

# 裂解性噬菌体内溶酶和穿孔素抗革兰阴性菌的研究进展

荣睿璠, 曾君, 郭志良, 左君豪, 赵瑞利\*, 郭海悦, 孙旭阳

(天津农学院 动物科学与动物医学学院/天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室, 天津 300392)

**摘要:**随着细菌耐药情况的日益严重,人们开始寻找抗生素的代替物,噬菌体内溶酶(endolysin)和穿孔素(holin)受到了关注。其中内溶酶展现了良好的抑菌潜力,与抗生素和噬菌体制剂相比有着一定的优点。而内溶酶的作用特点决定了其在抑制革兰阴性菌时需要穿孔素的协同,因此有研究利用基因工程把内溶酶和穿孔素进行重组来解决这一问题。此外,在噬菌体-细菌相互作用的研究中,已有研究表明噬菌体基因参与调控细菌间的通讯系统,内溶酶和穿孔素正是其中重要的调控因素。本文通过对噬菌体与噬菌体制剂的研究进展、内溶酶和穿孔素抗革兰阴性菌的研究进展及其应用进行了综述,以期对未来有关噬菌体裂解酶的研究提供思路。

**关键词:**裂解性噬菌体;革兰阴性菌;内溶酶;穿孔素

[中图分类号] S852.65 [文献标识码] A [文章编号] 1004-6704(2023)04-0037-04

## Research Progress of Lytic Phage Endolysin and Holin Against Gram-negative Bacteria

RONG Ruifan, ZENG Jun, GUO Zhiliang, ZUO Junhao, ZHAO Ruili\*, GUO Haiyue, SUN Xuyang

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University/Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Healthy Breeding, Tianjin 300392, China)

**Abstract:** With the increasing severity of bacterial drug resistance, people began to look for alternatives to antibiotics, and bacteriophage endolysin and holin attracted attention. Among them, endolysin show good antibacterial potential and have certain advantages compared with antibiotics and bacteriophages. The action characteristics of endolysin determine that it needs the cooperation of holin when it inhibits gram-negative bacteria. Therefore, it has been studied to use genetic engineering to recombine endolysin and perforin to solve this problem. In addition, in the study of bacteriophage bacteria interaction, previous studies have shown that bacteriophage genes are involved in the regulation of bacterial communication system, of which endolysin and holin are important regulatory factors. This article reviews the research progress of bacteriophages and bacteriophage preparations, the research progress and application of endolysin and holin against gram-negative bacteria, with a view to providing ideas for future research on bacteriophage lyase.

**Key words:** lytic phage; gram-negative bacteria; endolysin; holin

### 1 噬菌体与噬菌体制剂的研究进展

噬菌体(bacteriophage, phage)是对细菌、真菌

等微生物发动侵袭的病毒,宿主特异性极强,数量极大,是病毒中分布最广泛、最普遍的一个种。噬菌体由发现到正式提出“噬菌体”这一概念经历了近 20 年的时间,由数位来自不同国家的科学家接力完成。

#### 1.1 裂解性噬菌体和溶原性噬菌体

作为一种病毒,噬菌体只能在具有活性的细菌内寄生,由单一核酸和蛋白质构成。大部分噬菌体依靠尾部将自身的遗传物质注入宿主菌,按尾部形状分为多面体、丝状体和多形性噬菌体三类。噬菌体的生长繁殖方式与其他病毒略有不同,概述为 5 个阶段。在感染的开始,噬菌体对宿主菌进行吸附,随后侵入宿主菌体内,借助宿主菌的活性物质进行

[收稿日期] 2022-11-18

[基金项目] 天津市应用基础与前沿技术研究计划一般项目(18JCYBJC30100、14JCYBJC30000);天津市高校“中青年骨干创新人才”培养计划;天津市奶牛(肉羊)、生猪产业技术体系创新团队建设项目(ITTCRS2021000);天津市天津市研究生科研创新项目(2021YJSS140)。

[作者简介] 荣睿璠(1998-),女,天津人,硕士,研究方向:分子病原细菌学。E-mail:877284486@qq.com

\*[通信作者] 赵瑞利(1979-),女,河北石家庄人,博士,副教授,研究方向:分子病原细菌学。E-mail:zhaoruili1109@126.com

增殖、完成子代噬菌体的装配,最终使宿主菌发生裂解。

根据与宿主菌关系的不同,又可以分为使宿主

菌裂解的裂解性噬菌体和与宿主菌共生的溶原性噬菌体,其生命周期由图 1、图 2 所示。

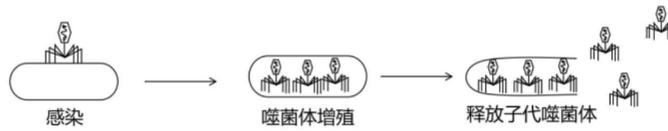


图 1 裂解性噬菌体的生命周期

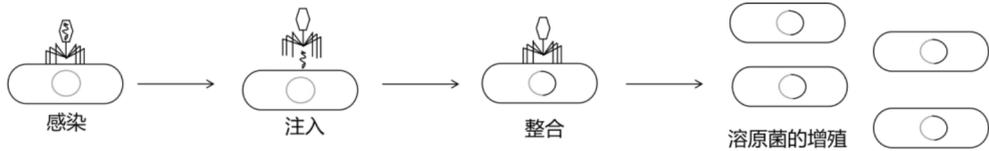


图 2 溶原性噬菌体的生命周期

## 1.2 噬菌体制剂

首次提出“噬菌体”这一概念的法籍加拿大学者 D'Herelle 在 1919 年提出用噬菌体制剂来治疗患有细菌性痢疾的病人,随着该患者的治愈,噬菌体制剂的治疗价值也得到了初步认可。1931 年, D'Herelle 和 Eliava 首次大规模使用噬菌体来防治印度地区的霍乱,治疗数据表明,对照组的死亡率超过 60%,而噬菌体制剂的治疗组死亡率不足 7%。近年来细菌耐药的问题日渐严峻,抗生素替代品成为了当前的研究热点,噬菌体制剂就是其中之一。

相比于抗生素,噬菌体是一种病毒,像所有病毒一样可以自然地发生选择和进化,具备突破细菌的防御机制的天然能力。不仅如此,噬菌体高度的宿主特异性,使得它们可以被用来消除食物中特定的病原菌,又由于在没有活的宿主菌存在的情况下噬菌体无法生存繁殖,在环境中不能长时间停留,也就进一步降低了污染的风险。但是,在实际应用中,被用于治疗噬菌体制剂也存在着一些需要关注的问题。

首先,噬菌体的增殖严格依赖宿主细胞,增殖速度也取决于宿主细胞的增长速度。这就要求噬菌体制剂必须要以最佳接种剂量和接种时期来使用,否则噬菌体可能会在发挥作用前就会被宿主当做异己排除。此外,噬菌体如在体外长期使用也会导致噬菌体不敏感突变体 (phage insensitive mutants, PIMs) 的出现,而噬菌体的高度特异性,导致其作为抑菌剂使用时抑菌谱过窄。不仅如此,已有研究表明,少数噬菌体基因组携带有致病菌的毒力基因,这些毒力基因能够随噬菌体转移给宿主菌并整合在宿主菌的基因组上。这说明了噬菌体对于细菌的基因水平的影响,并且也揭示了与致病性菌株的关联性。

## 2 裂解性噬菌体内溶酶和穿孔素的研究进展

从裂解性噬菌体的抑菌机理上来看,裂解性噬菌体能使宿主菌细胞破裂导致宿主菌的死亡,而使宿主菌细胞发生破裂的主要原因是裂解性噬菌体裂解系统中裂解酶的存在。相比裂解性噬菌体本身,这些裂解酶作为蛋白质,裂解谱更宽,由于对蛋白质的操作手段日趋成熟,也便于科研人员进行研究。

### 2.1 裂解性噬菌体的内容酶

裂解性噬菌体裂解系统中的功能蛋白目前研究最多的是内容酶 (endolysin)。释放于噬菌体繁殖的后期,化学本质为蛋白酶,能特异性地裂解细菌细胞壁的肽聚糖主键,从而达到破坏细菌细胞壁的目的。由于革兰阴性菌含有一层肽聚糖的保护外膜,导致内容酶无法直接接触到细菌的细胞壁,但在穿孔素的协调作用下,最终能使内容酶与革兰阴性菌的细胞壁肽聚糖发生接触。

大多数裂解酶 N 端为酶活性结构域 (enzymatically active domains, EADs), C 端为细胞壁结合结构域 (C-terminal cell wall binding domains, CBDs)。内容酶由双链 DNA 噬菌体 (dsDNA 噬菌体) 编码,由于革兰阴性菌和革兰阳性菌的细胞壁并不完全相同,对应的内容酶的化学结构也略有不同。革兰阴性菌噬菌体的内容酶 90% 以上为球状结构,通常只含有催化结构域, CBD 缺失, C 端为带电荷的结合残基。作为天然的蛋白质,内容酶可以被生物降解,不易造成环境污染。在体内作用时可能会引起机体产生免疫反应,但根据内容酶的快速动力学反应早于宿主免疫系统的特点进行推测,内容酶不易引起宿主的免疫反应。已有研究表明,细菌抗

性的主要形成机制均在细胞内部,因而在细胞外靶向水解肽聚糖的内溶酶使细菌不易对其产生抗性。根据内溶酶的作用机制来推测,细菌对内溶酶产生抗性最可能通过修饰自己的细胞壁来实现,然而,尚没有在宿主细菌中发现存在有类似的抗性产生机制。

内溶酶不仅特异性高,且兼具抗药性发生率低的特点,与抗生素协同使用时治疗效果更佳,现已成为被高度关注的新型抗菌物质。

## 2.2 裂解性噬菌体的穿孔素

裂解性噬菌体还能分泌穿孔素(holin),其具体作用机理是通过其在细胞质中的不断累积,达到一定的浓度后在革兰阴性菌保护肽聚糖的外膜上形成孔洞,帮助内溶酶通过,进一步与肽聚糖接触,它也是决定噬菌体感染周期结束时间的一个因素。体外实验中,在没有内溶酶存在的情况下穿孔素依然可以使细菌活力丧失,这是因为穿孔素虽然没有使细菌破裂,但它在细胞膜上形成的孔洞,使环境中的有毒有害物质进入细菌细胞,最终导致细菌死亡。穿孔素的作用对革兰阴性菌或革兰阳性菌来说并无区别,因此它具有广谱的、非特异性的抗菌活性。

现已发现的两种穿孔素分别为能形成孔径可达 500kDa 的 Canonical-Holins 和形成孔径较小的 Pin-Holin。其中,形成大孔的 Canonical-Holins 可允许蛋白质或蛋白复合物通过,形成小孔的 Pin-Holin 可以阻止内毒素的释放,因此是用来处理能产生内毒素的革兰阴性菌的一个选择。

在针对穿孔素的研究过程中,逐步发现穿孔素在扩大表达和克隆上存在一些困难。首先,作为一种膜蛋白的穿孔素无法避免低溶解度这一特性,而溶解度低就意味着在扩大表达上难度很大,此外,由于其没有选择性的在细胞膜上形成孔洞,细胞毒性极高,大剂量克隆困难。

## 3 裂解性噬菌体内溶酶和穿孔素的应用

### 3.1 抗革兰阴性菌

革兰阴性菌的细胞壁较革兰阳性菌薄,但其拥有包裹肽聚糖的一层以脂蛋白、脂质双层和脂多糖构成的外膜,正是这一特殊的结构,阻碍了内溶酶与革兰阴性菌细胞壁肽聚糖的直接接触。有研究用几种有机酸充当外膜渗透剂,与不动杆菌噬菌体的内溶酶协同使用,发现抗菌活性得以增加和扩大,特别是对鲍曼氏杆菌、铜绿假单胞菌和鼠伤寒沙门菌的抑菌作用明显,证明在外膜渗透剂的存在下,革兰阴性菌的细胞壁发生了裂解。

对于单独将内溶酶应用于抑制革兰阴性菌的设想,有研究利用基因工程把内溶酶进行重组来实现这一问题。Artilynsins 就是一种融合了穿孔素和内溶酶的基因工程蛋白,在研究中,Artilynsins 对革兰阴性菌的抗菌活性、抑菌范围比单独使用内溶酶时表现出更高的水平。此时穿孔素充当了外膜渗透剂的作用,融合了内溶酶和外膜渗透剂的重组蛋白对革兰阴性菌细胞壁的作用是直接的,并不像噬菌体还需与宿主细菌进行吸附、注入核酸和利用宿主活性物质自我复制等过程,对比噬菌体制剂的治疗方法来说,具有更高的效率。但目前为止,正是由于革兰阴性菌细胞壁的特殊结构,导致对噬菌体内溶酶抗革兰阴性菌的研究较少。

### 3.2 提高食品安全

畜牧养殖业最为关心的另一方面则是如何提高经济效益,具体涉及到动物源性食品的质量和经济损失动物的疾病控制等诸多方面。裂解性噬菌体分泌的内溶酶凭借着高度的特异性,成为了人们解决这些问题的又一选择。

将内溶酶直接应用于食品中可以特异性的杀死有害菌,提高动物源性食品的食品安全,而对于经济动物来说,使用内溶酶对细菌性疾病进行预防和治疗,不失为降低经济动物感染高致病性、高传播性疾病的一种手段,借此可以最终实现提高养殖业经济效益这一愿景。

### 3.3 探究噬菌体-细菌的相互作用

有研究表明,噬菌体基因参与调控细菌间的通讯系统。群体感应系统(Quorum sensing, QS)是细菌中存在的一种通讯系统,在这个系统中用来交流的信号分子被称为自我诱导物(AIs),其中,革兰阳性菌产生的自我诱导物称为寡肽,而革兰阴性菌产生的自我诱导物化学名称为乙酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactones, AHLs)。细菌 QS 的基本过程是细菌与细菌之间发生的信号分子的转移。传统的 QS 模型假设信号分子在细胞之间自由扩散,与该模型一致,亲水性信号分子能够自然完成跨细胞膜的自由扩散,但许多疏水性信号分子已被证明积聚在细胞包膜中。最近的研究表明,细菌释放膜囊泡(membrane vesicles, MVs)含有疏水性信号分子,并在几种细菌中作为载体起作用。脱氮副球菌是一种革兰阴性菌,产生和利用乙酰基高丝氨酸内酯(AHLs),即 N-十六烷酰基-L-高丝氨酸内酯(C16-HSL)。之前已有证明,这种细菌在 MVs 中富集了 C16-HSL,并将其传播给其他细胞,功能是调节细胞聚集,虽然 C16-HSL 单独存在时,由于其

高疏水性而不能在水性环境中很好地扩散,但有 MVs 存在的条件下 C16-HSL 能够分散。革兰阴性菌的 MVs 形成的典型模型是外膜起泡,而 DNA 损伤正是致使细菌发生 MVs 的一个诱因。前噬菌体的内溶酶和穿孔素,在这些过程中发挥重要作用。已知内溶酶-穿孔素系统在宿主细菌发生 DNA 损伤后,在噬菌体裂解周期中通过细胞裂解从宿主细菌释放噬菌体颗粒。内溶酶通过穿孔素在内膜上形成的孔从细胞质转移到周质。内溶酶通过酶活性降解细菌细胞壁,导致细胞裂解和噬菌体颗粒释放。该研究中,脱氮副球菌 Pd1222 在 DNA 损伤条件下通过细胞裂解产生 MVs,前噬菌体区域的表达被上调,在噬菌体区域发现了内溶酶和穿孔素,这些基因的表达受到 RecA 的调控,使用基因敲除技术,最终得到前噬菌体编码的内溶酶在 DNA 损伤的条件下对 MVs 的形成十分重要的结论,初步表明细菌间的通信系统是由噬菌体基因控制的。

### 3 结论与展望

随着细菌耐药情况的日益严重,人们开始寻找抗生素的代替物,噬菌体制剂就是其中之一。然而,通过前期的研究,科研人员也关注到噬菌体制剂存在的一些弊端,如噬菌体在体外长期使用同样会导致噬菌体不敏感突变体的出现,以及少数噬菌体携带的毒力基因、耐药基因能够随噬菌体转移给宿主菌等一系列的问题。

通过研究裂解性噬菌体的抑菌机制,发现裂解性噬菌体分泌的内溶酶存在良好的抑菌潜力,同时与抗生素和噬菌体制剂相比有着一定的优点,如细菌对内溶酶产生抗性的可能性微乎其微、几乎不会引起机体的免疫反应,使内溶酶现已成为被高度关注的新型抗菌物质。而内溶酶的作用特点决定了其在抑制革兰阴性菌时需要穿孔素的协同,因此有研究利用基因工程把内溶酶和穿孔素进行重组来解决这一问题,重组基因工程蛋白 Artilyns 对革兰阴性菌的抗菌活性、抑菌范围比单独使用内溶酶时表现出更高的水平。而穿孔素由于自身特异性低、溶解度低的特点,扩大表达和克隆困难重重,因此还应继续发掘穿孔素在物质运输方面的作用原理和应用。目前,与噬菌体有关的研究重心已经逐渐向噬菌体-细菌的互相作用方面偏移,已有研究表明噬菌体基因参与调控细菌间的通讯系统,噬菌体内溶酶和穿孔素正是其中重要的调控因素。

#### 参考文献:

[1] 孙新城,胡旭阳,许素月,等. 噬菌体裂解酶在食品安全

领域的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(24): 9415-9421. DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2021.24.014.

- [2] 李刚,胡福泉. 噬菌体治疗的研究历程和发展方向[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(10): 807-813. DOI: 10.13461/j.cnki.cja.006086.
- [3] 解天慧. 大肠杆菌 O157:H7 和沙门氏菌噬菌体及其内溶酶和穿孔素的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2021. DOI: 10.27684/d.cnki.gxndx.2021.003321.
- [4] GILCREASE E, WILLIAMS R, GOEL R. Evaluating the effect of silver nanoparticles on bacteriophage lytic infection cycle-a mechanistic understanding[J]. Water Res, 2020, 181: 115900.
- [5] 胡颖,李洪军,贺稚非. 噬菌体防控食源性致病菌的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(1): 246-251. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.017523.
- [6] KEEN E C. Phage therapy: Concept to cure[J]. Front Microbiol, 2012, 3: 238.
- [7] SABOURI S, SEPEHRIZADEH Z, AMIRPOUR R S, et al. A minireview on the in vitro and in vivo experiments with anti-Escherichia coli O157: H7 phages as potential biocontrol and phage therapy agents[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 243: 52-57.
- [8] KEEN, ERIC C. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology [J]. Bioessays, 2015, 37(1): 6-9.
- [9] SORIN B A, JULIE C, AMANDA F, et al. Phage therapy targeting Escherichia coli-a story with no end? [J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(22).
- [10] NILSSON, ANDERS S. Phage therapy-constraints and possibilities[J]. Upsala Journal of Medical Sciences, 2014, 119(2): 192-198.
- [11] HODYRA S K, MIERNIKIEWICZ P, DRAPALA J, et al. Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 14802.
- [12] 闫广谋. 大肠杆菌噬菌体裂解酶突变体与融合蛋白 Colicin-Ly-sep3 的构建及其菌外裂解活性的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [13] MONDAL S I, DRAPER L A, ROSS R P, et al. Bacteriophage endolysins as a potential weapon to combat Clostridioides difficile infection[J]. Gut Microbes, 2020, 12(1): 1813533.
- [14] MINGQUAN G, CHUNYAN F, JIE R, et al. A Novel Antimicrobial Endolysin, LysPA26, against Pseudomonas aeruginosa[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 293.

(下转第 43 页)