mg/dL 的患者的 CRP 才会受到影响^[15]。

2.3 噬菌体治疗的医疗成本 Miedzybrodzki 等^[16]选择了 6 例被葡萄球菌感染患者作为研究对象,包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染、耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌感染和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌感染,结果表明,噬菌体治疗的治疗费用明显低于抗菌药物治疗。这说明,噬菌体治疗可以节省医疗费用。

2.4 噬菌体治疗的安全性 Rhoads 等^[17]进行了一项随机对照试验,用噬菌体鸡尾酒治疗了 42 例因下肢慢性静脉溃疡而导致的由大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌引起的 3 种不同的细菌感染患者,并评价了噬菌体疗法的安全性,未发现有关噬菌体治疗的不良反应。Abedon 等^[18]用单一的噬菌体喷雾处理大面积的烧伤部分,而远处的伤口作为对照组,结果没有出现安全问题。国内也有一些针对噬菌体的安全性的研究。张红梅等^[19]向小鼠体内注射噬菌体 D29,发现噬菌体 D29 未对机体的安全产生威胁。靳静等^[20]也通过实验证实了克雷伯菌属噬菌体 LH-01 对小鼠具有良好的安全性。

以上研究尚未报告革兰阴性菌噬菌体裂解宿主菌所产生的负面影响。虽然,小剂量的由革兰阴性菌裂解释放的内毒素(LPS)作为特异性免疫刺激剂应用时,可增强机体非特异性抵抗力,也有增强抗感染免疫和抗肿瘤免疫作用^[21],但一般情况下,因革兰阴性菌裂解产生的 LPS 的危害确实存在。由于目

前缺乏大型的随机对照试验,因此还很难评估噬菌体治疗的不良反应和潜在的影响。

鉴于噬菌体治疗的优势,人们将噬菌体治疗视为后抗菌药物时代治疗细菌性感染的一种疗法。现在已有研究者们利用噬菌体治疗伤寒、痢疾、沙门氏菌引起的相关肠炎、腹膜炎、皮肤感染、外科感染(主要是各部位脓肿)、败血症、尿路感染及耳鼻咽喉感染。

3 噬菌体治疗的局限性

虽然噬菌体治疗有许多优点,但噬菌体应用于临床治疗仍需进一步确定。噬菌体治疗之所以没有广泛应用于临床治疗,是因为此疗法治疗细菌感染有一定的局限性。

噬菌体治疗的主要缺点是要先快速鉴定病原微生物。通过标准的微生物学鉴定程序,对临床样本进行鉴定;然后,分离特定的噬菌体;最后,利用噬菌体对患者进行抗菌治疗。采用基因组方法和质谱可能有助于新的细菌快速诊断方法。但目前,在大多数临床微生物学实验室和资源有限的基层医疗机构,还无法普及噬菌体治疗。

噬菌体所具有的高度的特异性,使得噬菌体有一个狭窄的噬菌谱,仅限作用于单一物种或某个物种的单一菌株。温和噬菌体不能引起细菌裂解,因此,噬菌体治疗必须选择毒性噬菌体。但毒性噬菌体在某些特定条件下可转变为温和噬菌体,这也是噬菌体治疗所面临的问题之一^[22]。

在应用噬菌体治疗细菌感染时,宿主菌可能会对噬菌体产生抗性。细菌对噬菌体的抵抗机制可分为 4 类:(1)吸附抑制。细菌通过自身基因的突变,使受体发生一些变化,如受体缺失、掩藏受体和受体突变,来阻止噬菌体吸附;或者通过产生荚膜、黏液层等阻止噬菌体接近而逃避噬菌体。(2)流产感染。噬菌体将其 DNA 注入宿主菌内,噬菌体的复制受到阻断,没有子代噬菌体的产生和释放。(3)穿入阻滞。依靠细菌外膜上的锚定蛋白或膜蛋白来阻止噬菌体 DNA 的注入,编码这些蛋白的基因常会在前噬菌体中发现,细菌一旦具有了这些前噬菌体,就可抵抗同种噬菌体再次感染。(4)降解或干扰噬菌体 DNA。限制-修饰系统可以保护细菌自身的 DNA,识别细菌内的外源 DNA,并对其切割、降解。此外,细菌中的规律成簇的间隔短回文重复(CRISPR)也可抵抗噬菌体^[23-24]。同时,噬菌体的转导作用和性菌毛的接合作用可能会在细菌之间发生基因转移,导致产生一种新的微生物甚至更多的耐药菌^[25-26]。

毒性噬菌体导致细菌裂解,细菌释放出的各种物质如革兰阴性菌的 LPS,可导致严重的不良反应。LPS 进入血循环后,机体出现 LPS 血症,可使体温上升、血液白细胞数骤减,严重时可引起 LPS 休克;严重者可活化凝血系统,出现弥散性血管内凝血(DIC),引起皮肤和黏膜出血、渗血及内脏广泛出血,甚至死亡。因此,限制了噬菌体对革兰阴性菌的治疗。

噬菌体属于病毒,在应用于治疗人类感染时,可能被患者的免疫系统视为一个潜在的入侵者,特别是噬菌体外壳的蛋白,会成为抗原刺激免疫系统的反应,这使噬菌体进入体内后可能会迅速被脾脏、肝脏和其他器官的网状内皮系统清除,或被免疫细胞清除^[27]。

4 展望

随着抗菌药物耐药性问题的日益严重,寻找抗菌药物替代品治疗细菌感染变得尤为重要。虽然在近百年前就有人进行了噬菌体治疗细菌感染的相关研究,如今人们又将视线聚焦于噬菌体的研究上,期待噬菌体自身的优势可以解决抗菌药物治

疗所遇到的问题。尽管噬菌体治疗细菌性感染有效,但仍有难题亟待解决,例如,如何保持噬菌体的稳定性,如何准确把握给药时间、给药剂量和给药途径,以及如何提高给药的效率及安全性等^[28]。对于噬菌体的不足,人们也试图寻找解决的方法,如筛选裂解性强的噬菌体^[29];寻找具有宽噬菌谱的噬菌体^[30];通过基因工程寻找合适的转基因噬菌体^[31];应用噬菌体鸡尾酒疗法有效治疗细菌感染等。随着各种技术和方法的不断改进,相信噬菌体治疗的不利因素会逐渐被克服。

参考文献

[1] 沃尔德,弗里德曼,阿迪亚. 噬菌体——在细菌致病机理及生物技术中的作用[M]. 北京:科学出版社,2007:3-9.

[2] Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2013, 11(3): 297-308.

[3] 肖纯凌,赵富玺. 病原生物学和免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社,2014:40-41.

[4] Chatterjee S, Rothenberg E. Interaction of bacteriophage 1 with its *E. coli* receptor, LamB[J]. Viruses, 2012, 4(11): 3162-3178.

[5] Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, et al. Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications[J]. Curr Protein Pept Sci, 2012, 13(8): 699-722.

[6] Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 6(12): 4629-4634.

[7] Edgar R, Friedman N, Molshanski-Mor S, et al. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(3): 744-751.

[8] 郭晓奎. 后抗菌药物时代我们如何征服细菌[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2012, 32(11): 1401-1403.

[9] 徐花,李毅,逮茵茵,等. 噬菌体对黏质沙雷菌感染 BALB/c 小鼠的保护作用[J]. 微生物与感染, 2015, 10(2): 103-107.

[10] Kumari S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *klebsiella pneumoniae* B5055 [J]. J Med Microbiol, 2011, 60(2): 205-210.

[11] 刘晓贺,顾敬敏,韩文瑜,等. 应用噬菌体 GH15 和 K 治疗金黄色葡萄球菌感染[J]. 微生物学报, 2013, 53(5): 498-506.

[12] Tamariz JH, Lezameta L, Guerra H. Phagotherapy faced with *staphylococcus aureus* methicillin resistant infections in mice[J]. Rev Peru Med Exp Salud Publica, 2014, 31(1): 69-77.

[13] 孙利利,杨毓,童贻刚,等. 金黄色葡萄球菌噬菌体对奶牛乳腺炎的治疗效果[J]. 沈阳大学学报(自然科学版), 2015, 27(1): 7-11.

[14] Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dabrowska B, et al. A retrospective analysis of changes in inflammatory markers in patients treated with bacterial viruses[J]. Clin Exp Med, 2009, 9(4): 303-312.

[15] Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, et al. Clinical aspects of phage therapy[J]. Adv Virus Res, 2012, 83(1): 73-121.

[16] Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dabrowska B, et al. Phage therapy of staphylococcal infections(including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2007, 61(5): 461-465.

[17] Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, et al. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial[J]. J Wound Care, 2009, 18(6): 237-242.

[18] Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, et al. Phage treatment of human infections[J]. Bacteriophage, 2011, 1(2): 66-85.

[19] 张红梅,梁梅,刘平,等. 噬菌体 D29 的免疫原性及安全性评价[J]. 世界科技研究与发展, 2012, 34(4): 692-695.

[20] 靳静,陈松建,张改,等. 克雷伯菌属噬菌体 LH-01 的生物学特性及其对败血症小鼠疗效的初步研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(1): 25-28.

[21] 张凤民,肖纯凌. 医学微生物学[M]. 3 版. 北京:北京大学医学出版社,2013: 71-72.

[22] 吴填顺,郭通,刘新. 噬菌体治疗鲍曼不动杆菌感染的综述[J]. 沈阳医学院学报, 2014, 16(4): 243-244.

[23] 徐嘉良,阚飙. 细菌的噬菌体感染抗性机制[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(3): 409-413.

[24] 黄建军. 细菌对噬菌体感染的抵抗[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(3): 135-138.

[25] Maiques E, Ubeda C, Tormo MA, et al. Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer[J]. J Bacteriol, 2007, 189(15): 5608-5616.

[26] 周园,王岚,林鸿,等. 鲍曼不动杆菌耐药性与噬菌体的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(3): 709-711.

[27] Dabrowska K, Switata-Jelen K, Opolski A, et al. Bacteriophage penetration in vertebrates[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98(1): 7-13.

[28] Pouillot F, Chomton M, Blois H, et al. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H 4-ST131 *escherichia coli* strain producing CTX-M-15[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(7): 3568-3575.

[29] 路荣,顾敬敏,刘晓贺,等. NDM-1 肺炎克雷伯菌裂解性噬菌体的分离鉴定及其对小鼠菌血症的治疗研究[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(12): 1747-1751.

[30] 代芳芳,赵秀英,于艳华,等. 医院内宽嗜性铜绿假单胞菌噬菌体的分离筛选[J]. 首都医科大学学报, 2013, 34(5): 727-732.

[31] 韩晗,李剑峰,姜金仲,等. 噬菌体治疗的另一种策略—转基因噬菌体[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(6): 138-141.