

戊型肝炎病毒感染动物模型应用于抗-HEV 试剂评价的初步研究

周诚 黄维金 吴星 蓝海云 辜文洁 黄果勇 张华远 祁自柏 李河民

【摘要】 目的 应用实验室戊型肝炎病毒(HEV)感染恒河猴动物模型对抗-HEV 诊断试剂进行初步的评价。方法 用 1 和 4 基因型的 HEV 静脉注射分别感染 4 只恒河猴,检测实验猴的丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测粪便标本中 HEV RNA,抗-HEV IgG 试剂(GL-IgG, WT-IgG)分别检测实验猴系列血清抗体水平。结果 HEV 感染的 8 只实验猴均出现粪便排毒,1 和 4 基因型 HEV 感染的实验猴分别有 1 只和 2 只出现 ALT 升高,GL-IgG 试剂检测 1 型 HEV 实验感染猴有 2 只抗体阳转,4 型 HEV 实验感染猴有 1 只抗体阳转;而 WT-IgG 试剂检测 1、4 型 HEV 实验感染猴的抗体均阳转。两种试剂检测感染猴窗口期抗体阳转时间相近,GL-IgG 试剂抗体阳性持续到 12 周,WT-IgG 试剂在 16 周观察期内均阳性。结论 两种试剂均可检测出感染实验猴的抗体,但 WT-IgG 试剂具有检测灵敏度较高的特点。

【关键词】 戊型肝炎病毒; 动物模型; 酶联免疫吸附试验

Primary evaluation of anti-HEV diagnostic reagent by experimental infection animal model with hepatitis E virus ZHOU Cheng^{*}, HUANG Wei-jin, WU Xing, LAN Hai-yun, GU Wen-jie, HUANG Guo-yong, ZHANG Hua-yuan, QI Zi-bai, LI He-min. ^{*}National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Product, Beijing 100050, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate anti-HEV diagnostic kits by experimental infecting rhesus monkeys with HEV. **Methods** Eight rhesus monkeys were infected with genotype 1 and 4 HEV separately. The alanine aminotransferase(ALT) level of all monkeys were detected before and after the process of infection. HEV RNA in stool specimens was tested by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Anti-HEV IgG in serum was detected by GL-IgG and WT-IgG. **Results** HEV RNA presented in the stool of all the 8 monkeys after infection. The ALT level of 1 monkey infected with genotype 1 HEV and 2 monkeys infected with genotype 4 HEV appeared abnormally after infection. Tested by GL-IgG, 2 of the 4 monkeys infected with genotype 1 HEV and 1 of 4 monkeys infected with genotype 4 HEV seroconverted to anti-HEV IgG. However, when tested by WT-IgG, all the infected monkeys seroconverted to anti-HEV IgG. The anti-HEV IgG tested by WT-IgG was positive during the whole observation period, and the anti-HEV IgG measured by GL-IgG only remained 12 weeks after infection. Detected by GL-IgG and WT-IgG, seropositive conversion of the anti-HEV IgG happened almost at the same time. **Conclusion** Both GL-IgG and WT-IgG could detect the anti-HEV IgG of experimentally infected rhesus monkeys but the WT-IgG had a higher sensitivity for detection of anti-HEV IgG than GL-IgG.

【Key words】 Hepatitis E virus; Animal model; Enzyme linked immunosorbent assay

戊型肝炎(戊肝)是由戊肝病毒(HEV)引起的主要经肠道传播的急性传染性肝炎^[1,2]。我国是戊肝的高流行区,约占临床散发性急性肝炎病例的 10%~20%^[2]。近年来,有报告多种与人类密切接触的动物检查结果,猪也可感染 HEV-3 或 HEV-4 病毒,并且研究发现动物中分离的 HEV 与人体

内分离的 HEV 的基因序列高度一致,人们逐渐将戊肝视为一种人兽共患病^[3,4]。在美国、日本及欧洲等传统的非戊肝流行区普通人群中发现了较高的戊肝感染率^{3,6}。目前戊肝尚无特效的治疗方法,疫苗的研制是控制其流行的有效途径,目前戊肝疫苗尚处于研制和临床实验阶段。正确选择能够客观评价戊肝疫苗诱导产生的抗-HEV 抗体的诊断试剂是疫苗进行临床实验的关键,本研究应用 1 和 4 型 HEV 感染恒河猴,建立戊肝动物模型,用两种

作者单位:100050 北京,中国药品生物制品检定所(周诚、黄维金、吴星、蓝海云、辜文洁、张华远、祁自柏、李河民);广西壮族自治区疾病预防控制中心(黄果勇)

抗-HEV 诊断试剂检测系列血清标本,对该试剂进行了初步的比较分析。

材料与与方法

1. 试剂盒: GL-IgG 和 GL-IgM 试剂均为新加坡 Genelabs 公司生产的抗-HEV IgG 抗体、抗-HEV IgM 抗体检测试剂盒,为商业化试剂。WT-IgG 试剂为北京万泰生物药业有限公司生产的抗-HEV IgG 抗体检测试剂盒,拟用于戊肝疫苗抗体效价检测。

2. 实验动物: 恒河猴共 8 只,由广西壮族自治区疾病预防控制中心提供,猴龄为 1.5~3.5 周岁,体重 1.2~3.5 kg,单笼饲养,试验前 2 周连续采血检测,丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 正常, GL-IgG、WT-IgG 两种抗-HEV IgG 试剂检测均为阴性。

3. HEV 感染实验猴: 从戊肝患者粪便分离的病毒,经逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增 HEV RNA,测序鉴定基因型。将含戊肝 1 及 4 型病毒的粪便用生理盐水制备成 1% 悬液,离心,取上清液,先后用 0.45 μm 和 0.22 μm 的滤器过滤,每个基因型分别以 1×10^5 和 1×10^4 PCR 滴度/只剂量静脉注射 2 只实验猴,注射后连续观察记录猴子异常反应,每天收集粪便, -70℃ 保存,用于 HEV 核酸检测,每周采血一次,检测 ALT,分离血清, -20℃ 以下保存,用于抗-HEV IgG 抗体检测。

4. 抗-HEV IgG 检测: 用 GL-IgG 和 WT-IgG 试剂盒对收集恒河猴系列血清检测,严格按说明书操作。试剂盒均采用间接 ELISA 方法检测戊肝 IgG 抗体,样品与预包被在微孔条上 HEV 抗原温育后加入酶标记的抗人 IgG 抗体,经底物作用显色。通过吸光度值 (A) 判断样品中 HEV-IgG 抗体水平。

5. HEV RNA 检测: 设计兼并引物,应用 PCR 方法分别扩增 HEV ORF1 和 ORF2, ORF1 外引物: E1B0: 5'-CTG GCA TYA CTA CTG CYA TTG AGC-3'; IEO: 5'-CCA TCR ARR CAG TAA GTG VGG TC-3', ORF1 内引物: E1B1: 5'-CTG CCY TKG CGA ATG CTG TGG-3'; E1E1: 5'-GGC AGW RTA CCA RCG CTG AAC ATC-3' (位于 102~387 bp)。ORF2 外引物: SEB01: 5'-AAV TAT GCW CAG TAC CGG GTT G-3'; SEE01: 5'-CCC TTA TCC TGC TGA GCA TTC TC-3'。ORF2 内引物: SEB11: 5'-GTY ATG YTY TGC ATA CAT GGC T-3'; SEE11: 5'-AGC CGA CGA AAT YAA TTC TGT C-3' (位于 6007~6354 bp)。其中 Y 代表

C 或 T; R 代表 A 或 G; K 代表 G 或 T; W 代表 A 或 C。用上海华舜生物工程有限公司生产的小量柱离心式病毒 RNA/DNA 抽提试剂盒提取 HEV RNA,反转录和第一轮 PCR 在同一反应体系中进行,抽提 RNA 10 μl,上下游引物各 0.5 μl (50 pmol/μl), 10×PCR 缓冲液 5 μl, 0.5 μl DTT (0.1 mol/μl), 反转录 AMV 1 μl (10 U/μl), Taq DNA 聚合酶 0.5 μl (5 U/μl), dNTP (10 mmol/L) 1 μl。42℃ 孵育 45 min 进行反转录,第一轮 PCR: 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 扩增 30 个循环。第二轮 PCR: 第一轮 PCR 扩增产物 3 μl, 10×PCR 缓冲液 5 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μl, dNTP (10 mmol/L) 1 μl, 上下游引物各 0.5 μl (50 pmol/μl), Taq DNA 聚合酶 0.5 μl (5 U/μl), 反应程序为: 94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 45 s, 扩增 30 个循环。扩增产物琼脂糖电泳分析。

结果

1. HEV 实验感染恒河猴血清 ALT 及粪便排毒检测: 8 只年龄在 1.5~3.5 周岁、体重 1.2~3.5 kg 的恒河猴随机分为 2 个试验组,分别用 1 和 4 型 HEV 粪便悬液静脉注射实验感染。观察期内有 3 只实验猴在感染后第 4 周 ALT 升高,第 5 周达高峰,第 6~7 周恢复正常,未观察到其他异常反应。全部 8 只实验猴粪便检测 HEV RNA 均为阳性,粪便排毒时间出现在感染后第 5 天至第 2 周,持续时间 4~5 周。IgM 为急性感染的指标,用 GL-IgM 试剂检测,有 5 只实验猴 IgM 抗体阳转 (表 1)。实验表明,实验猴全部发生感染,但是只有 3 只出现 ALT 升高。

表 1 Genelabs HEV IgM, GL-IgG 及 WT-IgG 试剂检测实验恒河猴系列血清结果

恒河猴 基因 编号	HEV 基因 型	注射 剂量 (PCR 滴度)	血清学检测和时间(周)				
			HEV RNA 阳性	ALT 升高	GL-IgM 阳性	GL-IgG 阳性	WT-IgG 阳性
JE1	4	1×10^5	1-6	4-5	4-5	-	5-16
JE2	4	1×10^5	1-6	4-6	3-10	4-12	5-16
JE3	4	1×10^4	1-5	-	-	-	4-16
JE4	4	1×10^4	2-6	-	-	-	6-16
JE5	1	1×10^5	1-5	-	5-6	-	6-16
JE6	1	1×10^5	1-6	-	4-10	5-14	4-16
JE7	1	1×10^4	2-6	-	-	-	6-16
JE8	1	1×10^4	1-5	4-6	3-10	4-12	4-16

注:“-”抗体阴性或 ALT 正常

2. HEV 实验感染恒河猴的系列血清抗体检测:

GL-IgG 试剂检测感染猴系列血清,有 JE2、JE6、JE8 共 3 只实验猴的系列血清检测有阳转,其中 JE2 为 1 型病毒感染猴,JE6、JE8 为 4 型病毒感染猴。GL-IgG 试剂检测 IgG 抗体在第 4-5 周阳转,阳转后 1-2 周达高峰,至第 8 周开始下降,第 12-14 周检测逐渐转为阴性。WT-IgG 试剂检测感染猴系列血清,全部 8 只实验猴试验感染 HEV 后 IgG 检测均阳转,IgG 抗体阳转出现在感染后第 4-6 周,同样在阳转后 1-2 周达到高峰,与 GL-IgG 检测结果不同的是在 16 周的观察期内一直保持为阳性(表 1)。

3. 实验动物抗-HEV 动态变化:不同感染剂量攻击的实验动物抗体进行分析,高剂量感染恒河猴多出现 ALT 升高,粪便排毒时间早于低感染剂量实

验动物,JE8 实验猴因猴龄较小、体重较轻,在低剂量病毒攻击出现 ALT 升高,粪便排毒时间较早。GL-IgG 试剂检测高剂量实验猴阳性率明显高于低剂量实验动物。高剂量攻击猴龄较大、体重较重的实验猴 IgG 抗体检测也为阴性,而 WT-IgG 试剂检测无差别。2 种试剂检测高剂量病毒攻击实验猴 IgG 阳性出现时间均早于低剂量实验动物。另外,应用 GL-IgM 试剂盒检测感染猴系列血清,1 型 HEV 感染的 4 只恒河猴中有 3 只 GL-IgM 试剂盒检测 IgM 抗体阳性,4 型病毒感染的 4 只恒河猴有 2 只 IgM 抗体阳性,IgM 抗体在第 3-5 周出现,时间滞后,第 5 周前后达到高峰,有 3 只 IgM 抗体持续至第 10 周(图 1)。

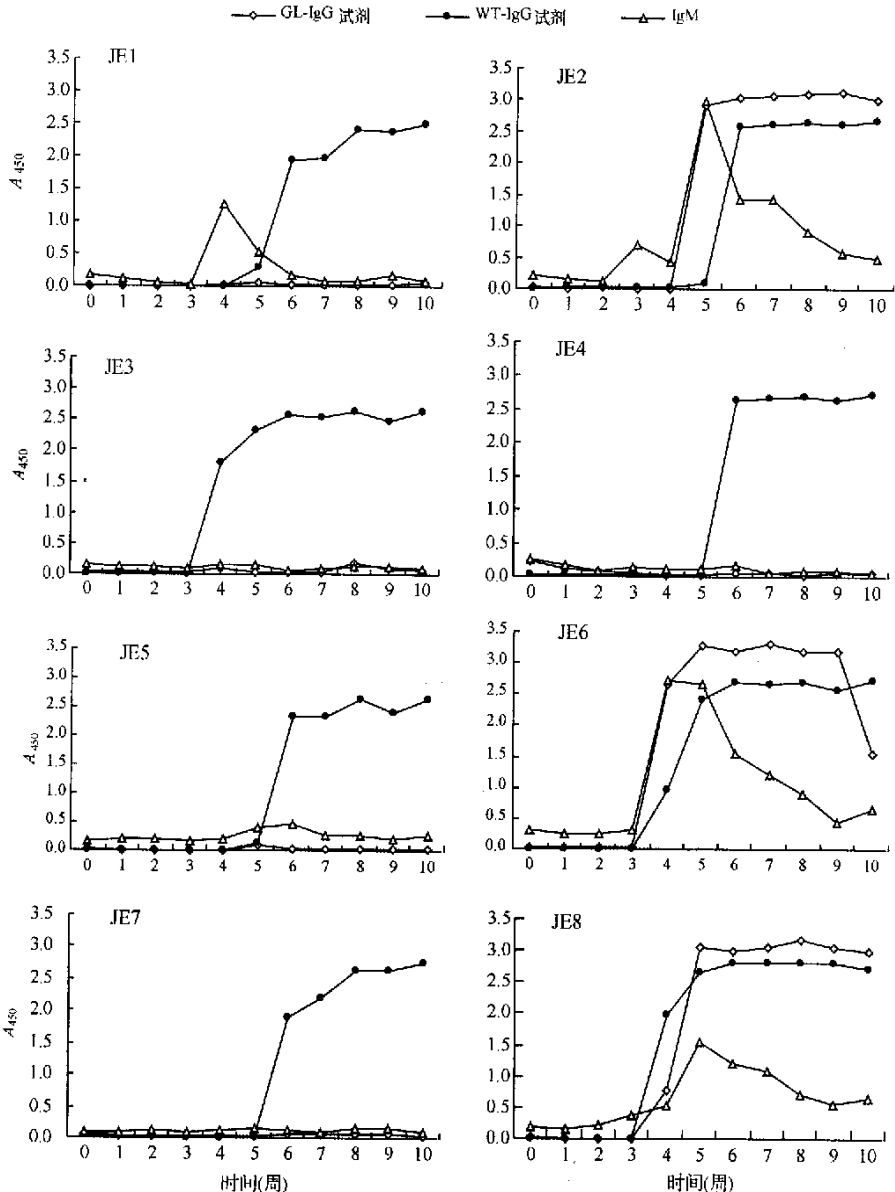


图1 HEV 攻击恒河猴 IgG 抗体持续时间动态反应图

讨 论

目前因国内外的抗-HEV检测试剂均采用间接法,所用抗原主要采用 ORF2 区域的某些片段,但抗原的基因型及表达片段不完全一致,国外试剂采用来源于 HEV 1 和 2 型基因片段抗原。据报道,目前 HEV 有 4 个基因型,基因 4 型主要分布在中国大陆和台湾地区^[2],王佑春等^[7]首先对 4 型 HEV 抗原性进行研究,1 型 HEV 抗原不能完全覆盖 4 型抗原,抗-HEV检测试剂有待进一步完善。对 2 种试剂检测实验感染 HEV 恒河猴系列血清结果分析,2 种试剂均可检测 1 型 HEV 和 4 型病毒攻击后产生的抗体,WT-IgG 试剂检测与 GL-IgG 试剂检测结果相比抗-HEV 阳转实验猴数量多,前者 8 只全部阳转,后者仅 3 只;且 WT-IgG 试剂检测抗-HEV 阳性持续时间更长。但检测抗体阳转时间接近,均在 4-6 周内阳转,1-2 周后达到高峰。GL-IgG 试剂检测抗-HEV 水平下降迅速。分析可能原因:Genelabs 试剂包被抗原与万泰公司的抗原不同,GL-IgG 为 ORF3(91-123AA)、ORF2(612-653)合成肽与 ORF2(328-654AA)重组蛋白为抗原包被,为线性表位;而万泰公司试剂为 ORF2(394-606AA),为构相型抗原表位^[8-10],选择抗原的不同,导致在检测的过程中因为抗体谱的不同而出现差异。

戊肝疫苗尚在进行临床研究期,Glaxo SmithKline 公司率先将重组戊肝疫苗进入临床研究^[11],我国厦门大学联合北京万泰生物药业有限公司研制的重组戊肝疫苗已获得国家食品药品监督管理局批准进行 I、II 期临床研究,抗体效价是疫苗评价重要指标,目前尚无标准检测试剂;Glaxo SmithKline 公司在戊肝疫苗临床研究未采用商业化抗体检测试剂,而是采用自行表达的重组抗原制备的试剂,除所用抗原不同外,其原理与 GL-IgG、WT-IgG 试剂一致。由于疫苗抗原表位和构相不同,各试剂在检测免疫后抗体存在较大差别,研究人员多采用与本疫苗相关抗原制备检测试剂。应用实

验感染 HEV 动物模型对检测试剂进行评价是一种探索,本研究的结果显示不同的试剂对 2 种基因型 HEV 实验感染后的系列血清的检测结果不同,WT-IgG 试剂表现出了更高的灵敏度,且抗体水平持续时间更长。但目前尚未确定检测的抗体是否具有中和性能,不同基因型之间抗原性有无差别有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Zhuang H, Cao XY, Liu CB, et al. Hepatitis E in China. *Gastroenterologia Japonica*, 1999, 36: 135-138.
- [2] Reyes GR. Overview of the epidemiology and biology of the hepatitis/Willson RA. *Viral Hepatitis*. NY: Marcel Dekker, Inc, 1997: 239-258.
- [3] Kabrane-Lazizi Y, Fine JB, Elm J, et al. Evidence for wide-spread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61: 331-335.
- [4] Meng XJ. Zoonotic and xenozoonotic risks of the hepatitis E virus. *Infect Dis Rev*, 2000, 2(1): 35-41.
- [5] Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, et al. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol*, 2004, 74 (3): 419-424.
- [6] Hitoshi M, Kazuyuki S, Yasuhiro T, et al. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(9): 3209-3218.
- [7] 王佑春, 张华远, 辜文洁, 等. 戊型肝炎病毒 IV 型的 ORF3 及 ORF2 蛋白的片段表达、纯化及抗原性分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, 22(3): 257-261.
- [8] Patrice OY, Albert WT, Katharine G, et al. Assay development of diagnostic tests for hepatitis E. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, 1994: 367-370.
- [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. *病毒学报*, 2003, 19(1): 79-81.
- [10] 李少伟, 何志强, 王颖彬, 等. 戊型肝炎病毒衣壳蛋白同源二聚体的相互作用结构域. *生物工程学报*, 2004, 20(1): 90-98.
- [11] Assad S. Perspectives of vaccination against hepatitis E. *Intervirology*, 2001, 44: 162-166.

(收稿日期: 2007-05-17)

(本文编辑: 尹廉)