综述

噬菌体展示技术在现代医药应用的研究进展

赵梦瑶，史增芳，宋丽丽，任晓亮，曹 颖*
（天津中医药大学中药学院，天津 301617）

摘要：噬菌体展示技术（PDT）是一种高效筛选疾病靶点特异肽的体外筛选技术。PDT 不仅能够筛选出疾病相关生物标志物，还可作为药物研究开发的有力工具，目前在疾病的诊断和治疗及药物研究方面具有广泛应用。该研究对 PDT 的原理及其在疾病诊断、药物研究开发中的应用进行了综述，并探讨了 PDT 现存的不足和应用前景，以期为 PDT 在现代医药领域的深入研究提供参考。

关键词：噬菌体展示；疾病诊断；体外筛选；生物标志物
中图分类号：Q812 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)01-0019-10
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.01.002

Research Progress of the Application of Phage Display Technology in Modern Medicine

ZHAO Mengyao, SHI Zengfang, SONG Lili, REN Xiaoliang, CAO Ying*
(*College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617*)

ABSTRACT: Phage display technology(PDT) is an efficient screening technology *in vitro* for specific peptides of disease targets. This technology not only can screen out disease-related biomarkers but also serve as a powerful tool for drug research and development. Nowadays, PDT applies widely in the diagnosis and treatment of diseases and drug research. This paper reviews the principle of PDT, and its application in disease diagnosis, treatment, and drug research and development. The existing shortcomings of PDT and its application prospects are discussed to provide references for further research of PDT in modern medicine.

Key Words: phage display; disease diagnosis; *in vitro* screening; biomarker

噬菌体是一种可以特异性感染细菌的病毒，是地球上较丰富和普遍的生物，分布广泛。据文献[1]报道，噬菌体总数量可达到 10^{31} 个。噬菌体具有结构简单、价廉易得且宿主特异性强的特点，被广泛应用于医药、食品、微生物领域[2]。噬菌体展示技术（phage display technology，PDT）是 20 世纪 80 年代逐步发展起来的高通量筛选技术，主要是利用基因工程的手段将外源基因插入到噬菌体特定蛋白的编码基因中，融合蛋白能在噬菌体中表达并呈现在其表面，通过淘洗得到与靶分子亲和力高、特异性强的蛋白或多肽的方法[3]。PDT 具有简单、高效、特异性强等特点[4]，可将噬菌体扩增和重组蛋白识别抗原的能力相结合，形成能高效表达和筛选的生物体系。PDT 在疾病诊断、药物开发、药物靶点筛选、疫苗研制等现代医药领域具有广阔的应用前景[5]。本研究综述了 PDT 原理及其在疾病诊断、治疗及药物研究开发中的应用，以期为 PDT 在现代医药领域的深入研究提供文献参考。

1 PDT 原理

PDT 是一种通过高通量筛选获得特异性结合靶分子的蛋白或多肽的方法。1985 年，SMITH[6] 利用丝状噬菌体表达外源基因，首次提出了 PDT 的

收稿日期：2022-06-09
基金项目：天津市教委科研(2019KJ084)资助项目
作者简介：赵梦瑶(1997—)，女，硕士研究生，专业方向：药物分析。
通信作者：曹 颖(1984—)，女，实验师，从事药物分析研究。
E-mail：five43c@163.com

概念。PDT 的原理主要是将外源基因插入噬菌体的外壳蛋白基因中，使外源基因编码的多肽随外壳蛋白的表达而展示在噬菌体的表面，同时仍保持噬菌体原有的生物学活性和结构功能。该技术的突破性贡献在于可将基因型与表型紧密连接[7]。通过各种外源基因在噬菌体表面的表达来构建噬菌体展示文库，主要包括抗体库、随机肽库和 cDNA（互补 DNA）文库，再通过噬菌体展示文库提供的大量信息来达到高通量筛选的目的[8]。为了得到目标分子的特异性抗体，需要经过生物淘洗。首先要将目标分子固定在载体上，在噬菌体展示文库中进行筛选，洗脱掉未能与目标分子充分结合的游离噬菌体，随后将发生特异性结合的噬菌体用胰蛋白酶水解或其他方法（稀酸或稀碱）洗脱，再通过感染宿主细胞进行扩增，用于下一轮淘洗，通过 3 ～ 5 轮的“吸附 - 洗脱 - 扩增”后，就能获得高度富集的特异性结合噬菌体（图 1）[9]，最后再进行序列分析及验证，得到能与目标分子特异性结合的氨基酸序列，用于进一步的研究[10]。根据构建噬菌体展示系统的载体不同，可将噬菌体展示系统分为丝状噬菌体、T7 噬菌体、λ 噬菌体和 T4 噬菌体[11]，其中应用较广泛的是丝状噬菌体展示系统。非溶原性丝状噬菌体主要由单链环状 DNA 和 5 个衣壳蛋白（P Ⅷ、P Ⅸ、P Ⅶ、P Ⅵ、P Ⅲ）组成，它可在宿主菌中扩增、表达但不破坏宿主菌[12]。由于 PDT 具有强特异性、高亲和力、简便、高效等优势，目前已被广泛应用于现代医药的多个领域。

2　PDT 在疾病诊断与治疗中的应用

2.1　在恶性肿瘤诊断与治疗中的应用

传统的肿瘤治疗药物和手段在治疗的同时，也会对机体免疫系统造成不良影响，缺乏特异性。而 PDT 在肿瘤特异性药物开发方面具有独特优势，噬菌体展示肽库含有大量的信息，可用来筛选能与肿瘤相关细胞发生特异性结合的多肽[13]。将通过 PDT 高通量筛选出的、与肿瘤细胞亲和力高的多肽，与肿瘤治疗药物相互偶联，就能靶向作用于肿瘤细胞，提高肿瘤部位的药物浓度和疗效，降低非特异性药物的不良反应[14]。例如，LIU 等[15] 以乳腺癌

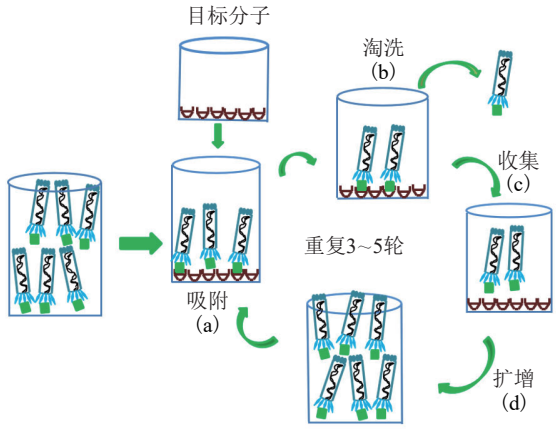


图 1　PDT 原理示意图

Fig.1　Schematic Diagram of the Principle of PDT

细胞系（MDA-MB-231 细胞）分离的乳腺癌干细胞作为靶细胞，在噬菌体展示随机十二肽库中进行 3 轮淘洗，采用双减法筛选出乳腺癌干细胞的特异性靶向肽，又经酶联免疫吸附测定（ELISA）和染色法对结果进行分析，得出序列为 GYSASRSTIPGK 的多肽与目标细胞特异性强，可减少化疗药物的使用剂量、减轻不良反应。逯晓青[16] 以人膀胱癌细胞（EJ 细胞）为靶细胞，采用噬菌体随机七肽库进行了 3 轮淘洗，筛选出的特异性多肽序列为 AVEAAKT。郑磊[17] 以胰腺癌细胞系（PANC-1 细胞）为靶细胞，利用 PDT 筛选出的特异性多肽序列为 HMNPWSD。ZHAO 等[18] 用噬菌体十二聚体肽库淘洗，筛选得到了能与卵巢癌细胞（SKOV3 细胞）特异性结合的多肽（METRPVAPHEFR）。SUI 等[19] 用 CX8C 噬菌体展示肽库筛选前列腺癌（PCa）的特异肽，以前列腺特异性抗原（PSA）$^{-/lo}$ 前列腺癌细胞［PSA $^{-/lo}$ PCa 细胞］为靶细胞，通过体内外试验鉴定得到的特异性靶向肽为 TAP1（TEWDYLTV）。研究[20] 表明 TAP1 可作为肿瘤诊断及预后生物标志物的治疗靶点。XIAO 等[21] 利用肽 CSP3（QQLPSSSTSTYP）能与人子宫颈鳞癌细胞（SiHa 细胞）特异性结合的特性，将其开发为靶向载体来达到治疗的目的。目前已有大量利用 PDT 筛选得到不同肿瘤细胞特异肽的研究报道（如表 1 所示）。

表 1 通过噬菌体展示肽库筛选得到的特异肽

Tab.1 Specific Peptides Screened Out by Phage Display Peptide Library

靶向的肿瘤细胞	特异肽的序列	治疗的疾病	年份	参考文献
MDA-MB-231 细胞	GYSASRSTIPGK	乳腺癌	2016	[15]
卵巢癌细胞(HO-8910细胞)	NPMIRRQ	卵巢癌	2016	[22]
SiHa 细胞	QQLPSSSTSTYP	宫颈癌	2017	[23]
人胚胎肾细胞(HEK293 细胞)	S1-WHXXXXXXQQA	胃癌	2018	[24]
EJ 细胞	AVEAAKT	膀胱癌	2018	[16]
人宫颈癌细胞(HeLa 细胞)	QVNGLGERSQQM	宫颈癌	2018	[25]
人乳腺癌细胞(Bcap-37 细胞)	LXRNTNX	乳腺癌	2019	[26]
PANC-1 细胞	HMNPWSD	胰腺癌	2020	[17]
SKOV3 细胞	METRPVAPHEFR	卵巢癌	2021	[18]
$PSA^{-/lo}$PCa 细胞	TEWDYLTV	前列腺癌	2021	[19]

PDT 不仅可以筛选肿瘤相关细胞的特异肽，还可以用于检测肿瘤的生物标志物。肿瘤生物标志物是指那些与基因突变或表观遗传改变相关的物质。与传统检测方法相比，利用 PDT 检测肿瘤生物标志物更灵敏、结果更准确。血管内皮生长因子（VEGF）是临床用于恶性肿瘤诊断的重要生物标志物，可作为肺癌、乳腺癌、肾癌等恶性肿瘤的检测指标 [27]。传统的 VEGF 检测方法程序复杂、检测限高，而利用 PDT 靶向特异性高及扩增快速的特点，可减少抗体的纯化步骤、提高检测速度和灵敏度。REZAEI 等 [28] 采用 PDT 介导聚合酶链式反应（PD-IPCR）设计了一种检测 VEGF 的方法，结果显示该方法的检测限为 3 pg/mL，明显低于常规 ELISA 法（1.1 ng/mL），且重现性好、准确度高。甲胎蛋白（alpha fetoprotein，AFP）常作为原发性肝癌的生物标志物，对 AFP 的快速、稳定检测，对于临床早期诊断至关重要。LIU 等 [29] 将 PDT 与 ELISA 法相结合，建立了一种灵敏度高、准确性好的 AFP 检测方法，为临床检测肿瘤生物标志物提供了参考。PDT 具有高特异性、低成本的特点，为肿瘤的临床治疗及早期检测提供了新方法，在肿瘤治疗与诊断中展现出巨大应用潜力。

2.2 在自身免疫性疾病诊断与治疗中的应用

自身免疫性疾病是指免疫系统不能正常发挥功能，对自身组织进行攻击的顽固性疾病。系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus，SLE）、类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis，RA）、结肠炎及许多皮肤病等都属于自身免疫性疾病。这类疾病的病因复杂，临床表现多样，目前尚无有效的治疗措施。由于自身免疫性疾病具有病情迁延不愈、未及时控制易引起严重后果的特点 [30]，早期诊断对防控其发展具有重要作用。目前，临床常以自身抗体作为自身免疫性疾病的诊断标志物。通过 PDT 能准确地筛选出自身免疫性疾病的特异性抗体，作为该类疾病的生物标志物，达到早期诊断的目的 [31]。RA 主要影响外周滑膜关节，在疾病早期做出诊断可减少伤害、提高治愈率 [32]。有研究 [33] 用 RA 患者的滑膜组织构建 cDNA 展示文库，筛选得到的特异性抗体可作为检测 RA 的生物标志物。SLE 会侵犯全身多系统，与其相关的自身抗体达 180 多种，目前常用抗核抗体（antinuclear antibody，ANA）作为诊断的生物标志物。然而，ANA 与其他自身免疫性疾病也有关联，对 SLE 不具有特异性。WU 等 [34] 利用噬菌体展示随机肽库和测序对样本进行分析，并用 ELISA 法对结果进行验证，筛选出的特异肽 SLE2018Val001 和 SLE2018Val002 可作为 SLE 的特异性检测指标，对 SLE 的诊断具有重要作用。自身免疫性疾病的病因复杂多样，因此，利用 PDT 筛选出能与疾病自身抗体特异性结合的多肽，对寻找疾病新的治疗靶点以及阐明其发病机制具有重要意义。

2.3 在耐药菌治疗中的应用

“超级细菌”是指可以抵御所有抗菌药的泛耐药细菌。由于抗菌药的不合理使用，全球细菌耐药性问题日益严重，“超级细菌”不断被发现，如碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌（carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*，CRKP）、耐碳青霉烯类

鲍曼不动杆菌（carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*，CRAB）、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA）等[35]。MRSA是较常见的耐药菌，会导致皮肤感染、肺炎、败血症等疾病，是医院内感染的主要原因，并且对抗菌药有泛耐药性，对全球人类的生命健康造成严重威胁[36]。NIAN等[37]以金黄色葡萄球菌作为抗原，利用PDT进行3轮筛选，得到对金黄色葡萄球菌具有特异性的多肽scFv-Fcs，该抗体可作为治疗MRSA感染的潜在治疗药物。HUSSAIN等[38]采用PDT筛选出金黄色葡萄球菌感染位点的特异肽，并与万古霉素纳米粒结合，得到了能靶向作用于感染部位的新型给药系统，不仅增加了万古霉素纳米粒的抗菌活性，而且减少了抗菌药的不良反应。PDT与抗菌药的联合应用为MRSA的临床治疗提供了一种新的参考方案。利用噬菌体治疗耐药菌感染的方案，近年来受到国内外学者的密切关注，未来还需要在更多的临床实践中不断完善、总结、创新和提高，提出更有效的治疗方案。

2.4 其他疾病

PDT还可应用于神经系统性疾病、肠道炎症性疾病的研究。阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）是一种以认知功能障碍和行为损害为特征的神经退行性疾病[39]。AD发病率近年来急剧增加，但目前临床还没有治愈AD的有效方法。研究[40]表明，大脑中的β-淀粉样蛋白（amyloid β-peptides，Aβ）聚集会导致神经元死亡和认知功能障碍，被认为是AD的主要病理学机制。因此，建立灵敏、准确的Aβ检测方法对AD的早期诊断和治疗具有重要作用及意义[41]。研究者通过PDT筛选出对Aβ亲和力较强的特异肽c-ABP2和n-ABP4，将其作为检测Aβ的新型探针，并成功用于检测小鼠大脑中Aβ的聚集情况，为临床AD的诊断提供了参考[42]。克罗恩病（Crohn's disease，CD）是一种炎症性肠道疾病，病因不清，难治愈，会严重影响患者的生活质量。MITSUYAMA等[43]通过噬菌体展示cDNA文库筛选CD患者血清样本中的特异肽，经ELISA法和序列分析得到亲和力较好的多肽MIRGLFPN，该多肽可促进炎症因子的释放，对CD的诊断和治疗具有重要意义。

表2列举了FDA批准上市的经噬菌体展示技术开发的抗体药物。

3 PDT在药物研发中的应用进展

3.1 生物制品方面

单克隆抗体药物具有特异性强、疗效显著、毒性低的特点，在恶性肿瘤、自身免疫性疾病、传染病等多种疾病的治疗上显示出良好疗效，应用前景十分广阔[44]。PDT是研发单克隆抗体药物的重要手段。通过把不同的抗体基因经噬菌体展示，组成噬菌体展示抗体库，可筛选出能特异性识别抗原的单克隆抗体药物[45]。噬菌体展示抗体库的质量主要由库容量和多样性决定，噬菌体展示的抗体片段数量代表库的容量，展示抗体的多样性代表库的多样性[46]。为了得到亲和力好、特异性强的目标抗体，需要在保证库多样性的前提下，尽可能地增加库容量。噬菌体展示抗体库的容量越大，越容易筛选得到亲和力高的目标抗体。因此，研究人员都在不断开发设计增大噬菌体展示抗体库容量的方法[9]。根据来源不同，可将噬菌体展示抗体库分为天然文库、免疫文库、合成文库3类。天然文库主要是由从未免疫的人或动物的外周血淋巴细胞、脾脏和骨髓细胞中分离得到的B细胞免疫球蛋白M（IgM）mRNA的V基因构建的，由于该文库中的抗体基因来源于未免疫者，能有效减少免疫原性的风险。在实际应用中，天然文库是开发抗体的首选文库[47]。免疫文库相比于天然文库具有抗体基因可在体内自然亲和、成熟的优点，可用于开发目标靶点的高亲和性抗体。但免疫文库的库存规模较小，需要从大量的动物中获取免疫蛋白基因，并且每个疾病靶点都需要一个新的文库，存在成本高、过程烦琐等缺点[12]。合成文库由合成抗体序列和天然抗体序列构建，不受人抗体基因种类的限制。该文库适用于筛选自身抗原的抗体，常与天然文库相结合以达到扩大库容量和增加抗体片段多样性的目的[48]。

PDT可用于抗病毒抗体药物的研发。严重急性呼吸综合征冠状病毒2（severe acute respiratory

syndrome coronavirus 2，SARS CoV-2）导致的新型冠状病毒肺炎（coronavirus disease 2019，COVID-19），是当今世界较严重的突发传染性疾病。SARS CoV-2的S蛋白可与宿主细胞受体上的血管紧张素转换酶2（ACE2）结合而使病毒进入细胞，因而S蛋白是开发抗病毒抗体药物的主要靶点[49]。目前，采用PDT已开发出基于SARS CoV-2 S蛋白的多种抗体药物，如H014、IgG1 ab1、HB27等[50—52]，并已进入临床前研究。PDT是一种独立于免疫系统之外的体外筛选技术，在抗体药物研发中具有重要作用，并且已有一些应用PDT的抗体候选药物进入临床试验阶段（如表3所示）。

PDT也能在疫苗的研究中发挥重要作用，提高疫苗的化学稳定性、安全性，使之同时具有易于贮存和运输、可大量生产等特点，弥补了减毒疫苗、灭活疫苗的不足[53]。噬菌体展示疫苗主要通过2种方式在噬菌体表面展示外来抗原，一种是通过转录融合外壳蛋白直接展示抗原，另一种是利用预先展示的抗原结合肽捕获抗原，在其表面展示免疫原性肽或蛋白，间接展示抗原[54]。目前，利用PDT制备的疫苗在预防和治疗恶性肿瘤、细菌感染、病毒感染、真菌感染及寄生虫感染方面已有一些研究（如图2所示）[55]。

噬菌体展示疫苗已成为恶性肿瘤潜在疗法的研

表2 FDA批准的噬菌体展示技术抗体药物

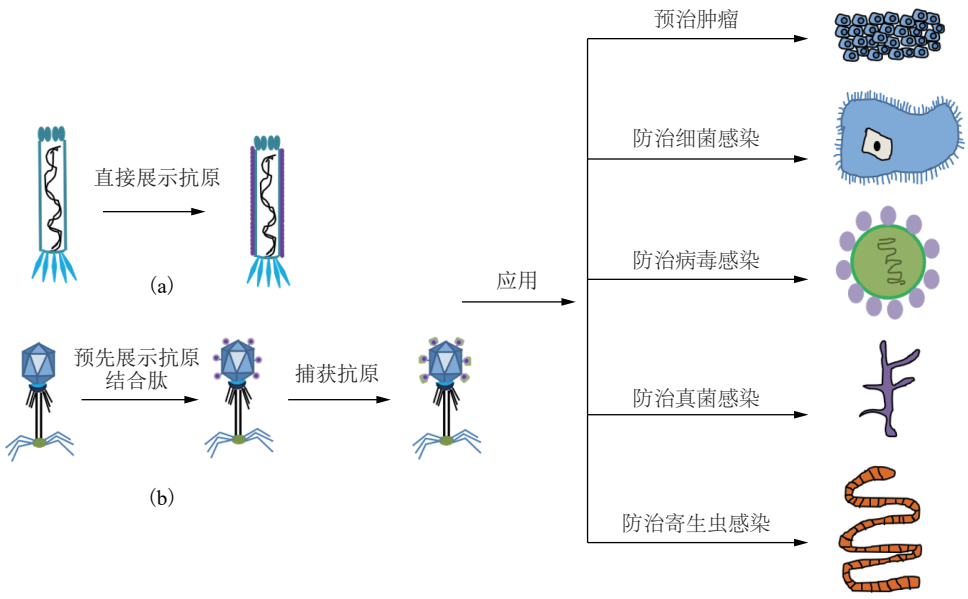
Tab.2 FDA Approved Antibody Drugs Derived from Phage Display Technology

商品名	靶向抗体	活性成分	持证商	适应证	批准时间
Humira	肿瘤坏死因子α（TNFα）	阿达木单抗（adalimumab）	AbbVie	RA	2002
Lucentis	血管内皮生长因子A（VEGFA）	雷珠单抗（ranibizumab）	Genentech Inc.	新生血管性年龄相关性黄斑变性	2006
Benlysta	B淋巴细胞刺激因子（BLyS）	贝利木单抗（belimumab）	GlaxoSmithKline	SLE	2011
Raxibacumab	炭疽保护性抗原（PA）	雷昔库单抗（raxibacumab）	GlaxoSmithKline	吸入性炭疽	2012
Cyramza	VEGF受体2（VEGFR2）	雷莫芦单抗（ramucirumab）	Eli Lilly Co.	胃癌、非小细胞肺癌	2014
Portrazza	内皮生长因子受体（EGFR）	耐昔妥珠单抗（necitumumab）	Eli Lilly Co.	非小细胞肺癌	2015
Taltz	白细胞介素-17A（IL-17A）	伊西贝单抗（ixekizumab）	Eli Lilly Co.	银屑病	2016
Tecentriq	程序性死亡配体1（PD-L1）	阿特珠单抗（atezolizumab）	Genentech Inc.	尿路上皮癌	2016
Bavencio	PD-L1	阿维单抗（avelumab）	EmdSerono Inc.	默克尔细胞癌	2017
Tremfya	白细胞介素-23（IL-23）	古塞库单抗（guselkumab）	Janssen Biotech Inc.	银屑病	2017
Gamifant	干扰素γ（IFNγ）	依帕伐单抗（emapalumab-lzsg）	Novimmune S.A.	噬血细胞性淋巴组织细胞增多症	2018
Lumoxiti	CD22蛋白	帕克莫单抗（moxetumomab pasudotox-tdfk）	Innate Pharma Inc.	毛细胞白血病	2018
Takhzyro	血浆激肽释放酶（pKal）	拉那芦人单抗（lanadelumab）	Dyax Corp	遗传性血管性水肿	2018
Cablivi	血管性血友病因子（vWF）	卡普赛珠单抗（caplacizumab-yhdp）	Ablynx NV	获得性血栓性血小板减少性紫癜	2019

表3 临床试验阶段的噬菌体展示抗体候选药物

Tab.3 Phage-displayed Antibody Candidates in Clinical Trials

药物名称	靶抗原	研发企业	适应证和临床试验阶段
VAY736	B细胞活化因子受体（BAFF-R）	Novartis	非霍奇金淋巴瘤、RA、慢性淋巴细胞白血病、原发性干燥综合征（Ⅰ期），SLE、自身免疫性肝炎（Ⅱ期）
oriticumab（BI-204/ MLDL1278A）	氧化低密度脂蛋白（oxLDL）	Abcentra	银屑病（Ⅱ期）
MOR202	CD38蛋白	Mario Negri Institute for Pharmacological Research	膜性肾病、肾小球肾炎、免疫球蛋白A（lgA）肾病（Ⅱ期）
lanadelumab（DX-2930）	激肽释放酶（kalikrein）	德国Charité University	遗传性自身炎症性疾病（Ⅱ期），遗传性血管性水肿、血管性水肿（Ⅲ期）
guselkumab（CNTO1959）	白细胞介素-23 P19亚基（IL-23 P19）	Janssen	酒精性肝病（Ⅰ期），毛发红糠疹、全身性硬皮病、狼疮性肾炎、溃疡性结肠炎、巨细胞动脉炎（Ⅱ期），肛周克隆病、纤维化性克罗恩病、克罗恩病、关节炎、银屑病、幼年关节炎（Ⅲ期），寻常性银屑病、点滴状银屑病、斑块状银屑病、银屑病（Ⅳ期）
gantenerumab（R1450）	淀粉样纤维（amyloid fibrils）	Hoffmann-La Roche	AD（Ⅲ期）
tralokinumab（CAT354/BAK1.1）	白细胞介素-13（IL-13）	LEO Pharma	特应性皮炎（Ⅱ期）



a—直接转录融合外壳蛋白展示抗原的噬菌体展示疫苗；b—通过预先展示的抗原结合肽捕获抗原而进行展示的噬菌体展示疫苗。

图 2　噬菌体展示疫苗的设计和应用

Fig.2　Design and Applications of Phage Display Vaccines

究热点。利用 PDT 制备的肿瘤治疗疫苗主要是通过免疫疗法，以增强自身机体能力来实现治疗疾病的作用。人表皮生长因子受体 2（human epidermal growth factor receptor 2，HER2）具有免疫原性，可刺激细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T lymphocyte，CTL）识别并杀死肿瘤细胞，常用于肿瘤疫苗的研究[56]。AE37（AcLRMKGVGSPYVSRLLGICL-NH_2）是 HER2 的衍生肽，能刺激 $CD4^+$ 辅助性 T 细胞（$CD4^+$Th 细胞），使其诱导免疫记忆和持续刺激 CTL。BARATI 等[57]用 AE37 肽结合 PDT 对小鼠乳腺癌模型进行体内和体外研究，结果表明 AE37 肽可抑制肿瘤细胞生长，具有较好的抗肿瘤活性。ASADI-GHALEHNI 等[58]将 EGFR 展示在 M13 噬菌体的 P Ⅷ蛋白上，开发了肿瘤治疗疫苗，采用动物试验评估其治疗效果，结果显示该疫苗可抑制肿瘤细胞生长，延长小鼠存活时间，具有开发潜力。噬菌体展示的肽或蛋白能直接作为治疗性肿瘤疫苗，还可作为免疫细胞的激活剂或抑制剂，以及免疫检查点的效应剂，应用于肿瘤治疗。噬菌体的免疫原性和毒性较低，适宜作为疫苗的载体，为进一步研发肿瘤免疫治疗的商业噬菌体衍生药物提供了可行性方案。此外，PDT 还可用于制备传染病预防性疫苗。SHI 等[59]利用直接显示抗原的方法，将肽 YGKDVKDLFDYAQE 与丝状噬菌体的外壳蛋白进行融合并展示在其表面，构成的重组噬菌体可预防白念珠菌感染。WANG 等[60]利用工程化 fd 噬菌体诱导捕获抗分泌型天冬氨酸蛋白酶 2（Sap2）IgG 和抗热休克蛋白 90（Hsp90）IgG，并在表面展示特异肽，从而间接展示抗原。接种该疫苗能提高念珠菌感染小鼠的存活率。

噬菌体展示疫苗不仅可避免常规疫苗的缺点，而且具有可大规模生产、可作为多肽和蛋白载体、能开发成多功能疫苗的优势。这些特点都支持研究者继续开发设计噬菌体展示疫苗，为疾病的预防和治疗提供新的选择。

3.2　中药方面

中药具有疗效确切、不良反应小等特点[61]，但也因多靶点、多通路、多成分的特点，研究较为困难。靶点是联结药物和疾病的桥梁，研究靶点是获得疗效优良药物的基础，因此，发现中药新的

作用靶点对中药的开发与利用具有十分重要的意义[62]。利用 PDT 可筛选出能与中药特异性结合的疾病靶点蛋白，再进一步分析验证中药疗效的生物学机制[63]。

RA 在中医中属于“痹症”“历节”，三水白虎汤（*Sanshui Baihu* decoction，SSBH）常用于临床治疗湿热痹阻型 RA。潘超[64]应用噬菌体展示随机十二肽库结合全细胞差减筛选法，挑选出 SSBH 中能与 RA 滑膜成纤维细胞特异性结合的多肽，经 ELISA 等方法验证，筛选出的亲和力较高的肽（SGVYKVAYDWQH）可成为 SSBH 治疗 RA 的作用靶点。李变英等[65]利用 T7 噬菌体展示人肺癌 cDNA 文库进行了 4 轮淘洗，通过测序分析得出多肽（His-MNTGRFGKTTSSPALTLGNFQKPL）是丹参 - 人参组分复方对人非小细胞肺癌细胞（A549 细胞）作用的重要靶点的结论，为中药复方靶点的研究提供了参考依据。苦参具有清热燥湿的作用，氧化苦参碱是其发挥药效的主要成分，临床常用于治疗慢性乙型肝炎（chronic hepatitis B，CHB）。SUN 等[66]利用 T7 噬菌体展示人 CHB cDNA 文库，淘洗、筛选出氧化苦参碱的可能靶点，结果显示特异性蛋白 UQCRB 是氧化苦参碱治疗 CHB 的潜在靶点。利用 PDT 进行中药作用靶点的筛选是加速实现中药现代化的有效途径，对于开发新药、阐明中药的作用机制具有重要意义。

3.3 化学药品方面

PDT 还可用于化学药品的研究。YU 等[67]利用噬菌体展示 cDNA 文库进行 4 轮淘洗，得到不溶性小分子药物地塞米松的靶蛋白，经序列分析为白蛋白和细胞色素 C 氧化镁亚单位Ⅲ。SMITH 等[68]利用噬菌体展示肽库淘洗，筛选得到对乙酰氨基苯酚（4-acetamidophenol，4-AAP）的特异肽 PARA-061。HE 等[69]优化了噬菌体展示 cDNA 文库的筛选方案，以环孢素 A（CsA）为探针，可同时鉴定多个靶点蛋白。DORST 等[70]利用 T7 噬菌体展示 cDNA 文库筛选 17β- 雌二醇（E2）的靶点，得出 2 种可能的靶蛋白：自噬调节因子 1（beclin 1）和 ATP 合酶 F（0）亚基 6（ATP6）。尽管 PDT 能筛选出药物的特异性靶蛋白，但在化学药品方面的适用范围并不广。这可能是由于化学药品多通过合成获得，具有固定的化学结构，对其作用靶点的研究比较明确。因此，PDT 作为一种独特的基因重组筛选技术，更适于多肽或蛋白的研究。

4 展望

PDT 作为一种高效的体外筛选技术在现代医药领域发挥着重要作用。PDT 在筛选生物制品、中药、化学药品产生药效作用的靶蛋白方面的研究为药物的开发利用提供了参考依据。一些利用 PDT 获得的单克隆抗体药物也都进入了临床前或临床试验阶段，证明了该技术在发现治疗性抗体药物方面的价值。PDT 不论是筛选与疾病相关的特异肽，还是作为探针检测疾病相关生物标志物，在临床疾病的诊断和治疗方面都有着独特优势，如高通量筛选、低成本、高效、应用范围广泛等，在现代医药领域的发展前景广阔。其中，PDT 最突出的优势是能实现基因型与表型的统一，达到蛋白构象的体外控制，更适于研究蛋白的结构功能和生物活性。尽管 PDT 的研究在过去几年已有较大进展，但在实际应用中也存在以下 4 点不足：①目前的研究大多集中在功能噬菌体的构建和筛选部分，在噬菌体和靶点的作用机制方面还需要更深入的研究，若能明确二者相互作用的机制，可拓展噬菌体的应用领域，充分发挥噬菌体的优势；②噬菌体展示过程必须经过细菌感染扩增，大大限制了噬菌体展示肽库的库容量和多样性，而增大库容量有利于得到高亲和力的多肽，未来应在丰富库容量和多样性方面进行更多研究，使其够在更短的时间内筛选出高亲和力的多肽；③利用 PDT 筛选得到的靶蛋白缺乏进一步验证，对其结构功能仍需进行大量研究，才能满足临床应用的要求；④利用 PDT 得到的特异肽在疾病治疗过程中仍面临口服生物利用度低、半衰期短、不稳定性等问题，还需要根据抗体药物的性质进行改善，从而更好地发挥治疗作用。随着 PDT 的不断完善和发展，它将会成为医药研究的重要技术手段，为疾病的临床诊断和治疗、药物研发提供高效简便的研究方法与技术。

参考文献：

[1] 秦秀娟, 雍　彬, 马沁沁. 噬菌体在食品工业中的应用与危害防控[J]. 微生物学通报, 2021, **48**(9): 3368-3379.

[2] GORACCI M, PIGNOCHINO Y, MARCHIÒ S. Phage display-based nanotechnology applications in cancer immunotherapy [J]. *Molecules*, 2020, **25**(4): 843.

[3] TAN Y Y, TIAN T, LIU W L, *et al*. Advance in phage display technology for bioanalysis [J]. *Biotechnol J*, 2016, **11**(6): 732-745.

[4] 胡雨欣, 何　早, 陈力力, 等. 噬菌体展示技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. 食品科学, 2015, **36**(11): 236-239.

[5] 邬亭亭, 刘　平, 罗永艾. 噬菌体在癌症治疗研究中的应用[J]. 世界科技研究与发展, 2012, **34**(3): 482-484.

[6] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, **228**(4705): 1315-1317.

[7] 姜　浩, 张　静, 吕雪飞. 噬菌体展示技术及其在生物医学检测中的应用[J]. 生命科学仪器, 2019, **17**(6): 32-39.

[8] JARA-ACEVEDO R, DIEZ P, GONZALEZ-GONZALEZ M, *et al*. Methods for selecting phage display antibody libraries [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, **22**(43): 6490-6499.

[9] MCCARREY J R, WILLIAMS S A. Construction of cDNA libraries from limiting amounts of material [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1994, **5**(1): 34-39.

[10] 侯雪莹, 胡卓伟, 崔　冰. 噬菌体展示技术在药物研发中的应用[J]. 药学学报, 2018, **53**(8): 1280-1289.

[11] DENG X Y, WANG L ,YOU X L, *et al*. Advances in the T7 phage display system(review) [J]. *Mol Med Rep*, 2018, **17**(1): 714-720.

[12] 王加利, 和似琦, 康子茜, 等. 噬菌体抗体展示技术及其在抗新冠病毒抗体发现中的应用[J]. 生物技术通报, 2022, **38**(5): 248-256.

[13] WANG Y C, GAO S H, LV J Y, *et al*. Phage display technology and its applications in cancer immunotherapy [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, **19**(2): 229-235.

[14] 刘倩倩, 夏思远, 张　舟. 噬菌体展示技术在多肽类药物开发中的应用[J]. 沈阳药科大学学报, 2017, **34**(8): 717-722

[15] LIU F, QI C L, KONG M, *et al*. Screening specific polypeptides of breast cancer stem cells from a phage display random peptide library [J]. *Oncol Lett*, 2016, **12**(6): 4727-4731.

[16] 逯晓青. 利用噬菌体随机肽库筛选膀胱癌EJ细胞导向肽的实验研究[D]. 太原：山西医科大学硕士学位论文, 2018.

[17] 郑　磊. 利用噬菌体展示技术筛选靶向胰腺癌细胞肽段并利用凋亡—靶向融合肽段抑制胰腺癌生长[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2020.

[18] ZHAO S H, LI C Y, GAO Y G, *et al*. Screening and identification of a specific binding peptide to ovarian cancer cells from a phage-displayed peptide library [J]. *Int J Pept Res Ther*, 2021, **27**(3): 1741-1749.

[19] SUI Y, ZHU R J, HU W, *et al*. Phage display screening identifies a prostate specific antigen(PSA)$^{-/lo}$ prostate cancer cell specific peptide to retard castration resistance of prostate cancer [J]. *TranslOncol*, 2021, **14**(3): 101020.

[20] LI X X, ZENG S Y, DING Y L, *et al*. Comprehensive analysis of the potential immune-related biomarker transporter associated with antigen processing 1 that inhibits metastasis and invasion of ovarian cancer cells [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, **8**: 763958.

[21] XIAO L, MA N, HE H M, *et al*. Development of a novel drug targeting delivery system for cervical cancer therapy [J]. *Nanotechnology*, 2019, **30**(7): 075604.

[22] 王乐丹, 李文桔, 胡　越. 利用噬菌体多肽库筛选卵巢癌细胞特异性结合肽[J]. 中国性科学, 2016, **25**(1): 56-60.

[23] LI C Y, GAO N, XUE Q, *et al*. Screening and identification of a specific peptide binding to cervical cancer cells from a phage-displayed peptide library [J]. *Biotechnol Lett*, 2017, **39**(10): 1463-1469.

[24] 林小波, 贾　环, 于照祥, 等. 噬菌体展示技术筛选胃癌高表达CD44分子特异性多肽序列的可行性分析[J]. 山东医药, 2018, **58**(24): 10-13.

[25] LI G Y, YIN G F, JI H H, *et al*. A study on screening and antitumor effect of CD55-specific ligand peptide in cervical cancer cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, **12**: 3899-3912.

[26] 张　帆, 贾　昕, 姚　红, 等. 噬菌体展示技术筛选人乳腺髓样癌细胞特异性结合肽[J]. 山西医科大学学报, 2019, **50**(2): 159-162.

[27] LAI Y D, WU Y Y, TSAI Y J, *et al*. Generation of potent anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibodies from mouse phage display library for cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(2): 214.

[28] REZAEI Z S, SHAHANGIAN S S, HASANNIA S, *et al*. Development of a phage display-mediated immunoassay for the detection of vascular endothelial growth factor [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, **412**(27): 7639-7648.

[29] LIU J J, CUI D X, JIANG Y, *et al*. Selection and characterization of a novel affibody peptide and its application in a two-site ELISA for the detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, **166**: 884-892.

[30] HU Z D, DENG A M. Autoantibodies in pre-clinical autoimmune disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2014, **437**: 14-18.

[31] XIANG Y, KATO T. Use of proteomics in analysis of autoimmune diseases [J]. *Lupus*, 2006, **15**(7): 431-435.

[32] SIOUD M . Phage display libraries: from binders to targeted drug delivery and human therapeutics [J]. *Mol Biotechnol*, 2019, **61**(4): 286-303.

[33] VANDORMAEL P, VERSCHUEREN P, WINTER L D, *et al*. cDNA phage display for the discovery of theranostic autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Res*, 2017, **65**(1): 307-325.

[34] WU F L, LAI D Y, DING H H, *et al*. Identification of serum biomarkers for systemic lupus erythematosus using a library of phage displayed random peptides and deep sequencing [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2019, **18**(9): 1851-1863.

[35] CASSINI A, HÖGBERG L D, PLACHOURAS D, *et al*. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, **19**(1): 56-66.

[36] ESHETIE S, TAREKEGN F, MOGES F, *et al*. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Ethiopia: a meta-analysis [J]. *BMC Infect Dis*, 2016, **16**(1): 689.

[37] NIAN S J, WU T, YE Y C, *et al*. Development and identification of fully human scFv-Fcs against Staphylococcus aureus [J]. *BMC Immunol*, 2016, **17**(1): 8.

[38] HUSSAIN S, JOO J, KANG J, *et al*. Antibiotic-loaded nanoparticles targeted to the site of infection enhance antibacterial efficacy [J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, **2**(2): 95-103.

[39] DE TURE M A, DICKSON D W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2019, **14**(1): 32.

[40] FONTANA I C, ZIMMER A R, ROCHA A S, *et al*. Amyloid-β oligomers in cellular models of Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 2020, **155**(4): 348-369.

[41] CHEN J M, HUANG Y R, ZHU C J, *et al*. Early detection of Alzheimer's disease by peptides from phage display screening [J]. *Brain Res*, 2019, **1721**: 146306.

[42] KIM S H, LEE E H, LEE S C, *et al*. Development of peptide aptamers as alternatives for antibody in the detection of amyloid-beta 42 aggregates [J]. *Anal Biochem*, 2020, **609**: 113921.

[43] MITSUYAMA K, NIWA M, MASUDA J, *et al*. Isolation and characterization of a novel short peptide associated with Crohn's disease [J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, **166**(1): 72-79.

[44] LU R M, HWANG Y C, LIU I J, *et al*. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases [J]. *J Biomed Sci*, 2020, **27**(1): 1.

[45] ALFALEH M A, ALSAAB H O, MAHMOUD A B, *et al*. Phage display derived monoclonal antibodies: from bench to bedside [J]. *Front Immunol*, 2020, **11**: 1986.

[46] KUMAR R, PARRAY H A, SHRIVASTAVA T, *et al*. Phage display antibody libraries: a robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **135**: 907-918.

[47] KIM S, PARK I, PARK S G, *et al*. Generation, diversity determination, and application to antibody selection of a human naïve Fab library [J]. *Mol Cells*, 2017, **40**(9): 655-666.

[48] SHIM H. Therapeutic antibodies by phage display [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, **22**(43): 6538-6559.

[49] SOMASUNDARAM R, CHORARIA A, ANTONYSAMY M. An approach towards development of monoclonal IgY antibodies against SARS CoV-2 spike protein(S) using phage display method: a review [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, **85**: 106654.

[50] LV Z, DENG Y Q, YE Q, *et al*. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody [J]. *Science*, 2020, **369**(6510): 1505-1509.

[51] SHI R, SHAN C, DUAN X M, *et al*. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, **584**(7819): 120-124.

[52] ZHU L, DENG Y Q, ZHANG R R, *et al*. Double lock of a potent human therapeutic monoclonal antibody against SARS-CoV-2 [J]. *Natl Sci Rev*, 2021, **8**(3): nwaa297.

[53] 朱有葱, 曾焱华. 噬菌体展示技术在疫苗研究中的应用进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, **42**(1): 51-55.

[54] BAO Q, LI X, HAN G R, *et al*. Phage-based vaccines [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, **145**: 40-56.

[55] GAO J M, WANG Y L, LIU Z Q, *et al*. Phage display and its application in vaccine design [J]. *Ann Microbiol*, 2010, **60**(1): 13-19.

[56] JONES R F, REYES J D, GIBSON H M, *et al*. An HER_2 DNA vaccine with evolution-selected amino acid substitutions reveals a fundamental principle for cancer vaccine formulation in HER_2 transgenic mice [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, **68**(7): 1143-1155.

[57] BARATI N, RAZAZAN A, NICASTRO J, *et al*. Immunogenicity and antitumor activity of the superlytic λF7 phage nanoparticles displaying a HER2/neu-derived peptide AE37 in a tumor model of BALB/c mice [J]. *Cancer Lett*, 2018, **424**: 109-116.

[58] ASADI-GHALEHNI M, GHAEMMAGHAMI M, KLIMKA A, *et al*. Cancer immunotherapy by a recombinant phage vaccine displaying EGFR mimotope: an *in vivo* study [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2015, **37**(3): 274-279.

[59] SHI H X, DONG S, ZHANG X T, *et al*. Phage vaccines displaying YGKDVKDLFDYAQE epitope induce protection against systemic candidiasis in mouse model [J]. *Vaccine*, 2018, **36**(38): 5717-5724.

[60] WANG Y C, SHI H X, DONG S, *et al*. Nontoxic engineered virus nanofibers as an efficient agent for the prevention and detection of fungal infection [J]. *Nano Res*, 2018, **11**(4): 2248-2255.

[61] 许叶春, 柳　红, 李剑峰, 等. 抗新冠肺炎药物研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, **41**(6): 111-118.

[62] LU F, WANG D, LI R L, *et al*. Current strategies and technologies for finding drug targets of active components from traditional Chinese medicine [J]. *Front Biosci*(Landmark Ed), 2021, **26**(9): 572-589.

[63] 赵玉男, 谢伟东, 邢东明, 等. 中药有效成分作用靶点研究的策略与实践[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, **18**(6): 1005-1011.

[64] 潘　超. 噬菌体展示技术淘选三水白虎汤干预类风湿关节炎滑膜细胞的靶点研究[D]. 广州: 南方医科大学硕士学位论文, 2014.

[65] 李变英, 陈飞燕, 陈建平, 等. T7噬菌体展示人肺癌cDNA文库筛选丹参-人参组分复方靶点研究[J]. 中成药, 2016, **38**(4): 745-750.

[66] SUN Y H, ZHANG X Y, XIE W Q, *et al*. Identification of UQCRB as an oxymatrine recognizing protein using a T7 phage display screen [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, **193**: 133-139.

[67] YU X M, ZHAO P, ZHANG W B, *et al*. Screening of phage displayed human liver cDNA library against dexamethasone [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, **45**(5): 701-705.

[68] SMITH M W, SMITH J W, HARRIS C, *et al*. Phage display identification of functional binding peptides against 4-acetamidophenol(paracetamol): an exemplified approach to target low molecular weight organic molecules [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **358**(1): 285-291.

[69] HE Q L, JIANG H, ZHANG F, *et al*. Simultaneous identification of multiple receptors of natural product using an optimized cDNA phage display cloning [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **18**(14): 3995-3998.

[70] DORST B V, MEHTA J, ROUAH-MARTIN E, *et al*. The identification of cellular targets of 17β estradiol using a lytic(T7) cDNA phage display approach [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, **25**(1): 388-393.