# 等离子体活化液对糖尿病大鼠创面的影响及其机制的初步研究

景志强[1,2]，张俊雅[1,2]，韩愚弟[2]，韩 岩[2,3]
[1]解放军医学院，北京 100853；[2]解放军总医院第一医学中心整形修复科，北京 100853；[3]北京大学国际医院，北京 102206

**摘要：背景** 我国糖尿病并发慢性难愈性创面患者逐年增加，其迁延不愈、反复感染、截肢率较高，已成为我国公共卫生领域的重大挑战。**目的** 探究等离子体活化液(plasma-activated liquid，PAL)是否具有促进糖尿病大鼠创面愈合的作用。**方法** 动物实验：选取40只雄性SD大鼠，腹腔注射50 mg/kg 1% STZ构建糖尿病大鼠模型。造模成功的33只大鼠随机分为空白对照组、湿敷组、注射组，每组各11只。每组大鼠背部中线两侧制造4个直径为0.8 cm的圆形创面。湿敷组和注射组大鼠一侧创面予以0.9%氯化钠注射液治疗，对侧创面予以PAL治疗，最终将创面分为空白对照组、0.9%氯化钠注射液湿敷组、PAL湿敷组、0.9%氯化钠注射液注射组、PAL注射组。以单个创面作为本研究的实验单元，定期对创面取材行组织染色，评估创面愈合面积和质量。体外实验：用无菌棉签蘸取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌菌液涂布在M-H培养皿，无菌打孔器打孔后分别加入PAL、0.9%氯化钠注射液、蒸馏水，通过抑菌圈大小评估PAL的抑菌能力；采集大鼠抗凝全血后分别加入PAL+$CaCl_2$、0.9%氯化钠注射液+$CaCl_2$、$CaCl_2$，记录凝血时间，评估PAL的促凝效果；取对数期生长的L929小鼠成纤维细胞分别予以PAL、0.9%氯化钠注射液处理，CCK-8法测定细胞增殖率，划痕实验测定细胞迁移率。**结果** 动物实验发现两种PAL治疗方式均能促进糖尿病大鼠创面愈合，创面切片普通染色提示PAL治疗的两组肉芽组织成熟度最好，第14天PAL湿敷组和PAL注射组的胶原含量显著高于对照组(64.94%±3.09%、69.93%±2.42% *vs* 53.69%±0.88%，$P<0.001$)；PAL湿敷组和PAL注射组愈合后期Ⅰ型与Ⅲ型胶原纤维比值更大。免疫组化提示，第3天时PAL治疗组IL-6表达显著低于对照组($P<0.001$)，IL-10表达显著高于对照组($P<0.001$)；第10天时PAL治疗的两组创面平滑肌肌动蛋白α(smooth muscle actin α，α-SMA)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)表达均显著高于对照组和0.9%氯化钠注射液治疗组($P<0.05$)，CD31免疫荧光染色提示PAL治疗能促进创面由肉芽组织向瘢痕转化。体外实验中，抑菌圈实验表明体PAL能杀灭3种常见细菌；体外全血凝结实验和全血凝固时间实验发现PAL显著缩短血液凝固时间($P<0.001$)；CCK-8实验提示PAL能促进L929细胞增殖($P<0.05$)，划痕实验提示PAL可增强细胞迁移能力($P<0.05$)。**结论** PAL具有一定抗菌、促凝、促进细胞迁移和增殖的能力，并能够促进糖尿病创面愈合。

**关键词：**糖尿病；伤口愈合；等离子体活化液；胶原；炎症
**中图分类号：**R587. 1；R826. 5 **文献标志码：**A **文章编号：**2095-5227(2025)07-0661-11
**DOI：**10.12435/j.issn.2095-5227.25030101
**引用本文：**景志强，张俊雅，韩愚弟，等.等离子体活化液对糖尿病大鼠创面的影响及其机制的初步研究［J］.解放军医学院学报，2025，46（7）：661-671.

## Effects and mechanisms of plasma-activated liquid on diabetic rat wound healing

JING Zhiqiang[1,2], ZHANG Junya[1,2], HAN Yudi[2], HAN Yan[2,3]
[1]Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; [2]Department of Plastic and Reconstructive Surgery, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; [3]Peking University International Hospital, Beijing 102206, China
Corresponding author: HAN Yan. Email: 13720086335@163.com

**Abstract: Background** The increasing prevalence of patients with chronic non-healing wounds complicated by diabetes mellitus in China has become a major public health challenge, owing to persistent disease progression, recurrent infections, and high amputation risks. **Objective** To investigate whether plasma-activated liquid (PAL) exhibits therapeutic effects in promoting wound healing in diabetic rats. **Methods** In vivo: Forty male Sprague-Dawley (SD) rats were injected intraperitoneally with 50 mg/kg streptozotocin (STZ) to establish diabetic models. Thirty-three successfully modeled rats were randomly divided into blank control group (n=11), topical saline/PAL treatment (wet dressing) group (n=11), and subcutaneous saline/PAL injection group (n=11). Four full-thickness circular wounds (0.8 cm diameter) were created bilaterally along the dorsal midline, with contralateral wounds in treatment groups receiving saline or PAL. Each wound served as an independent experimental unit. Histological staining, collagen

**收稿日期：**2025-03-01
**基金项目：**国家自然科学基金青年项目(82202473)
**第一作者：**景志强，在读硕士。Email: stevejingzq@163.com
**通信作者：**韩岩，博士，教授，主任医师，博士生导师。Email: 13720086335@163.com

quantification, and immunohistochemistry were performed to assess healing progression. In vitro: PAL's antimicrobial activity against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Pseudomonas aeruginosa was evaluated via agar diffusion assays. Coagulation time was measured using whole blood clotting assays. L929 fibroblast proliferation and migration were analyzed using CCK-8 and scratch assays. **Results** In vivo: Both PAL-treated groups exhibited accelerated wound closure and superior granulation tissue maturation. By day 14, collagen content was significantly higher in the topical PAL and subcutaneous PAL groups compared to controls (64.94%±3.09%, 69.93%±2.42% *vs* 53.69%±0.88%, $P$<0.001), with a marked increase in the type I/III collagen ratio. Immunohistochemistry revealed suppressed IL-6 ($P$<0.001) and elevated IL-10 ($P$<0.001) expression in PAL groups on day 3. By day 10, PAL-treated wounds demonstrated upregulated α-SMA and VEGF ($P$<0.05) and enhanced CD31 immunofluorescence, indicating robust angiogenesis and transition to scar formation. In vitro: PAL exhibited potent bactericidal activity (clear inhibition zones), significantly shortened coagulation time ($P$<0.001), and stimulated L929 proliferation ($P$<0.05) and migration ($P$<0.05). **Conclusion** PAL exhibits certain antibacterial, procoagulant, and cell migration- and proliferation-promoting properties, and can facilitate the healing of diabetic wounds.

**Keywords:** diabetes mellitus; wound healing; plasma-activated liquid; collagen; inflammation

**Cited as:** Jing ZHQ, Zhang JY, Han YD, et al. Effects and mechanisms of plasma-activated liquid on diabetic rat wound healing［J］. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(7): 661-671.

过去20年我国糖尿病患病率上升了3.5倍[1]。国际糖尿病联盟2022年流行病学数据提示，预计至2045年将攀升至1.74亿[2]。其中19%～34%的患者可能出现糖尿病足溃疡或褥疮等慢性难愈性创面[3]。临床上通常将经过1个月的系统规范治疗仍未愈合或无愈合倾向的创面认定为慢性难愈性创面[4]。对于糖尿病创面的治疗，临床上尚无操作便捷且价格低廉的治疗方案。

等离子体是一种由自由电子、阴阳离子、中性粒子、光子和活性物质组成的准中性电离气体介质[5]。自Laroussi[6]首次提出等离子体具有灭菌效应以来，其在生物医学领域的应用研究已取得显著进展。现有研究表明，低温大气压等离子体(cold atmospheric plasma，CAP)在消毒杀菌、凝血调控、诱导肿瘤细胞凋亡等方面展现出独特优势。根据其特性，有研究将等离子体射流用于感染性创面或糖尿病足等慢性难愈性创面的治疗，结果发现CAP能有效促进创面的愈合[7-9]。目前已有多个设备于临床创面治疗，如kINPen®MED已在临床用于传统治疗失败的慢性和感染性创面[10]。尽管CAP直接作用疗效可靠，但其在临床上的应用仍有局限性：(1)难以对大面积病灶进行同时处理；(2)对于凹凸不平的复杂表面作用不均匀；(3)活性粒子组织穿透能力弱，难以作用于深层病灶[11]。等离子体处理过后的液体——等离子体活化液中同样富含多种活性成分，如活性氧氮粒子(reactive oxygen/nitrogen species，ROS/RNS)，其生物活性与直接等离子体处理具有相似性[12]。基于此，本研究建立SD大鼠糖尿病创面模型，探究PAL是否能够促进糖尿病创面愈合，并比较局部湿敷与皮下注射两种给药方式对创面愈合的影响，旨在为优化等离子体医学的临床应用策略提供实验依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验动物

8周龄SPF级健康雄性SD大鼠，共40只，体质量300～350 g，购于北京维通利华实验动物技术有限公司。环境温度25℃，相对湿度40%～70%；12 h/12 h明暗交替。所有大鼠均可自由饮水，予以充足的食物喂养。所用动物实验均经北京维通利华实验动物技术有限公司伦理委员会批准(编号：P202404180001)。

### 1.2　主要试剂及仪器

低温等离子体发生装置(深圳恒达通伟业自动化科技有限公司)；便携式血糖仪、试纸(三诺生物传感股份有限公司)；0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司)；1%链脲佐菌素(STZ，美国Sigma公司)；金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、大肠埃希菌(ATCC25922)、铜绿假单胞菌(ATCC27853)购于赛默飞世尔科技有限公司；0.1 mol/L pH 4.5柠檬酸钠缓冲液(北京索莱宝科技有限公司)；PBS缓冲液(北京索莱宝科技有限公司)；DMEM低糖培养基、胎牛血清(Gibco公司)；4%多聚甲醛溶液(武汉赛维尔生物科技有限公司)；苏木素伊红(HE)染色试剂盒、Masson三色染色试剂盒、改良天狼星红染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

### 1.3　等离子体活化液的制备及检测

实验在常压下进行。应用0.9%氯化钠注射液制备的PAL，以空气为工作气体，调整低温等离子体发生装置射流喷头浸入液面以下2 cm。打开低温等离子体发生装置电源，功率为600 W。制备过程中等离子体射流与液体直接接触，短寿粒子可直接与溶液反应。将制备完成的PAL分装至试管中，自然冷却至室温，并于制备完成1 h后进行理

化性质检测。用pH计和氧化还原电位(oxidation-reduction potential，ORP)计测量出等离子体处理0 min、1 min、2 min、3 min、4 min、5 min的pH值和ORP值。再通过多功能水质分析仪测量出上述时间点的$H_2O_2$浓度和$NO_3^-$浓度。

### 1.4 糖尿病大鼠造模及分组

大鼠在造模前禁食12 h(自由饮水)。于避光条件下将STZ溶于柠檬酸盐缓冲液(pH 4.5)配制成1% STZ溶液，根据预实验结果单次大剂量腹腔注射溶液(50 mg/kg)构建1型糖尿病大鼠模型。分别于注射后第3、7天测体质量，血糖仪检测尾静脉随机血糖。若第7天血糖值≥16.7 mmol/L(连续2次检测)、体质量显著下降、出现典型“三多一少”症状则纳入实验组，剔除血糖未达标(＜16.7 mmol/L)或体质量下降≥20%的个体。最终有3只大鼠死亡，4只血糖未达标。采用随机数字生成器，将造模成功的33只大鼠随机分为空白对照组、湿敷组、注射组，每组11只。分组后的大鼠用无菌镊子和0.8 cm打孔器在大鼠背部中线两侧制造4个大小相等、分布均匀的全层皮肤缺损创面，创面边缘用6-0丝线缝合垫片以减小皮肤收缩对创面愈合的影响。所有创面处理后均沿身体长轴方向覆盖无菌纱布，外贴防水敷料固定。空白对照组大鼠仅覆盖纱布，以防止大鼠抓挠创面；湿敷组每日分别采用0.9%氯化钠注射液或新鲜制备活化2 min的PAL浸润无菌纱布进行20 min创面湿敷；注射组每日于创面周围皮下分4点注射共0.6 mL 0.9%氯化钠注射液或PAL。两实验组均采用自身对照设计，即每只大鼠单侧创面接受0.9%氯化钠注射液处理，对侧对应位置实施PAL干预。操作给药由1名不知晓PAL及0.9%氯化钠注射液分组的实验员进行。以单个创面作为本研究的实验单元。最终将创面分为空白对照组、0.9%氯化钠注射液湿敷组、PAL湿敷组、0.9%氯化钠注射液注射组、PAL注射组。对照组创面数为实验组的2倍，采用随机抽样从每只空白组大鼠选取2个创面纳入统计，最终各组创面数为22。

### 1.5 创面面积测量及统计

将制造全层创面的时间设为第0天，在第0、1、3、5、7、10、14、20天拍照并测量大鼠创面面积，将标尺平行置于创面旁侧，垂直于创面拍照。原始图像导入Image J图像分析系统，设定1.0 cm比例，采用多边形选择工具精确勾勒创面边缘，系统自动计算创面面积($cm^2$)。为消除个体差异影响，采用相对创面面积(relative wound area，RWA)进行数据标准化，公式为相对创面面积=各时间点实测面积/原始创面面积×100%。通过相对创面面积变化趋势反映创面愈合速度。创面拍照及统计由1名不知实验详情的研究人员进行。

### 1.6 创面及脏器取材及染色

分别于术后第3、10、14天随机选取对照组、湿敷组、注射组每组各2只大鼠进行标本取材，0.9%氯化钠注射液湿敷组、PAL湿敷组、0.9%氯化钠注射液注射组、PAL注射组各取得4份标本，空白对照组中随机选取4份标本进行后续对比研究。充分麻醉后暴露背部，操作部位予以消毒，用组织剪完整切取创面组织及周边5 mm正常皮肤，4%多聚甲醛固定后行HE染色、Masson染色、天狼星红染色、免疫组织化学染色[白细胞介素(interleukin，IL)-6、IL-10、平滑肌肌动蛋白α(smooth muscle actin α，α-SMA)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)]及CD31免疫荧光染色。第20天时，对照组、湿敷组和注射组各随机选取2只大鼠实施安乐死，经碘伏消毒术区皮肤后用无菌手术刀沿腹白线切开大鼠腹部，完整摘取心脏、肝及肾，4%多聚甲醛固定后行HE染色。

### 1.7 抗凝全血采集

腹腔注射2.5%三溴乙醇(1.2 mL/100 g)麻醉大鼠后，将其仰卧位固定于解剖台上。常规进行腹部剃毛消毒，沿腹白线纵向切开皮肤及肌层，用无菌纱球将肠管推向一侧以显露血管。选取腹主动脉分叉处近心端1～3 mm区域作为穿刺靶点，持采血针(针尖斜面朝下)以30°角向近心端进针。当进针约5 mm出现动脉回血时，立即连接含抗凝剂的真空采血管以收集抗凝全血。

### 1.8 体外凝血实验

用移液枪向1.5 mL离心管中加入100 μL抗凝全血，实验分组：PAL处理组(50 μL PAL+30 μL 0.2 mol/L $CaCl_2$)，0.9%氯化钠注射液处理(50 μL 0.9%氯化钠注射液+30 μL 0.2 mol/L $CaCl_2$)，对照组中一组直接加入30 μL 0.2 mol/L $CaCl_2$，另一组不添加任何试剂。37℃恒温培养箱中孵育5 min后，向离心管缓慢加入一定体积的去离子水，轻轻摇晃，将未凝集的红细胞冲洗掉。未凝固的红细胞在水中涨破，溶液颜色变红，根据颜色深浅判断PAL能否促进凝血。再向10 mL玻璃试管中加入5 mL含有抗凝剂的大鼠全血，于37℃恒温水浴

加热5 min，PAL处理组加入1 mL PAL，0.9%氯化钠注射液处理组加入1 mL 0.9%氯化钠注射液，对照组只含有抗凝全血，于37℃水浴加热5 min。实验组加入0.5 mL 0.02 mol/L的$CaCl_2$溶液启动凝血。每组实验重复5次。每隔15 s倾斜试管查看凝血情况，直至倒置试管时血液仍不流动即为凝血，并记录凝血时间。

### 1.9　抑菌圈实验检测PAL灭菌能力

将大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌菌种活化后，再将菌液逐级稀释。用移液枪吸取50 μL菌液涂布于固体培养基，每个稀释菌液涂3个板。倒转平板置于37℃恒温培养箱内培养12 h后进行菌落计数，并推算出原菌液浓度。用无菌棉签蘸取$10^8$ CFU/mL浓度的菌液涂布在M-H培养皿平板表面，涂布3次，每次旋转60°，静置5 min待菌液吸收。用灭菌后打孔器在培养皿内打出3个直径为6 mm的规整圆孔并去除孔内多余培养基琼脂，移液枪吸取100 μL活化2 min的PAL缓慢加入孔内，另一孔加入100 μL 0.9%氯化钠注射液，对照孔内加入100 μL无菌蒸馏水，每组重复3次。将平板正置放入37℃恒温培养箱，培养16～18 h后查看是否形成抑菌圈以判断PAL是否具有抑菌效应。

### 1.10　CCK-8细胞增殖实验

取对数生长期的L929小鼠成纤维细胞，经胰蛋白酶消化、离心后制备单细胞悬液。以$1\times10^4$/孔的密度接种于96孔板中，于外周孔内加入灭菌PBS溶液以减少中心孔培养基蒸发。将培养板置于37℃、5% $CO_2$培养箱中孵育24 h。吸弃旧培养基后，每孔加入等体积PAL溶液或0.9%氯化钠注射液，继续于37℃、5% $CO_2$条件下孵育30 min。移除孔内液体，更换为DMEM完全培养基，继续培养24 h、48 h后，每孔加入10 μL CCK-8溶液，孵育1 h后使用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度值，并计算细胞增殖率。

### 1.11　细胞划痕实验

取对数生长期小鼠L929成纤维细胞接种于6孔板，采用含2%胎牛血清的低血清培养基维持培养，37℃、5% $CO_2$及饱和湿度条件下培养至细胞融合度达80%～90%。采用200 μL无菌移液枪头沿培养板纵轴方向匀速划痕，建立无细胞的划痕区域。以预冷PBS缓冲液轻柔冲洗3次清除脱落细胞。分别用活化2 min的PAL和0.9%氯化钠注射液处理细胞30 min后，用移液枪吸取小孔中的PAL和0.9%氯化钠注射液，加入DMEM培养基再将细胞再次放入37℃，5% $CO_2$培养箱中培养。分别于划痕后即刻(0 h)及干预后24 h在显微镜下观察并拍照记录划痕区域的细胞迁移情况。

### 1.12　统计学分析

采用GraphPadPrism 10.1.2软件制作统计图，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示；两组间定量资料的比较采用$t$检验，多组间定量资料的比较采用单因素方差分析(两两比较采用Tukey法)，$P<0.05$为差异有统计学意义。

## 2　结果

### 2.1　CAP活化时间与PAL理化性质

本研究使用的0.9%氯化钠注射液在CAP活化前pH值为6.65，ORP值为243.60 mV。处理1 min后，溶液的pH显著下降，ORP显著升高，随着作用时间延长，pH值和ORP值的变化变缓，5 min时pH值降至3.94，ORP值为628.99 mV。随着等离子体活化时间延长，活化液中$H_2O_2$及$NO_3^-$浓度逐渐升高(图1)。既往研究发现PAL的保存条件会影响其性能，且随保存时间延长，PAL中的活性粒子浓度会不断衰减，其生物效应也会逐渐变弱，PAL在室温和4℃的条件下保存1周即失去了活性，因此本研究的PAL每次使用前均新鲜制备[13-14]。

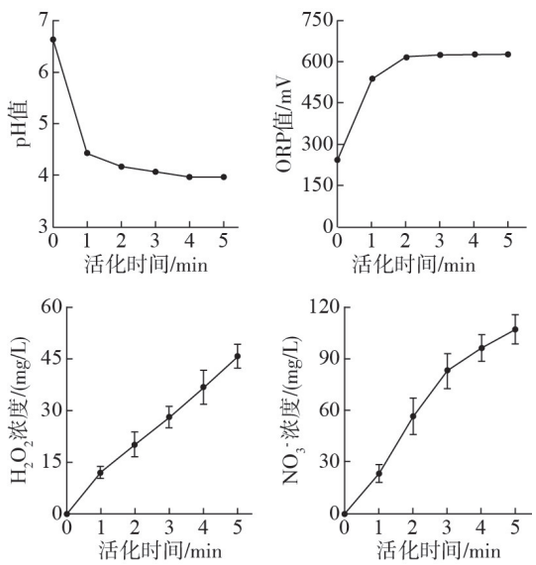



**图1　CAP活化时间与PAL的理化性质的变化**

**Fig. 1　Changes in CAP activation time and physicochemical properties of PAL**

### 2.2　PAL治疗对糖尿病大鼠创面愈合的影响

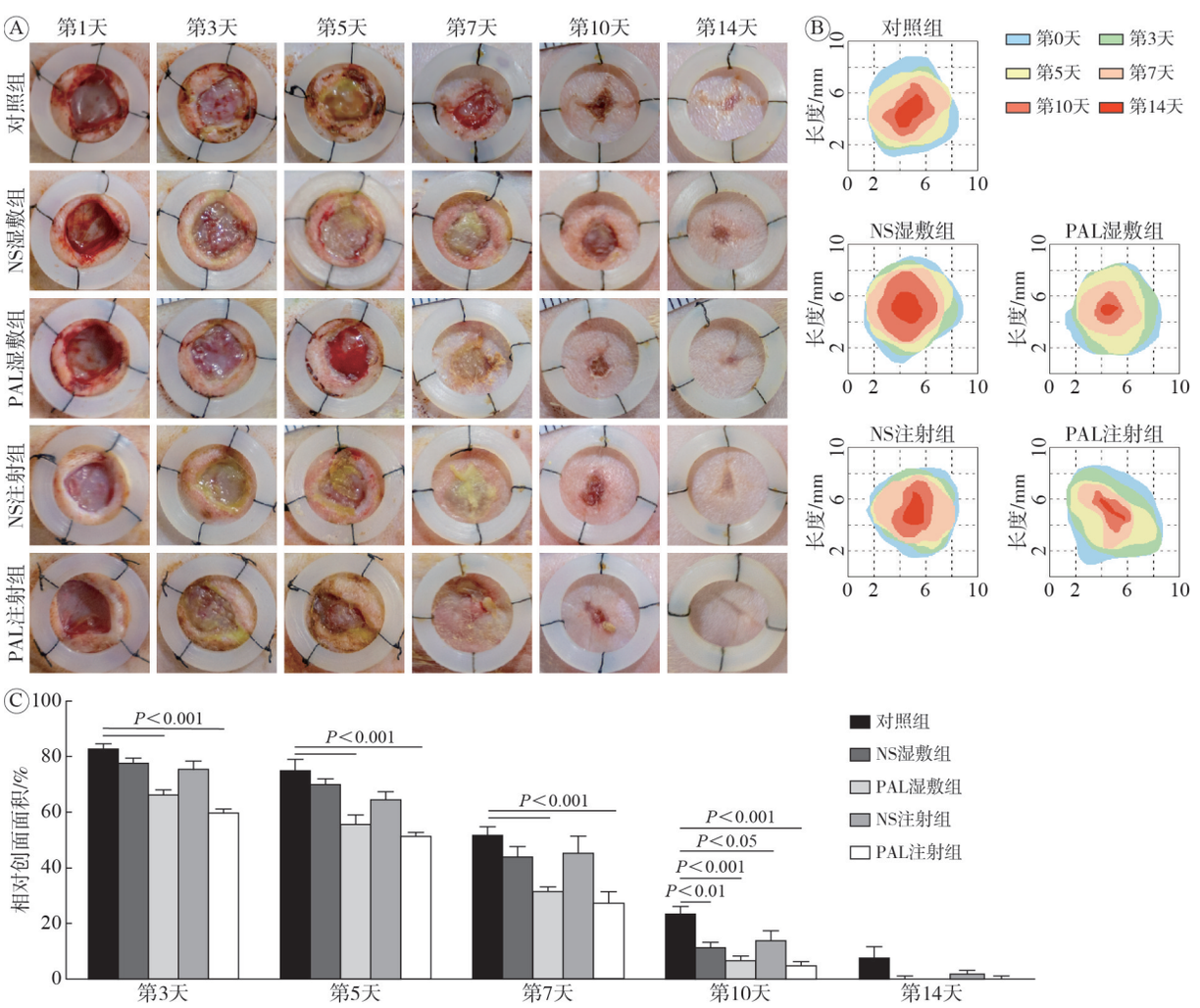
应用PAL湿敷组与PAL注射组愈合创面相对面积显著小于空白对照组和0.9%氯化钠注射液组。第3天时PAL湿敷组和PAL注射组的相对面积分别

为66.09%±4.89%和59.85%±3.84%，较空白对照组减小17%～24%($P<0.001$)，与0.9%氯化钠注射液湿敷组(78.12%±4.12%)和0.9%氯化钠注射液注射组(75.39%±8.47%)比较，差异有统计学意义($P<0.05$)，提示PAL治疗组在术后第3天即呈现愈合优势，但PAL两种不同处理方式差异无统计学意义($P>0.05$)。第7天时，PAL治疗组的相对创面面积为31.00%±4.81%(湿敷)和27.31%±11.24%(注射)，均高于空白对照组的52.23%±7.64%($P<0.001$)。PAL湿敷组与PAL注射组差异无统计学意义($P>0.05$)。第14天时，各实验组与空白对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2。

### 2.3　PAL治疗对大鼠创面组织学的影响

创面组织HE染色结果(图3)显示，术后第3天，空白对照组新生肉芽组织呈典型水肿样改变，PAL湿敷组和PAL注射组均出现新生血管结构，但各治疗组炎性细胞浸润程度无统计学差异。术后第10天，PAL治疗组中性粒细胞密度显著降低，并形成连续的表皮结构，空白对照组未见完整表皮层形成。术后第14天，PAL治疗组创面完成再上皮化，真皮层出现次级毛囊结构，其成熟度和表皮结构均优于空白对照组和0.9%氯化钠注射液处理组，具有与正常皮肤相似的组织学和形态。

光学显微镜下Masson染色蓝色深浅反映了创面周围胶原蛋白沉积情况(图4)。术后第3天，PAL治疗组即可见部分胶原沉积，对照组组织疏松。观察发现对照组胶原沉积速率滞后，表明未处理组织的自然修复效果较弱，至术后第14天仅达53.69%±0.88%，显著低于PAL湿敷组的64.94%±3.09%和PAL注射组的69.93%±2.42%($P<0.001$)。PAL注射组较PAL湿敷组胶原沉积提升5%，但差异无统计学意义($P>0.05$)。




A：不同时间点各治疗组创面；B：不同治疗组创面愈合示意图；C：不同时间点相对创面面积：纵坐标为当日创面面积与初始创面面积比值。

**图2　PAL治疗对糖尿病大鼠创面愈合的影响**

**Fig. 2　Effect of PAL treatment on wound healing in diabetic rats**

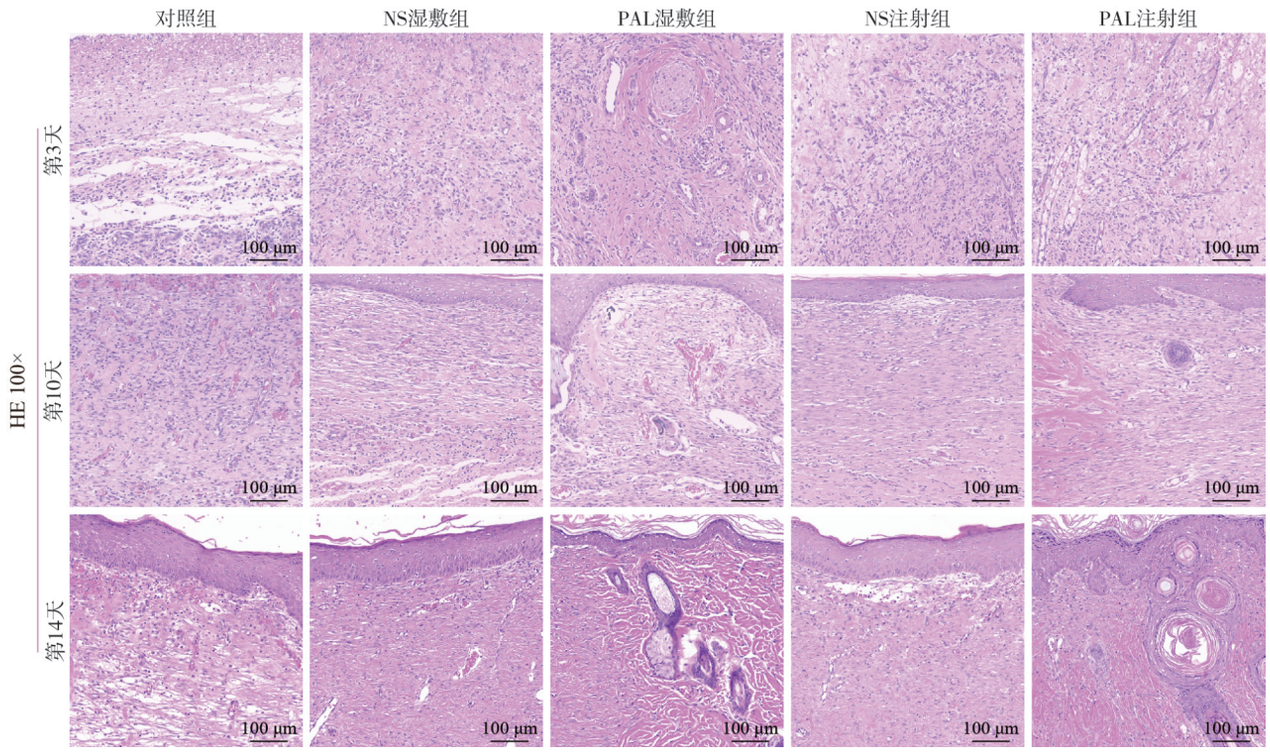
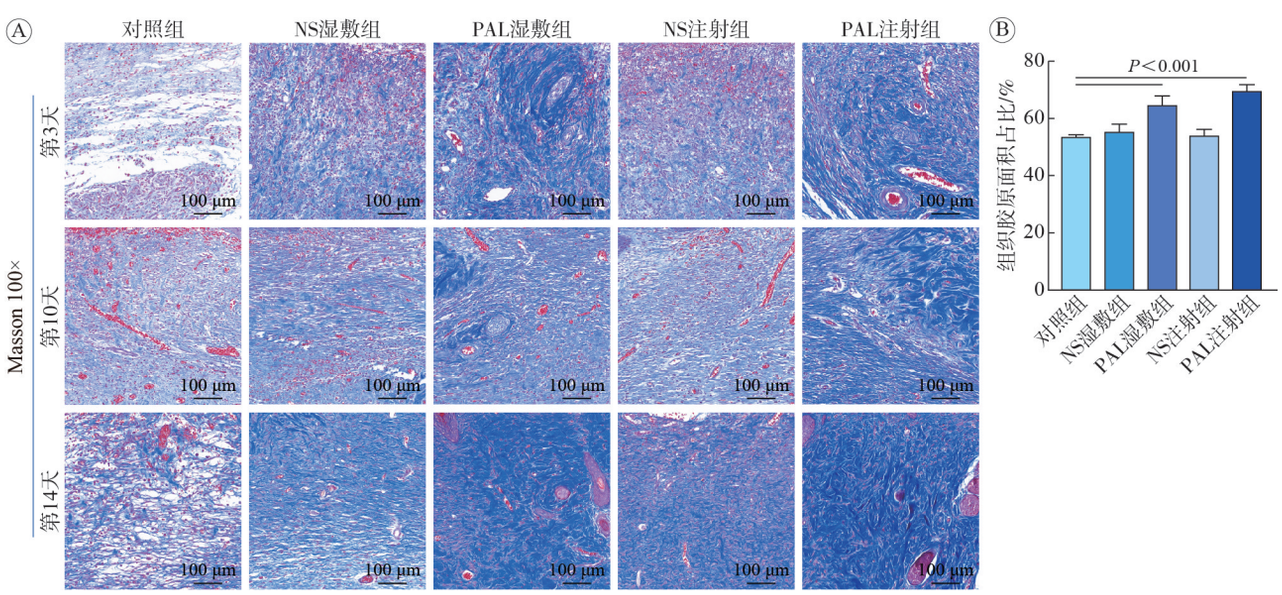



**图 3　第3、10、14天各治疗组创面HE染色**

**Fig. 3　HE staining of wound tissues on day 3, 10, and 14 among experimental groups**




A：第3、10、14天各治疗组创面Masson染色；B：第14天各治疗组胶原占比。

**图 4　大鼠创面Masson染色**

**Fig. 4　Masson's trichrome staining of the wound tissue**

术后第10天和第14天取创面组织行天狼星红染色(图5)。普通光学显微镜观察显示，术后第10天时，各组均可见到不同程度红染的胶原蛋白，PAL治疗的2组红染最深，提示胶原蛋白沉积最多，0.9%氯化钠注射液治疗组次之，对照组最少。在第14天时可见PAL治疗组胶原含量最高，红染最深。第10天和第14天偏振光显微镜下可见对照组中仅有少量胶原纤维，且以绿色的Ⅲ型胶原纤维为主，PAL治疗组中有大量排列紧密橙黄色的Ⅰ型胶原纤维和少量绿色的Ⅲ型胶原纤维，将第14天偏振光镜下图片导入ImageJ，通过色彩分离得到黄色与绿色面积，PAL注射组中Ⅰ型胶原纤维约为Ⅲ型胶原纤维的1.86±0.07倍，PAL湿敷组中Ⅰ型胶原纤维/Ⅲ型胶原纤维比值为1.80±0.07大于对

照组的1.58±0.09，差异有统计学意义($P<0.05$)。

术后第3天和第10天对创面取材行免疫组织化学染色(图6)。第3天时，对照组IL-6表达最高，0.9%氯化钠注射液湿敷组IL-6含量有所下降($P<0.001$)，PAL治疗组下降更为显著($P<0.001$)，0.9%氯化钠注射液注射组与对照组的IL-6含量差异无统计学意义($P>0.05$)。与IL-6含量相反，对照组此时的IL-10处于较低水平，PAL治疗组IL-10表达显著高于对照组($P<0.001$)，0.9%氯化钠注射液治疗的2组与对照组的IL-10表达差异无统计学意义($P>0.05$)。PAL湿敷组与PAL注射组变化趋势相同，两组差异无统计学意义($P>0.05$)。提示PAL在创面愈合早期能通过调控促炎因子与抑炎因子的释放从而改善糖尿病创面的高炎症状态。第10天时，PAL治疗后的两组创面α-SMA和VEGF表达均显著高于对照组和0.9%氯化钠注射液治疗组($P<0.05$)，0.9%氯化钠注射液治疗的两组α-SMA和VEGF含量有所增加，但与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

第10天和第14天分别取创面组织行CD31免疫荧光染色(图6)。CD31主要标记血管内皮细胞，荧光强度可反映新生血管的数量。第10天时，对照组可见少量新生血管形成，PAL湿敷组和PAL注射组均可见大量新生血管形成。第14天时，对照组创面中的新生血管数量显著增多，0.9%氯化钠注射液治疗组也有较多新生血管，而应用PAL治疗的2组中新生血管数量显著减少，提示此时创面由肉芽组织向更成熟的瘢痕转化。

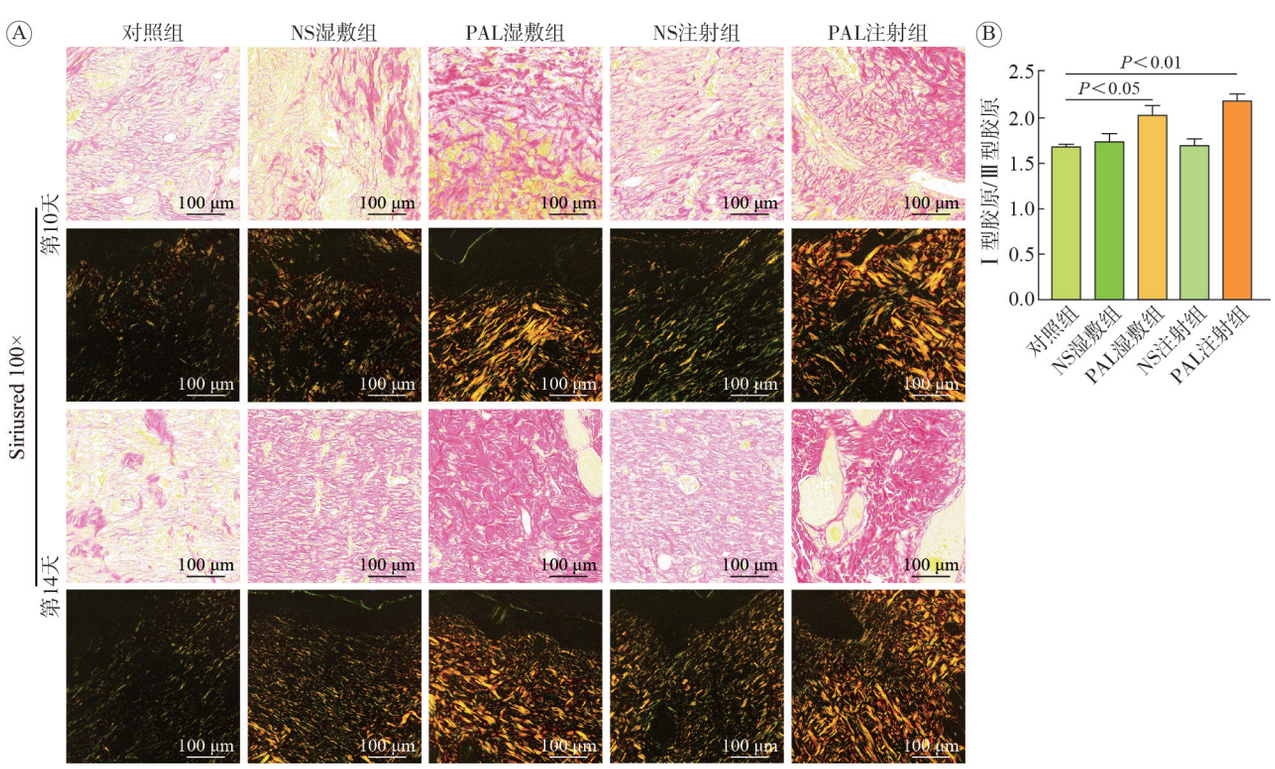
### 2.4　PAL治疗对大鼠主要脏器组织学的影响

术后第20天空白组、湿敷组和注射组大鼠心脏、肝、肾组织HE染色显示，湿敷组和注射组心肌层次分明，未见炎性浸润或间质纤维化等病理改变；肝小叶结构完整，门管区无异常增生；肾小球基底膜完整，皮髓质分界清晰，与对照组比较均未发现显著病理改变(图7)。

### 2.5　PAL的生物学效应

**2.5.1**　PAL的抑菌效应　抑菌圈实验显示，与未被活化的0.9%氯化钠注射液比较，经CAP活化后的0.9%氯化钠注射液对3种细菌显示出不同的抗菌作用(图8A)。在a孔(无菌蒸馏水)和b孔(0.9%氯化钠注射液)周围仍有细菌生长，无明显抑菌圈，说明0.9%氯化钠注射液和无菌水均无灭菌作用。c孔(PAL)周围出现了大小不同的抑菌圈，提示PAL对不同细菌的灭菌效率不同，PAL对金黄色葡萄球菌的抑菌效果显著优于大肠埃希菌和铜绿假单胞菌。

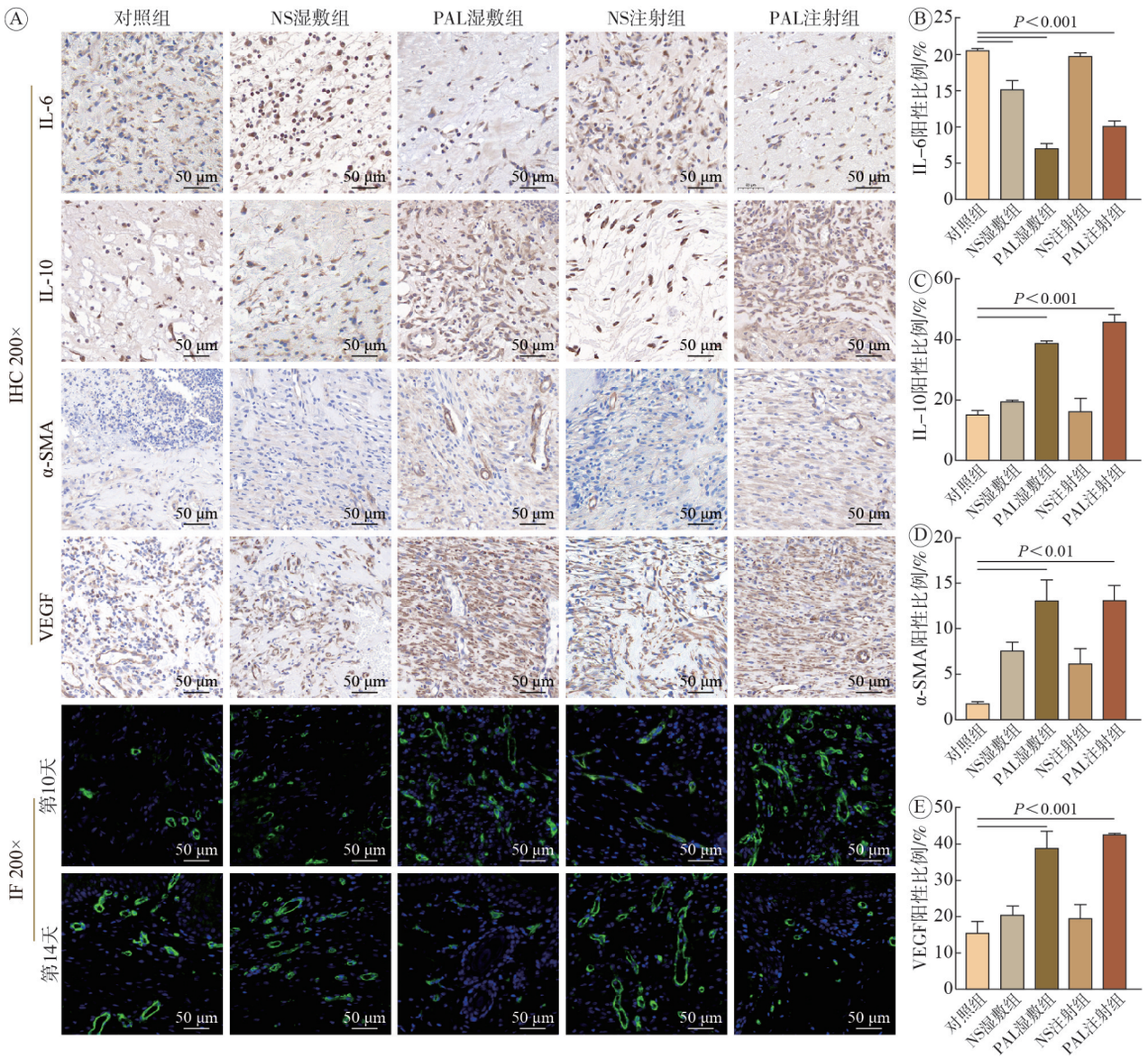
**2.5.2**　PAL促进凝血　体外全血凝结实验：待血栓




A：第10、14天各治疗组创面天狼星红染色光镜和偏振光镜下观察结果；B：第14天各治疗组Ⅰ型胶原纤维/Ⅲ型胶原纤维。

**图5　大鼠创面天狼星红染色**

**Fig. 5　Sirius red staining of the wound tissue**




A：第3天IL-6、IL-10，第10天α-SMA、VEGF创面免疫组织化学染色，第10天和第14天CD31创面免疫荧光染色；B、C、D、E：第3天IL-6、IL-10，第10天α-SMA、VEGF阳性占比。

**图6　大鼠创面免疫组化及免疫荧光染色**

**Fig. 6　Immunohistochemical and immunofluorescence staining of the wound tissue**

形成后加入去离子水，倒置EP管，观察发现未加$CaCl_2$的空白对照组未凝血，PAL干预组血栓体积最大，由去离子水冲洗后的溶液颜色更浅，提示PAL干预能够促进全血凝集(图8B)。全血凝固时间结果见图8C，肝素钠抗凝全血在PAL处理后凝血时间为(11.27±0.60) min，相比0.9%氯化钠注射液处理组的(16.93±0.57) min显著缩短($P<0.001$)。PAL处理的柠檬酸钠抗凝全血凝血时间为(10.03±0.53) min，相比0.9%氯化钠注射液处理组缩短5～9 min ($P<0.001$)。EDTA抗凝全血在PAL处理后凝血时间为(12.2±0.70) min，相比0.9%氯化钠注射液处理的(19.73±0.80) min显著缩短($P<0.001$)。

**2.5.3**　PAL促进细胞迁移与增殖　L929细胞划痕实验显示，PAL处理组24 h迁移率达65.70%±5.12%，高于对照组的55.90%±1.49%及0.9%氯化钠注射液组的52.49%±3.47%($P<0.05$)，对照组与0.9%氯化钠注射液组差异无统计学意义($P>0.05$)，提示PAL处理后的小鼠成纤维细胞迁移能力增强。CCK-8细胞增殖实验显示，PAL和0.9%氯化钠注射液处理后继续培养24 h和48 h，PAL处理组的细胞相对增殖率较对照组和0.9%氯化钠注射液处理组升高，差异有统计学意义($P<0.05$)，0.9%氯化钠注射液处理组与对照组细胞的相对增殖率的差异无统计学意义($P>0.05$)。见图9。

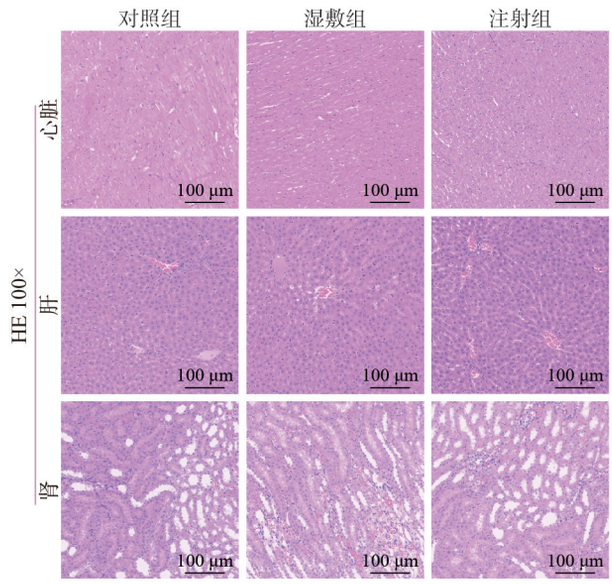
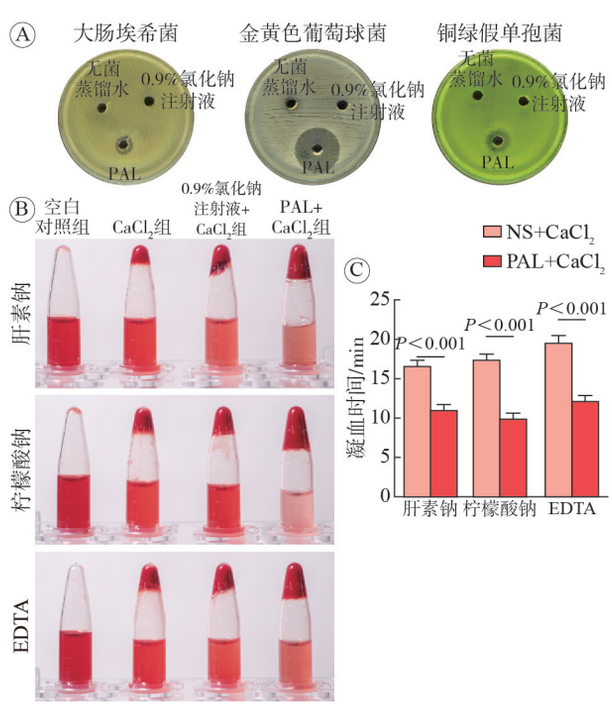



**图 7　第 20 天对照组、湿敷组、注射组主要脏器 HE 染色**

**Fig. 7　HE staining of major organs on day 20 in control, topical, and injection groups**



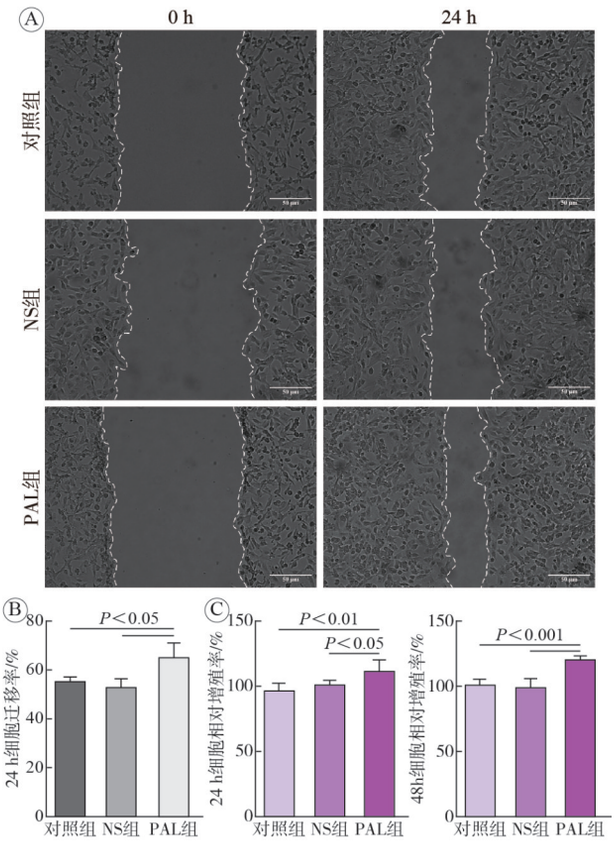

A：抑菌圈实验结果；B：体外全血凝结实验；C：含不同抗凝剂的全血凝固时间，因对照组血液未凝固未记录凝固时间。

**图 8　PAL 的抑菌效应和促凝效应**

**Fig. 8　Antibacterial and procoagulant effects of PAL**

## 3　讨论

皮肤损伤后，机体经历止血期、炎症期、增殖期和重塑期 4 个阶段，实现创面组织再生[15]。糖尿病创面由于高血糖、高炎症、缺血缺氧等因素，导致其无法短时间修复创面，停滞在慢性炎症阶段，难以进入增殖期，成为慢性难愈性创面，有




A：0 h 和 24 h 划痕面积；B：24 h 细胞相对迁移率；C：24 h 和 48 h 细胞相对增殖率。

**图 9　PAL 对细胞迁移和增殖的影响**

**Fig. 9　Effects of PAL on cell migration and proliferation**

迁延不愈、高复发率(31.6%)、高截肢率(19.03%)等特点[16-19]。但现有疗法治疗周期长、复发率高，易导致患者依从性降低；含银敷料、水胶体敷料高昂的价格使家庭经济负担加重。既往研究已证实 CAP 能够促进创面愈合，PAL 与 CAP 具有相似的生物学效应，因此本研究创新性地将 PAL 通过湿敷和皮下注射的方式用于糖尿病大鼠创面的治疗，探究 PAL 对糖尿病创面愈合的影响，及皮下注射 PAL 治疗糖尿病创面的可行性，并对其促进糖尿病创面的愈合机制进行了初步探索。

PAL 能够抑菌并调节慢性创面的微环境。糖尿病创面的氧化应激加重和炎症因子过度释放，使糖尿病创面周围微生物的生物多样性发生改变，细菌在创面表面聚集并分泌胞外多聚物，从而形成生物膜以避免被杀灭，导致创面迁延不愈[20]。上皮细胞分泌的有机酸使皮肤呈弱酸性(pH 4～6)，而糖尿病创面、感染创面因高细菌负荷而呈现出 pH＞7.3 的碱性环境[21]，PAL 含 $H^+$ 且通常呈弱酸性，因此 PAL 可调节创面微环境的酸碱度从而促进创面愈合。等离子体主要利用其中的活性粒子

杀灭细菌。等离子体作用到细胞表面时，活性粒子通过静电作用使细胞膜破裂，其细胞中蛋白质、核酸等流出后再被活性氧氧化损伤，最终导致整个细胞被破坏[22]。糖尿病创面常见定植菌为葡萄球菌、假单胞菌和肠杆菌科，本研究制备的PAL能够抑制金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌的生长[23]。还有研究将活化30 min获得的PAL作用于金黄色葡萄球菌产生的被膜，不仅杀灭了细菌，还抑制了生物被膜的再生[24]。

PAL通过调控炎症介质的释放，加速了糖尿病创面炎症反应阶段。糖尿病创面因局部高血糖可以使内皮细胞凋亡，抑制了成纤维细胞和内皮细胞的增殖和迁移能力，使其长期停滞于炎症期，阻碍了创面愈合的进展[25]。既往研究将PAL用于小鼠感染创面，发现与乙醇比较，PAL能够更有效地促进创面愈合，且PAL能够调控IL-1β、IL-6、IL-10等炎症相关因子的释放，本研究中第3天时IL-6、IL-10趋势与之相符。另有研究动态监测PAL处理后创面IL-1β和IL-6的mRNA表达，发现在PAL治疗第1天促炎因子表达显著升高，引起强烈而快速的炎症反应，使机体降解清除受损组织和预防感染的能力增强；随后PAL治疗的组织所有炎症标志物水平均较对照组显著降低[26]。因此PAL治疗以特定的两步方式影响慢性创面的炎症期，这使得糖尿病创面炎症期结束并向增殖期过渡，从而促进伤口的愈合[27]。Keap1-Nrf2-ARE是机体重要的抗氧化应激信号通路，组织损伤后被大量激活[28]。当氧化应激发生时，Nrf2与Keap1分离并进入细胞核，与抗氧化响应元件结合，从而调节抗氧化应激酶的表达，以拮抗氧化应激[29]。既往研究发现，CAP处理可使Keap1与肌动蛋白共定位，释放并促进Nrf2进入细胞核内，从而拮抗氧化应激，增加抑炎细胞因子基因的表达，减少炎性损伤，促进创面愈合[30]。

PAL通过促进细胞增殖与迁移加速糖尿病创面增殖期进程。既往研究发现，CAP治疗后的慢性创面成纤维细胞生长因子表达显著上调[31]。Cx43较高表达会抑制细胞迁移和愈合伤口的能力，Schmidt等[32]将CAP作用于HaCaT细胞，发现CAP短时间处理后的HaCaT细胞中Cx43表达显著下降，细胞迁移和增殖能力增强。Marches等[33]将CAP用于N/TERT-1细胞，发现短时间CAP处理无细胞毒性，而长时间CAP处理减少了角质形成细胞迁移，并诱导氧化细胞应激。本研究使用的短时间活化的PAL能够促进小鼠成纤维上皮细胞的增殖与迁移。还有研究将PAL与人脐静脉内皮细胞共培养，发现eNOS-AMPK表达和细胞内NO水平显著升高；体内研究发现，将PAL用于治疗小鼠感染创面后VEGF表达增加[34]。本研究将PAL用于糖尿病创面，发现第10天创面中α-SMA和VEGF的表达升高。

重塑期对慢性创面是否发生瘢痕化或复发具有重要意义，此时期多余新生血管退化，细胞外基质中胶原纤维重新排列，Ⅲ型胶原纤维被Ⅰ型胶原纤维替代，肉芽组织逐渐转变为成熟瘢痕[35]。CAP可激活成纤维细胞并提高COL1A1的mRNA水平，最终增加了创面中多种胶原蛋白的表达[36]。本研究中第14天创面组织CD31免疫荧光染色中，对照组和0.9%氯化钠注射液治疗组仍有大量新生血管，而PAL治疗组新生血管数量显著减少，表明PAL治疗后瘢痕成熟度更高。另有研究将等离子体用于瘢痕疙瘩的治疗，发现各种主观和客观指标均有轻到中度改善，且无不良反应[37]。

本研究存在一定的局限性：(1)PAL制备方式多种多样、活化时间长短不一、活化介质不尽相同，本研究未探究活化时间及不同活化介质对糖尿病创面的影响；(2)本研究仅证实了PAL调控炎症因子的释放及多种生长因子的表达，但具体涉及哪一类信号通路的激活与阻断有待进一步研究。

综上，本研究验证了湿敷及注射PAL均能促进糖尿病创面的愈合，为慢性难愈性创面的治疗提供了一种新的可行性方案。

**作者贡献**　景志强：实验设计与实施，论文撰写；张俊雅：实验实施；韩愚弟：实验设计与指导，审读和修订；韩岩：实验设计与指导，审读和修订，获取研究经费。

**利益冲突**　所有作者声明无利益冲突。

**数据共享声明**　本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取，Email：stevejingzq@163.com。

**参考文献**

1　Jia WP，Chan JC，Wong TY，et al. Diabetes in China：epidemiology，pathophysiology and multi-omics［J］. Nat Metab，2025，7（1）：16-34.

2　Sun H，Saeedi P，Karuranga S，et al. IDF Diabetes Atlas：Global，regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045［J］. Diabetes Res Clin Pract，2022，183：109119.

3　Armstrong DG，Boulton AJM，Bus SA. Diabetic foot ulcers and their recurrence［J］. N Engl J Med，2017，376（24）：2367-2375.

4 Olsson M，Järbrink K，Divakar U，et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds：a systematic review［J］. Wound Repair Regen，2019，27（1）：114-125.

5 Nam SH，Choi JH，Kim GC. Topical application of No-ozone cold plasma in combination with vitamin C reduced skin redness and pigmentation of UV-irradiated mice［J］. Biomedicines，2023，11（6）：1563.

6 Laroussi M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma［J］. IEEE Trans Plasma Sci，1996，24（3）：1188-1191.

7 Barjasteh A，Kaushik N，Choi EH，et al. Cold atmospheric pressure plasma：a growing paradigm in diabetic wound healing-mechanism and clinical significance［J］. Int J Mol Sci，2023，24（23）：16657.

8 Stratmann B，Costea TC，Nolte C，et al. Effect of cold atmospheric plasma therapy vs standard therapy placebo on wound healing in patients with diabetic foot ulcers：a randomized clinical trial［J］. JAMA Netw Open，2020，3（7）：e2010411.

9 Li YQ，Nie LL，Jin SH，et al. The effect of plasma on bacteria and normal cells in infected wound［J/OL］. https://doi. org/10.1155/2022/1838202.

10 Reuter S，von Woedtke T，Weltmann KD. The kINPen：a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications［J］. J Phys D Appl Phys，2018，51（23）：233001.

11 Heinlin J，Isbary G，Stolz W，et al. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology［J］. J Eur Acad Dermatol Venereol，2011，25（1）：1-11.

12 Yao HN，Toyoda H，Takada N，et al. Anti-tumor effect of non-thermal atmospheric pressure plasma-activated medium on synovial sarcoma：an in vitro and in vivo study［J］. Biomedicines，2025，13（3）：534.

13 Wang HX，Han RW，Yuan MD，et al. Evaluation of plasma-activated water：efficacy，stability，physicochemical properties，and mechanism of inactivation against Escherichia coli［J］. LWT，2023，184：114969.

14 Tsoukou E，Bourke P，Boehm D. Temperature stability and effectiveness of plasma-activated liquids over an 18 months period［J］. Water，2020，12（11）：3021.

15 Sorg H，Sorg CGG. Skin wound healing：of players，patterns，and processes［J］. Eur Surg Res，2023，64（2）：141-157.

16 Huang F，Lu XY，Yang Y，et al. Microenvironment-based diabetic foot ulcer nanomedicine［J］. Adv Sci（Weinh），2023，10（2）：e2203308.

17 Ndosi M，Wright-Hughes A，Brown S，et al. Prognosis of the infected diabetic foot ulcer：a 12-month prospective observational study［J］. Diabet Med，2018，35（1）：78-88.

18 Jiang YF，Wang XM，Xia L，et al. A cohort study of diabetic patients and diabetic foot ulceration patients in China［J］. Wound Repair Regen，2015，23（2）：222-230.

19 李喜伟，张颂，魏芬，等. 大气压冷等离子体在皮肤科的直接与间接应用［J］. 皮肤科学通报，2023，40（4）：390-399.

20 Kim JH，Ruegger PR，Lebig EG，et al. High levels of oxidative stress create a microenvironment that significantly decreases the diversity of the microbiota in diabetic chronic wounds and promotes biofilm formation［J］. Front Cell Infect Microbiol，2020，10：259.

21 Gethin G，O’Connor GM，Abedin J，et al. Monitoring of pH and temperature of neuropathic diabetic and nondiabetic foot ulcers for 12 weeks：an observational study［J］. Wound Repair Regen，2018，26（2）：251-256.

22 Nicol MJ，Brubaker TR，Honish BJ 2nd，et al. Antibacterial effects of low-temperature plasma generated by atmospheric-pressure plasma jet are mediated by reactive oxygen species［J］. Sci Rep，2020，10（1）：3066.

23 Dörr S，Holland-Letz AK，Weisser G，et al. Bacterial diversity，antibiotic resistance，and the risk of lower limb amputation in younger and older individuals with diabetic foot infection［J］. Int J Low Extrem Wounds，2023，22（1）：63-71.

24 Xu ZM，Zhou XX，Yang WS，et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of air plasma-activated water on Staphylococcus aureus biofilm［J］. Plasma Process Polym，2020，17（8）：1900270.

25 Geng K，Ma XM，Jiang ZZ，et al. High glucose-induced STING activation inhibits diabetic wound healing through promoting M1 polarization of macrophages［J］. Cell Death Discov，2023，9（1）：136.

26 Rajić J，Grdović N，Marković A，et al. Plasma-activated water improve wound healing in diabetic rats by influencing the inflammatory and remodelling phase［J］. Int J Mol Sci，2025，26（3）：1265.

27 Lee HR，Kang SU，Kim HJ，et al. Liquid plasma as a treatment for cutaneous wound healing through regulation of redox metabolism［J］. Cell Death Dis，2023，14（2）：119.

28 龚玲，李宇，马娟，等. 核因子E2相关因子2信号通路在病理性瘢痕中作用的研究进展［J］. 中华整形外科杂志，2024，40（3）：343-348.

29 Zhou XQ，Ruan QF，Ye ZQ，et al. Resveratrol accelerates wound healing by attenuating oxidative stress-induced impairment of cell proliferation and migration［J］. Burns，2021，47（1）：133-139.

30 Yin TY，Feng S，Zhu H，et al. Therapeutic potential of plasma-treated solutions in atopic dermatitis［J］. Free Radic Biol Med，2024，225：482-493.

31 Hiller J，Stratmann B，Timm J，et al. Enhanced growth factor expression in chronic diabetic wounds treated by cold atmospheric plasma［J］. Diabet Med，2022，39（6）：e14787.

32 Schmidt A，Bekeschus S，Wende K，et al. A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds［J］. Exp Dermatol，2017，26（2）：156-162.

33 Marches A，Clement E，Albérola G，et al. Cold atmospheric plasma jet treatment improves human keratinocyte migration and wound closure capacity without causing cellular oxidative stress［J］. Int J Mol Sci，2022，23（18）：10650.

34 Roux S，Merbahi N，Simon M. Les milieux activés par plasma froid à pression atmosphérique［J］. médecine，2025，41（1）：40-46.

35 Sousa AB，Águas AP，Barbosa MA，et al. Immunomodulatory biomaterial-based wound dressings advance the healing of chronic wounds via regulating macrophage behavior［J］. Regen Biomater，2022，9：rbac065.

36 Blaise O，Duchesne C，Capuzzo E，et al. Infected wound repair correlates with collagen I induction and NOX2 activation by cold atmospheric plasma［J］. NPJ Regen Med，2024，9（1）：28.

37 Suwanchinda A，Nararatwanchai T. Efficacy and safety of the innovative cold atmospheric-pressure plasma technology in the treatment of keloid：a randomized controlled trial［J］. J Cosmet Dermatol，2022，21（12）：6788-6797.


（责任编辑：迟素敏，孙菲）