

噬菌体治疗的前世、今生与未来 ——对话微生物学界噬菌体专家

近期,网上一则报道使噬菌体治疗这一人类对抗细菌的古老“武器”引起了全球关注.美国加州大学Tom Patterson教授被“超级细菌”鲍曼不动杆菌感染,他的妻子Steffanie Strathdee,加州大学圣迭戈全球健康研究所所长兼传染病流行病专家,在学术和人脉资源都集聚的优势条件下遍寻治疗方法,试遍所有有用的抗生素无效,绝望中她想到了用细菌的“天敌”噬菌体来治疗,最终使用美国军方研制的噬菌体挽救了Patterson教授的生命.该病例一时引起轰动.

噬菌体,是一个在中学教科书就出现过的名词.它是病毒中的一个特殊的群体,字面意思是“吃细菌的病毒”,它对细菌的感染可导致细菌的裂解死亡.噬菌体是细菌的天敌,这种利用噬菌体来治疗细菌感染的方法被称为“噬菌体治疗”(phage-therapy或者phagotherapy).噬菌体治疗到底是怎么发现和发展的?其研究现状如何?它对人类健康做出了怎样的贡献,为何近期再被关注?将来的应用前景如何?就这些大众关心的问题,本刊专访了中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会相关专家(以下简称专家),请他们谈谈噬菌体治疗的前世、今生,并畅想未来.

《科学通报》:噬菌体是如何发现的?噬菌体治疗在国内外的的发展情况如何?

专家:噬菌体的发现是一个十分有趣和充满曲折的过程,有两位科学家参与了噬菌体的发现,他们是Federick William Twort和Félix d'Hérelle.第一次世界大战前,英国人Federick William Twort博士观察到一些物质可以将葡萄球菌杀死,推测其可能是病毒或者其他生物.1915年Twort博士发表了他的研究结果,但在当时并没有引起关注,他也没有继续该项研究.1917年法国科学家Félix d'Hérelle也观察到了能够杀死细菌的物质在细菌培养基上形成的“透明斑”,认为其中存在一种生命体并将其命名为“bacteriophage”.随后d'Hérelle进行了大量的研究,同时利用噬菌体治疗人体细菌感染并取得了很大的成功,多次获得诺贝尔奖提名(最终未获奖).由于当时抗生素尚未普及且品种很少,噬菌体作为抗菌治疗药物被普遍使用,世界上一些主要药厂(如Eli Lilly)也生产和销售噬菌体制剂.但是20世纪40年代以后,由于抗生素在西方国家逐渐普及,噬菌体治疗日渐淡出.冷战时期,苏联和东欧一些国家一直在大规模使用噬菌体治疗,苏联曾经有5个研究所从事噬菌体制剂生产,这些噬菌体制剂主要用于痢疾、伤寒、霍乱等细菌感染的

治疗.时至今日,格鲁吉亚仍在大规模生产噬菌体作为临床常规治疗用药,位于其首都第比利斯的Eliava研究所是当今世界上从事噬菌体治疗的最大机构,那里具有世界上最全的噬菌体库和最经验的噬菌体治疗专家.该研究所成立80多年来用噬菌体治疗的病人不计其数,目前全球治疗用噬菌体制剂大多来源于该研究所,每年都有不少被耐药细菌感染的病人从世界各地(包括中国)到该研究所接受噬菌体治疗.

在苏联的影响下,新中国成立后我国也开始了噬菌体治疗的研究和实践.原大连生物制品研究所最早开展噬菌体研究和生产应用,武汉生物制品研究所在1958年前后也进行了一段时间的试生产.据原大连生物制品研究所陈廷祚先生记载,由于当时抗生素和抗菌药物都在西方国家对社会主义国家的禁运之列,大连生物制品所自1949年起在苏联专家的帮助下开始研制和生产痢疾噬菌体,主要针对志贺痢疾杆菌和福氏痢疾杆菌,这些噬菌体制剂在全国各地被广泛使用,尤其是在抗美援朝战争和国内大型水利工程建设中发挥了积极的作用.噬菌体的生产和使用随着大连生物制品研究所并入成都生物制品研究所(1957年)而逐渐萎缩直至停止,主要原因一是当时噬菌体生产要求发酵体积很大,容易污染且工作人员劳动强度巨大;二是20世纪50年代后期抗生素和抗菌药物的生产供应条件逐渐得到改善,基本能满足医疗需求.

根据当时的研究记录,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(志贺氏、舒氏、福氏及宋内氏)治疗23例痢疾病人,治愈17例(占73.91%),好转5例(占21.75%),总有效率达95.66%,无效1例(4.34%).解放军第175医院的一项研究发现,对22例痢疾患者分为两组分别用多价噬菌体治疗和黄连素治疗,发现两组之间的治愈率没有显著差别,而噬菌体治疗组的复发率较黄连素组低.

除此之外,我国科研人员也对噬菌体制备方法、联合抗菌素的抗菌效果等进行了系列研究.一个典型的噬菌体治疗案例是用噬菌体治疗烧伤劳模邱财康的细菌感染.1958年5月26日深夜,一辆救护车驶进了广慈医院(今上海瑞金医院),送来的是被1300℃钢水烫伤的上钢三厂司炉长、共产党员邱财康.邱财康全身89.3%面积的皮肤被灼伤,深度灼伤面积达23%,生命危在旦夕.上海第二医学院(上海交通大学医学院前身)和广慈医院迅速组织抢救小组,严重烧伤后的病人要经历三个生死关:休克关、感染

关、植皮关。在医护人员全力抢救使邱财康顺利渡过了休克关后,另一个挑战紧随而来,邱财康出现了绿脓杆菌感染及其所致败血症,病情急剧恶化,药物难以控制。医院请来医学院微生物教研室主任、细菌学专家余瀛教授会诊。余瀛教授提出大胆的设想——用噬菌体杀死绿脓杆菌。余瀛教授把医学院学生组织起来,从郊区野外污水中采样。然后,把采集的大量样品集中到医学院实验室,几天工夫噬菌体液制成。医护人员用噬菌体来清洗病人伤口,渐渐地病人的感染逐步得到控制,病人最终痊愈出院。这个故事后来成为微生物学界的一段佳话,也是以劳模邱财康为蓝本的电影《春满人间》中的情节。

然而,由于当时对于噬菌体严格的宿主嗜性了解不足,很多噬菌体治疗在实践中疗效并不理想。同时,随着抗生素的普及,由于抗生素对多种细菌都有杀灭作用,且疗效稳定可靠,抗感染治疗逐渐转向使用抗生素,噬菌体治疗随即淡出人们的视线。国际上也只有极少数国家(如格鲁吉亚)至今还在常规使用噬菌体用于临床细菌感染的治疗。

《科学通报》:“超级细菌”的不断出现使噬菌体治疗再次受到关注。随着科学技术发展,噬菌体治疗又有了哪些进步?在当前的应用和发展情况是怎样的?

专家:随着抗生素的广泛应用(有时甚至被滥用),耐药细菌菌株(包括多耐药菌株)大量出现与流行,抗生素治疗效果受到严峻的挑战。近年来出现一些“超级细菌”,它们几乎对所有的抗生素都不敏感,导致人类对此类细菌的感染几乎无药可用,非常迫切需要新的抗感染武器来替代抗生素。在此背景下,人类再次把目光投向了噬菌体治疗。科学界对噬菌体治疗的研究进入了一个新的阶段。各个国家的科学家开始寻找各种病原菌的噬菌体,大量的噬菌体被发现。随着测序技术的不断更新换代,噬菌体更容易被识别,新的噬菌体基因组序列不断增加,新的噬菌体家族不断壮大。

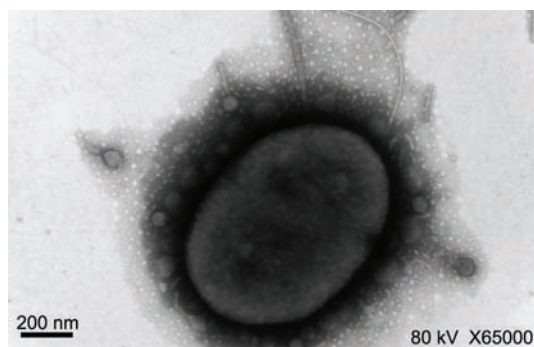
目前,关于噬菌体的基础和应用研究范围很广,涉及各种类型的体外感染控制模型和多种感染性疾病。不仅针

对人类疾病的预防与治疗,而且涉及到食品及饲料中病原细菌的清除、细菌生物膜的防控。总体研究结果显示,只要所使用的噬菌体对于感染菌株是敏感的,其治疗的效果一般都是肯定的。近年来噬菌体治疗研究开始得到各个国家政策的支持和鼓励,一系列产品已经进入各国市场。

2006年,美国食品药品监督管理局批准了一个用于控制食品中李斯特菌的噬菌体鸡尾酒复配剂P100。2007年,比利时布鲁塞尔医学伦理委员会批准了由绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌引起的烧伤后感染的噬菌体治疗。2014年3月,美国国立卫生研究院的过敏和感染疾病研究所将噬菌体疗法作为对付抗生素耐药的手段之一。同年,欧盟斥资520万美元开展用噬菌体治疗人类细菌感染的跨国临床研究计划(Phagoburn计划)。同年9月,法国、比利时和荷兰的科学家也招募感染大肠杆菌和绿脓杆菌的烧伤患者,对这些患者使用法国毕达哥拉斯医药公司提供的噬菌体进行治疗。2013年全球第一个噬菌体裂解酶产品Gladskin上市,用于辅助治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)引发的炎症性皮肤病。目前还有多个噬菌体裂解酶已经进入临床研究阶段。在畜禽养殖方面,美国Intralix公司研发的针对产气荚膜梭菌的噬菌体制剂INT-401已被FDA授权用于消除活禽养殖中细菌感染。在种植业方面,2005年,第一种噬菌体产品AgriPhage-CMM在美国环境保护局注册,用于控制由野油菜黄单胞菌和丁香假单胞菌引起的番茄和辣椒的斑点溃烂病。2011年,EPA批准OmniLytic公司的生物农药AgriPhage CMM,用于番茄作物的溃疡病防治;在畜禽产品加工方面,2013年由美国Intralix公司研发的针对沙门氏菌的噬菌体制剂SalmoFresh™被美国食品药品监督管理局(FDA)认定为公认安全级产品(Generally Regarded As Safe, GRAS),并获批准上市。国内也有多家企业与研究机构正在研发噬菌体相关技术与产品,如大连理工大学、江苏省农业科学院、菲吉乐科、上海高科、大连汉信等等,其中位于南京的菲吉乐科公司的噬菌体产品“乐虾”已经成功上市,主要用于鱼虾养殖过程中副溶血弧菌的控制。

《科学通报》:噬菌体被发现已超过100年,然而噬菌体治疗并未能在临床上得到广泛应用,主要原因和发展瓶颈是什么?

专家:归纳起来,主要有以下一些原因:(1) 抗生素的出现。由于抗生素杀灭细菌的广谱性和有效性,使得抗生素用于治疗感染性疾病被临床医学界迅速接受,并广泛应用。在这样的背景下,噬菌体治疗不再受到人们青睐。(2) 噬菌体治疗本身存在的局限性。这种局限性体现在四个方面:一是噬菌体对宿主菌的识别与感染具有高度特异性,换句话说其抗菌谱太窄。这种识别特异性达到细菌“株”的水平。二是噬菌体通常具有数个乃至数十个大分子结构蛋白,如果反复在同一个体使用,有可能引发过敏反



电子显微镜下观察噬菌体裂解细菌过程(胡福泉教授供图)。中央为细菌,四周的噬菌体围绕细菌表面吸附,它们可穿入细胞,复制,裂解细菌

应。三是反复使用噬菌体治疗后,由于机体会建立对噬菌体的获得性免疫应答,再次使用时,可能会面临机体的迅速清除,从而大大减低噬菌体治疗的效果。四是噬菌体治疗如果在临床广泛应用后,必然像抗生素那样,细菌会对噬菌体产生耐受性,变得不再敏感。

《科学通报》:如何提高噬菌体治疗的应用性?其发展前景如何?

专家:噬菌体治疗的一个重要局限性就是其宿主谱太窄,一个噬菌体往往只能杀死同一种细菌的某些菌株,而不能将同一个种的细菌都杀死,更不用说杀多种细菌。为了解决这个问题,人们采用分离多种噬菌体组合在一起,形成“鸡尾酒”(cocktail)制剂以拓宽制剂的杀菌谱。“鸡尾酒”制剂内包含的噬菌体种类数量越多,其宿主谱覆盖度就越大。

分子生物学技术的高度发展给扩展噬菌体杀菌谱提供了可能的手段。采用适当的基因改造策略在一定程度上扩大噬菌体杀菌谱还是可能的,自然界中存在宽谱噬菌体和窄谱噬菌体也证明这种可能性的存在。第三军医大学胡福泉教授实验室曾做过这样的探索,把一个噬菌体的受体结合蛋白(receptor binding protein, RBP)替换为另一噬菌体的RBP从而改变其宿主特异性。国际上也有人通过串联两种噬菌体的RBP,使其宿主谱由1个拓展到了2个,但是由于噬菌体基因组大小的限制,这种拓展度显然还是太有限。

噬菌体作为病毒,它们在快速复制过程中往往会伴随着突变的产生,这些突变形成了自然界中噬菌体天文数字般的多样性。尤其是RNA噬菌体,由于其复制酶缺乏碱基错配校正功能,其变异性更高,其碱基突变率可高达 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 。噬菌体作为一个群体,实际上包含了无数个不同的突变个体,突变碱基量尚未跨越种的界限时,这样的突变群体称为“准种”,因此噬菌体群体实际上是个“噬菌体准种库”,如果这个库足够大,理论上有可能从中迅速筛选出杀灭特定病原体的噬菌体。利用这种思路可能开发出新型的广谱噬菌体杀菌剂。

对噬菌体的充分了解是开展噬菌体治疗的基础,现代生物学研究技术为我们认识了解噬菌体提供了大量的强有力工具。近年来高速发展的组学技术将使我们认识噬菌体的速度大大加快。由于噬菌体的基因大多数是未知的,新一代全基因组高通量测序技术和蛋白质组学技术将为我们深入研究噬菌体基因的功能、识别噬菌体携带的毒力基因和耐药基因、防止噬菌体介导的毒力基因和耐药基因的水平转移等提供强大支撑。基于同源重组和CRISPR基因编辑的技术则会大大加强对噬菌体进行人工改造的能力。定量PCR技术可以替代传统的双层琼脂平皿噬斑技术为我们建立快速灵敏的噬菌体检测鉴定方法,还可以有效地避免噬菌体的污染。生物信息学分析技术也会大大加速噬菌体的基因功能研究。

目前国内研究噬菌体的专家和学者已经遍布很多高校、研究所和企业,如果将各单位所有的噬菌体保藏信息展示在一个共享平台上,形成一个全国性甚至世界性的噬菌体库,那么在我们需要某种噬菌体进行治疗的时候,就可以实现快速资源共享。这可能是未来应对超级细菌感染或者恐怖袭击等紧急状况的一个恰当的选择,是国家生物安全的一项保障措施。

《科学通报》:未来,噬菌体治疗是否有可能替代抗生素治疗?

专家:虽然随着耐药菌株的大量出现与流行,噬菌体治疗显示出光明的应用前景。但是,客观地讲,我们并不认为噬菌体治疗可取代抗生素治疗。噬菌体治疗的意义在于为人类抗细菌感染提供了一种新的选择手段,尤其在以下几个方面,可能将显示极大应用价值:(1)抗耐药性细菌感染。对于那些多耐药、泛耐药甚至超级细菌感染,抗生素的选择非常有限、甚至无药可选,在这种情况下,噬菌体治疗将大有用武之地。(2)在水产养殖业、畜牧养殖业和农业中的应用。在养鱼、养虾等水产养殖时,常常面临细菌、真菌感染,导致批量养殖失败。因此,人们常常在饲料中加入抗生素。这种饲料抗生素的滥用,一方面导致养殖物肉制品中大量抗生素残留,人类在不知不觉中摄入了抗生素;另一方面,抗生素在环境中或动物体内选择出来许多耐药细菌,这类耐药菌感染人类时,其治疗变得极为棘手。为了克服上述问题,噬菌体就是一个选项。可以考虑在养殖环境(鱼池、虾池或养殖栏舍)喷洒特定的噬菌体,以控制疫病的发生,从而避免在饲料中添加抗生素,减少耐药菌产生的机会。农作物的细菌感染也可以采用噬菌体来进行生物防治。噬菌体在食品防腐方面也具有良好的应用前景。(3)在医院的一些特殊病房环境中使用。如烧伤病房,大面积感染创面的存在会使得该病房环境中某些病原体密度增加,而烧伤病人创面是开放的,极易受感染,如果能针对性地在该环境中喷洒病原体敏感性噬菌体,可以影响环境中病原体的分布和密度,可以改变“治病人”为“治环境”,这或许是一种不错的做法。

上述都是使用噬菌体完整病毒颗粒进行噬菌体治疗的情形。其实,噬菌体编码的某些基因产物(如溶菌酶等),也具有极大的应用前景。有的噬菌体编码产物,具有直接杀菌作用;有的产物可能对宿主菌的生长及致病能力具有调控作用。开发这些噬菌体基因编码产物的临床应用可能成为未来的另一个热点领域。由于噬菌体的巨大多样性,目前已完成测序噬菌体中,绝大多数噬菌体基因都是功能未知基因,弄清楚这些基因的功能,对于开发噬菌体产品是必要的基础性研究工作。

《科学通报》:噬菌体制剂有什么特点?要走向临床,噬菌体制剂应遵循怎样的质量管控标准和审批程序?

专家: 和现代生物药一样, 用于治疗噬菌体制剂必须遵循生物制药的一般规程和执行标准。但是, 由于噬菌体具有与其他生物药完全不同的特点: (1) 噬菌体可以复制, 复制过程中会发生变异; (2) 噬菌体含有多种成分, 既有蛋白质, 又有核酸, 多数情况下其成分不是完全已知的, 且批次间可能存在差异, 而其中的很多成分功能不清楚; (3) 噬菌体鸡尾酒制剂会因为细菌的变异而耐受, 故需要经常更新配方。因此要体现属于噬菌体药物的特征, 需要单独建立噬菌体类生物药物的质量管理和质量控制标准。迄今为止, 国内外尚没有正规实施的噬菌体制剂的质量管控标准。为顺应噬菌体发展的趋势, 应尽快形成有关噬菌体治疗制剂质量控制的指导原则。同时应该给噬菌体药物

开辟审批的绿色通道(类似美国的Compassionate Use的审批), 便于在紧急情况(如广谱耐药菌感染、重大疫情、生物恐怖)下, 噬菌体药物可以用来治病救人。

总的来说, 噬菌体作为抗生素外的又一选择而应用于耐药细菌的感染治疗, 具有非常广阔的应用前景。但是, 噬菌体走向临床仍然有一些问题亟待解决。为了有效应对抗生素耐药带来的全球性健康威胁, 各国政府有必要高瞻远瞩、未雨绸缪, 做好顶层设计, 在医疗卫生和基础科学研究项目设置方面给予适当考虑, 鼓励和带动噬菌体基础与应用研究。同时政府医药审批和监管部门, 应加快制定适合于噬菌体类药物和制剂的质量控制标准, 开辟噬菌体治疗项目的审批渠道, 为人民健康和国家安全保驾护航。

致谢

本文是采访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学组部分专家整理的报道, 因参与人数较多, 未能一一列出各位专家的观点。胡福泉、童贻刚、郭晓奎、徐永平、王冉、谢建平、徐德启、危宏平、黄青山、魏东、王轲、阚飙、韩文瑜等老师参与了对部分问题的回答, 噬菌体学组其他专家对此文也做出了贡献, 一并表示感谢!

(安瑞)