

· 实验室研究 ·

海南省消除疟疾前期间日疟原虫环孢子蛋白多态性研究及其分子进化关系分析

李雨春 王善青 胡锡敏 王光泽 蒙锋 曾文 陈春香 童重锦

【摘要】 目的 分析海南省消除疟疾前期间日疟原虫环孢子蛋白(CSP)基因型。方法采用PCR扩增特异性目的片段,基因测序,序列比对及进化树构建等方法。结果 19份本地感染间日疟样本中18份为VK210,1份为VK247,VK210为优势亚型。与参考株相比,VK210又分为7个亚型,VK247仅有1个亚型。VK210各亚型中GDRAD(A)GQPA重复序列均存在不同数量的D或A点突变,属于高度突变区域;其余重复序列(GNGAGGQAA和GGNA)大多数仅发生基因数量的增减变化。海南省疟疾控制阶段和消除阶段间日疟VK210和VK247基因型构成比的差异无统计学意义($P>0.05$),进化树分析显示两基因型分别属于不同的进化簇。结论 海南省消除疟疾前期仍存在两种基因型间日疟。与控制阶段相比,种型间构成比差异不显著,间日疟虫株消失结果相一致。

【关键词】 间日疟原虫;环孢子蛋白;基因多态性

Study on the polymorphism in circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* before the completion on elimination program of malaria, in Hainan province Li Yuchun, Wang Shanqing, Hu Ximin, Wang Guangze, Meng Feng, Zeng Wen, Chen Chunxiang, Tong Chongjin. Hainan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Haikou 570203, China

Corresponding authors: Wang Shanqing, Email: wangsqkevin@hotmail.com; Hu Ximin, Email: huximin372@sohu.com

This work was supported by grants from the Hainan Provincial Natural Science Foundation (No. 310174 and No. 813251).

【Abstract】 Objective To explore the polymorphism in circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* before malaria was eliminated in Hainan island. **Methods** PCR amplification, sequencing, and alignment methodologies were conducted and phylogenetic tree constructed. **Results** From all the cases, 19 of them belonged to two types, with 18 as VK210 type and 1 as VK247 type. VK210 type could be divided into seven kinds of subtypes but VK247 had only one type. Ratio of tropical strain with temperate stain in VK210 type was explored between the two stages: control or elimination. Phylogenetic tree was constructed by amino acid sequencings which clearly manifested that VK210 type and VK247 type belonged to different clusters. **Conclusion** Compared the proportion of two types in the control stage, there was no significant difference seen in the stage of elimination.

【Key words】 *Plasmodium vivax*; Circumsporozoite protein; Polymorphism

间日疟原虫环孢子蛋白(CSP)是虫体外膜表面重要标示蛋白之一,由两侧非重复区和中央重复区组成。目前根据该蛋白中央重复区氨基酸组成不同,将CSP分为VK210(PV1)型(GDRAA/DGQPA)^[1]、VK247(PV2)型(ANGAGNQP)^[2]和间日疟相似型(PV-like)型(APGANQEGGAA)^[3]。研究表明,前两

型在全球范围内广泛分布^[4],而间日疟相似型(PV-like)与吼猴疟原虫子孢子表面蛋白氨基酸序列相似,其在全球分布尚有争议^[5]。目前多个国家和地区已对当地流行的CSP进行动态监测和分子水平研究^[6]。海南省主要流行恶性疟和间日疟,曾是我国疟疾高发区域。1999年王光泽等^[7]对海南省疟疾流行区研究表明存在2种类型的CSP。近年来海南省疟疾疫情得到有效控制,于2010年7月正式开展消除疟疾工作,发病率总体呈现大幅下降趋势,但恶性疟实现基本消除后,间日疟发病数占报告病例比例呈现逐年上升趋势。为此在海南省消除疟疾前期

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.03.019

基金项目: 海南省自然科学基金(310174, 813251)

作者单位: 570203 海口, 海南省疾病预防控制中心

通信作者: 王善青, Email: wangsqkevin@hotmail.com; 胡锡敏, Email: huximin372@sohu.com

本研究分析本地间日疟感染病例的CSP基因型,并对控制阶段间日疟种型构成进行回顾性研究,为消除疟疾前期有效应对输入性疟疾和本地疟疾分子水平关联性研究提供借鉴。

材料与与方法

1. 样本采集:海南省自2009年后仅发现本地感染的间日疟病例,且呈散发状态。本地疟疾病例主要分散于海南省中南部地区。病例来自2009—2012年海南省传染病疫情网报系统,并采集血液样本,同时收集病例个案调查表。

2. DNA提取及CSP基因PCR扩增:采用Qiagen Mini Blood DNA提取试剂盒提取血样DNA,即80 μl全血,180 μl ATL缓冲液,20 μl蛋白酶K,56 °C孵育1 h,随后按照试剂盒说明提取DNA,最后加入80 μl TE缓冲液-20 °C保存。采用特异性引物CSP-F(5'-GAG CCC TAC TAC TTG ATG GTC C-3')和CSP-R(5'-TCT TTC ACA GAC TTT TCA TTT GGG-3')对间日疟CSP基因进行扩增^[8],20 μl扩增体系:DNA模板5 μl,1 × reaction buffer,2.5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L of each dNTP,10 pmol引物和1 U *pfu* DNA polymerase (Tiangen, Beijing)。反应条件:95 °C变性5 min,35个循环95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 90 s;72 °C延伸5 min,PCR反应产物1.5%琼脂糖电泳检测。

3. 序列分析及构建进化树:Expasy Molecular Biology(<http://us.expasy.org/>)用来将核酸序列翻译成蛋白序列,WBioEdit version 7.0软件(www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html),CLUSTAL X and EditSeq 3.88(DNASTAR, Madison, WI)用来序列比对和分析。Mega 3.1软件用来进行遗传进化树构建和遗传进化分析。采用EpiInfo进行统计学检验。

结 果

1. 样本分布:2009—2012年累计收集本地病例间日疟病例标本20份,其中有效扩增和测序19份。分别来自海南省疟疾流行5个市县,保亭9份(47.3%)、白沙6份(31.6%)、三亚2份(10.5%)和澄迈、儋州各1份(各5.3%)。病例主要集中在海南省中南部地区,占全部网上报告病例的89.4%;东西北部地区相对较少,仅占11%。流行病学调查显示病例的空间和时间分布无聚集性,呈散发状态。

2. 间日疟CSP基因序列分析:19份本地感染间日疟病例DNA样本氨基酸序列分析表明,18份为

VK210型(PV1型),1份为VK247(PV2型),VK210为优势型。VK210型又划分为7个亚型(VK210HN1~HN6亚型和Sub-K1亚型),VK247型仅有1个亚型(表1)。分析各基因亚型的重复序列突变位点发现,VK210型各亚型中GDRAD(A)GQPA重复序列均存在不同数量的D或A点突变;其余重复序列(GNGAGGQAA和GGNA)大多数仅发生不同数量的增减变化。总体而言,VK210型间日疟GD□A□GQPA重复序列属于高度突变区域。

表1 海南省消除疟疾阶段VK210和VK247型间日疟氨基酸重复序列重复次数

亚型	GDRAA/DGQPA	GNGAGGQAA	GGNA	ANKKAEDA
VK210 ^a	8(9)	1	3	0
HN1	8(9)	1	5	0
HN2	8(9)	1	4	0
HN3 ^b	3(1)	1	2	0
HN4 ^c	5(9)	1(1)	4	0
Sub-K1(3)	2(10)	1	4	1
HN5	8(9)	1	2	1
HN6 ^d	5(7)	2(2) ^e	2	1

	ANGAGNQ/HPG	GAGGQAA	GGNA	ANKKAGDA
VK247 ^a	19	1	1	1
HN1	15(1)	1	1	1

注:括号内数据为变异位点的个数;^a参考序列VK210:AAA29507和VK247:AAA29506;^b该亚型产生一个新位点有义突变(A→G),氨基酸序列中的位点精氨酸(R)→甘氨酸(G)的转换,产生1个序列为GDGADGQPA,该突变序列又发生一个新的突变(G→T),氨基酸序列位点甘氨酸(G)→缬氨酸(V)的转换,又产生1个序列为GDGAAVQPA的序列;^c该亚型产生一个新位点有义突变(GA/C→AA),氨基酸序列位点天冬氨酸(D)或丙氨酸(A)→天冬酰胺(N)的转换产生4个序列为GDGANGQPA氨基酸重复序列;^d该序列产生2个新位点有义突变(A→G和G→C),产生2个新变异的氨基酸序列精氨酸(R)→甘氨酸(G)和脯氨酸(P)→丙氨酸(A),各GDR/GAAGQAA;^e该重复序新产生同一个有义突变(C→G),氨基酸序列位点发生丙氨酸(A)→脯氨酸(P)的转换,产生2个新类型的重复序列GNGAGGQPA

3. 不同防治阶段疟原虫CSP基因构成比差异:在20世纪90年代后期,我国学者依据CSP基因是否含有重复12肽(GGNAANKKAEDA),将VK210型又细分为热带株和温带株。为此本研究也依据该分类法将本文的VK210种型中HN1~HN3分为热带株,VK210-HN4~HN6及Sub-K1分为温带株(图1)。同时为比较海南省不同疟疾防治阶段(控制阶段和消除阶段)、不同类型间日疟CSP基因种型构成间的差异,本研究采用精确χ²检验(Fisher test),表明两阶段中间日疟构成比的差异无统计学意义,表明近10年海南省疟疾疫情显著下降的过程中两种型间日疟消失程度未发生统计学意义的变化(表2)。

讨 论

2010年海南省正式实施消除疟疾行动计划。此后省内未再发现本地感染的恶性疟报告病例,主要为间日疟^[9],分布在南部地区,中北部地区病例较少。本文样本来自中南部地区(保亭、白沙、三亚等)报告病例占全省病例的90%以上。其结果与王光泽等^[10]、刘莹等^[11]对海南省近年疟疾疫情时空分布分析结果一致。在消除疟疾阶段,海南省本地间日疟主要集中在中南部地区,推断消除进程可能是自北向南逐渐推进,散发病例主要集中在南部地区。

CSP基因作为分子标示基因,普遍用于间日疟原虫流行的分子水平监测。本研究发现在消除疟疾阶段,海南省主要流行的两种类型间日疟原虫仍以VK210型(PV-I)为主。王光泽等^[7]1999年调查发现海南省以VK210型的虫株为主,兼有VK247型。为进一步了解疟疾消除阶段和控制阶段2种间日疟基因型构成的差异,对2次调查发现的2种结果进行统计学检验,结果显示两者间的差异无统计学意义。表明在消除阶段和控制阶段,2种类型的间日疟虫株消失结果一致,可能与全省统一的抗疟策略和方法有关。

另外,依据我国学者分类方法,将VK210虫株细分为热带株和温带株^[6]。本研究发现在消除疟疾阶段,海南省仍存在热带株和温带株等不同株系。为了解不同等位基因型的虫株间的差异,还对海南省流行的CSP基因不同基因型进行分子遗传进化分析,结果显示该方法可以较好的区分不同类型间日疟原虫和绝大部分等位基因型,但VK210-HN1和HN2同为一簇,2种基因型氨基酸构成分析发现,仅相差1个四肽(GGNA),推测可能是由于两者基因型相似性极大而不能严格区分所致。

参 考 文 献

- [1] Anot DE, Barnwell JW, Tam JP, et al. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope [J]. *Science*, 1985, 230 (4727): 815-818.
- [2] Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax* [J]. *Science*, 1989, 245(4921): 973-976.
- [3] Goldman IF, Qari SH, Millet PG, et al. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malaria parasite [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1993, 57(1): 177-180.
- [4] Cochrane AH, Nardin EH, de Arruda M, et al. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, 43(5): 446-451.
- [5] Gopinath R, Wongsrichanalai C, Cordon-Rosales C, et al. Failure to detect a *Plasmodium vivax*-like malaria parasite in globally collected blood samples [J]. *J Infect Dis*, 1994, 170(6): 1630-1633.
- [6] Huang TY, Huang YM, Wang XL, et al. Investigation on genotype constitution of different *Plasmodium vivax* isolates and its geographical distribution in China [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2001, 19(5): 260-264. (in Chinese)
黄天谊, 黄亚铭, 王小力, 等. 我国间日疟原虫基因型种群结构及其地理分布 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2001, 19(5): 260-264.
- [7] Wang GZ, Hua D, Wang SQ, et al. Identification of circumsporozoite protein of genes of *Plasmodium vivax* and distribution of geographic in Hainan province [J]. *Chin J Parasit Dis Con*, 2001, 14(3): 174-175. (in Chinese)
王光泽, 华德, 王善青, 等. 海南省间日疟原虫环子孢子蛋白基因分型及地理分布 [J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 2001, 14(3): 174-175.
- [8] Yien-Kyoung C, Kyung-Mi C, Mi-Hyun P. Rapid dissemination of newly introduced *Plasmodium vivax* genotypes in South Korea [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 82(3): 426-432.
- [9] Zhou SS, Wang Y, Li Y. Malaria Situation in the People's Republic of China in 2010 [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2011, 29(6): 401-402. (in Chinese)
周水森, 王漪, 李雨. 2010年全国疟疾疫情分析 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2011, 29(6): 401-402.
- [10] Wang GZ, Wang SQ, Hu XM, et al. Analysis of malaria epidemic situation in Hainan province, 2010 [J]. *Chin J Schisto Control*, 2012, 24(3): 369-370. (in Chinese)
王光泽, 王善青, 胡锡敏, 等. 2010年海南省疟疾疫情分析 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2012, 24(3): 369-370.
- [11] Liu Y, Wang GZ, Hu XM, et al. Status of malaria prevalence in Hainan province from 2006 to 2010 [J]. *Chin Trop Med*, 2012, 12(2): 144-145. (in Chinese)
刘莹, 王光泽, 胡锡敏, 等. 海南省2006—2010年疟疾疫情分析 [J]. *中国热带医学*, 2012, 12(2): 144-145.

(收稿日期: 2013-09-09)

(本文编辑: 张林东)