

# 恶性疟原虫 AMA-1 基因多态性研究进展

周银发<sup>1</sup>, 张山鹰<sup>2</sup>

**摘要:**疟原虫裂殖子顶端膜抗原 1(AMA-1)在裂殖子晚期破裂前大量合成抗原物质, 在裂殖子黏附、入侵红细胞过程中起到重要作用。近期的研究主要通过对其进行分子生物学及免疫学进行的研究, 表明 AMA-1 可作为疟原虫的重要疫苗候选抗原之一。本文介绍恶性疟原虫 AMA-1 的分子结构、基因多态性的研究进展, 着重分析一些有重要功能的区域片段, 基因家族的分类以及造成多态性的原因, 为进一步对 AMA-1 基因多态性研究提供参考。

**关键词:**疟原虫; AMA-1; 基因多态

中图分类号:R382.3

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)02-0187-04

## Advances on research of AMA-1 gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum*

ZHOU Yin-fa<sup>1</sup>, ZHANG Shan-ying<sup>2</sup>

(1. School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China;

2. Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350004, China)

**ABSTRACT:** The apical membrane antigen-1 (AMA-1) is highly expressed in the late schizont stage of the *Plasmodium* and plays an important role in the merozoite adhesion and invasion of erythrocytes. Recent researches for *Plasmodium* were carried on the molecular biology and immunology. These researches show that AMA-1 is a leading malaria vaccine candidate antigen. This article gave a detailed introduction about molecular structure and polymorphism of the *Plasmodium falciparum* AMA-1 genes and emphasisly analysed some important domains of AMA-1 gene, groups of gene families and the reason of polymorphism to provide the reference for the further study of polymorphism of AMA-1 gene.

**KEY WORDS:** *Plasmodium*; AMA-1; gene polymorphism

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. Z0516066)

Corresponding author: Zhang Shan-ying, Email: zsy@fjcdc.com.cn

疟疾是一种重要的虫媒传染病, 广泛流行于热带、亚热带以及温带部分地区。由于抗药性虫株和抗杀虫剂按蚊的出现和蔓延, 传统的控疟方法效果趋降。疫苗可能是有效的方法, 所以疫苗的研发成为控制疟疾的重要策略。裂殖子顶端膜抗原 1(AMA-1)是恶性疟原虫的重要疫苗候选抗原之一, 在入裂殖子侵红细胞过程中起着重要作用<sup>[1]</sup>。

## 1 AMA-1 的分子结构及其作用

恶性疟原虫 AMA-1 基因全长大约有 1 701 bp, 编码约 600 个氨基酸<sup>[2]</sup>。AMA-1 在裂殖子晚期破裂前大量合成, 最早是出现于裂殖体的微线体

和棒状体的顶端复合物上, 随着裂殖体的破裂, 并非所有的 AMA-1 都迁移到裂殖子表面, 而是一部份 AMA-1 蛋白酶降解加工进而迁移到裂殖子表面, 另一部分未加工的 AMA-1 仍处于顶端复合物中<sup>[3]</sup>。AMA-1 这部分的酶解加工可能与裂殖体破裂和裂殖子稳定性有关。虽然 AMA-1 在疟原虫入侵人类细胞中起到重要作用, 但却没有在疟原虫入侵后形成的环状体中发现它, 提示有可能 AMA-1 只是作为一种类似信号肽的作用<sup>[4]</sup>。AMA-1 可能是疟原虫侵入红细胞时与红细胞膜结合的配体蛋白结合<sup>[5]</sup>。

AMA-1 蛋白是一个 83KD 的完整跨膜蛋白, 含有两个疏水区域, 一个是由胞质区域靠近 C-末端的 55 个氨基酸组成; 第二个是由靠近 N-末端的疏水区域, 可能有类似信号肽的作用。AMA-1 由 3 个区域组成, 分别是由 21 个疏水氨基酸残基组成的跨膜

福建省自然科学基金计划项目(No. Z0516066)资助

通讯作者:张山鹰, Email: zsy@fjcdc.com.cn

作者单位:1. 福建医科大学公共卫生学院, 福州 350004

2. 福建省疾病预防控制中心, 福州 350001

区、胞膜内的 55 个氨基酸残基构成的胞内区和处于 N 末端到跨膜区之间的胞外区(546 个氨基酸残基)组成的<sup>[6]</sup>。

恶性疟原虫的 AMA-1 蛋白,在胞外区含有 17 个相对保守的半胱氨酸残基,除了最 N 端的那个半胱氨酸残基外,其余的 16 个形成了 8 对分子内的二硫键,这 8 个二硫键对 AMA-1 蛋白的三维结构以及因其产生的特异性免疫保护反应起到重要作用。而且基于这些二硫键可将胞外功能区分为 I、II 和 III 三个次级的功能区,分别含有 3 对,2 对和 3 对二硫键<sup>[7]</sup>。

3 个区域均是抑制性抗体的目标区域,所以外功能区的多态性对疫苗抗原的组成有很大的影响。有很多研究都针对该区域进行分析,其中很多研究都表明在外功能区甚至 AMA-1 全长中 I 区是最具有多态性的,而 II 区就相对比较保守一点<sup>[8-9]</sup>,但也有研究表示在 II 区具有最多的氨基酸替代,表明 II 区可能是最具多态性的一个区域<sup>[2]</sup>。虽然只有较少的突变发生在 III 区,但是潜在的多态性也可能造成疟原虫逃脱抗体的作用。3 个区域之间有着相互的作用,这相互作用是否对疫苗的发展有用还需进一步研究。

## 2 AMA-1 基因多态性研究

**2.1 B T 细胞抗原表位多态性** B T 细胞抗原表位在 AMA-1 致免疫过程中起到重要作用,其抗原多态性在对疫苗的抗原成分有很大的影响。在 AMA-1 上有 9 个具有致免疫 B T 细胞抗原表位,其中有 5 个 B 细胞抗原表位和 4 个 T 细胞抗原表位,对这些表位均具有多态性,且除了胞质尾区的 571-588 残基上的一个 T 细胞抗原表位外其他均是非同义突变数量多于同义突变<sup>[8]</sup>;Rajesh<sup>[2]</sup>等同样也对印度分离株该 9 个抗原表位中的 8 个分析发现比以往的报告中的结果更具有多态性而且还发现一些新的突变;Chenet<sup>[10]</sup>等在恶性疟原虫秘鲁分离株的两个致免疫的 B T 细胞抗原表位的(259-271)和(279-287)区域内发现在 267 位点(Glu-Gln)和 282 位点(Ile-Lys)有两个均是非同义突变。

**2.2 等位基因家族分类** AMA-1 基因编码的蛋白,它的氨基酸替代呈簇状,聚集在成熟的 AMA-1 的第 1 个和第 8 个半胱氨酸之间(148—337 残基位置)Marshall<sup>[11]</sup>等发现 53 个突变位点中有 24 个(45%)处于该区域,该区域就是所谓的 AMA-1 的高度可变区域(HVR)。HVR 最早是由 Thomas 等提出的位于 AMA-1 基因编码的蛋白质氨基酸 160

—210 区域;Honner 则认为 HVR 是属于外功能 I 区的一大部分,也有认为 HVR 与外功能 I 区只是有重叠部分。HVR 的研究区域逐渐变大,扩大到 138—307 区域<sup>[10]</sup>,到目前属于 148-337 区域<sup>[12]</sup>。

基于 HVR, Marshall<sup>[11]</sup>等采用 PCR-RFLP 方法将 AMA-1 等位基因分为 4 个家族 I、II、III 和 IV;Eisen<sup>[12]</sup>等同样用该方法将恶性疟原虫的 KF1916 分离株消化成两个次级等位基因分别属于 I、II 家族;在对恶性疟原虫的非洲分离株的研究中也只发现有属于前三个家族的等位基因作者认为第四个家族的等位基因并不存在于非洲<sup>[13]</sup>,在秘鲁的分离株中发现 3 个家族<sup>[10]</sup>,在印度分离株中只发现 2 个家族<sup>[14]</sup>。

但是也有对 AMA-1 的完整序列数据分析却不能将等位基因划分成几个家族,认为基因家族分类使用于一些特殊情况如一些本身就已经有明显的分组的等位基因如 MSP-1 和 MSP-2 基因等。因为 PCR-RFLP 方法适用于严格的突变位点,而对于 AMA-1 散在的点突变并不适合<sup>[14]</sup>。Rajesh<sup>[2]</sup>在研究中也发现如果按 Marshall 的等位基因家族分类法,有两个等位基因不属于任何一个家族。因此这种采用 PCR-RFLP 方法对 AMA-1 等位基因进行分类的方法还需要进一步的研究。

**2.3 AMA-1 基因在地域上的差异** 对 AMA-1 基因在地域上的差异的研究可以帮助我们了解虫株的进化衍生,而地域上的差异对于疫苗的研发推广是一种很重要的障碍。

**2.3.1 对亚洲地区进行的研究** 2007 年 Gargs 等对印度的 5 个地区 157 例分离株分析其中有 44 个位点具有多态性产生了 57 种不同的单倍型,只有 31 种是单个拷贝,其中 46 种单倍型是以前没有报道过的,且每个地区存在的单倍型都不一样,在疟疾高流行区域 I 区多态性程度要比低疟区来的高。整个 I 区的 152 个密码子 29 个突变位点中有 17 个位点是三态的,3 个位点是四态的,1 个是五态的,其中 13 个多态位点具有特定区域的多态性<sup>[8]</sup>。2008 年 Rajesh<sup>[2]</sup>等对印度的拉贾斯坦和孟加拉省的 13 例恶性疟原虫分离株序列分析结果与原型等位基因 3D7 和 FC27 比较,发现有 161 个突变位点,其中 131 个是非同义突变;54 个是发生在密码子的第一个碱基,49 个发生在第二个碱基上,58 个发生在第三个碱基上,改变了 AMA-1 蛋白氨基酸从而导致多态性的发生,氨基酸改变数量要比 2001 年 Escalant<sup>[8]</sup>等对印度(德里)的分离株研究发现的 54 个氨基酸改变要多 53 个,并且在 107 个氨基酸改变中

有 32 个位于Ⅱ区,这与 Rajesh 等在 2007 年对间日疟原虫研究发现的结果相似, Gunasekera 也发现在间日疟中有大部分单核苷酸多态位点聚集在Ⅱ区。

Quang<sup>[15]</sup> 等对越南(Bao Loc)的恶性疟原虫分离株进行序列分析,分析的 31 个序列中有 25 个单倍型,大部分单倍型只有一个,有 4 个单倍型两个拷贝,只有一个是一个拷贝,有 37 个多态位点,40 个核苷酸多态位点,有三个多态位点是三态型,只有一个核苷酸多态是由同义突变引起的,在该地区的 AMA-1 基因核苷酸多态性程度要比尼日利亚、泰国和斯里兰卡这些疟疾流行区域要来的高。

单志新等<sup>[16]</sup> 对恶性疟原虫海南(FCC1/HN)株 AMA-1 基因进行序列分析和同源性比较,与其他分离株相比并无长度多态性,与 Thai-Tn 和 HB3 株的同源性较高,而与张龙兴等<sup>[17]</sup> 报道的云南勐捧 CMP1 株差异较大,可能与恶性疟原虫 FCC1/HN 株与 CMP1 株存在地理隔离,彼此独立进化有关。张龙兴等对云南勐捧 CMP1 株序列分析与参照序列比较,有 17 个突变位点引起 15 个密码子的变异,造成 14 个氨基酸的取代。HAN 等<sup>[18]</sup> 在南韩在出现的间日疟原虫分析发现 AMA-1 的两个基因型与中国的基因型相似,推断这些重现的疟疾可能起源于中国或其他亚洲有出现类似该基因型的地区。

**2.3.2 在对非洲以及南美洲人地区的研究:**Chenet 等在对秘鲁亚马逊流域的 139 例分离株研究发现的恶性疟原虫多态在其他南美洲地区均可发现,越早收集的分离株的基因多态性越高,有三个等位基因型 3D7、perul 和 7GB,其中 3D7 出现的频率最高,在全部的 D I 区域中发现有 24 个多态位点,其中只有一个发生同义替代。

Soulama 等<sup>[13]</sup> 在对恶性疟原虫非洲的分离株进行序列分析发现有三个等位基因型(K1、HB3 和 3D7),其中 3D7 的比例在非洲的东西中部存在差异( $P < 0.05$ )。Escalante 等在研究中发现位于非洲的肯亚分离株 AMA-1 基因是最具多态性,其多态位点要比东南亚多 20%,比委瑞内拉多 30%。作者推断造成非洲地区的 AMA-1 多态性程度比其他地区来的高有两个主要原因:一是由于选择压力和地区的种群大小不同;二是由于恶性疟原虫是发源于非洲然后在东南亚衍生,而在南美州则遭遇在衍生殖民化进程中的瓶颈<sup>[8]</sup>。

**2.4 造成 AMA-1 基因多态性的原因** 造成恶性疟原虫 AMA-1 基因多态性原因,认为主要有三种:一是由于自然选择引起;二是由于基因内重组产生的;再则就是由于二者共同的作用下造成。

**2.4.1 由自然选择引起的** 在对 AMA-1 突变位点分析中发现非同义突变率比同义突变率高是自然选择的结果,从而产生基因多态性。张龙兴等<sup>[1]</sup> 对云南勐捧分离株分析发现非同义突变比同义突变率高,且有 14 个密码子的突变均造成氨基酸的取代,一些取代还呈多发趋势反映了恶性疟原虫 AMA-1 在选择压力下的进化现象; Oliveira 等<sup>[19]</sup> 认为非同义的碱基突变引起氨基酸替代的趋势也表明了基因正经历着选择的压力; Escalante 等<sup>[8]</sup> 研究分析发现 AMA-1 的致免疫区域在选择的压力下产生高的多态性; Rajesh 等<sup>[2]</sup> 对恶性疟原虫的印度分离株也发现了  $dN/dS > 1$  认为自然的选择是造成 AMA-1 多态性的主要原因; Chenet 等<sup>[10]</sup> 不仅在(259—271)R1 和(279—287)R2 区域还在其他区域发现多态性位点的突变都是非同义突变居多,他们认为正是由于该基因在特异性免疫反应的选择压力下产生的非同义突变; Umar Faroop 等<sup>[14]</sup> 采用 PCR-RFLP 方法未发现有次一级的等位基因从而无法进行基因家族的分类可能由于多态性存在自然选择的原因; Coley 等<sup>[20]</sup> 也发现免疫反应的选择压力对 AMA-1 分子多态性起到很重要的作用。

**2.4.2 由基因内重组引起的** 基因内重组在 MSP-1 和 MSP-2 中已被认为是产生基因多态性的一个机制,可能也是 AMA-1 基因多态性的一个原因。而重组参数(Rm 与 R)被认为可以用来估计是否有重组的存在。Eisen<sup>[12]</sup> 等采用 PCR-RFLP 方法对巴布亚新几内亚的恶性疟原虫的 KF1916 株分析发现有属于 I 和 II 两个家族的次级等位基因,提示有基因内重组现象的存在。但该发现也仅限于在 HVR 上的严格的位点上进行,然而 Escalante 等<sup>[8]</sup> 用 Rm 与 SSCF 测量方法均未发现有基因内重组的存在。在理论上,当由于基因内重组造成等位基因多态性时,在多态位点之间的基因连锁不平衡程度就会下降;所以当我们用重组参数来估计基因内重组是还要考虑两个连锁不平衡的指数(D' 和 R<sup>2</sup>)<sup>[15]</sup>。因此基因内重组是否是造成 AMA-1 基因多态性的主要原因还需进一步研究分析。

**2.4.3 由二者共同作用引起的** Garg<sup>[8]</sup> 等研究的结果也阐明了 AMA-1 的外功能 I 区的多态性是由于正向自然选择导致的,但是重组参数(Rm 和 R)都很高说明了该区的一些多态位点可能有基因内重组的存在。也对恶性疟原虫越南分离株研究中也发现  $dN/dS > 1$  的同时 Rm 值也比较高。这些都说明了有可能 AMA-1 基因多态性可能就是由于二者共同作用下引起的。

### 3 存在问题

AMA-1 作为一种重要的疟疾疫苗候选抗原, 虽然对它的研究已取得很大的进展, 但是仍有一些许多问题, 例如:

**3.1 在 AMA-1 内的 16 个保守的半胱氨酸残基, 在分子内形成 8 个二硫键对疟原虫的 AMA-1 蛋白的稳定性具有重要的作用。而半胱氨酸残基的多态性对 AMA-1 成为疟疾疫苗候选抗原的影响还需进一步的探讨。**

**3.2 在一些研究中还发现了 AMA-1 在表达过程中由于突变而出现提前终止的现象<sup>[2]</sup>, 这种现象对恶性疟原虫的生活史以及进化的影响, 亦需进一步的分析。**

**3.3 AMA-1 是恶性疟原虫最重要的疫苗候选抗原之一, 但是由于等位基因的多态性而造成一些抗原表位的多态性, 这些多态性阻碍了基于该抗原的疫苗研发, 所以如何去寻找有效的合适的抗原表位来研发广谱而有效的疫苗仍是个关键问题。**

### 参考文献:

- [1] Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, et al. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum* [J]. Mol Cell Biol, 1989, 9(7): 3151-3154.
- [2] Rajesh V, Singamsetti VK, Vidya S, et al. *Plasmodium falciparum*: genetic polymorphism in apical membrane antigen-1 gene from Indian isolates [J]. Exp Parasitol, 2008, 119: 144-151. DOI: 10.1016/j.exppara.2008.01.019
- [3] Narum DL, Thomas AW. Differential localization of fulllength and processed forms of Pf83/ AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites [J]. Mol Biochem Parasitol, 1994, 67(1): 59-68. DOI: 10.1016/0166-6851(94)90096-5
- [4] Fang Z, Yu XB. Research progress on apical membrane antigen of *Plasmodium* merozoite [J]. Chin J Parasit Dis Ctrl, 1999, 12(1): 63-65. (in Chinese)  
方政, 余新炳. 疟原虫裂殖子顶端膜抗原研究进展[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1999, 12(1): 63-65.
- [5] Uriquiza M, Suarez JE, Cardenas C, et al. *Plasmodium falciparum* AMA-1 erythrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erythrocyte binding protein [J]. Vaccine, 2000, 19(4/5): 508-513. DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00185-7
- [6] Nie BY, Zhang LX. *Plasmodium falciparum* AMA-1 polymorphism and its significance in vaccine development [J]. Int J Med Parasit Dis, 2001, 28(4): 156-159. (in Chinese)  
聂本勇, 张龙兴. 恶性疟原虫 AMA-1 多态性及其在疫苗研制中的意义[J]. 国外医学 寄生虫分册, 2001, 28(4): 156-159.
- [7] Howell SA, Withers-martinez C, Kocken CH, et al. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 [J]. J Biol Chem, 2001, 276(33): 31311-31320. DOI: 10.1074/jbc.M103076200
- [8] Escalante AA, Grebert HM, Chaiyaroj SC, et al. Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort Project [J]. Mol Biochem Parasitol, 2001, 113(2): 279-287. DOI: 10.1016/S0166-6851(01)00229-8
- [9] Garg S, Alam MT, Das MK, et al. Sequence diversity and natural selection at domain I of the apical membrane antigen 1 among Indian *Plasmodium falciparum* populations [J]. Malar J, 2007, 6: 154. DOI: 10.1186/1475-2875-6-154
- [10] Chenet SM, Branch OH, Escalante AA, et al. Genetic diversity of vaccine candidate antigens in *Plasmodium falciparum* isolate from the Amazon basin of Peru [J]. Malar J, 2008, 7: 93. DOI: 10.1186/1475-2875-7-93
- [11] Marshall VM, Zhang LX, Robin F, et al. Diversity of the vaccine candidate AMA-1 of *Plasmodium falciparum* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 77(1): 109-113. DOI: 10.1016/0166-6851(96)02583-2
- [12] Eisen DP, Marshall VM, Billman-Jacobe H, et al. A *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1 (AMA-1) gene apparently generated by intragenic recombination [J]. Mol Biochem Parasitol, 1999, 100(2): 243-246. DOI: 10.1016/S0166-6851(99)00054-7
- [13] Soulama I, Bigoga JD, Ndiaye M, et al. Genetic diversity of polymorphic vaccine candidate antigens (apical membrane antigen-1, merozoite surface protein-3 and erythrocyte binding antigen-175) in *Plasmodium falciparum* isolates from Western and Central Africa [J]. Am J Trop Med Hyg, 2011, 84(2): 276-284. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0365
- [14] Farooq U, Malla N, Dubey ML. Genetic polymorphism in MSP-2, AMA-1 and CSP genes in *Plasmodium falciparum* field isolates from north and north-western India [J]. J Vector Borne Dis, 2009, 46(2): 109-116.
- [15] Quang ND, Hoa PT, Tuan MS, et al. Polymorphism at the apical membrane antigen 1 gene (AMA1) of the malaria *Plasmodium falciparum* in a Vietnamese population [J]. Biochem Genet, 2009, 47(5-6): 370-384. DOI: 10.1007/s10528-009-9236-4
- [16] Shan ZX, Yu XB, Li XR, et al. Sequence analysis of AMA-1 and Pfs230 gene of *Plasmodium falciparum* isolate FCC1/HN [J]. Chin J Zoonoses, 2002, 18(5): 19-24. (in Chinese)  
单志新, 余新炳, 李学荣, 等. 恶性疟原虫海南株 AMA-1, pfs230 基因的序列分析[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(5): 19-24.
- [17] Zhang LX, Zhan B, Wang JJ, et al. Sequence analysis of apical membrane antigen I from a *Plasmodium falciparum* isolate collected from Mengpeng Township, Yunnan Province [J]. Chin J Parasitol Parasitic Dis, 1995, 13(3): 203-208. (in Chinese)  
张龙兴, 詹斌, 王聚君, 等. 恶性疟原虫云南勐捧分离株裂殖子顶端膜抗原 1 序列分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1995, 13(3): 203-208.
- [18] Han ET, Park JH, Shin EH, et al. Apical membrane antigen-1 (AMA-1) gene sequences of re-emerging *Plasmodium vivax* in South Korea [J]. Korean J Parasitol, 2002, 40(3): 157-162. DOI: 10.3347/kjp.2002.40.3.157
- [19] Oliveira DA, Udhayakumar V, Bloland P, et al. Genetic conservation of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1 (AMA-1) [J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 76(1-2): 333-336.
- [20] Coley AM, Parisi K, Masciantonio R, et al. The most polymorphic residue on *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1 determines binding of an invasion inhibitory antibody [J]. Infect Immun, 2006, 74(5): 2628-2636. DOI: 10.1128/IAI.74.5.2628-2636.2006