

· 综述 ·

戊型肝炎病毒疫苗研究进展

吴淑玲 成军 邓红

人或动物感染戊型肝炎病毒(HEV)后可产生抗-HEV 反应,且有效保护作用,HEV 只有 1 个血清型,因此有可能研制出对所有 HEV 病毒株均有保护的 HEV 疫苗。近年来,HEV 疫苗的研究取得了快速进展。

一、原核细胞表达的 HEV 重组蛋白或抗原肽

大肠埃希菌表达系统是传统的原核表达系统,具有技术成熟、表达量大、速度快、培养条件和过程简单、成本低等优点,已被用于表达了 HEV ORF2 基因的不同片段,产物免疫原性较好。但由于该系统不能对蛋白进行加工修饰,产物的活性有待进一步提高。

1993 年,Purdy 等^[1]用大肠埃希菌表达 HEV 缅甸株 ORF2 片段,产物是 436 aa 的融合蛋白(TrpE-C2),它能对被同源毒株攻击的猕猴提供完全保护作用,并对异源毒株攻击提供部分保护。这是 HEV 重组蛋白免疫原性的最早研究之一,为 HEV 疫苗研究奠定了基础。

Im 等^[2]在大肠埃希菌中表达 HEV 中国株 ORF2 的 3'-端区域,产物是 23 kD 的短肽(pE2),它能自发形成同源二聚体或寡聚体,免疫 3 只恒河猴后,用同源毒株攻击,两只猴不感染,1 只猴有少量病毒分泌,表明 pE2 能对被同源毒株攻击的恒河猴提供保护作用,其二聚体或寡聚体引起的免疫反应明显强于单体,这意味着这两种形式中某些重要的构象决定簇得以更好的暴露。李少伟等^[3]为了探讨 HEV 衣壳蛋白同源二聚体形成的关键区域和相互作用结构域,以及二聚体形成与主要天然中和表位的形成之间的关系,通过末端缺失、定点突变技术研究 HEV ORF2 的 394~606 aa 片段 NE2 的聚合现象,发现其 C-端的 597~602 aa(AVAV-LA)疏水区是该片段同源聚合的核心区域,提高该区域氨基酸的亲水性将妨碍聚合现象的发生;半胱氨酸化学交联实验表明 NE2 形成同源二聚体时,597 在空间位置上相接近,处于可生成化学键的距离,提示所处区域为疏水聚合的作用结构域;通过 BLAST 程序估算核心区域的天然突变率,发现其疏水性高度保守;N-端缺失实验表明,至少 65 aa 既不影响同源聚合也不直接参与主要的天然中和表位的形成,但可协助中和表位构象的形成,而这种协助作用可被 ORF2 的末端肽段所代替。597~602 aa 疏水区为 HEV 衣壳组装的第一步骤的核心区域,并与重要的天然中和表位的形成直接相关,从而为 HEV 疫苗的研究提供更详细的信息。Ge 等^[4]在大肠埃希菌中表达的一段 HEV 结构蛋白 NE2,纯化后以弗氏佐剂,按 0 d、10 d、30 d 的方案 10 μg 针的剂量免疫 3 只恒河猴。在第 2 周抗体阳转,第 6 周

作者单位:100011 北京地坛医院传染病研究所(吴淑玲、成军);西安交通大学第二附属医院感染病科(吴淑玲、邓红)

通讯作者:成军 Email:cj@genetherapy.com.cn

时 1 只滴度达 1:100 000,另 2 只滴度 1:20 000,此时以 10^6 PCR 滴度的 HEV 病毒粪悬液攻击。对照组 3 只均出现血清转氨酶(ALT)升高,抗体阳转,粪便持续排毒 1 个月以上;疫苗组无一发病,未检出非疫苗来源的抗体,其中 1 只始终未检出粪便排毒,另 2 只仅出现短暂排毒。以 1 份 NE2 免疫后猴血清(滴度 1:20 000)与 10^3 PCR 滴度的病毒混匀后感染恒河猴,结果对照组 2 只均持续排毒 3 周以上,抗体阳转,1 只 ALT 明显升高;而抗体中和组 2 只猴始终未检出粪便排毒,抗 NE2 抗体缓慢下降,ALT 正常。这些结果表明 NE2 具有良好的免疫原性和免疫保护性,有可能成为有效的 HEV 疫苗。

He 等^[5]用大肠埃希菌表达 ORF2 中 394 ~ 606 aa 片段(NE2)的 3 个 N-端延伸突变体,发现对应于 ORF2 的 368 ~ 606 aa 的重组蛋白 HEV 239 在体外可以形成颗粒性抗原,透射电镜和原子显微镜观察均见直径约为 15 ~ 30 nm 的颗粒。HEV239 抗原颗粒与戊型肝炎患者血清反应性良好,对中和性单克隆 HEV 239 抗原颗粒免疫 BALB/c 小鼠的半数有效剂量(ED₅₀)在 0.08 ~ 0.25 μ g 之间,而同样以铝佐剂吸附的 NE2 抗原 60 μ g 剂量免疫的抗体阳转率仅 25%,表明 HEV 239 抗原颗粒具有更好的免疫原性。

到目前为止,已有不少研究显示截断的 ORF2 片段比全长 ORF2 蛋白的抗原性好,只要 ORF2 片段中含有与疫苗相关的表位,免疫动物后均能引起较强的免疫反应^[6]。Meng 等^[7]报道能结合 HEV 中和抗体的最小 ORF2 片段位于 452 ~ 617 aa 之间,该片段不仅能引发中和抗体,还能与其他型别的抗体发生交叉反应。利用系列合成肽研究发现,ORF2 编码的抗原表位多分布在 C-末端 2/3 区域^[8],这些抗原与急性期和恢复期抗 HEV 抗体的产生关系密切,但稍长一点的 ORF2 片段作为重组蛋白表达时,其表位就会被遮盖,因此免疫原性减弱。

二、真核细胞表达的 HEV 重组蛋白

用作 HEV 疫苗研究的真核表达系统主要有两种:一种是杆状病毒-昆虫细胞表达系统,一种是酵母表达系统。其他真核表达系统如用植物表达 HEV 重组蛋白亦已开始尝试。

1. 杆状病毒-昆虫细胞表达系统:杆状病毒-昆虫细胞表达系统是近年应用广泛的真核表达系统,具有翻译后加工功能,表达产物成为自主性的、有功能的蛋白,免疫原性好,表达水平高,能同时表达多个外源基因,至今已有多个 HEV 基因片段经该系统得到表达。目前认为最好的候选 HEV 疫苗是在昆虫细胞中表达的重组杆状病毒 HEV 衣壳抗原^[9],产物具有良好的免疫原性,已有一个候选疫苗通过了 I 期试验^[10],但产物的应用也受到了异源昆虫蛋白的限制。

Yarborough 等^[11]将昆虫细胞表达的 HEV 缅甸株 ORF2 基因片段产物(r62 kD)黏膜内注射免疫 3 只猕猴,用异源墨西哥株攻击,两只猴不发病也未见感染,另 1 只猴出现迟发感染及粪便 RNA 短暂阳性,表明 r62 kD 对异源毒株攻击的猕猴有保护作用。这是在昆虫细胞表达 HEV 基因的较早研究。

用 ORF2 全长基因构建重组昆虫杆状病毒,并使之在昆虫细胞中表达,可以

获得 30 ~ 100 kD 大小不等的蛋白带,分析认为 72 kD 的蛋白带是 ORF2 蛋白,72 kD 蛋白可能在杆状病毒编码的蛋白酶作用下,迅速裂解为一些小蛋白,主要是 56 kD 和 53 kD 蛋白^[12]。研究发现用氢氧化铝作佐剂的 56 kD 蛋白在猕猴中显示出较好的免疫原性,产生较高水平的抗体,对疾病的免疫保护较 53 kD 蛋白更好,因为 56 kD 蛋白含有中和表位,而 53 kD 蛋白则不含此表位。56 kD 蛋白疫苗引起的完全保护至少可持续 6 个月,部分保护至少可持续 1 年^[13]。

国内学者也进行了昆虫细胞表达 HEV 基因的研究。杜瑞娟等^[14]表达了 HEV ORF2 基因的 3' -端 1290 nt 的片段,经免疫荧光、Western blot、动物免疫试验证实该重组蛋白可刺激机体产生 HEV 抗体。张明程等^[15]表达 HEV 全长 ORF2 基因,经 SDS-PAGE、Western Blot 及免疫荧光证实了重组蛋白的表达及活性。

到目前为止,已有一个 HEV 候选疫苗通过了 I 期试验,该候选疫苗是昆虫细胞表达的 HEV 巴基斯坦株 ORF2 片段的蛋白产物(56 kD)。首先在美国经 88 名志愿者试验证明,该疫苗安全,有较好的免疫原性。尔后,在尼泊尔也进行了 I 期临床试验,44 名志愿者随机分为两组进行免疫,于 0、1 和 6 个月时分别注射 5 μ g 或 20 μ g 疫苗,注射后无严重不良反应。免疫后第 2 个月,44 名志愿者中有 43 名血清抗 HEV 抗体阳转;第 7 个月时另 1 名血清抗 HEV 也阳转。说明该 HEV 候选疫苗在尼泊尔人群中有很好的免疫性。同样的疫苗正在尼泊尔进行 II 和 III 期临床试验。在 II 期临床试验中对约 2000 名 HEV 易感的健康成人志愿者进行随机双盲安慰剂对照实验,他们分别在 0、1、6 个月接受疫苗或安慰剂注射,结果显示该疫苗有效率达 95.5%,与安慰剂组相比,疫苗组发生戊型肝炎后,重型肝炎发生率少($P < 0.001$),从而得出在高危人群中,该重组疫苗能有效预防戊型肝炎的发生并能减轻病情^[16]。

2. 酵母表达系统:酵母表达系统已被成功地用于疫苗生产,例如重组乙肝表面抗原^[17]。酵母表达系统营养要求低,能高密度发酵培养;条件易于控制,利于规模化实施和生产;对表达的蛋白进行翻译后修饰,产物类似天然蛋白,生物活性高,也易于纯化,因此是较有前景的疫苗开发工具。一些学者进行了用酵母表达系统表达 HEV 基因的探索,为 HEV 疫苗的研制提供了新途径。

佟玉品等^[18]利用甲醇营养型毕赤酵母表达了编码 HEV ORF2 第 69 ~ 660 aa 的基因,得到分子量为 59 kD 的重组蛋白,经亲和捕获反应转录 PCR、免疫小鼠实验表明,该重组蛋白刺激小鼠产生的抗体,不仅可以特异性结合天然 HEV,而且小鼠体内可有效地诱发体液免疫反应,具有良好的免疫原性,这为新型 HEV 疫苗的研制奠定了基础。苏彩霞等^[19]也用汉逊酵母成功的表达了 HEV IV 型 ORF2。

3. 其他真核表达系统:自 1990 年 Curtiss 等^[20]首次报道在烟草中表达链球菌变异株表面蛋白 A(Spa A)后,用植物表达蛋白的研究已取得了重大进展,近年来用植物表达口服疫苗的研究倍受学术界的重视。转基因植物疫苗具有许多潜在的优势:生产简单,成本低,易推广;产物三维空间结构趋于自然状态,免疫原性和

生物活性高,能成功地诱导黏膜免疫反应;安全性好;贮存简单,不污染环境。但也存在一些问题:表达量不高,口服时易被消化。Ma 等^[21]将 ORF2 部分序列(命名为 HEV E2 基因,编码 394 ~ 604 aa)转入西红柿基因以研制 HEV 转基因植物口服疫苗,他们构建了该 HEV 部分抗原的植物表达载体并转染西红柿基因,ELISA 试验显示,在转基因西红柿果肉组织中低水平表达出有特异抗原性的 HEV E2 蛋白。植物作为生产 HEV 疫苗的新型反应器,也具有较大的研究价值。

三、其他类型的戊型肝炎疫苗

1. 重组 DNA 疫苗:重组 DNA 疫苗是最近发展起来的一种新型疫苗,通过给人或动物直接注入带有靶基因的质粒 DNA,该 DNA 在宿主体内表达目的蛋白并引起免疫反应,进而防治疾病。这种疫苗有很多优点:在活细胞内表达的抗原以其天然形式存在,通常可引起双重免疫即细胞和体液免疫,具有较长期的保护作用;DNA 可以大量制备,成本低,纯度高,且相当稳定;与活疫苗不同的是载体不会致病,也不会引起免疫反应。

10 余年前,Lu 等^[22]开始进行 HEV 重组 DNA 疫苗的研究。用 HEV ORF3 全长 cDNA 片段插入真核表达质粒 pSVL,构建了 HEV cDNA 重组质粒,并用 100 μg 该质粒给 BALB/c 小鼠接种 2 次后,16 只小鼠中有 12 只产生了抗 HEV IgG,而 5 只只注射空载体的对照小鼠中,无 1 只抗 HEV IgG 阳转,说明 HEV cDNA 重组质粒可刺激小鼠产生保护性抗体。He 等^[23]研究发现注射 3 针 HEV 重组 DNA 疫苗的免疫小鼠有免疫记忆。

Kamili 等^[24]用构建的含有 HEV 缅甸株 ORF2 全长序列的表达载体黏膜免疫四只猕猴,均被诱导出抗 HEV 抗体反应,但体液免疫微弱,重复免疫后抗体水平未见增强,在异源毒株攻击后只有 2 只猴不感染。最近,他们用基因枪将这种 DNA 疫苗免疫猕猴,其对异源毒株的攻击表现保护作用,免疫原性较黏膜免疫有所增强,说明疫苗的保护效果与其进入机体的方式有关。重组 DNA 疫苗的研制成为 HEV 疫苗研制的另一个热点,但是目前这种疫苗的研究仅局限于动物实验,还未能进行临床试验。

2. 重组 HEV 样颗粒(rHEV VLPs):研究发现,当带有 N-末端 111 aa 的 HEV 衣壳蛋白在杆状病毒-昆虫细胞表达系统中表达时,自动装配成 VLPs,电镜显示,这些病毒样颗粒是由 60 个 54 kD 蛋白构成的,并排列成 T = 1 的对称型^[25]。作为黏膜免疫原,rHEV VLPs 有以下优点:由单一蛋白装配而成,无核酸,因而不复制;易于大量制备和纯化,在 10⁷ 个昆虫细胞内产量约为 1 mg;其抗原性与 HEV 很相似;给实验动物注射有很高的免疫原性;在低 pH 环境中稳定(如在胃中);口服引起与自然感染相同的免疫反应。

Li 等^[26]在昆虫细胞表达的 HEV 缅甸株 ORF2 基因片段产物(50 kD)分泌入培养基后能自我组装成为 rHEV VLPs,rHEV VLPs 与 HEV 野生型毒株相似但体积稍小,能口服免疫。口服免疫的小鼠血清中检测到抗 HEV IgA、IgM 和 IgG 抗体,粪便中检测到抗 HEV IgA 抗体,表明 rHEV VLPs 诱导了系统和肠道抗体反

应。由于小鼠对 HEV 不易感,最近又用 10 mg 纯化的 rHEV VLPs 对 2 只猕猴进行了不加佐剂的经口免疫。2 只猴均出现血清抗 HEV 反应,静脉注射同源 HEV 后,均不发病,1 只猴粪便排泄病毒 3 d^[27]。rHEV VLPs 还能用作口服免疫载体分子,在其 3'-端整合一个长度为 11 aa 的 B 细胞抗原表位,成为嵌合 VLP,其形态特征与 HEV 病毒体相似;能与整合的 B 细胞抗原表位的单克隆抗体反应,口服免疫小鼠,诱导出 HEV 抗原和 B 细胞抗原表位的特异性肠道免疫和体液免疫^[28]。rHEV VLPs 还可作为外源基因口服免疫的携带者,用于 DNA 免疫和基因治疗,在体外将 HIV 包膜基因的 cDNA 包装进入 rHEV VLPs,口服免疫后诱导了 HIV 特异的肠道、体液及细胞免疫^[29]。以上表明, rHEV VLPs 的免疫原性好,并能口服免疫,是很有前景的 HEV 候选疫苗。

3. 以重组腺病毒为载体的戊型肝炎疫苗研究:腺病毒作为疫苗载体在诱导黏膜免疫方面具有明显的优势,可模仿病毒天然的感染方式,并直接在体内表达天然的、保持完整生物活性的抗原蛋白,因此常常能诱导有效的特异性黏膜和体液免疫应答。董雪等^[30]进行了重组腺病毒表达 HEV 基因的尝试,他们经 PCR 扩增编码 ORF2 蛋白(112~660 aa)的基因片段,将其连接于重组腺病毒 AdEasy 系统的穿梭质粒 pTrack-CMV 上,与腺病毒基因组质粒 pAdEasy-1 共转化宿主菌 BJ5183,经细菌内同源重组获得重组腺病毒基因组质粒,转染 293 细胞以产生、扩增重组腺病毒。将重组腺病毒以 107 pfu 的剂量经鼻腔和腹腔免疫小鼠,通过 ELISA 检测血液 IgG 和黏膜 IgA 的应答情况。结果显示重组腺病毒经鼻腔免疫小鼠后可刺激机体产生特异性 IgA 和 IgG 免疫应答,IgG 最高滴度达 1:1000。经腹腔免疫可刺激小鼠产生 IgG 免疫应答,最高滴度可达 1:10 000,未检测到明显的 IgA 应答。表明能表达 HEV 的 ORF2 蛋白的重组腺病毒能刺激机体产生有效的免疫应答,为 HEV 疫苗研究探索了又一新途径。

4. 其他动物 HEV 重组蛋白:某些动物如猪、牛、羊、啮齿动物等也对 HEV 易感^[31]。Engle RE 等^[32]发现猪 HEV 可与人 HEV 衣壳抗原进行交叉反应。从自然感染 HEV 的猪的血清中通过逆转录 PCR(RT-PCR)扩增出全长 ORF2 和 ORF3 基因,通过鉴定,猪 HEV ORF2 与人 HEV ORF2 相比,79%~80% 的核苷酸序列相同,90%~92% 的氨基酸相同;ORF3 在核苷酸水平上相似性达到 83%~85%,氨基酸水平上达到 77%~82%。猪 HEV 虽与人 HEV 有所不同,但有极大的相似性,这个发现有助于 HEV 疫苗的研究。Guo H 等^[33]证实猪 HEV 和人 HEV 含有相同的免疫显性表位。猪 HEV 目前已用作 HEV 疫苗研究。此外,鸟类 HEV 与人 HEV 主要中和表位含有相似的结构。用铝作佐剂的鸟类 HEV 重组 ORF2 衣壳蛋白在鸡中能够诱导产生针对鸟类 HEV 的保护性免疫,这说明及可作为研究抗 HEV 免疫和发病机理的有用的小动物模型,鸡 HEV 可成为研究 HEV 疫苗的另一途径^[34]。

四、问题及展望

综上所述,HEV 疫苗的研究取得了较大进展,在常见表达系统的基础上提高

了重组蛋白或抗原肽的免疫原性,并探索了在新型表达系统表达 HEV 基因,还进行了 HEV 与 B 细胞抗原、HEV 与 HIV cDNA 的双价疫苗研究,提供了更多的研究思路和途径。但还有一些问题需要解决:例如,选用何种表达系统,所选系统的表达效率,产物的活性以及是否易于纯化;选用多长的 HEV ORF2 基因片段构建重组疫苗最为合适;是口服疫苗还是注射疫苗;疫苗对异源病毒株是否具有交叉保护力,交叉保护力的强弱;保护性免疫持续时间问题,是终身免疫还是每隔一段时间需要加强;疫苗的安全性有多大等等。为了解决这些问题,我们还需要认真研究 HEV 的复制方式以及致病机理,应建立一种实用有效的组织培养体系并进行大量的动物实验和临床试验。随着这些问题的逐一解决,HEV 疫苗的研究必将出现重大突破,届时将可能出现多种商品化的 HEV 疫苗或者 HEV 联合疫苗,人们的卫生水平将会大大提高。

参 考 文 献

- 1 Purdy MA, Mc Caustland KA, Krawczynski K, et al. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus against length wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol*, 1993, 41:90-94.
- 2 Im Sw, Zhang JZ, Zhuang H, et al. A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *J Vaccine*, 2001, 19:3726-3732.
- 3 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, 20:90-98.
- 4 Ge S, Zhang J, Huang G, et al. The immuno-protect study of a hepatitis E virus ORF2 peptide expressed in *E. coli*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2003, 43:35-42.
- 5 He ZQ, Zhang J, Li SW, et al. Particulate recombinant hepatitis E virus capsid protein and its antigenicity and immunogenicity. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2004, 20:262-268.
- 6 Obriadina A, Meng J, Ulanova T, et al. A new enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17:s360-s364.
- 7 Meng J, Dai X, Chang JC, et al. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *J Virol*, 2001, 288:203-211.
- 8 Li F, Riddell MA, Seow HF, et al. Recombinant subunit ORF2. 1 antigen and induction of antibody against immunodominant epitopes in the hepatitis E virus capsid protein. *J Med Virol*, 2000, 60:379-386.
- 9 Purcell RH, Nguyen H, Shapiro M, et al. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *J Vaccine*, 2003, 21:2607-2613.
- 10 Stevenson P. Nepal calls the shots in hepatitis E virus vaccine trail. *Lancet*, 2000, 355: 1623-1628.
- 11 Yabough PO. Hepatitis E virus: advances in the HEV biology and HEV vaccine approaches. *J Intervirology*, 1999, 42:179-184.
- 12 Robison RA, Burgess WH, Emerson SU, et al. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *J Protein Exp Puri*, 1998, 2:75-84.
- 13 Zhang MD, Emerson SU, Nguyen H, et al. Recombinant vaccine against hepatitis E: duration of protective immunity in rhesus macaques. *J Vaccine*, 2002, 20:3258-3291.
- 14 杜瑞娟,马雁冰,唐浩,等. 重组杆状病毒表达 HEV ORF2 抗原片段. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21:560-563.
- 15 张明程,伊璐,刘崇柏,等. 用杆状病毒系统表达戊型肝炎病毒全长结构基因的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, 16:354-356.
- 16 Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med*, 2007, 356: 895-903.
- 17 Zhang YX, Dai L, Sun XM. Kinetic aspect of hepatitis B surface antigen production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermentation. *Process Biochem*, 2003, 38:1593-1598.
- 18 佟玉品,詹美云,鲁健,等. 酵母表达的戊型肝炎病毒结构区 ORF2 蛋白的免疫原性研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, 16:23-26.

- 19 苏彩霞,顾美荣,张萍,等. 戊型肝炎病毒 IV 型 ORF2 蛋白在汉逊酵母中的表达. 生物工程学报,2007,23:73-78.
- 20 Curtiss R, Galan JE, Nakayama K, et al. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. Res Microbiol,1990, 141:797-805.
- 21 Ma Y, Lin SQ, Gao Y, et al. Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity products. World J Gastroenterol,2003,9:2211-2215.
- 22 Lu FM, Zhuang H, Zhu YH, et al. A preliminary study on immune response to hepatitis E virus(HEV) DNA vaccine in mice. J Clin Med,1996,10:9919-920.
- 23 He J, Hayes CG, Binn LN, et al. Hepatitis E virus DNA vaccine elicits immunologic memory in mice. J Biomed Sci,2001,8: 223-226.
- 24 Kamili S, Spelbring J, Krawczynski K. DNA vaccination against hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques. J Gastroenterol Hepatol,2002,17: S365-S369.
- 25 Kamili S, Spelbring J, Carson D, et al. Protective efficacy of hepatitis E virus DNA vaccine administered by gene gun in the cynomolgus macaque model of infection. J Infect Dis,2004,189:258-264.
- 26 Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, et al. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. J Virol, 1997,71:7207-7213.
- 27 Xing L, Kato K, Li TC, et al. Recombinant hepatitis E virus capsid protein self-assembles into dual-domain T=1 particle presenting native virus epitopes. J Virol,1999,265:35-45.
- 28 Li TC, Takeda N, Miyamura T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induce a systemic and mucosal immune response in mice. J Vaccine,2001,19:3476-3484.
- 29 Li TC, Suzaki Y, Ami Y, et al. Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus like particles. J Vaccine,2004,22: 370-377.
- 30 董雪,胡金勇,谢天宏,等. 表达戊型肝炎病毒 ORF2 蛋白的重组腺病毒构建及其经黏膜途径免疫小鼠. 中国医学科学院学报,2003,25:324-328.
- 31 Xiang JM, Robert H, Purcell, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94: 9860-9865.
- 32 Engle RE, Yu C, Emerson SU, et al. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by Enzyme immunoassay. J Clinical Microbiol,2002,40:4576-4580.
- 33 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. J Vaccine, 2007,25:2892-2899.

(收稿日期:2006-12-10)

(本文编辑:张锦前)