

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.11.1249

• 综述 •

恶性疟原虫青蒿素和哌喹耐药的流行现状及机制研究进展

尚晓敏, 张青锋*

同济大学医学院病原生物学教研室, 上海 200092

[摘要] 恶性疟原虫是全球范围内危害重大的寄生虫类传染病病原体之一。青蒿素是抗疟药的首选药物, 目前已在多个国家和地区发现恶性疟原虫对青蒿素及其与哌喹联合用药耐受性。研究已经发现与青蒿素耐药性有关的基因突变, 但哌喹耐药性的机制仍有待进一步研究。本文就近年恶性疟原虫对青蒿素及哌喹耐药的流行现状和分子机制研究进展作一综述。

[关键词] 恶性疟原虫; 青蒿素类; 哌喹; 抗药性

[中图分类号] R 531.3; R 978.61 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)11-1249-06

Resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin derivatives and piperazine: epidemic status and mechanism

SHANG Xiao-min, ZHANG Qing-feng*

Department of Pathogen Biology, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] *Plasmodium falciparum* is one of the main parasitic pathogens worldwide. Artemisinin derivatives are the first-line antimalarial drug. Recently, *Plasmodium falciparum* has been found to be tolerant to the treatment with artemisinin derivatives and its combination with piperazine in several countries and regions. Scientists have found gene mutations associated with resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin derivatives; however the mechanism of piperazine resistance remains to be further studied. This review sums up the epidemic status and mechanism research of the resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin derivatives and piperazine.

[Key words] *Plasmodium falciparum*; artemisinins; piperazine; drug resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(11): 1249-1254]

疟疾是全球性威胁人类生命安全的重要寄生虫传染病之一, 影响范围涉及近百个国家和地区、30多亿人口; 作为最重要的致病病原体, 恶性疟原虫在2016年仍造成2.16亿人患病以及44.5万死亡案例^[1]。在过去的几十年里, 疟疾死亡率已经呈现明显的下降趋势, 这主要归功于疟疾防治工作的加强以及青蒿素联合疗法 (artemisinin-based combination therapy, ACT) 的广泛应用。但是随着抗疟药物的广泛使用, 对药物产生抗性的病原体不可避免地被筛选出来, 包括氯喹、磺胺类耐药性疟原虫等^[2-3]。近些年发现青蒿素耐药性疟疾开始在东南亚传播, 尤其是在柬埔寨地区^[4], 因此预防抗药性疟疾的流行迫在眉睫。本文主要综述了恶性疟原虫耐药的流行现状以及青蒿素、哌喹耐药性研究机制进展。

1 抗疟药的应用历史和现状

药物治疗疟疾已有数百年的历史。19世纪20年代, 研究者从金鸡纳树皮中分离出抗疟成分奎宁, 但因供应不足, 开始寻求其他替代药物; 20世纪50—60年代, 氯喹被广泛用于治疗疟疾且取得良好疗效, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 基于氯喹的大量应用以及传播媒介控制提出了全球根除疟疾计划。这个计划在最初取得极大进展, 但随着时间推移, 1957年在泰国发现了对氯喹耐药的疟原虫, 随后耐药性虫株从南亚扩散至东南亚地区, 20世纪70年代在非洲及北美地区也发现了氯喹耐药性疟原虫^[5]。20世纪70—80年代, 磺胺多辛和乙胺嘧啶在产生氯喹抗药性的疟疾流行地区大量使用, 诱导了疟原虫对

[收稿日期] 2018-06-11 **[接受日期]** 2018-08-17

[基金项目] 国家重点研发计划(2018YFA0507300), 国家自然科学基金(81630063, 31671353)。Supported by National Key Research and Development Plan (2018YFA0507300) and National Natural Science Foundation of China (81630063, 31671353)。

[作者简介] 尚晓敏, 博士生。E-mail: elma0701@hotmail.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-65985138, E-mail: qfzhangsh@aliyun.com

叶酸拮抗剂类药物产生耐药性^[2]。20世纪90年代末,撒哈拉以南的非洲地区因疟疾死亡的病例每年超过100万人^[6-7]。鉴于疟疾在全球范围内对人类生命安全的巨大威胁,科研人员及相关企业积极致力于研发疟疾特效药。

1972年我国的科研人员从黄花蒿中提取出青蒿素,发现它对恶性疟原虫有明显的抑制作用。随后,瑞士诺华公司在我国科研成果基础上研发出第1代ACT,即青蒿素和苯芴醇联合疗法。2000-2001年,这种新联合疗法同时辅以传播媒介控制措施在南非的大规模应用取得巨大成功,疟疾死亡率在1年内下降了87.5%^[8]。2001年,为了防止单一用药可能带来的潜在耐药风险,WHO呼吁广大疟疾流行国家禁止采用青蒿素单一疗法^[9]。目前5种不同的ACT[双氢青蒿素-哌喹联合疗法

(DHA-PPQ)、青蒿琥酯-甲氟喹联合疗法(AS-MQ)、蒿甲醚-苯芴醇联合疗法、青蒿琥酯-磺胺多辛/乙胺嘧啶联合疗法、青蒿琥酯-阿莫地喹联合疗法]被广泛应用于疟疾流行的国家,这5种疗法是以青蒿素及其衍生物为基础,辅以一种半衰期较长的二线药物。ACT最初在全球范围内获得了成效,但是近年来部分地区已经开始出现青蒿素耐药迹象。为防止耐药性疟疾的扩散,对耐药性虫株进行实时监测十分必要,分子标志物是重要的检测靶标。目前已发现产生耐药性的药物及相应的分子标志物有奎宁(Pfcr, Pfmdr-1, Pfnhe-1)、磺胺多辛(Pfdhps)、氯喹(Pfcr, Pfmdr-1)、阿莫地喹(Pfcr, Pfmdr-1)以及阿托伐醌(Pfcytb)等^[10-17]。近年研究者还发现青蒿素耐药性疟疾与Kelch13蛋白关系密切^[18]。见表1。

表1 恶性疟原虫耐药的抗疟药物及其分子标志物

Tab 1 Antimalarial drugs tolerant by *Plasmodium falciparum* and the corresponding molecular markers

Antimalarial drug	Introduced time	First report of resistance time	Molecular marker	Drug sensitivity <i>in vitro</i> or threshold for resistance
Quinine ^[10]	1632	1908	Pfcr, Pfmdr-1, Pfnhe-1	IC ₅₀ >500-800 nmol/L
Sulfadoxine ^[11]	1937	1970s	Pfdhps	
Proguanil ^[12]	1940s	1949	Pfdhfr	IC ₅₀ >15 nmol/L
Pyrimethamine ^[11]	1940s	1952	Pfdhfr	IC ₅₀ >100 nmol/L
Chloroquine ^[13]	1945	1957	Pfcr, Pfmdr-1	IC ₅₀ >100 nmol/L
Amodiaquine ^[14]	1945	1970s	Pfcr, Pfmdr-1	IC ₅₀ >80 nmol/L
Piperaquine ^[15]	1960s	1980s	Pfcr, Pfplm2/3	Survival rate>10% in the PSA
Artemisinin derivatives ^[18]	1980s	2008	<i>PfK13</i> gene mutations at codons	Survival rate>1% in the RSA
Mefloquine ^[16]	1984	1991	Pfmdr-1	IC ₅₀ >30 nmol/L
Atovaquone ^[17]	1996	1996	Pfcytb	IC ₅₀ >10 nmol/L

Pfcr: *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter; Pfmdr-1: *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1; Pfnhe-1: *Plasmodium falciparum* sodium/hydrogen exchanger gene 1; Pfdhps: *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase; Pfdhfr: *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase; Pfplm2/3: *Plasmodium falciparum* plasmepsin 2/3; PfK13: *Plasmodium falciparum* Kelch 13; Pfcytb: *Plasmodium falciparum* cytochrome b; IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration; PSA: Piperaquine survival assay; RSA: Ring-stage survival assay

疟疾的成功控制甚至消除依赖于有效的抗疟药物。DHA-PPQ联合疗法是目前疟疾流行区应用最广泛的治疗方法,随着青蒿素耐药性的产生,DHA-PPQ联合疗法治疗有效性逐渐下降。在没有其他有效抗疟药可以替代的情况下,青蒿素耐药性的产生是对现已取得的控制和消除疟疾成绩的一次冲击,尤其是对联合药物哌喹产生耐药性更让根除疟疾的计划受到严峻挑战。

2 青蒿素耐药性疟疾的产生和研究现状

2.1 青蒿素耐药性的产生

疟原虫抗药性是指在抑制或者杀灭同种疟原虫繁殖的药物浓度下,疟原虫虫株仍能继续存活及繁殖的能力,在临床上表现为疟原虫延迟清除和疟原虫清除半衰期延长。

2008年,柬埔寨西部报道了第1例对青蒿素产生耐药性的疟疾^[4]。2009年,此消息被证实,青蒿素抗药性疟疾随后又在泰国、缅甸、越南以及中国被报道^[19]。2017年,我国发现1例从非洲归国的输入型疟疾有明显的青蒿素耐药性,因此,青蒿素耐药性疟疾极有可能像氯喹耐药性疟疾一样正逐渐向非洲扩散^[20]。

2.2 青蒿素耐药性研究方法

传统的青蒿素耐药性研究方法是通过计算双氢青蒿素(dihydroarteminin, DHA)抑制疟原虫生长达50%时的药物浓度(IC₅₀)作为恶性疟原虫青蒿素耐药性的指标,体外实验和体内实验均未发现疟原虫清除率半衰期与DHA IC₅₀值之间有相关性^[21-23]。造成这一结果的可能原因是青蒿素在人体

内半衰期很短, 在这些实验中疟原虫暴露在低浓度 DHA (≤ 64 nmol/L) 下达 48~72 h, 而在人体内疟原虫通常暴露在高浓度药物下仅 1~2 h。之后一种新的实验方法环期生存分析 (ring-stage survival assay, RSA) 被提出, 即早期严格筛选获得 0~3 h 环期疟原虫, 将 DHA 药物浓度控制在 700 nmol/L 并处理早期环状体疟原虫 6 h, 然后去除药物, 继续培养疟原虫 66 h 后观察其生存情况, 此方法帮助研究人员成功观测到体外实验时疟原虫对青蒿素耐药性产生的有意义的表型; 结果显示体外培养疟原虫对青蒿素敏感性与疟原虫生长阶段有关, 尤其是在早期环状体阶段 (0~3 h), 青蒿素药物敏感性降低尤为显著^[24]。这一结果进一步证明临床结果与 DHA 的 IC_{50} 值间无相关性, 疟原虫通过进入发育静止状态 (休眠现象) 来躲避短时间的药物的作用, 与之前的研究青蒿素耐药性疟原虫有较长的环期且代谢活动降低的结果一致, 也侧面印证了已经报道的青蒿素治疗恶性疟疾有效性降低的事实^[25]。

2.3 青蒿素耐药性分子机制研究 对青蒿素耐药性分子标志物及其机制的发现和研究的发现是延缓耐药性传播的关键。青蒿素类抗疟药作为治疗疟疾的前体药, 它的内过氧化物环可被疟原虫释放的含铁血红素裂解释放活性氧基, 进而使疟原虫生长过程中必须的蛋白烷基化失活, 对各时期的疟原虫均有致死作用^[26-27]。近年的蛋白质组学研究显示青蒿素的作用靶点很多, 蛋白质大环境的改变导致病原体的迅速死亡。关于青蒿素耐药性机制的观点主要有如下 2 种。

研究人员将一种非洲品系 F32-ART5 虫株暴露在高浓度药物下达 5 年之久后对其外显子进行测序, 发现相比于同样条件下无药物作用培养的单克隆虫株, 前者在 7 个基因上产生了 8 个突变^[16]。此外, 研究人员又从柬埔寨获得 49 个虫株, 分别将其暴露在治疗药物浓度下 22、40 和 59 个生活周期, 观测这几个突变出现的先后顺序。结果发现体外培养疟原虫对青蒿素的敏感性与 13 号染色体上 *Kelch* 基因 (*K13*, PF3D7_1343700) 的突变有关^[28]。恶性疟原虫 *K13* 编码基因 (*Plasmodium falciparum Kelch 13 gene*, *PfK13*) 是一个单个外显子基因, 编码包含 726 个氨基酸的蛋白, 其中含 3 个结构域, 分别为疟原虫特殊顶复门原虫结构域、BTB/POZ 结构域以及 *Kelch* 结构域。在野生型疟原虫中, BTB 结构域促进二聚作用, *Kelch* 结构域可结合到特异基质上加快泛素化以及蛋白酶体降解, 当 *Kelch* 结构域突变时, 蛋白结合作用降低, 进而泛素化和靶定蛋白水解作用降低, 最终导致基质增多聚集及哺乳动物自身内环境失调^[29]。

Mbengue 等^[30]近年在 *K13* 突变介导的青蒿素耐药性方面取得新的研究进展, 研究发现青蒿素可以抑制恶性疟原虫磷脂酰肌醇-3-激酶 (*Plasmodium falciparum* phosphatidylinositol-3-kinase, PfPI3K) 表达水平, 而在 C580Y 突变体中 PfPI3K 结合水平和泛素化水平降低, 导致 PfPI3K 和它的产物磷脂酰肌醇-3-磷酸 (phosphatidylinositol-3-phosphate, PI3P) 增多, 因此 PI3P 水平可以间接反映恶性疟原虫青蒿素耐药性, 甚至可以作为潜在临床生物化学指标来指导患者病情。在其他突变虫株 (R539T 除外) 中, PfPI3K 结合受到的影响依旧未知, 但是 *K13* 突变介导的基质水平增高相关的耐药机制值得进一步研究。

另一种恶性疟原虫耐药性机制是未折叠蛋白应答机制, 未折叠蛋白应答机制是真核细胞中控制蛋白折叠质量的机制之一。青蒿素的药物活性主要来自于内过氧化物桥, 近年研究显示青蒿素作用下释放的自由基并没有特定的靶点, 而是随机插入病原体蛋白导致疟原虫蛋白构象改变^[30]。蛋白构象恢复需要错误折叠蛋白和有毒蛋白聚合的消除以及新蛋白翻译、转位、折叠和运输后进行替换等。大样本青蒿素耐药性恶性疟原虫转录组研究发现活性氧化应激复合物 (reactive oxidative stress complex, ROSC) 和 T 复合蛋白 1 环状复合物 (T-complex protein 1 ring complex, TRiC) 的转录增加与耐药性有关^[31]。研究显示这 2 种分子伴侣蛋白复合物表达增加可以减缓毒性蛋白在内质网和细胞质中的聚集, 其中 ROSC 可以加快蛋白酶体清除, TRiC 可以重建蛋白正确折叠; 2 种蛋白复合物的增加加快了疟原虫的自我修复, 使部分突变虫株逃脱药物杀灭作用^[32]。

尽管近年来我们对疟原虫的了解逐渐加深, 但是恶性疟原虫 *K13* 基因突变涉及的分子机制依旧有待于进一步研究。并非所有的 *K13* 基因突变都能导致疟原虫青蒿素耐药性, *K13* 突变可能只是青蒿素耐药性的机制之一^[33]。也有学者认为, 青蒿素药物作用靶点是非特异性的, 因此单个药物靶点上的突变不太可能产生非常明显的耐药性效果^[34]。新的筛查工具、研发新型药物以及积极的应对措施是人类防止疟原虫耐药性扩散的重要手段。

3 哌喹耐药性疟疾的产生和研究现状

3.1 哌喹耐药性的产生 哌喹耐药性最早出现于 20 世纪 80 年代, 因其药物半衰期较长, 在 ACT 广泛应用后作为青蒿素类抗疟药的联合用药在临床上起到很好的治疗效果, 一直是一线抗疟用药方法^[35]。近几十年来, 泰国-柬埔寨边境是疟疾抗药性发生的中心地带, 这个地区先后见证了氯喹、磺

胺多辛-乙胺嘧啶以及甲氟喹等药物耐药性发生的历史。2010年,柬埔寨将DHA-PPQ作为临床一线疗法。然而近年来随着青蒿素耐药性的产生以及它从柬埔寨到相邻地区和国家的播散,DHA-PPQ治疗有效性也明显下降至40%,预示DHA-PPQ耐药性已经发生^[22]。

3.2 哌喹耐药性研究方法 体外实验发现,从不同患者外周血中分离出的疟原虫在同样培养条件下用哌喹治疗,疟疾复发患者外周血中分离出的虫株 IC_{50} 值高于被治愈患者,然而并无直接证据可以证明 IC_{50} 值与哌喹耐药性之间的必然关系^[21]。为了克服传统实验的局限性,近年有学者提出一种新的实验方法——哌喹生存分析(piperaquine survival assay, PSA),这个实验使用从患者外周血中新鲜分离出的虫株或体外培养虫株,将其暴露在模仿人体内哌喹治疗药物浓度(200 nmol/L)下48 h,结果表明抗药性虫株与敏感性虫株之间的生存率差异有统计学意义,其中抗药性虫株生存率 $\geq 10\%$;在K13突变虫株中发现,PSA实验的虫株生存率 $\geq 10\%$ 时,感染相应虫株的患者疟疾复发率较感染药物敏感虫株的患者复发率风险高32倍^[36]。

3.3 哌喹耐药性分子机制研究 体外PSA实验为鉴定哌喹耐药性分子标志物提供了可靠的工具,因此关于哌喹耐药性分子机制的研究越来越深入。Amato等^[37]对来源于柬埔寨的297株恶性疟原虫进行全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS),研究了11 630个外显子单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)与43个体外哌喹 IC_{50} 值时的拷贝数异常变化(copy number variations, CNVs)之间的关系,发现在*exo-E415G*突变虫株中,位于14号染色体上的plasmepsin 2和plasmepsin 3表达量相对增加,鉴于哌喹通过抑制血红蛋白转化为疟色素来达到杀灭病原体的作用,且plasmepsin 2和plasmepsin 3参与血红蛋白转化为疟色素的过程,因此plasmepsin 2/3是最有可能与哌喹耐药性相关的分子标志物。Witkowski等^[38]的研究也得到相似结论,证明plasmepsin 2/3在哌喹耐药性虫株中扮演着极为重要的角色。在其他体外实验中,研究人员发现携带单拷贝Pfmdr-1的虫株与哌喹耐药性相关,有哌喹耐药性的虫株均有单拷贝Pfmdr-1,而携带单拷贝Pfmdr-1的虫株未必对哌喹耐药,因此Pfmdr-1与哌喹耐药性之间并无明确的关联^[39]。病原体内部控制代谢流入流出的泵——Pfmdr-1可能在疟原虫药物敏感性方面扮演了重要角色,可能机制是Pfmdr-1在哌喹进入消化

液泡到达药物作用靶点的过程中起作用,这为寻找哌喹耐药性的分子标志物提供了思路。Bopp等^[40]通过改进PSA实验,对来自柬埔寨的哌喹耐药性虫株进行分析发现plasmepsin 2/3拷贝数变异在哌喹耐药性产生过程中的作用远大于Pfmdr-1,值得深入研究。

4 小结与展望

疟疾仍然是威胁全世界人民生命安全的重大传染病之一,DHA-PPQ作为抗疟的一线用药,近年来在东南亚地区的疟疾治疗效果出现下降趋势,究其根本原因是青蒿素耐药性的产生且伴随着联合用药哌喹耐药性的产生。目前与青蒿素耐药性关系最密切的是编码K13蛋白基因的突变,包括C580Y、R539T等,且主要的突变虫株PfK13-C580Y正在扩散。与哌喹耐药性有关的分子主要是plasmepsin 2/3,该分子通过干扰哌喹抑制病原体自身的解毒作用使药效降低。对DHA-PPQ耐药机制的研究有利于控制现有耐药性的传播以及相应对策的制定,针对某些地区已产生抗药性的病原体,现有抗疟药的新使用方法可以提升治疗有效率,如在产生耐药性的地区暂时转换其他的药物。从长远看,这种方法不会一直有效,极有可能会诱发恶性疟原虫的双重耐药^[41]。另一种方法是延长治疗疗程,但是疗效不能保证。最终,研究人员还是要致力于研发新型抗疟药,这才是对已经产生耐药性虫株的根本解决方案。尽管目前已合成一些有望成为新型抗疟药的化合物,但大多处于实验阶段,近期还无法应用于临床。例如有国内学者通过结构生物学研究首次揭示了恶性疟原虫氧化还原辅酶NADH(NADH-ubiquinone oxidoreductase of *Plasmodium falciparum*, PfNDH2)蛋白的晶体结构并尝试以PfNDH2为靶点设计相应的抑制剂达到治疗疟疾的目的,该方案已在动物实验及体外培养实验中取得较好的效果^[42]。这种策略可能会成为新型抗疟药物研制的新方向之一。此外,研究发现PI4K抑制剂可以高效抑制对青蒿素产生耐药性的休眠体的形成,可以考虑作为抗疟新药的备选^[43]。O'Neill等^[44]发现针对PfK13 C580Y突变虫株的四氧分子E209有明显的对抗青蒿素耐药作用,为青蒿素耐药性疟疾治疗提供了一线曙光。另外,值得指出的是:当今最有希望的疟疾候选疫苗(RTS、S/AS01)已在非洲不同国家和地区完成了多个临床试验^[45],但是该疫苗的免疫保护效果在不同人群中不稳定且免疫保护能力消失很快,因此使用局限性大^[46]。

青蒿素以及其联合药物哌喹耐药性的产生势必会对全球消除疟疾带来一定的冲击, 尤其是对已经有耐药性扩散趋势的地区, 因此必须实行有效的分子标志物监测。抗疟药耐药性分子标志物的确定是目前研究过程中的一个极大挑战, 它可以帮助我们提前预知耐药性的出现和流行, 示警相关政策制定人员及时采取应对措施。随着高通量测序、基因操作等新技术的发展, 相信越来越多的耐药性分子机制会逐渐被发现, 避免 20 世纪 80 年代非洲氯喹耐药性疟疾流行的悲剧事件重新上演。

[参 考 文 献]

- [1] World Health Organization. World malaria report 2017[EB/OL]. (2017-11-09)[2018-05-30]. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/en/>.
- [2] EYLES D E, HOO C C, WARREN M, SANDOSHAM A A. *Plasmodium falciparum* resistant to chloroquine in Cambodia[J]. Am J Trop Med Hyg, 1963, 12: 840-843.
- [3] HÖFLER W. [Sulfadoxine-pyrimethamine resistant falciparum malaria from Cambodia][J]. Dtsch Med Wochenschr, 1980, 105: 350-351.
- [4] NOEDL H, SE Y, SCHAECHER K, SMITH B L, SOCHEAT D, FUKUDA M M, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia[J]. N Engl J Med, 2008, 359: 2619-2620.
- [5] PAYNE D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*[J]. Parasitol Today, 1987, 3: 241-246.
- [6] MITA T, TANABE K, KITA K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance[J]. Parasitol Int, 2009, 58: 201-209.
- [7] ROPER C, PEARCE R, NAIR S, SHARP B, NOSTEN F, ANDERSON T. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria[J/OL]. Science, 2004, 305: 1124. doi: 10.1126/science.1098876.
- [8] MUHEKI C, MCINTYRE D, BARNES K I. Artemisinin-based combination therapy reduces expenditure on malaria treatment in KwaZulu Natal, South Africa[J]. Trop Med Int Health, 2004, 9: 959-966.
- [9] World Health Organization. Antimalarial Drug Combination Therapy[EB/OL]. [2018-05-30]. http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_rbm_2001_35/en/.
- [10] OKOMBO J, OHUMA E, PICOT S, NZILA A. Update on genetic markers of quinine resistance in *Plasmodium falciparum*[J]. Mol Biochem Parasitol, 2011, 177: 77-82.
- [11] SAHU B, BARIK T K, DHIMAN R C. Analysis of sulphadoxine-pyrimethamine drug resistance in *Plasmodium falciparum* from Khurda District of Odisha, India[J]. Res J Pharm Biol Chem Sci, 2015, 6: 1270-1277.
- [12] SIVAPRAKASAM P, TOSSO P N, DOERKSEN R J. Structure-activity relationship and comparative docking studies for cycloguanil analogs as PfDHFR-TS inhibitors[J]. J Chem Inf Model, 2009, 49: 1787-1796.
- [13] BUPPAN P, SEETHAMCHAI S, KUAMSAB N, HARNYUTTANAKORN P, PUTAPORNTIP C, JONGWUTIWES S. Multiple novel mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene during implementation of artemisinin combination therapy in Thailand[J]. Am J Trop Med Hyg, 2018, 99: 987-994.
- [14] APINJOH T O, MUGRI R N, MIOTTO O, CHI H F, TATA R B, ANCHANG-KIMBI J K, et al. Molecular markers for artemisinin and partner drug resistance in natural *Plasmodium falciparum* populations following increased insecticide treated net coverage along the slope of mount Cameroon: cross-sectional study[J/OL]. Infect Dis Poverty, 2017, 6: 136. doi: 10.1186/s40249-017-0350-y.
- [15] DONDORP A M. New genetic marker for piperazine resistance in *Plasmodium falciparum*[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17: 119-121.
- [16] ARIEY F, WITKOWSKI B, AMARATUNGA C, BEGHAIN J, LANGLOIS A C, KHIM N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria[J]. Nature, 2014, 505: 50-55.
- [17] WILSON C M, VOLKMAN S K, THAITHONG S, MARTIN R K, KYLE D E, MILHOUS W K, et al. Amplification of pfmdr1 associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium-falciparum* from Thailand[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 57: 151-160.
- [18] KORSINCZKY M, CHEN N H, KOTECKA B, SAULA A, RIECKMANN K, CHENG Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44: 2100-2108.
- [19] HTUT Z W. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria[J]. N Engl J Med, 2009, 361: 1807-1808.
- [20] LU F, CULLETON R, ZHANG M, RAMAPRASAD A, VON SEIDLEIN L, ZHOU H, et al. Emergence of indigenous artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa[J]. N Engl J Med, 2017, 376: 991-993.
- [21] AMARATUNGA C, LIM P, SUON S, SRENG S, MAO S, SOPHA C, et al. Dihydroartemisinin-piperazine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study[J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16: 357-365.
- [22] SPRING M D, LIN J T, MANNING J E, VANACHAYANGKUL P, SOMETHY S, BUN R, et al. Dihydroartemisinin-piperazine failure associated with a triple mutant including kelch13 C580Y in Cambodia: an observational cohort study[J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15: 683-691.
- [23] SAUNDERS D L, VANACHAYANGKUL P, LON C; U.S. Army Military Malaria Research Program; National Center for Parasitology, Entomology, and Malaria Control (CNM); Royal Cambodian Armed Forces. Dihydroartemisinin-piperazine failure in Cambodia[J]. N Engl J Med, 2014, 371: 484-485.
- [24] WITKOWSKI B, AMARATUNGA C, KHIM N, SRENG S, CHIM P, KIM S, 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: 1043-1049.
- [25] MOK S, IMWONG M, MACKINNON M J, SIM J, RAMADOSS R, YI P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* is associated with an altered temporal pattern of transcription[J/OL]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 391. doi: 10.1186/1471-2164-12-391.
- [26] ISMAIL H M, BARTON V, PHANCHANA M, CHAROENSUTTHIVARAKUL S, WONG M H, HEMINGWAY J, et al. Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 2080-2085.
- [27] WANG J, ZHANG C J, CHIA W N, LOH C C, LI Z, LEE Y M, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*[J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6: 10111. doi:10.1038/ncomms10111.
- [28] CHEESEMAN I H, MILLER B A, NAIR S, NKHOMA S, TAN A, TAN J C, et al. A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria[J]. *Science*, 2012, 336: 79-82.
- [29] GUPTA V A, BEGGS A H. Kelch proteins: emerging roles in skeletal muscle development and diseases[J/OL]. *Skeletal Muscle*, 2014, 4: 11. doi:10.1186/2044-5040-4-11.
- [30] MBENGUE A, BHATTACHARJEE S, PANDHARKAR T, LIU H N, ESTIU G, STAHELIN R V, et al. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria[J]. *Nature*, 2015, 520: 683-687.
- [31] DOGOVSKI C, XIE S C, BURGIO G, BRIDGFORD J, MOK S, MCCAW J M, et al. Targeting the cell stress response of *Plasmodium falciparum* to overcome artemisinin resistance[J/OL]. *PLoS Biol*, 2015, 13: e1002132. doi: 10.1371/journal.pbio.1002132.
- [32] MOK S, ASHLEY E A, FERREIRA P E, ZHU L, LIN Z, YEO T, et al. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance[J]. *Science*, 2015, 347: 431-435.
- [33] MIOTTO O, AMATO R, ASHLEY E A, MACINNIS B, ALMAGRO-GARCIA J, AMARATUNGA C, et al. Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*[J]. *Nat Genet*, 2015, 47: 226-234.
- [34] WANG J G, XU C C, LUN Z R, MESHNICK S R. Unpacking 'Artemisinin Resistance'[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38: 506-511.
- [35] EASTMAN R T, DHARIA N V, WINZELER E A, FIDOCK D A. Piperaquine resistance is associated with a copy number variation on chromosome 5 in drug-pressured *Plasmodium falciparum* parasites[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55: 3908-3916.
- [36] DURU V, KHIM N, LEANG R, KIM S, DOMERGUE A, KLOEUNG N, et al. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperaquine failures in Cambodia are associated with mutant *K13* parasites presenting high survival rates in novel piperaquine *in vitro* assays: retrospective and prospective investigations[J/OL]. *BMC Med*, 2015, 13: 305. doi: 10.1186/s12916-015-0539-5.
- [37] AMATO R, LIM P, MIOTTO O, AMARATUNGA C, DEK D, PEARSON R D, et al. Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperaquine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17: 164-173.
- [38] WITKOWSKI B, DURU V, KHIM N, ROSS L S, SAINTPIERRE B, BEGHAIN J, et al. A surrogate marker of piperaquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17: 174-183.
- [39] LIM P, DEK D, TRY V, EASTMAN R T, CHY S, SRENG S, et al. *Ex vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in western, northern, and eastern Cambodia, 2011-2012: association with molecular markers[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57: 5277-5283.
- [40] BOPP S, MAGISTRADO P, WONG W, SCHAFFNER S F, MUKHERJEE A, LIM P, et al. Plasmepsin II-III copy number accounts for bimodal piperaquine resistance among Cambodian *Plasmodium falciparum*[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9: 1769. doi: 10.1038/s41467-018-04104-z.
- [41] DENIS M B, TSUYUOKA R, LIM P, LINDEGARDH N, YI P, TOP S N, et al. Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia[J]. *Trop Med Int Health*, 2006, 11: 1800-1807.
- [42] YANG Y, YU Y, LI X, LI J, WU Y, YU J, et al. Target elucidation by cocrystal structures of NADH-ubiquinone oxidoreductase of *Plasmodium falciparum* (PfNDH2) with small molecule to eliminate drug-resistant malaria[J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 1994-2005.
- [43] DEMBELE L, ANG X, CHAVCHICH M, BONAMY G M C, SELVA J J, LIM M Y, et al. The Plasmodium PI(4)K inhibitor KDU691 selectively inhibits dihydroartemisinin-pretreated *Plasmodium falciparum* ring-stage parasites[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 2325. doi: 10.1038/s41598-017-02440-6.
- [44] O'NEILL P M, AMEWU R K, CHARMAN S A, SABBANI S, GNADIG N F, STRAIMER J, et al. A tetraoxane-based antimalarial drug candidate that overcomes PfK13-C580Y dependent artemisinin resistance[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15159. doi: 10.1038/ncomms15159.
- [45] RTS,S Clinical Trials Partnership, AGNANDJI S T, LELL B, FERNANDES J F, ABOSSOLO B P, et al. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367: 2284-2295.
- [46] NEAFSEY D E, JURASKA M, BEDFORD T, BENKESER D, VALIM C, GRIGGS A, et al. Genetic diversity and protective efficacy of the RTS,S/AS01 malaria vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373: 2025-2037.