

# 烧伤细菌感染的噬菌体治疗

彭毅志 黄广涛

**Phage therapy for bacterial infection of burn** Peng Yizhi, Huang Guangtao. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Corresponding author: Peng Yizhi, Email: yizhipen@sina.com

**【Abstract】** With the long-term and widespread use of antibiotics, drug resistance of bacteria has become a major problem in the treatment of burn infection. For treating multidrug resistant bacteria, phage therapy has become the focus of attention. Development of phage therapy to fill the blank of this field in China is extremely urgent.

**【Key words】** Burns; Bacterial infections; Bacteriophages; Therapy

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81571896); Key Program of Logistics Scientific Research of the PLA (BWS11J039)

**【关键词】** 烧伤; 细菌感染; 细菌噬菌体; 治疗  
**基金项目:**国家自然科学基金(81571896);全军后勤科研计划重点项目(BWS11J039)

严重烧伤患者由于体表生理防御屏障受损、全身免疫功能下降、坏死组织广泛存在以及外界或自身菌群侵袭,其感染易感性大大增加<sup>[1]</sup>。感染是严重烧伤的常见并发症,烧伤脓毒症则是导致烧伤患者 MOF 和死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。

目前针对烧伤感染,仍然主要依赖于应用抗生素治疗。然而,随着临床上抗生素的广泛使用,细菌耐药性不断增强<sup>[3]</sup>。临床流行病学调查表明,烧伤感染的常见致病菌如鲍氏不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌以及金黄色葡萄球菌等,大多已成为多药耐药甚至泛耐药细菌,给临床治疗带来严峻挑战<sup>[4-5]</sup>。难治性感染不仅可能导致创面愈合延迟,也加大了脓毒症发生的可能,对烧伤患者的生命构成严重威胁。

针对细菌耐药问题,尽管世界各国都广泛重视抗生素的研发,但近年来新型抗生素的开发速度显著减缓、难度日益加大。针对一些多药耐药细菌,现有抗生素的治疗效果越来越有限<sup>[6]</sup>。因此,亟须寻找其他方法来治疗临床上的难治性细菌感染,目前

国内外的研究热点主要集中在噬菌体抗感染治疗。



## 1 噬菌体

噬菌体是一类依赖细菌生长的病毒,由核酸和蛋白衣壳组成,其大小一般在几十到几百纳米不等<sup>[7]</sup>。噬菌体仅特异性地感染其对应细菌,不感染机体真核细胞。噬菌体感染宿主的过程分为吸附、传入、复制、组装和释放<sup>[8]</sup>。

噬菌体治疗细菌感染的优点:(1)传统抗生素治疗在杀灭致病菌的同时,破坏了机体内正常菌群,从而引起微生态失衡,可能导致二重感染甚至全身性感染<sup>[9]</sup>。而噬菌体的宿主特异性强,只裂解相应的宿主菌,不会破坏机体内正常菌群。(2)不同于抗生素针对细菌某一个代谢过程的靶点发挥作用,噬菌体的作用机制是裂解单个细菌,治疗效果不受细菌耐药性的影响,对于治疗耐药细菌有天然优势<sup>[8]</sup>。(3)噬菌体只在感染部位增殖并且增殖速度很快,1株噬菌体感染宿主菌后可以产生几十甚至几百株后代噬菌体,因此只需极少量的噬菌体就可以发挥杀灭大量细菌的作用,治疗效率高。(4)噬菌体不会感染人体细胞,这是因为噬菌体的受体是细菌特有的结构成分,真核细胞没有噬菌体的受体<sup>[10]</sup>。

## 2 噬菌体治疗的历史和现状

英国人 Twort 在 1915 年首先发现噬菌体,但没有进行深入研究;法裔加拿大人 Herelle 在 1917 年观察到噬菌体,并且进行了一系列动物和人体实验。Herelle 用鸡和牛做了噬菌体的保护实验,观察到在前述动物感染细菌后给予噬菌体能够有效治疗感染。随后,他将噬菌体用于儿童痢疾、坏疽等感染性疾病的治疗并取得成功。Herelle 的研究成果引起了欧洲感染研究领域学者的广泛关注,随后欧洲各国陆续成立了噬菌体研究所<sup>[11]</sup>。在第二次世界大战期间,苏联士兵和军医都随身携带噬菌体制剂,用于预防和治疗伤口感染,挽救了很多苏联士兵的生命。然而,随着 1938 年青霉素被提炼出来,尤其是在 1945 年青霉素可以大量生产使其成本显著降低

DOI:10.3760/ema.j.issn.1009-2587.2016.09.001

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信作者:彭毅志,Email:yizhipen@sina.com

之后,临床上开始广泛使用青霉素治疗感染,噬菌体这一细菌感染治疗方式逐渐淡出大众视野。

近年来,细菌对抗生素的耐药形势日益严峻,2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测报告的数据显示,铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率达 22.4%<sup>[12]</sup>,笔者单位烧伤病房的此项耐药率则更高。这一耐药情况不仅引起了医学界的重视,也引起了社会各界的广泛关注。近年来,欧洲国家和美国的科学家对细菌的噬菌体疗法再次重视起来,美国政府、美国食品药品监督管理局(FDA)、美国微生物学会(ASM)等多个组织已开始重新审视该疗法。

2011 年,美国 FDA 批准了第 1 种由噬菌体构成的人类食品添加剂,将该添加剂喷洒于猪肉表面可预防 O157:H7 大肠杆菌感染。截至目前,美国 FDA 已经批准了 3 种由噬菌体组成的人类食品添加剂。2014 年,美国过敏与传染病研究所将噬菌体疗法确定为治疗耐药菌的措施之一。同年 ASM 年会上提出了 Phagoburn 计划<sup>[13]</sup>,来自法国、比利时和瑞士等国的共 11 家单位,目前正在联合进行首个用噬菌体治疗烧伤患者感染的跨国临床试验,试验中主要将噬菌体用于治疗烧伤后铜绿假单胞菌和大肠杆菌感染。2015 年 12 月,《Science》杂志发表文章,指出噬菌体疗法、噬菌体编码的尾菌素和溶菌素目前正在商业化,并对前述跨国试验进行报道,提及其已经进行多项临床 I、II 期试验,且对噬菌体治疗烧伤感染创面的方法进行了评估<sup>[14]</sup>。同年,《Nature》杂志发表文章,回顾 1 个世纪以来噬菌体在抗感染治疗领域的应用和研究历史,该文作者指出生物学家们应该改变以细胞为中心研究感染治疗的习惯,重新重视噬菌体在细菌感染治疗中的作用<sup>[11]</sup>。

### 3 噬菌体抗细菌感染研究

#### 3.1 利用噬菌体直接治疗细菌感染

笔者课题组收集了国内多个省、市烧伤患者创面感染的泛耐药鲍氏不动杆菌,以这些鲍氏不动杆菌菌株为宿主菌来筛选噬菌体,目前从污水中分离出 30 余株噬菌体<sup>[15]</sup>。这些噬菌体均可以形成清晰的裂菌斑,为裂解性噬菌体。研究人员选取其中 1 株裂解性较强的噬菌体,完成了电镜下形态观察、测序和基本的生物学特性分析,为后续治疗研究打下基础。此外,本课题组也尝试建立鲍氏不动杆菌噬菌体库,通过观察不同地域不同时间鲍氏不动杆菌亚型的分布及其变异特点,了解到噬菌体裂解能

力与细菌亚型关系密切,在此基础上提出临床治疗中应根据不同细菌亚型选择对应噬菌体治疗,以实现对患者进行个性化精准抗感染治疗<sup>[15]</sup>。随后,笔者课题组进一步使用脓毒症小鼠模型初步验证了噬菌体的治疗效果,噬菌体治疗组小鼠的存活比、脏器细菌感染的抑制情况显著优于脓毒症对照组<sup>[16]</sup>,这与 Takemura-Uchiyama 等<sup>[17]</sup>用噬菌体治疗金黄色葡萄球菌所致脓毒症小鼠的效果相似。同时,笔者课题组观察到,噬菌体与抗生素相比展现出一定治疗优势,但差异不明显<sup>[16]</sup>。此外,笔者未观察到反复行腹腔注射噬菌体治疗脓毒症小鼠对于其血常规及免疫系统的影响,提示噬菌体疗法的安全性是值得信任的(另文发表)。

#### 3.2 利用噬菌体编码的溶菌素杀灭细菌

子代噬菌体的释放虽然是一个主动过程,但其需要一种叫溶菌素的分子裂解细胞壁,以帮助其释放。目前已经有上百种噬菌体的溶菌素被分离纯化,与噬菌体相比,其溶菌素的特点是它的特异性由株特异性扩展到种特异性,裂菌谱相对噬菌体更宽。例如,铜绿假单胞菌的噬菌体溶菌素几乎可以裂解所有的铜绿假单胞菌,基本不受细菌亚型的限制<sup>[18]</sup>。现有研究表明,细菌不易对溶菌素产生耐药性<sup>[19]</sup>,这可能是由于溶菌素一般裂解的是细菌细胞壁的骨架连接,而这种连接是非常保守的,不易产生突变。

从金黄色葡萄球菌噬菌体中分离的 SAL-1 和 Ply187 噬菌体溶菌素,可体外杀灭抗甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)并对 MRSA 感染小鼠有治疗效果<sup>[20-21]</sup>。体外实验证实,噬菌体溶菌素可以杀灭的细菌范围较广。有学者提出,分离自肺炎链球菌噬菌体的 Cpl-711 噬菌体溶菌素,可杀灭其实验中所有链球菌<sup>[22]</sup>;分离自嗜麦芽窄食单胞菌噬菌体的 P28 噬菌体溶菌素,可杀灭多种革兰阳性菌、革兰阴性菌<sup>[23]</sup>。笔者课题组从鲍氏不动杆菌噬菌体中分离出 PlyAB1 噬菌体溶菌素,其裂解效果好,可体外裂解 95% 的多药耐药鲍氏不动杆菌(另文发表)。

#### 3.3 利用噬菌体传递常回文重复序列丛集相关系统 CRISPR/Cas 靶向杀灭细菌

CRISPR/Cas 是近年来炙手可热的真核细胞基因编辑技术。CRISPR 序列最初在细菌测序时被发现,这些短间隔重复回文序列后又被观察到在噬菌体的基因组中也存在,最后证实了 CRISPR 序列介导了细菌对噬菌体的耐受和清除<sup>[24]</sup>。细菌中这些 CRISPR 序列转录出单链 RNA,成熟的单链 RNA 可

以噬菌体基因组中的配对序列为靶点,由位于 CRISPR 序列附近的一组 Cas 蛋白发挥核酸内切酶的功能来剪切噬菌体基因组,完成对噬菌体的清除。

CRISPR/Cas 系统能够清除特定的 DNA 序列,可利用这一特性将其用于清除含特定序列(耐药基因或毒力基因)的病原菌,因此该系统又被称为 CRISPR/Cas 抗生素。Yosef 等<sup>[25]</sup>利用溶原性噬菌体来传递靶向清除 CTX-M-15 或 NDM 耐药基因的 CRISPR/Cas 抗生素,耐药病原菌被溶原噬菌体传递 CRISPR/Cas 抗生素后,细菌浓度的数量级从  $10^7$  降低至  $10^3$ 。噬菌体传递的 CRISPR/Cas 抗生素能够特定清除某一病原菌,并且不破坏正常菌群,因此受到研究者重视。目前可以利用这种技术来清除环境中的特定病原菌,今后有望将其用于人体内清除病原菌。

#### 4 发展中国的噬菌体治疗

目前我国尚无成品噬菌体制剂上市,但是已有很多不同种属细菌的噬菌体被分离并被证实有应用前景<sup>[26-27]</sup>。虽然国外已有噬菌体制剂上市,但由于噬菌体具有较强的特异性,而不同地域细菌的流行情况不同,流行的主要菌株也不同,国外的噬菌体制剂在中国的应用效果会受到限制。因此,我国亟须加快开展噬菌体制剂研发与应用领域的相关研究。

构建广谱噬菌体库是噬菌体疗法应用成功的基础。由于噬菌体的抗菌谱较窄,而细菌亚型的多样性较大,通常需要较长时间才能构建一个总体有效率较高的噬菌体库。目前国外噬菌体研究所主要通过大量分离噬菌体,构建含有超过 1 000 种噬菌体的噬菌体库,以达到一定的覆盖率。笔者单位则通过收集国内众多大型城市的鲍氏不动杆菌菌株,基于多位点序列分型对所得菌株进行分类,再筛选噬菌体建库,已经取得一定进展<sup>[15]</sup>。

临床应用中,噬菌体抗感染治疗的标准和流程亟待规范,包括噬菌体的分离纯化、储存、更新,噬菌体的适用情况以及应用后对患者的随访要求。从基础医学角度,应重视噬菌体裂解细菌的机制研究,抓紧寻找噬菌体内的关键作用酶,掌握噬菌体裂解细菌过程的调节机制和规律,建立更为高效、安全、清洁的酶表达体系,实现产业化生产噬菌体制剂。

如果将抗感染的广谱抗生素治疗看成是“密集轰炸”,噬菌体抗感染疗法则可以被视为“精准制导”。在当前世界范围内细菌对抗生素耐药越来越严重的情况下,噬菌体抗感染治疗的研究和应用显

得尤为迫切,其医疗和商业前景值得期待。我国应加强开展噬菌体抗感染研究,尽快研制出相关噬菌体制剂,填补国内该领域空白。

#### 参考文献

- [1] Church D, Elsayed S, Reid O, et al. Burn wound infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(2): 403-434. DOI: 10.1128/CMR.19.2.403-434.2006.
- [2] Polavarapu N, Ogilvie MP, Panthaki ZJ. Microbiology of burn wound infections [J]. J Craniofac Surg, 2008, 19(4): 899-902. DOI: 10.1097/SCS.0b013e318175b4f0.
- [3] Hauser AR, Mecsas J, Moir DT. Beyond antibiotics: new therapeutic approaches for bacterial infections [J]. Clin Infect Dis, 2016, 63(1): 89-95. DOI: 10.1093/cid/ciw200.
- [4] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen [J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538-582. DOI: 10.1128/CMR.00058-07.
- [5] Gong YL, Chen J, Liu CJ, et al. Comparison of pathogens and antibiotic resistance of burn patients in the burn ICU or in the common burn ward [J]. Burns, 2014, 40(3): 402-427. DOI: 10.1016/j.burns.2013.07.010.
- [6] Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches [J]. Expert Opin Pharmacother, 2014, 15(10): 1351-1370. DOI: 10.1517/14656566.2014.914172.
- [7] Salmond GP, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future [J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(12): 777-786. DOI: 10.1038/nrmicro3564.
- [8] Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics [J]. Trends Biotechnol, 2010, 28(12): 591-595. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.08.001.
- [9] Chaudhry WN, Haq IU, Andleeb S, et al. Characterization of a virulent bacteriophage LK1 specific for *Citrobacter freundii* isolated from sewage water [J]. J Basic Microbiol, 2014, 54(6): 531-541. DOI: 10.1002/jobm.201200710.
- [10] Borysowski J, Górski A. Is phage therapy acceptable in the immunocompromised host? [J]. Int J Infect Dis, 2008, 12(5): 466-471. DOI: 10.1016/j.ijid.2008.01.006.
- [11] Rohwer F, Segall AM. In retrospect: a century of phage lessons [J]. Nature, 2015, 528(7580): 46-48. DOI: 10.1038/528046a.
- [12] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(5): 401-410. DOI: 10.3969/j.issn.1009-7708.2015.05.001.
- [13] Evaluation of phage therapy for the treatment of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections (Phase I-II clinical trial) [EB/OL]. (2016-03-08) [2016-07-07]. [http://cordis.europa.eu/project/rcn/108695\\_en.html](http://cordis.europa.eu/project/rcn/108695_en.html).
- [14] Young R, Gill JJ. MICROBIOLOGY. Phage therapy redux--What is to be done? [J]. Science, 2015, 350(6265): 1163-1164. DOI: 10.1126/science.aad6791.
- [15] 杨子晨, 邓柳洋, 龚雅利, 等. 严重烧伤患者创面分离泛耐药鲍氏不动杆菌噬菌体的建库及相关特征分析 [J]. 中华烧伤杂志, 2016, 32(9): 517-522. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.09.002.
- [16] 邓柳洋, 杨子晨, 龚雅利, 等. 噬菌体治疗泛耐药鲍氏不动杆菌所致脓毒症小鼠的效果 [J]. 中华烧伤杂志, 2016, 32(9): 523-528. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.09.003.
- [17] Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Osanai M, et al. Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia

- caused by *Staphylococcus aureus* in mice [J]. *Microbes Infect*, 2014, 16(6):512-517. DOI:10.1016/j.micinf.2014.02.011.
- [18] Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials [J]. *Future Microbiol*, 2012, 7(10):1147-1171. DOI:10.2217/fmb.12.97.
- [19] Fischetti VA. Lysin therapy for *Staphylococcus aureus* and other bacterial pathogens[J/OL]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2016 [2016-07-07]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26728063>. [published online ahead of print January 5, 2016]. DOI: 10.1007/82\_2015\_5005.
- [20] Jun SY, Jung GM, Yoon SJ, et al. Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1 [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 41(2):156-161. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.10.011.
- [21] Singh PK, Donovan DM, Kumar A. Intravitreal injection of the chimeric phage endolysin Ply187 protects mice from *Staphylococcus aureus* endophthalmitis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8):4621-4629. DOI:10.1128/AAC.00126-14.
- [22] Díez-Martínez R, De Paz HD, García-Fernández E, et al. A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(6):1763-1773. DOI: 10.1093/jac/dkv038.
- [23] Dong H, Zhu C, Chen J, et al. Antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* endolysin P28 against both Gram-positive and Gram-negative bacteria [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6:1299. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01299.
- [24] Maraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes [J]. *Nature*, 2015, 526(7571):55-61. DOI: 10.1038/nature15386.
- [25] Yosef I, Manor M, Kiro R, et al. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(23):7267-7272. DOI: 10.1073/pnas.1500107112.
- [26] Fan H, Fan H, An X, et al. Complete genome sequence of IME11, a new N4-like bacteriophage [J]. *J Virol*, 2012, 86(24):13861. DOI:10.1128/JVI.02684-12.
- [27] Fan X, Teng T, Wang H, et al. Biology of a novel mycobacteriophage, SWU1, isolated from Chinese soil as revealed by genomic characteristics [J]. *J Virol*, 2012, 86(18):10230-10231. DOI: 10.1128/JVI.01568-12.

(收稿日期:2016-07-07)

(本文编辑:谢秋红)

**本文引用格式**

彭毅志, 黄广涛. 烧伤细菌感染的噬菌体治疗[J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(9):513-516. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.09.001.

Peng YZ, Huang GT. Phage therapy for bacterial infection of burn[J]. *Chin J Burns*, 2016, 32(9):513-516. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.09.001.

**·读者·作者·编者·****本刊投稿格式新规**

根据中华医学会杂志社关于编排格式规范的最新要求,本刊投稿格式修订如下。

**1 标点符号**

撰写文章时,中文部分使用中文的标点符号,英文部分使用英文的标点符号(半角);数字的“小数点”使用英文状态下的标点“.”(半角);文后参考文献中著录符号“,”“.”“:”“( )”“[ ]”应用英文状态下的符号著录。

**2 基金项目**

有英文题名项的文章中基金项目采取双语著录,中、英文分别置于中、英文关键词下。国内部分基金项目名称的中英文对照翻译,可到本刊网站 [www.zhsszz.org](http://www.zhsszz.org)“作者中心”栏目中查看参考。

示例:

(1) 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2013CB532002)

Fund program: National Key Basic Research Program of China (973 Program) (2013CB532002)

(2) 基金项目:国家自然科学基金(30271269)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30271269)

**3 医学伦理**

当报告以人为研究对象的试验时,作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准。需提供该委员会的批准文件(批准文号著录于论文中)及受试对象或其亲属的知情同意书。研究涉及实验动物时,材料与方法中需注明动物许可证号。

示例:

本研究通过医院伦理委员会审批,批号为 XXXXXX。

**4 参考文献**

建议引用高影响力期刊近3~5年刊登的相关文献。对有DOI编码的文献必须著录其DOI,列于该条文献末尾。

示例:

[1] 刘欣,申阳,洪葵. 心脏性猝死风险的遗传检测管理[J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(9):760-764. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2015.09.003.

[2] 黄跃生. 严重烧伤早期心肌损害机制及临床意义的再认识[J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(5):257-259. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.05.001.

本刊编辑部