

文章编号:1000-7423(2015)-06-0418-07

【特邀综述】

【编者按】前不久，国人惊喜地获悉我国药学家屠呦呦教授荣获 2015 年诺贝尔生理学或医学奖，这是对她在青蒿素研究早期所起的关键性贡献的认可。这也是对 1 600 多年前我国晋代医家葛洪的伟大实践的承继，是一个“集体发掘中药的成功范例”。多年来，在世界卫生组织的主导下，青蒿素及其复方的推广使用，挽救了成百万疟疾患者的生命。然而，随着青蒿素类药物在多国疟疾流行区的广泛应用，情况发生了变化。本文综述了东南亚一些地区恶性疟原虫对青蒿素类产生抗性的过程与现状，以及国际学界开展的相关研究进展。众所周知，恶性疟原虫对药物产生抗性的速度常常超过人类研发抗疟新药的速度。因此，在本文提出的恶性疟原虫对青蒿素产生抗性的检测技术、分子标记物和抗性虫株的扩散等继续深入研究、监测的同时，我们或许还应该进一步思考：针对消灭疟疾的全球终极目标，继续研发抗疟新药仍是一个极为重要的研究方向。

## 恶性疟原虫对青蒿素产生抗性的研究进展

张逸龙，潘卫庆\*

【提要】青蒿素及其衍生物是我国发明的强效抗疟药，WHO 已推荐以青蒿素为基础的联合用药（ACTs）为治疗恶性疟的一线药物。青蒿素及其衍生物的应用已使全球疟疾流行得到了有效控制，疟疾发病率和死亡率逐年下降。但近年来，在东南亚多个地区陆续报道恶性疟原虫（*Plasmodium falciparum*）对青蒿素类药物产生抗性，并有进一步扩散的趋势，这已严重威胁到全球疟疾防治和消除疟疾计划的实施。本文综述近年来恶性疟原虫对青蒿素产生抗性研究领域的相关研究进展，包括青蒿素抗药性的检测方法、抗性相关的分子标记、抗性虫株的起源及传播流行等。

【关键词】青蒿素；恶性疟原虫；抗药性；起源

中图分类号：R382.312 文献标识码：A

### Research Progress on Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum*

ZHANG Yi-long, PAN Wei-qing\*

(Department of Tropical Infectious Diseases, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】Artemisinin (ART) is a novel and effective antimalarial drug discovered in China. As recommended by the World Health Organization, the ART-based combination therapies (ACTs) have become the first-line drugs for the treatment of falciparum malaria. ART and its derivatives have contributed greatly to the effective control of malaria globally, leading to yearly decrease of malaria morbidity and mortality. However, there have recently been several reports on the resistance of *Plasmodium falciparum* to ART in Southeast Asia. This is deemed a serious threat to the global malaria control programs. In this paper, we reviewed recent research progress on ART resistance to *P. falciparum*, including new tools for resistance measurement, resistance-associated molecular markers, and the origin and spread of the ART-resistant parasite strains.

【Key words】Artemisinin; *Plasmodium falciparum*; Drug resistance; Origin

\* Corresponding author, E-mail: wqpan0912@aliyun.com

疟疾是全球最严重的公共卫生问题之一。长期以来，抗疟药物是疟疾防治的主要手段。抗疟药种类主要包括喹啉类（如氯喹、甲氟喹、奎宁等）和

抗叶酸类（如乙胺嘧啶、磺胺多辛等），这些药物的应用已使疟疾在全球范围内的流行得到了有效控制。但自 20 世纪 60、70 年代起，疟原虫对这些药物陆续产生了抗药性，并在全球迅速蔓延<sup>[1,2]</sup>，使疟疾流行在全球范围内出现大幅度回升。目前，恶性

作者单位：第二军医大学热带传染病学教研室，上海 200433

\* 通讯作者，E-mail: wqpan0912@aliyun.com

疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 几乎对现有的抗疟药物均产生了不同程度的抗性<sup>[3,4]</sup>, 而间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*) 除了对乙胺嘧啶/磺胺类药物产生抗性外<sup>[5]</sup>, 在亚洲多个地区也报道了其对抗氯喹的抗性<sup>[6]</sup>。由此可见, 恶性疟原虫抗药性的产生是人类对付疟疾进程中的重大挑战。

由于恶性疟原虫已对多种药物产生抗性, WHO于2006年正式推荐以青蒿素为基础的联合用药 (ACTs) 治疗恶性疟, 并作为一线抗疟药物<sup>[7]</sup>。青蒿素及其衍生物是我国科学家发明的新型抗疟药, 具有高效、快速和不良反应小等优点。青蒿素及其衍生物的应用已使全球疟疾流行回升的严峻形势得到了有效遏制, 疟疾的发病率和死亡率逐年下降<sup>[8,9]</sup>。然而, 2008年首先在柬埔寨西部及泰-柬边境地区报道有青蒿素抗性虫株<sup>[10]</sup>, 随后几年在东南亚多个地区陆续报道出现青蒿素抗性虫株, 且有进一步扩散的趋势<sup>[11-14]</sup>。这些报道中的恶性疟原虫对青蒿素产生抗性, 指在ACTs治疗后原虫清除率显著下降, 并用延迟半数原虫清除时间 ( $PCT_{1/2}$ ) 来表示。目前对定义多大 $PCT_{1/2}$ 值为青蒿素抗性尚无定论, 但一般认为,  $PCT_{1/2}$ 几何均值大于5 h (是敏感株的2倍) 的虫株可定义为抗性虫株<sup>[13,14]</sup>。

青蒿素抗性虫株的产生及扩散已引起了人们普遍的关注和担忧, 这些抗性虫株一旦扩散和失控, 将给全球疟疾防控带来非常严重的后果。目前这种状况类似于20世纪60、70年代疟原虫对氯喹和乙胺嘧啶/磺胺多辛产生抗性, 由于对这些药物抗药性的产生和迅速蔓延, 使本已得到有效控制的疟疾形势发生根本性逆转, 导致疟疾在全球范围内出现大幅回升<sup>[1,2,15]</sup>。因此, WHO专门制定了全球遏制青蒿素抗性的规划 (GPARC)<sup>[16]</sup>, 以加强青蒿素抗性传播流行的监测以及相关技术的研发, 特别是加强新型抗药性检测和监测方法的研制。

## 1 青蒿素抗性的检测方法及其分子标记

遏制恶性疟原虫对青蒿素产生抗性的关键是要阻止抗性虫株的扩散和蔓延, 而采用有效手段检测和监测青蒿素抗性虫株是阻止其扩散的重要环节。WHO最近向相关国家发出通知, 要求各疟疾流行国家做好青蒿素敏感性的检测和抗性虫株的监测, 特别是边境地区的监测, 以防止恶性疟原虫青蒿素抗性虫株的扩散和蔓延。因此, 研制疟原虫对青蒿素敏感性的检测方法已成为当今研究的优先课题。疟原虫抗药性检测方法包括体内、体外以及分子标记的检测, 近年来, 除体内检测 $PCT_{1/2}$ 外, 体外测

定方法和青蒿素抗性相关的分子标记等方面研究已取得重要进展。

1.1 体外检测方法 体外评价疟原虫对药物敏感性的方法主要是采用体外培养的疟原虫, 在体外观察药物对疟原虫的杀灭作用。WHO已推荐用48 h标准体外微量法测定疟原虫药物敏感性<sup>[17]</sup>, 此方法也成功应用于绝大多数抗疟药敏感性的测定<sup>[18]</sup>。然而, 该方法并不适用于青蒿素敏感性的检测, 用该法检测泰-柬边境青蒿素抗性虫株, 其半数有效剂量 ( $ED_{50}$ ) 与其它敏感虫株并无显著差异<sup>[19]</sup>, 换言之, 该方法的检测结果并不能区分体内抗性虫株和敏感虫株。之后, 研究人员建立了“生长-药物杀虫-撤药-再燃”体外测定青蒿素敏感性的方法<sup>[20]</sup>。该方法虽能部分区分抗性虫株和敏感虫株, 但其结果重复性差, 方法本身技术复杂、耗时长, 不具有实用性。最近, Witkowski等<sup>[21]</sup>用体外培育抗性虫株研究的结果显示, 青蒿素抗性虫株主要表现为: 在药物作用下恶性疟原虫环状体发育停滞, 处于休眠状态, 当药物移去后环状体重新恢复发育。根据这一重要发现, 该研究组<sup>[22]</sup>用入侵后0~12 h的环状体进行药物敏感性试验, 结果显示, 青蒿素抗性虫株的原虫生存率比敏感株高17倍。在此基础上, Witkowski等<sup>[23]</sup>开展对疟原虫不同发育阶段环状体青蒿素敏感性的测定, 并设计0~3 h、9~12 h和18~21 h等3个发育阶段的环状体, 并对青蒿素抗性和敏感各13株进行检测。结果显示, 抗性株0~3 h环状体的原虫生存率比敏感株高47倍, 而9~12 h环状体与18~21 h环状体的原虫生存率无显著差别。在此基础上进一步扩大虫株数量, 对来源于柬埔寨西部地区大量虫株进行检测, 结果均表明0~3 h环状体检测方法能有效区分体内抗性虫株和敏感虫株。这种新型方法定名为“0~3 h环状体生存试验 ( $RSA_{0-3h}$ )”。用 $RSA_{0-3h}$ 法检测现场患者血中恶性疟原虫对青蒿素的敏感性, 结果同样能区分青蒿素抗性虫株和敏感虫株<sup>[22,23]</sup>。与体内测定 $PCT_{1/2}$ 法相比,  $RSA_{0-3h}$ 体外法具有较多的优势, 如不易受到患者因素和药物质量等的影响, 患者因素包括在药物吸收和代谢以及疟原虫感染后产生免疫力等方面的差异, 而药物方面因素包括在药物批次和质量等方面的差异。由于 $RSA_{0-3h}$ 体外法能应用于现场患者对青蒿素敏感性的检测, 因此, 该法具有推广应用的前景。

1.2 青蒿素抗性相关的分子标记 疟原虫抗药性的产生大多是由于其抗性相关基因产生突变所致, 如恶性疟原虫 *crt* 基因的突变导致对氯喹等药物产生抗性, 而恶性疟原虫和间日疟原虫的 *dhfr* 基因突变

导致对乙胺嘧啶产生抗性<sup>[24,25]</sup>。在过去几年中,青蒿素抗性相关基因的鉴定已成为研究热点<sup>[26-29]</sup>。此类研究大多采用青蒿素抗性和敏感两组虫株,通过对其基因组进行测序和群体基因组比较,从中发现与抗性关联性分子及其突变。较早期的研究已经发现了青蒿素抗性相关的特定染色体区域<sup>[30]</sup>,但并未鉴定到抗性相关的分子。直至新近,Ariey等<sup>[31]</sup>采用体外培育的青蒿素抗性虫株为研究对象,通过比较抗性虫株培育前、后,以及在体外培育过程中抗性虫株的基因组序列,鉴定了恶性疟原虫在青蒿素抗性产生过程中发生突变的基因,并用此基因突变信息引导分析临床上青蒿素抗性虫株。采用此策略已成功鉴定到青蒿素抗性的分子标记。该项研究采用实验室培育的1株青蒿素抗性虫株,通过全基因组测序并与其培育前虫株序列进行比对,鉴定了该虫株共计7个基因发生了突变。进一步分析显示,其中1个基因的突变是伴随青蒿素抗性产生而出现的,该基因为恶性疟原虫*K13*基因。该研究结果还表明,*K13*基因的Y493H、R539T、I543T和C580Y等4个位点的突变与对青蒿素产生抗性相关。在此基础上,Ariey等<sup>[31]</sup>收集了2001–2012年柬埔寨西部地区近千株恶性疟原虫株,并分析了*K13*基因的多态性,结果显示,该地区虫株*K13*基因存在广泛的序列多态性,但突变频率最高的基因位点是C580Y,并表明该分子氨基酸440位后的突变与对青蒿素产生抗性存在相关性。此外,该研究结果表明,近十年*K13*基因野生型虫株随时间推移而逐年减少。此后,不同实验室的大量研究结果均表明,*K13*基因的突变与虫株对青蒿素产生抗性相关,该分子作为青蒿素抗性相关的分子标记已被广泛接受<sup>[32-35]</sup>。

*K13*基因是位于恶性疟原虫第13号染色体上的*kelch*基因,全长2 180 bp,主要编码Kelch螺旋桨蛋白(K13-propeller),生物信息学预测K13-propeller同源蛋白为6个 $\beta$ -螺旋结构域组成,并与N末端片段、C末端 $\beta$ -折叠结构域紧密联系<sup>[36]</sup>。目前与疟原虫*K13*基因类似的研究主要集中在其他物种(如果蝇和人等)。人Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kelch-like ECH-associated protein-1, KEAP1)是一种E3泛素连接酶,可调节转录因子NF-E2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)的泛素化过程,是氧化应激反应的主调节器<sup>[37,38]</sup>。换言之,KEAP1是一种负调控因子,能够限制Nrf2依赖的细胞保护应激反应和抗氧化反应。在氧化应激条件下,KEAP1与Nrf2的相互作用被破坏,导致Nrf2进入细胞核中,促发下游一系列细胞(膜)的

保护应激反应。疟原虫中的K13-propeller蛋白功能可能与KEAP1类似,推测也属于一种负调控因子。*K13*基因某些位点的突变(如C580Y、R539T等)将削弱*K13*蛋白与未知伴侣蛋白的相互作用和联系,其结果是恶性疟原虫中该未知伴侣蛋白依赖(诱发)的抗氧化和细胞保护功能不再受限,从而导致诸如对青蒿素产生抗性等发生。但这种推测尚未被证实,主要是由于在恶性疟原虫中尚未鉴定到类似Nrf2的蛋白<sup>[31]</sup>。

## 2 青蒿素抗性虫株的起源

在基因层面研究临床上产生青蒿素抗性的虫株,对于追溯其抗性起源和传播具有重要的意义<sup>[39]</sup>,并且可从中寻找有效的分子标志监测其传播<sup>[40]</sup>。以往的研究表明,恶性疟原虫的种群结构分布与疟疾的传播有密切联系,且种群结构分布表现出显著差异的现象往往出现在低度传播的地区(如东南亚地区),而非传播程度高的非洲地区<sup>[41,42]</sup>。最近一项研究采用了来自东南亚和非洲(加纳、马里、布基纳法索、赞比亚、泰国、越南和柬埔寨)825株恶性疟原虫株,开展其基因组多态性研究<sup>[43]</sup>。该研究基因芯片分析结果显示,在东南亚地区这一相对狭小和闭塞的地理范围内,仅柬埔寨来源虫株便同时存在4个不同的亚群,即KH1、KH2、KH3和KH4。聚类分析结果显示,绝大部分柬埔寨东北地区抗性虫株、越南虫株和大部分柬埔寨西部地区虫株表现出常见的KH1型别(核心区域),而泰国虫株在“遗传距离”上靠近该区域,非洲虫株则远离该区域;另外3个“外围”亚群,即KH2、KH3和KH4的基因分化程度较高,具有“奠基者效应”的遗传漂变形式。同时,体内原虫清除率实验证实,KH2、KH3和KH4 3个亚群虫株的PCT<sub>1/2</sub>较KH1亚群虫株明显延长,表明这3个独立亚群虫株均与对青蒿素产生抗性相关。

在药物作用下,某些恶性疟原虫群体获得一定的基因变异,而这种基因变异导致对青蒿素产生抗性的起源,在基因层面上将以“奠基者效应”的形式遗传下去。基因组上多个等位基因变异的“共同协作”,即多基因抗性表型(“多因一效”)更易发生于已产生个别基因变异和流行的本地虫株中。另外当地的低传播强度和有利于杂交的其他因素,均能维持这种多基因抗性表型长时间持续存在。若此虫株群体恰好处于丛林边远地区,或处于繁殖隔离状态,则不同亚群的虫株将被这一地区不同种别的蚊媒优先分散传播<sup>[44]</sup>,这也解释了为何柬埔寨西部地区



是疟疾药物抗性产生的全球性热点区域,也是上述 KH2、KH3 和 KH4 3 个亚群共同起源地的原因。

前已述及, Arie 等<sup>[31]</sup>的研究表明, *K13* 基因作为青蒿素抗性的标志分子已被广泛接受, 并用于许多东南亚地区恶性疟原虫感染者血样的抗性检测研究。该研究以柬埔寨西部地区虫株为研究对象, 检测到其 *K13* 基因 propeller 结构域存在 18 个 SNP 位点, 其中 C580Y、R539T 和 Y493H 的突变与对青蒿素产生抗性相关, 而 K13-C580Y 基因型频率更是高达 85%<sup>[31]</sup>。最近几项湄公河流域虫株的类似研究亦进一步证实, K13-C580Y 基因型是柬埔寨、缅甸和越南等地的主要型别<sup>[45-47]</sup>, 这些研究提示 K13-C580Y 可能独立起源于柬埔寨和缅甸等地。但 Talundzie 等<sup>[48]</sup>利用微卫星分型法对泰国边境地区 K13-C580Y 突变虫株进行进一步分析, 发现泰柬边境和泰缅边境的 K13-C580Y 则具有相互独立的起源和进化路径。这说明 K13-C580Y 这一重要的抗性相关基因型在湄公河流域的不同地区可能具有不同的起源和进化途径, 但毋庸置疑, 柬埔寨西部边境地区仍是重要的青蒿素抗性虫株的起源地。

Miotto 等<sup>[45]</sup>随后于 2011–2013 年开展了一项青蒿素抗性相关的基因组学研究, 结果发现, 柬埔寨、越南、泰国和缅甸等地的 *K13* 基因抗性突变频率较高, 而老挝和孟加拉地区的 *K13* 抗性突变频率较低, 非洲地区的虫株鲜见 *K13* 基因突变, 因此认为 *K13* 基因突变可作为不同地区抗性起源和传播的有效分子标志。鉴于目前传播最广泛的 K13-C580Y 突变存在“多地共起源”的现象, 青蒿素抗性虫株在不同国家和地区之间发生和传播的主要因素则是 *K13* 基因关键位点的突变。该研究主要从柬埔寨、越南、老挝、泰国、缅甸、孟加拉、刚果和尼日利亚等国的 13 个疟疾流行区 1 063 份接受青蒿素衍生物药物治疗的恶性疟原虫感染病例着手, 通过全基因组关联性分析, 回溯了此前关于柬埔寨青蒿素抗性虫株 (KH2、KH3 和 KH4 亚群) 的遗传漂变研究<sup>[43]</sup>, 筛选出 7 个遗传漂变亚群, 其中 5 个来源于柬埔寨, 2 个来源于越南。这些青蒿素抗性的漂变亚群均表现出特异的 *K13* 抗性突变位点, 其中 3 个亚群带有 K13-C580Y 突变, 其余 4 个则带有 K13-R539T、K13-Y493H、K13-I542T 和 K13-P553L 突变, 而这些亚群的 *K13* 位点突变常常伴随其基因组上 fd-D193Y、crt-N326S、mdr2-T484I 和 apsr10-V127 等位点的变异, 这些基因位点现被称为“背景分子标志”。换言之, 这些背景分子标志在东南亚不同地区虫株的突变频率与其 *K13* 突变频率分布变化高度一致。而 apsr10-

V127M、fd-D193Y 和 mdr2-T484I 等位点的变化在 2 个非洲地区虫株中则缺失或少见, 说明上述背景分子标志是在东南亚地区、尤其是柬埔寨西部地区恶性疟原虫株特有的起源进化选择结果。如果说 *K13* 位点的突变是“驱动因子”, 那么这种驱动的发生往往是建立在上述背景分子标志发生变化的基础之上。因此, 柬埔寨地区的恶性疟原虫对青蒿素抗性产生或起源, 不能简单归结为地理环境、蚊媒传播或用药历史等方面的考量, 也不仅仅局限于虫株 K13-propeller 基因单核苷酸多态性 (SNP) 变异与对青蒿素产生抗性的关联, 而应综合考虑到 *K13* 突变及其相应的背景分子标志<sup>[31,45]</sup>。简言之, 对青蒿素抗性产生的条件必须首先满足恶性疟原虫背景分子标志发生变异, 而后 *K13* 基因关键位点发生突变, 两者缺一不可。另外, Miotto 等<sup>[45]</sup>通过对 K13-C580Y 突变的柬埔寨虫株两翼微卫星序列分析发现, 柬埔寨地区 K13-C580Y 突变虫株群体可分化为不同的单体型, 其中 2 种来源于柬埔寨西部地区的 K13-C580Y 单体型, 与 K13-R529T、K13-I543H 突变来源的单体型高度一致, 说明该地 K13-C580Y 抗性虫株具有独立起源, 且多次出现在这一地区。更有甚者, 这一起源已突破地理限制, 渗透至周边的越南、泰国东部等地<sup>[45,47,48]</sup>。

### 3 青蒿素抗性的传播与流行

2000 年前后, 青蒿素及其衍生物在临床上的广泛、反复使用, 已导致在泰国、印度等地出现临床疑似青蒿素抗药性病例的报道<sup>[49-51]</sup>。2006 年伊始, WHO 将 ACTs 作为官方推荐的一线疗法用于治疗疟疾治疗后<sup>[7]</sup>, 疟疾暴发和流行的趋势大幅下降<sup>[52]</sup>。2008 年, WHO 宣布在东南亚大湄公河流域的泰柬边境地带的恶性疟原虫对青蒿琥酯已产生抗性<sup>[53]</sup>。随之而来的青蒿素抗性虫株流行已不仅仅局限于泰柬边境地区, 而是在整个湄公河流域迅速扩散, 给疟疾的防治与消除工作带来了挑战<sup>[40,54]</sup>。但青蒿素抗性虫株的传播和流行状况与氯喹、磺胺多辛-乙氨嘧啶抗性虫株有所不同, 其目前的传播范围仅局限于东南亚及周边国家或地区, 而后者不仅在东南亚地区, 且广泛发生在非洲、南美洲地区, 导致数百万儿童的死亡<sup>[15,55]</sup>。若能将青蒿素抗性虫株传播流行的途径在东南亚及周边地区进行阻断和限制, 对防止抗药性恶性疟的进一步暴发流行将大有帮助<sup>[10,56,57]</sup>。

自 2008 年以来, 柬埔寨、缅甸、泰国和越南等地相继报道出现青蒿素类抗性疟原虫株<sup>[58]</sup>。2008–2010 年, 柬埔寨西部的拜林市使用双氢青蒿素-哌

喹联用药物治疗疟疾, 临床研究发现, 服药 3 d 后体内仍存在疟原虫的患者比例从 2008 年的 26% 上升至 2010 年的 45%<sup>[16]</sup>。在泰国西北边境地区, 疟原虫对青蒿素的药物敏感性亦明显降低: 经 ACTs 治疗后, 恶性疟原虫 PCT<sub>1/2</sub> 大于 6.2 h 的虫株占比由 2001 年的 0.6% 增加至 2010 年的 20%<sup>[13]</sup>。2013 年调查数据显示, 泰国 22% 的疟疾患者使用蒿甲醚-苯茛醇治疗 3 d 后体内仍存在疟原虫<sup>[58]</sup>。

自 2010 年起, 使用不同组分的 ACTs 治疗 3 d 后, 检测疟原虫仍呈阳性的病例分布范围已由泰-柬边境地区蔓延至缅甸的西南部、越南南部和泰国缅甸边境等处<sup>[59-61]</sup>。例如, 自 2009 年以来, 缅甸东南部 5 个省相继出现对 3 种 ACTs 组方产生抗药性的病例; 一项在缅甸南部地区进行的青蒿素抗性研究证实, 经口服青蒿琥酯 4 mg/(kg·d) 治疗 3 d 后, 26.9% 的患者体内仍能检测到恶性疟原虫<sup>[62]</sup>。另一项越南南部地区来源虫株的研究则表明, 口服青蒿琥酯 4 mg/(kg·d) 治疗后, 患者体内恶性疟原虫清除时间大于 72 h 的比例为 27%<sup>[14]</sup>。

目前, 非洲境内尚未发现对青蒿素及其衍生物联合用药产生抗药性的病例, 但撒哈拉以南非洲地区从来都是疟疾的重度流行区, 一旦对青蒿素产生抗药性, 疟疾防治将会面临失控。因此东南亚地区 ACTs 抗性的案例, 对其他国家和地区疟疾防治具有指导意义。我国是世界上最早使用青蒿素治疗恶性疟的国家, 有着三十多年的青蒿素用药史。鉴于我国西南地区与东南亚地区人员交流频繁, 边境线曲折绵长的特点, 中-缅、中-越边境一带的恶性疟原虫青蒿素抗性研究亦成为近年研究的焦点。最近 Wang 等<sup>[63]</sup>通过对 2007–2012 年采集的中-缅边境恶性疟原虫株进行 *K13* 基因 SNP 检测发现, 该地 43.1% 虫株在 *K13* 基因发生位点突变, 其中 F446I 突变是 SNP 的主要突变类型, 占 27.2%, 而明确与对青蒿素产生抗性相关的 C580Y 突变则仅占 1.6%。无独有偶, Huang 等<sup>[64]</sup>针对中-缅边境的虫株进行类似分析发现, 47.7% 的本地虫株在 *K13* 基因发生点突变, 其中 F446I 的突变占 36.5%。进一步研究发现, F446I 位点发生突变的虫株, 用药后其原虫清除时间延长。中-缅边境的青蒿素抗性虫株是否由东南亚地区传入, 或者存在自身的独立起源和传播路径, 仍需进一步探讨, 且 F446I 位点的突变是否在该地青蒿素抗性虫株发生和传播过程中起到重要作用尚不明确, 需要更多研究佐证。

泰-柬边境地区恶性疟原虫青蒿素抗性虫株得以迅速扩散至湄公河流域其他地区的内因是其自身

在药物压力下产生的基因突变, 而其外因主要有以下 3 个方面: 其一, 用药历史的复杂性, 湄公河流域的疟疾流行区多地处丛林地带, 卫生条件、医疗水平较差, 药物使用不够规范; 其二, 疟原虫感染者流动性较大, 除了从事贸易交流和移民之外, 甚至还有战争难民, 这类人群作为重要的传染源, 其迁徙过程中势必加快了青蒿素抗性虫株的扩散和传播<sup>[65,66]</sup>; 其三, 该区域也是最早使用乙胺嘧啶和磺胺多辛等药物作为一线抗疟药的地区, 这一历史原因导致该类地区的恶性疟原虫株对青蒿素类药物产生抗性的状况更显复杂<sup>[67]</sup>。

#### 4 结语

自 WHO 于 2006 年始推荐以我国科学家发明的青蒿素为基础的联合用药 (ACTs) 作为治疗恶性疟的一线药物以来<sup>[7]</sup>, 这一疗法的推广应用在一段时间内有效地控制了全球疟疾的暴发流行, 表现为疟疾的发病率和死亡率逐年下降<sup>[8,9]</sup>。但随之不可避免地出现青蒿素抗性虫株的产生与扩散<sup>[10-14]</sup>, 其中东南亚大湄公河流域情况最为严重, 该地用药历史和人员流动的复杂性, 均加剧了这一地区青蒿素抗性虫株流行的现状, 业已成为全球疟疾防治和消除疟疾计划的严重威胁。

因此, 加强青蒿素抗性虫株传播流行的监测以及相关技术的研发, 特别是加强新型抗性检测和监测方法的研究, 对于遏制青蒿素抗性虫株的扩散至关重要。目前, 除了体内检测 PCT<sub>1/2</sub> 外, 体外测定方法、青蒿素抗性相关分子标记和抗性溯源检测研究等方面已取得了重要进展: 新型体外测定方法“0~3 h 环状体生存试验 (RSA0~3 h)”能应用于现场患者对青蒿素敏感性的检测<sup>[22,23]</sup>, 且不易受患者因素和药物质量等的影响, 具有推广应用的前景; 恶性疟原虫 *K13* 基因 SNP 突变与对青蒿素产生抗性相关的重大发现<sup>[31]</sup>, 大大推进了恶性疟原虫对青蒿素产生抗性研究的进展, 该分子作为对青蒿素产生抗性相关的分子标记已被广泛接受<sup>[32-35]</sup>; 全基因组扫描、全基因组芯片和全基因组关联性分析的运用对于追溯青蒿素抗性起源和传播具有重要意义, 且可从中寻找有效的分子标志监测其传播<sup>[39,40,43,45]</sup>。这些研究不仅追溯了恶性疟原虫不同青蒿素抗性虫株亚群共同起源的成因<sup>[43]</sup>, 更寻找到抗性虫株基因组上关键的“背景分子标志”, 这些分子标志的变异与 *K13* 基因 SNP 突变紧密相关<sup>[45]</sup>。

上述青蒿素抗药性检测和抗性相关分子标志溯源检测技术的发展或研究, 承继和发展了 WHO 关

于全球遏制青蒿素抗性规划的相关要求<sup>[16]</sup>, 不仅有助于监控东南亚湄公河流域临近的青蒿素抗性虫株的传播与扩散态势, 指导这一地区 ACTs 联合用药规程, 而且将有望缓解或阻断青蒿素抗性虫株的传播流行从东南亚地区向周边地区乃至非洲地区进一步扩散或引起暴发流行<sup>[10,56,57]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Marsh K. Malaria disaster in Africa [J]. Lancet, 1998, 352 (9132): 924.
- [2] Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C. Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand [J]. Lancet, 1965, 286 (7414): 657-660.
- [3] Muregi FW, Kirira PG, Ishih A. Novel rational drug design strategies with potential to revolutionize malaria chemotherapy [J]. Curr Med Chem, 2011, 18(1): 113-143.
- [4] Sá JM, Twu O, Hayton K, et al. Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(45): 18883-18889.
- [5] Hawkins VN, Auliff A, Prajapati SK, et al. Multiple origins of resistance-conferring mutations in *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase [J]. Malar J, 2008, 7(1): 72.
- [6] Baird, J K. Chloroquine Resistance in *Plasmodium vivax* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(11): 4075-4083.
- [7] WHO. Guidelines for the treatment of malaria [R]. Geneva: WHO, 2006.
- [8] Barnes KI, Durrheim DN, Little F, et al. Effect of Artemether-lumefantrine policy and improved vector control on malaria burden in KwaZulu-Natal, South Africa [J]. PLoS Med, 2005, 2(11): e330.
- [9] Carrara VI, Sirilak S, Thonglairuam J, et al. Deployment of early diagnosis and mefloquine-artesunate treatment of falciparum malaria in Thailand: the Tak Malaria Initiative [J]. PLoS Med, 2006, 3(6): e183.
- [10] Noedl H, Se Y, Schaefer K, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia [J]. N Engl J Med, 2008, 359(24): 2619-2620.
- [11] Dondorp AM, Nosten F, Yi P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria [J]. N Engl J Med, 2009, 361(5): 455-467.
- [12] Amaratunga C, Sreng S, Suon S, et al. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Pursat province, western Cambodia: a parasite clearance rate study [J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12 (11): 851-858.
- [13] Phyto AP, Nkhoma S, Stepniewska K, et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study [J]. Lancet, 2012, 379 (9830): 1960-1966.
- [14] Hien TT, Thuy-Nhien NT, Phu NH, et al. *In vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in Binh Phuoc Province, Vietnam [J]. Malar J, 2012, 11: 355.
- [15] Roper C, Pearce R, Nair S, et al. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria [J]. Science, 2004, 305 (5687): 1124-1124.
- [16] WHO. Global plan for artemisinin resistance containment [R]. Geneva: WHO, 2011.
- [17] Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, et al. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in-vitro* microtechnique [J]. Lancet, 1978, 1(8054): 22-23.
- [18] WHO. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010 [R]. Geneva: WHO, 2010.
- [19] Dondorp AM, Yeung S, White L, et al. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment [R]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(4): 272-280.
- [20] Teuscher F, Gatton ML, Chen N, et al. Artemisinin-induced dormancy in *Plasmodium falciparum*: duration, recovery rates, and implications in treatment failure [J]. J Infect Dis, 2010, 202(9): 1362-1368.
- [21] Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJ, et al. Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(5): 1872-1877.
- [22] Witkowski B, Khim N, Chim P, et al. Reduced artemisinin susceptibility of *Plasmodium falciparum* ring stages in Western Cambodia [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(2): 914-923.
- [23] Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *in-vitro* and *ex-vivo* drug-response studies [J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13 (12): 1043-1049.
- [24] Howard EM, Zhang H, Roepe PD. A novel transporter, Pfert, confers antimalarial drug resistance [J]. J Membr Biol, 2002, 190 (1): 1-8.
- [25] Peterson DS, Di Santi SM, Pova M, et al. Prevalence of the dihydrofolate reductase asn-108 mutation as the basis for pyrimethamine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon [J]. Am J Trop Med Hyg, 1991, 45(4): 492-497.
- [26] Jambou R, Legrand E, Niang M, et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in-vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6 [J]. Lancet, 2005, 366 (9501): 1960-1963.
- [27] Hunt P, Martinelli A, Modrzynska K, et al. Experimental evolution, genetic analysis and genome re-sequencing reveal the mutation conferring artemisinin resistance in an isogenic lineage of malaria parasites [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 499.
- [28] Veiga MI, Ferreira PE, Jörnham L, et al. Novel polymorphisms in *Plasmodium falciparum* ABC transporter genes are associated with major ACT antimalarial drug resistance [J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20212.
- [29] Cui L, Wang Z, Miao J, et al. Mechanisms of *in vitro* resistance to dihydroartemisinin in *Plasmodium falciparum* [J]. Mol Microbiol, 2012, 86(1): 111-128.
- [30] Cheeseman IH, Miller BA, Nair S, et al. A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria [J]. Science, 2012, 336(6077): 79-82.
- [31] Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria [J]. Nature, 2014, 505 (7481): 50-55.
- [32] Straimer J, Gnadig NF, Witkowski B, et al. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates [J]. Science, 2015, 347(6220): 428-431.
- [33] Ghorbal M, Gorman M, Macpherson CR, et al. Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32 (8): 819-821.
- [34] Mok S, Ashley EA, Ferreira PE, et al. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance [J]. Science, 2015, 347(6220): 431-435.
- [35] Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, et al. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*



- malaria[J]. Nature, 2015, 520(7549): 683-687.
- [36] Li X, Zhang D, Hannink M, *et al.* Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1 [J]. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54750-54758.
- [37] Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain [J]. Genes Dev, 1999, 13(1): 76-86.
- [38] Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(22): 8137-8152.
- [39] Anderson TJ, Nair S, Nkhoma S, *et al.* High heritability of malaria parasite clearance rate indicates a genetic basis for artemisinin resistance in western Cambodia [J]. J Infect Dis, 2010, 201(9): 1326-1330.
- [40] Dondorp AM, Fairhurst RM, Slutsker L, *et al.* The threat of artemisinin-resistant malaria [J]. N Engl J Med, 2011, 365: 1073-1075.
- [41] Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, *et al.* Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(10): 1467-82.
- [42] Dye C, Williams BG. Multigenic drug resistance among inbred malaria parasites[J]. Proc Biol Sci, 1997, 264(1378): 61-67.
- [43] Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, *et al.* Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia[J]. Nat Genet, 2013, 45(6): 648-655.
- [44] Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, *et al.* The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic precis [J]. Parasit Vectors, 2011, 4: 89.
- [45] Miotto O, Amato R, Ashley EA, *et al.* Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* [J]. Nature genetics, 2015, 47(3): 226-34.
- [46] Takala-Harrison S, Jacob CG, Arze C, *et al.* Independent Emergence of artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia[J]. J Infect Dis, 2014, 211(5): 670-679.
- [47] Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, *et al.* Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria[J]. N Engl J Med, 2014, 371(5): 411-423.
- [48] Talundzie E, Okoth SA, Congpuong K, *et al.* Selection and spread of artemisinin-resistant alleles in Thailand prior to the global artemisinin resistance containment campaign [J]. PLoS Pathog, 2015, 11(4): e1004789.
- [49] Luxemburger C, Brockman A, Silamut K, *et al.* Two patients with falciparum malaria and poor *in vivo* responses to artesunate[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1998, 92(6): 668-669.
- [50] Gogtay NJ, Kadam VS, Karnad DR, *et al.* Probable resistance to parenteral artemether in *Plasmodium falciparum*: case reports from Mumbai (Bombay), India[J]. Ann Trop Med Parasitol, 2000, 94(5): 519-520.
- [51] Sahr F, Willoughby VR, Gbakima AA, *et al.* Apparent drug failure following artesunate treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Freetown, Sierra Leone: four case reports [J]. Ann Trop Med Parasitol, 2001, 95(5): 445-449.
- [52] WHO. World malaria report 2012[R]. Geneva: WHO, 2012.
- [53] 龚震宇, 杨小平. 国际旅行者用青蒿素预防和治疗耐药恶性疟的最新情况[J]. 疾病监测, 2010, 25(9): 762.
- [54] Enserink M. Malaria's drug miracle in danger [J]. Science, 2010, 328(5980): 844-846.
- [55] Anderson TJ, Roper C. The origins and spread of antimalarial drug resistance: lessons for policy makers [J]. Acta Trop, 2005, 94(3): 269-280.
- [56] WHO. Global malaria control and elimination: report of a meeting on containment of artemisinin tolerance [R]. Geneva: WHO, 2009.
- [57] White NJ. Artemisinin resistance --the clock is ticking [J]. Lancet, 2010, 376(9758): 2051-2052.
- [58] WHO. Status report on artemisinin resistance: 2014[R]. Geneva: WHO, 2014.
- [59] Wongsrichanalai C, Sibley CH. Fighting drug-resistant *Plasmodium falciparum*: the challenge of artemisinin resistance [J]. Clin Microbial Infect, 2013, 19(10): 908-916.
- [60] Fairhurst RM, Nayyar GM, Breman JG, *et al.* Artemisinin-resistant malaria: research challenges, opportunities, and public health implications [J]. Am J Trop Med Hyg, 2012, 87(2): 231-241.
- [61] Tulloch J, David B, Newman RD, *et al.* Artemisinin-resistant malaria in the Asia-Pacific region[J]. Lancet, 2013, 381(1): 16-17.
- [62] Kyaw MP, Nyunt MH, Chit K, *et al.* Reduced susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in southern Myanmar[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e57689.
- [63] Wang Z, Shrestha S, Li X, *et al.* Prevalence of K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* from China-Myanmar border in 2007-2012[J]. Malar J, 2015, 14: 168.
- [64] Huang F, Takala-Harrison S, Jacob CG, *et al.* A single mutation in K13 predominates in Southern China and is associated with delayed clearance of *Plasmodium falciparum* following artemisinin treatment [J]. J Infect Dis, 2015, 212(10): 1629-1635.
- [65] Mackinnon MJ. Drug resistant models for malaria [J]. Acta Trop, 2005, 94(3): 207-217.
- [66] Hastings IM. The origins of antimalarial drug resistance[J]. Trends Parasitol, 2004, 20(11): 512-518.
- [67] Bjorkman A, Phillips-Howard PA. The epidemiology of drug-resistant malaria [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1990, 84(2): 177-180.

(收稿日期: 2015-10-08 编辑: 张争艳)