

青蒿素的发现和发展

袁亚男, 姜廷良*, 周兴, 刘盈

中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

* 联系人, E-mail: tljiang@icmm.ac.cn

2017-03-21 收稿, 2017-04-11 修回, 2017-04-12 接受, 2017-05-17 网络版发表

摘要 卫生部中医研究院中药研究所(简称“中研院中药所”, 现为中国中医科学院中药研究所)屠呦呦及其研究组在对中药进行大量研究基础上, 受中医典籍《肘后备急方》的启迪创建了青蒿提取方法, 1971年10月获得青蒿抗疟活性化学部位, 1972年11月从中发现青蒿素。青蒿素是一个仅由碳、氢、氧3种元素组成、具有过氧基团特殊结构的新型倍半萜内酯, 是与已知抗疟药在化学结构、作用机制完全不同的新化合物。临床疗效几乎可达100%, 具有速效、高效和低毒等特点。目前, 青蒿素及其衍生物是世界上治疗疟疾最有效的药物, 青蒿素联合疗法已被用于几乎所有国家和地区的疟区, 每年治疗病例一亿以上, 降低了全球疟疾的发生率和死亡率, 已挽救了数百万人的生命。青蒿素来自中医药、发现启迪于中医药。它是中国传统医学和现代科技紧密结合、融合多学科和行业的系统创新工程, 凝聚着一群中国科学家的艰辛和智慧, 是中医药对人类健康事业作出的一项巨大贡献。我国政府先后11次给参加这一工程的相关单位授予国家发明奖、国家自然科学基金、国家科技进步奖等各类大奖, 屠呦呦也因此获得了2015年度诺贝尔生理学或医学奖和2016年度国家最高科学技术奖。

关键词 青蒿素, 青蒿素衍生物, 青蒿素联合疗法

疟疾是经蚊虫叮咬或输入带疟原虫者的血液而感染疟原虫所引起的虫媒传染病。寄生于人体的疟原虫有5种, 即间日疟原虫、三日疟原虫、恶性疟原虫、卵形疟原虫和诺氏疟原虫, 分别引起间日疟、三日疟、恶性疟、卵圆疟及诺氏疟。在我国主要是间日疟和恶性疟。临床表现为周期性规律发作, 全身发冷、发热、多汗, 长期多次发作后, 可引起贫血和脾肿大。

1 疟疾及其防治

1.1 疟疾——自古以来的全球重大寄生虫病

疟疾曾是我国主要的寄生虫病之一, 流行历史悠久, 对健康危害甚大。疟疾最早可以追溯到3000万年以前, 科学家在一块古近纪的琥珀化石里发现了

携带疟原虫的蚊子。我国在3000多年前就已有疟疾流行的记载, 是先秦两汉时期主要的流行病之一。殷商时期, 甲骨文中所用“疟”字, 形似老虎张口扑向人。《礼记·月令第六》称: “民多虐疾”。北魏《水经注第三十六》称: 泸水(今金沙江部分流域)两岸“时有瘴气, 三月、四月径之必死”。“瘴气”是疟疾的另一古称。

新中国成立前, 疟疾在我国猖獗肆虐, 乡村和城镇都曾严重流行。据不完全统计, 20世纪40年代, 每年至少有3000万以上患者, 病死率约为1%。20世纪50年代初期, 全国有疟疾流行的县(市)计1829个, 占当时县市总数的70%~80%。解放后, 疫情逐步受到控制, 但在1960和1970年曾出现局部暴发, 全国发病人数分别为1023万和2411万人, 然病死率已控制在0.006%和0.003%。20世纪80年代以来, 党和国家采取更有力措施, 疫情急速缓解。2011年全国疟疾发病人

引用格式: 袁亚男, 姜廷良, 周兴, 等. 青蒿素的发现和发展. 科学通报, 2017, 62: 1914–1927

Yuan Y N, Jiang T L, Zhou X, et al. Discovery and development of artemisinin (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 1914–1927, doi: 10.1360/N972017-00320

数已降至4479例。

疟疾也是全球性，特别是热带、亚热带地区的主要寄生虫病，世界卫生组织(World Health Organization, WHO)将其与艾滋病、结核一起列为世界三大公共卫生问题。公元前2、3世纪，古罗马学者已有相关疟疾的描述，当时认为疟疾是沼泽地散发的浊气所引发，英语中疟疾被称为“malaria”，即意大利语“坏空气”之意。从公元4世纪开始，疟疾成了古希腊的地方病，一直广泛流行。19世纪初期，印度每年逾100万人死于疟疾。

据WHO估测，2000年全球仍有32亿人口受到疟疾威胁(约占世界总人口的40%以上)，106个国家或地区受累。当年疟疾发病2.62亿(2.05亿~3.16亿)例，其中，非洲占发病总数的88%、东南亚占10%、东地中海地区占2%；致死83.9万(65.3万~110万)人，其中，72.3万(56.3万~94.8万)人是5岁以下的儿童。

1.2 中外对疟疾的防治

疟疾是我国古代医籍中记载传染病最早最详的病种。《素问·疟论》、《素问·刺疟论》等专篇对疟疾的病因、病机、症状、治法等有系统而详细的论述。之后，汉《金匮要略·疟疾脉证并治》、隋《诸病源候论》、南宋《三因极一病证方论》、元《脉因证治》、明《证治准绳》、《景岳全书》、《症因脉治》、清《疟疾论》等对病机、证候、治则治法、方药均有阐发；《神农本草经》、《肘后备急方》、《千金要方》等记载了常山及其嫩枝叶(蜀漆)、青蒿和马鞭草等截疟功效，为中医药治疟积累了丰富经验和资料。

1888年，法国军医 Charles Louis Alphonse Laveran(夏尔·路易斯·阿方索·拉韦朗)在非洲疟疾患者血液的红细胞中发现疟原虫。1897年，英国医生 Ronald Ross(罗纳德·罗斯)证实按蚊是疟原虫传播媒介(他们分别获1907和1902年诺贝尔奖)以前，南美洲秘鲁的土著人已用安第斯山区中的一类树皮抗病退烧，据说在1630年用其治好了驻秘鲁的西班牙总督夫人Chinchon的疟疾而传入欧洲。植物学家林奈将该树定名为“金鸡纳(chinchona)”。1820年，两位法国化学家 Pierre J. Pelletier 和 Joseph B. Caventou 从中分离获得含有氮原子的抗疟成分奎宁(金鸡纳霜)。1934年，德国科学家 Hans Andersag 与同事在奎宁基础上合成氯喹。二战期间，美国政府支持的研究组证实氯喹抗疟安全有效，并于1945年用于临床。由于氯喹能

抑制疟原虫的DNA复制、破坏其血红蛋白酶而疗效显著，成为当时全球治疗疟疾的特效药物。但从1960年代初开始，疟原虫对氯喹类药物出现抗药性，从东南亚、南美到非洲波及全球，疟疾肆虐又失去控制，人们盼求新的抗疟药物。

1.3 越南战争与“523”任务

在古代，疟疾对战时的士兵伤害很大，是影响军事活动最严重的疫病之一。蜀汉诸葛亮因瘴而推迟南征。唐玄宗派李泌率7万大军征伐南诏，因瘴疫等全军皆没。元朝大德和清乾隆年间向南方用兵，数度因疟疾而挫，有时竟“及至未战，士卒死者十已七八”。据报道，美国南北战争中有131.6万人感染疟疾，其中约一万人死亡。第二次世界大战期间，美国在非洲和南太平洋的驻军中有6万人死于疟疾。

1961年5月，美国派遣特种部队进入南越，到1973年1月巴黎四方会谈结束越战、1975年美国撤军完毕，历时14年，美军身受疟疾之苦。据美国退伍军人管理局资料，1967~1970年，美军感染疟疾4万余例。由疟疾造成的非战斗减员比战伤减员高出4~5倍。为此，美国政府指定专门机构，增加研究经费，联合相关部门和药企，开展对氯喹耐药疟原虫有效的新药研究，至1972年，筛选了20余万种化合物，但未获预期结果。

同样，越南人民军队也受到相似困扰。据河内卫生部门统计，1961~1968年越南军队伤病员比例，除1968年第一季度以外，病员均远超伤员，病员中大多数是患疟疾。1964年，越共中央领导向我国党中央提出，希望帮助其解决部队受疟疾困扰这一难题。我中央领导回应：解决你们的问题，也是解决我们的问题。为此，党中央指示有关部门要把解决热带地区部队受疟疾侵害、影响部队战斗力和军事行动的问题作为紧急援外战备任务立项。研制新型防治疟疾药物，成为当时中国军队医药科技工作者的一项重要政治任务。

其后，由于任务的紧迫性和艰巨性，中国人民解放军总后勤部商请国家科学技术委员会，会同前国家卫生部、前国家化学工业部、前国防科学技术工业委员会和中国科学院，于1967年5月23日在京召开“疟疾防治药物研究工作协作会议”，通过军民合作，组织所属科研、医疗、教学、制药等单位，讨论确定3年研究计划，开发防治疟疾药物，并组建了领导小

组及其办公室. 由于这是一项紧急军工项目, 为保密, 以开会日期为代号, 称之“523”任务.

自此, 先后有7个省市和相关部属单位全面开展了抗疟药物的调研普查和筛选研究, 到1969年筛选的化合物和包括青蒿在内的中草药有万余种, 但未能取得理想结果.

2 主要研究内容和标志性成果

从青蒿素的发现, 到青蒿素衍生物的研制, 再到青蒿素类药物复方的应用, 是源于中医药、受中医典籍启示、应用现代科技知识、融合多学科和行业的系统创新工程, 凝聚着一群中国科学家的艰辛和智慧, 是中医药对人类健康事业做出的巨大贡献.

谈到青蒿素工程, 首先应从中国中医科学院(原称: 卫生部中医研究院、中国中医研究院)发现青蒿素说起.

2.1 青蒿抗疟活性化学部位提取的突破

(i) 接受任务. 1969年1月21日, 全国“523”办公室鉴于当时的困境, 由主任白冰秋、副主任张剑方以及田辛等人到访前卫生部中医研究院(以下简称“中医研究院”), 商请该院参加此项政治任务. 中医研究院接受任务后交由下属的中药研究所(以下简称“中研院中药所”)来完成, 并任命屠呦呦为中药抗疟研究组组长, 从而开启了青蒿素的发现之旅.

(ii) 收集梳理中医药防治疟疾的古今方剂和药物资料. 接受中药抗疟研究任务后, 屠呦呦便广泛收集、整理历代医籍, 查阅群众献方, 请教老中医专家. 仅用3个月的时间, 收集到2000多个方药, 作为以后研究工作的铺垫, 并在此基础上精选编辑了包含青蒿在内的640个方药的《疟疾单秘验方集》, 以中医研究院革命委员会业务组的名义油印成册, 于1969年4月送交全国“523”办公室, 希望能转送相关单位参考.

(iii) 初期的实验研究(1969~1970年). 说是研究组, 其实研究初期仅有屠呦呦一个人, 最先是配合其他“523”研究组、为解决具有抗疟活性的常山碱所致呕吐的副作用, 寻找减毒、合适的配伍中药. 她选取一些有止呕功效的中药配伍常山碱, 在鸽子(*Columba*)及猫(*Felinae*)的呕吐模型上进行药理实验. 但是, 最好的组合也只是对鸽子的呕吐模型较为有效, 对猫呕吐模型基本无效. 后来随着其他同事的加

入, 1969年5月起, 他们开始制备多种中药的水提取物、乙醇提取物, 送请中国人民解放军军事医学科学院(以下简称“236”)进行抗疟活性筛选, 发现胡椒乙醇提取物对鼠疟原虫抑制率达84%. 1969年7月, 时值疟疾流行季节, 全国“523”办公室希望中研院中药所参与任务的科研人员去海南疟疾疫区现场体验实际情况, 并提出可带去抗疟活性较高的胡椒及辣椒加明矾做临床疗效观察. 中研院中药所最后决定屠呦呦、郎林福、余亚纲3人前往海南.

在海南疟区现场的临床验证发现, 对鼠疟原虫抑制率达80%以上的胡椒和辣椒加明矾的多种制备样品, 对疟疾患者只能改善临床症状, 并不能使他们体内的疟原虫转阴. 任务结束后, 屠呦呦被广东省“523”办公室授予“五好队员称号”奖状.

1970年初, 研究组主要还是开展对胡椒的深入研究, “236”的顾国明开始参与此项工作. 当年6月以前, 先后送胡椒等各种提取物和混合物4批样品给“236”进行活性测定, 结果发现胡椒提取物的活性并未提高, 不同成分比例组合的混合物的活性虽然提高, 但活性远不如氯喹. 6月以后, 扩大到龟板、鳖甲、五灵脂、夜明砂、川草乌、阿魏、黄丹、雄黄等动植物和矿物药, 有的有活性但毒性较强. 同年9月, 屠呦呦与余亚纲讨论进一步扩大筛选范围, 由余亚纲负责矿物和动物药的筛选, 屠呦呦负责植物药的筛选. 然而, 扩大筛选工作启动后, 仅筛选了30多个样品, 其中包括研究组首次做的青蒿乙醇提取物, 其疟原虫抑制率为68%. 由于“236”本身任务繁重, 1970年秋后, 难以再承担与中研院中药所合作进行抗疟药物药效筛选工作, 而中研院中药所自己又缺乏筛选模型, 屠呦呦研究组的抗疟药物筛选也就搁浅了.

(iv) 青蒿抗疟活性化学部位的发现. 1971年4月15日, 国务院、中国共产党中央军事委员会以(71)国发29号文, 批转了前卫生部军管会、前燃料化学工业部、中国科学院、中国人民解放军总后勤部《关于疟疾防治研究工作情况的请示报告》. 1971年5月22日~6月1日, 遵照国务院、中国共产党中央军事委员会(71)国发29号文的批示, 全国疟疾防治研究领导小组, 在广州召开疟疾防治研究工作座谈会, 屠呦呦被派参加了会议.

会议后, 中医研究院的领导为加强“523”任务研究工作, 于7月初调整、充实和组成了中西医结合、基础临床结合、针药结合的疟疾防治研究小组, 同时

还举办了为期5天的学习班,统一提高认识、研究部署工作。其中,药物筛选工作由屠呦呦、郎林福、钟裕蓉、刘菊福组成,再次明确屠呦呦负责全面工作。

筛选工作离不开动物模型,在“236”等的帮助下,中研院中药所建立了鼠疟动物模型。至1971年9月初,他们高强度地筛选了100多个中药的水提取物和200多个醇提取物,但结果不理想。筛过的中药包括青蒿(原植物拉丁学名*Artemisia annua* L.),其对疟原虫的抑制率高时也只有40%左右。在前期的实验研究中,由于胡椒提取物对鼠疟曾有较高的抑制率,有的批次抑制率高达84%,然而试用于临床,该提取物对疟原虫的抑杀作用并不理想。在对青蒿的筛选中,虽曾出现过对疟原虫的抑制率68%的结果,而此后的多批次研究却不能重现较高的抑制率。

带着问题,屠呦呦再次请教中医专家,并对前期研究过的几个药物的历代文献进行重新查阅。如青蒿,在中国的应用已有两千多年的历史,在服用方法上,一般均作汤剂。在反复研读文献过程中,葛洪《肘后备急方》治疗寒热诸疟方中“青蒿一握,以水二升渍,绞取汁,尽服之”的描述,给了屠呦呦新的启迪。古人“绞取汁”的用法令她悟到之前青蒿的提取常用水煎煮或用乙醇提取,但结果都不好,青蒿中的有效成分也许与提取温度有关系,并且想到只有嫩叶才能绞出汁来,可能还涉及药用部位的问题。于是又重新设计了以乙醚低温提取青蒿的研究方案,果然发现青蒿乙醚提取物表现出了较高的抗疟活性,进一步的分离工作显示,青蒿乙醚中性部分才是抗疟有效部位。1971年10月4日,药物研究序号为第191号(又简称为91[#])的青蒿乙醚中性提取物,展现了令人振奋的结果,对疟原虫的抑制率达100%,这是青蒿素发现最关键的一步。此后,屠呦呦及其研究组又不断完善提取、精制方案,制备样品,并在猴疟模型上证实乙醚中性提取物的抗疟活性。后来的实验证明,青蒿叶子是抗疟活性成分——青蒿素的药用部位,占大量份额的坚硬茎秆中青蒿素的含量是极低的。1972年3月8日召开的南京抗疟药研究内部会议上,屠呦呦报告了青蒿及其乙醚中性提取物的抗疟作用,引起了与会者极大的关注。会后,全国“523”办公室要求中研院中药所当年在海南疟区现场对提取物进行临床疗效观察。

要进行临床研究,就必须先制备大量的青蒿乙醚中性提取物,用以临床前的安全性等试验和制备

临床观察用药。但当时处于文革期间,没有药厂配合工作,短时间内实验室提取大量的青蒿提取物是很困难的,屠呦呦研究组买来盛水的大缸充当提取锅用,加班加点终于得到了足够的青蒿乙醚中性提取物。但在进行临床前毒性试验时,在个别动物的病理切片中,发现了疑似的毒副作用。因此,药理学的同事认为需要进行反复多次试验,当确证无毒后,才能上临床。然而,经过重复试验,疑似的问题仍然未能定论。是动物本身就存在问题还是药物所致,一时争论不休(以后确定主要由动物自身所引起)。然而,疟疾是有季节性的,若错过当年临床观察季,就要再等1年;并且青蒿乙醚中性提取物的首次临床是十分重要的,这既是提取物对鼠疟、猴疟100%疟原虫抑制率与应用于患者疗效相关性的检验,更是提取物将来能不能成为临床有效的抗疟新药的第一步。于是屠呦呦决定以身试药,经批准后,1972年7月,屠呦呦及研究组的其他两位同事共3人住进了医院,开始了青蒿提取物的人体试验。经一周观察,未发现该提取物对人体有明显毒副作用,3位受试者情况良好,除个别别人个别指标有一过性波动,肝肾功能及心脏相关指标正常。8月初,又增添做了5例健康人体试服,亦未发现疑似的毒副作用,经讨论同意上临床。于是屠呦呦亲自携药赶赴海南昌江疟区,亲自给病人喂药,以确保用药剂量,详细了解血片检查后的疟原虫数量变化等情况。最终完成了海南疟区间日疟11例,恶性疟9例,混合感染1例的21例临床抗疟疗效观察,取得疟原虫全部转阴的满意结果。同时还在北京302医院验证了9例,亦均有效。屠呦呦在1972年11月召开的全国各地区“523”办公室主任座谈会上报告了青蒿乙醚中性提取物首次临床30例抗疟全部有效的结果,引起了与会同道的极大关注。会后,山东、云南等地还去人、去信询问详情,屠呦呦及其研究组都做了积极回应。

青蒿提取方法的创新、抗疟活性化学部位的获得、临床试用有效,是发现青蒿素的关键。

2.2 青蒿素的发现

(i) 中研院中药所的发现。发现有活性的青蒿乙醚中性提取物后,屠呦呦及其研究组便开始进行有效成分的分离和提取工作。因没有青蒿素分离的先例,屠呦呦及其研究组的同事们只能边摸索边分离。

1972年4月26日~6月26日, 研究组对青蒿乙醚中性提取物先后分离得到少量颗粒状、片状或针状结晶. 8月1日, 屠呦呦曾在分离中发现用硅胶分离的效果为好. 并且在她去海南疟区现场前, 对提取方案进行了研究, 并对研究组人员安排做了部署. 在她到海南验证青蒿乙醚中性提取物临床疗效、暂离实验室时, 由倪慕云主持工作. 研究组不断地改进和完善提取分离方法和条件, 进一步去粗存精. 这期间, 屠呦呦也多次通过信件了解课题进展情况, 并提出建议. 当年9月25日、9月29日、10月25日、10月30日、11月8日倪慕云、钟裕蓉、崔淑莲相继分得多个结晶. 12月初, 鼠疟试验结果发现, 钟裕蓉、崔淑莲11月8日用硅胶柱分离得到的Ⅱ号结晶对疟原虫有显著药效, 可使疟原虫转阴. 首次以药效结果证实了青蒿素(当时称为“青蒿结晶Ⅱ”或“青蒿素Ⅱ”, 后定名为青蒿素)为青蒿抗疟的活性化合物, 并将1972年11月8日定为青蒿素的诞生日. 这是青蒿素发现史上一个值得纪念的里程碑.

(ii) 云南、山东等地的贡献^[3]. 山东省的青蒿素(黄花蒿素)研究: 山东省寄生虫病防治所借鉴1972年3月南京召开的抗疟药研究“523”内部会议上中研院中药所青蒿研究经验, 采用该省黄花蒿(中药青蒿的基源植物名称为黄花蒿 *Artemisia annua* L.)的醚提取物进行了抗鼠疟效价观察, 在1972年10月21日的报告中指出: 结果与中医研究院青蒿提取物的实验报告一致. 1973年, 该所与山东省中医药研究所协作, 用乙醚提取的黄花蒿的粗制剂“黄1号”, 在巨野县进行了30例间日疟病人临床试用观察, 结果显示对间日疟原虫有较强的杀灭结果, 控制临床症状作用迅速. 效果超过氯喹的3日疗法, 未见有明显的毒副作用. 1973年11月, 山东省中医药研究所从山东省当地的黄花蒿提取出有效单体, 命名为“黄花蒿素”, 以后又做了多种剂型的筛选研究.

云南省的青蒿素(黄蒿素)研究: 1972年11月, 昆明地区“523”办公室主任在参加各地区“523”办公室负责人北京会议中, 得知中研院中药所研究青蒿的情况, 并参观了中药研究所, 会后向云南药物研究所“523”小组传达了这一信息, 建议他们利用当地植物资源丰富的有利条件, 对蒿属植物进行广泛筛选. 1973年4月, 该所罗泽渊等人利用当地的大头黄花蒿(黄花蒿的一种变种)进行乙醚提取, 对鼠疟有抑制作用, 继而经硅胶柱层析得到了有效单体称之为“黄蒿

素”. 由于当地资源少, 从重庆市购来一批黄花蒿, 其黄蒿素的含量(0.2%)比云南的大头黄花蒿中的含量(0.02%)高出约10倍. 经查证, 该批黄花蒿来源于四川省的酉阳地区, 表明酉阳产的黄花蒿的黄蒿素的含量较高. 在尚未开展青蒿资源普查之前, 他们初步确证了酉阳地区为优质黄花蒿的产地, 为后来青蒿素的获取, 提供了优质资源, 也是后来确定酉阳作为青蒿的种植基地和青蒿素的生产基地的依据.

云南省药物研究所的研究人员对青蒿素提取工艺的研究也有创新. 他们于1974年初在实验室选用溶剂汽油冷浸代替乙醚、浓缩后再用50%浓度的乙醇重结晶, 可得到纯度较高的黄蒿素. 这一改进的提取方法称为“溶剂汽油法”, 为实验研究和临床试验, 提供了足量的黄蒿素.

1974年2月28日, 在北京召开的全国“青蒿素专题研究座谈会”上, 北京、山东、云南三家提取的青蒿抗疟活性单体被认为是同一化合物, 以后统一称之为青蒿素.

2.3 青蒿素抗疟的临床验证

(i) 青蒿素首次临床验证. 从1973年初到1973年5月, 中研院中药所已提取获得青蒿素纯品100余克. 屠呦呦将其一部分用于青蒿素的化学研究, 一部分用于临床前的安全性试验, 一部分制备临床观察用药, 少部分留做备用.

1973年第二季度, 对青蒿素进行了一系列安全性试验研究: 青蒿素对猫(*Felinae*)的血压、心率、心律和心电均无明显影响; 三批次犬(*Canis lupus familiaris*)的毒性试验, 除个别犬出现流涎、呕吐和腹泻外, 其他各项指标均正常, 未发现明显毒副作用.

慎重起见, 这次也同样做了健康人的人体试验. 在制定了详细人体试服计划后, 于1973年7月21日~8月10日, 4名科研人员参加了试服, 结果未见明显毒副作用.

青蒿素的动物及人体安全性试验通过, 意味着新一代抗疟药即将诞生. 大家都对临床验证翘首以望. 然而, 青蒿素的临床验证却是一波三折.

中药研究所的同事把青蒿素片剂送到海南现场后, 由已经在那里工作的中研院医疗队着手临床验证. 1973年8月10日~10月15日, 用青蒿素治疗外来人口疟疾8例. 这个过程实际是分两个阶段完成的, 9月22日前, 观察了青蒿素片治疗外来人口恶性疟疾5例,

结果1例有效,2例血中疟原虫数量有所降低,2例无效,效果不理想。消息传回北京,大家都十分意外,便开始查找原因。经排查发现所使用的片剂质地很硬,用乳钵都难将片子碾碎,提示崩解度有问题,影响了药物的吸收。经讨论决定,用青蒿素原粉直接装胶囊。赶在海南疟区现场观察季节结束前抓紧验证,以明确青蒿素的临床疗效。屠呦呦亲自动手,将该青蒿素装入胶囊,中药研究所业务负责人章国镇携青蒿素胶囊飞赴海南,9月29日抵达疫区现场,观察了3例外来人口间日疟,服药总剂量3.0~3.5 g。结果表明,药后平均31 h内体温复常,18.5 h疟原虫转阴,全部有效,未见明显副作用。但因海南疟区现场观察季节结束,未能再找到恶性疟患者继续验证。这是青蒿素的首次临床试用,结果说明所获得的青蒿素是青蒿的抗疟活性成分。

(ii) 山东、云南等地的临床验证。1974年5月,山东黄花蒿素协作组在巨野县用黄花蒿素和黄花蒿简易提取剂型治疗间日疟共26例,用药总量0.6~1.2 g,3日疗法。临床症状在第1次服药后即可控制,原虫转阴时间平均72 h,未见毒性反应;随访2个月,4/5的服药患者血疟原虫和症状再现,复燃率仍高。黄花蒿素0.4 g加另一药物(防疟片2号片)顿服组,2个月内4/9的服药患者复燃,似比单用黄花蒿素的复燃率降低,复燃时间推迟。结果表明,山东省中医药研究所提取的黄花蒿素,对北方间日疟临床近期有良好的疗效。

1974年9~10月,云南临床协作组带着云南省药物研究所提取的黄蒿素,到云南省凤庆县、云县一带进行恶性疟为主的临床效果观察。临床协作组进入现场后,收到的病人很少。只收治了2例间日疟和1例恶性疟。全国“523”办公室、广东地区“523”办公室和昆明地区“523”办公室负责人一行4人,到云南现场检查“523”工作的进展情况,了解到此情况后前往耿马县医院,观察到该县的恶性疟病例较多了解了广州中医学院李国桥医疗小组开展的脑型疟救治研究工作情况,提出希望由该组承担云南省药物研究所黄蒿素的临床试用观察,李国桥及其医疗小组接受了此任务。1974年11月~1975年1月,先后收治18例患者;其中恶性疟14例(包括3例凶险型疟疾),间日疟4例,均获得十分良好的效果。

(iii) 青蒿素的扩大临床验证。1975年4月,全国“523”办公室于成都召开中草药专业会议后,前卫生部中医研究院、山东、云南、广东、四川、江苏、

湖北、河南、广西、上海、中国科学院和中国人民解放军等有关单位,共同组成了青蒿研究协作组,从资源、临床、药理、化学结构、制剂、生产工艺、质量规格等方面进行全面的系统研究。各地区用当地的青蒿资源、提取加工,制备各种剂型,扩大临床试用,在云南、广东(海南)、河南、山东、江苏、湖北、四川、广西,以及在老挝、柬埔寨治疗恶性疟、间日疟等各类疟疾共6550多例,其中青蒿素治疗2099例均取得满意结果。青蒿素口服剂和注射剂近期疗效均可达到100%;简易剂型的有效率也稳定在80%以上。

(iv) 青蒿素栓剂的问世。自1972年底发现青蒿素、1973年10月首次在海南临床试用,到1975年底,全国临床治疗超过900例疟疾,呈现速效、高效、低毒的特点,体内消除快、复燃较高。给药途径从口服发展到肌注、鼻饲和直肠灌注。1978年和1979年初,已有几十万支青蒿素油针剂供紧急战备所需。

1976年中研院中药所开始研究将青蒿素制成栓剂,1982~1984年直肠给药治疗358例恶性疟、105例间日疟取得满意结果。1985年6月16日前卫生部药品审评委员会化学药分委会第一次审评会试评青蒿素栓剂,1986年10月获青蒿素、青蒿素栓剂新药证书。这是我国实施药品管理法以来,第一个批准上市的新药。

2.4 青蒿素化学结构的确定

中研院中药所1972年首次从青蒿有效部位中分离提纯出有效单体青蒿素之后,屠呦呦及其研究组即着手青蒿素的化学研究。1973年第一季度,已做了熔点、旋光度值与元素分析等,初步确定青蒿素无氮,有 $-C=O$ 、 $-OH$ 及 CH_3 等基团,与已有抗疟药中都含氮原子不同,是一种新类型化合物;同年4月,又进行了光谱分析等研究工作,确定了其分子式 $C_{15}H_{22}O_5$,分子量为282,并请中国医学科学院药物研究所进行了复核。1973年9月17日,屠呦呦和倪慕云就青蒿素结构及其衍生物问题向北京医科大学林启寿教授请益。林教授在分析研究组的资料后同意认为,青蒿素为不含氮的倍半萜类新结构类型的抗疟化合物,并对确定功能基团及制备衍生物等作了建议。1973年9月20日,为了确定青蒿素的内酯结构,研究组对青蒿素进行硼氢化钠还原,获得了还原青蒿素(现称为“双氢青蒿素”),这为以后发展青蒿素衍生物打下了基础^[1]。

鉴于青蒿素是倍半萜类化合物,得悉中国科学

院上海有机化学研究所(以下简称上海有机所)在这类化合物研究上有较好的经验和设备条件,1973年8月下旬,屠呦呦前往该所联系,希望开展协作.1974年1月上海有机所函复同意屠呦呦一人前往,拟由该所周维善教授主持,吴照华和吴毓林参加,共同合作.但屠呦呦因长期大量溶剂接触致中毒性肝炎而未成行.从1974年2月起,中研院中药所先有倪慕云、后有钟裕蓉、刘静明、樊菊芬相继前往,共同协作进行青蒿素化学结构的研究工作.1974年2月倪慕云前往时,携带了青蒿素和双氢青蒿素样品及其相关资料,对青蒿素、双氢青蒿素的红外、MS、元素分析、NMR等图谱数据进行复核,所得结果与北京已做的基本一致.在上海有机所,经过反复的实验、演示、论证,根据光谱的数据和各种化学反应,确定了青蒿素的功能团和双氧桥的存在.

1974年下半年,屠呦呦得知中国科学院生物物理研究所新型X射线衍射仪可作物质结构研究,商请他们参与青蒿素分子结构研究.1975年11月,中国科学院生物物理所李鹏飞等人提出了青蒿素的相对构型,继而该所梁丽等人以X射线反常衍射法提出绝对构型;1976年1月,中国科学院生物物理研究所和中研院中药所有关人员召开两次会议,并邀请中国医学科学院药物研究所梁晓天教授参加,认可了上述结构.同月,屠呦呦与生物物理所李鹏飞到上海有机所通报此情况,由该所周维善、吴毓林、吴照华等人参与并确认:青蒿素是一个仅由碳、氢、氧3种元素组成的、具有过氧基团的新型倍半萜内酯,是与已知抗疟药的化学结构完全不同的新型化合物.

1977年3月,由中医研究院上报前卫生部批准,以“青蒿素结构研究协作组”名义、《一种新型的倍半萜内酯——青蒿素》为题,于我国《科学通报》的第3期上公开发表.

2.5 青蒿素衍生物的开发

为了进一步发挥具有新化学结构类型抗疟药物青蒿素的优势,在构效关系研究和化学结构鉴定基础上,我国及时进行对青蒿素衍生物的研究开发.

(i) 双氢青蒿素. 1973年9月,屠呦呦研究组在进行青蒿素化学研究过程中,发现青蒿素经硼氢化钠还原,其羰基峰消失、出现羟基,这个青蒿素的还原产物就是双氢青蒿素(时称还原青蒿素),分子式为 $C_{15}H_{24}O_5$ 、分子量为284,对鼠疟的作用强于青蒿

素,在还原青蒿素中再引进乙酰基,抗疟效果更高,提示青蒿素分子引进羟基后可以制备多种衍生物.后续实验提示,在青蒿素的功能团中,这个羰基的改变,可不影响双氧桥结构.以后的蒿甲醚、青蒿琥酯等青蒿素类药物即以它为前体合成的.1985年,屠呦呦认为它本身具有进一步研发价值.临床以成人一次口服双氢青蒿素120 mg,清除95%疟原虫所需时间平均16 h,与青蒿琥酯静脉注射或蒿甲醚肌肉注射杀虫速度相似;以双氢青蒿素口服,3 d疗程总剂量240 mg,5 d疗程总剂量360 mg或7 d疗程总剂量480 mg,共治疗恶性疟349例,全部临床治愈,平均退热时间14~24 h,平均原虫转阴时间64.9~69.2 h,平均复燃率在2.0%上下,无明显毒副反应.1992年7月获双氢青蒿素和双氢青蒿素片剂新药证书,由北京第六制药厂生产,北京科泰新技术公司在国际市场销售,商品名“科泰新片(cotexin)”.

(ii) 蒿甲醚. 1976年初,确定青蒿素结构.同年2月,“523”办公室向中国科学院上海药物研究所下达了青蒿素结构改造的任务,由该所合成化学、植化、药理等研究室分工合作.在已有的青蒿素化学反应研究的基础上,1976年下半年,李英等人用双氢青蒿素合成了它的醚类、羧酸酯类和碳酸酯类衍生物,将它们溶于植物油中进行肌肉注射,在鼠疟(伯氏疟原虫)抗氯喹株实验中,发现蒿甲醚、蒿乙醚均能较好抑制疟原虫的作用;由于蒿甲醚活性强、在油中溶解度大、化学性质较为稳定,确定以此作为研发对象.1978年7月~9月在海南临床初试成功,由云南昆明制药厂试生产.从1978~1980年,在琼、滇、桂、鄂、豫等地以油针剂扩大临床试验,治疗疟疾患者1088例,其中,恶性疟829例,3~4 d疗程总剂量600~640 mg,近期治愈率100%,月复燃率7.8%.1981年1月通过技术鉴定.后按前卫生部《新药审评办法》要求,完善了临床前安全性研究,临床治疗恶性疟315例,5 d疗程总剂量480 mg,全部临床治愈,月(28 d)复燃率7.4%.1987年9月,中国科学院上海药物研究所和昆明制药厂获蒿甲醚原料及其注射剂新药证书.继并于1992和1996年获胶囊剂及其预防血吸虫病新适应症,又于1997年再获片剂的新药证书.

(iii) 青蒿琥酯. 1977年6月,广西桂林制药厂刘旭等人在中国科学院上海药物研究所研制青蒿素衍生物取得进展的影响下,也开展了青蒿素衍生物的合成研究.同年8月,他们在青蒿素的还原反应中,

以硼氢化钾代替硼氢化钠,合成了双氢青蒿素的琥珀酸半酯(即青蒿琥酯),鼠疟的抗疟效价高于青蒿素。1978年7月将青蒿琥酯制成片剂、其钠盐制成可供注射的粉针剂,并进行临床验证。始以3 d疗程总剂量300 mg肌注32例疟疾患者,有效;继而在以后两年,以静注、肌注、片剂口服等治284例,获满意效果。1980年11月通过技术鉴定。1985~1986年按《新药审评办法》,在Ⅲ期临床中以3 d总剂量240~300 mg静脉注射治疗疟疾346例,其中恶性疟258例,平均退热时间14.6~20.8 h,原虫转阴时间32.3~56.4 h,月复燃率约49.4%。1987年4月青蒿琥酯原料药及其注射剂获新药证书。1988年再获片剂新药证书。

此外,据报道,国内外先后曾合成青蒿素衍生物3000余个进行活性筛选,欧美将蒿乙醚开发成抗疟药。

2.6 以青蒿素为基础的复方制剂研发

鉴于青蒿素类单一化合物对疟疾具有速效、高效、低毒、代谢快等特点,但仍易复燃。1982年下半年,中国军事医学科学院五所周义清等人认为,如选择另一类代谢较慢的抗疟药物与之配伍,可互补增效、更好杀灭原虫、延缓抗性产生,提出合并用药以增效和延缓青蒿素抗性产生的设想^[2]。

(i) 复方蒿甲醚片(coartem)。1984年,军事医学科学院五所周义清与宁殿玺等人将苯茆醇(该所创制的另一抗疟新药)与蒿甲醚组成复方,通过配比(每片含蒿甲醚20 mg、苯茆醇120 mg)等临床前实验,以3 d 4次总剂量16片治疗24例恶性疟,平均退热时间23.2 h、原虫转阴时间41.0 h、月复燃率4.1%。1992年4月获我国新药证书和国际专利。1994年9月与瑞士汽巴-嘉基公司(诺华公司前身)签署《许可和开发协议》(商品名coartem),到2007年在亚、非、拉美等20个国际多中心临床试验,受试患者3599人,均获满意结果;已在全球包括美国在内的86个国家或地区注册。

(ii) 复方磷酸萘酚喹片(ARCO)。1991年,军事医学科学院五所李福林、焦岫卿研究组发现,抗疟效果显著高于氯喹的磷酸萘酚喹治愈率高、半衰期长,但起效较慢、易产生抗性,与青蒿素类药物配合可形成互补,通过正交等试验,青蒿素与磷酸萘酚喹2.5:1相伍,具有增效和一次顿服奏效的功效。1998年开始,以复方磷酸萘酚喹片总剂量1400 mg(含青蒿素1000 mg、磷酸萘酚喹400 mg)单次口服治疗恶性疟220例,平均退热时间17.4 h、平均原虫转阴时间29.8 h,

月复燃率2.3%;治疗间日疟109例,平均退热时间13.0 h、平均原虫转阴时间18.1 h和56 d复燃率10%。2003年获新药证书。2005年由昆明制药集团进行国际多中心临床试验,治疗恶性疟1153例,平均月复燃率在4%以下;并获20余个国家注册许可。

(iii) 双氢青蒿素磷酸哌喹片(artekin, Duo-Cotexin科泰复)。1991~1995年,广州中医药大学李国桥抗疟研究组在援越抗击疟疾的临床实践中发现,双氢青蒿素与其他抗疟药磷酸哌喹、伯氨喹和甲氧苄啶联合应用,具有更好的治疗效果。1997年6月,经中越双方的临床前研究,越南卫生部批准以“疟疾片-CV8”命名、由越南第26制药厂生产,在越南作为恶性疟流行区的一线用药。在此基础上进一步优化处方,由双氢青蒿素和磷酸哌喹以1:8配比组成,以2 d 4次口服总剂量2880 mg(含双氢青蒿素320 mg、磷酸哌喹2560 mg),在柬、越、缅和海南岛治疗恶性疟患者近400例,平均退热时间12.7~41.6 h,原虫转阴时间23.2~56.7 h,28 d复燃率0~8.3%。2003年1月获我国新药证书。

(iv) 青蒿素哌喹片(artequick, 粤特快)。2003年,李国桥研究组为减少服药次数和胃肠道副反应,将青蒿素和去磷酸的碱基哌喹以1:6配比、替代双氢青蒿素与磷酸哌喹,组成青蒿素哌喹片,以2 d 2次服药总剂量1750 mg(含青蒿素250 mg、哌喹1500 mg),在越、柬、印尼等地治疗恶性疟患者471例,月复燃率在5%以下,其中110例的平均退热时间31.6 h、原虫转阴时间66.7 h、月复燃率4.9%,与同步对照的复方蒿甲醚片、双氢青蒿素磷酸哌喹片各55例临床试验结果无显著差异。2006年4月获我国新药证书,在10余个国家注册销售。

此外,还有青蒿琥酯-阿莫地喹、青蒿琥酯-甲氟喹、青蒿琥酯-周效磺胺/乙胺嘧啶、青蒿琥酯-咯萘啶和双氢青蒿素-咯萘啶等复方制剂已经上市或正在研制。

2.7 青蒿素类药物的药理作用 and 安全性

(i) 青蒿素类药物的抗疟作用及其机制。红细胞内期的疟原虫是青蒿素的作用对象。疟原虫的生活史分有性生殖(在蚊体内)和无性生殖(在人体内)两个阶段。当受染疟原虫孢子随雌蚊叮咬进入人体、通过血液进入肝脏,在肝细胞内发育分裂增殖产生裂殖子,破裂肝细胞后进入血液,疟原虫在肝细胞内

发育又称为红细胞外期。入血的部分裂殖子侵入红细胞，在红细胞内通过滋养体和裂殖体两阶段的发育裂殖(称为红细胞内期)，裂殖体胀破红细胞、释放出裂殖子入血流后再侵入正常红细胞而继续发育裂殖，多次裂殖循环后，部分裂殖子侵入红细胞内不再进行裂殖而发育为雌雄配子体，配子体被雌按蚊叮咬时吸入蚊体内，进入有性生殖阶段。大量研究表明，青蒿素类药物主要作用在红细胞内期的疟原虫。

疟原虫滋养体膜系结构受损是青蒿素抗疟作用的生物形态学基础。电子显微镜显示，青蒿素及其衍生物主要作用在红内期滋养体疟原虫的膜系结构，首先出现食物泡膜、表膜和线粒体的破坏，然后波及核膜、内质网，并有自噬泡形成、扩大、外吐。膜系结构的损伤，阻断疟原虫与宿主细胞的物质和信号交换，致虫体瓦解。

双氧桥所致氧化损伤是青蒿素抗疟作用的一种重要机制。尽管青蒿素类药物已长时期大量应用于抗疟临床，可能由于其通过多途径、多靶点起作用，机制繁杂，也可能由于研究者的研究思路和研究方法所异所限，目前仍众说纷纭，但较多地注意其所含特殊化学结构双氧桥所致的氧化损伤。有人认为，疟原虫以宿主红细胞的血红蛋白为营养，产生大量亚铁血红素，亚铁原子可使青蒿素的双氧桥断裂，生成氧-自由基和碳-自由基以及亲电性的环氧化物等，这些活性中间体可能通过过氧化膜脂质、干扰线粒体功能、与某些酶、蛋白质起反应等途径杀灭疟原虫，但具体细节尚需进一步探讨。

(ii) 青蒿素类药物的代谢动力学。青蒿素类药物在动物体内的吸收、分布、代谢、排泄研究，涉及不同种属、多种给药途径、多种给药剂量、多种检测样品和检测手段。一般说来，它们具有吸收快、代谢快、半衰期短的特点。

健康志愿者：青蒿素口服15 mg kg⁻¹(约900 mg)剂量后，血药浓度达峰时间(h)、峰浓度(μg mL⁻¹)、药物在体内驻留时间(h)、血药浓度消除半衰期(h)均值依次为1.5, 0.09, 3.27, 2.27; 同剂量青蒿素直肠给药，药代参数依次为4.6, 0.04, 6.98, 4.84; 双氢青蒿素口服2.2 mg kg⁻¹(约130 mg)剂量后，药代参数依次为1.33, 0.71, 2.26, 1.57; 蒿甲醚口服3.3 mg kg⁻¹剂量后，药代参数依次为1.88, 0.31, -, 2.0; 青蒿琥酯口服后，药代参数依次为0.88, 1.94, -, 0.69。

疟疾患者：青蒿素口服500 mg d⁻¹(5 d方案，越

南患者)，血药浓度达峰时间(h)、峰浓度(μg mL⁻¹)、药物在体内驻留时间(h)、血药浓度消除半衰期(h)均值依次为2.9, 0.244, 4.2, 1.3。以上数据只是举例，由于不是同步进行的，不能确定青蒿素类之间的差异，但可说明，它们吸收快、代谢快、半衰期短、消除快，与动物实验的结果相符。

青蒿素和双氢青蒿素在体内都有I相酶和II相酶代谢，主要在肝脏，发生羟基化、脱氢、脱甲基、脱氧反应，以及葡萄糖醛酸化，产生许多代谢中间体，经肾脏和胆道排泄。蒿甲醚和青蒿琥酯是以双氢青蒿素为母体合成，进入体内后主要快速转化为双氢青蒿素，进入类似代谢通道。

(iii) 青蒿素类药物的安全性。动物实验显示，以青蒿素单次灌胃给小鼠(*Mus musculus*)的半数致死量(LD₅₀)在4200 mg kg⁻¹上下，主要表现为感觉迟钝、运动失调、抽搐惊厥、呼吸抑制而死亡；用以治疗小鼠疟疾的50%疟原虫转阴剂量(ND₅₀)在60 mg kg⁻¹左右，其治疗指数(LD₅₀/ND₅₀)可达75。14 d重复灌胃给与大鼠(*Rattus norvegicus*) 1000 mg kg⁻¹以上，主要表现为骨髓红细胞系造血功能障碍。Ames致突变试验、微核试验和染色体畸变试验均阴性，未见遗传毒性。

在青蒿素的致畸胎试验中，用LD₅₀的1/400~1/25剂量灌胃给孕期在7~19 d的妊娠大鼠，可引起胎鼠死亡或流产，提示青蒿素能影响胎鼠器官发生中晚期的器官形成，有胚胎毒性，但对雄性动物生殖器官的功能无影响。因此，孕期妇女应慎用青蒿素类药物，世界卫生组织不推荐用于妊娠头3个月的疟疾患者。

在健康人中，曾试服青蒿素每天350~5000 mg，连续7 d，未见不可恢复的主要脏器功能损害。有人对泰国24名健康志愿者一次或二次口服200 mg双氢青蒿素，后又对18名志愿者口服300 mg双氢青蒿素并与青蒿琥酯交叉验证，两者均有较好耐受性，不良反应轻微，主要是血红蛋白降低、有短暂骨髓抑制。还有人报道800多例口服青蒿琥酯和蒿甲醚的泰国恶性疟患者的毒性反应检测，未见过敏、神经精神异常、心血管、皮肤等毒性反应；另有83例孕妇患者，也没发现与药物相关的毒副作用，新生儿亦未见发育异常，有人解释青蒿素类药物对啮鼠类动物的胚胎毒性与灵长类胚胎发育的红系与血管形成期有种族差异。

这些都说明，青蒿素的衍生物抗疟活性提高，LD₅₀等毒理学指标数值也相应下降，有效剂量与LD₅₀之间的距离仍然较大，治疗指数依然较高。青蒿

素类是一种高效低毒、安全度大的抗癌药物。

2.8 青蒿素的其他功效研究

由于青蒿素双氧桥的特殊结构,引起国内外学者对其其他功效的探究。

2.8.1 防治其他寄生虫病

(i) 血吸虫病的预防:早在1980年我国开始用青蒿素实验治疗血吸虫病,其后发现蒿甲醚、青蒿琥酯也有杀虫作用,但活性不如已有治疗药物吡喹酮,继而发现青蒿素类对血吸虫发育阶段的童虫更敏感,中国预防科学院寄生虫病研究所等在长江中下游疫区对万余名人群,开展预防血吸虫病的临床试验,证明蒿甲醚和青蒿琥酯有效,1996年我国政府批准它们作为血吸虫病的预防药。以后,也为泰国、埃及等临床试验所证实。(ii) 弓形虫病的治疗:本病为猫与人共患性原虫病,临床表现复杂,孕妇感染后,可致胚胎发育障碍,引起流产,或致儿辈先天性弓形虫病。1996年我国有人用蒿甲醚、双氢青蒿素实验治疗啮鼠类急性弓形虫病感染,继而以双氢青蒿素40 mg 1 d两次连用6 d,对少量临床病例进行治疗、取得满意的结果。以后,国外也有用青蒿素衍生物抑制弓形虫的实验报道。此外,还有以青蒿素衍生物治疗肺吸虫病和华支睾吸虫病等少量临床病例或实验研究的探索。

2.8.2 对自家免疫性疾病的作用

鉴于青蒿素类药物可调节体液免疫和细胞免疫,1980年中国中医科学院广安门医院庄国康用青蒿素试治盘形红斑狼疮患者,其后,余其斌、钟嘉熙、刘红姣等人各自分别用青蒿琥酯或伍以其他药物治疗系统性红斑狼疮,取得较好疗效。目前,双氢青蒿素和马来酸蒿乙醚胺临床试验也在进行。

青蒿素类药物对类风湿性关节炎、佐剂性关节炎、自体免疫性脑脊髓炎、硬皮病等功效实验研究,均有阳性结果的报告。

2.8.3 对肿瘤的影响

近年来,青蒿素类药物的抗肿瘤作用受到国内外学者广泛关注。大量体外和动物体内实验结果显示,青蒿素类药物可抑制或杀伤白血病、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、胃癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、骨肉瘤等多种癌细胞,可诱导肿瘤细胞凋亡,阻滞细胞周期,抑制肿瘤血管新生,延缓或逆转肿瘤细胞的多药耐药性,与铁制剂合用或与转铁蛋白结合可提高对肿瘤细胞的选择性杀伤等作用。

2003年,我国张祖貽等人以每日125 mg连用21 d静脉注射青蒿琥酯联合化疗(长春瑞滨加顺铂)治疗中晚期非小细胞肺癌者60例,并与60例单纯化疗组相比较,加用青蒿琥酯能提高近期疾病控制率、延长疾病进展时间,安全性良好。有人用青蒿琥酯肝动脉灌注试治原发性肝癌,可提高患者的机体免疫力。国外也有人用以试治晚期宫颈癌患者,能缓解症状,抑制活检样品中肿瘤增殖相关的细胞标记物和新生血管的生成;近期有人正在试治已转移的乳腺癌病人。这些临床探索提示,青蒿素类药物可能对肿瘤具有治疗或与化疗药有增效等辅助治疗作用。

此外,青蒿素类还被实验研究发现能抑制流感和肝炎等病毒、抗炎抗纤维化,对哮喘、心律失常等也有作用。

2.9 青蒿的资源培育、青蒿素的细胞工程和人工合成

青蒿素从中药青蒿中被发现及其抗癌活性的确认,如何满足青蒿素用量的需求,成了另一个研究热点。

(i) 青蒿的资源调查和培育。根据明代以前本草文献记载的青蒿特征和药效考证,当时文献记录的青蒿就是现称的黄花蒿(*Artemisia annua* L.)。明代李时珍将黄花蒿和青蒿分列为两种药材,后来,国内外学者却将青蒿考证为*Artemisia apiacea* Hance,将黄花蒿考证为*Artemisia annua* L.,出现了植物分类和中药材两个专业的学者在名称标化上的不一样。当时《中国药典》将含有青蒿素的中药材称为青蒿,表述为“本品为菊科植物黄花蒿*Artemisia annua* L.的干燥地上部分”。

青蒿源于我国,野生遍及全国,还广布于欧、亚的温带-亚热带地区,北非以及美国和加拿大。青蒿素富含于*Artemisia annua*花前期的叶中。据调查,我国野生青蒿药材中青蒿素的含量,一般南方高于北方,可分为四区。高含量区:南岭山脉、武夷山脉以南地区(青蒿素含量约为0.50%~1.01%);中含量区:南岭以北秦岭以南地区(青蒿素含量约为0.48%~0.89%);低含量区和微含量区:分别为秦岭以北地区(北京约0.11%)和东北地区(黑龙江地区为0.01%~0.09%)。国外,越南产青蒿的青蒿素含量较高,可达0.86%,印度一些地区可达0.42%;国外其他多数地区的含量均较低,只有0.1%或其下。

我国的青蒿资源丰富。过去作为药材收购量占

的比例极小,而大量用作绿肥.据估算,仅广西桂林地区每年即可收购500 t,广东年产量估计为5000 t.20世纪,我国主要从野生青蒿叶中提取青蒿素.2002年以来,受国际治疟需求的增加,我国提取青蒿素的生产企业由原来几家曾急剧扩张发展到百余家,青蒿来源从野生转向种植.通过高含青蒿素植株的选育研究(如包括1996年我国返回式卫星搭载种子培育的SP-18株系、青蒿素产量可达 28.35 kg hm^{-2})、种植基地的建设,目前我国种植总规模稳定在6000~13000 hm^2 ,青蒿素得率一般在0.7%以上.每年可向国外提供150 t左右的青蒿素原料.

(ii) 青蒿的细胞和组织器官培养. 利用细胞等培养技术生产青蒿素可突破自然条件限制、少消损自然资源.早在20世纪80年代初,中研院中药所和中国科学院植物研究所合作进行青蒿愈伤组织的诱导与植株再生研究,发现带分化芽的愈伤组织能产生青蒿素.此后,国内外就离体生长的青蒿各种组织(包括青蒿发根、丛生芽等),通过生长调节物等诱导、质粒介导转化,生物反应器使用,研究青蒿素的离体合成,获得实验室的成功,因成本等原因,目前还缺乏应用前景的结果.

(iii) 青蒿素的生物合成. 了解青蒿素在青蒿内的生物合成过程,对于人工合成或半合成青蒿素有重要作用.倍半萜类的青蒿素在青蒿植物体内的生物合成,属于类异戊二烯代谢途径中的倍半萜分支途径,一般由乙酰辅酶A或3-磷酸甘油醛、丙酮酸在胞质或质粒,经一系列酶促反应生成法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP),在植物中普遍存在;从FPP合成青蒿酸和二氢青蒿酸的过程及其相关酶基因已基本清楚.但从青蒿酸或二氢青蒿酸如何合成青蒿素,还不完全清楚.

随着转基因技术的发展,2005年前后,中国科学院植物研究所和国外一些研究机构将青蒿的特定基因转入烟草(*Nicotiana tabacum* L.),合成青蒿素及其前体.近年来,人们已将相关基因打包转入大肠杆菌或酵母,组合生物合成青蒿素前体的工程菌,发酵获得了青蒿酸和二氢青蒿酸.

(iv) 青蒿素的人工合成. “青蒿素是一个含过氧基团的倍半萜内酯化合物,罕见的过氧基以内型方式固定在两个四级碳上而成‘桥’.显然,这一奇特结构的全合成是极具挑战性的.”1984年,中国科学院上海有机化学研究所周维善、许杏祥的研究组首次

人工合成青蒿素(1987年获国家自然科学二等奖),迄今已有十几条化学合成途径获得成功,基本上是从光学活性的单萜或倍半萜起步的半合成,关键在于引入过氧基团.2011和2012年,上海有机化学研究所和上海交通大学分别摒弃光化学方法引进过氧基团,用六价钼催化过氧化氢开环或用某种催化剂催化过氧化氢一步获得高产率的青蒿素.

由于人工合成青蒿素的成本高于从青蒿中直接提取,目前法国虽有一家企业建立了一条小型生产线,从事人工合成青蒿素工业化生产,目的似乎为了平衡和稳定市场,对植物提取进行补充.

3 学术影响与转化应用

3.1 我国原创的新型抗疟药

20世纪80年代以前,国际上使用的抗疟药,如1632年开始使用的奎宁($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$, 1910年出现抗药性)、1945年起使用的氯喹($\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{ClN}_3$, 1957年出现抗药性)、1951年起使用的阿莫地喹($\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$, 1971年现抗药性)、1967年起使用的周效磺胺($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$)和乙胺嘧啶($\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClN}_4$, 两者立即出现抗药性)、1977年开始使用的甲氟喹($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}$, 1982年出现耐药),都是含氮的化合物,当时人们认为抗疟药物必需含氮.青蒿素($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$)则是不含氮、具有过氧以内型方式固定在两个四级碳而成“桥”的奇特结构的倍半萜内酯化合物;对疟疾、包括对氯喹等抗药的疟原虫均有速效、高效、低毒的功效,是与已有抗疟药在化学结构和作用方式完全不同的新型抗疟药,迅速得到国际公认和应用,开创了世界新一类抗疟药物的发展史.

3.2 较强的学术影响力和国际影响力

1979年3月和1980年3月,在WHO副总干事陈文杰的推动下,WHO/TDR(热带病研究和培训特别规划署)主任Lucas AO和WHO/SWG-CHEMAL(疟疾化疗科学工作组)Peters W教授先后访华,考察青蒿素抗疟研究,建议在北京召开学术会议.1981年10月6日,由前卫生部中医研究院时任院长季钟朴负责筹办,以青蒿素为专题的第4次联合国开发署、WHO/SWG-CHEMAL会议在京召开.屠呦呦等人分别就青蒿素化学、药理、毒理、代谢、临床和衍生物等6个方面作了报告,我国首次向国际组织较全面、系统地介绍

了青蒿素的研究成果。会议高度肯定了我国发现青蒿素的重要意义,并认为由于它的独特结构及抗疟作用方式与已知抗疟药毫无雷同,为今后设计合成新抗疟药提供了新途径。青蒿素及其衍生物受到国际学术界、企业人士和相关官方机构的热烈关注。据美国PUBMED数据库统计,国际上探讨青蒿素(Artemisinin)的研究文献量从1980年的1篇开始,到80年代年均22.6篇,90年代年均79.7篇,21世纪头10年年均258篇,2010年以后的5年中、年均达518.8篇。据不完全统计,从1976~2015年40年里,各国学者在全球(包括我国)各种专业学术杂志上发表有关青蒿素类研究评述论文超过9800篇。

WHO/SWG-CHEMAL也于1982年初开始,与我国商谈开展青蒿素类药物在国际上的合作研究与开发。2003年,我国创制的青蒿素、蒿甲醚、青蒿琥酯、双氢青蒿素的原料药及其制剂被列入WHO《国际药典》第3版。青蒿素类药物单一用药和以青蒿素为基础的复合治疗逐步推广应用于全球主要疟区。

3.3 数百万生命的挽救

由于我国青蒿素、青蒿素衍生物和以青蒿素类为基础的复方制剂的成功研发,以及WHO对青蒿素联合疗法(artemisinin-based combination therapy, ACT)的推动和促进,21世纪开始,全球有疟疾流行的国家或地区陆续使用ACT治疗。2005年全球公共和私人机构采购ACT药物0.11亿人份(“人份”指一位患者一个疗程的用药量),2010年采购量上升到1.80亿人份,2012年为3.31亿人份(在当年恶性疟流行的88个国家中已有79个以ACT作一线药物),2014年达3.37亿人份。近些年,全球青蒿素原料药每年消耗量在180 t上下。

据WHO 2015年《世界疟疾报告》,由于防蚊措施推进、诊断技术发展和ACT的应用,疟疾发病率和死亡率逐年明显降低。全球疟疾发病总人数:2000年为2.62亿例,2005年为2.64亿例,2010年为2.43亿例,2015年为2.14亿例;2015年比2000年发病人数下降18%。就疟疾在全球人口中的发病率而论,2000年为14.6%,2005年为13.4%,2010年为11.3%,2015年为9.1%,2015年比2000年疟疾发生率下降了37.8%。全球因疟疾死亡总人数2000年为83.9万人,2005年73.8万人,2010年55.4万人,2015年43.8万人,2015年比2000年死亡人数下降48%。其中,5岁以下的儿童因疟

致死人数相应为72.3万人、61.4万人、42.8万人、30.6万人,2015年比2000年儿童因疟致死人数下降58%。WHO 2015年《世界疟疾报告》估测,从2000年到2015年使全球620万人避免死于疟疾,其中,590万人是5岁以下的儿童。在2015年12月该年度报告发布会上,WHO全球疟疾计划负责人阿隆索(Pedro Alonso)博士指出:“目前世界上治疗疟疾的最有效药物为青蒿素,由中国女药学家屠呦呦于1972年发现并成功提取。青蒿素的使用,成功地降低了疟疾患者的死亡率”。

3.4 国内外大奖激励创新正能量

抗疟新药青蒿素及其衍生物的发现与应用,受到我国政府高度评价。早在党中央结束“文革”、拨乱反正,鼓励我国科技界“树雄心、立壮志,向科学技术现代化进军”的1978年3月,将“全国科学大会奖”分别授予中研院中药所、山东中医药研究所/山东省寄生虫病研究所、云南药物研究所;在国务院重修《发明奖励条例》后第一次实施的1979年,将国家发明二等奖授给以中研院中药所为首的6个主要发明单位。此后,青蒿素的衍生物双氢青蒿素、蒿甲醚、青蒿琥酯,分别获得1992年全国十大科技成就、1996年国家发明二等奖、1989年国家发明三等奖;青蒿素复方和复方蒿甲醚,分别获得2006和2007年的国家科技进步二等奖;青蒿素的人工合成和蒿甲醚预防血吸虫病的新适应症研究,分别获得1987年国家自然科学二等奖和2001年国家科技进步二等奖。

进入21世纪,特别是近些年来,随着我国经济社会的发展和综合国力的提升,党和国家实施创新驱动发展战略,把创新摆在国家发展全局的核心地位,加快建设创新型国家。国家的科技进步和奖励,既反映了青蒿素的研究队伍不断创新的历程,也促进了他们继续创新的步伐。就科技论文而论,据我国CNKI数据库刊载青蒿素的相关研究论文数量,从20世纪90年代年均35.6篇到2001~2010年均155.5篇、增长336.8%,2011~2015年,年均298.8篇、环比又增长92.1%。

2011年,由于青蒿素的发现,屠呦呦研究员获美国拉斯克基金会的临床医学奖,该奖被视为国际生物医药领域重大奖项。该奖评委美国斯坦福大学露西·夏皮罗教授曾赞叹:“在人类的药物史土,如此一项能缓解数亿人病痛和压力、并挽救上百个国家数百万人生命的发现的机会并不常有”,“青蒿素这一高效抗疟药的发现,很大程度上归因于屠呦呦及其研究组

的洞察力、视野和顽强信念”，“屠教授的工作为世界提供了过去半个世纪里(治疗疟疾)最重要的药物干预方法”。2015年10月，屠呦呦又以“从中医药古典文献中获取灵感，先驱性地发现青蒿素，开创疟疾治疗新方法”，获得世界影响力最大的自然科学奖项——诺贝尔生理学或医学奖。她是第一位中国本土科学家获得诺贝尔自然科学奖，先后受到习近平总书记和李克强总理的表扬，并被授予2016年国家最高科学技术奖。国际学界的高度评价和中央领导的表彰大大激励了我国科技工作者，到2016年，在百度网页上，有关她的成就和信息已达一千多万条。人们热议，屠呦呦获奖和被表彰是由于她和她的研究组第一个把青蒿的化学活性部位引入“523”，第一个分离获得青蒿素，第一个做临床；第一就是首创，科学研究的灵魂是原创……。这表明，人们认识到“创新是引领发展的第一动力”，崇尚原始创新、追求卓越的正能量正在积蓄与壮大。

4 结语

作为新一类的抗疟药物，青蒿素是不含氮原子、具有双氧桥特异化学结构的倍半萜内酯，其作用方式与已有的抗疟药不同，显示了速效、高效、低毒的特点。由青蒿素肇始、双氢青蒿素等衍生物研发、ACT应用，已成世界疟疾治疗的首选药物，成功降低了疟疾患者的死亡率，在全球特别是发展中国家已挽救了数百万人的生命。

青蒿素源于中医药，其发现得益于中医典籍的启示，从事中医药的工作人员是青蒿素研发队伍的开拓者和重要主力军。青蒿素的发现，说明了“中国医药学是一个伟大的宝库”，“是中国古代科学的瑰宝，也是打开中华文明宝库的钥匙”，是“深入发掘中医药宝库中的精华，充分发挥中医药的独特优势”的

一个成功范例，“是中医药对人类健康事业作出巨大贡献的体现”。

疟疾是全球重大寄生虫病，传播于100多个国家和地区，每年发病数亿例，每年因疟疾致死百万人。20世纪60年代，由于疟原虫对已有抗疟药产生耐药性，疟疾肆虐全球，东南亚是重灾区，我国疟情也曾几次局部暴发。时值越南战争，美越双方军队因疟疾减员严重，越方求援于中国，希望获得新的有效抗疟药物。社会的重大需求，使我国政府做出决断，成立“523”项目，组织军民联合攻关。国家和社会的重大需要，催生了青蒿素。

从青蒿素的发现——衍生物的研发——青蒿素复方的应用，从青蒿资源调查——高产株药材基地培育——人工和生物合成启动，从实验室试产——工厂参与——企业集群形成，从国内产学研协作——国际产学研交流——世界产销竞争，从一个发现，到基础研究和应用研究、农业、工业、商业的衔接融合，形成全链条的新产业，突现了原始创新的意义和价值，突现了我国生物医药科学家、工商精英等多学科，多单位、多部门集体协作攻坚的智慧和贡献。其中，全国“523”领导小组和“青蒿素指导委员会”在特定时期的组织协调推动，功不可没。

人才是科技工作的支柱，是拉动科学发展的第一要素。在众多研究组参与的青蒿素研究与开发系统工程中，有着一批以屠呦呦为代表的善于思索、勇于创新、攻坚克难、持之以恒的领军人物，有着一群矢志攻关、辛勤耕耘、坚持不懈、默默奉献的人们，他们都被青蒿素的研发史所铭记。青蒿素的研发工程，为正确理解集体和个人的作用和贡献，为继承好、发展好、利用好祖先留下的中医药宝贵财富，为我国进一步的科技发展、崇尚原始创新、追求卓越提供正能量。

参考文献

- 1 Tu Y Y. Artemisia and Artemisinin (in Chinese). Beijing: Chemical Industry Press, 2015 [屠呦呦. 青蒿及青蒿素类药物. 北京: 化学工业出版社, 2015]
- 2 Li G Q, Li Y, Li Z L. Artemisinin-based Antimalarials (in Chinese). Beijing: Science Press, 2015 [李国桥, 李英, 李泽琳, 等. 青蒿素类抗疟药. 北京: 科学出版社, 2015]
- 3 Zhang J F. A Detailed Chronological Record of Project 523 and the Discovery and Development of Qinghaosu (Artemisinin) (in Chinese). 2nd ed. Guangzhou: Yangcheng Evening News Publishing House, 2015 [张剑方. 迟到的报告——五二三项目与青蒿素研发纪实. 第2版. 广州: 羊城晚报出版社, 2015]

Summary for “青蒿素的发现和发展”

Discovery and development of artemisinin

YUAN YaNan, JIANG TingLiang*, ZHOU Xing & LIU Ying

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

* Corresponding author, E-mail: tljiang@icmm.ac.cn

Malaria is an infectious disease, which is caused by plasmodium through mosquito biting or transfusing carriers' blood. Malaria is the main tropical parasitic disease globally, especially in the tropical and subtropical regions. At the end of the last century, nearly one hundred countries were affected each year, nearly 300 million people were infected and nearly one million people died.

Tu Youyou, who is from Institute of Chinese Materia Medica (ICMM), Academy of Traditional Chinese Medicine (current name: China Academy of Chinese Medical Sciences, CACMS), inspired by the description of antimalarial usage of Qinghao (*Artemisia annua* L.) in *Handbook of Prescriptions for Emergencies* written by Ge Hong, she redesigned a method to extract the active ingredient from Qinghao, and obtained No. 191 sample in October, 1971 that could inhibit rodent malaria and monkey malaria with 100% inhibition. And Tu and her team obtained artemisinin in November, 1972 firstly.

The absolute structure of artemisinin was determined by X-ray diffraction as a new sesquiterpene lactone of only carbon, hydrogen and oxygen elements with a specific structure of peroxide bridge. It is a new compound which is totally different from known antimalarial drugs in chemical structure and action mechanism. The clinical performance of artemisinin is fast, efficient, and with low toxicity.

At present, artemisinin and its derivatives are the most effective drug for malaria treatment. ACT therapy has been used in almost all countries and regions of malaria endemic areas, and more than one hundred million cases per year are cured. Millions of lives are saved globally by reducing the incidence and mortality of malaria.

Artemisinin is a gift from Traditional Chinese Medicine. The discovery of artemisinin is an output of the combination of Traditional Chinese Medicine with modern science and technology, an innovation system engineering integrated of multidisciplinary, together with a group of Chinese scientists' diligence and wisdom, which is a great contribution to the people's health. The Chinese government has successively awarded the relevant units participating in the project 11 times, for example the China National Technology Invention Awards, China National Natural Science Awards, China National Science and Technology Progress Awards, etc. The 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine and the 2016 Highest Science and Technology Awards were awarded to Professor Tu Youyou for her key contributions to the discovery of artemisinin.

artemisinin, artemisinin's derivatives, artemisinin-based combination therapy (ACT)

doi: 10.1360/N972017-00320