

## 酮替芬和赛庚啶增强体外培养的恶性疟原虫 氯喹抗性株对氯喹反应性的研究

权红, 汤林华\*

**【摘要】** 目的 研究酮替芬和赛庚啶增强体外培养的恶性疟原虫氯喹抗性株对氯喹反应性, 及其增效机制。方法 恶性疟原虫氯喹抗性株 (Fcc SM1/yN 株) 取自云南省思茅地区恶性疟患者静脉血, 经同步化处理, 用新鲜血将红细胞感染率调至 0.5%~1.0%, 红细胞压积与培养基体积比 (红细胞比容) 为 1:9, 混匀。制备氯喹药板及氯喹/酮替芬 (或氯喹/赛庚啶) 组合药板。氯喹药板自上而下每行氯喹终浓度依次为 0.312 5~2 560 nmol/L, 呈 2 倍递增。氯喹/酮替芬 (或氯喹/赛庚啶) 组合药板, 是在氯喹药板基础上加入酮替芬 (或赛庚啶), 每行 10 孔自左至右终浓度依次为 9.77~5 000 nmol/L, 呈 2 倍递增, 每块药板均设 A 行空白对照。每孔加混匀血样 50  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 培养 34 h, 镜检计数每 200 个疟原虫中含 3 个核以上裂殖体数, 计算氯喹单药及各配伍组对恶性疟原虫的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ), 以及酮替芬 (或赛庚啶) 提高氯喹活性的指数 (AEI)。选择 AEI 值较高的配伍组, 进行增效时序性研究。当氯喹对虫体作用 0~10 h 分别加入酮替芬 (或赛庚啶), 34 h 后检测和计算各时间段  $IC_{50}$  及 AEI。选择氯喹/酮替芬 (或氯喹/赛庚啶) 最佳配伍剂量, 培养恶性疟原虫 20 h, 提取总 RNA, 用实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 分析药物作用前后恶性疟原虫氯喹抗性转移基因 (pfcr) 和多药抗性基因 (pfmdr1) 表达水平。结果 0.312 5~2 560 nmol/L 氯喹与 625 nmol/L 酮替芬 (或赛庚啶) 配伍, 增效作用显著, 氯喹/酮替芬的  $IC_{50}$  为 74.53 nmol/L, AEI 为 0.42; 氯喹/赛庚啶的  $IC_{50}$  为 89.70 nmol/L, AEI 为 0.30。5 nmol/L 氯喹作用 6~7 h 加入 625 nmol/L 酮替芬 (或赛庚啶), 增效作用显著, 氯喹/酮替芬的  $IC_{50}$  为 67.70 nmol/L, AEI 为 0.47; 氯喹/赛庚啶的  $IC_{50}$  为 81.53 nmol/L, AEI 为 0.37。5 nmol/L 氯喹与 625 nmol/L 酮替芬 (或赛庚啶) 配伍, 作用 20 h, 氯喹/酮替芬可使 pfcr 基因表达水平升高 91%, 而氯喹/赛庚啶可使 pfmdr1 基因表达水平下降 14%。结论 体外氯喹与适量的酮替芬 (或赛庚啶) 配伍, 能增强恶性疟原虫氯喹抗性株对氯喹的反应性。氯喹对虫体作用 6~7 h 加入酮替芬 (或赛庚啶) 增效作用显著。该增效作用与 pfcr 基因和 pfmdr1 基因的表达水平有关。

**【关键词】** 恶性疟原虫; 抗性; 氯喹; 酮替芬; 赛庚啶; pfcr 基因; pfmdr1 基因; 基因表达

中图分类号: R531.32 文献标识码: A

### In vitro Potentiation of Chloroquine Activity in Plasmodium falciparum by Ketotifen and Cyproheptadine

QUAN Hong, TANG Lin-hua\*

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

**Abstract】** Objective To study the potentiation of chloroquine activity and mechanism by ketotifen and cyproheptadine in in vitro cultured Plasmodium falciparum Fcc SM1/yN strain. Methods In vitro cultured Fcc SM1/yN strain was added to pre-prepared drug plates at 50  $\mu$ l/well after synchronization to make final concentration of 0.312 5~2 560 nmol/L for chloroquine and of 9.80~5 000 nmol/L for ketotifen or cyproheptadine. After 34 hours' culture in 37  $^{\circ}$ C, the number of schizonts with 3 or more nuclei was calculated among 200 parasites under microscope. Calculated half inhibitive concentration ( $IC_{50}$ ) of chloroquine and every drug combination to parasite as well as chloroquine activity enhancement index (AEI) of ketotifen (or cyproheptadin). Time dependency of potentiation was studied. All data were analyzed statistically with SPSS 13.0. After 20 hours' action of one optimal combination dose of chloroquine/ketotifen or chloroquine/cyproheptadine, RNA of the Fcc SM1/yN strain was extracted and real-time PCR was used to determine the expression level of pfcr and pfmdr1 genes. Results The best potentiation effect was observed with ketotifen or cyproheptadine of 625 nmol/L, with  $IC_{50}$  of 74.53 nmol/L for chloroquine/ketotifen and 89.7 nmol/L for chloroquine/cyproheptadine respectively, and activity enhancement index (AEI) of 0.42 for chloroquine/ketotifen and 0.30 for chloroquine/cyproheptadine respectively. Combination of 625 nmol/L

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

\* 通讯作者, E-mail: ipdtlh@public3.sta.net.cn

ketotifen or cyproheptadine with 5 nmol/L chloroquine showed the highest potentiation potency. 6-7 hours during which ketotifen or cyproheptadine was added after chloroquine showed the highest effect, with  $IC_{50}$  of 67.70 nmol/L for chloroquine/ketotifen and 81.53 nmol/L for chloroquine/cyproheptadine respectively, and the AEI was 0.47 for chloroquine/ketotifen and 0.37 for chloroquine/cyproheptadine respectively. After action of chloroquine/ketotifen or chloroquine/cyproheptadine at one optimal combination dose, expression level of *pfcr t* gene increased by 91% and that of *pfmdr1* gene decreased by 14% respectively. Conclusion Appropriate combination of chloroquine/ketotifen or chloroquine/cyproheptadine potentiates chloroquine against in vitro cultured *P. falciparum*. 6-7 hour period is an optimal time when ketotifen or cyproheptadine was added after chloroquine. Potentiating activity of ketotifen and cyproheptadine may be related to the expression level of *pfcr t* and *pfmdr1* genes.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*; Resistance; Chloroquine; Ketotifen; Cyproheptadine; *pfcr t* gene; *pfmdr1* gene; Gene expression

\* Corresponding author, E-mail: ipdth@public3.sta.net.cn

恶性疟原虫对氯喹产生抗药性给疟疾控制造成困难, 于是有人开始尝试用其他药物治疗疟疾, 目前世界卫生组织比较倾向以青蒿素类药物为基础的联合用药方案<sup>[1-3]</sup>。由于氯喹具有价廉、高效及易获得等优点, 如能设法增强恶性疟原虫氯喹抗性株对氯喹的反应性, 则仍可继续发挥其抗疟作用。文献报道, 增效剂及抗性逆转剂与氯喹配伍, 能增强疟原虫对氯喹的反应性, 可部分逆转对氯喹的抗性<sup>[4-6]</sup>。研究结果为联合用药方案及增强恶性疟原虫对氯喹的反应性的构想提供了有价值的资料。

酮替芬和赛庚啶为 5-羟色胺(5-HT)类药物, 临床上常用于治疗过敏性疾病。酮替芬和赛庚啶单药能杀灭体外培养的、对氯喹具有高度抗性的伯氏疟原虫, 以及红内期恶性疟原虫。与氯喹伍用可逆转伯氏疟原虫对氯喹的抗性, 可治愈氯喹单药治疗无效的恶性疟患者<sup>[7-10]</sup>。推测酮替芬与赛庚啶的抗疟作用, 与阻断恶性疟原虫体内腺苷环化酶的活性、以及糖和蛋白质等代谢有关<sup>[9]</sup>。酮替芬或赛庚啶逆转恶性疟原虫对氯喹抗性的机制, 可能是两药作用于虫体的 P-蛋白类细胞组织(该组织可将氯喹泵出红细胞), 使感染的红细胞内氯喹浓度上升<sup>[10]</sup>所致。

本研究探讨酮替芬(或赛庚啶)增强恶性疟原虫氯喹抗性株对氯喹反应性的增效作用, 及其机制。

## 材料与方 法

### 1 材料

1.1 虫株来源 恶性疟原虫氯喹抗性株(Fcc SM1/yN 株)由云南省寄生虫病防治所于 2007 年惠赠。该虫株是 1983 年 7 月从云南省思茅地区医院一名住院病例(血检见恶性疟原虫环状体, 结合病史诊断为思茅地区本地感染的恶性疟) 静脉血中分离、并经体外连续培养获得。该虫株先后 8 次经体外微量法测定对氯喹

的敏感性, 在 32 pmol/井均有 3 个核以上裂殖体形成, 符合氯喹抗性标准, 判定为恶性疟原虫氯喹抗性株<sup>[11, 12]</sup>。本研究按照 WHO 推荐的体外微量法作了进一步检测, 确认在 32 pmol 井确有 3 个核以上裂殖体形成。同时, 经限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析, 证实存在 K76T 突变位点, 确定为恶性疟原虫氯喹抗性株。

1.2 药物、培养基及仪器 氯喹购自重庆康乐制药有限公司(批号为 0705005), 酮替芬(批号为 060903)和赛庚啶(批号为 060904)购自上海复旦复华药业有限公司。人 O 型全血购自上海市血液中心, 4℃保存, 用时离心并用培养基洗数次, 弃上清得红细胞。RPMI 1640 培养基和 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪-乙烷磺酸(Hepes 粉)购自美国 Gibco 公司。RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购自美国 Promega 公司。

### 2 方法

2.1 氯喹对 Fcc SM1/yN 株恶性疟原虫的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )测定 采用 WHO 推荐的 Rieckmann 体外微量法检测酮替芬(或赛庚啶)对氯喹的增效作用<sup>[13]</sup>。预实验结果, 氯喹为 640 nmol/L 时 Fcc SM1/yN 株疟原虫仍有 4~5 个裂殖体形成, 而氯喹为 1280 nmol/L 时裂殖体形成完全被抑制。计算氯喹对 Fcc SM1/yN 株恶性疟原虫的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )为 128.95 nmol/L (95%CI 为 119.36~138.53 nmol/L)。

2.2 氯喹对恶性疟原虫的抗疟活性测定 按照文献[14]方法, 检测氯喹对恶性疟原虫的抗疟活性。当恶性疟原虫环状体占 90%以上时, 用 5%山梨醇同步化处理, 继续培养 44~48 h, 使环状体达到 95%以上。用 RPMI 1640 培养基将红细胞感染率调至 0.5%~1.0%, 红细胞压积与培养基体积比(红细胞比容)调至 1:9, 混匀, 每孔加 50  $\mu$ l。每行氯喹终浓度呈 2

倍递增, 依次为 20、40、80、160、320、640 和 1 280 nmol/L, 同时设 A 行为空白对照。于 37 °C 培养 34 h。取 A 行对照孔样品涂片、镜检, 当 3 个核以上裂殖体数 ≥ 20%, 每孔取样涂制厚血膜, 镜检、计数每 200 个疟原虫中含 3 个核以上的裂殖体数。计算氯喹对恶性疟原虫的 IC<sub>50</sub>。

2.3 氯喹与酮替芬 (或赛庚啶) 配伍的增效作用 96 孔板自上而下每行氯喹终浓度呈 2 倍递增, 依次为 0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160、320、640、1 280 和 2 560 nmol/L。再自左至右每列依次加入酮替芬 (或赛庚啶) 至终浓度呈 2 倍递增, 依次为 9.77、19.54、39、78、156、312、625、1250、2 500 和 5 000 nmol/L。A 行为空白对照。每孔加入 50 μl 混匀血样, 37 °C 培养 34 h。重复 10 次。同上计数裂殖体数, 计算氯喹对恶性疟原虫的 IC<sub>50</sub>。

2.4 增效时序性研究 以上实验 5 nmol/L 氯喹与 625 nmol/L 酮替芬 (或赛庚啶) 配伍, 增效作用较好, 即以此配伍进行增效时序性研究。取同步化处理的恶性疟原虫, 红细胞感染率调至 0.5%~1.0%, 红细胞比容为 10%, 混匀, 每孔加入 50 μl 氯喹终浓度为 5 nmol/L, 混匀, 于 37 °C 培养 0~10 h, 于不同时间段, 每孔分别加入酮替芬 (或赛庚啶) 至 625 nmol/L。继续培养 34 h, 收集虫体, 计算不同时间各配伍组对恶性疟原虫的 IC<sub>50</sub>, 以及酮替芬 (或赛庚啶) 提高恶性疟原虫对氯喹的活性指数 (AEI)。

$$AEI = [\text{氯喹 } IC_{50} - \text{氯/酮 (或氯/赛) } IC_{50}] / \text{氯喹 } IC_{50}$$

2.5 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 疟原虫体外培养、同步化处理方法同上。红细胞感染率调至 5% 左右, 红细胞比容调至 5%, 混匀, 取 4 ml 加入预制的药皿中, 使每皿氯喹浓度为 5 nmol/L、酮替芬 (或赛庚啶) 浓度为 625 nmol/L (最佳配伍剂量)。另设不加药皿为对照。37 °C 培养 20 h 左右, 将含虫血 1 000×g 离心 5 min, 弃上清, 加入 10 倍体积的 0.015% 皂素, 于 37 °C 缓慢搅拌、孵育 15 min, 3 000×g 离心 10 min, 弃上清, 收集虫体。用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用反转录试剂盒进行反转录, 以分析药物作用前、后恶性疟原虫氯喹抗性转移基因 (pfcrt) 和多药抗性基因 (pfmdr1) 的表达水平。

提取的总 RNA 用紫外光谱仪鉴定。检测样品总 RNA 吸光度 (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值) 在 1.8~2.1 之间, 且电泳结果显示完整 RNA 分子结构, 为合格。

以丝氨酰 tRNA 合成酶 (seryl-tRNA synthetase) 基因作为实时荧光定量 PCR 反应的内参<sup>[13, 14]</sup>。以未用药的虫体为模板, 通过 PCR 反应分别得到针对 pfcrt、pfmdr1 和丝氨酰 tRNA 合成酶基因的 PCR 产

物, 以此制备实时荧光定量 PCR 反应的标准品。

### 3 统计学分析

酮替芬 (或赛庚啶) 对氯喹的增效作用, 所得数据用 SPSS 13.0 软件处理, 绘制剂量/效应曲线进行非线性回归分析。计算氯喹、及其与酮替芬 (或与赛庚啶) 配伍的 IC<sub>50</sub>。用 SPSS 13.0 软件对 Real-time PCR 数据进行单因素方差分析。

## 结 果

### 1 氯喹对恶性疟原虫的抗疟活性测定

镜检计数 200 个恶性疟原虫中含 3 个核以上裂殖体数, 实验数据经统计学处理, 绘制剂量/效应曲线 (图 1), 并进行非线性回归分析, 得到氯喹对恶性疟原虫的 IC<sub>50</sub> 为 128.95 nmol/L [95% 可信区间 (CI) 为 119.36~138.53 nmol/L]。

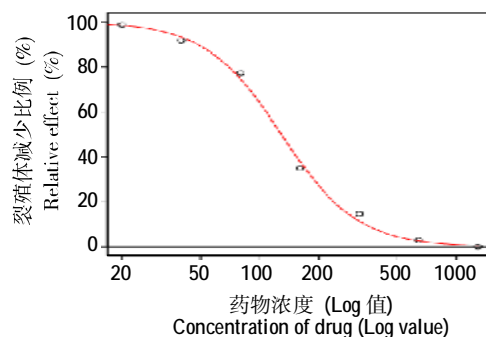


图 1 氯喹对体外培养的恶性疟原虫抗疟活性的剂量/效应曲线  
Fig. 1 Dose/response curve of chloroquine against in vitro cultured Plasmodium parasites

### 2 氯喹与酮替芬 (或赛庚啶) 配伍的增效作用

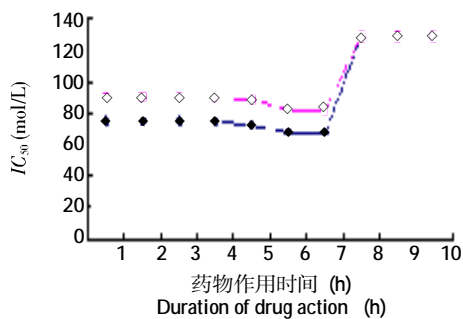
氯喹 (5~20 nmol/L) 与酮替芬 (或赛庚啶) (625 nmol/L) 配伍其增效作用显著, 其中 5 nmol/L 氯喹配伍 625 nmol/L 酮替芬 (或赛庚啶), 裂殖体数比 5 nmol/L 单药氯喹相应孔分别减少 74% 和 52% (P<0.05), 表明该配伍剂量可显著提高氯喹活性 (表 1)。

### 3 增效时序性研究

5 nmol/L 氯喹作用后 0~7 h 加入 625 nmol/L 酮替芬 (或赛庚啶), 其中 0~4 h 的 IC<sub>50</sub> 无明显差别, 5 h IC<sub>50</sub> 稍有降低, 6 和 7 h 达到 1 个小高峰, 氯喹/酮替芬 IC<sub>50</sub> 为 67.7 nmol/L (95% CI 为 58.02~77.37 nmol/L), AEI 为 0.47; 氯喹/赛庚啶 IC<sub>50</sub> 为 81.53 nmol/L (95% CI 为 65.95~97.19 nmol/L), AEI 为 0.37。8 h 后 IC<sub>50</sub> 升至 128 nmol/L (图 2)。

表 1 氯喹与酮替芬(或赛庚啶)配伍的增效作用结果  
Table 1 Effect of chloroquine potentiation by ketotifen and cyproheptadine

分组 Group (nmol/L)	IC <sub>50</sub> (nmol/L)	95% CI(nmol/L)	AEI
氯喹 Chloroquine (640-1 280)	128.95	119.36~138.53	-
氯喹 / 酮替芬(或赛庚啶) Chloroquine / Ketotifen (or cyproheptadine) 0.312 50~2 560 / 9.77~78.13	128	119.36~138.53	0
氯喹 / 酮替芬 Chloroquine / Ketotifen			
10~20/156.25	108.20	97.48~118.93	0.16
5~20/312.50	88.00	75.76~100.24	0.32
5~20/625.00	74.53	64.80~84.26	0.42
氯喹 / 赛庚啶 Chloroquine / Cyproheptadine			
10~20/156.25	113.74	102.83~124.64	0.12
5~20/312.50	97.39	86.02~108.77	0.25
5~20/625.00	89.70	77.70~101.70	0.30



◆ 氯喹/酮替芬 Chloroquine / Ketotifen, ◇ 氯喹/赛庚啶 Chloroquine / Cyproheptadine

图 2 氯喹与酮替芬(或赛庚啶)配伍增效时序性研究结果  
Fig.2 Time dependency of the potentiation by ketotifen and cyproheptadine

#### 4 Real-time PCR

RNA 质量鉴定, 经紫外光谱仪测定, 提取的各样品总 RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值均在 1.8~2.1 之间, 且电泳结果显示完整 RNA 分子。

标准曲线和溶解曲线: 拷贝数在 10<sup>-5</sup>~10<sup>1</sup>/μl 范围内, 3 种基因扩增的标准曲线呈良好的线性关系, 相关系数 (R<sup>2</sup>) 分别为 0.999 89、0.999 86 和 0.999 89。溶解曲线均为单峰且峰值单一, 说明反应具有特异性。

待测基因的表达量: 经内参校正后, 得到 *pfprt* 基因的相对表达量分别为 7.23×10<sup>-3</sup> 氯喹/酮替芬和 2.76×10<sup>-3</sup> 氯喹/赛庚啶, *pfmdr 1* 基因的相对表达量分别为 6.25×10<sup>-1</sup> 氯喹/酮替芬和 5.75×10<sup>-1</sup> 氯喹/赛庚啶。氯喹/酮替芬最佳配伍剂量为 5 nmol/L 氯喹+625 nmol/L 酮替芬, 可使恶性疟原虫 *pfprt* 基因表达水平升高 91% (P<0.01); 氯喹/赛庚啶最佳配伍剂量为 5 nmol/L 氯喹+625 nmol/L 赛庚啶, 可使疟原虫 *pfmdr 1* 基因表达水平下降 14% (P<0.05)。

## 讨 论

氯喹增效剂和抗性逆转剂的研究进展, 为解决日益严重的恶性疟原虫抗药性问题提供了新的线索。适当剂量的增效剂或逆转剂与氯喹配伍, 能够提高恶性疟原虫氯喹抗性株对氯喹的敏感性, 或使对氯喹的抗性得到部分逆转, 集中表现为恶性疟原虫氯喹抗性株对氯喹的 IC<sub>50</sub> 下降。但增效剂和逆转剂的作用是有限的<sup>[15-17]</sup>。已证实多种化合物具有增效及逆转氯喹抗性的作用。目前, 增效剂和抗性逆转剂不能常规用于临床, 主要是因为这些制剂对人体的不良反应, 大多数增效剂和抗性逆转剂在最佳浓度时单独应用均对人体产生毒性<sup>[18-21]</sup>。

根据作者以往实验结果, 单药酮替芬(或赛庚啶)浓度为 1 250 nmol/L 时对 Fcc SM1/yN 株恶性疟原虫已有微弱的抑制作用, 浓度为 2 500 nmol/L 或 5 000 nmol/L 时抑制作用明显, 不仅虫数明显减少且大部分原虫均出现退变现象; 而酮替芬(或赛庚啶)单药 (156.25~625 nmol/L) 以及氯喹单药 (5~20 nmol/L) 对 Fcc SM1/yN 株恶性疟原虫均无明显抑制作用。本研究将氯喹与酮替芬(或赛庚啶)伍用对其生长产生了抑制作用。以往实验还显示, 5~20 nmol/L 的氯喹对氯喹敏感株 (FCC/HN 株恶性疟原虫, 本单位保存) 具有抑制作用, 但对 Fcc SM1/yN 株恶性疟原虫基本无抑制作用。作者认为, 这是由于氯喹剂量偏低的缘故。本研究用 156.25~625 nmol/L 酮替芬(或赛庚啶)与 5~20 nmol/L 的氯喹伍用, 对 Fcc SM1/yN 株恶性疟原虫的生长产生了一定抑制作用, 虽然抑制程度不如该剂量的氯喹单药对氯喹敏感株的效果。分析原因可能是联合用药, 酮替芬(或赛庚啶)可提高 Fcc SM1/yN

株恶性疟原虫对氯喹的反应性, 使之对氯喹的抗药性得到部分逆转。

本研究结果表明, 有效的配伍取决于每种药物合适的浓度范围。浓度过低(如酮替芬或赛庚啶浓度低于 156.25 nmol/L、氯喹浓度低于 5 nmol/L)的配伍抑制效果不明显。而浓度过高(如酮替芬或赛庚啶浓度为 1.25~5 000 nmol/L, 氯喹浓度为 40~640 nmol/L), 已在单药氯喹的有效剂量范围, 其协同作用也不明显。表明浓度过高, 单药效果可能占主要优势。

增效时序性研究结果提示, 于氯喹作用不同时间段加入酮替芬(或赛庚啶), 其增效作用不同。于 0~4 h 加入, 各时间段其增效作用无显著差异。其中 6~7 h 加入, 效果稍好些。而 8 h 之后加入, 则无增效作用。

实时荧光定量 PCR 反应结果显示, 5 nmol/L 氯喹与 625 nmol/L 酮替芬(或赛庚啶)伍用(最佳配伍剂量), 作用 20 h 前后, 可使 Fcc SM1/yN 株恶性疟原虫 *pfcr1* 基因表达水平升高和 *pfmdr1* 基因表达水平降低, 表明酮替芬(或赛庚啶)增强 Fcc SM1/yN 株恶性疟原虫对氯喹反应性与 *pfcr1* 基因和 *pfmdr1* 基因表达水平有关。

本研究采用体外培养法, 恶性疟原虫生长状态良好, 形态发育及繁殖速度无异常。Fcc SM1/yN 株恶性疟原虫可作为药物组合研究的体外模型。本研究结果可为进一步研究恶性疟原虫逆转氯喹抗性提供参考。

#### 参 考 文 献

[1] Anderson TJ, Roper C. The origins and spread of antimalarial drug resistance: lessons for policy makers [J]. *Acta Trop*, 2005, 94(3): 269-280.

[2] Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents [J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 79(1): 55-87.

[3] Wellem TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria [J]. *J Infect Dis*, 2001, 184(6): 770-776.

[4] Van Schalkwyk DA, Egan TJ. Quinoline-resistance reversing agents for the malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. *Drug Resist Updat*, 2006, 9(4-5): 211-226.

[5] Martiney JA, Cerami A, Slater AF. Verapamil reversal of chloroquine resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is specific for resistant parasites and independent of the weak base effect [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(38): 22393-22398.

[6] Henry M, Alibert S, Orlandi-Pradines E, et al. Chloroquine resistance reversal agents as promising antimalarial drugs [J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(8): 935-948.

[7] Zhou MX, Pan XQ, Tong XM. Observation on the inhibitory effect of ketotifen, cyprohepadine and pizotifen on *Plasmodium falciparum* in vitro [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 1988, 6(2): 130-132. (in Chinese)

(周铭贤, 潘星清, 童小妹. 酮替芬、赛庚啶及苯噻啶体外抗恶性

疟原虫的作用 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1988, 6(2): 130-132.)

[8] Huang WZ, Luo MZ, Zhou MX, et al. Study on treatment of *Plasmodium cynomolgi* infection of macaque with ketotifen [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 1988, 6(2): 134-135. (in Chinese)

(黄文洲, 罗曼珍, 周铭贤, 等. 赛庚啶与利福平治疗猴疟的初步研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1988, 6(2): 134-135.)

[9] Huang WZ, Luo MZ, Zhou MX, et al. Study on treatment of *Plasmodium cynomolgi* infections of macaque of with ketotifen [J]. *Acta Pharma Sin*, 1987, 22(6): 409-412. (in Chinese)

(黄文洲, 罗曼珍, 周铭贤, 等. 酮替芬治疗猴疟的研究 [J]. *药理学学报*, 1987, 22(6): 409-412.)

[10] Pan XQ, Peters W, Warhurst D, et al. Studies of the reversion of chloroquine resistance by ketotifen and cyproheptadine [J]. *Chin J Parasit Dis Control*, 1990, 3(3): 194-197. (in Chinese)

(潘星清, Peters W, Warhurst D, 等. 酮替芬、赛庚啶逆转疟原虫对氯喹抗药性的研究 [J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 1990, 3(3): 194-197.)

[11] Zhu ZH. Successful in vitro continuous culture of a *Plasmodium falciparum* strain in south Yunnan Province [J]. *Yunnan Med*, 1984, 5(6): 379-380. (in Chinese)

(朱兆鸿. 云南南部一株恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 体外连续培养成功 [J]. *云南医药*, 1984, 5(6): 379-380.)

[12] Zhu ZH, Huang KG, Gao BH. Research study on separation, in vitro culture and bank construction of anti-chloroquine *Plasmodium falciparum* [J]. *Chin Pub Hlth*, 1994, 10(2): 61-62. (in Chinese)

(朱兆鸿, 黄开国, 高白荷. 恶性疟原虫抗氯喹株分离和培养建立虫库的实验研究 [J]. *中国公共卫生*, 1994, 10(2): 61-62.)

[13] Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, et al. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An in vitro microtechnique [J]. *Lancet*, 1978, 1(8054): 22-23.

[14] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture [J]. *Science*, 1976, 193(6): 673-675.

[15] Dzikowski R, Frank M, Deitsch K. Mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites is regulated independently of antigen production [J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2(3): 184-194.

[16] MerMerckx A, Nivez MP, Bouyer G, et al. *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(2): 1-11.

[17] Verdier F, Pussard E. Role of modulators in *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarials [J]. *Med Trop (Mars)*, 1995, 55 (4 suppl): 27-32.

[18] Bray PG, Deed S, Fox E, et al. Primaquine synergises the activity of chloroquine against chloroquine-resistant *P. falciparum* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(8): 1158-1166.

[19] Pradines B, Pages JM, Barbe J. Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance [J]. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 2005, 5(4): 411-431.

[20] Adovelande J, Deleze J, Schrevel J. Synergy between two calcium channel blockers, verapamil and fantofarone (SR33557), in reversing chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55(4): 433-440.

[21] Oduola AM, Sowunmi A, Milhous WK, et al. In vitro and in vivo reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* with promethazine [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, 58(5): 625-629.

[22] Millet J, Torrentino-Madamet M, Alibert S, et al. Dihydroethanoant hracene derivatives as in vitro malarial chloroquine resistance reversal agents [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(7): 2753-2756.

[23] Ward SA, Bray PG. Is reversal of chloroquine resistance ready for the clinic [J]. *Lancet*, 2001, 357(9260): 904.

(收稿日期: 2008-05-08 编辑: 富秀兰)