



噬菌体裂解酶应用研究进展

周彪^{1,2} 甄向凯^{1,2} 欧阳松应^{*1,2}

1 福建师范大学生命科学学院 福建 福州 350117

2 福建师范大学南方生物医学研究中心 福建 福州 350117

摘要: 近年来,随着抗生素的滥用,导致多重耐药性菌株出现的频率加快。因细菌感染导致死亡的人数逐年增多,人类健康面临巨大挑战,因此研制新型抗菌药物刻不容缓。噬菌体裂解酶因其高效的杀菌能力及高度的宿主专一性而成为新一代抗菌制剂的候选之一。其是一种细胞壁水解酶,在双链 DNA 噬菌体复制后期被合成,通过水解细胞壁肽聚糖上的化学键,从而裂解细菌细胞壁,释放出子代噬菌体。本文系统地介绍了噬菌体裂解酶的研究进展,为相关裂解酶抗菌药物的研发做出有益探索。

关键词: 噬菌体, 裂解酶, 抗菌剂, 应用

Research progress in the application of bacteriophage lysin

ZHOU Biao^{1,2} ZHEN Xiangkai^{1,2} OUYANG Songying^{*1,2}

1 College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350117, China

2 Fujian Normal University, Biomedical Research Center of South, Fuzhou, Fujian 350117, China

Abstract: More recently, the frequency of multi-drug-resistant strains has sped up with the misuse of antibiotics. Since the number of deaths caused by bacterial infection is increasing year by year and human health is facing a substantial challenge, it is urgent to develop novel antibacterial drugs. Bacteriophage lysin is a type of protein which synthesized by double-stranded DNA bacteriophage at the late stage of genome replication. It can hydrolyze the peptidoglycan in the bacterial cell wall to release the progeny bacteriophage and kill the bacteria. Bacteriophage lysin is derived from bacteriophages and has a unique advantage of evolutionary selection. It is not only efficient and fast quickly kill multi-drug resistant bacteria, and it is not easy to cause bacteria to develop new drug resistance. Because of its highly efficient bactericidal capacity and high host specialization, bacteriophage lysin has become one candidate for a new generation of antibacterial agents. A review on the structure and mode of action of lysins and their application were presented.

Keywords: bacteriophage, lysin, antibacterial agent, application

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31770948); Fujian Provincial Department of Science and Technology University Industry-University Cooperation Project (2020Y4007, 2021H0004); Marine Economic Development Subsidy Project of Fujian Province (FJHJF-L-2020-2)

***Corresponding author:** Tel: 86-591-22868199; E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

Received: 18-11-2020; **Accepted:** 03-04-2021; **Published online:** 03-06-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31770948); 福建省科技厅项目(2020Y4007, 2021H0004); 福建省海洋经济发展补助项目(FJHJF-L-2020-2)

***通信作者:** Tel: 0591-22868199; E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2020-11-18; **接受日期:** 2021-04-03; **网络首发日期:** 2021-06-03

1 噬菌体裂解酶结构以及作用机制

裂解酶又称内容素(Endolysin), 是一类由双链 DNA 噬菌体(dsDNA 噬菌体)编码的细菌细胞壁水解酶, 在噬菌体感染宿主的后期表达产生, 其主要作用是裂解宿主细胞壁释放子代噬菌体^[1]。

噬菌体裂解酶种类繁多, 大多数革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶在结构上存在“双结构域”的特点, 主要由催化结构域和结合结构域 2 个部分组成^[2-3] (图 1A)。一般来说, N 端为催化结构域(Catalytic Domain, CD), 可特异性地切断肽聚糖中的化学键, 大多数裂解酶只包含一个催化结构域, 少数含有多个催化结构域^[4-5]。根据切割肽聚糖的化学键类型, 可将裂解酶分为 6 大类^[2] (图 1B): (1) N-乙酰基酰胺酶; (2) N-乙酰-β-D-氨

基葡萄糖苷酶; (3) MurNAc-L-丙氨酸酰胺酶; (4) 内肽酶; (5) 肽酶; (6) 转糖苷酶。裂解酶的 C 端为细胞壁结合结构域(Cell Wall Binding Domain, CBD), 可特异性地结合肽聚糖上相应的配体^[6]。在解析的 CBD 结构中, 它们大多为单体结构, 少数为多聚体结构, 所在的位置和方向并不保守, 大部分位于裂解酶的 C 端, 少数位于 N 端^[7]。由于革兰氏阳性菌没有外膜(Outer Membrane, OM) 包被, 这使得革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶在没有穿孔素(Holin)的协助下, 可以从外部裂解细菌的细胞壁。相比之下, 大多数革兰氏阴性菌噬菌体裂解酶只有一个 CD, 没有 CBD, 由于外膜的存在, 革兰氏阴性菌噬菌体裂解酶无法从外部进入肽聚糖层发挥裂解作用, 这可能解释了为什么大

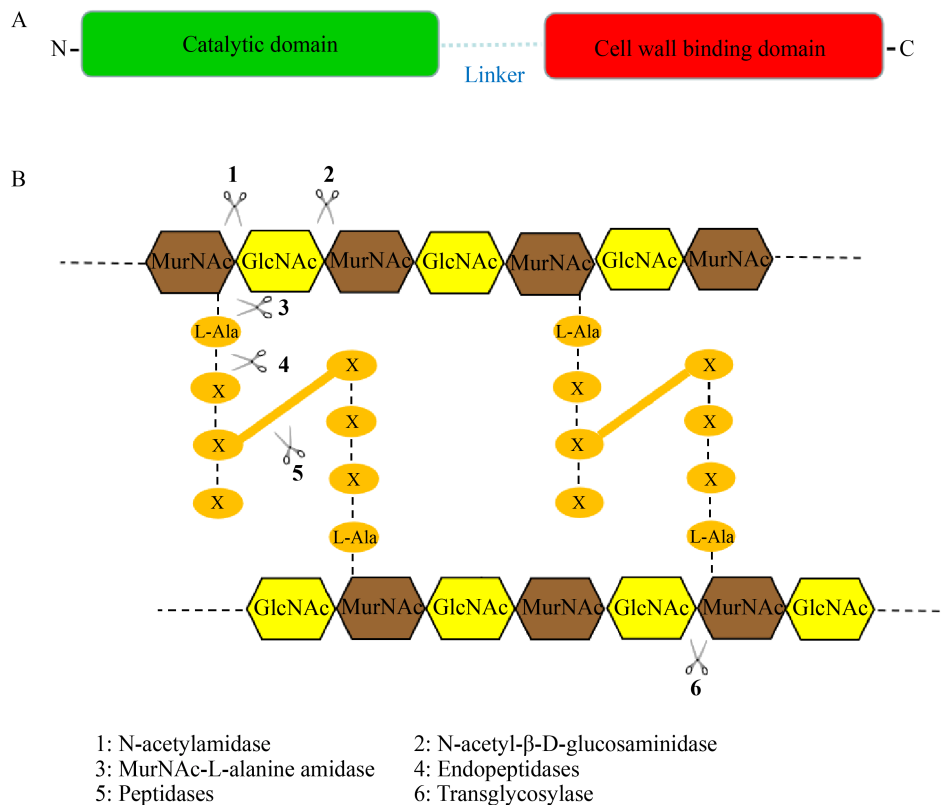


图 1 裂解酶结构以及对细菌细胞壁肽聚糖的作用位点

Figure 1 The structure of lysin and its action site on bacterial cell wall peptidoglycan

注: A: 噬菌体裂解酶的结构简图, 其中绿色代表催化结构域, 红色代表结合结构域; B: 裂解酶作用于细菌细胞壁的作用位点
Note: A: Schematic diagram of the structure of bacteriophage lysin, where the green represents the catalytic domain and the red represents the binding domain; B: Lysin acts on the site of bacterial cell wall

部分革兰氏阴性菌噬菌体裂解酶是小的单结构域的球状蛋白(分子量在 15–20 kD 之间)^[8-9]。与革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶相比,这类裂解酶可能会更好地发挥酶的催化作用(辅助细胞裂解过程中的多个催化反应)^[10]。但也有一些特殊情况,如来自绿脓杆菌噬菌体的裂解酶 KZ144 和 EL188 就含有 CD 和 CBD 这 2 种结构域^[7]。裂解酶的活性和结构特点显示了其良好的抗菌作用,也使其在成为新型抗菌药物方面拥有广阔的前景。

2 噬菌体裂解酶的应用

2.1 噬菌体裂解酶在医疗上的应用

1958 年, Jacob 等^[11]首次报道了噬菌体可以编码裂解细菌的蛋白质,即裂解酶,并证实它们在噬菌体感染宿主菌的过程中发挥着重要的作用;1975 年, Freimer 等^[12]首次将裂解酶作为抗菌剂应用于 A 群链球菌(Group A *Streptococcus*)后,越来越多的裂解酶被发现和应用。

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是一类高致病性和传染性的院内感染菌,能够引起人体(如中耳炎、鼻窦炎、肺炎、败血症和脑膜炎等)多种疾病。由于肺炎链球菌对抗生素的耐药性增加,由肺炎链球菌引起的细菌性疾病的治疗越来越困难^[13]。2008 年, Grandgirard 等^[14]研究表明,纯化的裂解酶 Cpl-1 在治疗因肺炎链球菌感染引起的败血症和脑膜炎中具有良好的抗菌效果;一次性注射 20 mg/kg 的 Cpl-1 可使小鼠脑脊液中肺炎球菌在 30 min 内迅速减少 3 个数量级,作用时间持续 2 h;向小鼠腹膜中注射 200 mg/kg 的 Cpl-1 对脑脊液(Cerebrospinal Fluid, CSF)的抗菌作用则达到 2 个数量级,持续 3 h。因此裂解酶 Cpl-1 也有望成为治疗肺炎球菌性脑膜炎和菌血症的潜在药物。通过解析的三维结构,裂解酶 Cpl-1 高效裂解肺炎球菌的作用机理也被合理解释。其是一种胆碱结合蛋白(Choline Binding Protein, CBP)含有一个催化结构域(CD)和一个胆碱结合结构域(Choline Binding Domain, CMB),CD 可作用于肽

聚糖中的化学键, CMB 可以特异性结合细胞壁上的胆碱分子。Cpl-1 的 CD 和 CMB 在结构上共同构成一个发夹结构,其 CMB 由 6 个连续串联重复的胆碱结合基序组成,它们并排排列,形成 2 个不同的结构区即 CI、CII,彼此通过疏水作用靠在一起(图 2)。CD 与 CMB 在结合底物之前相互作用,导致结合域 2 个结构区之间的角度增大,使裂解酶以正确的方向结合细胞壁上的糖链和胆碱分子,发挥最大的裂解活性,这为对多重耐药性肺炎链球菌的抗菌药物的研发奠定了理论基础^[15-17]。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是造成院内感染最为严重的一种病原菌,其可以引起皮肤脓肿、伤口感染、髓炎、肺炎、心内膜炎以及中毒性休克综合征等多种疾病^[18-20]。2007 年, Rashel 等^[21]发现裂解酶 MV-L 可以有效清除接种到小鼠鼻腔中的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),向小鼠的腹腔注射 MV-L (500 U)也能提高小鼠的

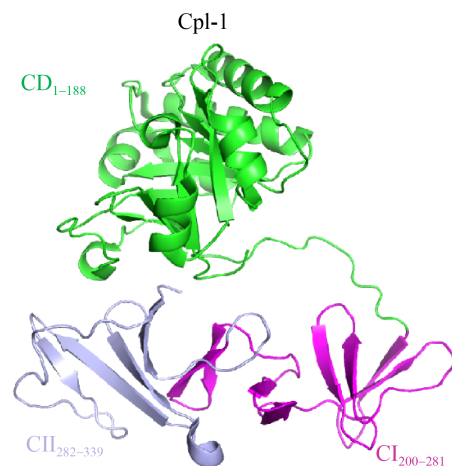


图 2 裂解酶 Cpl-1 的晶体结构

Figure 2 Crystal structure of lysin Cpl-1

注:裂解酶 Cpl-1 整体结构包含 N-端的 CD 域(绿色部分)和 C-端 CMB (灰色和紫色部分),2 个结构域相互作用构成一个发夹结构,其中 CMB 由 6 个连续串联重复的胆碱结合基序组成

Note: The overall structure of lysin Cpl-1 contains N-terminal CD domain (green) and C-terminal CMB (gray and purple). The two domains interact to form a hairpin structure, where CMB is composed of six consecutively repeated choline binding motifs

生存率。2014年, Gu等^[22]研究发现裂解酶 LysGH15 能够高效裂解多种金黄色葡萄球菌, 其中包括 24 株 MRSA。研究表明, 小鼠在感染金黄色葡萄球菌后, 从腹腔注射裂解酶 LysGH15 (50 μg) 能够对小鼠提供 100% 的保护率, 进一步研究发现 LysGH15 显著降低小鼠血液中的含菌量以及减少炎症反应的发生^[23-24]。为了揭示裂解酶 LysGH15 高效裂解金黄色葡萄球菌的分子机制, Gu 等^[22]通过 X-Ray 晶体衍射法解析了 LysGH15 的三维结构, 裂解酶 LysGH15 是一种金属离子依赖性肽酶, 其包含 CHAP、Amidase、SH3b 这 3 个活性域, 其中 CHAP 和 Amidase 为催化结构域, 分别结合一个钙离子和锌离子, SH3b 为结合结构域(图 3); 钙离子对 CHAP 的裂解活性至关重要, 一旦丢失, CHAP 则无法发挥裂解活性; Amidase 活性域单独表现不出裂解活性, 主要表现为增强 CHAP 活性的作用, 在 LysGH15 的整体活性中的作用很小; SH3b 结合结构域在 LysGH15 的全长活性中发挥着重要的作用, 将 SH3b 的结合位点突

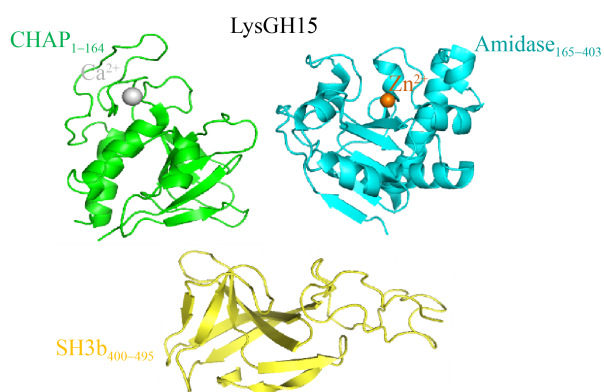


图 3 裂解酶 LysGH15 的晶体结构

Figure 3 Crystal structure of the lysin LysGH15

注: 裂解酶 LysGH15 包含 CHAP、Amidase 和 SH3b 这 3 个活性域, 其中 CHAP 和 Amidase 分别结合一个 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} , CHAP 和 SH3b 对全长 LysGH15 活性至关重要, 而 Amidase 则主要对 CHAP 活性起增强作用

Note: Lysin LysGH15 contains three active domains: CHAP, Amidase and SH3b. CHAP and Amidase bind a Ca^{2+} and Zn^{2+} respectively. CHAP and SH3b are essential for the activity of full-length LysGH15, while Amidase mainly enhances CHAP activity

变后, 全长 LysGH15 的裂解活性出现不同程度的下降, 这表明 CHAP 和 SH3b 对 LysGH15 的高效裂解活性至关重要。

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)是一种普遍寄生在人或动物肠道、口腔及生殖道内的革兰氏阳性菌, 当其在体内异位寄生时, 可引起人的心内膜炎、菌血症、尿道感染及脑膜炎等多种疾病^[25-26]。2013年, Zhang 等^[27]从医院的废水中分离到一株粪肠球菌噬菌体 IME-EF1, 并表达其裂解酶 LysIME-EF1, 研究表明 LysIME-EF1 展现出比亲本噬菌体更宽的裂解谱, 能够裂解 8 株粪肠球菌和 1 株屎肠球菌(*Enterococcus faecium*), 其中还包括 2 株万古霉素耐药粪肠球菌(Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*, VREF) V309 和 V583。2020年, Zhou 等^[28]解析了 LysIME-EF1 的三维结构; LysIME-EF1 整体结构呈不规则的上下结构, 包括一分子全长 LysIME-EF1 (绿色和紫红色部分)和三分子额外 CBD (彩色部分)(图 4A); 全长 LysIME-EF1 的 CHAP 结构域构成整体结构上部分, 额外的三分子 CBD 与全长 LysIME-EF1 的 CBD 形成环状四聚体构成整体结构的下部分, 四分子 CBD 之间没有任何区别。CBD 形成的环状四聚体一面比较平(图 4B 右), 而另一面则凸出来(图 4B 左), LysIME-EF1 的 CHAP 结构域就位于 CBD 四聚体的凸出来的一面, 彼此通过 Linker 连接, 其整体形似“八爪鱼”, 由于 CBD 的环状四聚体结构显著增加了 LysIME-EF1 结合细菌细胞壁的接触面积, 导致其裂解活性比其他粪肠球菌噬菌体裂解酶高; 进一步研究发现在 LysIME-EF1 的 168 位氨基酸(甲硫氨酸, M)对应的密码子 ATG 的上游存在一个核糖体结合位点(Ribosomal Binding Site, RBS), 这是导致 LysIME-EF1 额外产生三分子 CBD 的原因(图 5A)。正是因为这种独特的基因结构促使 LysIME-EF1 CBD 形成独特的四聚体结构, 并赋予其高效裂解粪肠球菌临床株的能力。

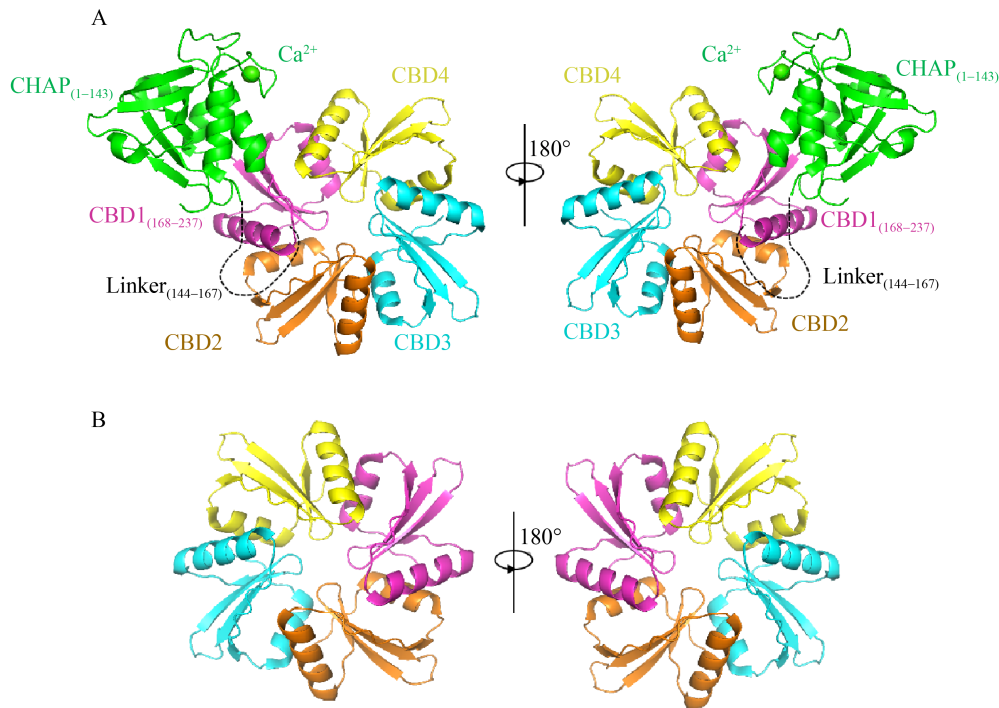


图4 LysIME-EF1 的晶体结构

Figure 4 Crystal structure of LysIME-EF1

注: A: LysIME-EF1 的整体结构, 其中绿色部分代表全长 LysIME-EF1 的 CHAP 结构域; 紫色部分为全长 LysIME-EF1 的 CBD, 额外的 3 个 CBD 为其他颜色; 黑色虚线代表 linker。B: Lys IME-EF1 的 4 个 CBD 形成的环状四聚体, 一面平整(右), 一面凸起(左), N 端 CHAP 结构域位于凸起的 CBD 四聚体环上

Note: A: The overall structure of LysIME-EF1. The green part represents the CHAP domain of the full length LysIME-EF1 and the purple part is the CBD of the full length LysIME-EF1. The additional three CBDs are in other colors. The black dotted line represents the linker. B: A cyclic tetramer formed by the four CBDs of LysIME-EF1, one side is flat (right) and the other side is convex (left). The N-terminal CHAP domain is located on the convex CBD tetramer ring

同样的机制也存在于噬菌体裂解酶 Lys170 中^[29], 2021 年, Xu 等^[30]解析了裂解酶 Lys170 的 CBD 结构, Lys170 CBD 和 LysIME-EF1 CBD 类似, 都是四聚体结构(图 5B)。4 个 CBD 彼此之间依靠氢键和疏水作用维持相互作用, 将 CBD 四聚体破坏, 裂解酶 Lys170 的裂解活性大幅度降低。同时在 Lys170 的基因序列中, 也存在内部翻译替代起始位点(170 M)和 RBS 的现象; 该系列研究首次从结构和功能角度阐明了粪肠球菌噬菌体的单个基因编码多组分裂解酶的作用机理, 对多重耐药性粪肠球菌的抗菌药物开发具有重大意义。

目前在被发现的裂解酶中, 结构最为复杂、活性最高的裂解酶是来自 A 型链球菌噬菌体裂解

酶 PlyC^[31-32]。2001 年, Nelson 等^[33]发现裂解酶 PlyC 可以在 5 s 内裂解 10^7 CFU 的化脓性链球菌, 提前给小鼠口服 250 U 的 PlyC 能显著降低细菌的感染率; 对于已经感染的小鼠, 在口服 500 U 的 PlyC 2 h 后, 可使小鼠血液含菌量显著降低; PlyC 高效裂解细菌的原因归结于其独特的三维结构, 其由一分子 PlyCA 和由 8 个 PlyCB 分子组成的环状结构组成, PlyCA 和 PlyCB 分别由 2 段基因编码(图 6A)。PlyCA 含有 3 个结构域, 其中 2 个分别是负责催化的糖苷水解酶结构域(GyH₁₋₂₀₅)和依赖于组氨酸的半胱氨酸酰胺水解酶结构域(CHAP₃₀₉₋₄₆₅), 另外一个则是帮助连接的螺旋对接结构域(Helical Docking Domain 266-288)。

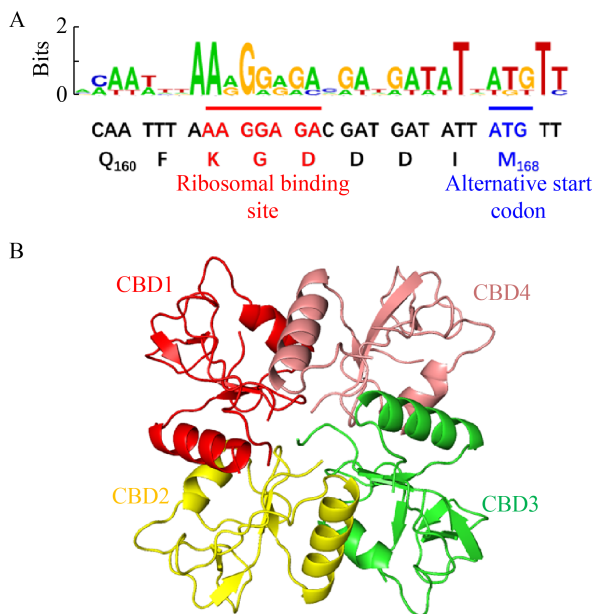


图5 LysIME-EF1的内部翻译替代起始位点的鉴定和裂解酶 Lys170 CBD 的整体结构^[29-30]

Figure 5 Identification of the internal translation substitution start site of LysIME-EF1 and the overall structure of Lys170 CBD^[29-30]

注: A: 内部核糖体结合位点序列用红色下划线标注, 起始密码子用蓝色下划线标注; B: CBD1 代表全长的 Lys170 CBD 的结构(红色部分), 其他颜色为额外的 CBD 结构, 4 个 CBD 形成四聚体环

Note: The internal ribosomal binding site sequence is underlined in red. The start codon is underlined in blue. B: CBD1 represents the full length Lys170 CBD structure (red) and the other colors are additional CBD structures. The four CBDs form a tetramer ring

PlyCB 则是由 8 个重复的 CBD 组成环状八聚体结构(图 6B), 8 个 CBD 增强了 PlyC 结合细胞壁的能力, 2 个催化结构域增强了其催化能力, 二者的分工合作奠定了裂解酶 PlyC 高效裂解活性的结构基础^[34]。

2.2 噬菌体裂解酶在其他方面的应用

裂解酶凭借着对病原菌的高效裂解性以及宿主专一性, 使其在增强食品安全性中也有着巨大的潜力^[35-37]。研究表明李氏杆菌噬菌体裂解酶 HPL118、HPL500 和 HPLP35 在蔬菜、牛奶及其他奶制品中表现出高效的抑菌活性, 而且这 3 种裂解酶对高温不敏感, 能够在较高的温度下发挥

裂解活性, 利用这种特性可以将它们制作成食品添加剂提高食品安全性^[38]。

裂解酶的 CBD 能够特异地结合细菌细胞壁。Kretzer 等^[39-40]用裂解酶的 CBD 来取代抗体, 通过包覆有重组李斯特氏菌噬菌体裂解酶衍生的 CBD 分子的顺磁珠, 在 40 min 内可以固定并回收超过 90% 的李斯特菌(*Listeria*), 而且不受其他微生物存在的影响; 相对传统的检测回收方法, 其能缩短一半的时间, 并且更为灵敏、通用性更高。目前, 在此方法的基础上, Yi 等^[41]开发了一种基于裂解酶 CBD 的磁性分离和荧光检测技术, 用于对真实样品中的金黄色葡萄球菌进行特异性检测和灵敏定量分析, 并且通过功能化的磁珠, 可将金黄色葡萄球菌样品基质分离处理; 检测范围从 1.0×10^2 CFU/mL 到 1.0×10^7 CFU/mL 不等, 最低至 78 CFU/mL, 整个检测过程在不到 50 min 的时间内完成; 除了普通表皮的葡萄球菌外, 其他与普通食源性和医院感染性细菌对金黄色葡萄球菌的检测影响均可忽略不计; 此外, 该方法在实际应用中的潜力已经通过无菌牛奶和人体血清的检测得以证明。

在农业上, 裂解酶可以通过转基因等技术手段在植物细胞进行表达, 从而防控植物病原细菌的感染, 提高作物产量^[42-43]。在动物养殖业, 可以使用噬菌体相关的裂解酶来预防和治疗细菌性疾病, 从而大大降低动物感染病原菌的风险^[44-45]。

3 噬菌体裂解酶的改造与发展

裂解酶作为一种潜在的抗菌药物, 在治疗细菌感染性疾病中具有巨大的应用前景, 但裂解酶在临床上的大规模应用还存在一定的局限性, 如裂解范围在不同的菌属之间较窄、在体内裂解活性相对较低、给药方式困难、在体内半衰期较短容易失效或被清除等^[46]。目前, 研究人员也在积极探索各种方法切实有效地解决这些问题。如将不同来源的噬菌体裂解酶进行融合重组, 产生嵌合体裂解酶。嵌合体裂解酶不仅裂解范围更广,

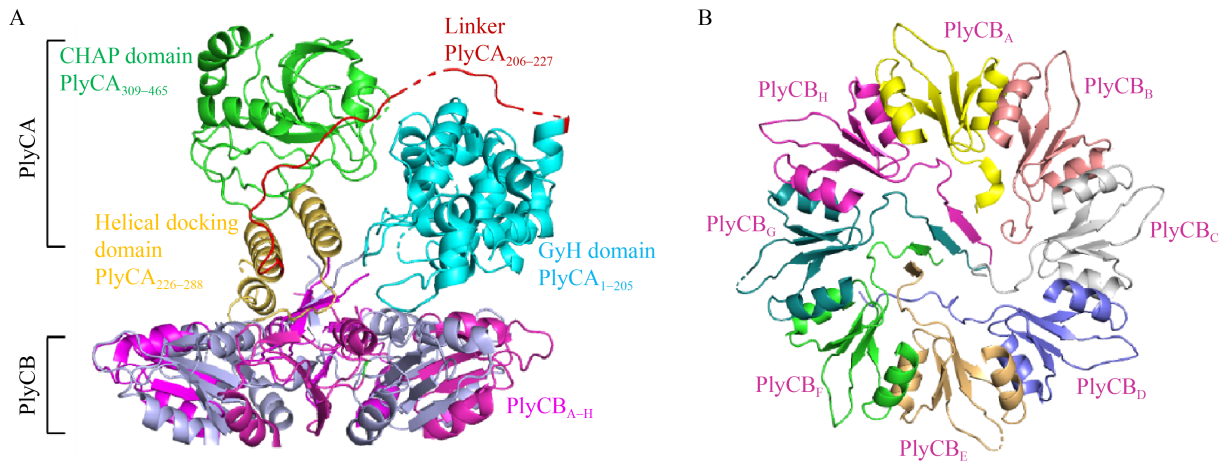


图6 裂解酶 PlyC 的整体结构

Figure 6 The overall structure of the lysin PlyC

注：A：裂解酶 PlyC 整体结构由 PlyCA 和 PlyCB 这 2 个部分以及中间的 Linker 组成，其中 PlyCA 包含 CHAP 和 GyH 这 2 个催化活性域，主要发挥 PlyC 的裂解活性；B：PlyCB 是由 8 个重复单元组成的环状结构，主要发挥结合活性

Note: A: The overall structure of the lysin PlyC is composed of two parts, PlyCA and PlyCB, and a linker in the middle. PlyCA contains two catalytically active domains, CHAP and GyH, which mainly exert the cleavage activity of PlyC. B: PlyCB is composed of eight repeated units and the composed ring structure mainly exerts binding activity

而且裂解活性更强、稳定性更高^[47-48]。Xu 等^[49]报道了一种独特的嵌合体裂解酶 ClyR，由 PlyCAC 的 CD 和 PlySs2 的 CBD 组成。该裂解酶对大多数链球菌具有高效裂解活性，同时 ClyR 对引起龋齿和牛乳腺炎的病原体也具有高效裂解活性，类似的嵌合酶还有 PL3、Csl2、PlySK1249、P128 等^[50-52]。

除嵌合酶外，抗生素和裂解酶联用也是提高抗菌活性、降低细菌耐药性的有效方法之一^[53-54]。Schuch 等^[55-56]将裂解酶 CF-301 与万古霉素或达托霉素联用后，对因葡萄球菌(*Staphylococcus*)感染引起的菌血症具有良好的治疗效果，并且在 26 项独立的菌血症研究中证实了 CF-301 与抗生素联合使用的优越性。2018 年，Letrado 等^[13]测试了 Cpl-711 和不同抗生素(阿莫西林、头孢噻肟、左氧氟沙星和万古霉素)的联合使用对几种耐多药肺炎链球菌的杀菌效果。通过小鼠和斑马鱼感染模型证实 Cpl-711 联合阿莫西林或头孢噻肟对血清型 23F 多耐药肺炎链球菌临床分离株具有协同杀菌作用，裂解酶 SA.100、LysGH15、SAL200 在与抗生素联用后也表现出协同效应^[23,57-58]。

裂解酶作为一类小分子蛋白质药物，通常需要注射到血液中发挥抗菌作用，但这种给药方式效率低下并可能引起机体的免疫反应，导致治疗失败，这是限制裂解酶药物发展的重要原因之一^[59]。2020 年，Wang 等^[60]将裂解酶 Cpl-1 和 ClyJ-3 制成可吸入的气雾剂，重点研究了其抗菌活性、蛋白质结构变化和气溶胶性能；结果表明，雾化后 ClyJ-3 的生物活性几乎完全丧失，而 Cpl-1 在使用不同的雾化方式后，其杀菌活性有所降低，但对肺炎链球菌仍然具有裂解作用；该研究结果表明雾化裂解酶进行吸入输送是可行的，但其治疗效果同时取决于蛋白质和雾化器的选择。

裂解酶性质不稳定、体内半衰期短、容易被清除等因素也是限制其发展的一个重要原因。最新的研究表明纳米颗粒可以通过保护蛋白质免于降解，并且能够增加裂解酶稳定性和保质期，从而提高治疗效果^[61]。2020 年，Kaur 等^[62]研究表明将藻酸盐-壳聚糖纳米颗粒(Alg-Chi NPs)用作裂解酶 LysMR-5 的药物递送系统是可行的；在该研究

中, 载有裂解酶 LysMR-5 的纳米颗粒是由钙离子诱导的藻酸盐核心与壳聚糖的络合制备而成, 抗菌实验和 SDS-PAGE 电泳结果均显示 LysMR-5 纳米颗粒的结构完整, 以及制备前后生物活性均没有发生改变; 同时观察到空白的 Alg-Chi NPs 对金黄色葡萄球菌也具有直接的抗菌作用, 而 LysMR-5 加载后, 纳米颗粒的杀菌活性更高、持续时间更久; 细胞和血液相容性研究表明 LysMR-5 纳米颗粒在体内有很好的生物组织相容性, 这使得其引起机体免疫反应的风险大大降低; 总体而言, 该研究证明了 Alg-Chi NPs 作为裂解酶 LysMR-5 和其他治疗性蛋白质在各种生物医学应用中的纳米递送载体的潜力, 这种方法不仅降低裂解酶引起机体免疫应答的风险, 同时提高了给药效率, 即使很小剂量的药物, 通过纳米靶向传送也可以发挥很好的治疗效果。

4 展望

近年来, 由于多重耐药菌的频繁出现及新型抗生素的开发进度缓慢, 噬菌体裂解酶成为下一代抗菌药物的潜力巨大^[63-65]。从目前的研究来看, 裂解酶呈现出具有几种典型特征的新型抗菌剂: (1) 无论在体内或体外都对革兰氏阳性菌具有很好的抗菌效果; (2) 对细菌的裂解活性高, 不用考虑其抗生素耐药性问题; (3) 裂解谱较广, 相对于亲本噬菌体裂解范围有所增加; (4) 细菌对其产生的耐药性的可能性低; (5) 安全性较高, 不会引起较强的免疫抗原性; (6) 容易通过基因工程对其进行改造。

尽管噬菌体裂解酶在某些领域上的应用取得了较大的进步, 但在临床中的大规模应用还面临着许多问题, 其主要表现在以下几个方面: (1) 裂解酶在体外表达时有些会对表达菌株具有毒性, 并且分子量较大、疏水性强, 导致蛋白表达时往往以包涵体的形式存在; (2) 对革兰氏阴性菌不敏感, 难以自外而内地裂解细胞壁; (3) 裂解酶作为外源蛋白质, 进入机体后易受到蛋白酶的降

解, 而具有较短的半衰期; (4) 裂解酶在治疗过程中的最佳时间和最适剂量难以控制; (5) 裂解酶的长期保存方法、安全的给药方式, 以及如何评价裂解酶治疗的效果都不够明确。

面对这些困境, 利用分子生物学领域的相关技术方法, 从基因水平改造噬菌体裂解酶, 提高裂解活性及稳定性、扩大其宿主谱, 使其能够特异性裂解某一种属的细菌, 甚至不同种属的细菌, 是今后裂解酶研究的趋势之一^[66], 同时更换表达菌株使裂解酶能够在真核生物和细胞水平上表达, 从而解决裂解酶对表达菌株具有毒性问题, 提高其稳定性也是今后的研究方向之一。其次, 筛选和培育能在体内长期循环的噬菌体也是今后的趋势之一, 通过连续传代的方法来筛选能在体内长期循环的噬菌体, 从而表达其对应的裂解酶, 这可有效地延缓机体免疫系统对裂解酶的清除, 延长裂解酶在体内存留时间。除此之外, (1) 性质更优裂解酶的筛选与鉴定; (2) 裂解酶在体内的分子动力学以及裂解机制的深入研究; (3) 裂解酶规模化生产工艺的探索; (4) 裂解酶的成药性研究; (5) 推动国家相关部门对裂解酶作为新药申报标准的制定与颁布, 这 5 个方面都是我们下一步需要开展的工作。

REFERENCES

- [1] Loessner MJ. Bacteriophage endolysins: current state of research and applications[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(4): 480-487
- [2] Gutiérrez D, Fernández L, Rodríguez A, García P. Are phage lytic proteins the secret weapon to kill *Staphylococcus aureus*?[J]. *mBio*, 2018, 9(1): e01923-e01917
- [3] Roach DR, Donovan DM. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications[J]. *Bacteriophage*, 2015, 5(3): e1062590
- [4] Broendum SS, Buckle AM, McGowan S. Catalytic diversity and cell wall binding repeats in the phage-encoded endolysins[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 110(6): 879-896
- [5] Reuter M, Kruger DH. Approaches to optimize therapeutic bacteriophage and bacteriophage-derived products to combat bacterial infections[J]. *Virus Genes*, 2020, 56(2): 136-149
- [6] Hong S, Son B, Ryu S, Ha NC. Crystal structure of LysB4,

- an endolysin from *Bacillus cereus*-targeting bacteriophage B4[J]. *Molecules and Cells*, 2019, 42(1): 79-86
- [7] Briers Y, Schmelcher M, Loessner MJ, Hendrix J, Engelborghs Y, Volckaert G, Lavigne R. The high-affinity peptidoglycan binding domain of *Pseudomonas* phage endolysin KZ144[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 383(2): 187-191
- [8] Larpin Y, Oechslin F, Moreillon P, Resch G, Entenza JM, Mancini S. *In vitro* characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192507
- [9] Briers Y, Volckaert G, Cornelissen A, Lagaert S, Michiels CW, Hertveldt K, Lavigne R. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages ϕ KZ and EL[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(5): 1334-1344
- [10] Schmelcher M, Shabarova T, Eugster MR, Eichenseher F, Tchang VS, Banz M, Loessner MJ. Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(17): 5745-5756
- [11] Jacob F, Fuerst CR. The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria[J]. *Journal of General Microbiology*, 1958, 18(2): 518-526
- [12] Freimer EH, Krause RM, McCarty M. Studies of L forms and protoplasts of group A streptococci. I. isolation, growth, and bacteriologic characteristics[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1959, 110(6): 853-874
- [13] Letrado P, Corsini B, Díez-Martínez R, Bustamante N, Yuste JE, García P. Bactericidal synergism between antibiotics and phage endolysin Cpl-711 to kill multidrug-resistant pneumococcus[J]. *Future Microbiology*, 2018, 13: 1215-1223
- [14] Grandgirard D, Loeffler JM, Fischetti VA, Leib SL. Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2008, 197(11): 1519-1522
- [15] Hermoso JA, Monterroso B, Albert A, Galán B, Ahrazem O, García P, Martínez-Ripoll M, García JL, Menéndez M. Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1[J]. *Structure*, 2003, 11(10): 1239-1249
- [16] Doehn JM, Fischer K, Reppe K, Gutbier B, Tschernig T, Hocke AC, Fischetti VA, Löffler J, Suttorp N, Hippenstiel S, et al. Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(9): 2111-2117
- [17] Monterroso B, Albert A, Martínez-Ripoll M, García P, García JL, Menéndez M, Hermoso JA. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the complete modular endolysin from Cp-1, a phage infecting *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2002, 58(Pt9): 1487-1489
- [18] Cheng Q, Fischetti VA. Mutagenesis of a bacteriophage lytic enzyme PlyGBS significantly increases its antibacterial activity against group B streptococci[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(6): 1284-1291
- [19] Patras KA, Wescombe PA, Rösler B, Hale JD, Tagg JR, Doran KS. *Streptococcus salivarius* K12 limits group B *Streptococcus* vaginal colonization[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(9): 3438-3444
- [20] Lood R, Raz A, Molina H, Euler CW, Fischetti VA. A highly active and negatively charged *Streptococcus pyogenes* lysin with a rare D-alanyl-L-alanine endopeptidase activity protects mice against streptococcal bacteremia[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(6): 3073-3084
- [21] Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, Yagyu KI, Muraoka A, Sugai M, Hiramatsu K, et al. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage ϕ MR11[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2007, 196(8): 1237-1247
- [22] Gu JM, Feng YG, Feng X, Sun CJ, Lei LC, Ding W, Niu FF, Jiao LY, Yang M, Li Y, et al. Structural and biochemical characterization reveals LysGH15 as an unprecedented "EF-hand-like" calcium-binding phage lysin[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(5): e1004109
- [23] Xia FF, Li X, Wang B, Gong PJ, Xiao F, Yang M, Zhang L, Song J, Hu LY, Cheng MJ, et al. Combination therapy of LysGH15 and apigenin as a new strategy for treating pneumonia caused by *Staphylococcus aureus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(1): 87-94
- [24] Zhang L, Li D, Li XW, Hu LY, Cheng MJ, Xia FF, Gong PJ, Wang B, Ge JL, Zhang H, et al. LysGH15 kills *Staphylococcus aureus* without being affected by the humoral immune response or inducing inflammation[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29344
- [25] Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment[J]. *Journal of Endodontics*, 2016, 42(7): 1022-1028
- [26] Daniel DS, Lee SM, Gan HM, Dykes GA, Rahman S. Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2017, 10(5): 617-623
- [27] Zhang WH, Mi ZQ, Yin XY, Fan H, An XP, Zhang ZY, Chen JK, Tong YG. Characterization of *Enterococcus faecalis* phage IME-EF₁ and its endolysin[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80435
- [28] Zhou B, Zhen XK, Zhou H, Zhao FY, Fan CP, Perčulija V, Tong YG, Mi ZQ, Ouyang SY. Structural and functional insights into a novel two-component endolysin encoded by a single gene in *Enterococcus faecalis* phage[J]. *PLoS*

- Pathogens, 2020, 16(3): e1008394
- [29] Proença D, Velours C, Leandro C, Garcia M, Pimentel M, São-José C. A two-component, multimeric endolysin encoded by a single gene[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 95(5): 739-753
- [30] Xu XL, Zhang DD, Zhou B, Zhen XK, Ouyang SY. Structural and biochemical analyses of the tetrameric cell binding domain of Lys170 from enterococcal phage F170/08[J]. *European Biophysics Journal*, 2021, 50(5): 721-729
- [31] Shen Y, Köller T, Kreikemeyer B, Nelson DC. Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(8): 1818-1824
- [32] Hoopes JT, Stark CJ, Kim HA, Sussman DJ, Donovan DM, Nelson DC. Use of a bacteriophage lysin, PlyC, as an enzyme disinfectant against *Streptococcus equi*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(5): 1388-1394
- [33] Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(7): 4107-4112
- [34] McGowan S, Buckle AM, Mitchell MS, Hoopes JT, Gallagher DT, Heselpoth RD, Shen Y, Reboul CF, Law RHP, Fischetti VA, et al. X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(31): 12752-12757
- [35] Bai J, Kim YT, Ryu S, Lee JH. Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 474
- [36] Cho JH, Kwon JG, O'Sullivan DJ, Ryu S, Lee JH. Development of an endolysin enzyme and its cell wall-binding domain protein and their applications for biocontrol and rapid detection of *Clostridium perfringens* in food[J]. *Food Chemistry*, 2021, 345: 128562
- [37] Jamal M, Bukhari SMAUS, Andleeb S, Ali M, Raza S, Nawaz MA, Hussain T, Rahman SU, Shah SSA. Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2019, 59(2): 123-133
- [38] Schmelcher M, Waldherr F, Loessner MJ. *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(2): 633-643
- [39] Kretzer J, Schmelcher M, Loessner M. Ultrasensitive and fast diagnostics of viable *Listeria* cells by CBD magnetic separation combined with A511: detection[J]. *Viruses*, 2018, 10(11): 626
- [40] Kretzer JW, Lehmann R, Schmelcher M, Banz M, Kim KP, Korn C, Loessner MJ. Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(6): 1992-2000
- [41] Yi ZJ, Wang SH, Meng XY, Wu AQ, Li Q, Song YJ, Zhao RL, Qiao JJ. Lysin cell-binding domain-functionalized magnetic beads for detection of *Staphylococcus aureus* via inhibition of fluorescence of Amplex Red/hydrogen peroxide assay by intracellular catalase[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(27): 7177-7185
- [42] Marin Viegas VS, Ocampo CG, Petrucci S. Vacuolar deposition of recombinant proteins in plant vegetative organs as a strategy to increase yields[J]. *Bioengineered*, 2017, 8(3): 203-211
- [43] Islam MR, Son N, Lee J, Lee DW, Sohn EJ, Hwang I. Production of bacteriophage-encoded endolysin, LysP11, in *Nicotiana benthamiana* and its activity as a potent antimicrobial agent against *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. *Plant Cell Reports*, 2019, 38(12): 1485-1499
- [44] Matamp N, Bhat S. Phage endolysins as potential antimicrobials against multidrug resistant *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: current status of research and challenges ahead[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(3): 84
- [45] Srinivasan R, Chaitanyakumar A, Subramanian P, Mageswari A, Gomathi A, Aswini V, Sankar AM, Ramya M, Gothandam KM. Recombinant engineered phage-derived enzymatic in *Pichia pastoris* X-33 as whole cell biocatalyst for effective biocontrol of *Vibrio parahaemolyticus* in aquaculture[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 1576-1585
- [46] Villa TG, Sieiro C. Phage therapy, lysin therapy, and antibiotics: a trio due to come[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(9): 604
- [47] Oechslin F, Daraspe J, Giddey M, Moreillon P, Resch G. *In vitro* characterization of PlySK1249, a novel phage lysin, and assessment of its antibacterial activity in a mouse model of *Streptococcus agalactiae* bacteremia[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(12): 6276-6283
- [48] Huang L, Luo DH, Gondil VS, Gong YJ, Jia MH, Yan DZ, He J, Hu SC, Yang H, Wei HP. Construction and characterization of a chimeric lysin ClyV with improved bactericidal activity against *Streptococcus agalactiae* *in vitro* and *in vivo*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(4): 1609-1619
- [49] Xu JJ, Yang H, Bi YL, Li WY, Wei HP, Li YH. Activity of the chimeric lysin ClyR against common Gram-positive oral microbes and its anticaries efficacy in rat models[J]. *Viruses*, 2018, 10(7): 380
- [50] Blázquez B, Fresco-Taboada A, Iglesias-Bexiga M, Menéndez M, García P. PL3 amidase, a tailor-made lysin constructed by domain shuffling with potent killing activity against pneumococci and related species[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1156
- [51] Vázquez R, Domenech M, Iglesias-Bexiga M, Menéndez M,

- García P. Csl2, a novel chimeric bacteriophage lysin to fight infections caused by *Streptococcus suis*, an emerging zoonotic pathogen[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 16506
- [52] Channabasappa S, Chikkamadaiah R, Durgaiyah M, Kumar S, Ramesh K, Sreekantham A, Sriram B. Efficacy of chimeric ectolysin P128 in drug-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in mice[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2018, 73(12): 3398-3404
- [53] Septama AW, Panichayupakaranant P. Synergistic effect of artocarpin on antibacterial activity of some antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*[J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(4): 686-691
- [54] Rao H, Lai PX, Gao Y. Chemical composition, antibacterial activity, and synergistic effects with conventional antibiotics and nitric oxide production inhibitory activity of essential oil from *Geophila repens* (L.) I.M. Johnston[J]. Molecules, 2017, 22(9): 1561
- [55] Schuch R, Lee HM, Schneider BC, Sauve KL, Law C, Khan BK, Rotolo JA, Horiuchi Y, Couto DE, Raz A, et al. Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2014, 209(9): 1469-1478
- [56] Indiani C, Sauve K, Raz A, Abdelhady W, Xiong YQ, Cassino C, Bayer AS, Schuch R. The antistaphylococcal lysin, CF-301, activates key host factors in human blood to potentiate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriolysis[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2019, 63(4): e02291-18
- [57] Totté JEE, Van Doorn MB, Pasmans SGMA. Successful treatment of chronic *Staphylococcus aureus*-related dermatoses with the topical endolysin staphfect SA.100: a report of 3 cases[J]. Case Reports in Dermatology, 2017, 9(2): 19-25
- [58] Kim NH, Park WB, Cho JE, Choi YJ, Choi SJ, Jun SY, Kang CK, Song KH, Choe PG, Bang JH, et al. Effects of phage endolysin SAL200 combined with antibiotics on *Staphylococcus aureus* infection[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018, 62(10): e00731-18
- [59] Gondil VS, Harjai K, Chhibber S. Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2020, 55(2): 105844
- [60] Wang YC, Khanal D, Chang RYK, Shang XR, Yang H, Britton WJ, Nelson D, Chan HK. Can bacteriophage endolysins be nebulised for inhalation delivery against *Streptococcus pneumoniae*?[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2020, 591: 119982
- [61] Gondil VS, Dube T, Panda JJ, Yennamalli RM, Harjai K, Chhibber S. Comprehensive evaluation of chitosan nanoparticle based phage lysin delivery system; a novel approach to counter *S. pneumoniae* infections[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2020, 573: 118850
- [62] Kaur J, Kour A, Panda JJ, Harjai K, Chhibber S. Exploring endolysin-loaded alginate-chitosan nanoparticles as future remedy for staphylococcal infections[J]. AAPS PharmSciTech, 2020, 21(6): 233
- [63] Sanz-Gaitero M, Van Raaij MJ. Crystallographic structure determination of bacteriophage endolysins[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2021, 40: 165-188
- [64] Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2014, 8(2): 129-136
- [65] Nadeem SF, Gohar UF, Tahir SF, Mukhtar H, Pornpukdeewattana S, Nukthamna P, Moula Ali AM, Bavisetty SCB, Massa S. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2020, 46(5): 578-599
- [66] Yang H, Yu JP, Wei HP. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 542