

噬菌体裂解酶的抗菌特性

王琰¹, 陆承平^{1,2*}

(¹上海交通大学农业与生物学院,上海市兽医生物技术重点实验室,上海 200240)

(²南京农业大学动物医学院,农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,南京 210095)

摘要:噬菌体裂解酶是一类细胞壁水解酶,可水解肽聚糖,造成细菌的破裂。裂解酶一般具有两到三个结构域,参与对底物的催化和结合。作为一种新型的杀菌剂,裂解酶已被越来越多地应用于化脓链球菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性细菌病的治疗。与抗生素治疗相比,裂解酶不易使细菌产生抗性且作用相对专一,这可能是解决现在日趋严重的细菌耐药性的一种可行方法。另外,裂解酶还具有高效性,作用协同性,且自身抗体不削弱其作用等优势,使之成为未来预防、控制致病菌一种可能的新途径。

关键词:噬菌体裂解酶;抗生素;抗菌特性

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2009)10-1277-05

噬菌体是一种感染原核细胞的病毒,其感染的最后一步就是水解细菌细胞壁释放成熟颗粒(丝状噬菌体除外)。小RNA或单链DNA噬菌体通过合成干扰宿主细菌肽聚糖合成的酶而导致宿主菌胞壁的水解;而双链DNA噬菌体则通过在病毒复制晚期合成的一类细胞壁水解酶,即裂解酶(lysin或endolysin),又称内溶素、溶胞壁酶,水解宿主菌的肽聚糖结构。

1 裂解酶的功能和结构域

双链DNA噬菌体通过穴蛋白-裂解酶裂解系统破坏细菌细胞壁结构,从而使宿主菌破裂。这一概念最早由Young等提出,现已得到普遍认同^[1]。裂解的具体过程是,受感染的细菌细胞晚期合成穴蛋白(holin)和裂解酶。穴蛋白到达细胞膜形成一种同源低聚物损害膜或者在细胞膜上形成“洞穴”(hole),改变宿主菌细胞膜通透性,使裂解酶易于通过而攻击肽聚糖,结束肽聚糖的合成,破坏胞壁质,

裂解宿主细胞,结束感染周期。

裂解酶主要作用于肽聚糖上的糖苷键和肽键,其中葡萄糖苷酶(glucosidase)水解肽聚糖氨基糖之间的糖苷键。酰胺酶(amidase)和肽链内切酶(endopeptidase)水解肽侧链和交联桥之间的氨基或肽键连接。转糖基酶(transglycosylase)将氨基糖之间的 β -1,4-糖苷键转换为分子内脱水型1,6-胞壁酸^[2](见图1)。相比之下,酰胺酶和葡萄糖苷酶往往具有更广的裂解谱。这是因为肽聚糖的酰胺连接和氨基糖之间的 β -1,4糖苷键连接在细菌种间往往是保守的^[3]。所以,其相应的裂解酶就具有更广的裂解谱。作者研究了所在实验室分离的猪链球菌噬菌体SMP的裂解酶LySMP的裂解谱,结果表明,裂解酶的裂解谱较广,不但可以裂解2型、7型、9型猪链球菌,而且还可以裂解马兽疫链球菌亚种(*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),而SMP的宿主谱只有两株2型猪链球菌。经序列比对发现该酶具有的2个

基金项目:农业部公益性行业科研专项项目(200803016)

*通信作者。Tel: +86-25-84396517 E-mail: lucp@njau.edu.cn

作者简介:王琰(1981-),女,山东人,博士研究生,研究方向为预防兽医学与畜禽产品安全。E-mail: wy34201591@126.com

收稿日期:2009-05-12;修回日期:2009-06-19

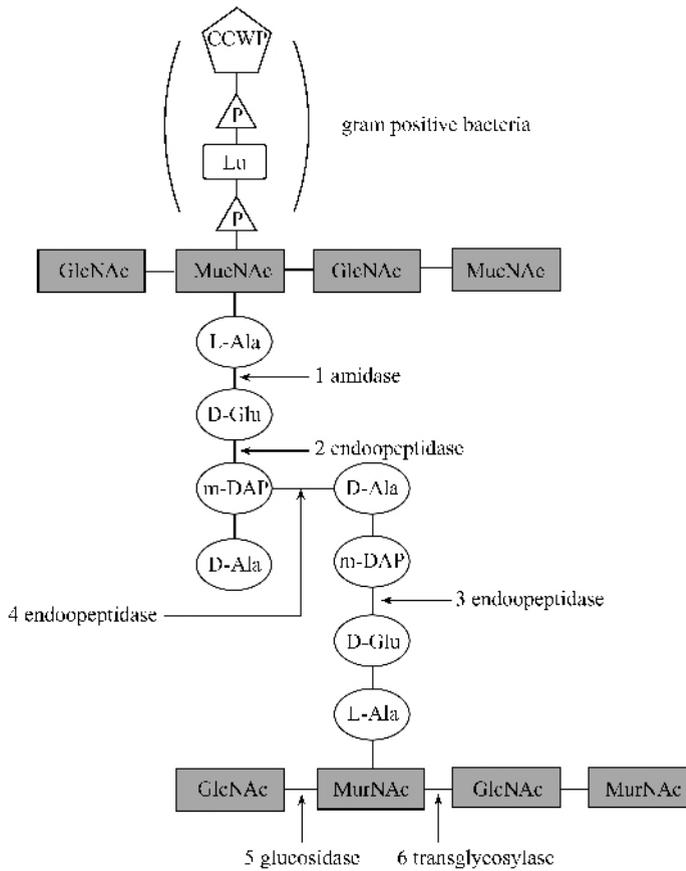


图1 裂解酶在革兰氏阳性菌细胞壁肽聚糖的靶位^[2] 根据 Loessner(2005) 修改

Fig.1 Endolysin targets on peptidoglycan for gram-positive bacteria. Abbreviations: CCWP, carbohydrate cell wall polymer; GlcNAc, N-acetyl glucosamine; LU, linkage unit; m-DAP, meso-diaminopimelic acid; MurNAc, N-acetyl muramic acid; P, phosphate group.

催化结构域,一个具有肽链内切酶的活性,另一个,具有葡萄糖苷酶的活性^[4]。

有些双链 DNA 噬菌体裂解酶不具备穴蛋白-裂解酶裂解系统。Loessner 等(1995 年,1997 年)研究发现,在蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的噬菌体裂解酶 TP21 和李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的噬菌体裂解酶 A511 中,裂解酶 N 端与信号肽序列同源性很高,这说明其 N 端具有与穴蛋白相似的功能,可以将自身引导至细胞壁靶点^[5-6]。

革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶与一般的酶一样有两个结构域,即 N 端催化结构域和 C 端结合结构域。但也有的裂解酶有两到三个不同的催化域而只有一个结合域。如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)噬菌体 Φ11、前噬菌体 LambdaSa2、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)噬菌体 B30 等的裂解酶^[7-9]。裂解酶一般通过水解细菌细胞壁发挥作用,但也有些采取完全不同的机制。Ikada 等(1992 年)研究发现,T7 噬菌体裂解酶的作用较特殊,除了具有酰胺酶活性以外,还能够通过结合 T7 聚合酶抑

制宿主细菌基因的转录^[10]。

裂解酶的 C 端结合宿主菌细胞壁特殊的糖类,这种结合对后来的催化是必要的。一般认为,只有单独 N 端的裂解酶一般是没有催化活性的,其催化活性只有当 N 端和 C 端完美结合后才具有。不过事实并非完全如此,有些 C 端缺失或部分缺失的裂解酶其裂解活性反而急剧上升。Loessner 等(1999 年)研究发现,金黄色葡萄球菌裂解酶 PlyTW 其全酶只具有相对弱的活力,具有更高活力的是其 N 端的 157 aa,而 158-227 aa 和 158-628 aa 没有任何的裂解活性^[11]。Cheng 等(2007 年)的研究也表明,B 群链球菌 PlyGBS 在去掉了 C 端 302 aa,仅保留 1-141aa 时,裂解活性是全酶的 28 倍^[12]。

2 裂解酶杀菌的作用特点

革兰氏阳性菌由于其肽聚糖层位于细菌外层,所以其噬菌体的裂解酶可以直接用于杀灭细菌。早在 1957 年就已报道噬菌体的裂解酶可发挥溶菌作用,但直到 2001 年才将纯化的裂解酶应用于化脓链

球菌(*Streptococcus pyogenes*)在小鼠黏膜表面增殖的防控^[13]。在细菌对抗生素产生越来越严重耐药性的情况下,裂解酶以其独特的优点,越来越受到重视,已经成为一种较有吸引力的杀菌制剂,对其研究也越来越多。裂解酶的杀菌特点可概括如下:

2.1 细菌对裂解酶不产生抗性

在裂解酶应用之初,这一问题已经被关注。在 Nelson 等(2001年)研究中,将化脓链球菌长时间暴露于含低浓度裂解酶的平板上,连续传代40次也不会产生抗性^[13]。在 Loeffler(2001年)研究中也获得同样的结果。将肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)与低浓度裂解酶 Pal 混合,经过液体培养基中的10次传代,不会出现抗性细菌^[14]。这可能是由于 Pal 在肺炎链球菌上的受体是胆碱,而胆碱对于肺炎链球菌的存活是必需的。噬菌体在与细菌共同进化的数千年里,可能为了脱离宿主,裂解酶的结合结构域针对宿主细胞壁受体分子经过演化,能够特异性识别细菌并杀死细菌,使细菌很难对其产生耐受性。

2.2 裂解酶的特异性介于抗生素和噬菌体之间

裂解酶比抗生素具有更好的特异性,相对于噬菌体,裂解谱又扩大了。Djurkovic 等(2003年)研究发现^[15],可裂解肺炎球菌青霉素耐药株的裂解酶,对人体的正常菌群却不产生影响,而抗生素往往在杀死病原菌的同时,也杀死了一部分人体正常菌群。在很多情况下,裂解酶的裂解谱却可以超出噬菌体宿主谱。如瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)噬菌体 Φ-0303 的裂解酶 Mur-LH,无乳链球菌噬菌体 B30 的裂解酶和产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)噬菌体 Φ3626 的裂解酶 Ply3626 均可裂解多种细菌^[16-18]。而具有酰胺酶活性的裂解酶还具有更宽的裂解谱,可以裂解不同类的细菌。Yoong 等(2004年)报道的引起人发病的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)噬菌体 Φ1 的裂解酶 PlyV12 可能是裂解谱最广的,不但可以裂解粪肠球菌和乳酸肠球菌(*Enterococcus lactis acid*),还可以裂解化脓链球菌、B群、C群链球菌和金黄色葡萄球菌等致病菌^[19]。

2.3 裂解酶的抗体不会削弱其杀菌作用

裂解酶由于是较大的蛋白分子,所以通过粘膜或经由全身循环注入动物体内时有可能产生免疫反应而影响自身作用的发挥。但 Loeffler 等(2003年)研究发现中和抗体的产生不会削弱裂解酶自身的杀菌作用^[20]。在裂解酶 Cpl-1 对肺炎链球菌作用的体外实验中,Cpl-1 产生的兔超免疫血清只会减缓 Cpl-

1 的作用而不会阻碍其作用。在体内试验中,实验组是 Cpl-1 三次静脉注射免疫的小鼠,对照组是未免疫的小鼠。用肺炎球菌对小鼠进行静脉攻毒 10 h 后,再注入 Cpl-1,结果发现,在 1 min 之内,实验组和对照组都使细菌滴度降低了相同的程度。Rashel 等(2007年)应用 phiMR11 裂解酶对金黄色葡萄球菌的体内试验也获得了同样的结论^[21]。这可能是由于裂解酶对细菌细胞壁的亲和力远比对抗体强。这样就可以通过在动物粘膜表面或血液中重复注入裂解酶控制病原菌的定殖。

2.4 裂解酶作用迅速

体外实验中,裂解酶可以在与细菌接触的几秒钟内迅速破裂细菌细胞,作用非常快速。纳克级的裂解酶即可使细菌浊度下降几个数量级^[22]。作者对猪链球菌裂解酶 LySMP 的体外实验研究发现,50 μg/mL 的裂解酶可以在半小时之内使敏感菌的细菌浊度下降 1~7 个数量级。裂解酶在加入细菌悬液几分钟后,有的菌株出现肉眼可见的浊度下降^[4]。裂解酶在体内试验中作用同样快速。虽然裂解酶在体内的半衰期很短,如肺炎链球菌裂解酶 Cpl-1 的半衰期只有 16 min。但 Loeffler 等(2003年)研究发现将肺炎链球菌通过静脉注射小鼠体内 1 h 后,再注入 2.0 mg 裂解酶 Cpl-1 可使小鼠存活 48 h,其中有一只小鼠在血中和组织中的病原菌已经消除。而对照组平均只能存活 25 h,只有 20% 的小鼠可以存活 48 h^[20]。这表明,裂解酶短时间内已经发挥了杀菌效力。

2.5 不同裂解酶以及与抗生素具有协同效应

两种酶共同使用可有协同作用或竞争抑制作用。对裂解酶来说,无论是几种裂解酶之间或裂解酶与抗生素之间,都具有协同效应。Jado 等(2003年)研究发现,高浓度肺炎球菌噬菌体 Dp-1 和 Cpl-1 (200 μg)可以使小鼠全部存活,低浓度的肺炎球菌噬菌体 Dp-1 和 Cpl-1 的裂解酶(2.5 μg)共同使用也可以使小鼠全部存活,而 5 μg 的 Dp-1 或 Cpl-1 单独使用时,小鼠因严重的菌血症全部死亡。所以,低浓度的酶混合物可以发挥与高浓度的单酶相同的效果,酶之间具有协同效应^[23]。裂解酶与抗生素共同使用也发挥协同杀菌作用。Djurkovic 等(2005年)研究中,将裂解酶 Cpl-1 与庆大霉素共同使用,可以降低青霉素对肺炎球菌的最小抑菌浓度(MIC)。当 Cpl-1 与青霉素共同使用时,可以协同杀死青霉素耐药菌株^[24]。Rashel 等(2007年)研究也证明了裂解酶与抗生素之间的协同效应。当金黄色葡萄球菌噬

菌体 Φ MR11 的裂解酶 MV-L 与糖肽类抗生素共同使用时,可以很好的控制耐万古霉素金葡菌的繁殖^[21]。裂解酶与抗生素的协同效应,也为解决现在越来越严重的细菌耐药性问题提供了另一种思路。

3 展望

自 2001 年裂解酶被作为一种抗菌制剂应用于局部细菌感染的治疗以来,越来越多的裂解酶已通过原核表达的方法制备提纯,用于细菌感染相关疾病的治疗。由于裂解酶的高效性、相对专一性、安全性且细菌不对其产生抗性这些独特的优势,已经成为一种颇具潜力的杀菌制剂,将会得到越来越广泛的应用,特别是对于某些难以采用常规方法治疗的耐药性细菌,发掘和应用其高性能的裂解酶更具理论和实用价值。目前,已经通过基因工程的方法将不同裂解酶的催化域和结合域连接起来,形成嵌合体裂解酶。这样的裂解酶不但具有很高的杀菌活性,较广的裂解谱,而且还可以适用于不同 pH 环境中病原菌的杀灭,所以,这也成为裂解酶研究的一个热点。裂解酶资源丰富,地球上大约有 10^{31} 种噬菌体,噬菌体裂解酶有可能成为未来预防、控制致病菌的新途径。

参考文献

- [1] Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiology Review*, 1992, 56(3): 430 - 481.
- [2] Loessner MJ. Bacteriophage endolysins-current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(4): 480 - 487.
- [3] Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS microbiology reviews*, 2008, 32(2): 149 - 467.
- [4] Wang Y, Sun JH, Lu CP. Purified recombinant phage lysin LySMP: an extensive spectrum of lytic activity for swine Streptococci. *Current Microbiology*, 2009. Published on line.
- [5] Loessner MJ, Maier SK, Daubek-Puza H, et al. Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(9): 2845 - 2851.
- [6] Loessner MJ, Wendlinger G, Scherer S. Heterogeneous endolysin *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzyme and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Molecular Microbiology*, 1995, 16(6): 1231 - 1241.
- [7] Navarre WW, Ton-That H, Faull KF, et al. Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage phi11. Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(22): 15847 - 15856.
- [8] Pritchard DG, Dong S, Kirk MC, et al. LambdaSa1 and lambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae*. *Applied Environmental Microbiology*, 2007, 73(22): 7150 - 7154.
- [9] David MD, Juli FF, Shengli D, et al. The cell lysis activity of the *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30 endolysin relies on the cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase domain. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5108 - 5112.
- [10] Ikeda RA, Bailey PA. Inhibition of T7 RNA polymerase by T7 lysozyme in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(28): 20153 - 20158.
- [11] Loessner MJ, Gange S, Scherer S. Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(15): 4452 - 4460.
- [12] Cheng Q, Fischetti VA. Mutagenesis of a bacteriophage lytic enzyme PlyGBS significantly increases its antibacterial activity against group B streptococci. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(6): 1284 - 1291.
- [13] Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(7): 4107 - 4112.
- [14] Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, 2001, 294(5549): 2170 - 2172.
- [15] Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(1): 375 - 377.
- [16] Deutsch SM, Guezenc S, Piot M, et al. Mur-LH, the broad-spectrum endolysin of *Lactobacillus helveticus* temperate bacteriophage phi-0303. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 96 - 103.
- [17] Pritchard DG, Dong S, Baker JR, et al. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*, 2004, 150(7): 2079 - 2087.
- [18] Zimmer M, Vukov N, Scherer S, et al. The murein hydrolase of the bacteriophage f3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5311 - 5317.

- [19] Yoong P, Schuch R, Nelson D, *et al.* Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(14): 4808 – 4812.
- [20] Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti V. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infection and Immunity*, 2003, 71(11): 6199 – 6204.
- [21] Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, *et al.* Efficient elimination of multidrug – resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phiMR11. *The Journal of Infectious Diseases*, 2007, 196(8): 1237 – 1247.
- [22] Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(10): 491 – 496.
- [23] Jado I, Lopez R, Garcia E, *et al.* Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 52(6): 967 – 973.
- [24] Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(3): 1225 – 1228.

Bacteriophage lysins: progress and perspective-A review

Yan Wang¹, Chengping Lu^{1 2}

(¹ Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

(² Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology of Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Phage endolysin targets the integrate cell wall and attack bonds in the peptidoglycan, resulting in degradation of bacteria. It features two or three domain structures, involving one or two catalytic domains and one binding domain. Endolysin is a promising antibiotic agent against gram-positive bacteria pathogen, such as *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus*. Compared to antibiotics, it is more specific and tested bacteria show no resistance to lysin. Therefore, it's a feasible measure for solving drug resistant problem. Beyond this, it is highly active and rapid lysis efficiency and has synergy effect when used together or with other antibiotics. Antibody against endolysin will not neutralize its activity. So endolysin treatment may be a new approach for preventing and controlling of bacteria pathogen.

Keywords: phage endolysin; antibiotics; antibiotic features

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Special Fund for Public Welfare Industry of Chinese Ministry of Agriculture (200803016)

Corresponding author. Tel: +86-25-84396517; E-mail: lucp@njau.edu.cn

Received: 12 May 2009/ Revised: 19 June 2009

《微生物学报》投稿方式

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 邮寄纸样:所有来稿均需要邮寄1份纸稿和介绍信。
- (3) 稿件受理费:收到本刊编辑部的“受理通知”后,请邮寄100元受理费,务必通过邮局汇款,切忌随信邮寄!
注:务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号”。