噬菌体复兴

克服抗生素耐药性的新希望

大肠杆菌细胞表面上的噬菌体将其遗传物质注入细菌。

Previous page: © Eye of Science/Science Source

在抗生素广泛使用前的20世纪20年代和30年代，医生曾成功地利用细菌噬菌体（或简称噬菌体）治疗过各种感染。噬菌体是病毒在自然界中的天敌，其攻击目标为细菌，但不伤害哺乳动物和植物细胞。礼来（Eli Lilly）以及许多制药公司都曾出售过噬菌体，这一事实甚至写进了小说—由辛克莱·刘易斯（Sinclair Lewis）撰写，1925年出版的《阿罗史密斯》（*Arrowsmith*）一书中，其主人公以噬菌体与鼠疫作斗争。

当时的科学家由于不太了解噬菌体的杀菌机制，他们使用的治疗方法简易，疗效不一。因此，随着20世纪40年代和50年代抗生素这一“灵丹妙药”的大量生产，人们基本上对噬菌体丧失了兴趣。

然而60年后，抗生素渐渐失去昔日的辉煌。抗生素不仅用于治疗人类感染性疾病，而且也用于家畜与家禽，以加速生长和预防疾病。它们被冲入下水道，渗入土壤与地下水面，使得抗生素耐药性成了环境问题的热点。耐抗生素微生物现已对不同年龄、国籍和社会经济背景的人们构成日益严重的威胁，许多以前可治愈的疾病再次成为不治之症。

研究人员在对前抗生素时代进行了回顾，他们的目的是复兴噬菌体，使之成为抗生素耐药性的解药，并解决医学、农业和环境的各种问题。这次他们以分子生物学工具为武器，以求更好地理解和控制噬菌体。他们还可以借鉴东欧研究人员的经验，这些研究者已对这些病毒连续研究了数十年，他们的研究工作主要发表在俄罗斯、格鲁吉亚和波兰的杂志上。在这些国家，使用噬菌体片剂和液体口服，局部、直肠给药以及注射剂已经持续了90年。未见有严重副作用的报道，发烧及其它轻微副作用是早期噬菌体制剂中的内毒素污染物所致。

食品安全鸡尾酒

食源性疾病是个严重问题，根据疾病控制和预防中心的估计，仅美国每年发生食源性疾病940万例，近56000人住院，超过1350人死亡。Intralytix生物技术开发有限公司生产的噬菌体疗法就是针对这些疾病的。

Intralytix公司的创始人之一兼首席科学家Alexander Sulakvelidze回忆道，当他的同事—马里兰大学医学院Glenn Morris医生说起20世纪90年代中期起多重耐药菌感染不断夺去他的病人生命时，沮丧之情溢于言表。当时Sulakvelidze是来自前苏联格鲁吉亚的客座研究员，在得知Morris从未听说过噬菌体时不禁目瞪口呆。美国尽管拥有各种先进医疗技术，却不利用噬菌体，他对此感到“十分震惊。”“人们死去，就是因为西方医学不再了解噬菌体疗法。” 1998年Sulakvelidze和Morris共同创立了Intralytix公司。

如今，该公司销售两种经美国食品和药物管理局（FDA）和美国农业部（USDA）批准的噬菌体产品。每种产品都含有针对和杀死同样细菌的噬菌体“鸡尾酒”。Sulakvelidze说：“我们的技术仅消灭有害细菌”。作为比较，他说抗生素和化学消毒剂“像战争伤亡一样”也杀死有益菌。我们不能够杀死所有微生物，这点已越来越被人们所认同，“我们不想这样做”，Sulakvelidze指出，“因为没有细菌存在，地球上也不会有生命。”

Intralytix ListShield™是第一个被FDA批准作为食品添加剂的噬菌体产品，针对即食肉类和禽类食品（如熟肉制品和法兰克福香肠）中的单核细胞增生性李斯特氏菌。该微生物还会污染奶制品及原料，即便在冷冻食品中也会生长，并导致名为李斯特氏菌病的严重感染，其致死率约为20%。

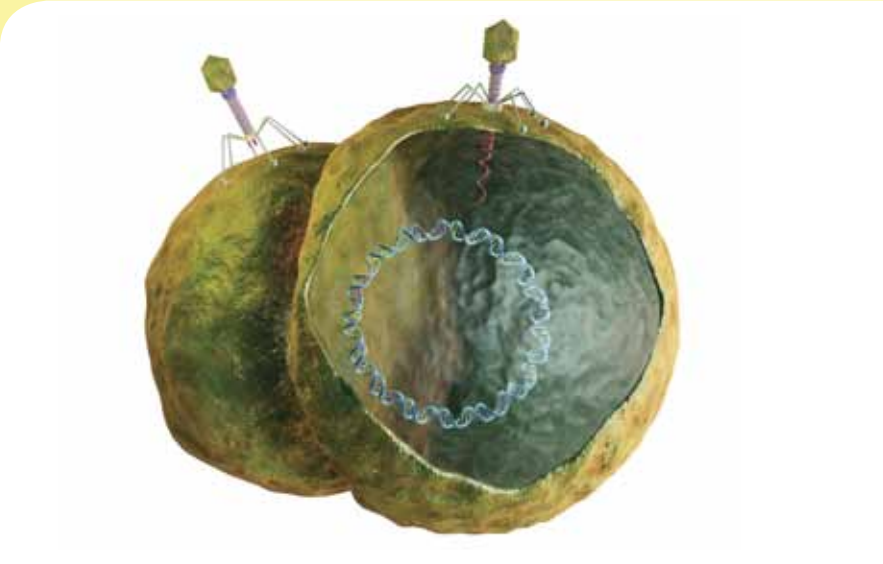
消灭来自食品加工厂的细菌十分困难。“尽管经过食品加工机的高强度清洗，单核细胞增生性李斯特氏菌仍无处不在，十分顽固，”Sulakvelidze说。ListShield被喷洒在肉类产品，以及食品加工厂的上下水道、地板、冷却器和可能携带李斯特氏菌的其它表面。据Sulakvelidze说，该产品通常会使单核细胞增生性李斯特氏菌污染降低95%甚或更多。

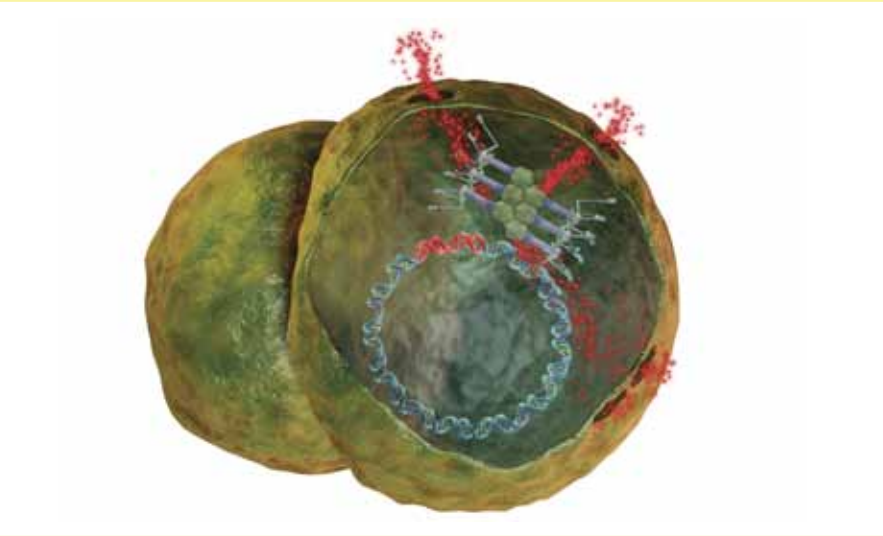
第二个产品是EcoShield™，喷洒于制成汉堡包前的肉上，以杀死大肠杆菌O157:H7，美国每年发生的62000例食源性疾病皆由此菌引起。来自不同动物身上的原料肉混在一起成为肉馅时，只要一头动物有细菌就可以感染大批量的肉。Sulakvelidze证实，在与政府研究人员所进行的研究中，EcoShield在5分钟内可杀死95%~100%的大肠杆菌O157:H7。

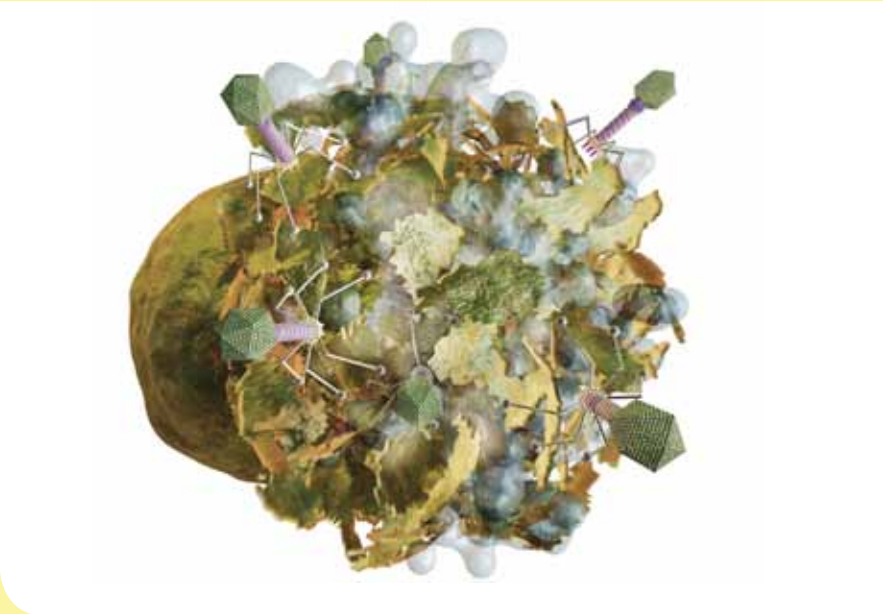
Jitu Patel和Manan Sharma是美国农业部的研究人员，他们也在实验性污染有大肠杆菌O157:H7的鲜切生菜和哈密瓜上测试过EcoShield。大肠杆菌病原体的生物膜或永久菌落，可污染用于收割生菜、菠菜和其它作物的刀片。刀片即使经过氯气消毒，生物膜上的部分细菌仍可幸免于难。然而，美国农业部的研究表明，EcoShield在一天内使病原体水平下降了100倍。Sharma说，他知道尚无人使用该产品处理水果或蔬菜。

EcoShield和ListShield无臭、无味、无形，且无腐蚀性。据Sulakvelidze说，这些产品中的噬菌体以0.001%的浓度存在于液体喷洒剂中，配成的终溶液“除了目标细菌，几乎像水一样对任何东西无害，”。噬菌体消散迅速，不会有噬菌体溶液的残留物转移到消费者身上。

第三个产品SalmoFresh™，专门针对禽类及其它食品中的沙门氏菌，正等待美国食品和药物管理局的批准。Intralytix公司正在开发用于伤口愈合、兽医保健和口腔卫生的其它噬菌体疗法。







© Medi-Mation Ltd/Science Source

噬菌体作用机制

噬菌体是所有已知细菌的克星，噬菌体特异性极强，仅攻击它们可寄生和杀死的细菌菌株（哺乳动物和植物细胞因缺乏噬菌体感染所需受体，噬菌体对其无害）。噬菌体首先附着于细菌的细胞膜上并将其穿透。噬菌体DNA被注入宿主细胞中。宿主细胞的DNA转录被抑制，代之以噬菌体特异蛋白质的合成。组装新噬菌体，宿主细胞膜破坏，大量新噬菌体从宿主细菌释放出来，宿主细菌死亡。

据估计生物圈中有1030~1032个噬菌体，每秒钟估计发生1023次噬菌体感染。每48小时噬菌体破坏世界上大约一半细菌，这一动态过程发生在所有生态系统中。

噬菌体感染细菌已经有数十亿年，就像细菌抗药性突变一样，细菌也发生突变使噬菌体失效。然而，新噬菌体不断演变以对抗突变细菌。马里兰大学生物科学和生物技术研究所的Daniel Nelson说，“这是一场进化军备竞赛。”由于噬菌体无法复制自己，它们必须细菌感染，而细菌又必须耗费大量的能量，才能避免被噬菌体杀死。

然而，噬菌体并非完全对细菌有害，它们甚至通过向细菌转移抗生素耐药性和毒素基因，为细菌提供健康优势，细菌从而获得理想特性，并避免死亡，细菌利用限制修饰系统切除有害噬菌体DNA，但保留有益噬菌体DNA。“然而，噬菌体比细菌适应与进化得更快，由于双方都试图在进化上超过对方，从而猫捉老鼠的游戏得以继续，”尼尔森说。

裂解酶：一种替代方法

有些研究人员正在分离使细菌爆裂的噬菌体酶（见“噬菌体如何工作”方框），以作为噬菌体鸡尾酒的替代品。当噬菌体在宿主细菌的细胞中复制时，产生两种重要的酶—穴蛋白与裂解酶，前者在细胞内膜上穿孔，后者经由穴蛋白产生的孔进入并攻击细胞壁，最终使细胞像气球一样爆裂释放出数以百计的噬菌体。

马里兰大学生物科学和生物技术研究所助理教授Daniel Nelson说，很显然，即使没有噬菌体或穴蛋白，直接作用于细菌的裂解酶也可以从外面“啃咬”和摧毁细胞壁。“这就是所谓的‘外溶菌作用’，意指无噬菌体感染性裂解，” Nelson解释道。

裂解酶正在用于消灭产气荚膜梭状芽孢杆菌，该菌引起家禽坏死性肠炎，也是人们食物中毒的主要病因。“我们想用噬菌体产品保护人们食用的鸡和禽类产品”，美国农业部农业研究服务局的微生物学家和首席研究员Bruce Seal如是说。

Seal及其同事们已经确定了家禽生产基地的50余株产气荚膜梭状芽孢杆菌，每一菌种都有其特定噬菌体。“仅为杀死美国东南部发现的所有产气荚膜梭状芽孢杆菌菌株，我们就需要由20~30种噬菌体组成的鸡尾酒，”Seal说。他的团队利用各种工具，将所有杀死产气荚膜梭状芽孢杆菌的各种裂解酶，如酰胺酶、肽酶和溶菌酶组合在一起。肽酶分解蛋白质，酰胺酶打破酰胺键，溶菌酶分解细菌细胞壁上的肽聚糖。将它们结合在一起，要比单独任何一种方法更有效。

Seal说，大部分梭状芽孢杆菌属细菌能帮助鸡消化饲料，并为鸟类提供营养因子，因此重要的是只杀死致病性产气荚膜梭状芽孢杆菌。目前已证实多裂解酶法不仅更有效，而且能防止今后细菌出现抗性。尚未听说有裂解酶抗性的报告，但“这是有可能发生的”，Seal说。他说，裂解酶的这种用法时间还不太长，所以人们不知道是否会发生抗性。但可供选择的裂解酶有好多种，而且如有需要，还可以寻找新的裂解酶，他补充道。

医学应用

目前美国还在对噬菌体的医学应用进行探索。2008年，FDA批准了评估Intralytix公司制备的由8种噬菌体组成，治疗下肢静脉溃疡的未命名鸡尾酒的一期临床试验。这些噬菌体针对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。治疗结果证明是安全的，达到了一期试验的主要目标。“此前美国还未曾进行过证明噬菌体鸡尾酒安全性的正式研究，”Sulakvelidze说。尚需资金继续进行评估治疗效果的二期临床试验。

Nelson及其纽约市洛克菲勒大学的同事，对在动物研究中杀死引起猩红热、风湿热、坏死性筋膜炎（“食肉菌感染”）及肺炎的链球菌的裂解酶进行了纯化。 他们最近破解了已知最强裂解酶PlyC的X-射线晶体结构，为其超强效力提供了线索。PlyC较之其它裂解酶及化学消毒剂的杀菌能力强100倍。仅10纳克PlyC就可以在5秒钟内杀死107个细菌。

“该结构对如何设计效果更好的其它裂解酶方面为我们提供了帮助，”Nelson说。他及其同事推测，类似裂解酶有可能控制医院和养老院里的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌，以及学校、日托中心、军营里的肺炎链球菌。

人们还在研究用噬菌体治疗痤疮。引起痤疮的细菌—痤疮丙酸杆菌菌株对抗生素的耐药性高达60%，因此有必要改进痤疮治疗。加州大学洛杉矶分校医学院的皮肤科医生Jenny Kim猜测，自然产生的皮肤噬菌体有保护部分人免患痤疮的作用。“我们每个人都携带痤疮丙酸杆菌，”她解释说，“但并非人人都患痤疮。”她指出皮肤光洁者的皮肤微生物可能带有抑制痤疮丙酸杆菌的噬菌体群。

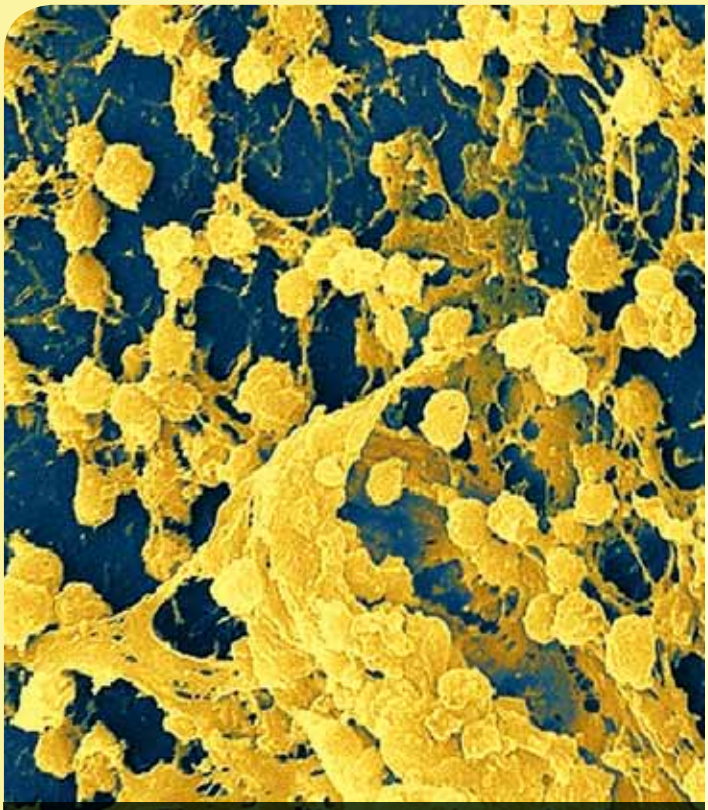
Kim及其同事对从患有及未患痤疮者的毛囊皮脂腺（痤疮丙酸杆菌聚集处）中获得的噬菌体进行了基因组测序。他们鉴定到了不同程度杀灭痤疮丙酸杆菌的各种噬菌体。Kim说开发痤疮外用噬菌体疗法有“极大的治疗机会”。

噬菌体除可治疗细菌性感染外，还可以帮助诊断。匹兹堡大学阿尔伯特·爱因斯坦医学院以及南非德班的纳尔逊·曼德拉医学院的团队，设计了携带绿色荧光蛋白报告基因的荧光噬菌体，当它侵入引起结核病（TB）的结核分枝杆菌时会发光。开发荧光噬菌体的目的是提高结核病患者痰中结核分枝杆菌耐药菌株的检测速度。标准的细胞培养实验需要长达2个月；在此时间，只要吸入少量的细菌即可传播结核病。

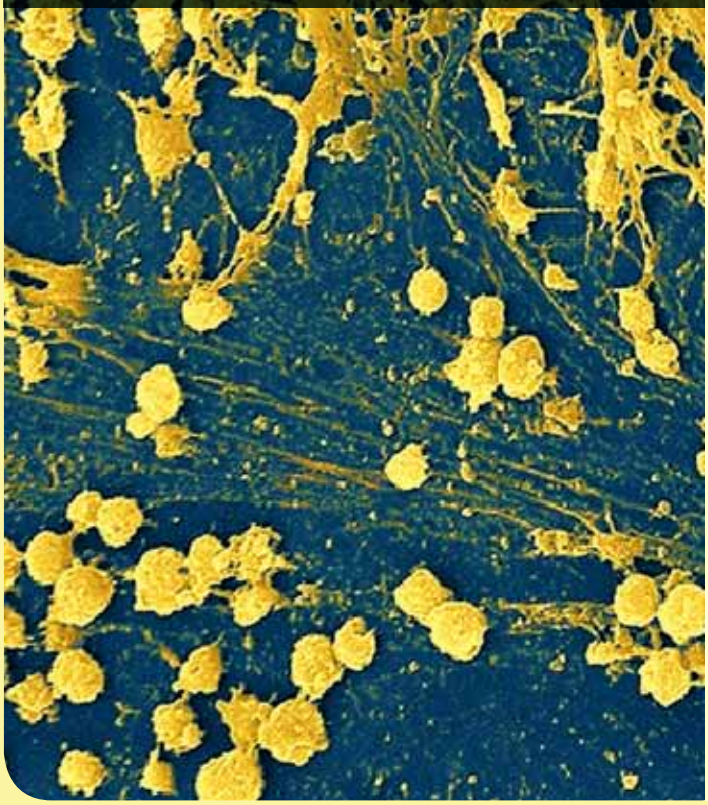
开发者之一的美国匹兹堡大学生物技术教授Graham Hatfull说，“这一技术看来很有发展前途，较之用噬菌体治疗结核病的目标更为合理，”不过他也说噬菌体喷鼻剂有可能防止结核病传播。Hatfull说：“噬菌体绝对是新基因与新应用的宝库”。

水处理

水处理是美国噬菌体复兴的又一领域。污水含有的病毒比其他水体高达1000倍以上。民用和环境工程师对污水进行筛查以找到可以改进饮用水和废水处理的噬菌体。简单地说，他们将废水样品通过尼龙过滤器，收集滤液。滤液中的噬菌体生长在工程师想要杀死的细菌接种的琼脂平板上。在经过第一轮的杀灭后，收集噬菌体溶液进行离心，上清液就是所需噬菌体



无针式静脉注射接头内表面上的葡萄球菌生物膜。如果噬菌体成为医用或其它用途的常用工具，公众需要得到病毒不单只是无害，而且是有益的明确保证。



© Science Source

必要的教育

噬菌体是地球上最普遍的微生物。我们的牙菌斑、消化道、皮肤和其他器官，以及我们的食物和饮用水，都充斥着这些微生物，我们与它们和睦相处。但如果噬菌体越来越常用于医疗保健和其它方面的话，人们在得知它们其实是病毒时可能会怀疑甚至害怕。哥伦比亚密苏里大学的胡志强教授说，像人们对流感、脊髓灰质炎和艾滋病的看法一样，“公众认为所有病毒都是危险的。”

为该文采访提供信息的人都赞成有必要通过教育，使普通大众易于接受噬菌体疗法。“这一想法开始听起来很吓人，但如果噬菌体疗效良好，公众是会接受它们，”加州大学洛杉矶分校的Jenny Kim预言道。她指出，利用病毒消灭细菌类似于使用活疫苗预防疾病。现在很多人接受了“好细菌”的观点，并购买酸奶这类益生菌食物。

“噬菌体符合这一日益为人们所接受的趋势，即并非所有微生物都是有害的，很多是有益的，”Intralytix公司首席科学家Alexander Sulakvelidze说。“噬菌体，如果使用得当，可以对我们生活的许多方面，从食品安全到人体健康产生巨大的积极影响。”

目前有两项使学生了解噬菌体的实践教育计划。美国匹兹堡大学的Graham Hatfull是研究与教育相结合噬菌体猎人（PHIRE）计划的领头人。当地的高中和大学学生收集土壤，从中分离噬菌体，纯化和提取噬菌体DNA，并在匹兹堡噬菌体研究所的基因组中心对其进行测序。然后，他们使用生物信息学工具来分析和解释基因组。

PHIRE学生已发现并命名了1000种新噬菌体，Hatfull说同学们都强烈意识到他们在通过该计划的工作推动科学进步。PHIRE催生了全国科学教育联盟推进基因组学和进化科学噬菌体猎人（SEA-PHAGES）项目，这是一个为大学新生开办的两学期研究型课程。SEA-PHAGES每年有超过70多所大学的2000多名学生参加。这两个项目均由霍华德·休斯医学研究所（Howard Hughes Medical Institute）资助。

专业噬菌体”猎人”可通过名为《噬菌体》（*Bacteriophage*）的新杂志了解这方面的最新研究进展，噬菌体是第一家致力于噬菌体各方面研究的期刊（Sulakvelidze任总编辑）。该国际同行评审期刊涉及的主题包括基础生物学、噬菌体分类、噬菌体宿主细胞相互作用、噬菌体的实际应用以及临床试验结果。

的丰富来源。“噬菌体是废水处理研究的一个新领域，它们可以很容易地与现有系统相结合，”盐湖城犹他州立大学民用与环境工程副教授Ramesh Goel说。

在进行污水活性污泥处理时，污泥沉淀在罐中，上清液流出后作进一步纯化。但这一过程受到诸如浮游球衣菌这种丝状微生物的影响，浮游球衣菌长着长长的触须，使污泥悬浮而不易沉淀。为此添加消毒剂，如氯气杀死这些细菌，但消毒剂杀死的往往是接近水表面的细菌，一旦处理停止，很快又被下部的更多细菌所替代。

Goel在实验中用从污水中分离出来的噬菌体以这些问题丝状菌为攻击目标。在一项研究中，受浮游球衣菌污染的混浊废水在12小时后显示污泥体积减少和上清液更清，此外，噬菌体可以保持稳定和活跃9个月以上，并能耐受活性污泥处理中常见的温度和pH值波动。

哥伦比亚密苏里大学土木与环境工程副教授，Zhiqiang Hu（胡志强）用绿脓杆菌细菌生物膜进行过类似研究，绿脓杆菌生物膜通常堵塞在饮用水处理厂的过滤器上，需要用氯气和昂贵的冲洗液进行清洗。胡志强教授从杀死绿脓杆菌生物膜的污水中分离出噬菌体，与氯气进行对照测试，标准处理法去除40％的绿脓杆菌生物膜。单用噬菌体杀灭89％，而氯气清洗后再用噬菌体处理则可去除97％的生物膜。

像许多自然情况（包括人体）下一样，污水处理厂用许多有益菌种分解废物和控制污水处理厂的气味，维持微生物的谨慎平衡。“我们的目标是清除致病菌，对有益菌的影响则微乎其微，” 胡志强教授说。因为污水处理设施的周围噬菌体数量巨大，“添加所需噬菌体应该不会造成环境或健康问题，”他补充道。

优点和缺点

虽然细菌确实会对其天敌病毒产生抗性，但要击败一个鸡尾酒中的各种噬菌体必须发生几次突变。“细菌同时对一个鸡尾酒中的多种噬菌体产生抗性的几率是很低的，” Sharma说。“利用鸡尾酒中针对同一病原体的多种噬菌体，为防止细菌产生噬菌体抗性提供了内置应急方案。”

Sulakvelidze预计，将来某一天需用新噬菌体更新他的公司产品。如果产生抗性，他说将会找到新噬菌体，并添加至配方以恢复效力。

不过，虽然噬菌体为解决细菌抗性提供了前所未有的灵活性，但噬菌体鸡尾酒需要在实验室中的致病菌体内生长大量的病毒，从理论上说，这会给工作人员与环境带来风险。而按Seal的说法，利用裂解酶的优势提供了一种更安全的替代品。

但是裂解酶也有其局限性。它们对革兰氏阳性菌（如链球菌、金黄色葡萄球菌、梭菌属）的效果最佳。虽然业已证明噬菌体对革兰氏阴性菌（例如，沙门氏菌、大肠埃希氏菌、假单胞菌属）也有效，但这类细菌外层脂肪膜的保护作用，影响了单用裂解酶的穿透能力。据Seal和Nelson说，与所有治疗性蛋白一样，裂解酶的开发与制造都比噬菌体要贵。高成本可能使裂解酶的部分工业用途不切实际。

同时，人类噬菌体疗法获得批准是对自身的独特挑战。Sulakvelidze说，当Intralytix公司寻求FDA批准其ListShield产品时，“我们没有任何可以依据的指南，这一过程历时4年。”该公司第二个产品的批准要顺利得多，花了大约一年半得到批准。该过程“对我们和FDA来说都是个相互学习的过程，我们希望能为后来者扫清了道路，”Sulakvelidze说。 FDA现正完善其它噬菌体制剂的申请指南。

对人类噬菌体疗法的监管与药物和生物制品的要求一样，进行人体测试需要提交临床试验新药（IND）申请。对于传统药物来说，FDA希望联合用药中的每种成分，无论单用还是合用，都证明是安全和有效的。据FDA发言人Rita Chappelle说，这意味着噬菌体鸡尾酒中每种噬菌体的活性、效力和稳定性都必须得到证实。这一要求所带来的挑战可能是噬菌体疗法的拦路虎。

Chappelle说，“对于应用噬菌体解决人类疾病或症状的临床研究感兴趣的制造商，FDA鼓励他们在产品开发时尽早与管理局（FDA）联系，”他还补充道，噬菌体疗法开发商可以要求召开临床试验前（pre-IND）会议。

DNA测序、蛋白质组学分析、细胞毒性实验和透射电子显微镜有助于反映人类噬菌体制剂的特性。这些工具可以确认所需裂解过程和不存在毒素及杂质，并有助于临床测试良好操作规范标准的建立。

总结噬菌体的优缺点，以及向有关当局注册噬菌体的工作需要花费大量时间。但噬菌体的支持者坚持认为带来的好处值得这样做：无论用作鸡尾酒、裂解酶，抑或单一噬菌体，这些制剂都反映了新型抗菌剂巨大武库的潜力。Hatfull说，“要做的工作还有很多，开发噬菌体的机会也很多。”

Carol Potera居住在蒙大拿州，自1996年以来为*EHP*撰稿。她还为《微生物》（*Microbe*）、《遗传工程新闻》（*Genetic Engineering News*）和《美国护理杂志》（*American Journal of Nursing*）撰文。

译自*EHP* 121(2):A48–A53 (2013)
翻译: 王仁礼；审校: 李卫华

***本文参考文献请浏览英文原文**

原文链接

http://dx.doi.org/10.1289/ehp.121-a48