

恶性疟原虫对氯喹抗药性的流行病学及 IPT 的研究进展

刘若冰^{1,2}, 吴兰鸥^{1*}, 杨照青^{2*}

摘要 氯喹作为最早发现和使用的最为有效的抗疟药物,在大规模用于疟疾治疗后,恶性疟原虫陆续对它产生抗药性,并且抗性虫株在全球范围迅速播散。近年来的研究显示氯喹可用于疟疾的周期性预防疗法。本文综述了氯喹抗药性流行病学的研究,抗药性产生的机制及周期性预防疗法(Intermittent preventive treatment, IPT)的研究新进展。

关键词 恶性疟原虫;抗药性;氯喹;流行病学;IPT

中图分类号 R531.3 **文献标识码** A **文章编号** 1009-9727(2011)10-1289-03

Epidemiology and resistance to chloroquine of *Plasmodium falciparum* and IPT research progress. LIU Ruobing, WU Lan-ou, YANG Zhao-qing. (1. Department of Pharmacology, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan, P.R. China)

Abstract: Chloroquine first discovered and used as the most effective antimalarial drug in large-scale treatment for malaria. *Plasmodium falciparum* gradually give rise to resistance to chloroquine and resistant strains of insects spread rapidly around the world. In recent years, studies have shown that chloroquine can be used for periodic preventive treatment of malaria (intermittent preventive treatment, IPT). This article reviews the epidemiology of chloroquine resistance, drug resistance mechanisms and IPT of new progress.

Key words: *Plasmodium falciparum*; Drug resistance; chloroquine; epidemiology; IPT

疟疾是一项主要的公共卫生问题,每年引发全世界超过 3 亿临床病例。迄今为止,恶性疟原虫已发展为对大多数抗疟药都具有抗性,如氯喹^[1]。自从 1957 年第 1 例抗氯喹的恶性疟病人出现以来,恶性疟原虫对氯喹的抗药性(Chloroquine resistance, CQR)已经遍及所有恶性疟流行地区。疟原虫抗药性的产生和扩散严重制约了疟疾的控制,并成为全球疟疾发病率急剧回升的主要原因。致使氯喹在大部分地区已不再具有以往的效力,主要用于治疗间日疟引起的疟疾。在东南亚地区 CQR 恶性疟引发了更为严重的公共卫生问题,在我国云南、海南等省也有 CQR 恶性疟的流行。

1 恶性疟原虫氯喹抗药性的流行状况

在云南特殊的地理位置,恶性疟抗药性很严重,疟疾流行态势不容乐观。自 1973 年和 1974 年分别在云南和海南两省发现抗氯喹恶性疟以来,抗性疟迅速传播,抗性程度不断增高。至 1978 年海南全省及云南南部恶性疟原虫对氯喹普遍产生了抗性,抗性率在 90%以上,其中 I 级抗性(R^I)超过 30%;1979~1984 年经 8 省(区)协作调查的结果表明,抗氯喹恶性疟在我国广泛分布,特别是恶性疟流行较严重的海南和云南两省。云南省由于青蒿素类药物的替代使用,恶性疟原虫的抗药性逐年下降,可见杨恒林等人对云南省 1981~2006 年疟原虫对氯喹抗性研究^[2]。说明停用某些抗疟疾药物一定时间后,疟原虫可以恢复对这些药物的敏感性。因此,实时地监测抗药性、掌握最新流行病学的动态是制定疟疾防治措施极其重要的依据,对科学预防疟疾、指导临床合理用药有重要的意义。

虽然云南南部和海南两地疟疾流行得到了较好的控制,但是由于周边的缅甸、泰国、越南、老挝等国家疟疾流行严重,同时对外开放力度不断加大,输入性疟疾流行速度和幅度增加,导致云南省疟疾发病率增高。报告显示海南省疟疾疫情尤其恶性疟发病已降至较低水平,但其疑似病例达数万,提示疟疾确诊水平需进一步提高^[3]。

在上世纪 50 年代晚期,对氯喹抗药的恶性疟第一次被发现于泰国—柬埔寨的边境,这一地点被认为是恶性疟原虫对氯喹产生抗药性的起源地,随后从东南亚到非洲传播。1959 年氯喹抗药性传播到泰国。1962 年传播到泰国—柬埔寨的边境的邻近的国家:马来群岛,柬埔寨和越南。从上世纪 60 年代到 70 年代中期,氯喹抗药性传播到整个东南亚地区^[4]。在泰国—缅甸边境地区采用体内试验显示摄入标准氯喹对治疗血液感染间日疟十分有效,但体外敏感性试验显示有潜在抗性增加的可能^[5]。1973 年首次报道印度恶性疟原虫对氯喹产生了抗性,并且逐渐增加。在印度用氯喹治疗恶性疟原虫现已无效,一线治疗药已变为青蒿琥酯加磺胺多辛-乙胺嘧啶^[6]。在印度和孟加拉国边境地区,印度东北方的三角地带的 16 个村庄进行的流行病学调查发现疟疾的发病率为 25.3%,其中恶性疟的发病率占主导地位,为 22.3%。并且在不同的年龄组之间恶性疟的发病率有显著差异性,2~4 岁的儿童最易感染,对氯喹抗药性研究发现其治疗失败率为 35%^[7]。在柬埔寨体外测定恶性疟原虫对抗疟药的敏感性发现:从 2001 年到 2007 年采集的 2 041 个恶性疟原虫样本中,1 588 个样本对四种抗疟药:氯喹,青蒿琥酯,甲氟喹,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30960050)

作者单位:1.昆明医学院药理学教研室,云南 昆明 650031; 2.昆明医学院寄生虫学教研室,云南 昆明 650031

* 通讯作者 E-mail: lanouwu@126.com

奎宁)敏感,并且这四个药的 IC₅₀ 值有地域差异,柬埔寨西部地区的 IC₅₀ 值明显高于东部地区^[8]。用分子生物学的方法研究巴基斯坦的疟疾流行地区发现,100%抗氯喹的恶性疟原虫体内发现突变 pfcrt 76T,并且该基因与对阿莫地喹产生抗药性也相关^[9]。

在东南亚地区出现抗药性的 20 年后,对氯喹抗药性首先在 1978 年出现于非洲靠近东海岸的肯尼亚和坦桑尼亚。80 年代早期,传播到东非国家、科摩罗群岛、马达加斯加岛、乌干达、赞比亚、马拉威。80 年代中期,传播到非洲的中部、安哥拉、纳米比亚、非洲的西部、尼日利亚、贝宁、多哥、加纳、塞内加尔、冈比亚。90 年代早期,在非洲西部的许多国家恶性疟原虫对氯喹抗药性成为一个新发现的严重问题^[4]。2007 年从苏丹中部和东部地区收集了 198 株疟原虫样本,对其中 45 例恶性疟原虫样本进行了体外测定氯喹的敏感性,发现 37.8% 的样本为低度抗性,6.7% 的样本为高度抗性^[10]。最近在马拉威发现自氯喹被弃用后产生对氯喹敏感的疟原虫。在 2005 年的样本中发现野生型 pfcrt 单体型基因,该基因能保持高度的变异性并且没有连锁不平衡性,与氯喹敏感株的产生有关联。说明氯喹敏感株的回归并不是先前抗性株或新自然选择虫株回复突变的结果。马拉威氯喹敏感株成为优势虫株很可能表明在该区域广泛用药的压力下幸存下来的氯喹敏感株的再次膨胀^[11]。

1960 年对氯喹抗药性的恶性疟同时被发现于南美洲两个地点,哥伦比亚和委内瑞拉。1961 年在巴西的波多韦柳靠近玻利维亚的边境发现两例对氯喹抗药性的恶性疟的病例。接着抗药性逐渐蔓延到巴西的疟疾流行区域,1969 年蔓延到圭亚那,1972 年蔓延到苏里南,1976 年蔓延到厄瓜多尔,1980 年蔓延到秘鲁,1980 年蔓延到玻利维亚^[4]。在哥伦比亚,疟原虫对抗疟药如氯喹和抗叶酸剂产生抗性已是一个严重的问题,在体外测定对氯喹的抗性高达 74%,甲氟喹为 30%^[12]。

2 氯喹抗药性的分子机制

大量研究表明,恶性疟原虫对氯喹抗性的分子机制是与氯喹抗性转运蛋白(pfcrt)基因的 72~76 位密码子发生突变有关。氯喹抗性转运蛋白(pfcrt)基因发现有两种等位基因:§ tct) VMNT (91%) 和 § agt) VMNT (9%)。这两种等位基因有很强的选择性,并且与 pfcrt, pfmdr1, dhfr, 和 dhps 这些基因有关联性^[13]。最新发现氯喹敏感株 GC03 的 pfcrt 等位基因的交换后产生的突变体等位基因,并发现亚洲和非洲的氯喹抗性株 Dd2 等位基因交换)和南美洲和巴布亚岛新几内亚(7G8 等基因交换),并且在氯喹的抗性虫株中突变体等位基因有上升趋势^[14]。在泰国最近完成的总数为 95 个恶性疟原虫样本的分析中几乎所有的疟原虫的突变特征保持以前报道过的突变结果 K76T, A220S, N326S, I356T, Q271E 和 R371I。在完成全部序列的测定后,鉴定到新的突变 K76A 和 E198K。并且发现疟原虫包含 E198K 突变的比不包含 E198K 突变的抗性弱。此外,通过 RT-PCR 对 pfcrt 和 pfmdr1 基因表达进行了研究,这些突变基因的表达和对药物的抗性之间没有关联性。从目前的研究数据表明,一旦确定了 pfcrt 突变的抗性表型,其他基因很可能促其

抗性的程度^[15]。对大量的恶性疟原虫样本的研究显示无论从不同地理区域的野生种群或者遗传杂交的后代,有 pfcrt 突变的虫株对氯喹反应存在广泛的变异^[14]。虽然这些突变可以预言恶性疟原虫对氯喹的抗性,但是对突变的程度没法在数量上进行推测。

Pfcrt 基因介导的机制会增加氯喹从消化泡中流出,这可能与恶性疟原虫抗性株中氯喹浓度下降相关联。最近有理论认为氯喹外流是与食物泡内 H⁺ 质子同时进行的,并由 pfcrt 基因突变直接介导,这一理论被认为是氯喹抗药性的又一机制^[16]。维拉帕米,一种弱碱药物,作用是增加氯喹抗性株内氯喹的浓度,因此化学感受虫株对氯喹的反应。最近报告在此条件下氯喹抗性株 HB3 和氯喹敏感株 Dd2 都聚集氯喹到相同的细胞内浓度(分别把这两种寄生疟原虫的红细胞暴露于外部氯喹浓度为 250nM 和 750nM),氯喹抗性株相比较氯喹敏感株更少的被杀死。因此,减低氯喹聚集浓度不一定是氯喹抗性株避免氯喹毒性作用^[14]。

恶性疟原虫对氯喹抗药性还与恶性疟原虫多药物抗性基因-1(pfmdr1)的突变有关。恶性疟原虫多药物抗性基因-1(pfmdr1)位于 5 号染色体,是与哺乳动物多元抗药性基因为同系的基因,编码蛋白为 P-glycoprotein homolog 1 (Pgh1)。一些研究显示 pfmdr1 蛋白第 86 位天(门)冬酰胺被酪氨酸代替(N86Y)与氯喹抗药性相关联。在委内瑞拉研究过的 93 个恶性疟原虫的样本中发现,12% 的样本中有 pfmdr1 基因多拷贝,63% 的 pfmdr1 的基因中发现两种等位基因,一种为 Y184F/N1042D/D1246Y(37%),另一种为 Y184F/S1034C/N1042D/D1246Y(63%),这两种等位基因有共同的祖先,但没有证据发现有突变选择压力^[13]。从沙特阿拉伯西南部区域采集 121 个恶性疟原虫的样本做序列分析,并分别测定恶性疟原虫的 pfcrt 基因的 K76T 突变和 Pfmdr1 基因的 N86Y 突变。全部的样本中 pfcrt 基因的 76T 突变包含 ACA 密码子(121/121; 100%),指示现存在的 76T 突变。在 Pfmdr1 基因的 N86Y 突变中,样本中 59.5% (72/121) 序列为 AAT,指示现存在野生型等位基因(86N),然而样本中 40.5% (49/121) 的序列为 TAT 密码子,指示现在突变体等位基因(Y)在 86 号染色体^[17]。

用群体遗传学的方法分析这两个基因片段,比起 pfmdr1 基因在 pfcrt 基因中我们发现相当高的核苷酸变异。此外,结合不平衡被发现在 pfcrt 基因中。用分子进化标准中立的模型发现 pfcrt 和 pfmdr-1 基因在演变^[18]。

3 氯喹的 IPT 研究

对氯喹有抗性的疟原虫归因于 pfcrt/pfmdr1 基因的突变,但最近研究显示有 pfcrt/pfmdr1 基因的突变疟原虫毒力较小,那些有 dhfr/dhps 基因的突变的疟原虫对宿主的免疫清除能力更加敏感。在以青蒿素为基础的联合治疗的年代,pfcrt 和 pfmdr1 野生型的突变增加。在非稳定疟疾传播的地区,严重的疟疾流行和重度疟疾都会在半免疫人群中引发很高的死亡率。依据以上的观点,氯喹可用于疟疾的 IPT,并作为可行的控制标准减少成人和儿童疟疾死亡率,但不会减低单一疟疾的发病率。在季节

性和低传播率的疟疾流行区,用氯喹作为周期性预防药物在短期疟疾流行季节会降低成人和儿童脑型疟(CM)的死亡率^[19]。

长效磺胺-乙胺嘧啶(Sulphadoxine-pyrimethamine,SP)经常作为孕妇的IPT药物。氯喹相比较SP有以下优点:1)在有抗药性之前就长期作为一线药使用;2)较少的副作用;3)有益于抗肿瘤坏死因子(TNF- α)的作用,因此部分地对抗脑型疟;4)不被用于与以青蒿素为基础的(Artemisinin-based combination therapies,ACT)联合治疗。氯喹相对于其他抗疟药除有以上优点,价格也相对便宜。但氯喹作为IPT的药物可能会对氯喹抗性株有选择性并加重疟疾贫血。

在非稳定和季节性疟疾流行区域,氯喹的IPT用药政策为在季节性疟疾流行之前给予成人和大于5岁的儿童。以苏丹这一观测点为例,疟疾流行跨度为9月到下一年的1月,IPT的用药为8月的最后一个星期到11月的最后一个星期。大部分脑型疟发生于疟疾流行季节的前半时期,而严重疟疾贫血发生在后半时期^[20]。所以氯喹的IPT用药政策不仅能起预防作用还能降低致死性脑型疟的发生率。

4 结语

我们总结了近几年氯喹抗药性的流行病学及氯喹抗药机制的研究结果,可以帮助我们制定合理的用药策略来控制疟疾的传播。根据各个地区特有的突变类型,运用分子生物学技术,进行临床流行病学的研究。虽然恶性疟原虫普遍对氯喹产生抗药性,但近期研究证明氯喹可用于疟疾的周期性预防疗法。并总结了氯喹相比较长效磺胺-乙胺嘧啶的优点及在预防和治疗严重的恶性疟的作用,以及建议的氯喹IPT的用药政策。

参考文献:

- [1] Nzila A. Inhibitors of de novo folate enzymes in *Plasmodium falciparum* [J]. *Drug Discov Today*, 2006, 11(19-20): 939-944.
- [2] Yang H, Yang Y, Yang P, et al. Monitoring *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance in Yunnan Province, China, 1981-2006 [J]. *Acta Trop*, 2008, 108(1): 44-49.
- [3] 周水森, 王漪, 房文, 等. 2008 年全国疟疾形势 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2009, 27: 455-457.
- [4] Mita T, Tanabe K, Kita K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance [J]. *Parasitol Int*, 2009, 58(3): 201-209.
- [5] Muhamad P, Ruengweeraut R, Chacharoenkul W, et al. Monitoring of clinical efficacy and in vitro sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine in area along Thai Myanmar border during 2009-2010 [J]. *Malar J*, 2011, 10(1): 44.
- [6] Shah NK, Dhillon GP, Dash AP, et al. Antimalarial drug resistance of *Plasmodium falciparum* in India: changes over time and space [J]. *Lancet Infect Dis*, 2011, 11(1): 57-64.
- [7] Dhiman S, Goswami D, Rabha B, et al. Malaria epidemiology along Indo-Bangladesh border in Tripura State, India [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2010, 41(6): 1279-1289.
- [8] Lim P, Wongsrichanalai C, Chim P, et al. Decreased in vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to artesunate, mefloquine, chloroquine, and quinine in Cambodia from 2001 to 2007 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(5): 2135-2142.
- [9] Khatoon L, Baliraine FN, Bonizzoni M, et al. Prevalence of antimalarial drug resistance mutations in *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from a malaria-endemic area of Pakistan [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2009, 81(3): 525-528.
- [10] Menegon M, Talha AA, Severini C, et al. Frequency distribution of antimalarial drug resistance alleles among *Plasmodium falciparum* isolates from Gezira State, central Sudan, and Gedarif State, eastern Sudan [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 83(2): 250-257.
- [11] Laufer MK, Takala-Harrison S, Dzinjalimala FK, et al. Return of chloroquine-susceptible *falciparum* malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites [J]. *J Infect Dis*, 2010, 202(5): 801-808.
- [12] Restrepo-Pineda E, Arango E, Maestre A, et al. Studies on antimalarial drug susceptibility in Colombia, in relation to *Pfmdr1* and *Pfcr1* [J]. *Parasitology*, 2008, 138(5): 547-553.
- [13] Griffing S, Syphard L, Sridaran S, et al. *pfmdr1* amplification and fixation of *pfcr1* chloroquine resistance alleles in *Plasmodium falciparum* in Venezuela [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(4): 1572-1579.
- [14] Lehane AM, van Schalkwyk DA, Valderramos SG, et al. Differential drug efflux or accumulation does not explain variation in the chloroquine response of *Plasmodium falciparum* strains expressing the same isoform of mutant *Pfcr1* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(5): 2310-2318.
- [15] Chaijaroenkul W, Ward SA, Mungthin M, et al. Sequence and gene expression of chloroquine resistance transporter (*pfcr1*) in the association of in vitro drug resistance of *Plasmodium falciparum* [J]. *Malar J*, 2011, 10(1): 42.
- [16] Lehane AM, Kirk K. Chloroquine resistance-conferring mutations in *pfcr1* give rise to a chloroquine-associated H⁺ leak from the malaria parasite's digestive vacuole [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52: 4374-4380.
- [17] Bin Dajem SM, Al-Sheikh AA, Bohol MF, et al. Detecting mutations in *Pfcr1* and *PfMDR1* genes among *Plasmodium falciparum* isolates from Saudi Arabia by pyrosequencing [J]. *Parasitol Res*, 2011, [Epub ahead of print].
- [18] Sutar SK, Gupta B, Ranjit M, et al. Sequence analysis of coding DNA fragments of *pfcr1* and *pfmdr1* genes in *Plasmodium falciparum* isolates from Odisha, India [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011, 106(1): 78-84.
- [19] Giha HA. Prospects of intermittent preventive treatment of adults against malaria in areas of seasonal and unstable malaria transmission, and a possible role for chloroquine [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2010, 11(6): 871-876.
- [20] Giha HA, Elbashir MI, A-Elbasit IE, et al. Bimodal transmission of cerebral malaria and severe malarial anemia and reciprocal co-existence of sexual and asexual parasitemia in an area of seasonal malaria transmission [J]. *Parasitol Res*, 2008, 103(1): 81-85.

收稿日期 2011-06-09 编辑 崔宜庆