

戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体的鉴定

顾颖¹, 葛胜祥¹, 黄果勇², 李少伟¹, 朱子恒¹, 何志强¹, 陈毅歆¹, 王颖彬¹, 张军¹, 夏宁邵¹

(1. 厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

2. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西 430021)

摘要: 阻断实验发现, 用戊型肝炎病毒(HEV)衣壳蛋白重组抗原制备的8株抗HEV单克隆抗体(mAb), 分别识别3个构象表位和2个线性表位。用抗体捕获反转录PCR方法证实, 其中识别2个构象表位的3个mAb可以直接捕获HEV颗粒, 表明这2个表位位于HEV颗粒的外表面。识别这两个表位的mAb8C11和8H3均可中和HEV对恒河猴的致病性和感染性。mAb8C11缩短排毒时间的效应较明显, 而mAb8H3延迟机体抗HEV抗体阳转时间的效应较明显。二者的中和效应具有较明显的协同作用。中和单抗8C11、8H3对戊肝不同感染时期的血清均有显著阻断作用, Fab片段的阻断作用与完整抗体类似, 表明这两个mAb对应的中和表位是HEV体液免疫应答的优势表位。

关键词: 戊型肝炎病毒; 中和表位; 单克隆抗体

中图分类号: R373, Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2003)03-0217-07

戊型肝炎(戊肝)是由戊型肝炎病毒(HEV)引起的一种胃肠道传播的急性肝炎, 约占我国散发性肝炎中的15%~20%, 且时有爆发或流行的报道^[1]。HEV大小约27nm~34nm(平均30nm~32nm), 为单股正链无包膜的RNA病毒, 其归类尚未确定。HEV基因组包含3个开放读码框架(ORF), 其中ORF2编码病毒结构蛋白, 组成病毒衣壳, 也是主要的免疫优势蛋白。目前已发现多个ORF2重组蛋白具有免疫保护作用, 表明ORF2蛋白上存在着重要的中和表位^[2]。由于中和性单克隆抗体(mAb)对戊肝疫苗、诊断试剂、感染机制等基础与应用研究的重要作用, 戊肝中和mAb的分离一直是戊肝研究的重点之一。但由于戊肝细胞模型的缺乏, 这一研究的进展十分缓慢。目前报道的唯一的一个戊肝中和mAb, 是由Schofield等^[3]利用噬菌体抗体文库技术从黑猩猩外周血淋巴细胞中分离鉴定出的。最近, 我们在大肠杆菌中表达了HEV ORF2的一个片段, 获得的重组蛋白(NE2)可自发形成以二聚体为基础的多种聚合形式, 类似于病毒衣壳蛋白的装配过程^[4,5]。NE2蛋白二聚体及多聚体对戊肝急性期、恢复期血清均有较单体蛋白强许

多的反应性, 免疫恒河猴可产生良好的保护性, NE2免疫多抗可以完全中和HEV对恒河猴的感染性。这些结果均表明, NE2蛋白较好地模拟了HEV病毒衣壳蛋白的天然立体结构, 并正确形成了重要的中和表位^[4-7]。本研究中, 我们从E2蛋白制备出的多株mAb中成功鉴定出两株中和mAb, 分别识别HEV ORF2上的两个不同表位区域, 从而首次证实: HEV ORF2上至少存在2个不同的中和表位区域, 并为HEV疫苗、诊断、病毒感染机制等相关研究提供了重要的工具。

材料与方法

1 HEV ORF2重组蛋白NE2及抗HEV mAb的制备 HEV ORF2区重组蛋白NE2及由NE2免疫筛选出的抗HEV mAb, 均由本实验室制备, 具体方法参见文献^[5,8]。

2 抗HEV mAb与NE2的蛋白印迹试验(Western blotting)

8株抗HEV mAb(1F6、2C9、7E8、8H3、8C11、13D8、15B2和16D7)分别与NE2蛋白及沸水浴10min后的NE2蛋白, 按文献方法进行蛋白印迹试验^[5]。

3 抗HEV mAb间的相互阻断试验 以改良过碘酸钠法标记各mAb, 用ELISA法进行相互阻断试验。取每孔0.05μg/ml NE2包被的ELISA板, 分为8组, 每组分别加入100μl孔的不同单抗(分别以20%小牛血清PBS稀释至ELISA滴度为1:10⁵), 另外1个孔中仅加入20%小牛血清PBS作为对照。37℃孵育30min, 吸弃液体, 在8组孔中分别加入100μl孔的8种不同的HRP标记的单抗(以20%小牛血清PBS稀释至1:10³ ELISA滴度), 37℃孵育30min; 用PBST洗涤5次

收稿日期: 2003-03-27; 修回: 2003-05-21

基金项目: 福建省科技重大项目(2002F013)

作者简介: 顾颖(1977-), 女, 博士研究生。

通信作者: 夏宁邵, 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室(E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn)

并扣干后,加入显色剂,37℃温育 15min,2mol/L 硫酸 50 μ l 终止反应。于酶标仪上读取 OD_{450/620nm} 的值,计算阻断率(阻断率=1-阻断孔 OD 值/对照孔 OD 值),阻断率大于 50% 判断为有阻断。

4 抗体捕获 HEV 反转录 PCR (RT-PCR) 紫外照射 1.5ml Eppendorf 管 30min,分别加入 500 μ l 以碳酸包被缓冲液(pH 为 9.5)1:1 000 稀释的 8 种不同 mAb,以空白包被液、抗 HBs mAb 为阴性对照,兔抗 NE2 为阳性对照。37℃包被过夜,吸去包被液,加入 1.5ml 封闭液(含 2% 的白蛋白的 PBS, pH7.4),37℃封闭 2h;吸去封闭液,加入 500 μ l 以无菌生理盐水稀释的 HEV 病毒阳性粪便 10% 悬液,37℃反应 2h,PBST 洗涤 6 遍;加入 250 μ l ddH₂O,按文献进行 RT-PCR 检测^[7]。

5 恒河猴 HEV 感染中和试验 实验用猴由广西疾病预防控制中心提供。实验前进行常规医学观察,并持续 2 周检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)水平,攻毒前检测抗 HEV 抗体均为阴性,实验期间分笼喂养。12 只恒河猴分为 4 组,每组 3 只,第 1 组为对照组(猴 KF25~27),第 2 组为 8C11 mAb 中和组(猴 KF16~18),第 3 组为 8H3 mAb 中和组(猴 KF19~21),第 4 组为混合 mAb 组(8C11、8H3 mAb 等量混合)(猴 KF22~24)。HEV 阳性粪便稀释至 10³PCR 滴度,各取 2ml 分别与 2ml 的 mAb 稀释液、mAb8C11 腹水(滴度 1:10⁵)、mAb8H3 腹水(滴度约为 1:10⁴),或 8C11 和 8H3 等体积混合腹水混匀,4℃过夜(约 14h),室温孵育 2h。每种病毒-腹水混合物分别静脉感染 3 只恒河猴(每只 1ml)。从攻毒当天起每日收集粪便至第 2 周,随后每周 2 次收集粪便,以 RT-PCR 检测粪便中 HEV RNA。从攻毒起每周收集血清,检测 ALT 和抗 HEV IgG 抗体。抗 HEV IgG 抗体检测使用 NE2 抗原(参见文献^[9])。以粪便出现排毒或抗体出现阳转作为 HEV 感染成功指标。

6 抗 HEV mAb 对抗 HEV 多抗血清的阻断试验 抗 HEV 多抗血清包括 3 份戊肝患者急性期血清、3 份戊肝恢复期抗 HEV IgG 阳性血清以及 3 只 HEV 实验感染猴系列血清。取 NE2 包被并封闭好的 ELISA 板,分别加入 100 μ l 浓度为 1mg/ml 的不同抗 HEV mAb,以血清稀释液为未阻断对照。37℃孵育 30min,甩干,加入对比稀释的待检血清,37℃孵育 30min,PBST 洗涤 5 次,扣干后每孔加入 100 μ l 稀释好的抗人 IgG-HRP,37℃温育 30min;洗涤 5 次,扣干,加入显色剂,37℃温育 10min,2mol/L 硫酸 50 μ l 终止反应,读取 OD_{450/620nm}。以未阻断孔 OD 值在 1.0~1.5 之间的稀释度计算阻断率,阻断率=(1-阻断孔 OD/未阻断孔 OD)×100%,阻断率>50% 为阳性。

结 果

1 抗 HEV mAb 识别表位的构象依赖性

分别进行 8 株抗 HEV mAb 与 NE2 蛋白的蛋白印迹检测,结果如图 1 所示。mAb1F6、2C9、7E8、

8H3、8C11 和 13D8 对二聚体和多聚体蛋白的反应性均明显强于单体,而且当对 NE2 蛋白进行热处理以破坏其高级结构并使多聚体解聚成单体后,这 6 个 mAb 的反应性均有显著下降,表明这 6 个 mAb 识别的表位依赖于特定的空间构象。而 mAb15B2 和 16D7 对 NE2 的单体、聚体、热处理后蛋白的反应性均基本相同,表明这 2 个 mAb 识别的表位基本不受空间结构的影响,属于线性表位。

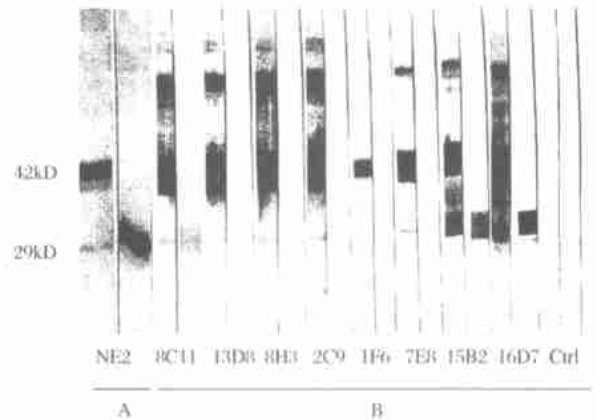


图 1 抗 HEV mAbs 与 NE2 的蛋白印迹试验

Figure 1 Western blotting of anti-HEV mAbs against NE2 protein

A. SDS-PAGE; B. Western blotting.

Proteins in left strips were unboiled, and proteins in right strips were treated in boiled water bath for 10min before electrophoresis. Ctrl= Control.

2 抗 HEV mAb 间的相互阻断

检测 8 株抗 HEV mAb 间的相互阻断,结果在 6 个构象依赖性 mAb 中,mAb8C11 和 13D8 之间可以彼此有效阻断。同样,mAb8H3 和 2C9、1F6 和 7E8 之间也可以彼此阻断。而另 2 个线性表位 mAb16D7 和 15B2,则对其他任一抗体均不产生相互阻断。这些结果表明,在 NE2 抗原上至少存在 5 个彼此分开的表位区域,其中 3 个为构象依赖性区域,另 2 个为线性表位区域(图 2)。

3 抗 HEV mAb 对 HEV 病毒的捕获作用

将 8 个抗 HEV mAb 分别包被 eppendorf 管,进行抗体捕获 RT-PCR 实验,结果 mAb8C11、8H3 和 13D8 均能有效捕获天然 HEV 病毒颗粒,表明这 3 个 mAb 识别的表位均位于 HEV 病毒衣壳的外表面(图 3)。由于 mAb8C11 和 13D8 可以相互阻断,因此这两个 mAb 可能识别 HEV 上的共同或彼此重叠的表位,而 8H3 则识别 HEV 上的另一表位区域。

4 抗 HEV mAb 的中和试验

HEV 病毒分别与 mAb8C11、8H3、8C11 混合物

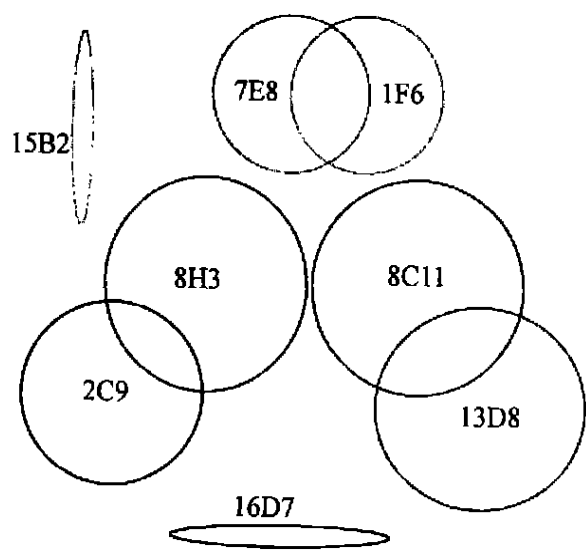


图 2 NE2 上不同 mAbs 表位区域的位置关系
Figure 2 Distinct epitope domains in NE2 presented by anti-HEV monoclonal antibodies
Conformation dependent epitopes were presented as circles, antibodies mutually inhibitory were overlapped. Linear epitopes were presented as clubs.

孵育后, 静脉感染恒河猴, 结果如表 1 所示。对照组 3 只猴均出现了明显的 ALT 异常, 高峰值/感染前值均大于 3.0, 并且较早出现了粪便排毒。mAb 中和组 ALT 高峰值/感染前值均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。除混合 mAb 组的 1 只猴(KF22) ALT 高峰值/感染前值为 2.3 外, 其余均低于 2.0。mAb 中和组的实验猴均有较明显的排毒起始时间推迟的趋势。混合 mAb 组的 1 只实验猴始终未出现排毒, 该组的另两只猴(KF22、KF23) 出现排毒的时间也是最晚的; mAb8C11 可见缩短排毒时间的趋势, mAb8H3 组的排毒时间未见明显缩短, 而混合 mAb 组排毒时间显著短于其他组 ($P < 0.05$), 其中 1 只甚至始终未见排毒。8H3mAb 可显著推迟抗体阳转时间 ($P < 0.05$), 而 8C11 则不能, 混合 mAb 则可使 1 只实验猴始终不产生抗体, 1 只猴抗体阳转时间显著延迟 ($P < 0.05$)。这些结果表明: mAb8C11 和 8H3 均具有中和保护作用, 8C11 对缩短排毒时间较明显, 8H3 对延迟抗体产生较明显, 而二者联用可明显增强中和保护效应。

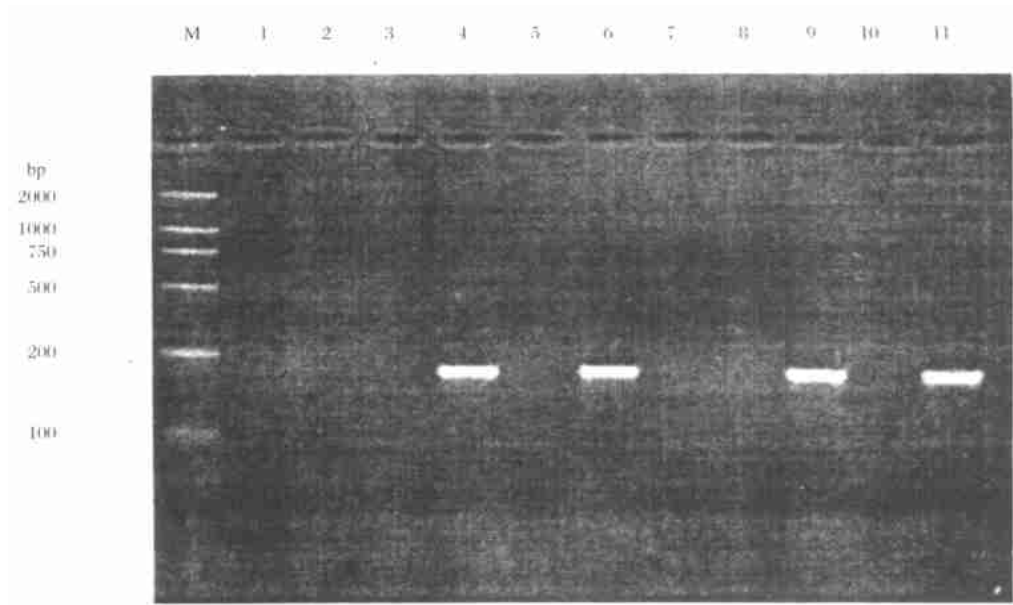


图 3 抗 HEV mAbs 对 HEV 的免疫捕获

Figure 3 Immune capture of HEV by anti-HEV monoclonal antibodies.

M. Molecular weight marker; Lane 1. Uncoated; Lane 2. mAb 1F6; Lane 3. mAb 7E8; Lane 4. mAb 8C11; Lane 5. mAb 15B2; Lane 6. mAb 8H3; Lane 7. mAb 16D7; Lane 8. mAb 2C9; Lane 9. mAb 13D8; Lane 10. mAb anti-HBsAg; Lane 11. Rabbit anti-NE2.

5 mAb 对戊肝感染猴系列血清和戊肝患者血清的阻断实验

为了解 8C11 和 8H3 表位在体液免疫应答中是否具有免疫优势, 检测了 mAb 对实验猴感染不同时期血清的阻断效应。在过去的研究中发现,

mAb8H3 与 NE2 抗原结合后会迅速解离, 因此 mAb8H3 对自身也无法实现有效阻断, 因此无法独立用于阻断实验^[8]。但当 mAb8C11 与 NE2 结合后再与 mAb8H3 结合, 则可显著增强 8H3 与 NE2 的结合, 而且 8H3-NE2-8C11 的结合十分稳定, 而

mAb13D8 没有对 8H3 结合能力的增强作用(结果另文发表), 因此对 mAb8H3 的阻断实验只能通过 8H3 与 8C11 的联合阻断来间接进行。

表 1 抗 HEV mAb 对感染 HEV 恒河猴的中和作用

Table 1 Neutralization effects of anti-HEV mAbs in HEV infected rhesus monkeys

Group	Monkey no.	ALT (peak/ pre-infection)	Onset day of virus in feces	Lasting day of virus in feces	Week of anti-HEV seroconversion
Control	KF25	3. 3	8	47	5
	KF26	4. 5	4	65	5
	KF27	3. 6	16	25	5
mAb8C11	KF16	1. 2	19	22	5
	KF17	1. 8	26	15	6
	KF18	0. 9	10	49	5
mAb8H3	KF19	1. 0	16	36	7
	KF20	1. 4	19	40	6
	KF21	1. 4	16	83	6
Mixed mAbs of	KF22	2. 3	23	18	5
8C11, 8H3	KF23	1. 3	40	12	8
	KF24	0. 8	Unconverted	0	Unconverted

阻断实验结果如表 2, 可见 mAb8C11 可以单独阻断从急性期到恢复晚期等各个时期的血清, mAb8H3 单独不能产生阻断, 但 mAb8H3 与 mAb8C11 联合阻断的效应显著增强。而不能捕获病毒的其他 5 个 mAb 均不产生阻断效应。mAb13D8 阻断效果与 8C11 类似, 但没有与 8H3 的协同作用(结果未列出)。这一现象可以解释为何 mAb8H3 单独无法体现出阻断效应, 而与 mAb8C11 联合应用则表现出较二者单独应用均强的阻断效应。对戊肝患者急性期和恢复期血清的阻断实验的结果与猴血清基本相同(表 2)。

为减少位阻效应对阻断实验的影响, 同时用 mAb8C11 和 8H3 的 Fab 片段进行了阻断实验, 结果 Fab 片段的阻断效果与完整抗体基本相同, 提示 mAb 的阻断效应是表位特异的(图 4)。

阻断实验的结果表明中和表位 8C11 和 8H3 的抗体产生早, 持续时间长, 在机体抗 HEV 免疫应答中居重要地位, 是免疫优势表位。

讨 论

一般认为, 抗体的中和机制会因病毒类型、细胞受体类型以及中和抗体类型的不同而不同, 但总会表现在抗体阻断病毒吸附和侵入、阻止膜融合或病毒脱衣壳等过程上, 几乎所有已报道的中和抗体均识别病毒外表面的特定表位区域。基于这一认识, 本研究中首先利用抗体捕获 PCR 方法鉴别出 3 个能直接捕获天然 HEV 病毒颗粒的 mAb, mAb 交叉

表 2 抗 HEV mAbs 对不同感染时期患者或实验感染猴血清的阻断

Table 2 Blocking of sera of patients of different infectious stages or of experimentally infected monkeys' sera by anti-HEV mAbs

Serum	Sampling week (post-infection)	Serum dilution	Unblocking OD	Blocking Rate(%)			
				8C11	8H3	8C11+	8H3
Monkey							
F4	3	1: 40	1.026	98	9	98	
	4. 5	1: 200	1.107	96	38	98	
	18	1: 80	1.418	87	25	94	
	52	1: 10	1.416	51	3	67	
F6	4	1: 5	1.111	98	20	98	
	6	1: 200	1.338	78	37	98	
	13	1: 200	1.062	86	32	97	
F15	4	1: 20	1.120	92	25	91	
	6	1: 800	1.316	83	33	98	
	10	1: 100	1.470	76	34	96	
	16	1: 1, 600	1.339	82	26	95	
Patient							
HV514	Convalescence	1: 80	1.161	76	24	94	
HV454	Convalescence	1: 80	1.115	60	37	89	
HV515	Convalescence	1: 40	1.499	23	- 1	88	
S31	Acute	1: 250	1.496	ND*	ND	89	
S51	Acute	1: 1, 250	1.295	ND	ND	95	
S163	Acute	1: 250	1.480	ND	ND	84	

* ND. no data.

阻断实验表明, 其中 2 个 mAb (8C11 和 13D8) 识别共同的表位区域, 而另 1 个 mAb(8H3) 识别另一个表位区域。HEV 恒河猴感染中和实验证实, mAb8C11 和 8H3 均能中和 HEV 对恒河猴的致病性, 并有延迟排毒开始时间的趋势。但这两个 mAb 的中和效应有所差别; 8C11 对于缩短感染猴粪便

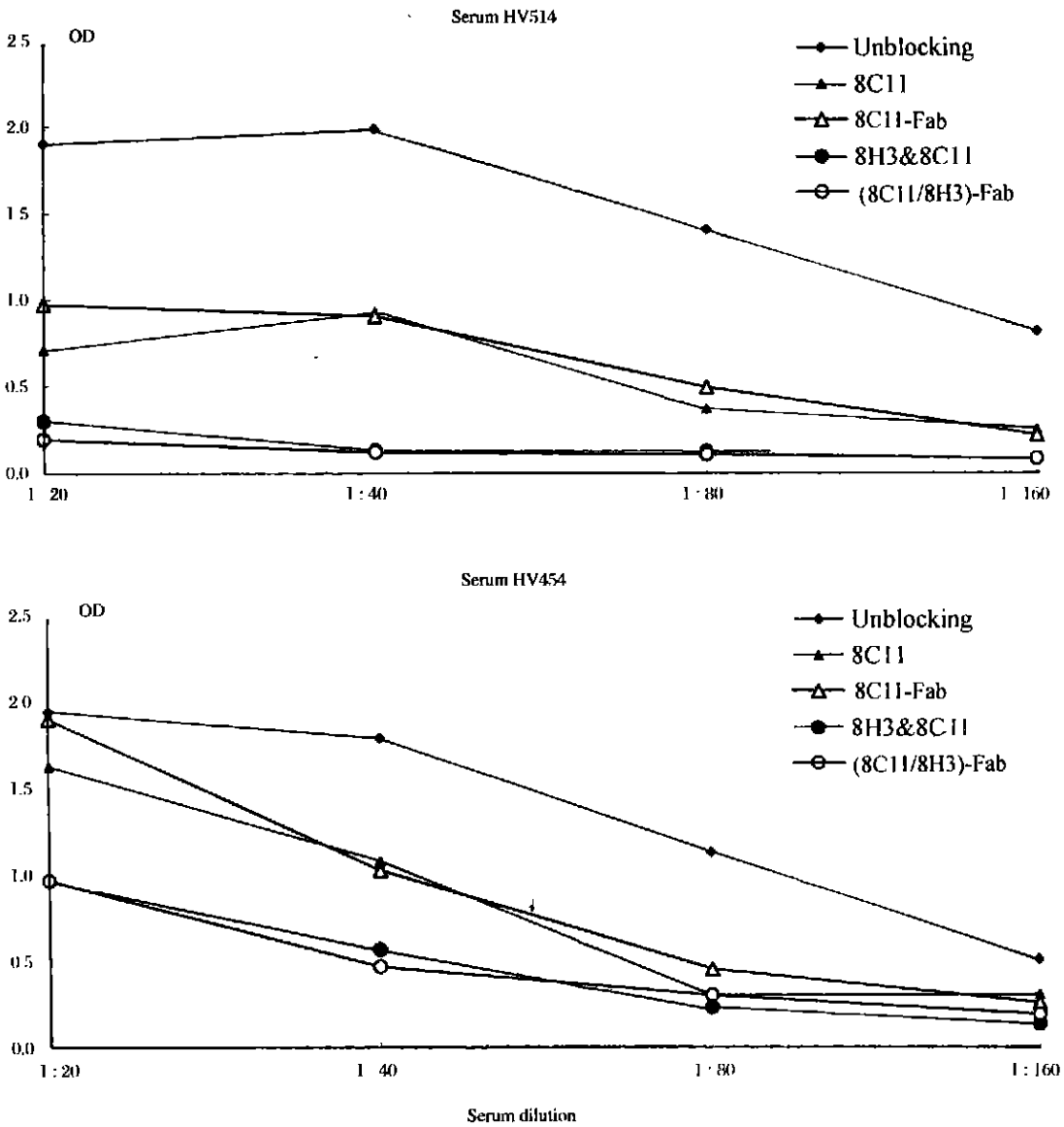


图4 中和性抗 HEV mAbs 及其 Fab 段对戊肝患者血清的阻断

Figure 4 Blocking of hepatitis E patients' sera by neutralizing anti-HEV mAbs and their Fab fragments

排毒时间的效应更为明显,而 8H3 可更显著地延迟猴抗 HEV 抗体的阳转时间。两种 mAb 的协同效应显著,在 3 只实验猴中有 1 只猴被完全保护,既没有肝炎的生化表现,也不出现粪便排毒和抗体阳转;另 2 只猴的粪便排毒时间均有显著缩短,其中 1 只抗体阳转时间显著推迟。这些结果首次证实:在 HEV 衣壳蛋白上至少具有 2 个暴露在外的构象依赖性中和表位,其对应的 mAb 中和效应的差别,可能意味着这 2 个表位区域在病毒感染宿主细胞过程中,以及机体对病毒的免疫应答中,各自发挥着不同的作用。

Meng 等^[10]利用体外病毒细胞侵入模型检测一系列 ORF2 重组蛋白的多抗血清的中和活性,发现

HEV ORF2 中和抗体的形成更多的是依赖于特定空间构象的形成, aa452~ 617 是能形成主要中和表位最小片段,与 Schofield 等^[3]推测出的中和表位区域,以及本研究所分离出的两个中和 mAb 的表位组成区域均位于类似范围内。这些结果的一致性提示,HEV 衣壳蛋白上的主要中和表位应位于 aa452 ~ 604 这一范围内。目前尚无法证实 Schofield 等^[3]所得到的中和 mAb 是否与 8C11 或 8H3 之一识别共同的表位区域。

对 HEV 感染猴不同时期血清的阻断作用显示,在感染早期抗体刚阳转时,8C11 和 8H3 就已可对猴血清产生阻断,这种阻断作用一直持续至一年以后。8C11 和 8H3 对戊肝患者急性期血清和恢复

期血清同样具有显著的阻断作用,而且 mAbFab 片段的阻断作用与完整抗体的阻断作用完全相同,提示这种阻断作用是表位特异的。这些结果表明: mAb8C11 和 8H3 对应的中和表位是 HEV 感染过程中的免疫优势表位,机体在感染早期就已对其产生体液免疫应答,并且这种应答可长期持续存在。与 NE2 蛋白类似,在过去的研究中,HEV ORF2 区域的重组蛋白 ORF2.1(aa394~660)、55kD 蛋白(aa112~607)均因对戊肝感染者的恢复期血清有较高的检出率而与其他众多重组戊肝抗原或合成肽抗原有着显著的差别。众多缺失及延伸突变体的研究均提示,这种抗原活性的差别主要是因 ORF2 上的构象依赖性表位的形成密切相关^[11-15]。本研究结果提示,8C11 和 8H3 中和表位可能构成了这类免疫优势表位的主要成份,这也与流行病学研究显示的人群抗 HEV 抗体具有保护作用相符。对 ORF2.1、55kD 抗原上 8C11 和 8H3 表位活性的检测将有助于证实这一推测。

在电镜下,HEV 颗粒表面有明显的凸起和缺刻结构,与 HAV 的平滑表面明显不同。最近 Li 等利用冷冻蚀刻电镜技术获得了昆虫细胞表达的 HEV 类病毒颗粒(VLP)的立体结构图像,发现 HEV 的 VLP 为一种含有突出于二十面体二倍轴的二聚体的 T=1 颗粒^[16]。NE2 与其它蛋白相比的显著区别之一,即在于 NE2 能自发形成稳定的二聚体结构和多聚体结构。这种结构可能与 VLP 上观察到的二聚体结构十分相似,这可能也是 NE2 蛋白上可以正确形成 HEV 中和表位的主要原因之一^[5]。

传统抗原检测的抗 HEV IgG 抗体的特点之一是其抗体多数情况下并不持久,这与通常认为的抗病毒 IgG 抗体一般长期持续存在矛盾,较为可能的解释传统抗原多不能有效形成 HEV 的许多重要构象依赖性免疫优势表位,而仅包含不具有免疫优势而通常不形成长期免疫记忆的线性表位^[17-20]。这一情况必然导致传统试剂在进行 HEV 流行病学调查时的显著缺陷。因此利用包含 HEV 主要构象表位的抗原进行流行病学调查,将可能获得与过去不同的结果。最近,李新兰等^[21]用 NE2 抗原和传统的 Genelabs 公司抗 HEV IgG 试剂,对 50 例戊肝患者 10 年后的随访血清进行了平行试验检测,发现 NE2 抗原的检出率为 86%,显著高于 Genelabs 公司试剂的 36%,从而部分证实了这一推测。近年来,国外利用 ORF2.1 抗原或 55kD 抗原与传统试剂同时进行的多次研究也均发现,新型抗原可显著提高

人群中抗 HEV IgG 抗体的检出率。但这些研究的一个重要缺陷在于缺乏有力的证据来证实新型抗原的特异性。由于此类研究通常针对的是既往感染者,已不可能获得 HEV 病原学证据。目前的做法是通过检测待检血清对实验感染动物多抗血清的阻断作用,来证实检测结果的特异性^[22]。由于多抗血清中的抗体组成复杂,常会有多个抗体同时发挥阻断作用,其阻断实验的结果必然受到抗体位阻效应的较大影响,而且也难以确切证实发挥阻断效应的抗体是 HEV 特异的,因此这种阻断实验的可靠性一直受到质疑。本研究结果显示,戊肝中和 mAb 或位阻效应更小的 Fab 片段,对 HEV 各个感染时期血清有明显的阻断效应,则较好地解决了这一问题,从而可成为人群中抗 HEV 抗体的特异性验证的重要手段。

许多病毒的中和表位区域通常也就是病毒与细胞受体结合的区域。本研究发现的 2 个中和 mAb 不同的中和机制及协同作用,可能意味着 HEV 在感染细胞时可同时或先后与 2 个或与更多的受体相结合。对 HEV 上 8C11 表位区域与 8H3 表位区域的进一步研究,对于阐述 HEV 与细胞的相互作用机制、HEV 细胞受体的分离鉴定等均具有重要的意义。已有多个研究表明,HEV ORF2 的线性表位抗体基本上没有中和活性,因此对于 HEV 疫苗而言,评估疫苗刺激产生抗体的特异性比抗体产生的总量更有意义。在过去 20 年里,甲肝疫苗和乙肝疫苗的发展很大程度上得益于对免疫有很好指导作用的中和抗体检测。本研究获得的中和 mAb,同样也将对 HEV 疫苗的研制提供重要帮助。抗 HEV 中和 mAb 的获得,同样也为戊肝抗体治疗研究奠定了基础。

(致谢:军事医学科学院朱关福研究员、香港大学微生物学系吴文翰教授对本研究提供了重要指导,特此致谢。)

参考文献:

- [1] Zhuang H, Cao X Y, Liu C B, et al. Epidemiology of hepatitis E in China[J]. *Gastroenterologia Japonica*, 1999, 36(supp13): 135-138.
- [2] Purcell R H, Emerson S U. Hepatitis E virus [A]. Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, et al. *Fields virology* [M]. 4th ed. Vol 2. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001, 3051-3061.
- [3] Schofield D J, Glanann J, Emerson S U, et al. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein[J]. *J Virol*, 2000, 74: 5548-5555.
- [4] Zhang J Z, Ng M H, Xia N S et al. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein[J]. *J*

- Med Virol, 2001, 64: 125– 132.
- [5] 李少伟, 张军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究[J]. 生物工程学报, 2002, 18: 463– 467.
- [6] Im S, Zhang J Z, Zhuang H, et al. A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus [J]. Vaccine, 2001, 19: 3726– 3732.
- [7] 葛胜祥, 张军, 黄果勇, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 多肽对恒河猴的免疫保护研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 35– 42.
- [8] 顾颖, 张军, 李少伟, 等. 生物传感器对戊型肝炎病毒单克隆抗体部分特性的研究[J]. 细胞和分子免疫学杂志, 2002, 18(6): 617– 620.
- [9] 葛胜祥, 张军, 彭耿, 等. 基于多聚化重组抗原的检测戊型肝炎病毒 IgM 与 IgG 抗体的 ELISA 的建立及初步评估[J]. 病毒学报, 2003, 19(1): 78– 86.
- [10] Meng J, Dai X, Chang J C, et al. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus[J]. Virology, 2001, 288(2): 203– 211.
- [11] Li F, Riddell M, Seow H, et al. Recombinant subunit ORF2.1 antigen and induction of antibody against immunodominant epitopes in the hepatitis E virus capsid protein[J]. J Med Virol, 2000, 60: 379– 386.
- [12] Li F, Zhuang H, Kolivas S, et al. Persistent and transient antibody responses to hepatitis E virus detected by Western immunoblot using open reading frame 2 and 3 and glutathione S-transferase fusion proteins[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32: 2060– 2066.
- [13] Tsarev S, Tsarev T, Emerson S, et al. ELISA for antibody to hepatitis E virus based on complete open reading frame-2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates [J]. J Infect Dis, 1993, 168: 369– 378.
- [14] Li T C, Zhang J, Shinzawa H, et al. Empty virus-like particle-based enzymelinked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus[J]. J Med Virol, 2000, 62(3): 327– 333.
- [15] Zhang Y, McAtee P, Yarbough P O, et al. Expression, characterization, and immunoreactivities of a soluble hepatitis E virus putative capsid protein species expressed in insect cells[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 4(4): 423– 428.
- [16] Xing L, Kato K, Li T, et al. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual domain T = 1 particle presenting native virus epitopes[J]. Virology, 1999, 265: 35– 45.
- [17] Ke W M, Tan D, Li J G, et al. Consecutive evaluation of immunoglobulin M and G antibodies against hepatitis E virus[J]. J Gastroenterol, 1996, 31: 818– 822.
- [18] 李奎, 庄辉, 朱万孚, 等. 抗戊型肝炎病毒 IgG 和 IgM 抗体对诊断急性戊型肝炎的意义[J]. 中华内科杂志, 1999, 38(11): 733– 736.
- [19] Mast E E, Alter M J, Holland P V, et al. For the Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel[J]. Hepatology, 1998, 27: 857– 861.
- [20] 戎广亚, 孙杰, 周继文, 等. 戊型肝炎病人血清抗-HEV IgG 与 IgM 和 HEV RNA 的动态变化[J]. 病毒学报, 1998, 14: 268– 270.
- [21] 李新兰, 任晖, 梁新海, 等. 戊型肝炎患者十年后血清抗病毒抗体的检测[J]. 地方报通报, 2002, 17(3): 14– 17.
- [22] Arankalle V A, Joshi M V, Kulkarni A M, et al. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species[J]. J viral Hepat, 2001, 8(3): 223– 227.

Identification of Neutralizing Monoclonal Antibodies to Hepatitis E Virus

GU Ying¹, GE Sheng-xiang¹, HUANG Guo-yong², LI Shao-wei¹, ZHU Zi-heng¹,
HE Zhi-qiang¹, CHEN Yixian¹, WANG Yin-bing¹, ZHANG Jun¹, XIA Ning-shao¹

(1. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Center of Disease Control and Prevention of Guanxi, Nanning 430021, China)

Abstract: Blocking assays showed that eight anti-HEV monoclonal antibodies(mAbs) prepared from a recombinant capsid protein of HEV recognized three conformational epitopes and two linear epitopes respectively. Three mAbs recognizing two conformational epitopes could capture HEV particles directly, which suggested that these two epitopes exposed on the outer surface of the virus particle. Both the mAbs 8C11 and 8H3 which recognized these two epitopes respectively showed neutralizing activity against the pathogenicity and infectivity of HEV to rhesus monkey. The effect of shortening feces shedding was more obvious in mAb 8C11 neutralizing group, but the delay of seroconversion was more obvious in mAb 8H3 neutralizing group. The neutralizing effects were enhanced when both mAbs were used. Significant sera blocking effect could be seen in both acute phase and convalescent phase samples by mAb 8C11 and 8H3, and the blocking effect of Fab fragments of the mAbs were the same as the whole antibodies, which suggests that the corresponding epitopes of these two mAbs are the immunodominant epitopes in humoral immunoresponse against HEV.

Key words: hepatitis E virus; neutralizing epitope; monoclonal antibody

Corresponding author: Xia Ning-shao. E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn