

卟啉衍生物介导声动力疗法缓解脂多糖诱导的小鼠急性肺炎肺损伤作用及机制

陶 琢, 温 莹, 荣玉美, 刘天军*

中国医学科学院北京协和医学院生物医学工程研究所 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192

摘 要: **目的** 评估基于卟啉结构的新型声敏剂 5,10,15,20-四-[4-[(*S*)-2,6-二氨基己酰胺]苯基]卟啉(4i)介导的声动力疗法(SDT)在小鼠急性肺炎模型中的治疗效果。**方法** 将 4i 与 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)溶液混合后超声,观察活性氧(ROS)的生成;体外培养肺癌人类肺泡基底上皮细胞 A549 和人正常支气管上皮细胞系 BEAS-2B,经脂多糖(LPS, 500 ng·mL⁻¹)诱导炎症后,给予 4i (16、32、64 mg·mL⁻¹)联合超声(1.0 MHz、1 W·cm⁻²)作用,通过 MTT 实验和碘化丙啶(PI)染色法检测细胞活性,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测 *p38*、细胞外信号调节激酶(*ERK*)1/2、*c-Jun* 氨基端激酶(*JNK*)1/2 mRNA 水平。小鼠通过气管插管吸入 50 μL 的 4i (60、120、180 mg·kg⁻¹) 2 h 后,处死动物并提取其内脏器官,观察 4i 的分布。建立小鼠急性肺炎(50 μL 0.2 μmol·L⁻¹ LPS 溶液通过鼻腔吸入)模型后 3 d,4i 通过气管滴注给药,每隔 1 天给药 1 次,剂量分别为 60、90、120 mg·kg⁻¹,4i 吸入 2 h 后进行超声照射(1.0 MHz、10 min),共进行 4 次治疗;动态监测各组小鼠体质量变化;检测小鼠肺功能;采用苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理学改变,通过 Wright-Giemsa 染色分析支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞浸润情况,使用 ELISA 法检测 BALF 中促炎因子肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素(IL)-6 及总蛋白水平。**结果** 随着 4i 浓度和声强的增加,生成的 ROS 也呈增加趋势。细胞实验结果表明,与模型组相比,4i 联合 SDT 处理后,死亡细胞的红色荧光明显增强;细胞存活率显著降低($P<0.01$ 、 0.001),*JNK2*、*p38*、*ERK1/2* mRNA 表达显著降低($P<0.01$ 、 0.001)。动物实验结果表明,4i 沿气管给药确保了其在肺部的有效分散和分布,吸入 2 h 后,肺部 4i 浓度与荧光强度呈正相关。与对照组比较,模型小鼠从第 3 天开始体质量下降,随着 4i 介导的 SDT 进行逐渐改善;与模型组比较,接受 4i 介导 SDT 的小鼠的用力肺活量(FVC)、第一秒用力呼气容积与用力肺活量的比值(FEV₁/FVC)、峰值呼气流速(PEF)显著增加($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),肺组织病理变化均有不同程度的逆转,炎症评分显著降低($P<0.001$),BALF 中炎症细胞数量显著减少($P<0.001$)、TNF-α、IL-6 和总蛋白浓度显著降低($P<0.01$ 、 0.001)。**结论** 新型卟啉衍生物 4i 可通过 SDT 显著减轻肺部炎症反应,对急性肺炎具有显著的治疗效果,可能通过影响丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路发挥作用。

关键词: 声动力疗法;卟啉衍生物;炎症;活性氧;声敏剂;MAPK 通路

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)02-0486-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.02.010

Study on effects and mechanisms of porphyrin derivatives-mediated sonodynamic therapy in alleviating lipopolysaccharide-induced acute pneumonia lung injury in mice

TAO Zhuo, WEN Ying, RONG Yumei, LIU Tianjun

Tianjin Key Laboratory of Biomedical Materials, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Abstract: **Objective** To evaluate the therapeutic effect of a novel porphyrin-based photosensitizer, 5,10,15,20-tetra-[4-[(*S*)-2,6-diaminohexanoylamino]phenyl]porphyrin (4i), mediated sonodynamic therapy (SDT) in a mouse model of acute pneumonia. **Methods** 4i was mixed with 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) solution and then subjected to ultrasound to observe the generation of reactive oxygen species (ROS). Human lung cancer alveolar basal epithelial cells A549 and human normal bronchial

收稿日期: 2025-06-13

基金项目: 中国医学科学院医学创新基金资助项目(2021-I2M-1-052/2021-I2M-1-015)

作者简介: 陶 琢(1999—), 博士研究生, 从事光敏剂对于肺部疾病的研究。E-mail: taozhuo777@163.com

*通信作者: 刘天军, 博士, 研究员, 长期从事分子设计与超分子化学的研究工作。E-mail: liutianjunpubm@163.com

epithelial cell line BEAS-2B were cultured *in vitro*. After induction of inflammation with lipopolysaccharide (LPS, 500 ng·mL⁻¹), 4i (16, 32, 64 mg·mL⁻¹) was combined with ultrasound (1.0 MHz, 1 W·cm⁻²) treatment. Cell viability was detected by MTT assay and propidium iodide (PI) staining, and the mRNA levels of *p38*, extracellular signal-regulated kinase (*ERK*) 1/2, and c-Jun N-terminal kinase (*JNK*) 1/2 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). Mice were intratracheally instilled with 50 μ L of 4i (60, 120, 180 mg·kg⁻¹) for 2 h, and then the animals were sacrificed and their internal organs were extracted to observe the distribution of 4i. A mouse model of acute pneumonia was established by intranasal inhalation of 50 μ L of 0.2 μ mol·L⁻¹ LPS solution for 3 d. 4i was administered via intratracheal instillation at doses of 60, 90, and 120 mg·kg⁻¹ every other day, and ultrasound irradiation (1.0 MHz, 10 min) was performed 2 h after 4i inhalation for a total of four treatments. Body weight changes were dynamically monitored in each group. Pulmonary function was detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in lung tissue, and Wright-Giemsa staining was used to analyze the infiltration of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). The levels of pro-inflammatory factors tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, and total protein in BALF were detected by ELISA. **Results** With the increase of 4i concentration and sound intensity, the generation of ROS also showed an increasing trend. The results of cell experiments indicated that compared with the model group, the red fluorescence of dead cells was significantly enhanced after 4i combined with SDT treatment; the cell survival rate was significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$), and the mRNA expression of *JNK2*, *p38*, and *ERK1/2* was significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). The results of animal experiments showed that intratracheal administration of 4i ensured its effective dispersion and distribution in the lungs. Two hours after inhalation, the concentration of 4i in the lungs was positively correlated with the fluorescence intensity. Compared with the control group, the body weight of model mice decreased from the third day and gradually improved with the administration of 4i-mediated SDT. Compared with the model group, the forced vital capacity (FVC), the ratio of forced expiratory volume in one second to forced vital capacity (FEV₁/FVC), and peak expiratory flow rate (PEF) of mice treated with 4i-mediated SDT were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the pathological changes in lung tissue were reversed to varying degrees, the inflammatory score was significantly decreased ($P < 0.001$), the number of inflammatory cells in BALF was significantly reduced ($P < 0.001$), and the concentrations of TNF- α , IL-6, and total protein in BALF were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** The novel porphyrin derivative 4i can significantly mitigate pulmonary inflammatory responses through sonodynamic therapy (SDT), exhibiting notable therapeutic effects on acute pneumonia by alleviating acute lung injury via modulation of the MAPK pathway.

Key words: sonodynamic therapy; porphyrin derivative; inflammation; reactive oxygen species; sonosensitizer; MAPK pathway

细菌性肺炎作为全球主要呼吸系统疾病, 发病率高和死亡率高^[1]。近年来, 研究人员开发出多种替代抗生素策略, 其中声敏剂已被证明在超声照射下能够产生活性氧 (ROS) 并消除细菌或生物膜^[2]。通过肺部吸入化合物 5, 10, 15, 20-四-[4-[(S)-2,6-二氨基己酰胺]苯基]卟啉 (4i) 作为有机声敏剂, 然后利用声动力疗法 (SDT) 激活声敏剂, 在超声波照射下, 超声波辐射产生的空泡和微射流可以促进药物的扩散, 这种卟啉类化合物比传统的无机声敏剂产生更多的单线态氧 (¹O₂) 和羟基自由基 (\cdot OH), 可有效根除革兰阴性菌并减轻组织炎症^[3]。本实验室先前报道了化合物 4i 的合成与表征^[4], 4i 的结构见图 1。此外, 卟啉在细胞和动物水平上均表现出极低的毒性, 作为一种安全有效的可吸入声敏剂, 卟啉为 SDT 提供了一种有前景的方案, 可能是治疗多重耐药细菌性肺炎的有效策略。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

卟啉衍生物 4i 的合成与表征按照 Meng 等^[4]先

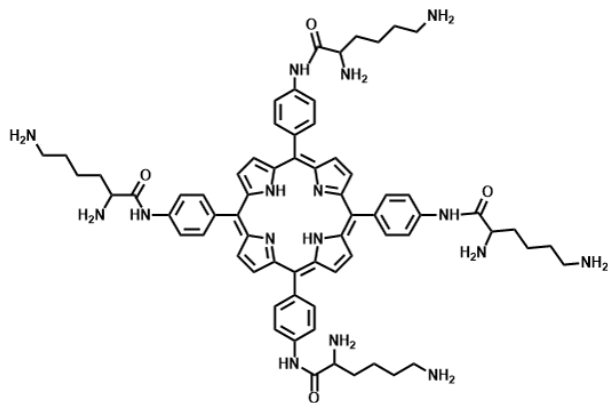


图 1 4i 分子结构

Fig. 1 Chemical structure of 4i

前报道的方法进行; 脂多糖 (LPS) 购自美国 Sigma 公司 (货号 L2880); Wright-Giemsa 染色剂购自 BASO 公司; 地塞米松醋酸片 (Dex) 购自浙江仙居制药有限公司 (每片 0.75 mg, 产品批号 LB2139); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (货号 88-7064-77、BMS607-3) 购自赛默飞世尔科技有限公司;

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号 P0011)、Calcein/碘化丙啶(PI)细胞活力/细胞毒性检测试剂盒(货号 C2015M)、MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(货号 C0009S),购自碧云天生物公司;青霉素-链霉素(货号 P1400,北京索莱宝科技有限公司);2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA,货号 BD221268,毕得医药科技股份有限公司);AniRes2005 系统(北京兰博技术有限公司);One Step RT-PCR 试剂盒(Tak Kala biological, Tokyo, Japan)。

1.2 主要仪器

WED-100 便携式超声设备购自中国深圳的威尔德医疗电子有限公司。

1.3 细胞与动物

肺癌人类肺泡基底上皮细胞 A549 和人正常支气管上皮细胞系 BEAS-2B 购自国家细胞资源库。细胞在 RPMI 1640 或 DMEM 培养基(Gibco)中培养,培养基中添加 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素,在 37 °C、5% CO₂的湿润环境中培养。

6~8 周龄、体质量 18~20 g 的 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物使用许可证号 SCXK(京)2024-0003。所有动物实验均按照美国国立卫生研究院发布的《实验动物护理与使用指南》进行,严格参照动物实验伦理要求规定进行本次实验操作。由中国医学科学院放射医学研究所实验动物管理委员会和实验动物福利伦理委员会批准(批准号 IRM-DWLL-2023196)。

2 方法

2.1 ROS 生成的测定

将等体积的质量浓度为 16 mg·mL⁻¹ 声敏剂 4i 加入 DCFH-DA (20 mmol·L⁻¹) 溶液中混合,超声(1.00、2.00 W·cm⁻²) 2、4、6、8、10 min; DCFH 与生成的过氧化氢(H₂O₂)立即反应,氧化为高度荧光物质 DCF,发射峰位于 525 nm(激发波长=488 nm),观察荧光强度。同时设立不含声敏剂的对照组。

将等体积的质量浓度为 31、62、120 mg·mL⁻¹ 声敏剂 4i 加入 DCFH-DA (20 mmol·L⁻¹) 溶液中混合,超声(0.50、0.75、1.00、1.25 W·cm⁻²) 10 min,观察荧光强度,同时设立不含声敏剂的对照组。

2.2 体外 SDT 细胞实验

将处于指数生长期的 A549 和 BEAS-2B 细胞

以 1×10⁴个·mL⁻¹ 的密度重悬于无血清培养基中。随后将所有样品随机分为 4 组:对照组、模型(LPS 500 ng·mL⁻¹)^[5]组、4i (16、32、64 mg·mL⁻¹+超声)组、Dex (500 nmol·L⁻¹)组,除对照组外,使用 LPS 处理 6 h 后更换培养基并加入不同浓度的 4i 共同孵育。对于 4i 组,细胞在含有 4i 溶液的培养基中避光孵育,2 h 后收集细胞并用 PBS 洗涤 2 次。将 A549 和 BEAS-2B 细胞重悬于 RPMI 1640 培养基和 DMEM(无血清)中,并转移至圆柱形聚苯乙烯组织培养管中进行超声照射,接受自由场超声(1.0 MHz、1 W·cm⁻²)处理 10 min。处理后,将细胞转移至 96 孔板中培养 24 h,使用标准 MTT 法评估细胞活力。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

将细胞以 5.0×10⁴个·孔⁻¹ 的密度接种于 24 孔板中,细胞分组及处理方式同上,接着使用 Calcein/PI 细胞活力/细胞毒性检测试剂盒检测活细胞和死细胞,操作按说明书进行。随后在倒置荧光显微镜下观察细胞。

2.3 4i 的分布

小鼠通过气管插管吸入 50 μL 的 4i (60、120、180 mg·kg⁻¹) 2 h 后,处死动物并提取其内脏器官。使用 Maestro EX 成像系统(CRI,美国)评估 4i 的分布。

2.4 LPS 诱导的急性肺炎小鼠模型

小鼠分为对照组、模型组、4i (60、90、120 mg·kg⁻¹, 50 μL)组和 Dex (5 mg·kg⁻¹, 50 μL)组。使用 50 μL 0.2 μmol·L⁻¹ LPS 溶液通过鼻腔吸入建立急性肺炎小鼠模型^[6],感染后第 3 天开始 4i 治疗。4i 和 Dex 通过气管滴注给药,每隔 1 天给药 1 次,剂量分别为 60、90、120 mg·kg⁻¹, 4i 吸入 2 h 后进行超声照射(1.0 MHz、10 min)。整个研究期间共进行 4 次治疗。实验期间所有小鼠均置于黑暗环境中,并定期测量体质量。

最后 1 次治疗后第 2 天,通过 ip 三溴乙醇(20 mL·kg⁻¹)麻醉小鼠。实验结束后使用 AniRes2005 系统进行侵入性肺功能测试,检测用力肺活量(FVC)、第一秒用力呼气容积与用力肺活量的比值(FEV₁/FVC)、峰值呼气流速(PEF)。随后处死小鼠。收集支气管肺泡灌洗液(BALF)并进行分析。将收集的 BALF 在 4 °C 下以 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液保存于-80 °C直至进一步分析。将含有离心细胞的沉淀物涂片并采用 Wright-

Giemsa 染色。随后取肺组织并用 4%多聚甲醛液固定。石蜡包埋后,肺组织切片进行苏木精-伊红(HE)染色并通过正置显微镜拍摄 3 张照片,根据肺组织损伤的病理学评分标准(表 1)[7]进行统计。使用

ELISA 试剂盒检测 BALF 中的 IL-6、TNF- α 以及蛋白来揭示炎症水平。BALF 沉淀中的细胞通过 Wright-Giemsa 染色,通过正置显微镜拍摄 3 张照片,并用 Image J 统计出视野中细胞数量。

表 1 肺组织损伤的病理学评分标准
Table 1 Pathological scoring criteria for lung tissue injury

评分	病理变化特殊描述
1	肺组织形态正常,无肺泡/间质水肿、无中性粒细胞浸润、无肺泡腔内出血
2	损伤区域占比约 25%,表现为局部轻微水肿、少量中性粒细胞浸润,或散在肺泡出血(仅少数肺泡受累)
3	损伤区域占比约 50%,可见明显的肺泡/间质水肿、中等量中性粒细胞聚集,或多个肺泡出现出血/渗出
4	损伤区域占比约 75%,广泛的肺泡壁增厚、间质水肿显著、大量中性粒细胞浸润,且多数肺泡存在出血或渗出液
5	损伤呈弥漫性分布(几乎累及全部肺组织),肺泡结构严重破坏、间质重度水肿伴充血、中性粒细胞弥漫浸润,且肺泡腔内满布出血或渗出液

2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)

将 A549 细胞以 5.0×10^4 个/孔⁻¹的密度接种于 24 孔板中,分为 3 组:对照组、模型组、4i 组,处理方法同“2.3”项。用 Invitrogen-Trizol 进行 RNA 提取,利用 A_{260}/A_{280} 比定量检测纯度,每份 RNA 样本的定量检测采用 One Step RT-PCR 试剂盒,首先进行反转录(42℃、5 min, 5℃、10 s),然后利用 Applied Biosystems™ 7500 qRT-PCR 系统检测进行 PCR 反应(95℃反应 5 s, 60℃反应 30 s, 40 个循环)。通过 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法检测 mRNA 含量,引物序列(由上海生工有限公司设计合成)见表 2。

2.6 统计分析

实验结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 8 进行统计分析,采用单因素方差分析(ANOVA)、双因素方差分析或 t 检验。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequence

基因	引物序列(3'→5')
β -actin	F-TGGTGGGCATGGGTCAGAAGG R-ACGCAGCTCATTGTAGAAGGTGTG
P38	F-GGCTGTTCCCAAATGCTGACTCC R-TTGAATGGTGCTTCGGCGATGG
c-Jun 氨基端 激酶 1(JNK1)	F-CCACCACCAAAGATCCCTGACAAG R-ACAGACGACGATGATGATGGATGC
JNK2	F-GACTGCACCCTGAAGATCCTTGAC R-CACACAACCTTTCACCAGCTCTCC
细胞外信号调节 激酶 1(ERK1)	F-GGGAGGTGGAGATGGTGAAGGG R-CGCTGGCAGTAGGTCTGATGTTC
ERK2	F-GGCTGTTCCCAAATGCTGACTCC R-TTGAATGGTGCTTCGGCGATGG

3 结果

3.1 4i 的体外声学特性表征

如图 2-A 所示,声强为 2 W·cm⁻² 的超声在时间相关性上比 1 W·cm⁻² 更显著提升 ROS 水平。当超声持续时间设定为 10 min 时,随着药物浓度和声强的增加,生成的 ROS 也更多(图 2-B)。

3.2 体外 4i 介导 SDT 疗效评估

如图 3 所示,与模型组相比,4i 联合 SDT 处理后,死亡细胞的红色荧光明显增强;细胞存活率显著降低($P<0.01$)。结果表明,在 LPS 诱导的炎症后,4i 能杀伤炎症损伤细胞,减少炎症细胞数量,对 A549 细胞的细胞杀伤作用强于 BEAS-2B 细胞。

3.3 不同 4i 浓度的 SDT 效果探索

本课题组前期研究表明,4i 能有效灭活创伤中机会性微生物感染的病原体[4,8-9]。4i 沿气管给药确保了其在肺部的有效分散和分布,吸入 2 h 后,肺部 4i 浓度与荧光强度呈正相关(图 4-A)。与对照组比较,模型小鼠从第 3 天开始体质量下降,随着 SDT 的进行逐渐改善和恢复(图 4-B)。

3.4 肺功能测试

如表 3 所示,与对照组相比,模型组 FVC、FEV₁/FVC、PEF 显著降低($P<0.001$);与模型组比较,接受 4i 介导 SDT 的小鼠的 FVC、FEV₁/FVC、PEF 显著增加($P<0.001$),气道阻力降低,肺通气功能增强。结果表明,气道 4i 介导 SDT 治疗,尤其是 4i 高剂量组,改善了 LPS 诱导的急性肺炎小鼠模型的肺功能。

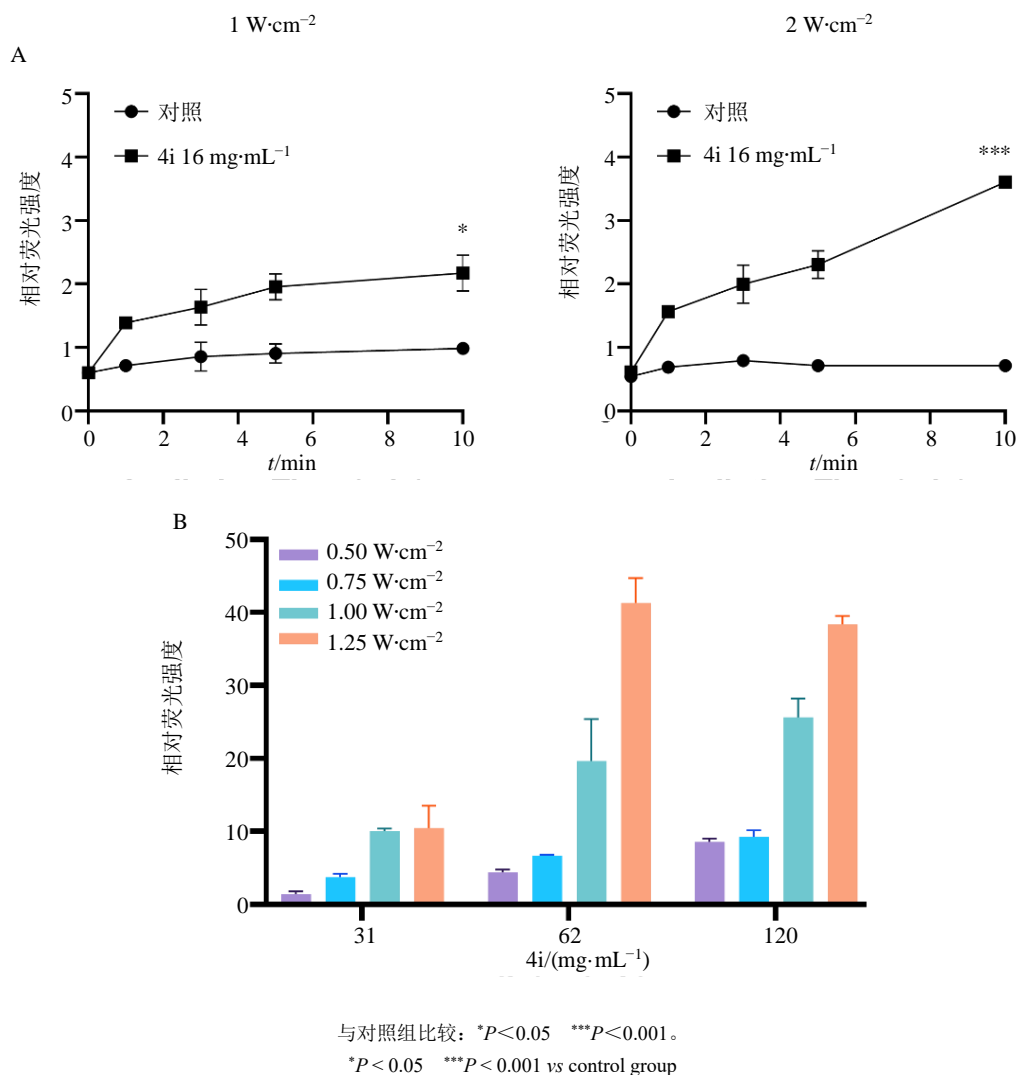


图 2 4i 在不同超声强度下 (A) 和不同浓度 (B) 下的 ROS 生成量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 ROS production under different ultrasonic intensities (A) and concentrations (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

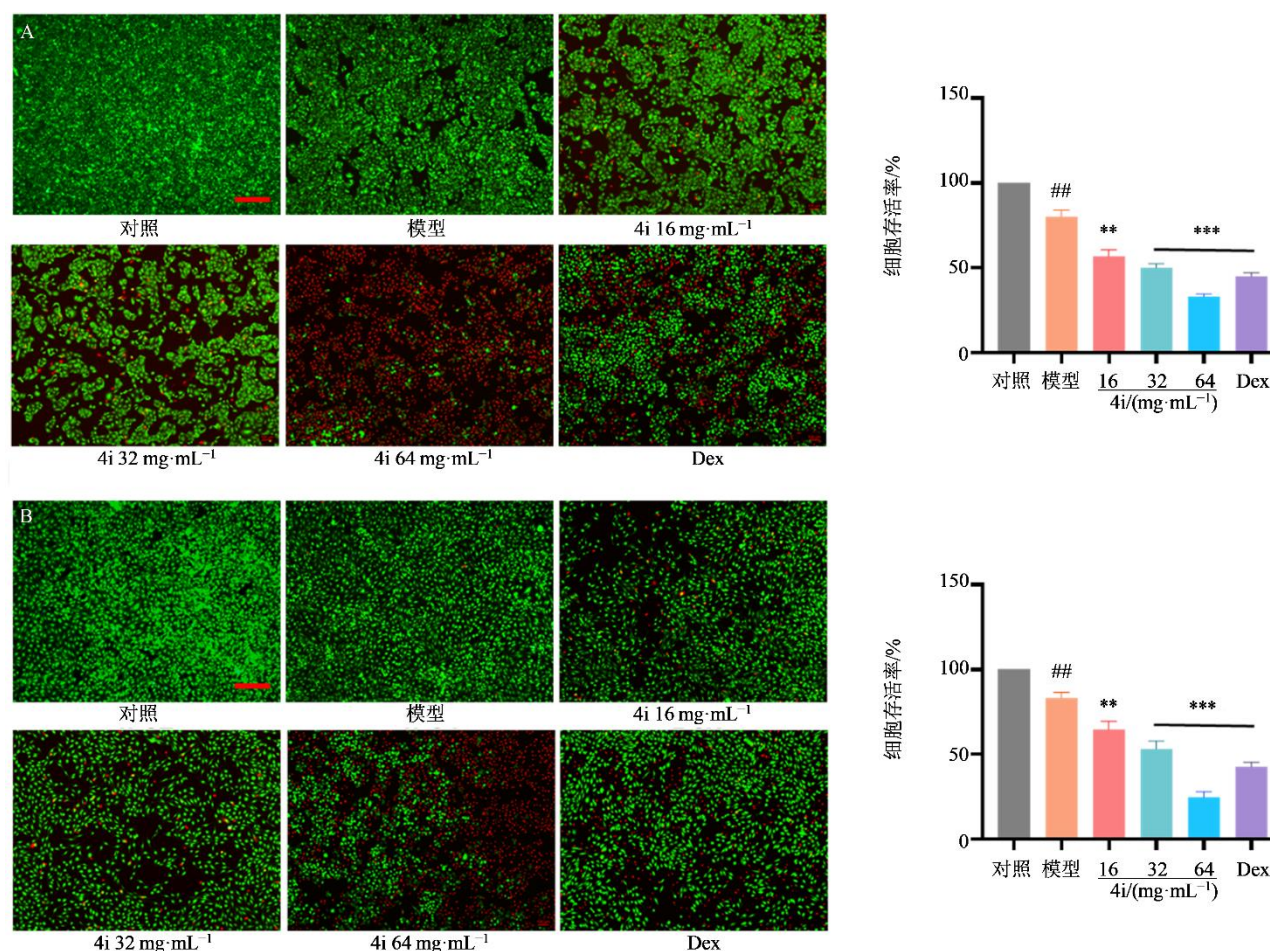
3.5 肺组织切片 HE 染色及 BALF 中 Wright-Giemsa 染色

图 5-A 显示了对照组小鼠肺小叶的完整结构,其特征是肺泡腔内无渗出、无炎症细胞浸润和肺泡间隔水肿。LPS 处理后,模型组表现出严重的急性肺炎症状,包括炎症细胞浸润、肺泡壁增厚、肺泡腔内显著炎症渗出、肺出血和间质水肿,炎症评分显著增加 ($P < 0.001$),表明疾病模型成功建立,LPS 直接注入气管会在数小时至数天内引发强烈的炎症反应,并持续一段时间^[10]。与模型组比较,接受 60、90、120 mg·kg⁻¹ 4i 和 0.75 W·cm⁻² 声强 10 min 处理的小鼠肺组织病理变化均有不同程度的逆转,炎症评分显著降低 ($P < 0.001$),尤其是 4i 高剂量组。Wright-Giemsa 染色显示 (图 5-B),与对照组比较,模型组炎症细胞数量显著增加 ($P <$

0.001);与模型组比较,4i 联合 SDT 组炎症细胞数量显著减少 ($P < 0.001$)。

3.6 BALF 中炎症介质和蛋白的测量

肺泡上皮细胞的过度凋亡是急性肺炎病理生理进展的关键因素^[11]。炎症介质如 TNF- α 和 IL-6 的产生和释放增加,促进了细胞凋亡和细胞死亡^[12]。因此,抑制炎症细胞浸润、减少促炎因子的分泌以及防止肺泡上皮细胞凋亡是有效治疗急性肺炎的关键。如图 6 所示,与对照组比较,LPS 感染小鼠 BALF 中 TNF- α 和 IL-6 浓度显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,经 4i (90、120 mg·kg⁻¹)-SDT 后 TNF- α 和 IL-6 浓度显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001),其中 4i 介导 SDT (120 mg·kg⁻¹、0.75 W·cm⁻²) 组小鼠 BALF 中炎症介质的浓度最低,这一发现支持了 4i 介导 SDT 有效调节促炎细胞因子水平的假设。BALF 中



红色荧光代表死细胞, 绿色荧光代表活细胞; 与对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ 。

Red fluorescence represents dead cells and green fluorescence represents living cells; $##P < 0.01$ vs control group; $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs model group.

图 3 4i 对 LPS 刺激的 A549 (A) 和 BEAS-2B (B) 细胞的 calcein-AM/PI 染色和细胞存活率的影响 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Calcein-AM/PI staining and cell viability of A549 (A) and BEAS-2B (B) cells stimulated with LPS by 4i ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

的总蛋白浓度是严重肺损伤中毛细血管通透性的重要指标。与对照组比较, 模型组蛋白浓度显著增加 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 4i 联合 SDT 组蛋白浓度显著减少 ($P < 0.001$)。

3.7 4i 介导 SDT 对 LPS 诱导的 A549 细胞中 *JNK1/2*、*p38*、*ERK1/2* mRNA 水平表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 *JNK1/2*、*ERK1/2* mRNA 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 4i 介导 SDT 作用后细胞中 *JNK2*、*ERK1/2* mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。JNK/p38/ERK 是细胞内重要的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路家族成员, 它们在细胞应激反应、增殖、分化、凋亡和炎症等生理病理过程中发挥关键作用, p38 促进炎症因子 (TNF- α 、

IL-6) 合成, JNK 参与 T 细胞分化; ERK 对细胞增殖、分化、存活、迁移产生影响。经 4i 介导 SDT 后显著逆转 MAPK 通路中关键基因的转录水平。

4 讨论

近年来, 针对急性肺炎, 研究人员开发了几种无抗生素且非侵入性的方法, 如光动力疗法、光热疗法以及超声触发的 SDT^[13]。在这些方法中, SDT 因其优异的组织渗透活性和对耐药细菌的有效性而成为最有前景的治疗细菌感染方式^[14]。此外, 超声触发的局部 SDT 疗法已被用作替代抗生素治疗的微创工具, 可以避免传统抗生素治疗中潜在的系统毒性并减少细菌耐药性^[15]。声敏剂是 US 治疗过程中最重要的因素。本课题组合成了卟啉类化合物 4i, 可以诱导 ROS 的产生。ROS 是指氧不完全还原

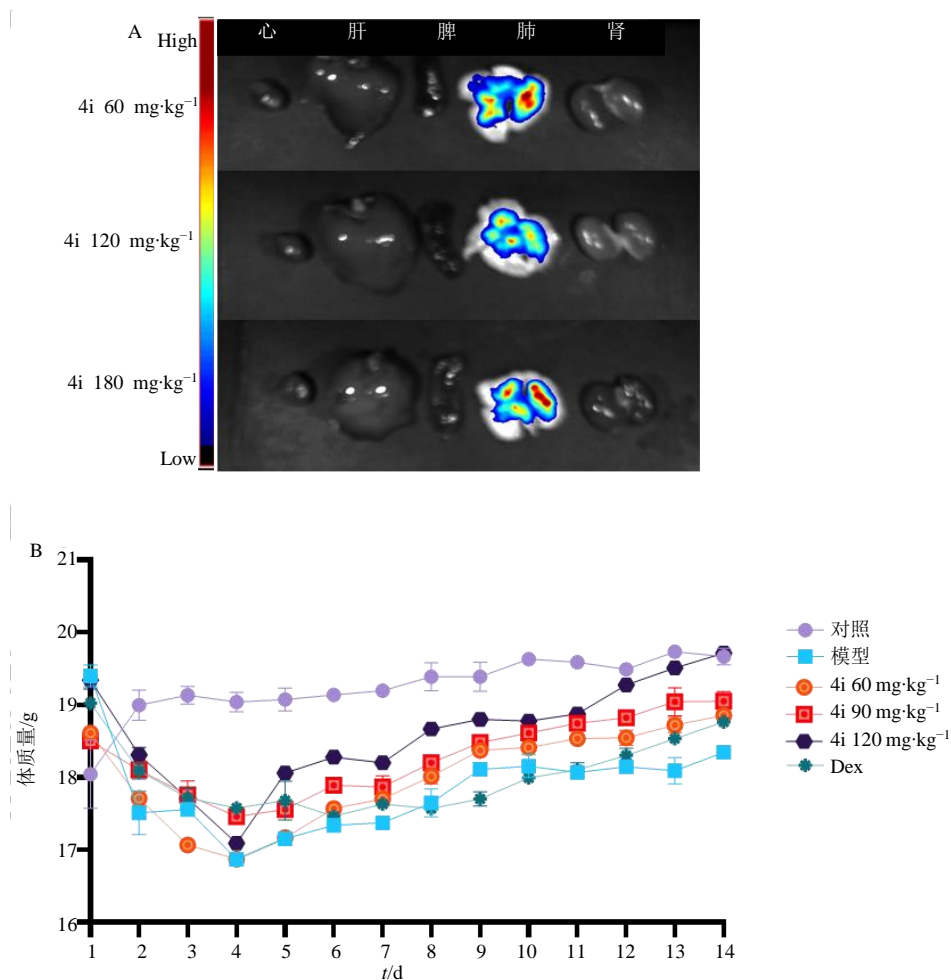


图 4 气管滴注给药后不同浓度 4i 的体内分布 (A) 和小鼠体质量变化 (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 *In vivo* distribution of different concentrations of 4i after endotracheal intubation (A) and changes in mouse weight (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表 3 小鼠的肺功能评估 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Pulmonary function assessment in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FVC/mL	FEV ₁ /FVC/%	PEF/(mL·s ⁻¹)
对照	—	1.047 ± 0.008	72.750 ± 5.455	11.520 ± 0.195
模型	—	0.581 ± 0.021 ^{###}	23.990 ± 3.452 ^{###}	2.739 ± 0.222 ^{###}
4i	60	0.855 ± 0.064 ^{***}	40.180 ± 4.946 ^{***}	2.968 ± 0.176 ^{***}
	90	0.919 ± 0.014 ^{***}	46.340 ± 3.842 ^{***}	8.614 ± 0.532 ^{***}
	120	1.050 ± 0.065 ^{***}	62.180 ± 6.186 ^{***}	10.190 ± 0.058 ^{***}
Dex	5	1.015 ± 0.006 ^{***}	48.850 ± 4.963 ^{***}	5.643 ± 0.884 ^{***}

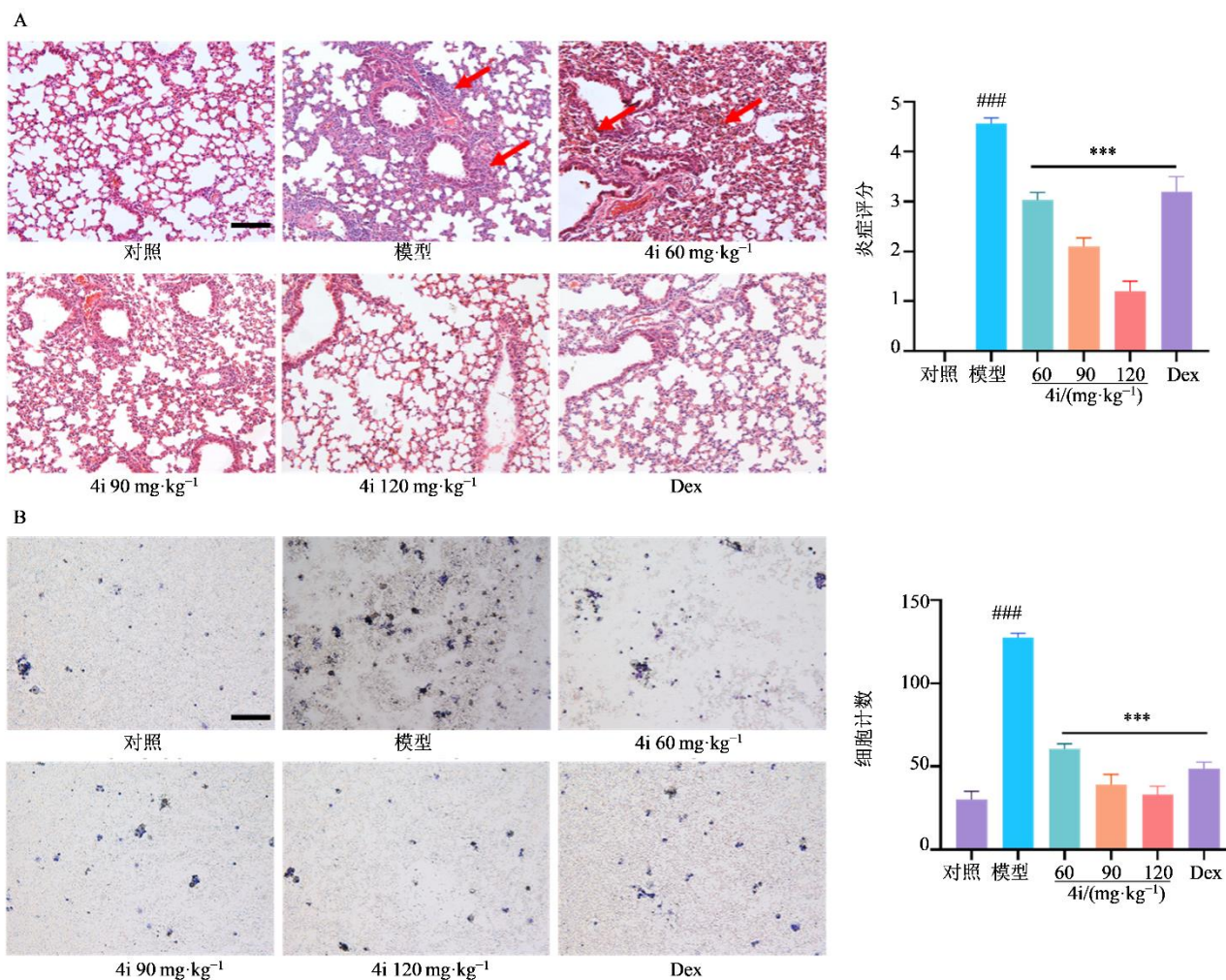
与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{***} $P < 0.001$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

后形成的化学物质, 如 H₂O₂、超氧阴离子 (O₂^{·-})、¹O₂和·OH, 这些物质对多种微生物具有高度致死性且无耐药性^[16]。超声的非侵入性、优异的组织穿透性和局部限制性照射展示了 SDT 在根除深部感染

中的巨大潜力。本研究在体外比较了不同声动力强度下 31、62 和 120 mg·mL⁻¹ 浓度 4i 产生的 ROS, 声动力强度越大, 生成的 ROS 越多。

声敏剂的特性是决定 SDT 治疗效果的关键因

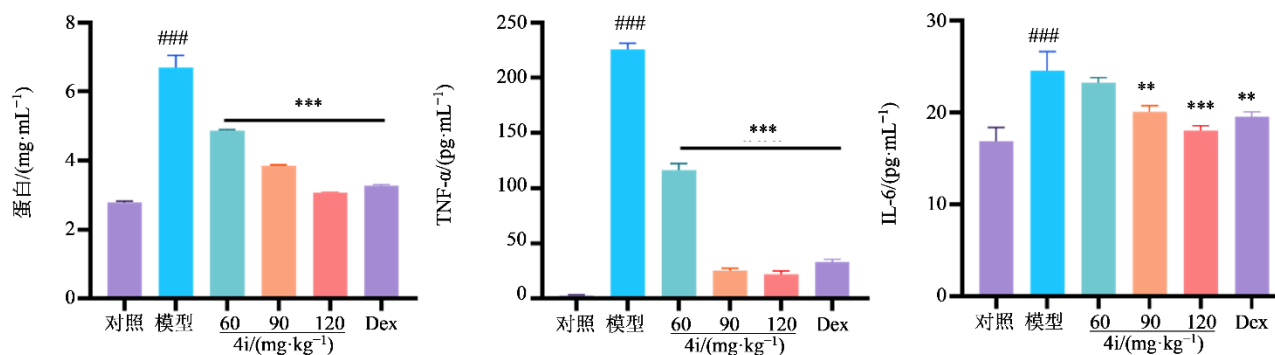


与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.01$ vs model group.

图 5 小鼠肺组织病理图并炎症评分统计 (HE, $\times 200$) (A) 和 BALF 中细胞 Wright-Giemsa 染色并计数 (B) ($\times 200$) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Histopathological images of mouse lung tissue and statistical score of inflammation (HE, $\times 200$) (A) and cell Wright-Giemsa staining and counting in BALF (B) ($\times 200$) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 6 BALF 上清液中的总蛋白含量和 BALF 中炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Total protein content in BALF supernatant and inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in BALF ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

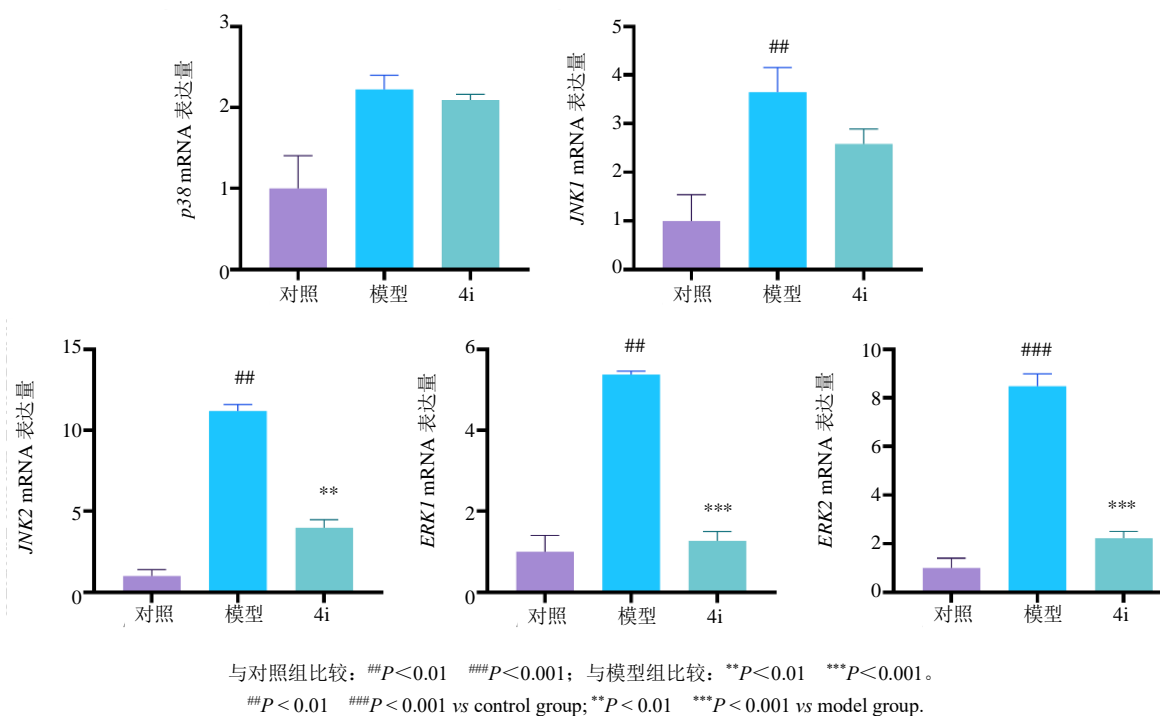


图 7 MAPK 通路中相关基因表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Expression of related genes in MAPK pathway ($\bar{x} \pm s, n=3$)

素之一。4i 具有高纯度和水溶性，皮肤光毒性较小且声活性高，表明其作为声敏剂的潜力。越来越多的证据表明，卟啉介导的 SDT 对多种细菌感染疾病具有治愈作用，包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起的肌炎、幽门螺杆菌治疗的胃感染、以及细菌性肌炎^[17-19]。4i 介导的 SDT 在人类肺细胞中诱导的细胞毒性排除了细胞系特异性效应。在本研究中，4i 介导的 SDT 在 LPS 刺激后的 A549 细胞中诱导了超过 20% 的细胞死亡率。超声的非侵入性、优异的组织穿透性和局部限制性照射展示了 SDT 在靶向根除深部感染中的巨大潜力。SDT 可以通过调整超声参数（频率、强度、辐照时间），精确控制 ROS 产生的位置、时间和剂量，将杀伤限定在病变区域^[20]。该特性与 4i 对炎症细胞的选择性敏感性共同保障了治疗安全性：正常肺上皮细胞（如 BEAS-2B）对 4i 介导 SDT 敏感性较低，且超声参数可精准调控以避免能量过度释放，同时声敏剂无靶向富集时毒性微弱，因此对正常细胞损伤很小，实现了治疗效能与生物安全性的统一^[21]。

作为一种非侵入性治疗方法，SDT 具有良好的杀菌效果。通过局部给药使声敏剂 4i 大量内化到肺细胞中。此外，超声已被用于定位深部组织细胞并激活炎症组织。积累的声敏剂可以杀死细菌和炎症

细胞，这主要通过 SDT 后 ROS 的生成实现。高水平的 ROS 可以进一步促进 DNA 双链断裂，从而破坏 DNA 并诱导细胞凋亡^[22-23]。本研究的治疗效果在体内和体外实验中一致。在体内观察到各组小鼠体质量的变化。通过肺功能测试、病理切片和 BALF 细胞染色发现，在高剂量 4i 和高声动力强度的情况下，炎症得到显著缓解。结果表明，SDT 对炎症组织具有强烈的杀伤作用，但实现彻底治疗效果仍具有挑战性。其中 4i 高剂量组小鼠的炎症浸润程度与 LPS 组相比显著改善。ROS 可以显著促进炎症细胞凋亡，从而增加药物在炎症部位的渗透。此研究为改善 4i 介导的 SDT 在炎症治疗中的效果提供了有前景的策略。

4i 介导 SDT 的炎症组织杀伤作用与 MAPK 信号通路调节相互协同，SDT 利用超声激活声敏剂，产生大量 ROS（如 $^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 等），这些 ROS 是产生杀伤作用的主要效应分子。ROS 的过量产生直接导致脂质过氧化、蛋白质损伤和 DNA 断裂，这些过程本身就能引发强烈的炎症反应和细胞应激。在炎症组织中，由于通常已存在氧化应激微环境和高代谢状态，SDT 诱导产生的过量 ROS 优先破坏已处于应激状态的炎症细胞。这种基于 ROS 的初级杀伤作用是信号通路调节的物理与化学基础。然而

单纯的 ROS 杀伤可能遇到细胞防御机制的抵抗, 如炎症组织常伴随 MAPK 等信号通路的异常活化, 这不仅驱动炎症进程, 也促进细胞存活^[24]。4i 介导 SDT 产生 ROS 造成初始物理化学损伤的同时, 调节 MAPK 信号通路从分子层面阻断细胞的防御信号, 导致炎症细胞在受到攻击后无法启动有效的修复和增殖程序, 从而增强杀伤效果并可能减轻炎症级联反应。

本研究中, 在细胞水平以及小鼠急性肺炎模型中, 4i 介导 SDT 治疗均表现出令人满意的疗效。治疗后 BALF 中炎症细胞的减少和总蛋白浓度的降低表明经 SDT 后肺部炎症得到缓解, 同时 4i 介导 SDT 有可能通过影响 MAPK 通路缓解急性肺炎。声敏剂 4i 是急性肺炎 SDT 的有力候选者, 凸显了 4i 的有效声热和声动力特性及其临床应用潜力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘碧晴, 张晓彤, 王可, 等. 385 例多重用药的老年细菌性肺炎住院患者药品不良反应特点及影响因素分析 [J]. 中国药物警戒, 2025, 22(2): 206-210, 216.
Liu B Q, Zhang X T, Wang K, et al. Adverse drug reaction in 385 elderly inpatients with bacterial pneumonia under polypharmacy [J]. Chin J Pharmacovigil, 2025, 22(2): 206-210, 216.
- [2] Wang W, Zhang T J, Zhang D W, et al. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of heme proteins on gold nanoparticles-bacteria cellulose nanofibers nanocomposite [J]. Talanta, 2011, 84(1): 71-77.
- [3] Roy J, Pandey V, Gupta I, et al. Antibacterial sonodynamic therapy: Current status and future perspectives [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2021, 7(12): 5326-5338.
- [4] Meng S, Xu Z P, Hong G, et al. Synthesis, characterization and *in vitro* photodynamic antimicrobial activity of basic amino acid-porphyrin conjugates [J]. Eur J Med Chem, 2015, 92: 35-48.
- [5] Hou L, Zhang J Y, Liu Y J, et al. MitoQ alleviates LPS-mediated acute lung injury through regulating Nrf2/Drp1 pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 165: 219-228.
- [6] Zhou J, Peng Z L, Wang J. Trelagliptin alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and oxidative stress in acute lung injury mice [J]. Inflammation, 2021, 44(4): 1507-1517.
- [7] Matute-Bello G, Downey G, Moore B B, et al. An official American Thoracic Society workshop report: Features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(5): 725-738.
- [8] Xu Z P, Gao Y X, Meng S, et al. Mechanism and *in vivo* evaluation: Photodynamic antibacterial chemotherapy of lysine-porphyrin conjugate [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 242.
- [9] Zhao Z J, Ma J D, Wang Y Y, et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined with antibiotic in the treatment of rats with third-degree burns [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 622410.
- [10] Liu Y, Song M, Zhu G F, et al. Corynoline attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by activating Nrf2 [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 48: 96-101.
- [11] Sang A M, Zhang J, Zhang M, et al. METTL4 mediated-N6-methyladenosine promotes acute lung injury by activating ferroptosis in alveolar epithelial cells [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 213: 90-101.
- [12] Zhang C P, Chen X Y, Wei T C, et al. Xuebijing alleviates LPS-induced acute lung injury by downregulating pro-inflammatory cytokine production and inhibiting gasdermin-E-mediated pyroptosis of alveolar epithelial cells [J]. Chin J Nat Med, 2023, 21(8): 576-588.
- [13] Huo J J, Jia Q Y, Huang H, et al. Emerging photothermal-derived multimodal synergistic therapy in combating bacterial infections [J]. Chem Soc Rev, 2021, 50(15): 8762-8789.
- [14] Wang R H, Liu Q W, Gao A, et al. Recent developments of sonodynamic therapy in antibacterial application [J]. Nanoscale, 2022, 14(36): 12999-13017.
- [15] Pang X, Li D F, Zhu J, et al. Beyond antibiotics: Photo/sonodynamic approaches for bacterial theranostics [J]. Nanomicro Lett, 2020, 12(1): 144.
- [16] Zhang C Y, Wang X, Du J F, et al. Reactive oxygen species-regulating strategies based on nanomaterials for disease treatment [J]. Adv Sci, 2020, 8(3): 2002797.
- [17] Geng X R, Chen Y H, Chen Z Y, et al. Oxygen-carrying biomimetic nanoplateform for sonodynamic killing of bacteria and treatment of infection diseases [J]. Ultrason Sonochem, 2022, 84: 105972.
- [18] Lai Y K, Wei W, Du Y Q, et al. Biomaterials for Helicobacter pylori therapy: Therapeutic potential and future perspectives [J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2120747.
- [19] Sun D, Pang X, Cheng Y, et al. Ultrasound-switchable nanozyme augments sonodynamic therapy against multidrug-resistant bacterial infection [J]. ACS Nano, 2020, 14(2): 2063-2076.
- [20] Shan Q Y, Li R M, Ying B, et al. Organic sonosensitizers-

- based SDT with enhanced ROS generation [J]. *Ultrason Sonochem*, 2025, 122: 107625.
- [21] Nowak K M, Schwartz M R, Breza V R, et al. Sonodynamic therapy: Rapid progress and new opportunities for non-invasive tumor cell killing with sound [J]. *Cancer Lett*, 2022, 532: 215592.
- [22] Srinivas U S, Tan B W Q, Vellayappan B A, et al. ROS and the DNA damage response in cancer [J]. *Redox Biol*, 2019, 25: 101084.
- [23] Zhao Y X, Ye X C, Xiong Z F, et al. Cancer metabolism: The role of ROS in DNA damage and induction of apoptosis in cancer cells [J]. *Metabolites*, 2023, 13(7): 796.
- [24] Li L J, Zhang Y, Zhao L, et al. C-reactive protein-induced injury in *Mycoplasma pneumoniae*-infected lung epithelial cells is mediated by the P38 MAPK/mitochondrial apoptosis pathway [J]. *Microbiol Spectr*, 2025, 13(3): e01626-e01624.

[责任编辑 兰新新]

~~~~~

• 公益广告 •

