

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2021.03.007

• 综述 •

## 变异链球菌噬菌体在龋病防治中的研究进展

李雨含<sup>1</sup>, 李嘉鑫<sup>1</sup>, 张诗铭<sup>1</sup>, 张耀华<sup>1</sup>, 李雨庆<sup>1</sup>, 曾菊梅<sup>2</sup>

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, 四川 成都(610041);

2. 四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院, 四川 成都(610041)

**【摘要】** 变异链球菌作为主要致龋病原菌之一,其在牙菌斑生物膜中的过度增殖,是龋病发生发展的重要原因。细菌病毒——噬菌体可特异性感染细菌并有效降解细菌生物膜,因此变异链球菌噬菌体可能用于防治龋病。基于噬菌体的疗法已在多个领域进行临床应用,但变异链球菌噬菌体在龋病中的应用仍处于探索阶段。本文对变异链球菌噬菌体在龋病防治方面的应用进行综述,旨在为龋病的临床预防工作提供新的思路。文献复习结果表明,活噬菌体制剂具有特异性强、亲和力高以及安全性良好的优点,但由于其结构较不稳定,可以通过冻干、喷雾干燥、添加稳定性增强剂等方式,或将噬菌体并入软膏、可生物降解聚合物基质或微粒中加工成较稳定的制剂,在一定程度上提高稳定性;噬菌体产生的裂解酶可以消化细菌细胞壁,从而释放组装好的噬菌体颗粒,其在裂解生物膜中也同样表现优异;通过噬菌体展示技术筛选出针对致龋病原体的抗原结合片段库,利用抗原结合片段的被动免疫也可达到防治龋病的目的。然而,噬菌体的宿主范围狭窄,因此在临床龋病防治工作中可以通过噬菌体联合传统治疗或其他药物使用,或使用多种噬菌体的鸡尾酒治疗。

**【关键词】** 变异链球菌; 噬菌体; 龋病; 龋病防治; 噬菌体疗法; 裂解酶; 生物膜; 鸡尾酒治疗

**【中图分类号】** R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)03-0184-05



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

**【引用著录格式】** 李雨含, 李嘉鑫, 张诗铭, 等. 变异链球菌噬菌体在龋病防治中的研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(3): 184-188. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2021.03.007.

**Research progress on *Streptococcus mutans* phages in the prevention of dental caries** LI Yuhan<sup>1</sup>, LI Jiaxin<sup>1</sup>, ZHANG Shiming<sup>1</sup>, ZHANG Yaohua<sup>1</sup>, LI Yuqing<sup>1</sup>, ZENG Jumei<sup>2</sup>. 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. West China School of Public Health & West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Correspondencing author: ZENG Jumei, Email: zengjumei@scu.edu.cn, Tel: 86-18280048959

**【Abstract】** The *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) phage, as one of the principal pathogenic bacteria of dental caries, is a main cause of the formation and development of dental caries due to its overproliferation in dental plaque biofilms. Bacterial viruses, also known as bacteriophages, have the capability of specifically infecting bacteria and effectively degrading bacterial biofilms. *S. mutans* phages, therefore, may prevent and control caries. Therapy based on phages has been applied in many fields, but the application of *S. mutans* phages in caries remains exploratory. This article will review the research progress of *S. mutans* phages in clinical caries prevention, aiming to provide a new idea for the clinical prevention of caries. The results of the literature review show that the living bacteriophage system has the advantages of high specificity, high affinity and good safety. However, due to its unstable structure, it can be processed into a more stable formulation by freeze-drying, spray drying, adding stability enhancers, or incorporating bacteriophages into ointments, biodegradable polymer matrices or particles to a certain extent to improve stability. The lysozyme produced

**【收稿日期】** 2020-04-30; **【修回日期】** 2020-06-21

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(31870065); 四川大学中央高校基本科研业务费(YJ201985); 四川大学大学生创新创业训练计划(201910611603)

**【作者简介】** 李雨含, 本科在读, Email: 690067735@qq.com

**【通信作者】** 曾菊梅, 副研究员, 博士, Email: zengjumei@scu.edu.cn, Tel: 86-18280048959

by phages can digest the bacterial cell wall and release the assembled phage particles, which effectively cleave biofilms. In addition, the antigen binding fragment library for cariogenic pathogens was screened by phage display technology, and the purpose of caries prevention and treatment was achieved by passive immunization of antigen binding fragments. However, the host range of bacteriophages is narrow, so this kind of problem can be overcome by phage combined with traditional therapy or other drug use or cocktail therapy with multiple phages in clinical caries prevention and control.

**【Key words】** *Streptococcus mutans*; bacteriophage; dental caries; prevention of dental caries; phage therapy; lyase; biofilm; cocktail therapy

**J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(3): 184-188.**

**【Competing interests】** The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No. 31870065), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. YJ201985), Undergraduate's Platform for Innovation and Entrepreneurship Training Program of Sichuan university (No. 201910611603).

龋病是发生于牙体硬组织的慢性菌斑性疾病,主要致龋病原体是变异链球菌。大量研究表明,噬菌体不仅能有效感染特定的宿主细菌,还可以裂解生物膜,达到传统抗菌药物无法实现的穿透生物膜的效果。

近年来,已有多个领域开展噬菌体的临床应用,在龋病相关方面有数项实验室研究的进展。本文将从变异链球菌噬菌体与龋病防治方面作一综述,希望能为龋病防治工作提供一种新的可能性。

### 1 传统龋病防治策略面临的问题

龋病是以细菌为主要病原菌的牙体硬组织慢性进行性破坏的疾病。许多研究表明变异链球菌是主要的致龋菌之一,其致龋性主要包括产酸和耐酸力强、能合成细胞内外多糖、对牙体组织粘附力强。值得强调的是,龋病的发生不是单纯的致龋菌导致的,而是牙菌斑生物膜微生态失衡的结果。牙菌斑生物膜是粘附在牙体组织表面的一种整体生存的微生物生态群体。当细菌以生物膜形式存在时耐药性明显增强,抗菌剂不仅不能有效清除生物膜,还可能诱导耐药性产生。生物膜参与耐药形成有多种机制,如物理屏障作用、细菌密度感应系统<sup>[1]</sup>、生物膜中基因表型改变、氧化应激反应<sup>[2]</sup>等;但这些机制都不是单独存在的,不同机制间可能存在协同作用。

目前临床上对口腔龋齿的防治方式多是利用机械手段或者化学抗菌剂的方法来抑制消灭这些口腔细菌和菌斑。但由于抗菌剂的作用是非特异的,可将口腔内的致病菌和有益细菌一起清除,最终破坏口腔环境生态平衡,并导致新的疾病发

生。近年来,致病菌的耐药病例日渐增多,耐药现象给临床抗感染治疗留下了极大挑战。目前认为致病菌的耐药性与生物膜形成有关,因为生物膜使得传统抗菌剂无法有效对致龋细菌发挥作用<sup>[3]</sup>。

### 2 噬菌体及其基本特性

噬菌体是一类由蛋白质外壳和核酸组成的细菌依赖性的病毒,也称细菌病毒。大多数噬菌体结构为有尾部结构的二十面体,包括了一个二十面体的头部,一个中空针状结构及外鞘组成的尾部,以及尾丝和尾针组成的基部。对于有尾噬菌体来说,依据其尾部结构又可以分为长尾噬菌体科、短尾噬菌体科和肌尾噬菌体科。变异链球菌噬菌体属于其中的长尾噬菌体科,头部为等轴二十面体衣壳,尾部为非收缩性长尾,其衣壳直径估计为 $(67 \pm 0.4) \text{ nm}$ ,非收缩尾的长度估计为 $(283 \pm 7) \text{ nm}$ ,宽 $(8.3 \pm 0.1) \text{ nm}$ <sup>[4]</sup>。

噬菌体通常具有感染特异性、宿主依赖性、指数增殖等特性。另外,噬菌体能够产生一种肽聚糖水解酶,即噬菌体裂解酶。裂解酶靶向接触特定的细菌,导致细菌细胞壁中的肽聚糖快速水解而使细菌迅速裂解死亡<sup>[5]</sup>。除了浮游细菌,裂解酶还可以破坏生物膜基质,或通过降解细菌之间的交流信号的酶,破坏生物膜中细菌的群体感应,从而有效裂解生物膜<sup>[6]</sup>。

### 3 变异链球菌特异性噬菌体的发现

众多实验室研究已经证明,噬菌体能有效地杀灭浮游细菌以及裂解生物膜。但是生物膜的特殊结构可能成为噬菌体的完美避难所,使得变异链球菌噬菌体难以分离。目前已有的关于变异链

球菌噬菌体分离及鉴定的研究数量并不多。

最早 Greer 等和 Klein 等观察到几株变异链球菌裂解并释放出病毒颗粒,表明可能存在原噬菌体。1977 年,Brady 等通过电子显微镜从一位患者的牙菌斑样本中观察到了噬菌体样颗粒。这些噬菌体样颗粒截面为六边形,直径约为 1 100 nm,中央含有一个高密度的核。1988 年,Armau 等成功地从 1 000 多个牙菌斑样本中分离出了变异链球菌的特异性噬菌体 M102。1993 年,Delisle 和 Rostkowski 证实并扩展 Armau 等的初步观测结果,从中分离出了三种变异链球菌噬菌体,经鉴定均为烈性噬菌体,分别命名为 M102、e10 和 f1<sup>[7]</sup>。三者形态同属于长尾噬菌体科。三种噬菌体的基因组均由长 31~35 kb 的线性双链 DNA 组成且具有一些共同序列,表明其可能来自相同的祖先。

2012 年,Delisle 等<sup>[4]</sup>对来自同一实验室不同批次的 M102 噬菌体再次测序分析,在其中发现了 M102AD。M102AD 同样为烈性噬菌体,其形态、尺寸与 M102 一致,在核苷酸水平也高度相似。噬菌体 M102AD 只能感染少数血清型 c 菌株,与此同时 c 特异性抗血清可以阻断 M102AD 的吸附。

2015 年,Dalmasso 等<sup>[8]</sup>分离出了一种新型变异链球菌噬菌体  $\phi$ APCM01。噬菌体  $\phi$ APCM01 亦属于长尾噬菌体科,核苷酸水平与 M102、M102AD 相似性达 85%,能在数小时内有效地抑制变异链球菌的生长及其生物膜代谢活动。

#### 4 噬菌体在龋病防治中的应用前景

目前龋病防控已经比较成熟,主要有刷牙等机械方法以及洁牙、涂氟、窝沟封闭等临床预防手段;在某些情况下还可在机械性控制菌斑的基础上,配合抗菌剂使用。目前常见的防控措施都对公众的口腔健康意识提出了较高的要求。根据 2017 年第四次全国口腔健康流行病学调查,5 岁儿童患龋率为 70.9%,12 岁儿童恒牙患龋率为 38.5%,35~44 岁年龄组恒牙患龋率为 89.0%,仍有待改善<sup>[9]</sup>。

目前替代抗生素的优选方案有一半是基于噬菌体完成的,噬菌体相关制剂现已应用于皮肤溃疡、化脓性感染、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染、伤口感染预防、烧伤、呼吸道感染等临床问题中,以及食品安全、工业、农业等领域。对于噬菌体相关制剂的研发主要包括野生型噬菌体、工程噬菌体和噬菌体裂解酶三个方面。

##### 4.1 经典的活噬菌体制剂

通过分离特异性噬菌体直接用于抗菌治疗。活噬菌体制剂在特异性、亲和力、安全性方面都表现良好,但由于结构较不稳定,通常不能在未冷却的情况下储存<sup>[10]</sup>。现有的活噬菌体制剂可以通过冻干、喷雾干燥、添加稳定性增强剂的方式,或将噬菌体并入软膏、可生物降解聚合物基质或微粒中加工成较稳定的制剂,在一定程度上解决稳定性的问题<sup>[11]</sup>。

##### 4.2 噬菌体裂解酶制剂

噬菌体产生的裂解酶可以消化细菌细胞壁,从而释放组装好的噬菌体颗粒,其在裂解生物膜中也同样表现优异。噬菌体裂解酶制剂与活噬菌体制剂相比较而言,其分子量小,稳定性更高。Vázquez 等<sup>[12]</sup>将噬菌体裂解酶用于下呼吸道感染的研究,显示出其特异性的快速致死能力,并且不会影响目标细菌以外的其他菌群。Delisle 等<sup>[4]</sup>将多种变异链球菌噬菌体(M102、e10 和 f1)的裂解酶加入牙膏、漱口水等中来防治龋齿及其他口腔疾病。Yang 等<sup>[13]</sup>发现了第一种可对抗变异链球菌所有已知的血清型的噬菌体裂解酶,能够广谱裂解大多数链球菌,其通过改造裂解酶中与感染宿主有关的结构域,构建出嵌合裂解酶,从而改善裂解活性,扩大宿主谱。

##### 4.3 工程噬菌体

噬菌体展示技术有十多年的历史,现在已成为公司抗体制备的主要工具,通过将外源基因片段与噬菌体特定蛋白基因在其表面进行融合表达,从而展示出特定的外源肽。

2018 年诺贝尔化学奖得主 Gregory P.Winter 和 George P.Smith 在噬菌体展示技术的基础上,将抗体抗原结合位点的遗传信息插入到噬菌体 DNA 中,筛选出能与抗体特异性高度结合的噬菌体,为单抗药物的开发提供理论基础<sup>[14]</sup>。Alam 等<sup>[15]</sup>利用该技术合成出带有多种抗原结合片段(Fabs)的噬菌体库,并筛选出针对主要致龋病原体(变异链球菌和远缘链球菌)的抗原结合片段。筛选出的抗原结合片段中,Fab SM-10、Fab SS-2 分别显示出对变异链球菌和远缘链球菌生物膜的较强生长抑制作用。Alam 等<sup>[15]</sup>再通过动物实验,将前述两种抗原结合片段注入提前已感染致龋病原体并长期接受生龋饮食的小鼠体内。动物实验结果显示注入抗原结合片段的小鼠与对照组小鼠相比,龋齿总数明显减少,提示抗原结合片段具有阻止龋齿形



成的能力,这为龋病的防治带来新的启发。

## 5 噬菌体治疗的优势及局限性

### 5.1 噬菌体治疗的优势

首先,特异性是噬菌体治疗的关键之一,即噬菌体只针对感染的病原体,而不伤害其他共生菌群;其次,噬菌体的亲和力通常很高,能快速吸附宿主细菌,从而发挥功能;最后,因为噬菌体的高度特异性,不攻击人体细胞,并且目前没有临床试验表明其存在免疫并发症的副作用,所以理论上将其开发成药物具有较高的安全性。

另外,相比于传统抗菌药物,噬菌体还具有很强的生物膜降解能力,这是它独特的优势。传统抗菌药物由于无法大量渗透生物膜形成的物理屏障,往往不能有效消灭菌斑生物膜。噬菌体产生的裂解酶不仅可以破坏细菌的细胞壁结构,还能摧毁生物膜基质从而穿透生物膜<sup>[16]</sup>,所以噬菌体疗法作为一种抗生物膜措施,在龋病防治方面有巨大潜力。

### 5.2 噬菌体治疗面临的困境

目前对于龋病致病菌特异性噬菌体的发现仍较少,特别是对于变异链球菌噬菌体的分离鉴定的研究并不多见;另外由于噬菌体的高度特异性,一种噬菌体只能感染一种细菌,治疗疾病时可能需要多种噬菌体共同参与;如果将噬菌体运用到龋病防治工作中,更多的龋病病原菌特异性噬菌体的分离鉴定实验还有待开展。

噬菌体具有抗原性,一方面可以通过促进人体固有免疫清除细菌,另一方面其免疫原性可诱导特异性体液记忆<sup>[17]</sup>,可能引起人体免疫合并症。烈性噬菌体快速溶解细菌导致内毒素和炎症介质的释放,也为免疫反应提供条件,但目前没有临床试验表明相关免疫并发症的发生。

另外,细菌可能产生噬菌体感染抗性。有研究显示细菌中存在CRISPR-Cas系统<sup>[18]</sup>,可能作为细菌的抗性机制抵御噬菌体感染;但是在理论上噬菌体有能力与宿主细菌共同进化,进化出克服细菌抗性机制的能力;并且有研究显示多种噬菌体混合的鸡尾酒疗法可以避免这种抵御噬菌体感染的机制产生<sup>[19-20]</sup>。

最后,噬菌体具有复杂的药效学/药代动力学,需要大量的临床试验探讨其作为药物的给药途径、优化剂量等<sup>[21]</sup>,这为噬菌体相关制剂作为正式的治疗措施提出挑战,也是噬菌体应用到临床防

治工作中所要面对的最大难题。

## 6 结 语

噬菌体具有优异的抗生物膜能力,并且只特异性攻击宿主细菌,因此它理论上适用于龋病防治;但与大多数感染性疾病不同,龋病与多种细菌定植相关,而噬菌体往往宿主范围狭窄。因此,在临床防治工作中可以通过噬菌体联合传统治疗或其他药物使用,或使用多种噬菌体的鸡尾酒疗法来克服这类问题。

**【Author contributions】** Li YH wrote the article. Li JX, Zhang SM, Zhang YH, Li YQ collected the references. Zeng JM reviewed the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

## 参考文献

- [1] Jiang Q, Chen J, Yang C, et al. Quorum sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 2015978. doi: 10.1155/2019/2015978.
- [2] Nilsson M, Jakobsen TH, Givskov M, et al. Oxidative stress response plays a role in antibiotic tolerance of *Streptococcus mutans* biofilms [J]. Microbiology, 2019, 165(3): 334-342. doi: 10.1099/mic.0.000773.
- [3] Roy R, Tiwari M, Donelli G, et al. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action [J]. Virulence, 2018, 9(1): 522-554. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.
- [4] Delisle AL, Guo M, Chalmers NI, et al. Biology and genome sequence of *Streptococcus mutans* phage M102AD [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(7): 2264-2271. doi: 10.1128/AEM.07726-11.
- [5] Oliveira H, São-José C, Azeredo J. Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: challenges and future prospects for *in vivo* therapy [J]. Viruses, 2018, 10(6): 292. doi: 10.3390/v10060292.
- [6] Sharma U, Vipra A, Channabasappa S. Phage-derived lysins as potential agents for eradicating biofilms and persisters [J]. Drug Discov Today, 2018, 23(4): 848-856. doi: 10.1016/j.drudis.2018.01.026.
- [7] Delisle AL, Rostkowski CA. Lytic bacteriophages of *Streptococcus mutans* [J]. Curr Microbiol, 1993, 27(3): 163-167. doi: 10.1007/BF01576015.
- [8] Dalmasso M, de Haas E, Neve H, et al. Isolation of a novel phage with activity against *streptococcus mutans* biofilms [J]. PLoS one, 2015, 10(9): e0138651. doi: 10.1371/journal.pone.0138651.
- [9] 李珍珍, 刘姗姗, 张凯. 低龄儿童龋研究进展 [J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(4): 260-263. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.04.011.  
Li ZZ, Liu SS, Zhang K, et al. Research progress on early childhood caries [J]. J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(4): 260-263. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.04.011.
- [10] Zhang Y, Peng X, Zhang H, et al. Manufacturing and ambient

- stability of shelf freeze dried bacteriophage powder formulations [J]. Int J Pharm, 2018, 542 (1-2): 1-7. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.02.023.
- [11] Malik DJ, Sokolov IJ, Vinner GK, et al. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy [J]. Adv Colloid Interface Sci, 2017, 249: 100-133. doi: 10.1016/j.cis.2017.05.014.
- [12] Vázquez R, García E, García P. Phage lysins for fighting bacterial respiratory infections: a new generation of antimicrobials [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2252. doi: 10.3389/fimmu.2018.02252.
- [13] Yang H, Linden SB, Wang J, et al. A chimeolysin with extended-spectrum streptococcal host range found by an induced lysis-based rapid screening method [J]. Sci Rep, 2015, 5: 17257. doi: 10.1038/srep17257.
- [14] Smith GP. Phage display: simple evolution in a petri dish (nobel lecture) [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2019, 58(41): 14428-14437. doi: 10.1002/anie.201908308.
- [15] Alam MK, Zheng L, Liu R, et al. Synthetic antigen-binding fragments (Fabs) against *S. mutans* and *S. sobrinus* inhibit caries formation [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10173. doi: 10.1038/s41598-018-28240-0.
- [16] Szafranski SP, Winkel A, Stiesch M. The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms [J]. J Biotechnol, 2017, 250: 29-44. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.01.002.
- [17] Van Belleghem JD, Dałbrowska K, Vaneechoutte M, et al. Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system [J]. Viruses, 2018, 11 (1): 10. doi: 10.3390/v11010010.
- [18] Hille F, Richter h, wong SP, et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward [J]. Cell, 2018, 172(6): 1239-1259. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.032.
- [19] Yuan Y, Wang L, Li X, et al. Efficacy of a phage cocktail in controlling phage resistance development in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Virus Res, 2019, 272: 197734. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197734.
- [20] Yu L, Wang S, Guo Z, et al. A guard-killer phage cocktail effectively lyses the host and inhibits the development of phage-resistant strains of *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(2): 971-83. doi: 10.1007/s00253-017-8591-z.
- [21] Cooper CJ, Khan Mirzaei M, Nilsson AS. Adapting drug approval pathways for bacteriophage-based therapeutics [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1209. doi: 10.3389/fmicb.2016.01209.

(编辑 周春华)



官网



公众号

• 短讯 •

## 《口腔疾病防治》杂志入选 RCCSE 中国核心学术期刊

由广东省卫生健康委员会主管,南方医科大学口腔医院、广东省牙病防治指导中心主办的《口腔疾病防治》杂志在2020年推出的《中国学术期刊评价研究报告》(第6版)中被评为“RCCSE中国核心学术期刊(A-)”。

在此,编辑部谨向全体编委、审稿专家、广大读者和作者表示衷心的感谢!希望大家一如既往地关心、支持杂志的发展,并提出宝贵的意见与建议。

《口腔疾病防治》编辑部