

## 戊型肝炎疫苗研究进展

肖楠 石爽 庄辉

【关键词】 戊型肝炎疫苗; 戊型肝炎病毒

Progress on hepatitis E vaccine XIAO Nan, SHI Shuang, ZHUANG Hui. Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Corresponding author: ZHUANG Hui, Email: zhuangbmu@126.com

【Key words】 Hepatitis E vaccine; Hepatitis E virus

戊型肝炎(戊肝)病毒(HEV)经粪-口途径传播,有嗜肝性,发病时表现为急性肝炎。在亚洲及非洲发展中国家均有传播,中国亦有分布。在发达国家,HEV主要影响猪和禽的养殖,密切接触生猪及鲜猪肉的人群中,抗-HEV抗体阳性率较高。虽然在发达国家仅有零星病例,但是普通人群中抗体阳性率比预期要高<sup>[1]</sup>。在中亚和东南亚,HEV是急性临床型肝炎病例最主要的病原体,而在中非、东非和北非,HEV是造成肝病的第二位原因(仅次于HBV)<sup>[1]</sup>。HEV感染的病死率为1%~4%<sup>[1]</sup>,孕妇感染后病死率可高达20%<sup>[1,2]</sup>。HEV分5个基因型,其中1、2型感染人类,3、4型可感染人和猪,5型感染鸟类<sup>[1]</sup>。在亚洲发展中国家,主要流行1型和2型,此两型HEV的毒力较强,多为水源性传播,发病者主要为青少年。在发达国家,主要为3型和4型,毒力相对较弱,主要是由于食用未经充分加热的猪肉和鹿肉而感染,发病主要为老年人及免疫力低下的人群。现已发现的所有可感染人类的HEV基因型(1~4型)只有一个血清型,这为疫苗的研制提供了基础<sup>[1,2]</sup>。自1991年Tam等对第1株HEV测序后,戊肝研究取得很大进展,包括HEV疫苗研究。鉴于对2004年之前的HEV疫苗研究进展已有详细综述<sup>[3]</sup>,本文仅就2005年以后HEV疫苗研究进展做简要综述。

1. 重组蛋白疫苗:由于HEV的细胞培养尚未成功,因此,至今仍无HEV灭活疫苗或减毒活疫苗。目前研究的HEV疫苗主要基于重组病毒蛋白疫苗、DNA疫苗或采用二者结合的方案<sup>[4]</sup>。

HEV基因组有3个开放阅读框(ORF),ORF2表达衣壳蛋白,是主要的免疫原性和抗原性来源。目前惟一确定的中和抗原表位位于ORF2第578~607位氨基酸残基之间<sup>[5]</sup>,因此,蛋白疫苗主要是采用各种体外表达的重组HEV ORF2蛋白。

其中一种HEV重组蛋白疫苗已经进入Ⅱ期临床试验,并取得令人满意的效果。该重组蛋白疫苗是进入Ⅱ期临床试验的HEV疫苗。研究对象是尼泊尔军人,几乎全部是男性青

年,采用随机、双盲和安慰剂对照试验,应用重组杆状病毒在Sf细胞中表达的相对分子质量( $M_r$ ) $56 \times 10^3$  HEV截断的衣壳蛋白作为HEV疫苗,此蛋白的序列设计是基于1型巴基斯坦株<sup>[6,7]</sup>。共肌肉注射3次,每次20 g重组蛋白,0.5 mg氧化铝佐剂,注射时间为第0个月第1针,第1个月第2针,第6个月第3针<sup>[6]</sup>。该疫苗控制戊肝发病的有效率为95.5%。除注射部位疼痛外,无任何主诉不适。在注射3针疫苗后1个月,实验组由疫苗引发的抗体应答率为100%。但在注射第一剂疫苗后平均809 d抗体应答率降至56.3%。表明该疫苗引发的抗体并不持久;注射1针该疫苗并不提供保护,注射2针的保护作用有待证明,因此推荐注射3针疫苗<sup>[6]</sup>。

该项研究存在如下问题:①该疫苗对HEV感染后预防发病有保护作用,但对保护作用的机制未进行论证;动物实验表明,重组蛋白疫苗对于HEV感染仅有部分保护作用<sup>[8]</sup>。②研制HEV疫苗首先应检验其对感染HEV后病死率高的孕妇的保护作用,而该研究的对象几乎全部是男性。③由于HEV流行的国家多是卫生条件差的发展中国家,疫苗的价格也很重要,而该项研究并未对该疫苗的推广应用作出预测。④有人质疑该实验存在伦理问题,即作为受试者的尼泊尔青年军人是否有被上级强迫参与实验的可能<sup>[9]</sup>。

另一组研究者使用大肠埃希菌表达的重组蛋白疫苗。我国厦门大学的研究组研制的大肠埃希菌重组蛋白疫苗已进入Ⅱ期临床试验,但尚未见公开发表的资料。该研究组还对两种不同长度的HEV衣壳蛋白的抗原性和免疫原性进行了系统研究<sup>[10,11]</sup>,发现重组蛋白HEV239和E2虽然结构(HEV 239包括衣壳蛋白的第368~606位的氨基酸残基,E2则比HEV 239少了N端26个氨基酸残基,包括第394~606位的残基)和抗原性相似,但HEV 239的免疫原性较E2高200倍<sup>[10,11]</sup>。E2免疫原性差的原因是:①虽然两者有相同的辅助T细胞和杀伤性T细胞表位,但E2无法有效激活T细胞,而HEV 239可激活特异性细胞免疫;②E2激活体液免疫系统的能力几乎为零,而HEV 239诱导抗体的能力很强(0.2 g即可使无胸腺的小鼠产生抗体)。这是由于E2为可溶性抗原,与HEV 239相比,其被抗原递呈细胞捕获的能力弱。提示HEV重组蛋白疫苗必须同时拥有抗原表位和适当的空间构象,才能有效激活机体免疫系统<sup>[10]</sup>。

由于蛋白构象对于免疫原性极为重要,日本研究者通过动物实验证明,昆虫细胞表达的重组蛋白的病毒样颗粒包含病毒外壳的突触部分,免疫原性很强,甚至可在口服的情况下引起免疫应答<sup>[12]</sup>。该研究组还对常用于表达重组蛋白的昆虫细胞系Tn5和Sf9产生的HEV衣壳蛋白颗粒进行了研究,发现同一细胞系表达的N端缺失111个肽段的衣壳蛋白

时,可产生大小不同的产物;而同一载体在不同细胞系中表达的产物,其大小和状态也不尽相同。从而认为是由于不同细胞系在蛋白的翻译后处理过程中有差异。利用含不同长度的衣壳蛋白序列的重组病毒载体,发现第 126~601 位的氨基酸残基对颗粒抗原的形成有重要作用。这段肽链形成衣壳蛋白的核心区,在 2 个不同的昆虫细胞系中均可形成颗粒。C 端的 52 个氨基酸与肽链在细胞内的定位和释放有关,而 N 端 111 个氨基酸残基则可使表达的蛋白与质膜结合,影响其释放;因此,在表达重组衣壳蛋白时,最好去除 N 端 111 个氨基酸残基。此外,第 601 位的亮氨酸对病毒样颗粒的形成很重要。在 Tn5 细胞系中,不但重组蛋白表达量多,而且翻译后修饰更准确<sup>[13]</sup>。

除用昆虫细胞和大肠埃希菌表达目的蛋白的方法外,利用植物为反应器,大量生产价廉的蛋白疫苗,也引起极大的关注<sup>[14]</sup>。香港大学的研究组用烟草叶子的质体表达重组蛋白 E2(衣壳蛋白第 394~607 位氨基酸残基),每克新鲜叶片组织中含 13.27 μg 重组蛋白。动物实验证明,用该 E2 蛋白免疫小鼠可产生应答。但 E2 蛋白的免疫原性相对较差,作为疫苗的潜在价值有待进一步验证,且烟草不能食用。如在可生食的蔬菜中能大量表达诱发黏膜免疫的衣壳蛋白,不失为有前景的廉价疫苗。厦门大学的研究组在番茄中表达 E2,并获得有免疫原性的产物,但表达的量很低,每克番茄中仅含 61.22 ng<sup>[15]</sup>。美国和日本的研究者用马铃薯表达无 N 端的 111 个氨基酸残基的衣壳蛋白,虽然在马铃薯球茎中表达量较高,但无法形成颗粒,动物实验结果表明,该转基因马铃薯的口服免疫原性很差<sup>[16]</sup>。

2. DNA 疫苗:DNA 疫苗是一种较新的技术,通过将 DNA 导入宿主细胞内,使其在宿主细胞中表达,从而有效诱导细胞免疫和体液免疫。其优势是:①无感染性;②价格低;③不含异源蛋白;④模拟实际感染情况,可更有效诱导体液免疫和细胞免疫<sup>[17]</sup>。

有学者利用大约长 0.8 kb 的部分 ORF2 基因和全长 ORF3 基因构建嵌合体 DNA 疫苗,给小鼠肌肉注射后,出现抗-HEV IgG 和 HEV 特异性 T 细胞增殖<sup>[17]</sup>。但未提及所用的是 ORF2 的哪一段基因序列。

印度学者比较了全长 ORF2 基因和包含第 458~607 位氨基酸的中和抗原表位 NE 基因 DNA 疫苗的效果,还对 DNA 疫苗导入宿主细胞的方式及免疫方案进行了比较;结果基因枪较肌肉注射效果更好,单独使用蛋白疫苗和单独使用 DNA 时,NE 的免疫效果均低于 ORF2,但使用 DNA-蛋白疫苗免疫时,NE 的免疫效果大幅上升,而 ORF2 的效果基本不变。GM-CSF 作为佐剂的效果不明确<sup>[18]</sup>。因此,该研究组建议应用 DNA 和蛋白疫苗联合免疫,并指出,NE 作为疫苗是有研究价值的。由于 NE 蛋白可在细菌中表达,生产价格低,更适用于发展中国家。

通过改变抗原的序列和结构,可使抗原选择性地被 MHC I 或者 MHC II 途径处理,从而选择性地被递呈给 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 或 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 淋巴细胞,激活体液免疫或细胞免疫。根据这一理论,澳大利亚学者将蛋白 ORF2.1(ORF2 的 C 端第 394~660

位氨基酸残基组成的肽链)的 N 端融合不同信号肽(Sig1 和 Sig3),观察融合蛋白在体内外的处理过程和抗原性的变化,此 2 个信号肽分别为 ORF2 序列的 N 端前 22 个和前 50 个氨基酸残基组成的肽段。结果显示,在体外条件下,Sig1 使融合蛋白与质膜结合,而 Sig3 融合蛋白则呈现与衣壳蛋白全长相似的性质。Sig1 可提高小鼠对 ORF2.1 的免疫应答,对绵羊则无此作用,而 Sig3 作用正与此相反<sup>[19]</sup>。

### 3. 其他 HEV 疫苗研究:

(1) 禽类 HEV 研究:禽类 HEV 被认为是哺乳动物 HEV 的一个分支,被列入第 5 型 HEV。禽类 HEV 在 ORF1 高变区比人类 HEV 短 600 bp<sup>[11,20]</sup>。由于至今尚无 HEV 细胞培养模型,禽类 HEV 提供了一种替代的小动物模型<sup>[20]</sup>。美国学者发现,在禽类 HEV 第 389~410 位氨基酸残基的片段上,有一个人型、猪型和禽型 HEV 共有的 B 细胞抗原表位,在第 583~600 位氨基酸也有一个人型与禽型 HEV 共有的表位<sup>[21]</sup>,并证明重组 ORF2 蛋白免疫小鸡可产生应答<sup>[20]</sup>。这些针对禽类 HEV 的研究结果,可能对于人类 HEV 疫苗的研制有参考价值。

(2) HEV 与 HAV 混合疫苗研制: Dong 等<sup>[22]</sup>应用商品化 HAV 灭活疫苗与 HEV 重组 ORF2 蛋白片段制成混合疫苗,小鼠实验证明,HAV 灭活疫苗对 HEV 重组蛋白的免疫原性有促进作用,而 HEV 蛋白的存在并不影响 HAV 疫苗的免疫效果。

4. HEV 疫苗研究的困难和方向:目前最有希望的 HEV 候选疫苗是 2007 年在尼泊尔进行 II 期临床试验的重组蛋白疫苗。HEV 蛋白疫苗是目前主流研究方向。但 HEV 蛋白疫苗也有不足,如不能引发有效的细胞免疫,蛋白质构象对免疫原性的影响较大,成本相对较高等。

近年来,对 HEV ORF2 中和表位的研究有较大进展,已确定中和表位的位置<sup>[9]</sup>。此外,抗原构象对免疫原性也十分重要<sup>[10,11]</sup>。上述研究结果,对 HEV 重组蛋白疫苗研究有指导意义。

为降低 HEV 疫苗的成本,有人探索 HEV 短肽疫苗和口服疫苗。有研究表明,重组 ORF2 肽段形成的病毒样颗粒经口免疫小鼠,可引发体液免疫和肠道免疫应答<sup>[14]</sup>。

HEV DNA 疫苗是另一个有前景的研究方向,其优势是成本较低,储存条件简单,易于在发展中国家推广应用。但目前 HEV DNA 疫苗的研制尚有一定困难;如近期的研究表明,HEV ORF2 全长 DNA 疫苗单独免疫动物的效果并不理想,需要考虑其他路径,如应用信号肽和基因枪等<sup>[17-19]</sup>。此外,作为 HEV DNA 疫苗序列的选择、修饰以及导入宿主主体内的途径等因素均可影响 HEV DNA 疫苗的免疫效果,值得进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepat*, 2008, 48(3): 494-503.
- [2] Emerson SU, Clemente-Casares P, Moiduddin N, et al. Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 3): 697-704.
- [3] Worm HC, Wirmsberger G. Hepatitis E vaccines progress and prospects. *Drugs*, 2004, 64(14): 1517-1531.
- [4] Deshmukh TM, Lole KS, Tripathy AS, et al. Immunogenicity of candidate hepatitis E virus DNA vaccine expressing complete

- and truncated ORF2 in mice. *Vaccine*, 2007, 25 (22): 4350-4360.
- [5] Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, et al. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J Virol*, 2000, 74 (12): 5548-5555.
- [6] Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, et al. Safety and Efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med*, 2007, 356(9): 895-903.
- [7] Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, et al. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine*, 1997, 15(17/18): 1834-1838.
- [8] Purcell RH, Nguyen H, Shapiro M, et al. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine*, 2003, 21(19-20): 2607-2615.
- [9] Krawczynski K. Hepatitis E vaccine — ready for prime time? *N Engl J Med*, 2007, 356(9): 949-951.
- [10] Li S, Zhang J, Li Y, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine*, 2005, 23(22): 2893-2901.
- [11] Wu T, Wu X, Ou S, et al. Difference of T cell and B cell activation in two homologous proteins with similar antigenicity but great distinct immunogenicity. *Molecular Immunol*, 2007, 44 (12): 3261-3266.
- [12] Li T, Suzuki Y, Ami Y, et al. Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine*, 2004, 22(3-4): 370-377.
- [13] Li T, Takeda N, Miyamura T, et al. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol*, 2005, 79(20): 12999-13006.
- [14] Zhou YX, Lee MY, Ng JM, et al. A truncated hepatitis E virus ORF2 protein expressed in tobacco plastids is immunogenic in mice. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(2): 306-312.
- [15] Ma Y, Lin S, Gao Y, et al. Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(10): 2211-2215.
- [16] Maloney BJ, Takeda N, Suzakib Y, et al. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Bryan J. Vaccine*, 2005, 23(15): 1870-1874.
- [17] Hong Y, Ruan B, Yang L, et al. Hepatitis E virus chimeric DNA vaccine elicits immunologic response in mice. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(42): 6713-6715.
- [18] Deshmukh TM, Lole KS, Tripathy AS, et al. Immunogenicity of candidate hepatitis E virus DNA vaccine expressing complete and truncated ORF2 in mice. *Vaccine*, 2007, 25(22): 4350-4360.
- [19] Li F, Loke P, Healy A, et al. The effect of antigen targeting sequences on antibody responses to hepatitis E virus DNA vaccines in rats and sheep. *Vaccine*, 2006, 24(9): 1367-1377.
- [20] Guo H, Zhou EM, Sun ZF, et al. Protection of chickens against avian hepatitis E virus (avian HEV) infection by immunization with recombinant avian HEV capsid protein. *Vaccine*, 2007, 25 (15): 2892-2899.
- [21] Guo H, Zhou EM, Sun ZF, et al. Identification of B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (avian HEV) that are common to human and swine HEVs or unique to avian HEV. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 1): 217-223.
- [22] Dong C, Dai X, Meng J, et al. The first experimental study on a candidate combined vaccine against hepatitis A and hepatitis E. *Vaccine*, 2007, 25(9): 1662-1668.

(收稿日期:2008-03-31)

(本文编辑:尹廉)

## · 消息 ·

## 中华医学会系列杂志从2009年开始标注数字对象惟一标识符

数字对象惟一标识符(digital object identifier, DOI)是对包括互联网信息在内的数字信息进行标识的一种工具。在传统的出版物中,书刊、磁带、光盘都有国际标准编号(ISBN、ISSN、ISCN)及其条形码,作为出版物的惟一标识。这些标识使出版物得到有效的管理,便于读者查找和利用。而网上的文档一旦变更了网址便无从追索。数字信息标注DOI如同出版物的条形码,是一个永久和惟一的标识号。随着时间推移,数字对象的某些有关信息可能会有变化(包括存储的物理位置),而DOI可让使用者直接由此链接到出版商的数据库、文献、摘要甚至是全文,识别码可以直接指引到出版物的本身,使国内外各种来源、不同物理地址的各种类型的学术信息实现互链互通。DOI是一个可供全球期刊快速链接的管理系统,整个系统由国际DOI基金会(IDF)进行全球分布式管理。随着DOI的普及,可以借助其进行相关的科研评价,分析高被引频次作者、单位和论文等相关信息,了解各个领域学术研究的热点、影响和趋势,以及研究者在本研究领域的影响力及最新研究成果。中文和英文资源,一次和二次文献,科技文献和数据通过DOI可实现动态的、开放式的知识链接,整体提升包括期刊在内的数字资源的使用率,为读者提供更好的服务。进而逐步提高中国期刊的被引率,整体上提高中国精品期刊在国际上的影响度和显示度,最终推动并建立一个与世界接轨的、永久的、开放互动、成员主动参与、覆盖主要学术研究信息领域的知识链接系统,推动数字期刊的发展和繁荣。

为了实现中华医学会系列杂志内容资源的有效数字化传播,同时保护这些数字资源在网络链接中的知识产权和网络传播权,为标识对象的版权状态提供基础,实现对数字对象版权状态的持续追踪,自2009年第1期开始,中华医学会系列杂志纸版期刊和数字化期刊的论文将全部标注DOI。即中华医学会系列杂志除科普和消息类稿件外,其他文章均需标注DOI,DOI标注于每篇文章首页脚注的第1项。由中华医学会杂志社各期刊编辑部为决定刊载的论文标注DOI。

参照IDF编码方案(美国标准ANSI/NISO Z39.84-2000)规定,中华医学会系列杂志标注规则如下:“DOI:统一前缀/学会标识.信息资源类型.杂志ISSN.\*\*\*\*-\*\*\*\*.年期.论文流水号”。即:“DOI:10.3760/cma.j.issn.\*\*\*\*-\*\*\*\*.yyyy.nn.zzz”。

中华医学会系列杂志标注DOI各字段释义:“10.3760”为中文DOI管理机构分配给中华医学会系列杂志的统一前缀;“cma”为中华医学会(Chinese Medical Association)缩写;“j”为journal缩写,代表信息资源类别为期刊;“issn.\*\*\*\*-\*\*\*\*”为国际标准连续出版物号(ISSN);“yyyy”为4位出版年份;“nn”为2位期号;“zzz”为3位本期论文流水号。