

大肠杆菌重组颗粒性戊型肝炎疫苗对恒河猴的免疫保护

张军¹, 李益民², 李少伟¹, 欧山海¹, 黄果勇³, 何志强¹, 葛胜祥¹, 鲜阳凌², 逢淑强², 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. 北京万泰生物药业有限公司, 北京 102200; 3. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西 南宁 430021)

摘要: 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒(HEV)衣壳蛋白 ORF2 片段 HEV 239 重组蛋白颗粒, 经铝佐剂吸附后, 分别以 5 μ g、10 μ g 和 20 μ g 剂量免疫恒河猴, 28 天时以相同剂量加强免疫 1 次, 3 周后分别以不同病毒滴度的基因 iv 型或基因 Ⅲ型 HEV 静脉攻击。结果, 加强后 3 周, 3 个免疫剂量组猴的抗体几何平均滴度分别为 I: 27 175、I: 34 409、I: 41 607, 以世界卫生组织参比血清定量, 则分别为 1 098 IU/ml, 1 357 IU/ml, 1 724 IU/ml。每个剂量免疫组及对照组各有 3 只猴接受 10⁷ 病毒滴度基因 iv 型 HEV 感染, 对照组 3 只猴均被成功感染, 2 只出现肝炎; 20 μ g 免疫组 3 只猴均未被感染; 10 μ g 和 5 μ g 免疫组各有 2 只猴未被感染, 另 1 只猴出现短暂感染, 免疫猴均未出现肝炎。3 个剂量免疫组及对照组另外 3 只猴, 接受 10⁴ 病毒滴度基因 iv 型 HEV 感染, 对照组 3 只猴均被感染, 1 只出现肝炎; 而免疫猴均未被感染, 也未出现肝炎。3 只 10 μ g 免疫猴和 3 只对照猴分别接受 10⁷ 病毒滴度基因 Ⅲ型 HEV 感染, 对照组均被感染并出现肝炎, 而免疫组均未出现肝炎, 有 2 只未被感染, 另 1 只被短暂感染。另有 3 只 10 μ g 免疫猴和 3 只对照猴分别接受 10⁴ 病毒滴度基因 Ⅲ型 HEV 感染, 对照组均被感染, 而免疫组均未被感染。这些结果表明: HEV 239 疫苗可以完全预防 HEV 导致的肝炎, 并保护大多数恒河猴不被 HEV 感染。另外, 疫苗对基因 Ⅲ型 HEV 的保护性与基因 iv 型 HEV 相近。

关键词: 戊型肝炎; 疫苗; 原核表达; 恒河猴; 保护率

中图分类号: R512.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2004)01-0001-06

戊型肝炎(戊肝)是一种由戊型肝炎病毒(HEV)引起的、主要经胃肠道传播的急性肝炎, 主要流行于亚洲、非洲和中美洲发展中国家, 是一种世界性的危害严重的传染病。戊肝约占我国临床肝炎的 15%~20%, 且时有爆发或流行的报道^[1,2]。戊肝临床表现与甲型肝炎类似, 但孕妇感染病情较重, 死亡率可高达 20%^[2]。不同来源的戊肝毒株的基因序列存在一定的差异。目前通常将 HEV 分为 4 个基因型, 即以缅甸株为代表的 iv 型(亚洲型), 以墨西哥株为代表的 Ⅲ型(北美洲型), 以美国株和猪株为代表的 Ⅱ型(美国型), 以及以中国株和中国台湾株为代表的 Ⅰ型(中国型)。我国流行的 HEV 以 iv 型和 Ⅲ型为主^[2,3]。各地毒株在 ORF2 氨基酸序列上的高度同源性造成了 HEV 血清学上的相似性, 敏感动物交叉保护实验以及不同病毒基因型抗原的血清学一致性研究结果, 提示这些 HEV 均为同一血清型^[4-9]。

HEV 含 3 个开放读码框架(ORF), 其中 ORF2 编码 660 个氨基酸的多肽(PORF2), 组成病毒衣壳^[2]。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^[10-12]。最近, 我们在大肠杆菌中表达了 HEV ORF2 aa 394~606 的一个片段, 获得的重组蛋白(NE2)免疫恒河猴可产生良好的保护性^[13-15]。利用 NE2 蛋白制备的单克隆抗体, 成功地鉴定出 HEV ORF2 上的 2 个不同的中和表位区域^[16]。在此基础上, 进一步利用大肠杆菌表达了 ORF2 的 aa 368~606 片段, 获得的重组蛋白 HEV 239 可以形成病毒样颗粒, 免疫原性较 NE2 有了显著的加强, 从而克服了一般重组疫苗免疫原性不足的重大障碍。而同时抗原性, 尤其是中和表位活性也有所提高, 成为目前最有希望的候选戊肝疫苗之一^[17]。本研究将 HEV 239 疫苗免疫恒河猴, 以进一步系统观察其免疫原性和对不同基因型 HEV 攻击的免疫保护性。

材料与方法

1. 实验动物 36 只健康恒河猴捕自中国南部地区, 1~2

收稿日期: 2003-09-08; 修回日期: 2003-11-03

基金项目: 福建省科技重大项目(2002F013); 教育部跨世纪人才优秀培养计划

作者简介: 张军(1972-), 男, 副研究员

通讯作者: 夏宁邵, 361005 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)

岁,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。免疫前检测抗 HEV 抗体均为阴性,实验期间分笼喂养。

2 疫苗 重组(大肠杆菌)戊肝疫苗中的戊肝抗原 HEV 239 为大肠杆菌表达的非融合蛋白,纯度大于 95%,以直径 15nm~ 30nm 的颗粒形式存在,并以铝佐剂吸附^[17]。以 10^{μg}/ml、20^{μg}/ml、40^{μg}/ml 浓度分别配制疫苗,每支 0.5ml,故实际接种剂量为每支 5^{μg}、10^{μg}、20^{μg}。

3 免疫 以 5^{μg}/支、20^{μg}/支疫苗各免疫 6 只恒河猴,以 10^{μg}/支疫苗免疫 12 只恒河猴,三角肌肌肉注射。免疫后第 28 天以相同方式和剂量加强 1 针。

4 病毒攻击 HEV XM 株(基因 iv 型)和 HEV Nan 株(基因 Ⅱ型)分别来自新疆和北京的戊肝患者,用以感染恒河猴,收集粪便作为毒种。以 RT-PCR 进行病毒定量,以 1^{μm} 无菌滤膜过滤后,1ml/只静脉注射恒河猴。攻击时间为加强免疫后第 3 周。将 5^{μg} 免疫组 6 只猴随机分为两组,第一组 3 只以 10⁷ PCR 滴度 HEV iv 型病毒(HEV XM 株)感染;第二组 3 只以 10⁴ PCR 滴度 HEV iv 型病毒(HEV XM 株)感染。20^{μg} 免疫组 6 只猴分组及感染方式与 5^{μg} 免疫组相同。10^{μg} 免疫组 12 只猴分为 4 组,每组 3 只。其中 2 组分别以 10⁷ PCR 滴度 HEV iv 型病毒(HEV XM 株)或 HEV Ⅱ型病毒(HEV Nan 株)感染;另 2 组分别以 10⁴ PCR 滴度 HEV iv 型病毒(HEV XM 株)或 HEV Ⅱ型病毒(HEV Nan 株)感染。对照组 12 只猴分组及感染方式与 10^{μg} 免疫组相同。

5 标本采集 每只猴在 0 天、2 周、4 周和 7 周采静脉血 3ml,分离血清,-20℃保存备检。攻毒后每周采血 1 次,至攻毒后 10 周,检测血浆 ALT 水平。同时分离血清贮存于-20℃备检抗 HEV 抗体。从攻毒后第 1 天开始每天采集粪便,2 周后每周收集 2 次,至对照组粪便排毒阴转连续 3 次。粪便采集后贮存于-70℃,2 周内以 RT-PCR 检测 HEV 病毒。

6 抗-HEV 抗体检测 抗-HEV IgM 抗体和 IgG 抗体的检测,使用北京万泰生物药业有限公司提供的以 NE2 重组蛋白为抗原的试剂盒^[15,18]。IgM 抗体检测采用捕获法,IgG 抗体检测采用间接法。IgG 抗体含量以两种方法测量,一种采用倍比稀释法,以超过阴性值 3 倍的最高稀释度作为血清抗体滴度。另一种是,对攻毒前(初次免疫后第 7 周)血清同时以世界卫生组织抗 HEV IgG 抗体参比血清[由英国国立

生物标准品和质控品研究所(NIBSC)惠赠,目录号 95/584]标准曲线法测定血清抗体的国际单位(IU)^[19]。攻毒后实验猴系列血清出现抗体滴度 4 倍以上升高,或血清抗体阳转为抗体应答阳性(+),否则为阴性(-)。

7 粪便 HEV RNA 检测 取 250^{μl}不同稀释度的粪便悬液,用 Trizol 试剂(GIBCO 公司)按其操作说明提取。20^{μl} 体积反转录,基因 iv 型病毒反转录引物为特异性引物 A3(5'-ggctcaccggagtggttttctt-3'), Ⅱ型病毒反转录引物为 EE4(5'-ggttggttggatgaatatag-3'), AMV 反转录酶 42℃ 反转录 40min。基因 iv 型病毒第一轮 PCR 引物为 A5(5'-ctttgatgacacgttctctc-3')和 A3,基因 Ⅱ型病毒第一轮 PCR 引物为 EE1(5'-taacctgattgggatgct-3')和 EE4;反转录模板加 2^{μl},总体积为 20^{μl},条件为:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 40s,68℃ 复性延伸 40s,35 个循环;72℃ 延伸 5min。基因 iv 型病毒第二轮引物为 B5(5'-gccgcagcaaggcatcatg-3')和 B3(5'-gtgtttctccaaaacctge-3');基因 Ⅱ型病毒第二轮引物为 EE2(5'-gggtggaatgaataacatg-3')和 EE3(5'-gtcaccaccagaaccace-3');第一轮模板加 1^{μl},总体积为 20^{μl},条件为:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 40s,56℃ 复性 40s,72℃ 延伸 1min20s,35 个循环;72℃ 延伸 5min。以能检出阳性带的最高稀释度粪便悬液 250^{μl} 所含有的病毒量定义为 1 个 PCR 滴度。

8 血浆 ALT 检测 采用赖氏法^[20]。感染后每周检测 ALT,以感染后 3~7 周内 ALT 峰值高于 2 倍感染前值为阳性(+),否则为阴性(-)。

结 果

1 疫苗的免疫原性

不同剂量疫苗免疫的恒河猴,经过 1 针免疫即可产生抗体(表 1)。24 只猴中,除 5^{μg} 免疫组有 3 只猴在初免后第 4 周阳转外,其余 21 只猴在免后 2 周抗体即已阳转。初免及加强免疫后,10^{μg} 和 20^{μg} 免疫组的抗体几何平均滴度(GMT)均较为接近,而 5^{μg} 免疫组初免后抗体产生相对较差一些,但加强后可达到与 10^{μg} 和 20^{μg} 免疫组相当的水平。疫苗组在攻毒前(7 周)的抗 HEV 抗体量平均为 1 384IU/ml。

表 1 疫苗免疫恒河猴的抗体应答

Table 1 Antibody response of rhesus monkeys immunized with HEV 239 vaccine

Vaccine dosage	Monkey No.	Ant+HEV								IU/ml
		0 d		2 wks		4 wks		7 wks		
		Positive No.	GMT (I)	Positive No.	GMT (I)	Positive No.	GMT (I)	Positive No.	GMT (I)	
2× 5 ^{μg}	6	0	< 10	3	35	6	2,554	6	27,175	1,098
2× 10 ^{μg}	12	0	< 10	12	1,314	12	7,529	12	34,409	1,357
2× 20 ^{μg}	6	0	< 10	6	738	6	5,236	6	41,607	1,724
Mean			< 10		460		5,247		34,014	1,384

The geometry mean titer(GMT)of antibody of vaccinated monkeys on 2wks, 4wks and 7wks were significantly higher than pre-immunization($P < 0.001$). The GMTs among three vaccine groups were similar($P > 0.05$).

2 对基因 iv 型 HEV 的保护性

以不同剂量疫苗按 0、28 天方案肌内注射恒河猴, 49 天时分别以 10^7 和 10^4 PCR 滴度剂量基因 iv 型 HEV 静脉攻击。以高剂量病毒攻击时, 对照组 3 只猴均出现 1 个月以上的粪便排毒, 血清抗体阳转, 2 只出现 ALT 异常。20 μ g 免疫组 3 只猴均未检出粪便排毒, 血清抗体滴度未出现明显升高, ALT 始终正常, 表明该剂量免疫可完全保护恒河猴不被高剂量同基因型 HEV 感染。10 μ g 和 5 μ g 免疫组各有 1 只猴出现粪便排毒及血清抗体明显升高, 提示病毒成功感染了这 2 只猴, 但感染猴的粪便排毒时间

较对照组显著缩短, 且均未出现 ALT 异常, 提示感染的程度较对照组有明显减轻(表 2)。以较低剂量病毒攻击时, 对照组 3 只猴同样均出现 1 个月以上的粪便排毒, 血清抗体阳转, 1 只感染猴出现 ALT 异常。疫苗免疫猴则均未检出病毒感染指标, 也未出现 ALT 异常, 表明疫苗免疫可对该剂量同型 HEV 攻击产生完全的感染及发病保护性(表 2)。可见疫苗免疫可完全保护恒河猴在 HEV 基因 iv 型病毒感染后不出现肝炎症状, 并可降低病毒对恒河猴的感染性(差异均具有显著的统计学意义, $P < 0.05$)。

表 2 HEV 基因 iv 型病毒对恒河猴的感染及致病

Table 2 Infectivity and pathogenicity of HEV genotype iv to rhesus monkeys

Group	Monkey code	Challenging virus dosage 10^7					Challenging virus dosage 10^4					
		Pre challenge anti-HEV		ALT	Virus shedding (w)	Antibody response	Pre challenge anti-HEV		ALT	Virus shedding (w)	Antibody response	
		Titer (I)	IU/ml				Titer (I)	IU/ml				
0 μ g	25	< 10	< 2	+	5	+	28	< 10	< 2	-	5	+
	26	< 10	< 2	-	5	+	29	< 10	< 2	+	6	+
	27	< 10	< 2	+	4	+	30	< 10	< 2	-	4	+
2 \times 5 μ g	1	40, 200	961	-	3	+	4	67, 800	1, 617	-	0	-
	2	47, 800	1, 052	-	0	-	5	71, 800	2, 338	-	0	-
	3	7, 900	435	-	0	-	6	5, 500	186	-	0	-
2 \times 10 μ g	7	8, 700	368	-	1	+	10	51, 600	1, 104	-	0	-
	8	145, 200	2, 504	-	0	-	11	61, 800	1, 949	-	0	-
	9	68, 100	2, 498	-	0	-	12	4, 3200	960	-	0	-
2 \times 20 μ g	19	51, 900	1, 284	-	0	-	22	44, 300	1, 377	-	0	-
	20	9, 200	530	-	0	-	23	61, 400	3, 314	-	0	-
	21	47, 400	1, 339	-	0	-	24	84, 300	2, 498	-	0	-

3 对基因 Ⅴ型 HEV 的保护性

疫苗以 10 μ g/针剂量按 0、28 天方案肌内注射免疫恒河猴, 49 天时分别以 10^7 和 10^4 PCR 滴度剂量基因 Ⅴ型 HEV 静脉注射攻击。以高剂量病毒攻击时, 对照组 3 只猴均出现粪便排毒, 血清抗体阳转, 2 只出现 ALT 异常。免疫组均未出现 ALT 异

常, 2 只未出现感染指标, 另 1 只出现短暂粪便排毒, 以及抗体水平升高。而以较低剂量病毒攻击时, 对照组 3 只均出现病毒感染指标, 而免疫组则均未被感染(表 3)。这些结果表明: 10 μ g 疫苗 2 针免疫可以保护大多数恒河猴不受 Ⅴ型 HEV 的感染, 并完全保护恒河猴感染 Ⅴ型 HEV 后不发病。

表 3 HEV 基因 Ⅴ型病毒对恒河猴的感染及致病

Table 3 Infectivity and pathogenicity of HEV genotype Ⅴ to rhesus monkeys

Group	Monkey code	Challenging virus dosage 10^7					Challenging virus dosage 10^4					
		Pre challenge anti-HEV		ALT	Virus shedding (w)	Antibody response	Pre challenge anti-HEV		ALT	Virus shedding (w)	Antibody response	
		Titer (I)	IU/ml				Titer (I)	IU/ml				
0 μ g	31	< 10	< 2	+	2	+	34	< 10	< 2	-	1	+
	32	< 10	< 2	+	5	+	35	< 10	< 2	-	4	+
	33	< 10	< 2	+	4	+	36	< 10	< 2	-	4	+
2 \times 10 μ g	13	46, 000	1503	-	0	-	16	41, 900	1, 012	-	0	-
	14	5, 200	196	-	1	+	17	59, 700	2, 520	-	0	-
	15	58, 300	1, 351	-	0	-	18	66, 500	316	-	0	-

4 疫苗对恒河猴抗 HEV 感染及抗 HEV 致病的保护率

比较表 2、表 3 可见, 疫苗对 HEV 基因 iv 型和基因 Ⅲ型病毒的保护性是一致的, 因此合并各组数

据如表 4。可见疫苗对 HEV 攻击的发病保护率为 100%, 对 10⁷ 剂量 HEV 攻击的感染保护率为 75%, 而抗 10⁴ 剂量 HEV 攻击的感染保护率为 100%。

表 4 疫苗对恒河猴抗 HEV 感染及致病性的保护率

Table 4 Protective efficacy of vaccine to rhesus monkeys against infectivity and pathogenicity of HEV

Group	Pre-challenge anti-HEV		Infection	Hepatitis	Protection efficacy against infection (%)	Protection efficacy against hepatitis (%)
	Titer	IU/ml				
Challenge virus dosage 10 ⁷						
Vaccine	1: 2, 9371	1, 168	3/12	0/12	75	100
Control	< 1: 10	< 2	6/6	5/6		
Challenge virus dosage 10 ⁴						
Vaccine	1: 39, 393	1, 599	0/12	0/12	100	100
Control	< 1: 10	< 2	6/6	1/6		

讨 论

自戊肝病毒发现伊始国内外学者即已开展了疫苗的研究, 但由于尚未建立起有效的细胞培养模型或简便的病毒繁殖模型, 难以进行传统的灭活疫苗或减毒疫苗的研制, 因此基因工程疫苗的研制成为各国学者研究的焦点, 但迄今仍未有任何一种候选疫苗获批准上市。在过去的研究中, 我们发现大肠杆菌表达的一个 HEV ORF2 重组抗原 NE2 上具有高活性的 2 个戊肝中和表位, 使用弗氏佐剂免疫恒河猴可以产生良好的保护性^[13-16]。但随后的研究发现, 纯化的 NE2 抗原在铝佐剂中的免疫原性难以满足疫苗的要求, 因此进一步研制出了抗原性与 NE2 相似的颗粒性抗原 HEV 239, 使其免疫原性得到了显著的改善^[17]。本研究制备了三种规格的 HEV 239 铝佐剂疫苗, 在恒河猴戊肝感染模型中研究其抗 HEV 感染及抗 HEV 致病性的效果。由于 HEV 对灵长类动物的感染剂量较低, 而致病剂量较高^[15, 20], 因此本研究设计了两个感染剂量组, 一组采用 10⁷PCR 滴度的病毒, 而另一组采用 10⁴PCR 滴度的病毒, 以了解疫苗对 HEV 致病性和感染性的保护效果。另外, 为了解疫苗对不同基因型病毒的保护性, 对其中一个免疫组分别采用基因 iv 型病毒和基因 Ⅲ型病毒攻击。结果表明, 2 × 5μg、2 × 10μg 和 2 × 20μg 3 个剂量组 1 针免疫即可 100% 刺激抗体产生, 加强 1 针后 3 周(感染前)的抗体平均滴度分别达到 1: 27 175, 1: 34 409 和 1: 41 607, 表明疫苗对恒河猴有较好的免疫原性。全部免疫猴在高剂量和低剂量病毒攻击后均未出现急性肝炎, 对发病的

保护率为 100%。全部免疫猴均能完全预防 10⁴PCR 滴度的病毒感染的感染, 2 × 20μg 组对 10⁷PCR 滴度的病毒感染也能完全预防, 而 2 × 10μg 组和 2 × 5μg 组对 10⁷PCR 滴度的病毒感染也有 66.7% 的保护率。与其它多个研究结果一致^[4-8], 本研究所用的疫苗抗原虽源于 HEV 基因 iv 型病毒, 但对基因 iv 型病毒和基因 Ⅲ型病毒的保护效果十分接近, 表明各基因型间的 HEV 存在良好的交叉保护, 均属于同一个血清型, 因此很可能单一基因型别的疫苗即可对各个型别的 HEV 产生良好的保护性。

迄今已报道的保护效果最好的铝佐剂疫苗, 是由昆虫杆状病毒表达系统表达的 HEV ORF2 的 aa112~ aa607 片段(55kD 蛋白)^[4, 8]。以 55kD 疫苗 50μg × 2 免疫恒河猴后, 以 10⁵ 猴半数感染剂量 (MID₅₀, 1 个 MID₅₀ 剂量约相当于 10~ 100 个 PCR 滴度), 8 只免疫猴均不发病, 但有 6 只出现粪便排毒^[8]。最近 Purcell 等^[4]报道, 以 55kD 疫苗 10μg × 2 与 5μg × 2 免疫各 12 只恒河猴, 攻毒前(初疫后 8 周)平均抗体含量分别为 485IU/ml 和 483IU/ml, 而本研究疫苗免疫 7 周后的平均抗体含量达 1 384IU/ml, 约为 55kD 疫苗的 3 倍。提示 HEV 239 疫苗的免疫原性较 55kD 疫苗为高, 这可能也是前者对感染的保护性明显优于后者的原因之一。虽然本研究所采用的毒株、免疫剂量等与 55kD 疫苗不同, 这种比较并不能直接反映这两种疫苗的优劣, 但仍可提供一些有价值的信息。

HEV 239 疫苗与已报道的其它 HEV 候选疫苗相比, 其优点首先在于它较好地模拟出了 HEV 的中和表位; 第二, HEV 239 蛋白以病毒样颗粒形式存在, 免疫原性显著优于单体或寡体蛋白; 第三,

HEV 239 蛋白为大肠杆菌表达, 该表达系统是目前研究得最为透彻的表达体系, 生产成本低廉, 已有大量的大肠杆菌表达蛋白被广泛应用于临床治疗, 因此与昆虫杆状病毒表达系统相比具有更为可靠的安全性。另外, HEV 239 蛋白源于 HEV 基因 iv 型, 是我国主要 HEV 基因型之一, 并且与其它各基因型病毒有明确的交叉保护作用, 因此 HEV 239 作为戊肝疫苗具有良好的应用前景。

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 (suppl 3): 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, Vol12. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001, 3051-3061.
- [3] Wang Y C, Zhang H Y, Xia N S, et al. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China[J]. *J Med Virol*, 2002, 67: 516-521.
- [4] Purcell R H, Nguyen H, Shapiro M, et al. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine[J]. *Vaccine*, 2003, 21: 2607-2615.
- [5] Arankalle V A, Chadha M S, Chobe L P. Long-term serological follow up and cross-challenge studies in rhesus monkeys experimentally infected with hepatitis E virus[J]. *J Hepatol*, 1999, 30: 199-204.
- [6] Meng J, Pillot J, Dai X, et al. Neutralization of different geographic strains of the hepatitis E virus with anti-hepatitis E virus-positive serum samples obtained from different sources[J]. *Virology*, 1998, 249: 316-324.
- [7] Pillot J, Turkoglu S, Dubreuil P, et al. Cross-reactive immunity against different strains of the hepatitis E virus transferable by simian and human sera[J]. *C R Acad Sci* [M] 1995, 318: 1059-1064.
- [8] Tsarev S A, Tsareva T S, Emerson S U, et al. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge[J]. *Vaccine*, 1997, 15: 1834-1838.
- [9] Meng X J, Wseman B, Elvinger F, et al. Prevalence of Antibodies to Hepatitis E Virus in Veterinarians Working with Swine and in Normal Blood Donors in the United States and Other Countries[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 117-122.
- [10] Purdy M A, McCaustland K A, Krawczynski K, et al. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus(HEV) [J]. *J Med Virol*, 1993, 41: 90-94.
- [11] Tsarev S A, Tsareva T S, Emerson S U, et al. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 10198-10202.
- [12] Zhang M, Emerson S U, Nguyen H, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53 kDa truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells[J]. *Vaccine*, 2001, 20: 853-857.
- [13] 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.
- [14] 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作用[J]. *微生物学报*, 2003, 43(1): 35-42.
- [15] Zhang J, Ge S X, Huang G Y, et al. Evaluation of antibody based and nucleic acid based assays for diagnosis of Hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model[J]. *J Med Virol*, 2003, 71(4): 518-526.
- [16] 顾颖, 葛胜祥, 黄果勇, 等. 戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体的鉴定[J]. *病毒学报*, 2003, 19: 217-223.
- [17] 何志强, 张军, 李少伟, 等. 大肠杆菌中戊型肝炎病毒衣壳蛋白颗粒的表达及其抗原性与免疫原性[J]. *生物工程学报*, 2004(2), (已接受).
- [18] 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.
- [19] Ferguson M, Walker D, Mast E, et al. Report of a collaborative study to assess the suitability of a reference reagent for antibodies to hepatitis E virus[J]. *Biologicals*, 2002, 30: 43-48.
- [20] 冯仁伟. 血清谷丙转氨酶测定[A]. 上海市医学化验所主编. 临床生化检验(上册) [M]. 上海: 上海科技出版社, 1979. 333-335.

Protective Efficacy of a Particulate Recombinant(*E. coli*) Hepatitis E Vaccine on Rhesus Monkey

ZHANG Jun¹, LI Yi-ming², LI Shao-wei¹, OU Shan-hai¹, HUANG Guo-yong³, HE Zhi-qiang¹,
GE Sheng-xiang¹, XIAN Yang-lin², PANG Su-qiang², XIA Ning-shao^{1*}

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

2. Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Beijing 102200, China;

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

Abstract: An *E. coli* expressed recombinant protein HEV 239, which was derived from capsid protein ORF2 of hepatitis E virus(HEV) and aggregated into virus-like particle, was adsorbed with alum adjuvant, then immunized rhesus monkeys with 5 μ g, 10 μ g, or 20 μ g dosages. Three weeks after the animals were boosted on day 28, different virus dosages of a HEV genotype iv strain and a HEV genotype ⑤ strain were used to challenge the monkeys as well as the control monkeys intravenously. The results showed that the geometry mean titer of anti-HEV of three vaccine dosage groups were 1: 27 175, 1: 34 409 and 1: 41 607 respectively. The anti-HEV quantity calculated by ELISA using a WHO reference serum were 1 098 IU/ml, 1 357 IU/ml and 1 724 IU/ml respectively. Three monkeys of each vaccinated groups and control group were challenged with 10⁷ virus titer of HEV genotype iv strain. While all three monkeys of control group were infected by the virus and two suffered from hepatitis, all three monkeys of 20 μ g vaccinated group, two of 10 μ g vaccinated group and two of 5 μ g vaccinated group were protected from infection, and moreover all vaccinated monkeys were protected against hepatitis. Another three monkeys of each vaccinated group and control group were challenged with 10⁴ virus titer of HEV genotype iv strain. While all three monkeys of the control group were infected and one suffered from hepatitis, all the vaccinated monkeys were protected from infection as well as hepatitis. Three monkeys vaccinated with 10 μ g vaccine and three control monkeys when challenged with 10⁷ virus titer of HEV genotype ⑤ strain, all three monkeys of the control group were infected and suffered from hepatitis, and the vaccinated monkeys all were protected from hepatitis and two were protected from virus infection. Three monkeys of 10 μ g vaccinated group and control group when challenged with 10⁴ virus titer of HEV genotype ⑤ strain, the monkeys of the control group were all infected, the vaccinated monkeys were protected from infection. These results indicated that the HEV 239 vaccine could protect rhesus monkey completely against hepatitis E, and partially protect against HEV infectivity. Besides, the protective efficacy of this vaccine against heterologous HEV challenge was similar as against homologous challenge.

Key words: hepatitis virus E; vaccine; prokaryote expression; rhesus monkey; protective efficacy

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