

噬菌体疗法: 回顾与展望

田而慷¹, 王 玥¹, 吴卓轩¹, 万紫千红¹, 程 伟^{2△}

1. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院(成都 610041);

2. 四川大学华西医院 呼吸与重症医学科(成都 610041)

【摘要】 目前, 细菌感染的治疗主要使用抗生素, 但随着抗生素耐药性问题越发严重, 迫切需要新的治疗方法。因此, 噬菌体疗法将是解决细菌耐药性的一种潜在选择, 并可考虑噬菌体与抗生素联合治疗。遗憾的是, 目前缺乏设计良好的噬菌体疗法临床对照试验, 希望未来有更多的研究着眼于解决噬菌体疗法抗菌谱窄、安全性未知和细菌抵抗等问题。部分难治性疾病如乳腺癌和酒精性肝炎在临床治疗上也较难处理, 噬菌体在这些领域成功的实验研究报道给未来更多的难治性疾病提供了新的治疗思路。除此之外, 噬菌体在疫苗应用和骨再生中也有不错的表现。本文综述了上述噬菌体疗法在相关疾病的应用及其治疗机制。最后, 通过对噬菌体疗法现存不足进行总结, 并对其在系统性疾病中的应用前景进行展望, 以期能进一步推动对噬菌体疗法的临床应用研究。

【关键词】 噬菌体疗法 多药耐药 系统性疾病

Bacteriophage Therapy: Retrospective Review and Future Prospects TIAN Er-kang¹, WANG Yue¹, WU Zhuo-xuan¹, WAN Zi-qian-hong¹, CHENG Wei^{2△}. 1. State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Respiratory and Intensive Care Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: chengwei669@scu.edu.cn

【Abstract】 At present, bacterial infections are mainly treated with antibiotics, but new treatment methods are urgently needed because of growing problems with antibiotic resistance. Therefore, phage therapy will be a potential solution to the problem of bacterial drug resistance, and the combined use of bacteriophage and antibiotics is also considered a potential treatment option. However, there has not been any well-designed clinical controlled trials on phage therapy. More future research needs to be done to solve the problems of phage therapy, for example, its narrow antibacterial spectrum, the uncertainty regarding treatment safety, and the bacterial resistance. Some refractory diseases such as breast cancer and alcoholic hepatitis are difficult to treat clinically. The successful experimental research on bacteriophages reported in these fields provides new ideas of treatment for more refractory diseases in the future. In addition, bacteriophages also showed promising performance in vaccine applications and osteogenesis. We herein summarize the existing weaknesses of phage therapy and its application prospects in treating systemic diseases, hoping to promote further clinical application research of phage therapy.

【Key words】 Phage therapy Multidrug resistance Systemic disease

细菌可通过多种机制对抗生素产生耐药性, 耐药细菌(如耐药金黄色葡萄球菌、耐药铜绿假单胞菌等)导致的感染若无法有效控制, 会导致病情加重, 甚至危及患者生命。而噬菌体可特异性识别细菌, 有效摧毁细菌的防御系统, 因此使用噬菌体疗法取代抗生素治疗, 或是将噬菌体与抗生素联合应用于治疗, 均具有广阔的前景, 且联用的协同抗菌作用已被证明有效^[1]。

虽然噬菌体疗法作为实验疗法蓬勃发展, 但在具体的临床研究中, 学者们逐渐发现噬菌体疗法存在以下几方面的问题: ①抗菌谱的局限性: 由于对宿主细菌的特异性识别, 噬菌体的抗菌谱较窄。②噬菌体的毒性: 噬菌体

可能携带一些毒素基因, 在治疗期间对人体产生不利影响。③细菌的抵抗: 细菌可以利用规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)系统抵御噬菌体的侵染。这些问题影响了噬菌体疗法代替抗生素用于疾病治疗的可行性、合理性及疗效的持久性。噬菌体作为一种病毒在进入人体内必然会引发机体免疫的产生, 目前已有针对噬菌体引起免疫反应的研究, 但仍无法确定噬菌体抗体如何影响实验结果^[2]。

为了进一步开展噬菌体疗法的研究, 本综述以噬菌体疗法替代抗生素用于疾病的治疗为主题展开, 并涉及部分难治性疾病的研究进展, 同时对目前的临床研究的局限性提出建议, 供研究者参考。

△ 通信作者, E-mail: chengwei669@scu.edu.cn

1 噬菌体疗法的治疗机制探讨

噬菌体是一种攻击细菌的病毒,由两个部分组成——核酸(DNA或RNA)和蛋白质。噬菌体可以分为温和噬菌体和裂解噬菌体^[3]。温和噬菌体感染宿主细菌后将其基因整合到细菌染色体中而不发生增殖;裂解噬菌体在宿主细菌中会进行复制和增殖,并产生大量子代,最终裂解宿主细菌。噬菌体疗法通常利用裂解噬菌体^[4]。通常来说,裂解噬菌体感染细菌首先需要通过其表面结构蛋白特异性识别并吸附于宿主菌表面受体,这一步骤主要取决于噬菌体尾部蛋白与细菌表面结合位点的分子结构互补性^[5]。有尾噬菌体主要通过裂解酶水解细胞壁的肽聚糖从而释放子代噬菌体,裂解酶可以通过单一蛋白质抑制肽聚糖的合成,或者溶素和打孔-溶解酶系统酶解肽聚糖,这两种方式来裂解细菌肽聚糖^[6]。

噬菌体是一种天然的抗菌药物,内在毒性低,能自我复制,与宿主的结合具有高度的特异性且能够与宿主共同进化,因此能够有效地治疗耐药细菌引起的感染^[7-8]。噬菌体可以通过几种不同的机制适应细菌的生长过程。目前已经发现噬菌体可通过编码蛋白因子来调控宿主核糖核酸酶的特异性或编码核糖核酸酶来启动其自身基因转录^[9]。此外,噬菌体可以通过宿主群体感应途径诱导产生病毒子代^[10]。而对于常见细菌,噬菌体主要通过穴蛋白和裂解酶来杀灭宿主菌,穴蛋白穿过宿主细胞膜与裂解酶共同作用,使裂解酶接触并裂解细菌肽聚糖,导致细菌溶解^[11]。

然而,在噬菌体治疗过程中,细菌也可以利用各种防御机制来对抗噬菌体感染,比如使结合噬菌体的受体发生改变,大肠杆菌O157:H7删除了其OmpC蛋白以防止特定噬菌体PP01和 ϕ SA039的吸附^[12]。外膜载体是细菌产生的特殊结构,在噬菌体感染的时候可以诱导噬菌体将其DNA注入囊泡来逃脱感染,如霍乱弧菌的外膜载体能中和3个不同的噬菌体(ICP1、CIP2和ICP3)^[13]。此外细菌还可以通过CRISPR系统防止噬菌体的侵袭,通过将外源DNA(间隔区)整合到CRISPR基因座中,当CRISPR位点转录时,间隔区序列就会引导Cas核酸酶蛋白切割进入细胞的核酸^[14-15]。

而在癌症的治疗中,噬菌体也可以通过几种不同的途径来达到治疗效果。例如噬菌体可以选择性地内化到癌症细胞中,参与细胞膜褶皱和肌动蛋白骨架的重排,这一过程主要通过干扰肌动蛋白动力学来实现^[16]。此外,噬菌体抗肿瘤还可能与衣壳上的赖氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(KGD)氨基酸基序有关,野生型噬菌体T4的突变体

HAP1抑制黑色素瘤与其KGD基序暴露有关^[17]。此外,噬菌体通过激活核因子(NF)- κ B信号诱导树突细胞成熟进而促进CD8⁺T淋巴细胞分泌干扰素(IFN)- γ ,最终活化相关细胞毒性T细胞^[18]。最后,噬菌体疗法可适应不同现有资源、感染类型和患者的特点,从而表现出多功能性^[19]。

2 噬菌体疗法在抗感染治疗中的应用

2.1 局部感染

2.1.1 呼吸道感染 在治疗呼吸道感染方面,噬菌体制剂包括液体悬浮液制剂、噬菌体固体制剂和以推进剂为基础的噬菌体制剂^[19],且吸入技术能够做到将噬菌体制剂输送到感染位点^[8]。一项研究表明,肺部给药噬菌体PEV20干粉可以用于治疗多药耐药铜绿假单胞菌FADDI-PA001引起的小鼠肺部感染^[20]。一项研究通过建立噬菌体展示的人抗体V结构域文库,鉴定出了一个能以高亲和力结合抗体V的噬菌体ab8,通过进一步实验,发现低至2 mg/kg的剂量也能中和野生型小鼠的严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2),并在仓鼠SARS-CoV-2感染模型中显示出良好的预防和治疗效果^[21]。这两项实验都使用了噬菌体治疗呼吸道感染并取得了良好的疗效,第一项实验创新性地使用了干粉作为给药途径,而第二项实验给COVID-19的治疗提供了一个新思路,希望进一步的研究能探明其临床应用的可行性和安全性。

2.1.2 皮肤感染 研究显示,大多数慢性创面/溃疡治疗(86.1%, $n=310$)和皮肤病感染(94.9%, $n=734$)的患者在噬菌体治疗之后病情得到缓解或改善^[22]。作为一种皮肤感染疾病,痤疮慢性复发,非常容易产生抗生素耐药性,在一项研究中,从人体皮肤微生物丛中分离出了10个噬菌体,并且证明了这些噬菌体对痤疮细胞具有溶解活性^[23]。这两项研究都显示了使用噬菌体治疗浅表细菌感染的有效性,且不同给药途径均安全。

糖尿病足溃疡是糖尿病的严重并发症,足部形成有利于微生物定植的开放性伤口,严重时会引起下肢截肢^[24]。KIFELEW等^[25]发现利用AB-SA01噬菌体鸡尾酒可以有效治疗多药耐药金黄色葡萄球菌所致糖尿病创面感染,并能促进创面闭合,实验结果与万古霉素处理相同且均优于生理盐水对照组,未来希望有进一步的实验指出噬菌体疗法与抗生素疗法的区别。

2.1.3 消化道感染 致病性大肠杆菌EPEC是一种引起严重腹泻的耐药性大肠杆菌,近年来EPEC对常用抗生素的耐药性不断增加,VAHEDI等^[26]通过比较噬菌体和环丙沙星在感染了EPEC的小鼠模型中的治疗效果,发现噬菌体疗法不仅可以使体内EPEC含量下降,还能保证小鼠正

常生长。这项实验的成功给未来治疗耐药菌引起的消化道感染提供了新的思路,但是遗憾的是实验仅局限于动物层面,未能进一步进行临床验证。

2.1.4 口腔感染 牙周病和根管感染均与粪肠球菌感染密切相关^[27-28]。已经发现一些噬菌体可以专门对付粪肠球菌,如噬菌体EF24C^[29]、EFDG1^[30-31]、*tp Ef11*^[32]、*tp VPE25*、*tp VFW*^[33]和部分转基因噬菌体^[34]。对于多药耐药甚至耐噬菌体的粪肠球菌,基因工程噬菌体可以破坏宿主的生存条件。TINOCO等^[32]研究了噬菌体 ϕ Ef11感染粪肠球菌后的反应,通过删除噬菌体阻遏基因使原噬菌体转变为裂解噬菌体,并通过替换启动子来逃避宿主的抑制反应,最终将其修饰为 ϵ Ef11/ ϵ FL1C(Δ 36)*PnisA*菌株,修饰后的噬菌体可以有效破坏细菌的生物膜,这体现了噬菌体基因工程在临床治疗中的潜力。

2.2 菌血症

万古霉素抗药性肠球菌(VRE)在胃肠道的滋生会使个体对VRE菌血症和/或心内膜炎变得更加敏感。在一项关于VRE感染小鼠的研究中^[35],即使将噬菌体治疗推迟到所有动物都濒死才进行,也能救治约50%的动物,进一步的研究发现噬菌体的作用与其功能有关,而非引起宿主的非特异性免疫,但是遗憾的是噬菌体预防VRE感染的具体机制并未探明。

引起菌血症的金黄色葡萄球菌易形成生物被膜而耐受多种抗生素,其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是导致医院感染的常见菌种,约30%的医院感染由MRSA引起^[34]。对于耐药金黄色葡萄球菌的治疗,研究显示噬菌体AB-SA01对401株临床分离的金黄色葡萄球菌(包括甲氧西林耐药株)的杀伤率为94.5%,对205株已知多重耐药株的杀灭率为95%^[36]。在另外一项研究中,通过比较噬菌体和苯唑西林对感染金黄色葡萄球菌的糖尿病和非糖尿病小鼠的治疗效果,发现注射裂解噬菌体GRCS可以显著保护两类小鼠免受致死性菌血症的侵袭^[37]。这两项实验都表明了噬菌体疗法对于金黄色葡萄球菌导致的菌血症有一定的治疗能力,且对多药耐药的金黄色葡萄球菌也有不错的治疗效果。

2.3 其他

对临床医生来说,由铜绿假单胞菌引起的继发感染是一个巨大的挑战,而OMKO1噬菌体通过结合铜绿假单胞菌的外排泵蛋白杀死细菌,目前已经有1例治疗个案报道^[38]。而另一名感染铜绿假单胞菌的26岁女性囊性纤维化患者使用AB-PA01(由4个裂解噬菌体组成,可有效裂解大多数铜绿假单胞菌)进行治疗后,患者未复发铜绿假单胞菌肺炎,囊性纤维化也未恶化,并且没有其余不良事件

发生^[39]。噬菌体疗法有效地避免了铜绿假单胞菌引起的严重感染性疾病,这两例临床案例给未来进一步的临床研究奠定了基础,但遗憾的是研究对象过少,尚不能说明其有效性及安全性。

3 噬菌体疗法用于部分难治疾病

3.1 噬菌体疗法治疗乳腺癌

乳腺癌常转移至骨、肺、肝和脑等并导致严重继发疾病^[40]。目前用于治疗乳腺癌的新方法主要有溶瘤病毒疗法、病毒和噬菌体展示免疫疗法等新技术。噬菌体展示免疫疗法通过与噬菌体外壳蛋白的基因融合来呈递多肽或蛋白质抗原,而噬菌体结构制剂可作为抗癌的保护性或预防性疫苗^[41]。此外,丝状噬菌体可以作为载体与抗癌药物结合,将药物输送到癌细胞进行靶向治疗。已经证明含有特定氨基酸序列肽的噬菌体可以选择性地内化到SKBR-3乳腺癌细胞中,参与细胞膜褶皱和肌动蛋白骨架的重排,这一过程需要能量并且通过干扰肌动蛋白动力学使得肌动蛋白丝重组,增加SKBR-3细胞的膜褶皱^[16]。目前关于噬菌体治疗乳腺癌已经有足够的实验证明其有效性,关于其机制的探讨也已经明晰,未来希望有更多的临床试验证明其有效性。

3.2 噬菌体疗法用于治疗酒精性肝炎

酒精性肝炎目前尚无有效的治疗方法^[42]。肠道中的病毒可能与酒精性肝炎的严重程度有关,一项实验发现在酒精性肝炎患者的粪便样本中,肠道病毒类群发生了改变并与疾病严重程度和死亡率有关^[43]。在针对酒精性肝炎的治疗中,DUAN的团队^[44]发现,细胞溶血素是导致肝细胞死亡和肝损伤的原因之一,健康人群和酗酒者相比,大多数酒精性肝炎患者体内含有粪肠球菌,他们创新性地使用了噬菌体作为治疗手段,发现噬菌体减少了人源化小鼠肝脏中的溶血素,消除了酒精引起的肝脏疾病。这两项实验都指出酒精性肝炎的发生与细菌有一定的关系,可尝试用噬菌体疗法,但都出自同一个研究团队,证据薄弱,还需其他研究团队进一步研究验证。

4 新的研究方向:疫苗和骨再生

将噬菌体运用于疫苗或者运用于骨再生之中也是研究的方向。现有两种基于噬菌体的疫苗:噬菌体展示疫苗和噬菌体DNA疫苗^[45]。这两者结合可以产生第三种混合噬菌体疫苗。噬菌体展示疫苗是指噬菌体因其基因特异性,会展示肽或蛋白抗原,并以化学或生物学方式在其表面结合抗原,从而将免疫原性肽或蛋白传递到靶细胞或组织。噬菌体DNA疫苗是由插入噬菌体基因组的真核

启动子驱动的疫苗基因,由噬菌体携带到靶细胞诱导产生抗原。混合噬菌体疫苗是另一种DNA疫苗,它们依靠抗原提呈细胞或抗原本身具有较高的亲和力的噬菌体蛋白质或肽,和携带其基因组编码特定抗原的真核表达盒两种途径来增强免疫应答。基于噬菌体的疫苗可用于预防病毒感染和细菌感染^[46]。除了应用于疫苗,噬菌体在一些新兴领域也有独特的作用。仿生矿化是一种以仿生骨为原料制备骨生物材料的新方法。在天然骨中,羟基磷灰石(HAP)优先定向于与天然骨中的胶原纤维平行的轴心,但是这在人工骨生物材料中是不容易实现的。利用基因工程丝状噬菌体模拟骨组织中的胶原纤维,成功构建了HAP的核和组装模板,克服了定向控制的不足^[47]。HAP组装是制备骨基质以诱导骨形成的潜在基石。这些材料有望在不久的将来应用于骨再生种植中^[4]。

5 噬菌体疗法的不足:思考与创新

虽然已经有许多研究报道证明噬菌体疗法在多种疾病中都有显著的治疗效果,但是还没有一项双盲随机对照临床试验产生的数据支持^[48]。在临床上,将噬菌体疗法应用于替代抗生素用于治疗疾病有几个瓶颈问题。一是如何扩大噬菌体的抗菌谱进而应用于更多的细菌感染,二是如何防止细菌CRISPR系统抵御噬菌体,三是如何选用正确剂量的噬菌体用于治疗,四是如何避免噬菌体的细胞毒性。

目前已经有部分针对这些问题的报道,但是仍然缺乏系统及全面的研究,对这些问题提出更为确切的解决方法。噬菌体对宿主细菌存在特异性识别,所以其抗菌谱较窄,有时因为感染疾病的细菌种类较多,如果无法明确定位主要病原菌并使用特定的噬菌体,则治疗效果可能就会明显降低,一项针对噬菌体治疗铜绿假单胞菌引起的烧伤创面感染研究证明了这一点^[49]。细菌可以利用CRISPR系统抵御噬菌体,该系统可以裂解噬菌体和质粒DNA,目前还缺乏有效避免这种抵御发生的方法^[50-51]。由于噬菌体疗法还处于药代动力学的早期测定阶段,对于患者血清中的最佳治疗性噬菌体浓度还缺乏了解,因此需要更多的研究指出如何避免不正确剂量的噬菌体引发机体的病理反应和如何确定有效的噬菌体治疗浓度^[48]。此外,噬菌体治疗的安全性也需要被考虑,目前对噬菌体进行全面的体外细胞毒性检测实验也很少。但是应该注意的是,通常情况下导致安全问题的多数是温和噬菌体^[28, 52]。高溶解性噬菌体诱导的黏膜细菌菌株的破坏可以增加释放的细菌蛋白的总量,模式识别受体系统可以识别这些细菌蛋白,并可能增加引发炎症的风险^[27]。而

在静脉注射时,噬菌体可能引发免疫反应,这可能是由噬菌体本身或噬菌体制剂中的某些成分刺激造成^[53-54]。最后,在噬菌体治疗过程中引发机体产生的抗体对于噬菌体疗法的影响仍不明确,在不同的研究报道中提到的结论都有所不同,ŁUSIAK-SZELACHOWSKA等^[2]的研究指出血清中抗体水平与噬菌体疗法的转归并无相关性,而GÓRSKI等^[45]认为噬菌体和能够穿透细菌感染部位的抗体之间的局部相互作用,比在外周血液中的这种相互作用,与噬菌体疗法的结局更相关。

针对以上噬菌体疗法的不足,我们提出了可能的解决办法与对未来实验的建议。在针对噬菌体抗菌谱窄的问题时,使用噬菌体鸡尾酒或者将噬菌体与抗生素联合应用来扩大噬菌体的抗菌谱都是不错的选择。在最近一项针对泌尿感染的实验中,研究发现膀胱内噬菌体疗法在治疗泌尿系统感染方面和标准抗生素疗法效果类似,但在有效性或安全性方面没有明显优于安慰剂治疗^[55]。所以进行更多的针对噬菌体鸡尾酒和噬菌体与抗生素联合治疗疾病的研究是有必要的。为了明确噬菌体抗体在治疗中的作用,通过建立血清中噬菌体抗体实时监测系统是一种很好的方法,可以追踪噬菌体抗体在治疗过程中的产生情况及对治疗效果的影响,此外建立良好控制的临床试验数据和复杂的监管框架还能及时发现并有效避免噬菌体对于人体产生不良的影响。

本文总结了噬菌体疗法目前的研究现状及前景,但研究数据都是在单个患者的基础上或者基于动物模型基础上而生成,未来还需要更多关于噬菌体疗法的研究来验证其可行性。

参 考 文 献

- [1] JEON G, AHN J. Assessment of phage-mediated inhibition of *Salmonella Typhimurium* treated with sublethal concentrations of ceftriaxone and ciprofloxacin. *FEMS Microbiol Lett*, 2020, 367(19): 19.
- [2] ŁUSIAK-SZELACHOWSKA M, MIĘDZYBRODZKI R, FORTUNA W, et al. Anti-phage serum antibody responses and the outcome of phage therapy. *Folia Microbiol (Praha)*, 2021, 66(1): 127-131.
- [3] HESSE S, ADHYA S. Phage therapy in the twenty-first century: facing the decline of the antibiotic era; is it finally time for the age of the phage? *Annu Rev Microbiol*, 2019, 73: 155-174.
- [4] SUNDERLAND K S, YANG M, MAO C. Phage-enabled nanomedicine: from probes to therapeutics in precision medicine. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(8): 1964-1992.
- [5] CHATTERJEE S, ROTHENBERG E. Interaction of bacteriophage λ with its *E. coli* receptor, LamB. *Viruses*, 2012, 4(11): 3162-3178.
- [6] HERMOSO J, GARCÍA J, GARCÍA P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol*,

- 2007, 10(5): 461–472.
- [7] CHANG R Y K, WALLIN M, LIN Y, *et al.* Phage therapy for respiratory infections. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 133: 76–86.
- [8] GOLSHAHI L, SEED K D, DENNIS J J, *et al.* Toward modern inhalational bacteriophage therapy: nebulization of bacteriophages of *Burkholderia cepacia* complex. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2008, 21(4): 351–360.
- [9] YANG H, MA Y, WANG Y, *et al.* Transcription regulation mechanisms of bacteriophages: recent advances and future prospects. *Bioengineered*, 2014, 5(5): 300–304.
- [10] MAXWELL K L. Phages tune in to host cell quorum sensing. *Cell*, 2019, 176(1/2): 7–8.
- [11] TAATI MOGHADAM M, AMIRMOZAFARI N, SHARIATI A, *et al.* How phages overcome the challenges of drug resistant bacteria in clinical infections. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 45–61.
- [12] BERTOZZI SILVA J, STORMS Z, SAUVAGEAU D. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(4): 2–11.
- [13] REYES-ROBLES T, DILLARD R, CAIRNS L, *et al.* *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J Bacteriol*, 2018, 200(15): e00792-17[2020-11-03]. <http://jb.asm.org/content/200/15/e00792-17>. doi: 10.1128/jb.00792-17.
- [14] ALSETH E O, PURSEY E, LUJÁN A M, *et al.* Bacterial biodiversity drives the evolution of CRISPR-based phage resistance. *Nature*, 2019, 574(7779): 549–552.
- [15] AZAM A H, TANJI Y. Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(5): 2121–2131.
- [16] ABBINENI G, MODALI S, SAFIEJKO-MROCZKA B, *et al.* Evolutionary selection of new breast cancer cell-targeting peptides and phages with the cell-targeting peptides fully displayed on the major coat and their effects on actin dynamics during cell internalization. *Mol Pharm*, 2010, 7(5): 1629–1642.
- [17] DABROWSKA K, ZEMBALA M, BORATYNSKI J, *et al.* Hoc protein regulates the biological effects of T4 phage in mammals. *Arch Microbiol*, 2007, 187(6): 489–498.
- [18] AN T, KIM S, LEE Y, *et al.* The immune-enhancing effect of the *Cronobacter sakazakii* ES2 phage results in the activation of nuclear factor- κ B and dendritic cell maturation via the activation of IL-12p40 in the mouse bone marrow. *Immunol Lett*, 2014, 157: 1–8.
- [19] GORDILLO ALTAMIRANO F L, BARR J J. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(2): e00066-18[2020-11-03]. <http://cmr.asm.org/content/32/2/e00066-18>. doi: 10.1128/cmr.00066-18.
- [20] CHANG R Y K, CHEN K, WANG J, *et al.* Proof-of-principle study in a murine lung infection model of antipseudomonal activity of phage PEV20 in a dry-powder formulation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(2): e01714-17[2020-11-03]. <http://aac.asm.org/content/62/2/e01714-17>. doi: 10.1128/aac.01714-17.
- [21] LI W, SCHÄFER A, KULKARNI S, *et al.* High potency of a bivalent human V domain in SARS-CoV-2 animal models. *Cell*, 2020, 183(2): 429–441. e16[2020-11-03]. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.007>.
- [22] STEELE A, STACEY H J, DE SOIR S, *et al.* The safety and efficacy of phage therapy for superficial bacterial infections: a systematic review. *Antibiotics (Basel)*, 2020, 9(11): 754–768.
- [23] BROWN T L, PETROVSKI S, DYSON Z A, *et al.* The formulation of bacteriophage in a semi solid preparation for control of *Propionibacterium acnes* growth. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151184[2020-11-03]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151184>.
- [24] SHETTIGAR K, MURALI T S. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39(12): 2235–2246.
- [25] KIFELEW L G, WARNER M S, MORALES S, *et al.* Efficacy of phage cocktail AB-SA01 therapy in diabetic mouse wound infections caused by multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 204.
- [26] VAHEDI A, SOLTAN DALLAL M M, DOURAGHI M, *et al.* Isolation and identification of specific bacteriophage against enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *in vitro* and *in vivo* characterization of bacteriophage. *FEMS Microbiol Lett*, 2018, 365(16): fny136[2020-11-03]. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny136>.
- [27] DUERKOP B A, CLEMENTS C V, ROLLINS D, *et al.* A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(43): 17621–17626.
- [28] BROUDY T B, FISCHETTI V A. *In vivo* lysogenic conversion of Tox^{-} *Streptococcus pyogenes* to Tox^{+} with lysogenic *Streptococci* or free phage. *Infect Immun*, 2003, 71(7): 3782–3786.
- [29] RHOADS D D, WOLCOTT R D, KUSKOWSKI M A, *et al.* Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care*, 2009, 18(6): 237–243.
- [30] KHALIFA L, BROSH Y, GELMAN D, *et al.* Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(8): 2696–2705.
- [31] KHALIFA L, GELMAN D, SHLEZINGER M, *et al.* Defeating antibiotic- and phage-resistant *Enterococcus faecalis* using a phage cocktail *in vitro* and in a clot Model. *Front Microbiol*, 2018, 9: 326[2020-11-03]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00326>.
- [32] TINOCO J M, BUTTARO B, ZHANG H, *et al.* Effect of a genetically engineered bacteriophage on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Arch Oral Biol*, 2016, 71: 80–86.
- [33] DUNNE M, HUPFELD M, KLUMPP J, *et al.* Molecular basis of bacterial host interactions by Gram-positive targeting bacteriophages. *Viruses*, 2018, 10(8): 397[2020-11-03]. <https://doi.org/10.3390/v10080397>.
- [34] BUTTERLY A, SCHMIDT U, WIENER-KRONISH J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization, its relationship to nosocomial infection, and efficacy of control methods. *Anesthesiology*,

- 2010, 113(6): 1453–1459.
- [35] BISWAS B, ADHYA S, WASHART P, *et al.* Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*, 2002, 70(1): 204–210.
- [36] LEHMAN S M, MEARN S G, RANKIN D, *et al.* Design and preclinical development of a phage product for the treatment of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Viruses*, 2019, 11(11):88[2020-11-03]. <https://doi.org/10.3390/v11010088>.
- [37] SUNAGAR R, PATIL S A, CHANDRAKANTH R K. Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* bacteremia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Res Microbiol*, 2010, 161(10): 854–860.
- [38] CHAN B K, TURNER P E, KIM S, *et al.* Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol Med Public Health*, 2018, 2018(1): 60–66.
- [39] LAW N, LOGAN C, YUNG G, *et al.* Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. *Infection*, 2019, 47(4): 665–668.
- [40] LIANG Y, ZHANG H, SONG X, *et al.* Metastatic heterogeneity of breast cancer: molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 14–27.
- [41] ARAB A, BEHRAVAN N, RAZAZN A, *et al.* The viral approach to breast cancer immunotherapy. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1257–1267.
- [42] CIOCAN D, CASSARD A M. Intestinal bacteria involved in nutritional liver disease killed by phagotherapy: a new therapeutic target. *Med Sci (Paris)*, 2020, 36(4): 310–312.
- [43] JIANG L, LANG S, DUAN Y, *et al.* Intestinal virome in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 2020, 72(6): 2182–2196.
- [44] DUAN Y, LLORENTE C, LANG S, *et al.* Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease. *Nature*, 2019, 575(7783): 505–511.
- [45] GÓRSKI A, MIĘDZYBRODZKI R, JOŃCZYK-MATYSIAK E, *et al.* The fall and rise of phage therapy in modern medicine. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(11): 1115–1117.
- [46] BAO Q, LI X, HAN G, *et al.* Phage-based vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 145: 40–56.
- [47] XU H, CAO B, GEORGE A, *et al.* Self-assembly and mineralization of genetically modifiable biological nanofibers driven by β -structure formation. *Biomacromolecules*, 2011, 12(6): 2193–2199.
- [48] GÓRSKI A, BORYSOWSKI J, MIĘDZYBRODZKI R. Phage therapy: towards a successful clinical trial. *Antibiotics (Basel)*, 2020, 9(11):827 [2020-11-03] . <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110827>.
- [49] JAULT P, LECLERC T, JENNES S, *et al.* Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(1): 35–45.
- [50] GARNEAU J E, DUPUIS M, VILLION M, *et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71.
- [51] BIKARD D, EULER C W, JIANG W, *et al.* Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(11): 1146–1150.
- [52] HENEIN A. What are the limitations on the wider therapeutic use of phage? *Bacteriophage*, 2013, 3(2): e24872[2020-11-04]. <https://doi.org/10.4161/bact.24872>.
- [53] TAYLOR P W, STAPLETON P D, PAUL LUZIO J. New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov Today*, 2002, 7(21): 1086–1091.
- [54] MERRIL C R, SCHOLL D, ADHYA S L. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(6): 489–497.
- [55] LEITNER L, UJMAJURIDZE A, CHANISHVILI N, *et al.* Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21(3): 427–436.

(2020-11-29收稿, 2021-02-03修回)

编辑 吕熙