

噬菌体特异性裂解细菌的现象最早是由英国的 Twort 和法国的 d'Hérelle 分别于 1915 年和 1917 年相继独立发现的。Jacob 等于 1958 年首先发现噬菌体可以编码一类具有裂解细菌特性的蛋白质, 这些蛋白质在噬菌体感染并裂解宿主菌的过程中发挥着重要的作用, 被命名为裂解酶 (又称为内溶素)。1959 年, Freimer 等首次成功纯化了裂解酶, 且具有杀菌能力。2001 年, 噬菌体裂解酶首先被用作局部抗菌剂。2013 年, 全球第一个噬菌体裂解酶产品 Gladskin 上市, 该产品主要用于辅助治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 引起的炎症性皮肤病。目前, 针对 MRSA 的裂解酶 CF-301 已完成人体的 I/II 期临床试验, 证明了这一新治疗制剂的安全性和有效性, 目前该裂解酶正用于 MRSA 菌血症住院患者及心内膜炎患者的实验治疗, 如果获得成功, 这将成为第一个裂解酶药物。除了裂解酶之外, 对噬菌体基因编码的其他抗菌产物的相关研究也日益增多, 主要包括穿孔素、转运信号多肽、跨膜素、解聚酶和尾突蛋白等, 这些噬菌体来源的蛋白质也具有抗菌作用。

第一节 噬菌体裂解细菌的分子基础——裂解系统

正常情况下, 噬菌体感染细菌之后所形成的子代噬菌体颗粒要穿过细菌的细胞膜和细胞壁结构, 然后才能释放到细菌外。对于细胞膜这道屏障, 有些噬菌体是通过非破坏性的“出芽”等方式通过, 也有些噬菌体则是通过编码形成的蛋白质以打孔的方式破坏细菌细胞膜。对于细胞壁这道屏障, 一部分噬菌体是通过编码表达抑制细胞壁合成的蛋白质分子进行突破; 另外一部分噬菌体是通过编码表达能够结合细胞壁上特定结构并水解特定化学键的裂解酶, 从而破坏细胞壁的完整性。噬菌体穿过细胞膜和细胞壁可能是依赖单个蛋白质分子, 也可能需要多个蛋白质同时协作, 据此可以将噬菌体的裂解系统分为单组分系统和双组分系统两大类。

1. 单组分裂解系统 一些具有小基因组的噬菌体, 如噬菌体 Φ X174、ssDNA 丝状噬菌体 Φ X174 和 ssRNA 噬菌体 MS2 等, 都具有不依赖裂解酶的裂解系统, 其可抑制宿主

的细胞壁合成酶，并以独特的出芽方式释放子代噬菌体。其中噬菌体 Φ X174 的蛋白 E 为由 91 个氨基酸组成的膜蛋白，它通过抑制参与脂质 I 合成的 *MraY* 酶，从而完成子代噬菌体颗粒的释放。据报道，大肠埃希菌 ssRNA 噬菌体 QB 并没有独立的裂解相关基因，真菌线状 ssDNA 微小病毒噬菌体 X174 和 ssDNA 噬菌体 MS2 也都不存在能够破坏细胞壁的裂解酶。这些缺乏裂解酶的小基因组噬菌体主要是利用多肽在不同阶段抑制宿主菌的胞壁质合成酶，从而在不同阶段释放子代噬菌体颗粒，并最终导致宿主菌的裂解。ssRNA 噬菌体编码的单一蛋白质称为 amurin，这种蛋白质有导致细胞膜溶解并抑制细胞壁合成的作用，一般不需要其他蛋白质的协助。

2. 双组分裂解系统 (holin-endolysin) dsDNA 噬菌体则具有主要依赖裂解酶的裂解系统，一般包括两种蛋白质，即细胞壁裂解酶和穿孔素。噬菌体在其感染晚期合成穿孔素和裂解酶；穿孔素可在特定的时间点细胞膜上形成低聚物“跨膜孔”，并改变宿主细胞膜的通透性；裂解酶通过穿孔素在细胞膜上形成的孔洞到达细胞壁，并将之水解破坏，最终导致宿主细胞在渗透压的作用下裂解死亡。“穿孔素-裂解酶”二元裂解系统是 dsDNA 噬菌体普遍采用的裂菌模式，以实现在宿主菌内部裂解细菌并释放其子代噬菌体。

第二节 噬菌体裂解酶

一、裂解酶的概念

噬菌体裂解酶是 dsDNA 噬菌体感染细菌的后期，由噬菌体基因编码合成的一种细胞壁水解酶。在噬菌体裂解复制周期中，裂解酶通过穿孔素在细胞膜形成的孔洞，进而抵达细胞壁上的肽聚糖靶点，然后对细菌细胞壁肽聚糖中的重要化学键进行切割水解，最终导致细菌裂解、死亡，以帮助子代噬菌体释放到胞外。裂解酶可以选择性地快速杀灭特定的细菌，且不易产生抗性，不破坏机体的正常菌群，是“精准型”抗菌物质。

二、裂解酶的结构组成及抗菌作用机制

目前研究较多的是 G⁺ 菌的噬菌体裂解酶，分子量一般为 25 kDa 以上（链球菌 C1 噬菌体的裂解酶 PlyC 为 114 kDa）。噬菌体裂解酶在结构上具有相似性，典型的结构由一个或多个 N 端细胞壁催化结构域 (cell wall catalytic domain, CWCD) 和一个 C 端细胞壁结合结构域 (cell wall binding domain, CWBD) 组成 (图 16-1)。

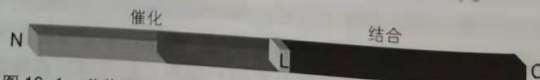


图 16-1 噬菌体裂解酶的结构示意图 (引自 Fischetti V A, 2005)

(一) 裂解酶催化域

裂解酶 N 端结构域具有催化活性，称为催化域 (catalytic domain, CD)，能够特异地切断肽聚糖 (peptidoglycan, PG) 的化学键，催化域在一定程度上使裂解酶保持其宿

的特异性。根据作用于细胞壁肽聚糖共价键位点和种类的不同,可以将催化域分为6类:①N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶(*N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase);②N-乙酰基-β-D-胞壁质酶(*N*-acetyl-β-D-muramidase);③N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖苷酶(*N*-acetyl-β-D-glucosaminidase);④肽桥内肽酶(interpeptide bridge endopeptidase);⑤L-丙氨酸-D-谷氨酸内肽酶(*L*-alanoyl-D-glutamate endopeptidase);⑥糖基转移酶(transglycosylase,图16-2)。N-乙酰基-β-D-胞壁质酶、N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖苷酶和糖基转移酶的作用部位在肽聚糖的糖基上;N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶的作用部位是聚糖与肽连接的酰胺键;而肽桥内肽酶和L-丙氨酸-D-谷氨酸内肽酶则作用于四肽侧链和五肽交联桥上的肽键。具有酰胺酶活性的裂解酶通常表现为较宽的裂解谱。有些报道的裂解酶含有两个催化域,如金黄色葡萄球菌噬菌体K的裂解酶LysK和金黄色葡萄球菌噬菌体GH15的裂解酶LysGH15,它们的催化域均包含半胱氨酸和组氨酸依赖性酰胺水解酶/肽酶(cysteine histidine-dependent amidohydrolase/peptidase, CHAP)结构域和酰胺酶(amidase)结构域,其中CHAP结构域通常在活性位点处含有半胱氨酸和组氨酸残基。

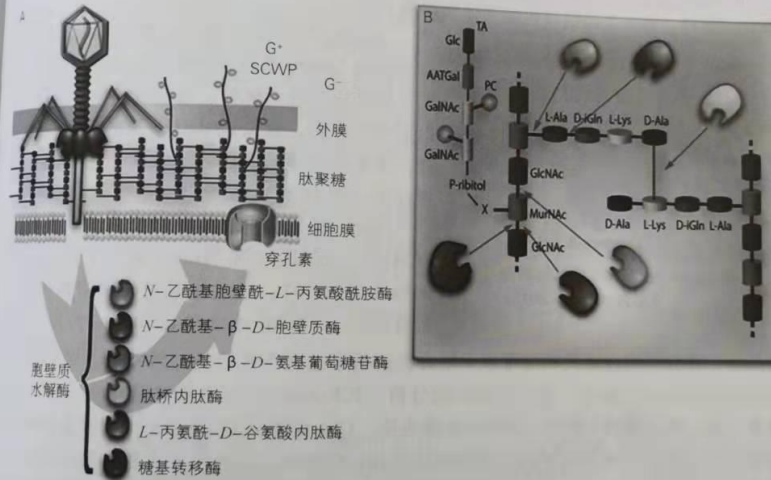


图 16-2 作用于细菌细胞壁上不同结构的裂解酶 (引自 Hermoso 等, 2007)

(二) 裂解酶结合域

C端结构域是与宿主细胞壁上的特异性底物发挥结合作用的区域,称为结合域(binding domain, BD),负责识别和结合细菌细胞壁内的保守模块,决定了裂解酶裂解的特异性。通常细菌细胞壁上含有多糖和磷酸受体,其中N-乙酰葡萄糖胺、胆碱和聚半乳糖等都被证明是结合域的靶标分子,能通过非共价键的方式与结合域发生高亲和且特异的结合。例如,干酪乳杆菌裂解酶Lc-Lys的C端结构域可以特异地靶向含有酰胺化D-Asn交叉桥肽聚糖的细菌菌株,并在催化域作用下将细菌裂解,但是其对细胞壁修饰后的细菌突变体结合活性完全消失,也无法将细菌裂解,表明裂解酶对相关菌株特



图 16-2 彩图

异的裂解活性依赖于结合域与细胞壁上保守表位的特异性结合。炭疽芽孢杆菌裂解酶 PlyG 的相关研究也证明了这一点，去除其结合结构域会导致裂解酶无法发挥催化活性。表明 C 端结合结构域对保持酶活非常重要。此外，有些文献表明天然不带有结合域的裂解酶通常比含有结合域的裂解酶倾向于具有更宽的抗菌宿主范围。

各种裂解酶的 N 端催化域是相对高度保守的，而 C 端结合域是高变的。但也有例外，Simmons 等研究发现产气荚膜梭菌的两个噬菌体裂解酶的 C 端结合域显示 100% 序列同源性，而在 N 端功能区序列只有 55% 的同源性。

G⁻ 菌噬菌体裂解酶的研究较少，而多数已被报道的 G⁻ 菌噬菌体裂解酶仅具有呈单体球状的催化域结构，而不具备结合域结构。一小部分 G⁻ 菌噬菌体裂解酶也呈现模块式镶嵌结构，其催化域和结合域与 G⁻ 菌噬菌体裂解酶的位置分布恰好相反，即结合域在裂解酶的 N 端，而催化域在裂解酶的 C 端。

(三) 裂解酶的三维结构及分子作用机制

目前成功解析结构的裂解酶有两个典型的代表，一个是金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 LysGH15，另一个是链球菌噬菌体裂解酶 PlyC。

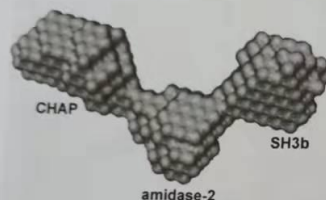


图 16-3 LysGH15 的结构模型
(引自 Xia 等, 2015)

Jingmin Gu 等为了揭示金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 LysGH15 发挥裂解活性的作用机制，对其三维结构进行了解析。由二级结构预测和小角散射分析表明，全长 LysGH15 是由两个连接肽连接三个近似球形的活性区域组成，表现出很大的摆动性（图 16-3），无法进行有效的蛋白结晶。

因此，他们分别对 LysGH15 的 3 个活性片段（CHAP、amidase-2 和 SH3b）进行了表达和结构解析（图 16-4）。通过结晶条件的初筛和优化，最终获得了 CHAP 片段和 amidase-2 片段的高质量晶体，并分别通过硒代和泡重原子的方法解析了这两个片段的三维结构。对 CHAP 片段结构进行的位点突变、原子发射光谱分析（ICP-AES）、等温滴定量热法（ITC）、热漂移、圆二色谱分析（CD）和活性实验表明，C54-H117-E134-N136 四联体为 CHAP 的活性中心，其中 C54 的巯基起主要的攻击作用；CHAP 可以通过 5 个氨基酸残基结合一个 Ca^{2+} ，形成一个“ef-hand-like”钙结合位点，其中 D45、D47 和 D56 的侧链在结合 Ca^{2+} 中起关键作用； Ca^{2+} 的丢失不会影响 CHAP 的二级结构，但是对其热稳定性具有影响，它与 CHAP 的解离平衡常数为 $27 \mu\text{mol}$ ； Ca^{2+} 在 CHAP 的裂解活性中起关键的“开关”调节作用，一旦丢失，将使 C54 位点偏离正确的空间位置，从而使 CHAP 失活。通过 amidase-2 的结构可以看到 H214、H324 和 C332 三个氨基酸残基的侧链可以结合一个 Zn^{2+} ，另外通过序列和结构的比对确定了与活性有关的氨基酸位点为 E282 和 T330。对 SH3b 片段采用核磁共振技术进行结构解析，首先表达了 N^{15} 和 C^{13} 单标和双标的 SH3b 蛋白，通过核磁共振技术获得了二维谱数据，通过计算、分析和优化最终获得了 SH3b 在溶液状态下的三维结构；核磁滴定与突变实验鉴定了 SH3b 与底物多肽“AGGGGG”相互作用的界面和关键氨基酸位点。

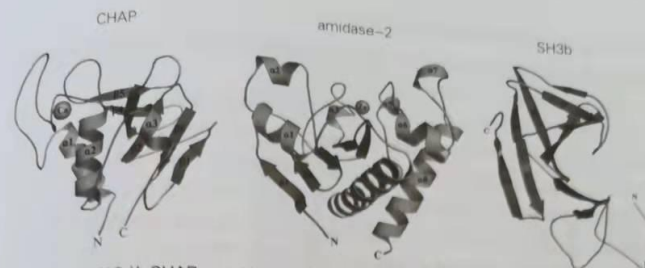


图 16-4 LysGH15 的 CHAP、amidase-2 和 SH3b 的三维结构 (引自 Gu J M, et al., 2014)

通过定点突变, 确定了三个片段在 LysGH15 活性的发挥中分别起到的作用。LysGH15 的三个活性片段单独存在时: CHAP 表现出较全长蛋白弱的裂解活性; amidase-2 片段不具有裂解活性, 但是 amidase-2 片段可以增强 CHAP 片段的活性; SH3b 具有特异性结合金黄色葡萄球菌的活性。LysGH15 及其 CHAP 片段的裂解活性均依赖于 Ca^{2+} 的存在, Ca^{2+} 所在的位置紧邻 CHAP 片段的四联体活性中心, 四联体对其活性的发挥也是至关重要的, amidase-2 片段发挥活性的关键位点是 E282 和 Zn^{2+} , 该片段在 LysGH15 的裂解活性中所起的作用很微弱; SH3b 与多肽 AGGGGG 相互作用的界面及关键的氨基酸位点的鉴定表明, 该片段在 LysGH15 全酶活性的发挥上起重要导向和结合作用。

而链球菌噬菌体裂解酶 PlyC 与其他的裂解酶结构不同, 它是由两个独立基因编码的 PlyCA 和 PlyCB 组成, 二者共同组成具有活性的 PlyC (图 16-5)。从 PlyC 的蛋白质结构可以看到它是由 1 个 PlyCA 和 8 个 PlyCB 形成的多聚体, 其中 PlyCA 位于 PlyCB 多聚体上方, 包含一个 CHAP 片段, 主要具有催化水解活性; 而 8 个 PlyC 分子共同构成了一个环状结构, 主要起结合作用。

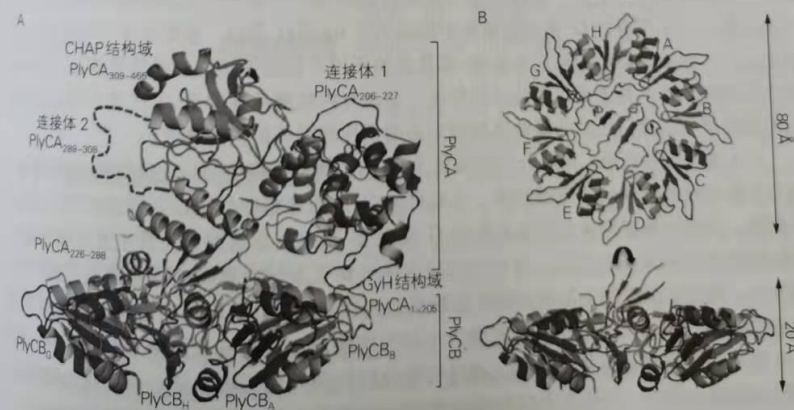


图 16-5 链球菌噬菌体裂解酶 PlyC 的三维结构 (引自 McGowan 等, 2012)

图 16-5 彩图

(四) 噬菌体裂解酶裂解细菌的方式

根据裂解酶裂解细菌的起始部位不同, 可以分为自内裂解 (lysis from interior) 和自外裂解 (lysis from external) 两种方式。

1. 自内裂解 当有噬菌体存在时, 噬菌体侵入细菌并编码产生裂解酶, 裂解酶从细菌内部穿过细胞膜达到细胞壁从而裂解细菌的方式, 即自内裂解。噬菌体自内裂解细菌时通常是通过裂解酶与穿孔素这两种物质导致细菌裂解的。由于裂解酶不含先导信号序列, 所以不能通过细胞膜, 这就需要穿孔素的协助。穿孔素是细胞的溶解“定时器”, 在噬菌体感染末期表达, 由 100 个左右的氨基酸组成, 能够穿透细胞膜并起到信号肽的作用, 通过穿孔素寡聚化 (oligomerization) 在细胞膜上形成孔道, 并破坏其内外渗透压平衡和正常的调节机制, 导致细胞膜发生破裂、内容物外漏。随之裂解酶抵达肽聚糖并将其水解, 细胞壁遭到破坏后, 细菌在渗透压的作用下发生裂解, 子代噬菌体被释放到外界。因此, 自内裂解是穿孔素和裂解酶协同作用的结果。

而 G^+ 菌、 G^- 菌和分枝杆菌的细胞壁结构与组成相差很大 (图 16-6), 噬菌体为了能够破坏特定宿主菌的细胞壁从而将子代释放出去, 进化出了一套能够精确破坏特定宿主细胞膜和细胞壁的裂解系统。

(1) 裂解 G^+ 菌: G^+ 菌细胞壁主要成分为肽聚糖结构 (图 16-6), 其特点是多层、三维立体网状结构。噬菌体的裂解酶在细菌细胞质内表达, 其要想到达细胞壁肽聚糖, 则必须穿过细菌的细胞膜, 但通常来说 G^+ 菌的裂解酶为亲水、可溶性蛋白质, 没有破坏、穿过细胞膜的功能。所以 G^+ 菌会表达能够在细胞膜上打孔的穿孔素, 从而辅助裂解酶穿过细胞膜, 到达细胞壁肽聚糖, 破坏细胞壁完整性, 释放子代噬菌体颗粒。多数 G^+ 菌的细胞壁紧挨细胞膜一侧的结构与细菌细胞壁外表面的结构是一致的, 这为异源表达的噬菌体裂解酶能从胞外直接接触并水解细胞壁肽聚糖提供了可能。

(2) 裂解 G^- 菌: G^- 菌细胞壁由外膜和周质间隙组成, 细胞壁除含有肽聚糖外还含有较厚的类脂层 (图 16-6)。 G^- 菌细胞壁最外层是较厚的脂多糖等, 被认为是一道渗透性屏障, 阻碍疏水性抗生素、试剂和蛋白质的渗透作用, 可避免其肽聚糖破坏后直接导致细菌崩解。几乎所有的 G^- 菌的噬菌体中都编码有 $Rz/Rz1$ 蛋白, 推断由于 G^- 菌细胞壁外膜的存在, 噬菌体虽然能够在裂解酶-穿孔素的作用下裂解细胞壁中的肽聚糖层, 但细胞壁外膜的存在也不利于子代噬菌体的释放, 而具有内肽酶活性的 $Rz/Rz1$ 蛋白可攻击外膜上的胞壁质和脂蛋白之间的寡肽连接键来协助子代噬菌体的快速释放。

(3) 裂解分枝杆菌: 虽然分枝杆菌属于 G^+ 菌, 但其细胞壁结构比较特殊 (图 16-6), 既有类似阳性菌较厚的肽聚糖结构, 又有类似 G^- 菌的细胞壁外膜, 其外膜主要成分为分枝菌酸。分枝杆菌噬菌体的裂解系统与 G^+ 菌及 G^- 菌也有显著差异, 其主要由裂解酶 A、裂解酶 B 及穿孔素蛋白构成。分枝杆菌噬菌体的穿孔素蛋白是噬菌体基因编码的小分子膜蛋白, 通过在细胞膜上形成跨膜孔使裂解酶到达细胞壁肽聚糖层而发挥细菌裂解功能; 裂解酶 A 蛋白的功能类似于其他噬菌体中的裂解酶蛋白, 具有肽聚糖水解酶活性; 裂解酶 B 被认为是在噬菌体裂解晚期, 通过切割分枝杆菌外膜与细胞壁之间的化学键彻底裂解宿主细胞。其中, 穿孔素不仅是构成跨膜孔的重要元件, 而且是触发细菌裂解的“分子定时器”, 在噬菌体裂解宿主菌的过程中扮演着重要角色。

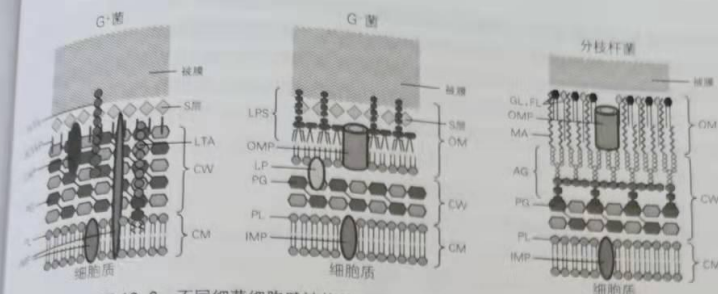


图 16-6 不同细菌细胞壁结构的差异性 (引自 Fernandes 等, 2018)

2. 自外裂解 当没有噬菌体时, 将某些噬菌体裂解酶加入含有敏感细菌的环境中, 噬菌体裂解酶也可以在细菌外发挥有效的裂解作用, 即自外裂解。多数 G⁻ 菌噬菌体的裂解酶可以从胞外快速裂解细胞壁, 从而杀死细菌。这为裂解酶的单独使用提供了基础。迄今, 已经报道了针对多种病原细菌的裂解酶, 主要包括链球菌、葡萄球菌、李斯特菌和芽孢杆菌等。

三、裂解酶的改造

为了提高裂解酶的裂解活性、拓宽其裂解谱, 可以应用分子生物学的方法对天然噬菌体裂解酶进行设计改造, 对裂解酶的不同作用区域进行调整、转换, 或者将其其他功能蛋白的元件与裂解酶的结构域相嵌合, 以构建嵌合式裂解酶, 可以赋予其更优秀的抗菌功能。

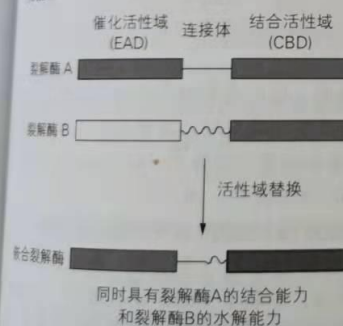


图 16-7 嵌合裂解酶的构建示意图 (引自 Kim 等, 2019)

(一) 对 G⁻ 菌噬菌体裂解酶的改造

1. 嵌合裂解酶 G⁻ 菌的天然裂解酶结构是模块化的, 通常由 N 端的催化域和 C 端的结合域组成, 由于裂解酶这两个区域的结构域是相互独立的, 可以通过将不同来源的催化域和结合域组合 (图 16-7), 构建比亲代裂解酶性能更优良的嵌合裂解酶 (chimeolysin), 以提高其杀菌活性、水溶性, 拓宽杀菌谱等。Rodriguez-Rubio 等把金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 HydH5 和溶葡萄球菌素的结构域进行了嵌合表达, 嵌合蛋白 HydH5-SH3b、CHAP-SH3b 和 HydH5-Lyso 的裂解能力与 HydH5 相比都得到

了提高。Osipovitch 等将金黄色葡萄球菌的自溶酶 (autolysis enzyme) Lyt M 和金黄色葡萄球菌裂解酶的细胞壁结合域进行了嵌合构建, 其裂解能力比原裂解酶提高了 540 倍。Dong 等将金黄色葡萄球菌裂解酶 Ply187 的催化域 Ply187N (1~157 aa) 和噬菌体裂解酶 PlyV12 的结合域 V12C (146~314 aa) 进行了嵌合构建, 组成的嵌合酶 Ply187N-V12C 不

仅能裂解金黄色葡萄球菌，还能裂解链球菌（包括停乳链球菌、无乳链球菌、酿脓链球菌）和肠球菌（屎肠球菌、粪肠球菌），极大拓宽了裂解酶的裂解谱。Fernandes 等把粪肠球菌噬菌体裂解酶 F168/08 的催化域和噬菌体裂解酶 Lys87b 的结合域组合成嵌合酶，既扩大了裂解谱，还增加了裂解酶的水溶性。由噬菌体 Twort 裂解酶 ply TW 的催化域和噬菌体 phi nm3 裂解酶的细胞壁结合域融合而成的嵌合裂解酶 ClyS，表现出了更好的水溶性和裂解活性。许晶晶等报道了一个较为广谱的嵌合裂解酶 ClyE，它是由天然噬菌体裂解酶 PlyGBS 的催化域和 PlySs2 的细胞壁结合域融合表达而来，它的裂解谱较广，能够裂解无乳链球菌、停乳链球菌、化脓链球菌、猪链球菌、变异链球菌、肺炎链球菌、粪肠球菌和金黄色葡萄球菌。Yang 等把金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 Ply187 的催化域和裂解酶 phi nm3 的结合域进行组合形成嵌合酶 ClyH，不仅增加了裂解能力，而且扩大了裂解谱；他们还基于合成生物学的理论，将两个金黄色葡萄球菌裂解酶的不同功能域进行融合进而得到一个全新的嵌合酶 ClyH，其能高效杀灭包括 MRSA 在内的各种金黄色葡萄球菌临床分离株，而且 ClyH 具有比溶菌素更高的裂解活力和更广的裂解谱，有望成为一种用于临床上金黄色葡萄球菌感染控制与治疗的抗菌药物；将链球菌噬菌体裂解酶 λ SA2 的肽链内切酶结构域与葡萄球菌噬菌体裂解酶 LysK 及溶葡萄球菌素的 SH3b 结合结构域组成嵌合酶，不但能对金黄色葡萄球菌（包括青霉素耐药株）具有较高的裂解活性，对链球菌同样具有裂解活性。除了可以对不同噬菌体裂解酶的片段进行嵌合，裂解酶的功能片段还可以跟其他来源的功能蛋白片段相结合，Fischetti 等将裂解酶的结合域与人源 IgG 抗体的 Fc 片段进行了融合表达，该融合蛋白（lysibody）能够靶向结合金黄色葡萄球菌，从而促使吞噬细胞有效清除细菌。

因此，通过对裂解酶进行修饰和改造，不仅能增强裂解酶的裂解活性，还能使其更准确地针对不同的目标致病菌，达到优化裂解酶的目的。嵌合裂解酶可以克服天然裂解酶活性低、可溶性差及作用靶点单一等缺点，并且可被赋予更多的功能，更适于治疗耐药菌引起的感染。嵌合裂解酶的设计和改造是今后裂解酶研发和应用的一个重要方向，也是裂解酶用于耐药菌控制和治疗最具有希望的增长点。

2. 裂解酶截短 一些裂解酶在去除 C 端结合域时，依旧具有溶菌活性，如德氏乳杆菌噬菌体 LL-H 编码的 Mur；有些酶甚至 C 端缺失或部分缺失后，其剩余的母体裂解酶裂解活性反而得到了增强。Loessner 等发现金黄色葡萄球菌裂解酶 Ply187 的全酶活性低，但其 N 端的 1~157 aa 单独存在时却表现出更高的裂解活性，而 158~227 aa 和 158~628 aa 没有裂解活性。Cheng 等也发现 B 群链球菌裂解酶 PlyGBS 多种片段丢失的蛋白质突变体活性得到了增高，如仅保留 N 端 1~141 aa 和 C 端的 13 个氨基酸，裂解活性为全酶的 28 倍。当截去葡萄球菌裂解酶 LysK 的一些肽链，只剩下 CHAP 结构域时，其仍保持裂解葡萄球菌（包括 MRSA）的活性。艰难梭菌噬菌体裂解酶 CD27L 被截短后剩下 N 端结构域 CD27L1-179，不但增加了其对艰难梭菌的裂解活性，其裂解谱亦有所扩大。此外，经过截短的裂解酶，甚至可以仅剩下某一个结构域蛋白，这样能够使其分子量大大降低，能减少免疫应答的发生。Yang 等还发现针对金黄色葡萄球菌的裂解酶 PlyV12 截断至仅剩结合域 V12CBD 时，可以通过结合金黄色葡萄球菌来调控其毒力基因的下调转录和表达，并促使细菌被吞噬细胞清除；他们还首次发现在炭疽芽孢杆菌特异性裂解酶 plyG 的结构中存在两个独立的识别功能域，分别识别炭疽芽孢杆菌的芽孢和营养体。

噬菌体中催化域中有一段 60 个氨基酸的序列能特异性的识别炭疽芽孢，免疫电泳分析结果显示，其作用靶点最有可能是芽孢外壁。他们将裂解酶 plyG 不同截短体与增强型绿色荧光蛋白进行融合，所得到的重组蛋白可以通过荧光消减法特异性的检测炭疽芽孢杆菌的芽孢和芽孢。因此，新发现芽孢识别功能域不仅可以用于炭疽芽孢的快速检测，而且还对体外炭疽芽孢的控制提供了新的思路。

(二) 对 G⁻菌噬菌体裂解酶的改造

对于作用于 G⁻菌的裂解酶，可以用物理（如高压）和化学（如 EDTA、弱有机酸、柠檬酸）等方法协助其发挥作用，以增强其穿透细胞壁外膜的能力，拓宽其裂菌谱。研究发现，某些少数裂解酶具有广谱的杀菌能力，单独使用的情况下，不仅可以裂解 G⁻菌，也可以裂解 G⁺菌，可用于治疗混合感染。例如，何洋等发现类志贺单胞菌噬菌体 Gp4-7 的裂解酶 Gp2 能够高效裂解 5 种 G⁻菌，包括铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、黏质沙雷菌、摩氏摩根菌和弗氏柠檬酸杆菌，以及 3 种 G⁺菌，包括金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌，具有潜在的应用价值。在不影响裂解酶水解肽聚糖活性的前提下，目前主要有 3 种方法可提高 G⁻菌裂解酶活性：第一种方法是采用物理或化学方法帮助裂解酶突破细菌外膜，如氯仿或静水压处理后的铜绿假单胞菌可被裂解酶 KZ144 裂解；将铜绿假单胞菌噬菌体裂解酶 OBPGp279 和沙门菌噬菌体裂解酶 PVP-SE1gp146 分别与多种外膜渗透剂（如 lycotoxin1）组合成融合蛋白 Artilysins，在体外具有较好的裂菌活性。第二种方法是使裂解酶嵌合一段阳离子多肽或穿透性功能域。抗菌肽嵌合裂解酶可有效裂解细菌，抗菌肽电荷数、亲疏水性对嵌合裂解酶活性影响较大，该嵌合酶可破坏细菌外膜并直接结合到细菌肽聚糖上发挥降解作用。Lei 等将能够渗透细菌外膜的抗菌肽 SMAP-29 融合在裂解酶 KZ144 的 N 端，组合成融合蛋白 SMAP-29-KZ144，该融合蛋白通过大肠埃希菌表达纯化后，能够通过细菌外膜抵达细胞壁上的肽聚糖靶点，从而切割肽聚糖、杀灭铜绿假单胞菌。将鼠疫菌素上能特异识别耶尔森菌细胞膜上离子通道的序列与 T4 裂解酶融合，所得到的重组蛋白能借助离子通道通过耶尔森菌的细胞膜，导致耶尔森菌的死亡，而且对大肠埃希菌也有明显的杀灭效果。第三种方法是将裂解酶酸性氨基酸突变为碱性氨基酸以改变裂解酶携带的电荷数。如将蛋白质非功能区的酸性氨基酸改为碱性的精氨酸，可以提高蛋白质表面所带的正电荷数，而细胞壁外膜的磷脂双分子层大多携带负电荷，以此提高两者之间的亲和力，以帮助裂解酶穿过细菌外膜。

四、裂解酶作为抗菌剂的优势及应用策略

(一) 裂解酶对宿主菌具有相对特异性

多数裂解酶的作用位点保守，只作用于一种或者一类细菌，对其他种类的细菌没有作用。噬菌体裂解酶因其 C 端具有特异性结合域和 N 端特异性催化域，能与相应的宿主菌进行特异性结合，因此裂解酶抗菌作用具有很好的特异性，不影响环境和机体的正常菌群。

(二) 裂解酶抗菌作用高效

纳克级的裂解酶在与细菌接触的数秒内即可迅速使细菌细胞破裂，并在短时间内可使细菌下降几个数量级。Schuch 等将 2 个活性单位（2 μg）的炭疽芽孢杆菌 γ 噬菌体裂

解酶 PlyG 加入 1.0×10^4 CFU 耐链霉素的蜡样芽孢杆菌 RSVF1 中, 10 秒内就能使细菌裂解; 将 2 个单位的 PlyG 加入 1 mL (约 10^8 CFU) 对数生长期的 RSVF1 中, 20 秒就使细菌数量减少为原先的 $1/17\ 000$, 并在 2 分钟时几乎杀灭所有细菌。

(三) 裂解酶之间及与抗生素之间具有协同抗菌作用

研究发现裂解酶与抗生素之间具有协同抗菌效应, 且裂解酶与裂解酶之间也具有协同抗菌作用。裂解酶与其他抗菌药物联用, 不仅能够拓宽裂解谱, 且能够更高效地发挥抗菌活性, 降低细菌产生抗性的概率, 且对游离细菌、滞留菌和生物膜均有效。

(四) 细菌对裂解酶不易产生抗性

裂解酶是噬菌体裂解宿主菌并释放子代噬菌体所必需的工具, 与细菌同步相互作用、进化, 故产生宿主菌耐噬菌体裂解酶的可能性极低。这可能是由于噬菌体为了配合宿主菌的变异, 其裂解酶上针对宿主细胞壁受体分子的结合域经过长期演化, 使其具有特异性识别并杀死细菌的能力。这也可能与裂解酶在细菌细胞壁上的受体是胆碱或者其他保守结构有关, 这些结构为宿主菌生长所必需, 因此细菌很难产生针对裂解酶的抗性。

大多数细菌具有产生抗性机制的能力, 以保护自身免受抗菌剂的作用。这些机制包括细胞壁组分的变化、*efux* 泵过表达、酶修饰和穿孔素等。然而, 到目前为止尚未报道细菌产生针对噬菌体裂解酶抗性的现象。有研究表明, 在琼脂平板上培养细菌暴露于低浓度的裂解酶中, 即使经过 40 多个周期的相互作用, 也没有导致耐药菌株的产生。在液体培养中, 细菌暴露于低浓度裂解酶 (5~20 个单位) 10 个以上的周期后, 也没有分离出对裂解酶产生抗性的细菌。金黄色葡萄球菌持续暴露于亚抑菌浓度的裂解酶 LysH5 及 LysGH15, 同样也不会产生抗性菌株。

(五) 裂解酶的抗体不会削弱其杀菌作用

裂解酶对于动物机体而言属于外源蛋白, 很容易诱导机体产生特异性抗体, 这在很多研究中均有报道, 但是这些抗体不会显著影响裂解酶的杀菌活性。这可能是裂解酶与细菌细胞壁的结合效率远比抗体与裂解酶的结合力强所致, 当裂解酶进入血液循环中, 还来不及发生抗原抗体的反应时, 就很快与细菌细胞壁结合而发挥杀菌作用。此外, 对裂解酶的三维结构解析显示, 裂解酶的催化域和结合域均不是暴露于分子外部的抗原决定簇, 这可能造成免疫细胞不易产生针对催化域和结合域凹陷活性中心的抗体。

(六) 可用于细菌的快速检测

裂解酶的 C 端结合域对特定细菌具有特异性结合活性, 因此可利用裂解酶 C 端的细胞壁识别功能域来检测特定的靶细菌。基于此, 噬菌体裂解酶的结合域可用作病原菌快速检测的标签; 或者可以作为导向元件, 将其他药物引导至特定的病原菌。

五、裂解酶的免疫原性、安全性及体内清除

(一) 免疫原性

裂解酶用于临床治疗的潜在障碍之一是在全身和黏膜给药后能够诱导体液免疫应答。裂解酶的药代动力学与其他外源蛋白相似, 全身性传递给动物时裂解酶的半衰期大约为

因此,如果裂解酶要全身性地使用,则需要对其进行改良以延长其半衰期,或需要频繁地给药或静脉输注。使用裂解酶的另一个关注点是中和抗体的产生。这种抗体可以降低治疗期间体内裂解酶的浓度。抗生素一般不具有免疫原性的小分子,而裂解酶与抗生素不同,是可以刺激免疫反应的蛋白质的,当在黏液或以全身方式传递时,可能干扰裂解酶的活性。为了明确这个问题,研究人员测定了特异性兔超免疫血清对肺炎链球菌特异性裂解酶 Cpl-1 裂解活性的影响,发现高免疫血清能够减缓裂解酶的活性,但不影响 Cpl-1 最终的抗菌效果。当使用针对炭疽芽孢杆菌和化脓棒状杆菌特异性裂解酶 Cpl-1 的抗体进行类似的体外试验时,也发现抗体不能中和裂解酶的抗菌活性。这可能是因为裂解酶在细胞壁中的底物具有更高的亲和力。研究人员还在动物体内验证了这一结果,接受 3 次静脉注射 Cpl-1 的 6 只小鼠中有 5 只检测到了抗 Cpl-1 的 IgG。然后用肺炎球菌静脉内或皮下注射这些免疫和未免疫的小鼠,在 10 小时后用 200g Cpl-1 进行静脉给药。在 1 分钟后,裂解酶 Cpl-1 使提前接种该裂解酶的小鼠血液中的肺炎球菌滴度降低至与未接种裂解酶的小鼠相同的程度,证明裂解酶抗体在体内同样没有中和裂解酶的活性。Rashel 等用葡萄球菌裂解酶进行的一项类似实验也显示了同样的结果,且多次注射裂解酶的动物没有表现任何不良反应。

此外,溶葡萄球菌酶被报道,通过与聚乙二醇(PEG)缀合,可以显著降低裂解酶的免疫原性。已知蛋白质的聚乙二醇化降低了树突状细胞的抗体结合和摄取(并因此降低了抗原加工),以防止蛋白水解酶的接近,并减少肾脏超滤。因此,PEG 化的溶葡萄球菌酶,尤其是具有低 PEG 修饰程度的溶葡萄球菌酶,具有降低 10 倍以上的抗体结合亲和力和高达 24 小时的血清半衰期,而未修饰的酶则不到 1 小时。另外,低度聚乙二醇化导致酶的溶解活性仅略微降低,显著改善的药代动力学可以弥补这一影响。

(二) 安全性

已有大量实验研究证明了裂解酶的安全性。在单剂量和重复剂量毒性实验中,实验动物均未出现任何不良反应,重要器官及组织也未见严重的炎症反应或其他病变,且对正常菌群无影响。其他重复剂量毒性试验表明,实验动物的体质量、食物消化、眼科、心电图、尿常规、血液学、血液生化和脏器重量及宏观和微观检查等,均未见异常变化。只有一些每天均注射裂解酶的动物在持续 1 周以后,才出现了一些短暂、轻微的临床症状。此外,有研究在处理小鼠的体重和行为方面进行了 4 周评估,表明即使重复鼻腔或静脉内使用大量裂解酶也未显示出毒性迹象。因为在真核细胞中不存在肽聚糖,所以预计裂解酶在人体中也不会对正常细胞产生任何不良反应。但是,对于一些裂解酶,尤其是内肽酶,可能会影响哺乳动物组织,如溶葡萄球菌酶已被证明可以结合并降解动物的弹性蛋白,后者甘氨酸含量高。尽管在全身或局部给药后溶葡萄球菌酶未发现引起任何不良作用,但这一发现仍然值得关注。

(三) 裂解酶的体内清除

裂解酶是蛋白质分子,当应用于黏膜或全身时,会刺激机体产生免疫应答,有可能影响其活性,加快其体内清除速率。研究发现,肺炎链球菌噬菌体裂解酶 Cpl-1 在小鼠体内的半衰期很短,仅为 20.5 分钟,这导致 1~2 次应用 Cpl-1 不能完全清除小鼠体内的肺炎链球菌,之后感染会再次发生。还有研究显示,对小鼠腹腔反复 3 次注射裂解酶

MV-L 能够激活免疫应答, 会使其血清中的抗体水平大幅上升。因此, 免疫应答对裂解酶的影响主要在于加快体内清除。裂解酶在体内还可能被水解酶降解而失活, 经肾脏被清除, 这都加快了其在体内清除的速度, 从而对其临床应用产生较大的阻碍。有一些方法能够减缓裂解酶的体内清除。间隔适当时间反复给药或持续静脉给药能使裂解酶在体内长时间保持。Resch 等发现 Cpl-1 二聚体的血浆清除速度明显小于 Cpl-1 单体, 实验中小鼠尾静脉注射 30 分钟后 Cpl-1 二聚体的分子量超过人类肾小球 60 000~65 000 的滤过阈值的 7.76 倍, 这是因为 Cpl-1 二聚体的抗菌能力是相同摩尔浓度 Cpl-1 值的 2 倍。因此, 多聚裂解酶也是一种减缓裂解酶体内清除的方式。而 Resch 等尝试将 Cpl-1 与聚乙二醇连接, 以减缓其清除速率, 但聚乙二醇分子结构影响了裂解酶的活性。

六、裂解酶在细菌感染治疗中的应用

(一) 对 G⁺ 菌感染的治疗

1. 葡萄球菌 部分裂解酶本身具有较强的杀菌活性, 单独使用就可裂解包括 MRSA 在内的多种葡萄球菌。将作用位点不同的裂解酶混合使用, 或与抗生素联合使用, 或将裂解酶的 CHAP 结构域和溶葡萄球菌素的细胞壁结合结构域构成嵌合裂解酶等, 这些措施对实验中所有被测试的金黄色葡萄球菌菌株 (包括 MRSA 分离株) 都具有较高的抗菌活性, 明显提高了实验中患葡萄球菌性菌血症小鼠的存活率。Yang 等的一项研究发现, 来源于噬菌体裂解酶 PlyV12 的重组蛋白 V12CBD 具有降低金黄色葡萄球菌毒力与增强菌株被免疫清除的多重功能, 该研究首次发现一个蛋白质分子同时具有治疗和免疫保护效果, 为研究治疗包括 MRSA 菌株在内的超级细菌感染的药物提供了新的思路和潜在靶标。Bae 等的研究表明, 经鼻内服用重组裂解酶 SAL200, 并与抗生素联合用药, 可有效治疗小鼠致死性金黄色葡萄球菌感染。Sandhya Nair 等的实验表明, 来源于噬菌体的裂解酶 P128 可以通过裂解细胞壁肽聚糖的甘氨酸桥使葡萄球菌裂解, 可有效治疗由 MRSA 感染引起的大鼠菌血症, 而且耐药细菌用 P128 处理后对抗生素的敏感性得到了一定程度的恢复, 为将该裂解酶与抗生素联合应用提供了依据。Staphfect SA. 100 是一种重组噬菌体裂解酶, 它在局部皮肤上应用可特异地靶向甲氧西林敏感和甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌。Totté 等用 Staphfect SA. 100 成功治疗了 3 例与金黄色葡萄球菌感染相关的慢性复发性皮肤病患者。

目前进入临床治疗阶段的只有金黄色葡萄球菌噬菌体的裂解酶, 共 4 个, 具体临床研究进程见表 16-1。

表 16-1 金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶的临床试验研究进展

实施单位	国家	名称	感染类型	进展情况	试验编号	启动时间
ContraFect	美国	CF-301	金黄色葡萄球菌引起的菌血症	已完成 II 期试验	NCT03163446	2019/5/20
GangaGen	印度	P128	鼻腔金黄色葡萄球菌的消减	已完成 II a 期试验	NCT01746654	2016/3/5

实施单位	国家	名称	感染类型	进展情况	试验编号	启动时间
Amoy Resotechnology	韩国	SAL200	金黄色葡萄球菌引起的菌血症	启动 II a 期试验	NCT03089697	2018/8/8
Pharm Medica Center	荷兰	Staphyfekt SA 100	金黄色葡萄球菌引起的特征性皮炎	已完成 II 期试验	NCT02840955	2018/2/23

注：数据于 2019 年 6 月 9 日整理自 ClinicalTrials.gov。

2. 链球菌 通过构建嵌合酶是治疗链球菌感染的主要方式。Yang 等应用 LytA 自溶酶为模板鉴定了由链球菌噬菌体 SPSL1 编码的假定裂解酶 (gp20)，该假定裂解酶含有对肺炎链球菌高度特异的胆碱结合性重复单位 (choline-binding repeat, CBR)。为提高针对肺炎链球菌的裂解酶 Cpl-1 的活性，研究人员将结合域 GPB 与裂解酶 PlyC 的 CHAP 催化域融合，构建了一种新的嵌合裂解酶 Cly J。体外试验表明，连续 8 天将肺炎链球菌与逐渐递增浓度的 Cly J 孵育，未见到抗性菌株的产生。在对小鼠菌血症模型的治疗实验中，与青霉素 G 治疗对照组相比，单次腹腔内注射 Cly J 提高了致死性感染小鼠的成活率。Cly J 有望用于治疗肺炎球菌引起的感染。Gilmer 等鉴定了一种来源于猪链球菌噬菌体的新型裂解酶 Ply Ss2，其具有一个 N 端 CHAP 催化域和一个 C 端 SH3b 结合域，表现出极其广谱的裂解活性，可以裂解 MRSA、万古霉素中等敏感的金黄色葡萄球菌 (VISA)、猪链球菌、李斯特菌、模拟葡萄球菌、表皮葡萄球菌、马链球菌、无乳链球菌、化脓链球菌、血链球菌、G 群链球菌、E 群链球菌和肺炎链球菌等。Vouillamoz 等将抗肺炎链球菌的达托霉素和链球菌噬菌体裂解酶 Cp-1 在肺炎链球菌菌血症小鼠模型中进行联合使用，证实了二者可呈现协同效应，联合疗法显著提高了裂解酶对肺炎链球菌菌血症的治疗效果。

3. 其他 G⁺ 菌 产气荚膜梭菌是重要的人类食源性病原菌，该菌的芽孢在土壤、粪便或环境中可持续存在，并且会引起许多严重的动物和人类的感染疾病，如食物中毒、气性坏疽和坏死性肠炎等。Teresa Gervasi 等鉴定了一种产气荚膜梭菌的裂解酶 CP25L，其裂解活性与来自其他产气荚膜梭菌噬菌体裂解酶有所不同，原核表达的裂解酶 CP25L 能裂解参试的 25 株产气荚膜梭菌。炭疽杆菌能够引起人畜共患传染病炭疽，炭疽芽孢很容易储存、运输和传播，并可能在土壤中存活几十年。噬菌体裂解酶 plyb 和 PlyG 可作用于炭疽杆菌，使腹腔接种炭疽杆菌的小鼠 100% 存活，Plyb 和 PlyG 表现出不同的催化活性并切割不同的肽聚糖位点，因此将两种裂解酶联合使用抗炭疽效果非常显著。Hongming Zhang 等克隆、表达、纯化并研究了粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 噬菌体裂解酶的特征，该裂解酶对参试的大多数粪肠球菌菌株均有抗菌活性，与其他已报道的粪肠球菌噬菌体裂解酶相比展现出多功能的酶学特性。

(二) 对 G⁻ 菌感染的治疗

1. 鲍曼不动杆菌 多重耐药性鲍曼不动杆菌已成为最重要的医院感染病原菌之一。已有报道表明，重组裂解酶 Ply AB1 对 206 株多重耐药鲍曼不动杆菌 (MDRAB) 及 48 株泛耐药鲍曼不动杆菌 (PDRAB) 在 30 分钟内均表现出高效的杀灭作用。还有研究人员从基于 13 株鲍曼不动杆菌前噬菌体的基因组文库中筛选出编码可能具有溶菌活性的基

因,从中表达获得了可以裂解鲍曼不动杆菌的裂解酶 Ply F307,在小鼠感染模型中,1.0 mg Ply F307 可使腹腔注射了 10^8 CFU 鲍曼不动杆菌的小鼠达到 50% 的存活率。Mya Thandar 等的研究表明鲍曼不动杆菌噬菌体裂解酶 Ply F307 的 C 端 108~138 组成的多肽 P307 对鲍曼不动杆菌表现出高效的杀灭活性 ($>3\log$ s),通过对 P307 设计改造,获得了活性更好的 P307 SQ-8C 衍生物 ($>5\log$ s 的杀灭效果),而且 P307 和 P307 SQ-8C 在体外对鲍曼不动杆菌生物膜均表现出显著的清除作用。

2. 铜绿假单胞菌 该菌引起的感染多发生在身体衰弱或免疫受损的住院患者,常引起术后感染、肺部感染和尿路感染等,是重要的医院内病原菌。目前已有多项研究发现裂解酶在 EDTA 或有机酸存在的条件下能够杀灭铜绿假单胞菌。有研究将抗菌肽和裂解酶共价结合构建重组裂解酶,由于抗菌肽有靶向细菌膜结构的作用,因此能够介导裂解酶穿过 G^- 菌的细胞壁外膜,5 分钟可使铜绿假单胞菌下降 3 个 \log s,其中还包括一些多重耐药的菌株。噬菌体编码的具有裂解活性的蛋白质包括裂解酶和病毒颗粒相关肽聚糖水解酶 (VAPGH),在治疗铜绿假单胞菌感染方面都具有应用潜力。大多数 dsDNA 噬菌体在感染时用 VAPGH 降解肽聚糖,而裂解酶则在裂解周期的后期裂解宿主细胞。对于 dsRNA 噬菌体而言,仅编码一种具有裂解活性的蛋白,这种蛋白质位于病毒外膜,在穿入过程中可降解 PG,并在后期子代噬菌体的释放过程中起重要作用。目前仅有 7 个已测序的 dsRNA 噬菌体,其中 phi YY 是唯一 1 个感染人铜绿假单胞菌的噬菌体。Yuhui Yang 等将噬菌体 phi YY 编码的裂解酶命名为 Ply17,并对其进行了克隆、纯化, Ply17 含有一个 PG 结合域和一个溶酶样家族 (lysozyme-like-family) 域。Ply17 在经通透剂处理的 G^- 菌表现出广谱的抗菌活性,尤其在加入 0.5 mmol/L EDTA 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH7.5 的条件下,可达最好的裂解活性。而且, Ply17 可有效裂解包括金黄色葡萄球菌在内的 G^+ 菌,有望成为治疗多重耐药细菌的新药物。

3. 其他 G^- 菌 很多裂解酶因其具有特异性,所以只能针对 1 种细菌,但最近有研究发现,将裂解酶与 EDTA 或有机酸等细胞通透剂联用可使裂解酶杀灭 2 种甚至 2 种以上的细菌。如裂解酶 ABgp46 在不加细胞通透剂条件下仅特异性杀灭鲍曼不动杆菌,但若与有机酸联合使用,则其对铜绿假单胞菌和鼠伤寒沙门菌都有较强的裂解活性。裂解酶 Lys68 仅可杀灭铜绿假单胞菌,但是若与柠檬酸或苹果酸联合使用,则可以在 2 小时内使 9~11 种 G^- 菌下降 3~5 \log s,其中包括鼠伤寒沙门菌、鲍曼不动杆菌、宋内志贺菌、大肠埃希菌和阪崎肠杆菌等。Antonova 等报道了三种新克隆的裂解酶的体外抗菌活性研究,包括 Lys Am24、Lys ECD7 和 Lys Si3,这三种裂解酶能裂解铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌和伤寒沙门菌菌株,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 足以清除 5 \log s 以上的活细菌。Guangmou Yan 等将大肠菌素 A (colicin A) 的受体结合域与大肠埃希菌噬菌体裂解酶融合,获得了融合蛋白 Colicin-Lyse3,这种融合蛋白可以从外部对大肠埃希菌呈现裂菌作用,在体内还可显著降低小鼠肠道感染模型中大肠埃希菌的数量。

(三) 裂解酶破坏细菌生物被膜

细菌生物被膜是指细菌黏附于植入的医疗器械或受损组织,通过自身产生的外部多糖基质、纤维蛋白质和脂蛋白等包裹细菌群体,是细菌相对于浮游状态的一种群体生存形式。细菌生物被膜可提高细菌对外界理化环境的抵抗力 (可达到浮游细菌的 1 000 倍

以上巨大的成熟中的效葡萄球菌、细菌

Sar 0.5 物 (C 阴 对 的 唑 治

往

禾

以上),使细菌不易被抗生素或常规消毒剂杀死。细菌生物被膜的产生,给临床治疗带来巨大挑战。Raymond Schuch 等的研究表明噬菌体裂解酶 CF-301 不但对金黄色葡萄球菌生物膜具有清除作用,而且对凝固酶阴性葡萄球菌、化脓链球菌、无乳链球菌形成的成熟生物膜均具有破坏作用。裂解酶 CF-301 既能有效地破坏生物膜,还可以杀死生物膜中的细菌。在治疗由 MRSA 引起的小鼠菌血症方面,裂解酶 CF-301 与抗生素联合治疗的效果要优于各自的单独治疗效果。与其相似,Yufeng Zhang 等的研究也表明金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 LysGH15 在低浓度时能够显著抑制葡萄球菌生物被膜的形成,提高浓度时还可以有效的破坏已经形成的成熟生物被膜,且裂解谱很广,包括金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和溶血葡萄球菌等。不过,到目前为止,还未见应用裂解酶直接治疗细菌生物被膜性感染动物的报道。

(四) 裂解酶可恢复多重耐药菌对抗生素的敏感性

来源于噬菌体的裂解酶 P128 可以通过裂解葡萄球菌肽聚糖的甘氨酸桥来裂解细菌,Sandhya Nair 等的研究结果表明低于最小抑菌浓度的 P128 ($0.025 \sim 0.20 \mu\text{g/mL}$) 和 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的苯唑西林相结合,可以使 4 株 MRSA 细菌的生长受到抑制,用其他参试药物也得到相似的结果。亚最小抑菌浓度的 P128 可使金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性 (CoNS) 菌株恢复对 SoC (standard-of-care) 药物的敏感性。对金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性菌株的棋盘滴定实验显示, P128 和抗生素联合使用可抑制细菌生物膜的形成。对耐药性金黄色葡萄球菌和 CoNS 菌株的扫描电镜及菌落计数试验证实亚最小抑菌浓度的 P128 和 SoC 抗生素联合可杀死被生物膜包裹的细菌。在体内亚治疗剂量的 P128 和苯唑西林可以保护致死性菌血症的动物。以上研究表明, P128 和 SoC 抗生素的联合应用是治疗耐药性葡萄球菌感染的一种新策略。

尽管裂解酶有很多优势,但同时仍存在一些问题:

- (1) 有些天然裂解酶在大肠埃希菌中表达时对表达菌株具有明显的毒性,表达蛋白往往以包涵体的形式存在。
- (2) 裂解酶本质是蛋白质,进入机体后易受到蛋白酶的攻击,且易被机体免疫系统和滤过系统清除,因此半衰期较短。
- (3) 很难掌握裂解酶在治疗过程中的最佳应用时间和最适剂量。
- (4) 裂解酶的裂解谱比抗生素窄。
- (5) 如何长期地保存裂解酶、如何高效安全地给药、如何大量生产和应用裂解酶、如何评价裂解酶治疗的效用等,都有待解决。

第三节 与裂解相关的其他噬菌体编码蛋白

与裂解相关的其他主要噬菌体编码蛋白还包括穿孔素、转运信号多肽 (signal peptide) 和跨膜素等。

一、穿孔素

(一) 概念

穿孔素 (perforin) 是一种疏水性的跨膜蛋白,不仅是构成跨膜孔的重要元件,而且