

青蒿素：从抗疟机理与积累模式到临床应用

——2015年诺贝尔生理学或医学奖简介

曾庆平

广州中医药大学热带医学研究所, 广州 510405

摘要 以解读2015年度诺贝尔生理学或医学奖为契机,重点介绍了获奖者之一——中国药学家屠呦呦的科学贡献。通过切入相关研究动态与进展,初步揭示了青蒿素抗疟及疟原虫耐药的分子机理。从描述青蒿素天然合成规律到青蒿素人工合成现状,前瞻性地展望了青蒿素研究的未来,强调了青蒿素获奖给后人带来的启示。

关键词 青蒿素;抗疟疾;耐药性;新药开发;合成生物学

2011年,中国药学家屠呦呦因发现青蒿素获得素有“美国诺贝尔奖”之称的拉斯克-德贝基临床医学奖。作为诺贝尔奖“风向标”的拉斯克奖获得者,屠呦呦年年都被预测能获诺贝尔奖,但这样的预言却年年落空。

正当获奖可能性几乎被人淡忘之后,瑞典卡罗林斯卡医学院却出其不意地宣布,将2015年诺贝尔生理学或医学奖一分为二,一半奖给青蒿素发现者屠呦呦,另一半由阿维菌素发明人William C. Campbell和Satoshi Ōmura共同分享(图1)。

自诺贝尔奖设立115年以来,第一次把这个诺贝尔奖颁给中国女科学家,第一次把自然科学奖颁给中国本土科学家,第一次让本土中国人获得生理学或医学奖。2015年10月5日,屠呦呦一举创造了诺贝尔奖历史上的3个第一!

鲜为人知的是,2015年6月4日,屠呦呦还获得由沃伦·阿尔伯特奖励基金会颁发的2015年度沃伦·阿尔伯特奖,同样表彰她在抗疟领域做出的突出贡献。



从左向右依次为William C. Campbell、Satoshi Ōmura和屠呦呦
(图片来源: <http://www.nobelprize.org>)

图1 2015年诺贝尔生理学或医学奖的3位获得者

1 青蒿素的获奖理由是什么?

正如诺贝尔奖网站披露的颁奖词所说:“诺贝尔生理学或医学奖授予屠呦呦是因为她发现了一种抗疟疾新疗法”,也就是屠呦呦首先发现的青蒿素导致疟疾治疗方法的革新。这说明4年前拉斯克-德贝基临床医学奖的颁奖理由同样得到诺贝尔奖评委会的认可:屠呦呦“第一个把青蒿素带到青蒿素项目组,第一个提取出有100%抑制率的青蒿素,第一个做了青蒿素抗疟临床实验”。

青蒿素之所以屡获巨奖,是因为它的问世挽救了数百万濒临死亡的疟疾患者的生命,是当之无愧的“救命药”。青蒿素的另一个可贵之处是,它能攻克抗氯喹疟原虫感染所致的疟疾,也能对付多药耐药(multidrug resistant)疟疾,而且几十年来仍然保持奇高的治愈率,成为为数不多的抗疟药中一枝独秀的“奇葩”!更神奇的是,正当抗氯喹疟原虫肆虐而让疟疾患者无药可救时,青蒿素犹如“及时雨”般地横空出世,令世人叹为观止!



2 疟原虫对青蒿素会产生耐药性吗?

理论上,任何药物在长期应用过程中若使用不当都可能会出现敏感性降低和耐药性提高乃至药效逐渐丧失的结局。为此,世界卫生组织强调,对疟疾不可采用青蒿素单药治疗,并推荐使用基于青蒿素的联合治疗(artemisinin-based combination therapies, ACTs)^[1],它实际上是由速效抗疟药青蒿琥酯或蒿甲醚与长效抗疟药甲氟喹或本苄醇组成的复方抗疟药。

最近几年来,东南亚各国相继发现青蒿素复方耐药性病例,即青蒿素复方治疗依然有效,但疟原虫的敏感性有所降低,从5 h内清除50%疟原虫延长至5 h以上(图2)。同时,疟原虫的复燃率有所提高,从原来的5%上升至15%~20%^[2,3]。据疟疾临床专家李国桥教授介绍,造成青蒿素复方复燃率升高的原因并不是疟原虫对青蒿素产生抗性,而是疟原虫对与之配伍的长半衰期抗疟药敏感性降低。

李国桥还引述掌握的疟原虫体外

抗性筛选数据来支持自己的观点:当疟原虫在添加本苄醇的培养基上传递20~30代时,抗性指数可达到100,传递200代后,抗性指数更高达400。相反,若将本苄醇与蒿甲醚合用,则疟原虫的抗性指数始终保持在40~60不变,而蒿甲醚的抗性指数最高也不会超过10。

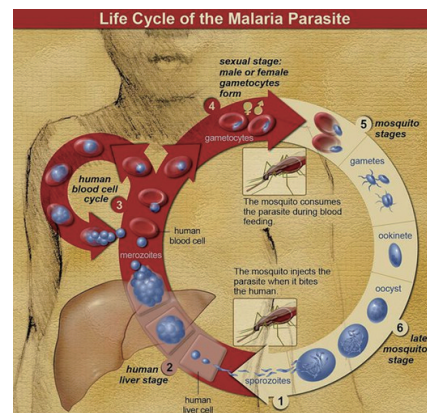
为什么疟原虫不易对青蒿素产生耐药性呢?这要从青蒿素分子中特有的“过氧桥”(peroxide bridge)说起,因为这个—O—O—结构被公认为青蒿素杀灭疟原虫的关键因素。以往研究发现,凡是抗氧化剂(如维生素E生育酚、维生素C抗坏血酸、谷胱甘肽、二硫苏糖醇等)都能降低青蒿素的活性,凡是促氧化剂(如维生素B2核黄素、维生素K甲萘醌等)都能提高青蒿素的活性^[4]。同时,抗氧化酶抑制剂可提高青蒿素的抗疟活性^[5],暗示青蒿素活性与氧化—抗氧化平衡动态有关。

由于青蒿素作用十分迅速,疟原虫根本来不及诱导抗氧化酶及抗氧化剂的合成。同时,红细胞本身不含细胞核,没有染色体和基因组,也就不可能

上调抗氧化酶基因的表达。因此,红细胞与栖身其中的疟原虫因缺乏足够的抗氧化活性物质保护,几乎不可能抵御青蒿素的凌厉攻势,一旦遭遇必陷灭顶之灾。

3 青蒿素为何能杀灭疟原虫?

疟原虫可寄生于人体的肝细胞和红细胞中(图3)。虽然青蒿素抗疟疾的分子机制仍不明确,但青蒿素依赖过氧桥的自由基形成并发挥抗疟作用是明确的。以前有人认为,青蒿素主要作用于疟原虫吞食血红蛋白后产生的疟色素(hemozoin),疟色素中的螯合铁可以使青蒿素的过氧桥还原,从而大量形成氧自由基杀死疟原虫^[6]。另一种理论认为,青蒿素可能打破细胞的氧化还原循环,因为青蒿素能抑制疟原虫消化泡膜上的谷胱甘肽-S-转移酶^[7]。



(图片来源: <https://www.niaid.nih.gov/topics/Malaria/Pages/lifecycle.aspx>)

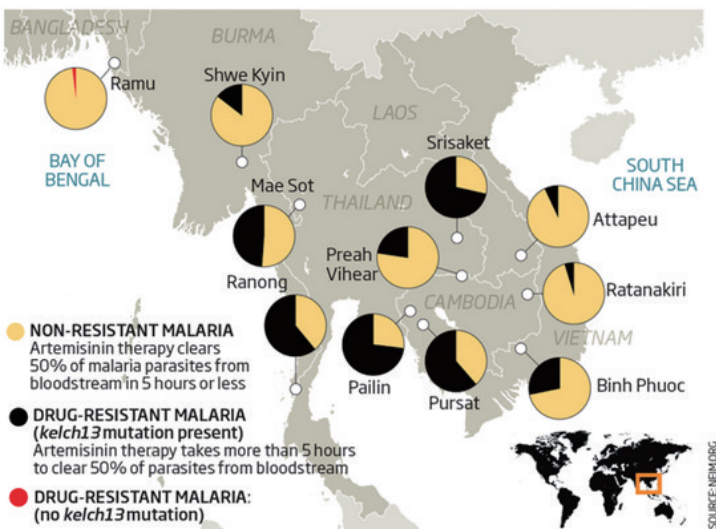
图3 疟原虫的生活史

有人以酵母为模型研究青蒿素作用机理,结果发现青蒿素靶向酵母菌的线粒体,其中的电子传递链可激活青蒿素释放活性氧自由基(ROS),导致线粒体膜去极化^[8]。随后的研究证实,青蒿素只攻击疟原虫的线粒体,而且作用于线粒体时并不抑制呼吸中的电子传递,表明青蒿素作用的特异性可能源于自我催化^[9]。

最近有人提出一个新的假说,认为氧自由基导致疟原虫ATP酶(PfATP6)受到抑制,由此阻断其能量代谢过程而致死^[10]。PfATP6被确认为青蒿素作用

Resistance strikes again

Artemisinin, our most effective antimalarial, is losing its potency in South-East Asia. Testing the parasite for mutations in the *kelch13* gene can quickly identify who has the resistant form - and hopefully help stop it spreading



(图片来源: <https://www.newscientist.com/article/mg22329822.900-blood-test-identifies-people-with-resistant-malaria?full=true&print=true>)

图2 东南亚各国青蒿素抗性疟疾的分布概况

图2 东南亚各国青蒿素抗性疟疾的分布概况

靶点的证据是:青蒿素也能抑制哺乳动物钙 ATP 酶 (SERCA)^[11]; PfATP6 与 SERCA 突变能调节对青蒿素的敏感性^[12];用去污剂使 PfATP6 与 SERCA 液化,两者对青蒿素都不敏感^[13]。

4 青蒿为何积累青蒿素?

青蒿素是从青蒿 (*Artemisia annua* L.) 中提取出来的单体化合物 (图 4), 而野生青蒿广泛分布在世界各地, 只不过中国云贵川地区的青蒿富含青蒿素, 如四川西阳青蒿中所含有的青蒿素比其他地区高出 10 倍以上。因此, 可以说, 高产青蒿素的青蒿是中国独有的“土特产”, 中国也当之无愧地成为世界上最大的青蒿素原料出口国。

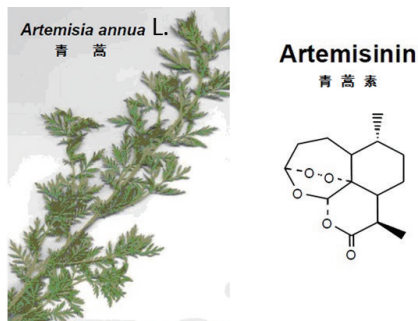


图 4 青蒿及青蒿素分子结构

青蒿素属于倍半萜类化合物, 根据此类化合物可能充当植物抗逆成分的观点^[14], 推测青蒿素可能是生物胁迫 (biotic stress, 如病、虫、创伤) 及非生物胁迫 (abiotic stress, 如旱、涝、暑、寒、盐碱) 诱导的抗性产物^[15]。有证据显示, 青蒿素是由其前体接受单线态氧 (singlet oxygen) 而生成的, 因而青蒿素有活性氧自由基的“贮存库”之称^[16]。

换言之, 生态环境条件越极端的地区, 当地青蒿中的青蒿素含量越高, 因为恶劣气候能刺激细胞中的叶绿体大量释放单线态氧。有报道称, 四川西阳山如“鸡爪”起伏不平, 河似“树根”蜿蜒遍布, 常出现“一边是骄阳一边是雨”的奇异天气, 这或许能理解为何当地生长的青蒿中青蒿素含量在全国数一数二。

5 青蒿素能否人工合成?

早在 1983 年, 国外就已成功地化

学合成青蒿素^[17]。中国科学家也在同年报道了青蒿素的全合成^[18,19]。但是, 人工合成青蒿素的成本太高, 难以实现工业化生产。随后, 美国伯克利加州大学的科学家 Keasling 团队另辟蹊径, 开启了青蒿素半合成的新时代, 即首先在微生物工程菌体内合成青蒿素前体, 然后再通过体外化学转化获得青蒿素。2003 年, 他们在基因工程大肠杆菌中首次合成了青蒿素前体青蒿酸^[20]。2006 年, 他们又在基因工程酵母中合成了更多的青蒿素前体, 包括青蒿酸和双氢青蒿酸^[21]。

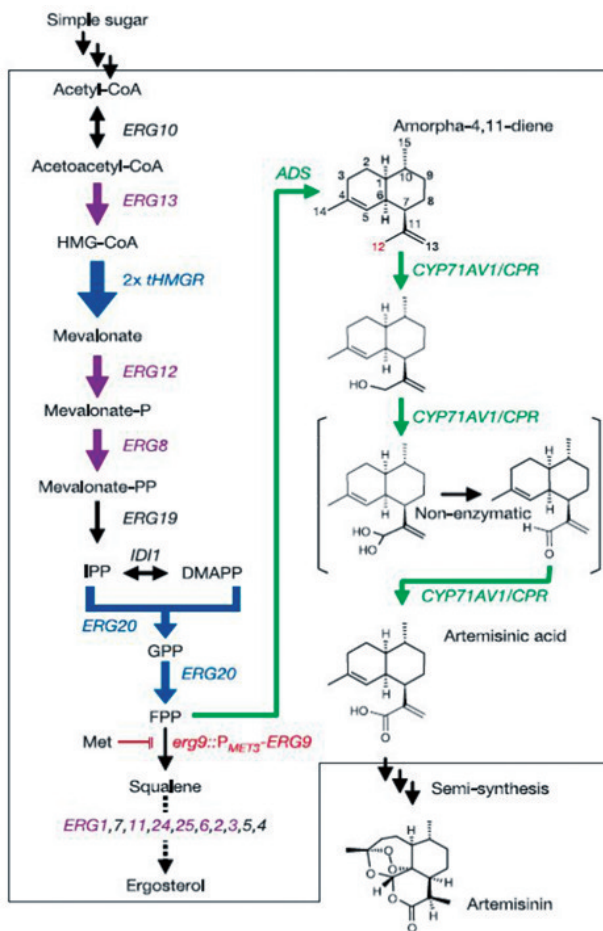
由于微生物体内缺乏活性氧自由基的来源, 也不具备青蒿素前体转化的油性环境, 因而未能实现青蒿素的“一步法”全合成, 而只能采用“两步法”将酵母合成的双氢青蒿酸通过体外光化学催化转变成青蒿素 (图 5)。从经济角度来看, 酵母来源的青蒿素价格每公

斤为 350~400 美元, 而青蒿来源的青蒿素价格最低为每公斤 120 美元, 最高可达每公斤 1200 美元^[22]。中国科学家采用独特的非光化学催化法也已成功地将青蒿酸转变成青蒿素。

利用工程微生物工业化生产青蒿素完全可达到高效、经济、实用的程度, 用这种青蒿素给药一次只需花费 25 美分。酵母青蒿素目前已由赛诺菲公司在意大利投资设厂进行规模生产, 2014 年已生产出 55~60 t 青蒿素, 这相当于青蒿素总供应量的 1/3。2014 年 8 月, 第一批总共 1700 万份青蒿素已运往非洲国家, 用于疟疾患者临床救治^[23]。

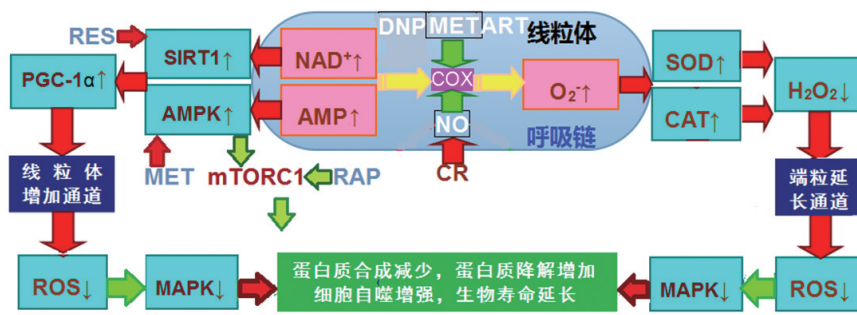
6 青蒿素未来研究展望

青蒿素不仅可以抗疟疾, 而且具有抗衰老、抗肥胖、抗炎、抗癌和抗菌等多种潜在功效 (图 6)。



(图片来源: <http://www.nature.com/nature/journal/v440/n7086/full/nature04640.html>)

图 5 青蒿素“两步法”合成示意



红色箭头表示激活,绿色箭头表示抑制,方框内箭头朝上指上调、朝下指下调。AMP:腺一磷; AMPK:腺一磷依赖蛋白激酶; ART:青蒿素; ATP:腺三磷; CAT:过氧化氢酶; COX:细胞色素c氧化酶; CR:热量限制; DNP:2,4-二硝基苯酚; H₂O₂:过氧化氢; MAPK:丝裂原活化蛋白激酶; MET:二甲双胍; mTORC1:哺乳类雷帕霉素靶点复合物1; NAD⁺:氧化型辅酶I; NADH:还原型辅酶I; NO:一氧化氮; O₂⁻:超氧阴离子; PGC-1α:过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅助活化因子1; RAP:雷帕霉素; RES:白藜芦醇; ROS:活性氧; SIRT1:氧化型辅酶I活化去乙酰化酶; SOD:超氧化物歧化酶。

图6 青蒿素等抗衰老作用机理模型

青蒿素之所以能“一药多用”,是因为其特有的过氧桥赋予了“一因多效”。这个“因”是指青蒿素与血红素的结合,这个“效”是指青蒿素结合血红蛋白并抑制其活性后产生的一系列健康效应^[24]。

当青蒿素与肿瘤细胞或细菌的一氧化氮合酶结合后,就能有效地抑制其活性,切断保护性一氧化氮的合成,因而可作为抗肿瘤药或抗生素的增效剂发挥抗癌或抗菌作用^[25,26]。青蒿素可与诱导型一氧化氮合酶结合,迅速阻断一氧化氮迸发诱导的缺氧、血管再生和组织增殖,有效中止类风湿性关节炎的发病进程^[27]。青蒿素与线粒体细胞色素c氧化酶的结合,能模拟热量限制激发的线粒体增殖效应,发挥减肥及延寿等作用^[28,29]。

有趣的是,青蒿素与2,4-二硝基苯酚、白藜芦醇、二甲双胍、雷帕霉素等化合物的结构完全不同,但却具有相似的

抗衰老作用。这是因为这些候选的“长寿药”都靶向线粒体,而且通过一氧化氮发挥作用。

7 青蒿素获奖启示

1) 温故知新,绝不可生搬硬套。东晋葛洪所著《肘后备急方》写道:“青蒿一握,以水二升渍,绞取汁,尽服之”。正是其中的“水渍”和“绞汁”让屠呦呦琢磨出青蒿素可能不耐热的想法。诚然,古训的经验之说难能可贵,但它仅仅是教病人如何抓药治病,并不强求一定要完全利用青蒿素。实际上,青蒿素不溶于水而溶于油,青蒿素因对青蒿有毒而被隔离在充满芳香油的腺毛(glandular trichome)中。假如机械地套用“水渍法”,那么青蒿素的提取量将很低。

2) 古为今用,中医药现代化是否还有必要?屠呦呦在多次热提取青蒿

素失败后,果断改用冷萃取法,一方面有机缘巧合与运气的成分,另一方面也有受先人启发的因素,说明不仅中医药本身是现代医药开发的素材,而且中医药典籍也是现代医药研究的宝藏。有人担心中药或中药复方一旦被拆散,其药性不再或大大减弱,反对中药的单药提取及其药效研究。这种担心是没有必要的,毕竟拆方效果最终要靠药效说话,而且不可能每种中药必须配伍才会有效。

3) 屠呦呦获奖,同行应有怎样的心态?青蒿素项目获得诺贝尔奖应该是实至名归、货真价实!至于对“个人功劳”还是“集体荣誉”的纠结,随着青蒿素获得拉斯克—德贝基临床医学奖与诺贝尔奖也就尘埃落地了。这是主流科学评价的“游戏规则”,中国人应该学会适应。屠呦呦是中国青蒿素研究的杰出代表,她的获奖是国际学术界对中国自然科学研究成就的认可和肯定,这是全体中国人的骄傲!

4) 预测诺贝尔奖及高影响力论文还有用吗?从今年的生理学或医学奖来看,汤森路透的预测再次落空。这反映出诺贝尔奖评选委员会与科研团队追求的理念不同,前者更青睐实用成果,而后者更注重前沿研究,导致从成果发布到颁奖的相对滞后性,他们的预测或许在今后可以兑现。高影响力学术期刊固然集中了绝大部分高水平的研究成果,但影响因子较低的学术期刊不一定只发表低水平论文,更有可能收罗原创但初步的创新性成果,青蒿素研究中发表的论文就是鲜活的例子。

致谢 广州中医药大学青蒿研究中心教授李国桥为本文写作提供帮助!

参考文献

- [1] WHO. WHO calls for an immediate halt to provision of single-drug artemisinin malaria pill[R]. 2006-01-19.
- [2] Noedl H, Se Y, Schaefer K, et al. Artemisinin resistance in Cambodia I (ARC1) study consortium: Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia[J]. New England Journal of Medicine, 2008, 359: 2619-2620.
- [3] Ashley E A, Dhorda M. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria[J]. New England Journal of Medicine, 2014, 371: 411-423.
- [4] Senok A C, Nelson E A S, Li K, et al. Thalassemia trait, red blood cell age and oxidant stress: Effects on *Plasmodium falciparum* growth and sensitivity to artemisinin[J]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1997, 91: 585-589.
- [5] Meshnick S R, Tsang T W, Lin F B, et al. Activated oxygen mediates the antimalarial activity of qinghaosu[J]. Progress in Clinical Biological Research, 1989, 313: 95-104.

- [6] Cumming J N, Ploypradith P, Posner G H. Antimalarial activity of artemisinin (qinghaosu) and related trioxanes: Mechanism(s) of action[J]. *Advances in Pharmacology*, 1997, 37: 253–297.
- [7] Lisewski A M, Quiros J P, Ng C L, et al. Supergenomic network compression and the discovery of EXP1 as a glutathione transferase inhibited by artesunate[J]. *Cell*, 2014, 158: 916–928.
- [8] Li W, Mo W, Shen D, et al. Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in the action of artemisinin[J]. *PLoS Genetics*, 2005, 1: e36.
- [9] Wang J, Huang L, Li J, et al. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation[J]. *PLoS One*, 2010, 5: e9582.
- [10] Eckstein-Ludwig U, Webb R J, Van Goethem I D A, et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum* [J]. *Nature*, 2003, 424: 957–961.
- [11] Shandilya A, Chacko S, Jayaram B, et al. A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2513.
- [12] Uhlemann A C, Cameron A, Eckstein-Ludwig U, et al. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12: 628–629.
- [13] Krishna S, Pulcini S, Moore C, et al. Pumped up: Reflections on PfATP6 as the target for artemisinins[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2014, 35: 4–11.
- [14] Vickers C E, Gershenzon J, Lardau M T, et al. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5: 283–291.
- [15] He J, Gao Q, Liao T, et al. An ecological implication of glandular trichome-sequestered artemisinin: As a sink of biotic/abiotic stress-triggered singlet oxygen[J]. *Peer J PrePrints*, 2015, 3: e1026.
- [16] Zeng Q P, Zeng X M, Yang R Y, et al. Singlet oxygen as a candidate retrograde signaling transducer for modulating artemisinin biosynthetic genes in *Artemisia annua*[J]. *Biologia Plantarum*, 2011, 55: 669–674.
- [17] Schmid G, Hofheinz W. Total synthesis of Qinghaosu[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105(3): 624–625.
- [18] 许杏祥, 朱杰, 黄大中, 等. 青蒿素及其一类物构造和合成的研讨. X. 从青蒿酸立体操纵合成青蒿素和脱氧青蒿素[J]. *化学学报*, 1983, 41: 574–575.
- [19] 许杏祥, 朱杰, 黄大中, 等. 青蒿素及其一类物结构和合成的研究. XVII. 双氢青蒿酸甲酯的立体控制性合成——青蒿素全合成[J]. *化学学报*, 1984, 42: 940–942.
- [20] Martin V J J, Pitera D J, Withers S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 796–802.
- [21] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast[J]. *Nature*, 2006, 440: 940–943.
- [22] Mark P. Sanofi launches malaria drug production to maintain stability in artemisinin availability[R]. *Chemistry World Online (RSC)*, 2013–04–19.
- [23] Palmer E. Sanofi shipping new malaria treatment manufactured from semisynthetic artemisinin[R]. *FiercePharmaManufacturing*. 2014–09–14.
- [24] Zeng Q P. Artemisinin and nitric oxide: Mechanisms and implications in disease and health[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2015.
- [25] Zeng Q P, Zhang P Z. Artesunate mitigates proliferation of tumor cells by alkylating heme-harboring nitric oxide synthase[J]. *Nitric Oxide*, 2011, 24: 110–112.
- [26] Zeng Q P, Xiao N, Wu P, et al. Artesunate potentiates antibiotics by inactivating heme-harboring bacterial nitric oxide synthase and catalase[J]. *BMC Research Notes*, 2011, 4: 223.
- [27] Bao F, Wu P, Xiao N, et al. Nitric oxide-driven hypoxia initiates synovial angiogenesis, hyperplasia and inflammatory lesions in mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e34494.
- [28] Wang D T, Wu M, Li S, et al. Artemisinin mimics calorie restriction to extend yeast lifespan via a dual-phase mode: A conclusion drawn from global transcriptome profiling[J]. *Science China: Life Sciences*, 2015, 58: 451–465.
- [29] Wang D T, He J, Wu M, et al. Artemisinin mimics calorie restriction to trigger mitochondrial biogenesis and compromise telomere shortening[J]. *Peer J*, 2015, 3: e822.

作者简介: 曾庆平, 研究员, 研究方向为青蒿素合成生物学及分子药理学, 电子信箱: qpzeng@gzucm.edu.cn。

(责任编辑 吴晓丽)

