



戊型肝炎病毒遗传多样性和进化机制的研究进展

徐永权^{1,2}, 高珺珊², 吴清平², 张菊梅^{2*}, 薛亮^{2*}

1 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室
国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 广东 广州 510070

徐永权, 高珺珊, 吴清平, 张菊梅, 薛亮. 戊型肝炎病毒遗传多样性和进化机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1392-1401.

XU Yongquan, GAO Junshan, WU Qingping, ZHANG Jumei, XUE Liang. Research progress in genetic diversity and evolutionary mechanism of hepatitis E viruses[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1392-1401.

摘要: 戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)是一种引发全球急性病毒性肝炎的人兽共患病病原。HEV 具有丰富的遗传多样性, 不同基因型或基因亚型的流行与地理位置、宿主物种以及防控策略等密切相关。欧洲和美洲 HEV 流行株为 HEV-3, 包括 3a-3i 亚型, 而亚洲流行株含 HEV-3 和 HEV-4; 我国的流行毒株已从 HEV-1 进化到 HEV-4。近年来, 研究发现 HEV 进化的影响机制, 包括同义密码子使用模式、氨基酸突变和基因重组等, 其中氨基酸突变是病毒持续流行的主要驱动力。因此, 本文就 HEV 的分类、全球流行特征、进化机制等进行综述, 以期对戊型肝炎的有效防控以及疫苗开发提供参考。

关键词: 戊型肝炎病毒; 遗传多样性; 进化

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFF1103100); 国家自然科学基金(32272436); 广东省重点研发计划(2022B1111040002)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1103100), the National Natural Science Foundation of China (32272436), and the Key Research and Development Program of Guangdong Province (2022B1111040002).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Jumei, zhangjm926@126.com; XUE Liang, xueliang@gdim.cn

Received: 2023-11-09; Accepted: 2024-01-26; Published online: 2024-02-29

Research progress in genetic diversity and evolutionary mechanism of hepatitis E viruses

XU Yongquan^{1,2}, GAO Junshan², WU Qingping², ZHANG Jumei^{2*}, XUE Liang^{2*}

1 College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

Abstract: Hepatitis E virus (HEV) is a major zoonotic pathogen that causes acute viral hepatitis worldwide. HEV has high genetic diversity, and the incidence of various genotypes or subtypes is strongly correlated with host species, geographic location, and prevention and control methods. HEV strains HEV-3, comprising 3a–3i subtypes, were present in Europe and America, whereas HEV-3 and HEV-4 were prevalent in Asia. The epidemic strains in China have evolved from HEV-1 to HEV-4. Recent studies have shown that gene recombination, amino acid mutations, and synonymous codon usage patterns are part of the mechanisms underlying HEV evolution. In particular, amino acid mutations are the main driving force for the continued prevalence of the virus. This paper reviews the classification, global epidemic characteristics, and evolutionary mechanism of HEV, aiming to provide a reference for the prevention and control of hepatitis E and vaccine development.

Keywords: hepatitis E virus; genetic diversity; evolution

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)是一种造成全球急性病毒性肝炎的人兽共患病原体^[1]。戊型肝炎属自限性感染疾病,轻症感染者会出现轻度发烧、恶心、皮疹等症状,一般2–6周内会自愈^[2];重症戊型肝炎患者可能发展成急性戊型肝炎,造成急性肝衰竭,甚至导致死亡^[3]。HEV是世界范围内最常见的急性病毒性肝炎病毒,全球每年约有2 000万患者感染,约330万病例有临床症状^[4]。

1955年,第一次回顾性确定的戊型肝炎疫情在印度暴发,统计病例数达2.9万例^[5]。1983年, Balayan 等通过免疫电镜技术首次在阿富汗的苏联士兵中发现戊型肝炎的病原体颗粒^[6]。我国法定传染病报告显示,近十年来,戊型肝炎

报告发病数超过甲肝发病数,并且其报告死亡率已升至五大病毒性肝炎首位^[7]。

后疫情时代,HEV引起了特别的关注。许多研究表明猪并不是HEV的唯一宿主,蝙蝠很可能也是这些高致病性病毒的天然宿主^[8]。此外,全球首例鼠传人戊型肝炎的出现也给人们敲响了警钟,证实HEV正在不断进化,拥有跨物种传播能力^[9]。HEV作为食源性病毒之一,以粪-口传播为主,如食用受HEV感染的猪肉或猪肉制品、饮用受污染的水等,其危害已成为我国食品安全的主要问题^[10–11]。因此,本文对HEV的遗传多样性和进化机制进行综述,以期发现和监测新毒株的流行以及毒株之间的联系,预报流行趋势和提出新的防治策略提供参考。

1 基因组结构

1990年, HEV 缅甸株的全长基因组被首次克隆测序^[12], 其基因组长度约为 7.2 kb, 由单股正链 RNA 编码^[13], 包含 3 个或 4 个开放阅读框(open reading frames, ORFs) (图 1)^[14]。

以 Sar55 株(GenBank 登录号: AF444002)为例, ORF1 是 HEV 基因组中最大的 ORF, 共有 5 081 个核苷酸, 其编码的非结构蛋白由多个结构域组成, 即甲基转移酶(methyltransferase, Met)、Y 结构域(Y-domain, Y)、蛋白酶(putative papain-like cysteine protease, PCP)、高变区(hypervariable region, HVR)、X 结构域(macrodomain, X)、解旋酶(helicase, Hel)和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)^[15]。ORF1 编码的非结构蛋白是 HEV 基因组复制所必需的, 但目前尚不清楚 ORF1 产物是作为具有多个结构域的单蛋白起作用, 还是被加工成单独的功能单位。

ORF2 由 1 982 个核苷酸组成, 包含壳(shell,

S)、中间(middle, M)和突出(protruding, P)结构域, 主要编码两种形式蛋白: 分泌形式(secreted form of ORF2, ORF2^S)和衣壳蛋白(capsid-associated ORF2, ORF2^C); ORF2^S由一直被认为是 HEV 衣壳蛋白的起始密码子(第一个 AUG 密码子)翻译而来, ORF2^C在高度保守的内部 AUG 密码子(第一个 AUG 下游的 15 个密码子)处翻译; 与 ORF2^C不同, ORF2^S以糖基化二聚体形式存在, 不会阻断 HEV 进入细胞, 但会抑制抗体介导的中和作用^[16]。作为主要的病毒粒子成分, HEV ORF2 最初被认为只用于编码衣壳蛋白^[17]。然而, 近年来研究发现, 除了形成衣壳外, ORF2 在病毒复制、发病机制和诊断中都起着重要作用^[18-19]。

ORF3 是所有 HEV ORF 中最小的 ORF, 与 ORF2 的 N 端部分重叠, 存在 2 个疏水结构域和 2 个富含脯氨酸的结构域, 编码分子量约为 13 kDa 的磷酸蛋白^[20]。最初, HEV ORF3 蛋白未引起过多关注。因为在细胞培养中, 即使没有合成 ORF3 蛋白, 也会产生明显真实的病毒

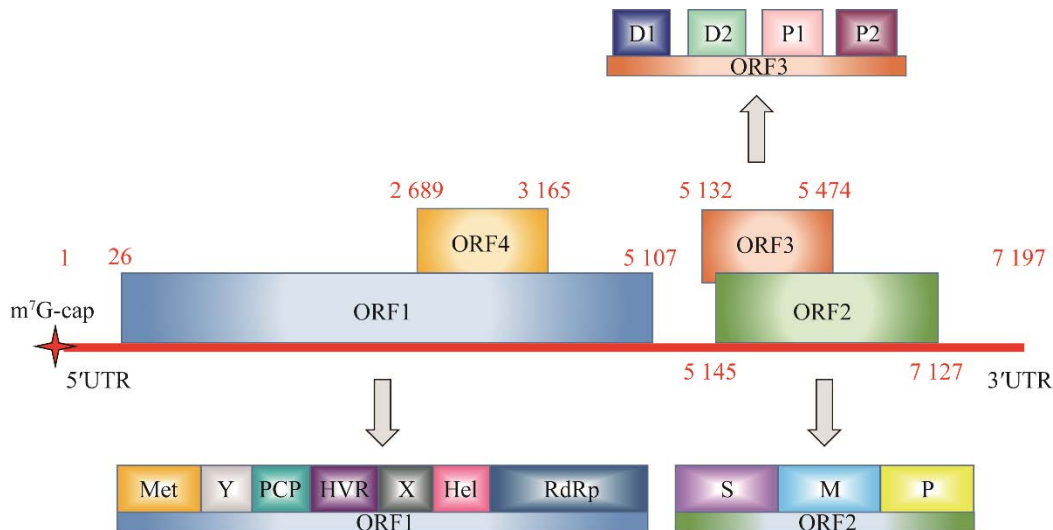


图 1 戊型肝炎病毒的基因组结构(基于 Sar55 株, GenBank 登录号: AF444002)

Figure 1 The genome structure of hepatitis E virus (based on Sar55 strain, GenBank accession number: AF444002).

粒子,因此 ORF3 蛋白似乎只是一种病毒调节蛋白,而不是病毒粒子的结构成分,不参与体内病毒粒子的产生^[21]。然而,随后的研究表明 ORF3 是 HEV 生命周期中所必需的,ORF3 的缺失显著降低了 HEV 复制和从顶端表面释放的病毒粒子,尽管 ORF3 缺失的突变 HEV 能够在肝脏中短暂复制,但未能维持感染并最终被清除^[22]。

ORF4 共有 476 个核苷酸,仅由 HEV-1 在内质网应激条件下编码合成 ORF4 蛋白;ORF4 蛋白是一种中度无序蛋白,其多肽链中无序残基(VLXT、VSL2、VL3)少于 30%,且在 N 末端有一段无序结构域^[23]。核苷酸组成分析表明,ORF4 蛋白编码序列中 C 核苷酸含量最高,A 核苷酸含量最低,G 和 T(U)核苷酸含量相近;这种核苷酸组成限制影响 HEV 同义密码子使用模式,从而影响病毒的进化^[24]。

2 分类和区域流行特点

根据 2022 年国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)的最新报告,HEV 被归类为戊型肝炎病毒科(Hepeviridae),其中包含正戊型肝炎病毒属(Orthohepevirus)和鱼戊型肝炎病毒属(Piscihepevirus) 2 个不同的属,Orthohepevirus 分为 Orthohepevirus A-D 4 个种,具有不同的宿主范围^[25]。Orthohepevirus A 细分为 8 个基因型(HEV-1-HEV-8),其中 HEV-1 和 HEV-2 仅感染人类,主要流行于亚洲、非洲和拉丁美洲的热带和亚热带地区;HEV-3 和 HEV-4 属于人兽共患病病原,在全球范围内均有流行;HEV-5 和 HEV-6 仅在野猪中发现;HEV-7 和 HEV-8 分别在单峰骆驼和双峰骆驼中发现^[26]。目前研究重点主要集中在能感染人类的 HEV-1-HEV-4,这 4 种基因型进一步划分为多个基因亚型,包括 HEV-1 的 7 个亚型(1a-1g)、HEV-2 的 2 个亚型

(2a 和 2b)、HEV-3 的 14 个亚型(3a-3m 和 3ra)和 HEV-4 的 9 个亚型(4a-4i)^[27]。依据 GenBank 中现有的 HEV 全基因组核苷酸序列数据绘制系统发育树(图 2),结果证实 HEV 具有丰富的遗传多样性。

HEV 的基因型和亚型流行不仅具有明显的地域性,并且会随着时间的推移而发生变化^[28],如我国 20 世纪 90 年代的戊型肝炎处于以 HEV-1 引起的频繁暴发的高流行模式,而目前则处于以 HEV-4 感染的散发病例的低流行模式,其中以 4a、4b、4d 和 4h 这 4 种亚型为主^[29]。同时,HEV 的流行也与宿主物种有着密切关系,如从葡萄牙野猪中分离出的 HEV 毒株主要为基因 3e 和 3m 亚型^[30];从日本梅花鹿中检测出基因 3b 亚型毒株^[31];而从我国西北地区养殖猪中分离出基因 4a、4d 和 4h 亚型毒株^[32]。

在欧洲,大多数急性 HEV 患者是流行地区的旅行者或接受过输血的患者,流行基因型为 HEV-3^[33]。在过去十年中,欧洲国家 HEV 抗体的血清阳性率一直在增加,并且在不同地理区域之间显示出显著差异^[34]。一项研究分析了德国 2010-2019 年 936 份人源 HEV RNA 阳性样本,结果显示以 3c 亚型为主(67.3%),其次为 3f、3e 和 3i 亚型,分别为 14.3%、9.7%和 4.0%,其他亚型为 1.1%^[34]。

美洲的 HEV 抗体血清阳性率很高,但临床重要病理报告却不常见,可能反映了无症状的高比例和对 HEV 认知的局限性,与欧洲相同的是,美洲检出最多的同样是 HEV-3,过去 17 年报告的病例中,在阿根廷检测到 3a 和 3b 亚型,在巴西检测到 3b 和 3i 亚型,HEV-1 仅在委内瑞拉和乌拉圭检出^[35]。

在亚洲,主要流行 HEV-3 和 HEV-4,不同国家显示出不同的流行差异。在一项对日本人群 HEV 感染的流行情况研究中,以 2002-2007 年

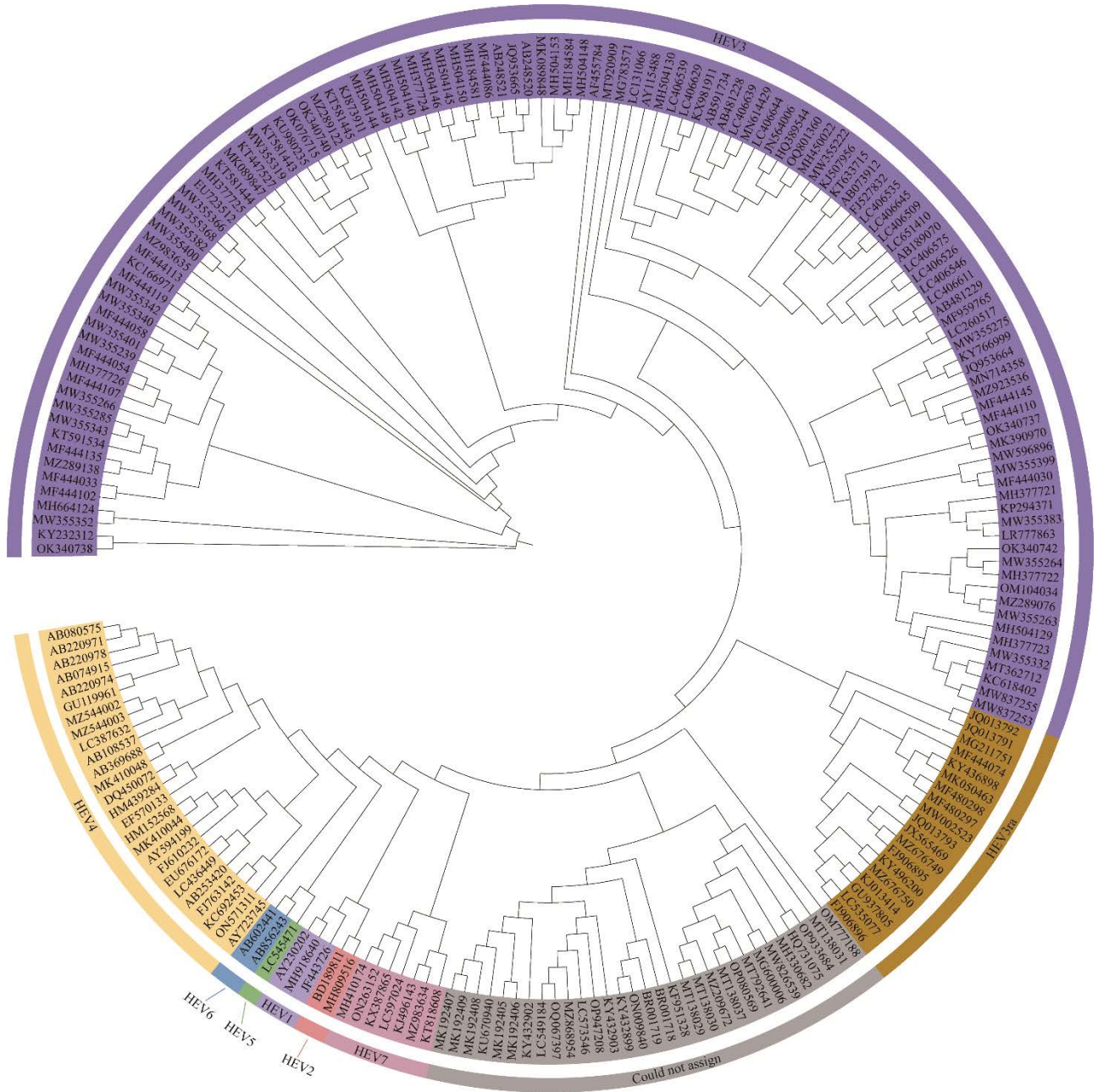


图 2 基于全基因组核苷酸序列的戊型肝炎病毒系统发育分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of hepatitis E virus based on the whole genome nucleotide sequence.

30 个县的 22 027 人为研究对象收集血清样本，通过巢式 RT-PCR 检测出 HEV RNA 均为 HEV-3^[36]。对 1997–2022 年中国 HEV 流行率的 Meta 分析表明，我国 HEV 优势基因型为 HEV-4，包括 4a、4d、4f 和 4h 亚型^[37]。

HEV 在全球各地流行，但不同时间以及地区 HEV 基因型和亚型的分布和流行具有差异。因此加强对 HEV 的分子流行病学研究可以有效掌握其流行情况以及分布特点，为制定准确有效的 HEV 防控策略提供帮助。

3 进化机制

对 HEV 分离株的基因组序列的比较分析揭示了它们之间存在广泛的遗传多样性, 这些遗传差异可能是受到宿主免疫和选择压力(如疫苗免疫和抗病毒药物治疗)的影响。为了更好地适应生存环境和从宿主免疫系统逃逸, HEV 在这些压力下不断进化。尽管 HEV 毒株具有高度多样性和异质性, 但仅存在一种血清型的 HEV, 这可能与衣壳蛋白氨基酸序列的高度保守有关。目前的研究表明, HEV 进化的影响因素主要是同义密码子使用模式、突变和重组。

3.1 同义密码子使用模式

除色氨酸和蛋氨酸具有单个密码子外, 其他氨基酸都具有多个编码密码子, 这些密码子被定义为同义密码子。同义密码子使用模式中的突变偏差或自然选择是决定病毒进化变化的重要因素, 这些变化使它们能够增强病毒存活率和病毒对宿主的适应性。研究发现, 通过进化选择(包括自然选择)对 HEV-1 进行密码子选择的偏好通常强于来自人类或猪的 HEV-3 和 HEV-4, 因此由同义突变引起中性进化的 HEV-1 能够通过强大的自然选择维持其稳定的遗传特征, 而 HEV-3 和 HEV-4 的多种同义密码子使用模式是进化的标志, 使其能够更好地适应不同宿主^[38]。深入研究表明, HEV ORF1 中具有稳定使用模式的密码子有助于维持感染, 而在 ORF3 中具有不同使用模式的密码子有助于跨物种感染并扩大宿主范围^[39]。对于 ORF4 的同义密码子使用模式分析也表明, ORF4 中的同义密码子使用是一个进化过程, 反映了突变和选择力的动态过程以调整其密码子的使用从而适应不同的宿主和条件^[24]。对同义密码子的使用模式研究证实了 HEV 基因组进化主要基于突变压力, 而不是由地理或宿主因素驱动的。

3.2 氨基酸突变

病毒基因组的突变是进化的重要方式之一, 准确发现病毒突变位点及影响对于了解病毒的进化十分重要。一方面, 宿主免疫应答压力下 HEV 发生突变从而有助于逃避宿主免疫反应。病毒衣壳蛋白具有免疫原性, 其序列发生少许变化也可能导致病毒抗原中和表位发生突变, 从而影响病毒的免疫反应性。Zhang 等研究发现 HEV ORF2 编码蛋白中的 Leu477 和 Leu613 在 HEV 抗原中和表位的形成中至关重要, 使其发生突变导致 HEV 免疫反应性降低^[40]。然而, 衣壳蛋白中的 F51L、T59A 和 S390L 突变却导致 HEV 毒力衰减, 可能是由于 F51L 和 T59A 突变影响病毒基因组 RNA 包装, 而 S390L 突变改变抗原中和表位的结构从而阻止病毒与宿主细胞受体之间的相互作用^[41]。

另一方面, 抗病毒药物治疗的选择压力也会导致 HEV 发生突变, 使其获得耐药性。利巴韦林可用于治疗慢性戊型肝炎, 然而研究表明利巴韦林治疗可能导致 HEV 突变, 导致病毒对利巴韦林敏感性改变, 产生耐药性; 利巴韦林耐药性与 HEV RdRp 中的 Y1320H、K1383N 和 G1634R 突变有关, Y1320H 和 G1634R 突变以及高变区插入使 HEV 的复制增加, 而 K1383N 突变抑制了病毒复制, 增加了对利巴韦林的敏感性^[42]。

3.3 基因重组

重组是一般病毒进化的重要驱动力, 但在 HEV 中重组现象却鲜有报道, 最早报道的 HEV 毒株重组是在 2005 年, 研究鉴定了中国 D 和尼泊尔 TK15 两种重组 HEV 毒株^[43]。随后在 HEV 重组的深入研究中, 研究人员使用重组检测程序分析发现, HEV 存在双重重组和四重组事件^[44-45], 其中重组猪源分离株 swCH31 发生了两次重组, 第一处重组的主要亲本株

(CHN-XJ-SW13)和次要亲本株(E067-SIJ05C)分别为从中国新疆的猪中分离和中国上海的日本患者中分离出来的 HEV-4 毒株, 为基因型内重组; 第二处重组为基因型间重组, 发生在以毒株 E067-SIJ05C 为主要亲本, 以日本急性肝炎患者分离的 HEV-3 毒株 JJT-Kan 为次要亲本之间^[44]。来自英国的 HEV-3 毒株(HEV_32_Manchester_301214)经历了 4 次重组事件, 主要亲本株(HEPAC-44)是从患者血液中分离出来的法国 HEV-3 毒株, 而次要亲本株(HE-JA15-1335)是从本土人血清中分离出来的日本 HEV-1 毒株^[45]。HEV 的重组可能导致其毒力以及宿主发生变化, 也可能导致现有的防控效果失效。

4 疫苗

由于缺乏 HEV 体外培养技术, HEV 灭活疫苗尚未成功研制^[46]。因此目前对于疫苗的研究主要集中于利用基因工程表达不同长度 ORF2 截短蛋白, 例如以 HEV-3 179 截短的 ORF517 编码蛋白在大肠杆菌中表达^[47]; 由昆虫细胞表达的 53 kDa 截短 HEV 衣壳蛋白^[48]; 在毕赤酵母中表达 HEV-1 ORF2 的 112–608 氨基酸残基区域^[49]。这些蛋白可以自组装成 HEV 病毒样颗粒(virus-like particle, VLP), 并且动物免疫实验结果显示出高水平抗体滴度, 具有良好的免疫原性, 可用于未来 HEV 疫苗的开发。目前唯一上市的 HEV 疫苗为我国的 HEV 疫苗(益可宁), 由厦门大学和万泰生物共同研发制造, 于 2012 年在中国上市。益可宁第 III 期临床试验显示, 接受益可宁的参与者在第三剂后 12 个月内均未发生戊型肝炎感染, 而对照组中发现了 15 例病例, 表明疫苗效力为 100%^[50]。另一项研究证明益可宁不仅在 16–65 岁的健康成年人中是安全且高效的, 在 65 岁以上的老年人中同样耐受性良好^[51]。目前, 益可宁在预防

HEV 方面十分有效, 但是随着 HEV 的不断进化, 需要加强对戊型肝炎疫苗的研究以及进一步评估 HEV 疫苗在控制戊型肝炎中的作用。

5 展望

民以食为天, 食以安为先, 食品安全关乎每个人的生命健康。病毒污染引起的食品安全问题不可忽视, 需对食品中病毒的污染监测、结构功能以及遗传进化进行深入研究, 为食源性病毒的有效防控以及疫苗的制备提供理论基础。综上所述, 虽然目前的疫苗预防能有效干预 HEV 的传播, 抗病毒药物治疗也能有效抑制病毒的复制, 但是 HEV 在宿主免疫应答和抗病毒药物的选择压力下也在不断进化以提升生存能力, 产生耐药性或导致严重疾病的发生。未来需要积累更多病毒序列, 了解 HEV 的自发突变率和进化机制, 并且加强对病毒体外培养体系的研究, 开发出更多抗病毒治疗药物和疫苗, 从而拥有更多、更有效的手段对抗 HEV 的入侵。

参考文献

- [1] ELBAHRAWY A, ATALLA H, ALBORAIE M, ALWASSIEF A, MADIAN AL, EL FAYOUMIE M, TABLL AA, ALY HH. Recent advances in protective vaccines against hepatitis viruses: a narrative review[J]. *Viruses*, 2023, 15(1): 214.
- [2] TAKAKUSAGI S, KAKIZAKI S, TAKAGI H. The diagnosis, pathophysiology, and treatment of chronic hepatitis E virus infection: a condition affecting immunocompromised patients[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(5): 1303.
- [3] WENTER C, BORENA W, OBERHUBER G, GRAZIADEI I. Acute liver failure in immunocompetent patients infected with hepatitis E[J]. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 2019, 131(17/18): 442-445.
- [4] World Health Organization. Hepatitis E[EB/OL]. [2023-06-19]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>.
- [5] VISWANATHAN R. Epidemiology[J]. *Indian Journal*

- of Medical Research, 1957, 45: 1-29.
- [6] BALAYAN MS, ANDJAPARIDZE AG, SAVINSKAYA SS, KETILADZE ES, BRAGINSKY DM, SAVINOV AP, POLESCHUK VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted *via* the fecal-oral route[J]. *Intervirology*, 1983, 20(1): 23-31.
- [7] 国家疾病预防控制中心. 2021 年全国法定传染病疫情概况[EB/OL]. [2023-06-20]. https://www.ndcpa.gov.cn/jbkzxx/c100031/common/content/content_1651466519851110400.html.
- [8] WANG B, YANG XL. Chirohepevirus from bats: insights into hepatitis E virus diversity and evolution[J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 905.
- [9] SRIDHAR S, YIP CCY, WU SS, CHEW NFS, LEUNG KH, CHAN JFW, ZHAO PS, CHAN WM, POON RWS, TSOI HW, CAI JP, CHAN HSY, LEUNG AWS, TSE CWS, ZEE JST, TSANG OTY, CHENG VCC, LAU SKP, WOO PCY, TSANG DNC, et al. Transmission of rat hepatitis E virus infection to humans in Hong Kong: a clinical and epidemiological analysis[J]. *Hepatology*, 2021, 73(1): 10-22.
- [10] LI PF, JI YP, LI YL, MA ZR, PAN QW. Estimating the global prevalence of hepatitis E virus in swine and pork products[J]. *One Health*, 2022, 14: 100362.
- [11] WANG H, KJELLBERG I, SIKORA P, RYDBERG H, LINDH M, BERGSTEDT O, NORDER H. Hepatitis E virus genotype 3 strains and a plethora of other viruses detected in raw and still in tap water[J]. *Water Research*, 2020, 168: 115141.
- [12] TAM AW, SMITH MM, GUERRA ME, HUANG CC, BRADLEY DW, FRY KE, REYES GR. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome[J]. *Virology*, 1991, 185(1): 120-131.
- [13] WANG B, MENG XJ. Structural and molecular biology of hepatitis E virus[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 1907-1916.
- [14] CANCELA F, NOCETI O, ARBIZA J, MIRAZO S. Structural aspects of hepatitis E virus[J]. *Archives of Virology*, 2022, 167(12): 2457-2481.
- [15] LeDESMA R, HELLER B, BISWAS A, MAYA S, GILI S, HIGGINS J, PLOSS A. Structural features stabilized by divalent cation coordination within hepatitis E virus ORF1 are critical for viral replication[J]. *eLife*, 2023, 12: e80529.
- [16] YIN X, YING D, LHOMME S, TANG ZM, WALKER CM, XIA NS, ZHENG ZZ, FENG ZD. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(18): 4773-4778.
- [17] ROBINSON RA, BURGESS WH, EMERSON SU, LEIBOWITZ RS, SOSNOVTSEVA SA, TSAREV S, PURCELL RH. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells[J]. *Protein Expression and Purification*, 1998, 12(1): 75-84.
- [18] SAYED IM, KARAM-ALLAH RAMADAN H, HAFEZ MHR, ELKHAWAGA AA, EL-MOKHTAR MA. Hepatitis E virus (HEV) open reading frame 2: role in pathogenesis and diagnosis in HEV infections[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2022, 32(6): e2401.
- [19] ZHOU ZB, XIE YQ, WU CY, NAN YC. The hepatitis E virus open reading frame 2 protein: beyond viral capsid[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 739124.
- [20] YANG YL, NAN YC. Open reading frame 3 protein of hepatitis E virus: multi-function protein with endless potential[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2021, 27(20): 2458-2473.
- [21] EMERSON SU, NGUYEN H, TORIAN U, PURCELL RH. ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells *in vitro*[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(21): 10457-10464.
- [22] SARI G, ZHU JT, AMBARDEKAR C, YIN X, BOONSTRA A, FENG ZD, VANWOLLEGHEM T. The viral ORF3 protein is required for hepatitis E virus apical release and efficient growth in polarized hepatocytes and humanized mice[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(23): e0058521.
- [23] SHAFAT Z, AHMED A, PARVEZ MK, ISLAM A, PARVEEN S. Intrinsically disordered regions in the rodent hepevirus proteome[J]. *Bioinformatics*, 2022, 18(2): 111-118.
- [24] SHAFAT Z, AHMED A, PARVEZ MK, PARVEEN S. Analysis of codon usage patterns in open reading frame 4 of hepatitis E viruses[J]. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2022, 11(1): 65.
- [25] PURDY MA, DREXLER JF, MENG XJ, NORDER H, OKAMOTO H, van der POEL WHM, REUTER G, de SOUZA WM, ULRICH RG, SMITH DB. ICTV virus taxonomy profile: hepeviridae 2022[J]. *The Journal of General Virology*, 2022, 103(9): 10.1099/jgv.0.001778.

- [26] THAKUR V, RATHO RK, KUMAR S, SAXENA SK, BORA I, THAKUR P. Viral hepatitis E and chronicity: a growing public health concern[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 577339.
- [27] SMITH DB, IZOPET J, NICOT F, SIMMONDS P, JAMEEL S, MENG XJ, NORDER H, OKAMOTO H, van der POEL WHM, REUTER G, PURDY MA. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species *Orthohepevirus A*)[J]. *The Journal of General Virology*, 2020, 101(7): 692-698.
- [28] PRIMADHARSINI PP, NAGASHIMA S, OKAMOTO H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus[J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 456.
- [29] LI BZ, WAGNER AL, SONG YJ, CHEN XX, LU YH. Distribution and phylogenetics of hepatitis E virus genotype 4 in humans and animals[J]. *Zoonoses and Public Health*, 2022, 69(5): 458-467.
- [30] SANTOS-SILVA S, MORAES DFSD, LÓPEZ-LÓPEZ P, PALMEIRA JD, TORRES RT, SÃO JOSÉ NASCIMENTO M, DASHTI A, CARMENA D, RIVERO-JUAREZ A, MESQUITA JR. Survey of zoonotic diarrheagenic protist and hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) of Portugal[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2023, 13(2): 256.
- [31] TAKAHASHI M, NISHIZONO A, KAWAKAMI M, FUKUI E, ISOGAI E, MATSUOKA H, YAMAMOTO S, MIZUO H, NAGASHIMA S, MURATA K, OKAMOTO H. Identification of hepatitis E virus in wild sika deer in Japan[J]. *Virus Research*, 2022, 308: 198645.
- [32] WU JY, MENG XX, WEI YR, BOLATI H, LAU EHY, YANG XY. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) in feral and farmed wild boars in Xinjiang, Northwest China[J]. *Viruses*, 2022, 15(1): 78.
- [33] ZAHMANOVA G, TAKOVA K, TONOVA V, KOYNARSKI T, LUKOV LL, MINKOV I, PISHMISHEVA M, KOTSEV S, TSACHEV I, BAYMAKOVA M, ANDONOV AP. The re-emergence of hepatitis E virus in Europe and vaccine development[J]. *Viruses*, 2023, 15(7): 1558.
- [34] SCHEMMERER M, WENZEL JJ, STARK K, FABER M. Molecular epidemiology and genotype-specific disease severity of hepatitis E virus infections in Germany, 2010–2019[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 1754-1763.
- [35] PISANO MB, MARTINEZ-WASSAF MG, MIRAZO S, FANTILLI A, ARBIZA J, DEBES JD, RÉ VE. Hepatitis E virus in South America: the current scenario[J]. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 2018, 38(9): 1536-1546.
- [36] TAKAHASHI M, TAMURA K, HOSHINO Y, NAGASHIMA S, YAZAKI Y, MIZUO H, IWAMOTO S, OKAYAMA M, NAKAMURA Y, KAJII E, OKAMOTO H. A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan[J]. *Journal of Medical Virology*, 2010, 82(2): 271-281.
- [37] CAO KX, WU XY, YANG MY, CHEN C, ZHANG XB, JIANG DX, DU YX, CHEN MS, YOU Y, ZHOU WK, QI JX, CHEN DM, YAN R, MIAO ZP, YANG SG. Prevalence of hepatitis E virus in China from 1997 to 2022: a systematic review and meta-analysis[J]. *Frontiers in Public Health*, 2023, 11: 1243408.
- [38] ZHOU JH, LI XR, LAN X, HAN SY, WANG YN, HU YH, PAN QW. The genetic divergences of codon usage shed new lights on transmission of hepatitis E virus from swine to human[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 68: 23-29.
- [39] WANG X, SUN J, ZHENG YY, XIE FQ. Dispersion of synonymous codon usage patterns in hepatitis E virus genomes derived from various hosts[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2022, 62(8): 975-983.
- [40] ZHANG HM, DAI X, SHAN XN, MENG JH. The Leu477 and Leu613 of ORF2-encoded protein are critical in forming neutralization antigenic epitope of hepatitis E virus genotype 4[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2008, 5(6): 447-456.
- [41] CÓRDOBA L, HUANG YW, OPRIESSNIG T, HARRAL KK, BEACH NM, FINKIELSTEIN CV, EMERSON SU, MENG XJ. Three amino acid mutations (F51L, T59A, and S390L) in the capsid protein of the hepatitis E virus collectively contribute to virus attenuation[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(11): 5338-5349.
- [42] WANG B, MAHSOUB HM, LI W, HEFFRON CL, TIAN DB, HASSEBROEK AM, LeROITH T, MENG XJ. Ribavirin treatment failure-associated mutation, Y1320H, in the RNA-dependent RNA polymerase of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) enhances virus replication in a rabbit HEV infection model[J]. *mBio*, 2023, 14(2): e0337222.
- [43] van CUYCK H, FAN J, ROBERTSON DL, ROQUES P. Evidence of recombination between divergent hepatitis E viruses[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(14): 9306-9314.
- [44] WANG H, ZHANG W, NI B, SHEN HX, SONG YY, WANG XC, SHAO SH, HUA XG, CUI L.

- Recombination analysis reveals a double recombination event in hepatitis E virus[J]. *Virology Journal*, 2010, 7: 129.
- [45] SHEN H, LIU SN, DING M, GU HX, CHANG M, LI YS, WANG H, BAI XW, SHEN HX. A quadruple recombination event discovered in hepatitis E virus[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(12): 3405-3408.
- [46] MEISTER TL, BRUENING J, TODT D, STEINMANN E. Cell culture systems for the study of hepatitis E virus[J]. *Antiviral Research*, 2019, 163: 34-49.
- [47] CAO YF, ZHOU YF, ZHAO DY, CHANG JL, TANG JG, CHANG DY, ZHANG XM, WANG XP. Expression and immunogenicity of hepatitis E virus-like particles based on recombinant truncated ORF2 capsid protein[J]. *Protein Expression and Purification*, 2023, 203: 106214.
- [48] ZHANG MD, EMERSON SU, NGUYEN H, ENGLE RE, GOVINDARAJAN S, GERIN JL, PURCELL RH. 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(5/6): 853-857.
- [49] GUPTA J, KAUL S, SRIVASTAVA A, KAUSHIK N, GHOSH S, SHARMA C, BATRA G, BANERJEE M, SHALIMAR, NAYAK B, RANJITH-KUMAR CT, SURJIT M. Expression, purification and characterization of the hepatitis E virus like-particles in the *Pichia pastoris*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 141.
- [50] ZHU FC, ZHANG J, ZHANG XF, ZHOU C, WANG ZZ, HUANG SJ, WANG H, YANG CL, JIANG HM, CAI JP, WANG YJ, AI X, HU YM, TANG Q, YAO X, YAN Q, XIAN YL, WU T, LI YM, MIAO J, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *The Lancet*, 2010, 376(9744): 895-902.
- [51] YU XY, CHEN ZP, WANG SY, PAN HR, WANG ZF, ZHANG QF, SHEN LZ, ZHENG XP, YAN CF, LU M, CHEN B, ZHENG Y, ZHANG J, LV HK, HUANG SJ. Safety and immunogenicity of hepatitis E vaccine in elderly people older than 65 years[J]. *Vaccine*, 2019, 37(32): 4581-4586.