

氯喹和硫酸羟氯喹对 SARS-CoV-2 体外抗病毒活性的差异研究

但德苗, 刘小可, 杜洪桥, 卢佳*, 李新国*

武汉生物制品研究所有限责任公司 生物安全三级实验室, 湖北 武汉 430000

摘要: 目的 通过改变药物与病毒引入的先后顺序, 探讨氯喹与硫酸羟氯喹对严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 不同变体 (Prototype、Beta、Delta、Omicron) 的体外抗病毒活性。方法 预防研究: Vero E6 细胞用氯喹或硫酸羟氯喹 (200.00、150.00、100.00、50.00、16.70、5.55、1.85、0.62、0.21 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 孵育 1 h, 加入病毒附着 2 h, 去除病毒-药物混合物, 用新鲜培养基培养细胞直到实验结束; 治疗研究: Vero E6 细胞中加入病毒吸附 2 h, 去除病毒, 用含氯喹或硫酸羟氯喹的培养基培养细胞直到实验结束; 全时研究: Vero E6 细胞用药物孵育 1 h, 加入病毒附着 2 h, 去除病毒-药物混合物, 用含药物的培养基培养细胞直到实验结束。培养 72 h 后显微镜下观察细胞是否变圆脱落判断细胞病变情况, 计算半数效应浓度 (EC_{50}) 及药物选择指数 (SI)。结果 2 种药物对于 SARS-CoV-2 的预防效果较差; 氯喹和硫酸羟氯喹在治疗和全时处理下均表现出良好的抗病毒活性, 其中硫酸羟氯喹的 EC_{50} 小于氯喹, SI 大于氯喹, 抗病毒效果较氯喹更优越。在治疗和全时处理条件下, 氯喹 ($\text{EC}_{50}=0.904 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和硫酸羟氯喹 ($\text{EC}_{50}=0.143 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 Omicron 变异株抗病毒效果较其他变种更明显。结论 氯喹和硫酸羟氯喹在治疗和全时处理下均表现出良好的抗病毒活性, 且 2 种药物对 Omicron 变异株的活性高于其他变种。

关键词: SARS-CoV-2; 氯喹; 硫酸羟氯喹; 抗病毒; 预防; 治疗

中图分类号: R978.7 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 01-0072-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.01.010

Differential of antiviral activity between chloroquine and hydroxychloroquine sulfate against SARS-CoV-2 *in vitro*

DAN Demiao, LIU Xiaoke, DU Hongqiao, LU Jia, LI Xinguo

Biosafety Level 3 Laboratory, Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd., Wuhan 430000, China

Abstract: Objective To investigate the *in vitro* antiviral activity of chloroquine and hydroxychloroquine sulfate against different variants of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Prototype, Beta, Delta, Omicron) by changing the sequence of drug and virus introduction. **Methods** Prophylactic treatment: Vero E6 cells were treated with Chloroquine or hydroxychloroquine sulfate (200.00, 150.00, 100.00, 50.00, 16.70, 5.55, 1.85, 0.62, 0.21 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 1 h, then the virus was added and incubated for another 2 h. The virus-drug mixture was replaced with fresh medium until the end of the experiment. Post-entry treatment: Vero E6 cells were incubated with virus for 2 h, then the virus was removed and the cells were cultured with drug-containing medium until the end of the experiment. Full-time treatment: Vero E6 cells were pretreated with the drug for 1 h ahead, then virus was added and incubated for another 2 h. The virus-drug mixture was discarded and the cells were cultured with drug-containing medium until the end of the experiment. After 72 h of culture, the cells were observed to see whether they became round and shed to determine the cytopathic situation, and the semi-maximum effect concentration (EC_{50}) and drug selection index (SI) were calculated. **Results** Both drugs were less effective in preventing SARS-CoV-2. Chloroquine/hydroxychloroquine sulfate showed good antiviral activity under both therapeutic and full-time treatment. EC_{50} of hydroxychloroquine sulfate was less than chloroquine, SI was greater than chloroquine, antiviral effect of hydroxychloroquine sulfate was better than chloroquine. The antiviral effect of

收稿日期: 2022-07-15

基金项目: 国家重点研发计划“公共安全风险防控与应急技术装备”重点专项(2020YFC0841800); 国家重点研发计划“公共安全风险防控与应急技术装备”重点专项(2020YFC0842100); 2021 年省级科技创新专项立项项目(2021ACB005)

第一作者: 但德苗(1996—), 女, 研究实习员, 从事新发传染病相关研究。E-mail: yunzhibuer@163.com

*共同通信作者: 卢佳(1984—), 女, 副研究员, 从事新发传染病相关研究。E-mail: johnsonchau@163.com

李新国(1973—), 男, 副研究员, 从事免疫学相关研究。E-mail: Lixinguo@sinopharm.com

chloroquine ($EC_{50} = 0.904 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and hydroxychloroquine sulfate ($EC_{50} = 0.143 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was more significant against Omicron variant than other variants under therapeutic and full-time treatment conditions. **Conclusion** Chloroquine/hydroxychloroquine sulfate showed good antiviral activity under both therapeutic and full-time treatment, and both drugs were significantly more active against the Omicron variant than the other variants.

Key words: SARS-CoV-2; chloroquine; hydroxychloroquine sulfate; antiviral; prophylaxis; treatment

在由严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)大流行期间,出现了多种SARS-CoV-2变异株,这些变异株的出现导致病毒进一步适应性进化,例如传播力、毒力或免疫逃逸增加^[1-2]。目前全球流行的常见变异株主要包括Alpha、Beta、Gamma、Delta和Omicron,且5种变异株在刺突蛋白上均有不同程度的利于逃脱宿主免疫系统的突变存在^[3-4]。尽管当前全球范围内都在针对刺突蛋白上的突变进行疫苗研究,但是目前依旧没有针对人类冠状病毒感染的有效并获得广泛认可的疗法。现有的治疗策略通常仅限于对症治疗和支持治疗,在缺乏针对SARS-CoV-2特定治疗方法的情况下,COVID-19研究的工作重点应该是预防及控制病毒的复制和传播。氯喹及其羟基化衍生物羟氯喹作为治疗和预防疟疾、类风湿性关节炎以及系统性红斑狼疮等慢性炎症性疾病的药物,被认为是治疗COVID-19的潜在药物从而备受关注^[5]。

氯喹和硫酸羟氯喹具有相似的化学结构,不同之处仅在于硫酸羟氯喹侧链末端存在羟基^[6],其中氯喹曾被列入中华人民共和国国家卫生健康委员会发布的《新冠肺炎诊疗指南(第七版)》试验药物清单。氯喹和硫酸羟氯喹治疗COVID-19,主要通过2方面作用:①干扰人血管紧张素转换酶2(ACE2),阻断ACE2末端的糖基化从而导致ACE2与SARS-CoV-2刺突蛋白之间的结合亲和力降低,抑制SARS-CoV-2的病毒感染^[7-8];②由于氯喹和羟氯喹都是弱碱性化合物,会提高体内酸性细胞内细胞器的pH值,例如包涵体和溶酶体,并通过提高细胞膜表面的pH值,阻止病毒与宿主细胞膜融合,从而抑制病毒感染^[9]。

武汉病毒研究所的Wang等^[5]率先发表关于氯喹在体外有效阻断SARS-CoV-2感染非洲绿猴肾细胞(Vero E6)中病毒复制的研究,结果显示氯喹在半数效应浓度(EC_{50})为 $1.13 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时即可有效抑制SARS-CoV-2的感染。基于体外数据开展的体内疗效研究显示,氯喹改善了患者的肺部病理学情况,缩短了病程^[10],且有研究显示硫酸羟氯喹与阿奇霉

素联合使用可以降低患者的病毒载量^[11-12]。本研究改变药物的引入时间,探究不同给药方式下氯喹和硫酸羟氯喹对SARS-CoV-2的体外抗病毒作用,并探讨2种药物对当下SARS-CoV-2不同的流行株是否也具有抑制作用。

1 材料

1.1 细胞与病毒

Vero E6细胞来自武汉生物制品研究所有限责任公司生物安全三级实验室,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养。

新型冠状病毒原型株(prototype strain)分离于中国科学研究院武汉病毒研究所;Beta株(B.1.351)和Delta株(B.1.617.2)均分离于湖北省疾病预防控制中心;新型冠状病毒 Omicron BA.1株(B.1.1.529)分离于香港大学。4种毒株均由武汉生物制品研究所有限责任公司生物安全三级实验室培养及保存。

1.2 药物

氯喹(美国 Med Chem Express 公司,货号 HY-17589A,质量分数 99.98%);硫酸羟氯喹(中国食品药品检定研究院标准品,货号 100582-202103,质量分数 99.9%);氯喹易溶于DMSO,硫酸羟氯喹易溶于水,将药物冻干粉末分别稀释至 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,其中DMSO不超过总体积的0.5%,通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤膜滤过,储存至 -80°C 备用。

1.3 试剂与仪器

0.25% Trypsin-EDTA(美国 Gibco 公司);DMEM(美国 Gibco 公司);新生牛血清(四季青,浙江天杭生物科技股份有限公司);青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司);DMSO(中国 Sangon Biotech 公司);显微镜(中国重庆奥特光学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞毒性实验

将培养好的 Vero E6 细胞以每孔 2×10^4 铺于 96 孔板中,每孔 $100 \mu\text{L}$ 。细胞贴壁 16~24 h,汇合度达到 90%。弃去原细胞培养基,加入含不同浓度(200.00、150.00、100.00、50.00、16.70、5.55、1.85、0.62、0.21 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)氯喹或硫酸羟氯喹的培养基,每孔 $100 \mu\text{L}$,每个浓度 8 个复孔,置于 37°C 、5% CO_2

培养。72 h后显微镜下观察细胞病变效应(CPE),当细胞形态呈现出圆形或椭圆形并脱落则判断细胞病变,计算药物的半数细胞毒浓度(CC₅₀),即致50%细胞死亡所需的药物浓度。

2.2 体外抗病毒活性作用机制

将 Vero E6 细胞以每孔 2×10^4 接种到 96 孔板中,贴壁生长 16~24 h 至汇合度达到 90%,在生物安全三级实验室进行 SARS-CoV-2 的感染操作。体外研究分为 3 个部分:预防研究、治疗研究、全时研究。

2.2.1 预防研究 Vero E6 细胞接种操作同“2.1”项,细胞贴壁 16~24 h 后,预先在含不同浓度(0.006、0.020、0.070、0.210、0.620、1.850、5.550、16.700、50.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)氯喹或硫酸羟氯喹的培养基中孵育 2 h,每孔 100 μL ,而后每孔加入感染复数为 0.005 的病毒液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育感染 2 h。去除含病毒的培养基,更换成不含药物和病毒的新鲜培养基,培养 72 h 后观察细胞是否变圆脱落判断细胞病变情况,利用 Graphpad Prism 绘制药物对病毒的抑制曲线,计算出药物的 EC₅₀ 以及药物选择指数(SI)。

$$\text{SI} = \text{CC}_{50} / \text{EC}_{50}$$

2.2.2 治疗研究 Vero E6 细胞接种操作同“2.1”项,细胞贴壁 16~24 h 后,Vero E6 细胞中加入感染复数为 0.005 的病毒,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下吸附感染 2 h,去除病毒液,用 PBS 洗净。加入含不同浓度(0.006、0.020、0.070、0.210、0.620、1.850、5.550、16.700、50.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)氯喹或硫酸羟氯喹的培养基,每孔 100 μL ,每个浓度 8 个复孔,培养 72 h 后观察细胞是否变圆脱落判断细胞病变情况。利用 Graphpad Prism 绘制药物对病毒的抑制曲线,计算药物的 EC₅₀ 和 SI。

2.2.3 全时研究 Vero E6 细胞预先在不同浓度(0.006、0.020、0.070、0.210、0.620、1.850、5.550、16.700、50.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)氯喹或硫酸羟氯喹培养基中孵育 1 h,每孔 100 μL ,在药物存在下每孔接种感染复数为 0.005 的病毒,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。而后,去除病毒-药物混合液,PBS 洗净细胞,并用含药物的培养基培养 72 h,观察细胞是否变圆脱落判断细胞病变情况。利用 Graphpad Prism 绘制药物对病毒的抑制曲线,计算药物的 EC₅₀ 和 SI。

2.3 统计分析

计量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据均采用 Graphpad Prism 统计软件进行处理,组间差异比较采

用 t 检验。

3 结果

3.1 氯喹和硫酸羟氯喹的细胞毒性实验

本实验对药物进行不同浓度的稀释处理从而评估其对细胞的毒性作用。结果显示氯喹和硫酸羟氯喹的 CC₅₀ 分别为 76.73、48.32 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,两者之间无显著的差异。结果见图 1。

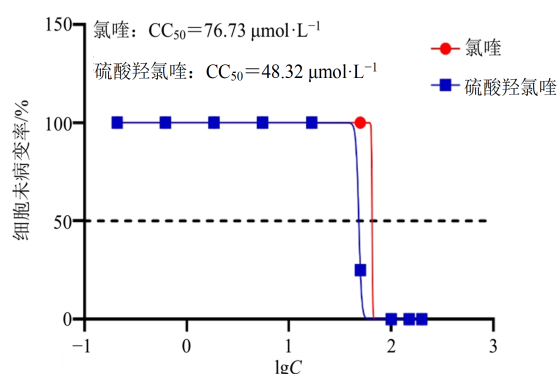


图1 氯喹和硫酸羟氯喹的细胞毒性

Fig. 1 Cytotoxicity of chloroquine and hydroxychloroquine sulfate

3.2 感染前氯喹和硫酸羟氯喹预防处理对 SARS-CoV-2 的影响

结果如表 1 所示,在病毒感染前添加药物预防处理,其中氯喹在研究中的最高浓度时,其抑制率也不超过 50%;相对氯喹而言,硫酸羟氯喹对 Omicron 变异株的 EC₅₀ 值为 13.87 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表现出较优的体外抗病毒效果。

3.3 氯喹和硫酸羟氯喹治疗 SARS-CoV-2 感染

氯喹和硫酸羟氯喹都具有良好的抗病毒活性,且以浓度相关的方式减少病毒感染细胞(图 2)。与氯喹相比,硫酸羟氯喹对 4 种病毒株均显示出更优的抗病毒作用,EC₅₀ 值较小;且 SI 值更大,显示出良好的药物选择性(表 2)。

3.4 氯喹和硫酸羟氯喹对 Vero E6 细胞感染 SARS-CoV-2 的全时保护作用

氯喹和硫酸羟氯喹在病毒的进入与增殖阶段给药表现良好的抗病毒作用,以浓度相关的方式减少病毒感染细胞(图 3),特别是对 Omicron 毒株感染起到明显的保护作用,EC₅₀ 值较小。在 4 种毒株的感染下,硫酸羟氯喹对细胞的保护作用均优于氯喹,EC₅₀ 值更小,SI 更大。结果见表 3。

4 讨论

自疫情暴发以来,世界各地的研究人员已经发现了许多可能对 COVID-19 具有潜在功效的药物,

表1 氯喹和硫酸羟氯喹预防处理对SARS-CoV-2的影响

Table 1 Prophylactic treatment with chloroquine/hydroxychloroquine sulfate on SARS-CoV-2

药物浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	氯喹(病变孔数/总孔数)				硫酸羟氯喹(病变孔数/总孔数)			
	Prototype	Beta	Delta	Omicron BA.1	Prototype	Beta	Delta	Omicron BA.1
50.000	8/8	7/8	8/8	8/8	0/8	0/8	1/8	0/8
16.700	8/8	8/8	8/8	8/8	7/8	5/8	7/8	4/8
5.550	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	6/8
1.850	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
0.620	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
0.210	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
0.070	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
0.020	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
0.006	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

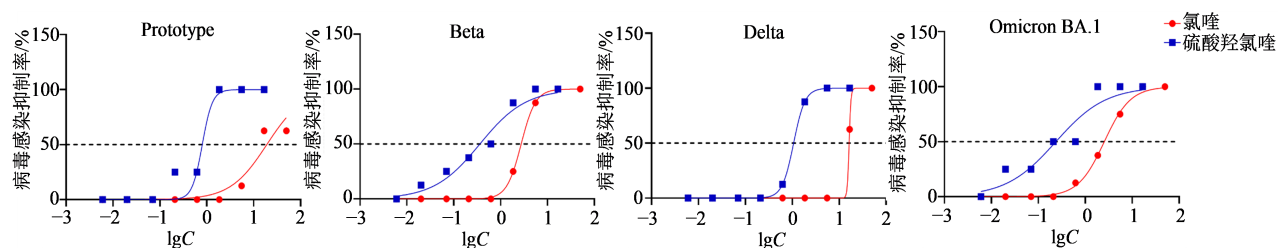


图2 氯喹/硫酸羟氯喹治疗处理的病毒感染抑制率

Fig. 2 Rate of viral infection inhibition of post-entry treatment with chloroquine/hydroxychloroquine sulfate

表2 治疗处理氯喹/硫酸羟氯喹的 EC_{50} 和SITable 2 EC_{50} and SI of post-entry treatment chloroquine/hydroxychloroquine sulfate

组别	$\text{EC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$				SI			
	Prototype	Beta	Delta	Omicron BA.1	Prototype	Beta	Delta	Omicron BA.1
氯喹	19.05	2.75	16.32	2.55	4.028	27.902	4.702	30.126
硫酸羟氯喹	0.80	0.36	1.07	0.24	60.189	133.776	45.117	203.882

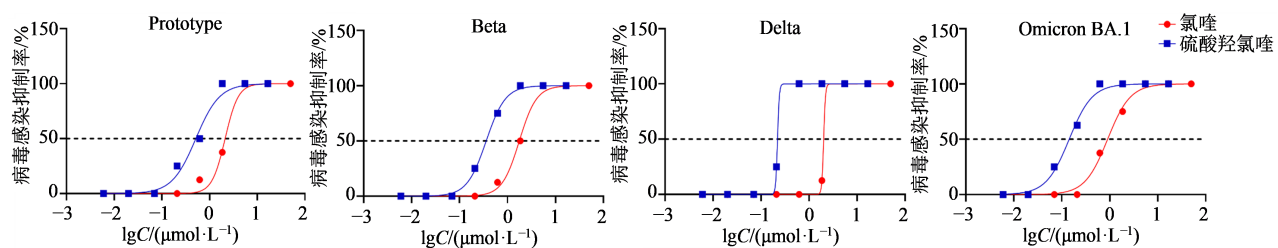


图3 氯喹/硫酸羟氯喹对感染SARS-CoV-2的全时保护作用

Fig. 3 Full-time protection of SARS-CoV-2 infection with chloroquine/hydroxychloroquine sulfate

表3 全时处理氯喹/硫酸羟氯喹的 EC_{50} 和SITable 3 EC_{50} and SI of full-time treatment chloroquine/hydroxychloroquine sulfate

组别	$\text{EC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$				SI			
	Prototype	Beta	Delta	Omicron BA.1	Prototype	Beta	Delta	Omicron BA.1
氯喹	2.126	1.768	2.015	0.904	36.091	43.397	38.079	84.878
硫酸羟氯喹	0.517	0.361	0.220	0.143	93.424	133.925	219.636	337.902

但目前没有临床证据可用于 SARS-CoV-2 的特异性抗病毒药物。尽管当前多国已紧急批准相关疫苗的使用,但是随着病毒的不断适应性突变,疫情防控的形势依旧紧张,研发特异性药物依旧是当下急需解决的问题。

氯喹和硫酸羟氯喹多年以来一直被用作治疗风湿类疾病,但是其确切作用机制尚未完全阐明。作为弱碱类化合物,氯喹和硫酸羟氯喹在溶酶体内的酸性环境中累积,从而干扰溶酶体活性和自噬,破坏细胞膜稳定性,进而可能抑制免疫激活^[13]。已有研究指出氯喹和硫酸羟氯喹可能抑制了 SARS-CoV-2 病毒粒子从早期内体到 Vero E6 细胞内溶酶体的转运,而这种转运可能是释放病毒基因组和病毒复制的必要条件^[14-15]。在 Wang 等^[5]的研究中,氯喹对 SARS-CoV-2 的全时处理具有抑制作用,在 48 h 的培养时间后,EC₅₀ 值为 1.13 μmol·L⁻¹,本研究处理 72 h 氯喹的 EC₅₀ 值为 2.126 μmol·L⁻¹,结果是相当的。Yao 等^[16]的研究比较了氯喹和硫酸羟氯喹的体外抗病毒作用,发现硫酸羟氯喹在体外表现出更好的抗 SARS-CoV-2 活性,与本研究结果符合,即在 4 种毒株的感染下,硫酸羟氯喹的 EC₅₀ 总是小于氯喹的 EC₅₀ 值,表明硫酸羟氯喹具有更强的抗病毒活性。Yao 等^[16]的抗病毒活性研究中,发现在预防治疗中氯喹表现出很差的保护作用,本研究中氯喹在所选最高浓度时也未表现出对 Vero E6 细胞的保护作用,相对氯喹而言,硫酸羟氯喹在 72 h 后对 Omicron 变异株的 EC₅₀ 值为 13.87 μmol·L⁻¹,表现出较为优越的体外抗病毒效果。本研究结果表明,硫酸羟氯喹较氯喹可以在体外更有效抑制 SARS-CoV-2 的感染,预测该药物具有更好的抗击 SARS-CoV-2 良好潜力,但是硫酸羟氯喹的细胞毒性致使其长期过量使用可能会引起中毒,因此还有待临床试验验证。

本研究通过改变药物与病毒的不同添加方式,即预防、治疗和全时处理探究药物对病毒的作用机制,发现羟氯喹和氯喹的 EC₅₀ 值都随着孵育时间的延长而降低,即全时处理相对于其他 2 种药物处理方式表现出更低的 EC₅₀ 值。这表明孵育时间可能会影响药物的抗病毒活性,推测可能更长的孵育时间使得药物在细胞内累积到更高的浓度,最终体现出更好的抗病毒效果。

此外,本研究的实验结果表明,氯喹/硫酸羟氯喹对当前包括 Omicron 在内的流行株都具有抗病毒活性,尤其对 Omicron 毒株具有较强的抗病毒作用,

这些结果表明,随着 SARS-CoV-2 变异株的不断突变、抗原性漂移,氯喹/硫酸羟氯喹可能对当下或者未来的变异株病毒仍然保持抗性。研究并开发新型抗病毒药物是至关重要的,它们可能是控制 SARS-CoV-2 大流行必不可少的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Davies N G, Abbott S, Barnard R C, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B. 1.1.7 in England [J]. Science, 2021, 372(6538): eabg3055.
- [2] Sabino E C, Buss L F, Carvalho M P S, et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence [J]. Lancet, 2021, 397(10273): 452-455.
- [3] Saputri D S, Li S L, van Eerden F J, et al. Flexible, functional, and familiar: Characteristics of SARS-CoV-2 spike protein evolution [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 2112.
- [4] Khateeb J, Li Y C, Zhang H B. Emerging SARS-CoV-2 variants of concern and potential intervention approaches [J]. Crit Care, 2021, 25(1): 244.
- [5] Wang M L, Cao R Y, Zhang L K, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro* [J]. Cell Res, 2020, 30(3): 269-271.
- [6] Schrezenmeier E, Dörner T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: Implications for rheumatology [J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(3): 155-166.
- [7] Vincent M J, Bergeron E, Benjannet S, et al. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread [J]. Virol J, 2005, 2: 69.
- [8] Keyaerts E, Vijgen L, Maes P, et al. *In vitro* inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(1): 264-268.
- [9] Zhitomirsky B, Assaraf Y G. Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance [J]. Oncotarget, 2015, 6(2): 1143-1156.
- [10] Gao J J, Tian Z X, Yang X. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies [J]. Biosci Trends, 2020, 14(1): 72-73.
- [11] Gautret P, Lagier J C, Parola P, et al. Hydroxychloroquine

- and azithromycin as a treatment of COVID-19: Results of an open-label non-randomized clinical trial [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 56(1): 105949.
- [12] Gautret P, Lagier J C, Parola P, et al. Clinical and microbiological effect of a combination of hydroxychloroquine and azithromycin in 80 COVID-19 patients with at least a six-day follow up: A pilot observational study [J]. *Travel Med Infect Dis*, 2020, 34: 101663.
- [13] Cortegiani A, Ingoglia G, Ippolito M, et al. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19 [J]. *J Crit Care*, 2020, 57: 279-283.
- [14] Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion [J]. *Autophagy*, 2018, 14(8): 1435-1455.
- [15] Liu J, Cao R Y, Xu M Y, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection *in vitro* [J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 16.
- [16] Yao X T, Ye F, Zhang M, et al. *In vitro* antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(15): 732-739.

[责任编辑 兰新新]