

深层海水通过激活 PI3K/Akt 通路促进糖尿病小鼠创伤的愈合

https://doi.org/10.12307/2022.118

李为明, 许青文, 李奕俊, 孙岩波, 崔进, 徐鹏远

投稿日期: 2020-09-30

送审日期: 2020-10-13

采用日期: 2021-01-19

在线日期: 2021-07-17

中图分类号:

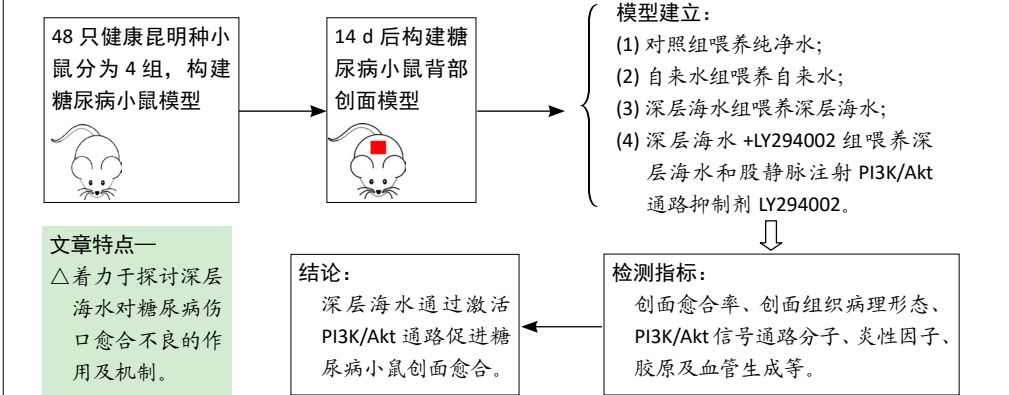
R459.9; R587.2; R319

文章编号:

2095-4344(2022)05-00724-06

文献标识码: B

文章快速阅读:



文题释义:

深层海水: 是指水深 200 m 以下的水, 水质纯净而稳定, 呈弱碱性, 富含人体细胞所需的无机盐和微量元素, 其水分子团与人体水分、血液结合角极其近似, 极易被人体吸收。

摘要

背景: 前期研究证实, 深层海水不仅影响小鼠的耐受和免疫, 还对创面修复具有重要的调控作用。

目的: 探讨深层海水修复糖尿病小鼠创面过程中对 PI3K/Akt 通路的影响。

方法: 取 48 只昆明种小鼠, 建立糖尿病模型, 造模成功后在背部制作 1 cm² 的创面, 随机分 4 组处理, 分别饮用纯净水(对照)、自来水、深层海水及深层海水+股静脉注射 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002, 每组 12 只。创面造模后第 3, 7, 10 天, 观察创面愈合情况, Western blot 检测创面组织中血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、缺氧诱导因子 1 α 、p-PI3K、p-Akt、PI3K 和 Akt 表达水平, qRT-PCR 和 Western blot 检测胶原 I、胶原 III、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和转化生长因子 β 1 的表达水平; 创面造模后第 3, 10 天, 苏木精-伊红染色观察创面形态变化。实验获中国科学院昆明动物研究所实验动物伦理委员会批准(批准号: KPRC-2017091)。

结果与结论: ①深层海水组各时间点的创面愈合率高于对照组、自来水组($P < 0.01$), 深层海水+LY294002 组与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$); ②苏木精-伊红染色显示, 对照组、自来水组、深层海水+LY294002 组第 3 天创面有大量炎性细胞浸润及少量纤维母细胞, 第 10 天可见肉芽组织及毛细血管和纤维母细胞; 深层海水组第 3 天可见纤维母细胞、毛细血管和少量炎性细胞, 第 10 天可见新生肉芽组织及较多胶原纤维和少量毛细血管; ③Western blot 检测显示, 深层海水组各时间点的血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、缺氧诱导因子 1 α 、p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达均高于对照组、自来水组($P < 0.01$); ④qRT-PCR 和 Western blot 检测显示, 深层海水组各时间点的胶原 I、胶原 III 和转化生长因子 β 1 表达均高于对照组、深层海水+LY294002 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 表达均低于对照组、深层海水+LY294002 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); ⑤结果表明, 深层海水通过激活 PI3K/Akt 通路促进糖尿病小鼠创面愈合。

关键词: 糖尿病; PI3K/Akt 通路; 深层海水; 创面愈合; 实验动物

Deep seawater promotes wound healing in diabetic mice by activating PI3K/Akt pathway

Li Weiming, Xu Qingwen, Li Yijun, Sun Yanbo, Cui Jin, Xu Pengyuan

Second Ward of Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Li Weiming, MD, Associate chief physician, Second Ward of Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Corresponding author: Li Weiming, Second Ward of Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Preliminary studies have confirmed that deep seawater not only affects the tolerance and immunity of mice, but also has an important regulatory effect on wound repair.

昆明医科大学第二附属医院胃肠外科二病区, 云南省昆明市 650101

第一作者: 李为明, 男, 1976 年生, 湖北省麻城市人, 汉族, 2014 年昆明医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事普通外科研究。

通讯作者: 李为明, 副主任医师, 昆明医科大学第二附属医院胃肠外科二病区, 云南省昆明市 650101

https://orcid.org/0000-0001-9220-514X (李为明)

基金资助: 云南省应用基础研究(昆医联合专项)资助(2015FB057), 项目负责人: 李为明; 云南省外科临床营养研究中心子课题资助(2016NS272), 项目负责人: 李为明; 云南省卫健委高层次人才项目资助(D-2017037), 项目负责人: 李为明

引用本文: 李为明, 许青文, 李奕俊, 孙岩波, 崔进, 徐鹏远. 深层海水通过激活 PI3K/Akt 通路促进糖尿病小鼠创伤的愈合 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(5):724-729.



OBJECTIVE: To explore the effect of deep seawater on the PI3K/Akt pathway in the process of wound repair in diabetic mice.

METHODS: Forty-eight Kunming mice were enrolled to establish a diabetes model. A 1 cm² wound was made on the back after successful modeling, and all the mouse models were randomized into four groups for corresponding treatments, including drinking purified water (control), tap water, deep seawater and deep seawater+LY294002, with 12 rats in each group. On the 3rd, 7th, and 10th days after wound modeling, the wound healing was observed, and western blot was used to detect the expression levels of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, hypoxia-inducible factor 1 α , p-PI3K, p-Akt, PI3K and Akt in the wound tissue. qRT-PCR and western blot were used to detect the expression levels of collagen type I, collagen type III, interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β 1 mRNA. On the 3rd and 10th days after wound modeling, hematoxylin-eosin staining was used to observe the morphological changes of the wound. The study protocol was approved by the Animal Ethic Committee of Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Science with an approval No. KPRC-2017091.

RESULTS AND CONCLUSION: The wound healing rate of the deep seawater group was higher than that of the control group and the tap water group ($P < 0.01$), while there was no significant difference in the wound healing rate between the tap water group and deep seawater+LY294002 group ($P > 0.05$). Hematoxylin-eosin staining showed that there were a large number of inflammatory cells infiltrated and a few fibroblasts on the wound surface in the control group, tap water group, and deep seawater+LY294002 group on the 3rd day, and granulation tissue, capillaries and fibroblasts were visible on the 10th day. In the deep seawater group, fibroblasts, capillaries and a few inflammatory cells were seen on the 3rd day, and new granulation tissue, more collagen fibers and a few capillaries were seen on the 10th day. Western blot analysis showed that the expressions of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, hypoxia-inducible factor 1 α , p-PI3K and p-Akt in the deep seawater group were higher than those in the control group and the tap water group on each observational time point ($P < 0.01$). qRT-PCR and western blot results showed that the expressions of collagen type I, collagen type III and transforming growth factor- β 1 in the deep seawater group were higher than those in the control group and deep seawater+LY294002 group on each observational time point ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expression levels of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α were lower than those in the control group and deep seawater+LY294002 group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). To conclude, deep seawater can promote wound healing in diabetic mice via activating the PI3K/Akt pathway.

Key words: diabetics mellitus; PI3K/Akt pathway; deep seawater; wound healing; experimental animal

Funding: Yunnan Provincial Applied Basic Research Project, No. 2015FB057 (to LWM); the Subproject of Yunnan Provincial Surgical Clinical Nutrition Research Center, No. 2016NS272 (to LWM); High-level Talent Project of Yunnan Provincial Health and Construction Commission, No.D-2017037 (to LWM)

How to cite this article: LI WM, XU QW, LI YJ, SUN YB, CUI J, XU PY. Deep seawater promotes wound healing in diabetic mice by activating PI3K/Akt pathway. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(5):724-729.

0 引言 Introduction

糖尿病创口难愈是糖尿病患者的常见并发症之一，由于糖尿病患者机体代谢紊乱扰乱了创面修复愈合的正常进程，使得创面的炎性反应延长，造成肉芽组织生成速率减缓并伴随着反复感染或损伤，严重者甚至会导致截肢或危及生命。研究发现，导致糖尿病患者创面难愈的原因与调控机体功能的相关信号通路异常相关^[1-2]，例如：PI3K/Akt 信号通路广泛参与机体内细胞增殖、分化和凋亡等，从而调节机体的正常生长、发育、免疫调节和新陈代谢等^[3-8]；低氧诱导因子 1 是调控创面愈合的关键因子，PI3K/Akt 信号通路影响了低氧诱导因子 1 的表达。同时研究显示，PI3K/Akt 通路也与糖尿病创伤难愈密切相关^[9-12]。前期研究证实，深层海水不仅影响小鼠的耐受和免疫，还对创面修复具有重要的调控作用^[13-15]。因此，实验探讨深层海水激活 PI3K/Akt 通路影响糖尿病小鼠创面修复的作用机制，期望为临床上糖尿病创伤难愈提供新的治疗方法和理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，t 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 9 月至 2018 年 9 月在昆明医科大学实验动物中心完成。

1.3 材料

1.3.1 主要试剂 戊巴比妥钠、链脲佐菌素 (Sigma, 美国); PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002(Beyotime, 上海); 血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、p-P13K、P13K、p-AKT、AKT、HIF-1 α 抗体及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (Abcam, 美国)。

1.3.2 实验动物与分组 健康雄性昆明种小鼠 48 只，4 周龄，体质量 15~17 g，购于昆明医科大学实验动物中心，许可证号：SYXK2011-006。随机分配成 4 组，分别为对照组、自来水组、深层海水组、深层海水 +LY294002 组，每组 12 只，自由饮

水和进食。小鼠饲养环境湿度保持在 50%~60%，温度保持在 20~24 °C。动物实验所有操作均按照《实验动物和操作管理规程》实施。动物实验获中国科学院昆明动物研究所实验动物伦理委员会批准。

1.4 实验方法

1.4.1 生理性深层海水的制备 取国内南海海域获取海平面 200 m 以下的深层海水，避光保存运送至昆明，利用超微过滤并使用铜锌合金净化深层海水中的重金属，通过反复冻融浓缩减去海水中多余的盐分，制备成生理性深层海水，然后稀释成 90 g/L 的深层海水，以便供后续实验采用。

1.4.2 糖尿病模型的制备 将 4 组小鼠按照每只 50 mg/kg 的剂量腹腔注射 2% 链脲佐菌素，72 h 后从尾静脉处取血，测量血液中的血糖值，血糖 >16.8 mmol/L 认为成功建立糖尿病小鼠模型。

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的	探究深层海水对糖尿病小鼠创面愈合的影响
模型与所研究疾病的关系	糖尿病小鼠模型与糖尿病创面愈合高度相关
动物来源及品系	昆明医科大学实验动物中心的健康雄性昆明种小鼠
造模技术描述	按照每只 50 mg/kg 的剂量腹腔注射 2% 链脲佐菌素构建糖尿病小鼠模型，饲养 14 d 后在模型小鼠背部构建创面
动物数量及分组方法	48 只，随机分配成 4 组，每组 12 只，分别为对照组、自来水组、深层海水组、深层海水 +LY294002 组
造模成功评价指标	造模 72 h 后从尾静脉处取血，测量血液中的血糖值，血糖 >16.8 mmol/L 认为成功建立糖尿病小鼠模型
造模后观察指标	小鼠创面愈合率、创面组织病理形态、信号通路分子、炎症因子、胶原及血管生成指标
造模后动物处理	创面模型构建成功后，对照组饲养纯净水，自来水组饲养自来水，深层海水组饲养深层海水，深层海水 +LY294002 组饲养深层海水和股静脉注射 LY294002
伦理委员会批准	获中国科学院昆明动物研究所实验动物伦理委员会批准 (批准号: KPRC-2017091)

1.4.3 造模后分组处理 糖尿病小鼠饲养 14 d 后在其背部构建创面模型。40 mg/kg 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 4 组小鼠，在小鼠背部预定 1 cm² 的创伤面积，用眼科剪沿预定面积修剪皮肤至肌肉筋膜表面，再止血、消毒，小鼠背部形成 1 cm² 的创面，手术全程保持自然暴露。创面模型构造成功后，对照组小鼠自由饮用纯净水，自来水组、深层海水组分别饮用自来水与深层海水，深层海水 +LY294002 组饮用深层海水且股静脉注射 LY294002(2 mL/kg, 注射 1 次)，混合饲料单笼饲养。同时，每天检测小鼠体重和血糖值。

1.4.4 创面形态及愈合率观察 每天检测一次背部创面恢复情况，检测方法是利用透明方格纸描绘小鼠创面的大小，描绘后录入电脑并采用 Adobe Photoshop CC 2020 计算创面面积进行分析，然后根据创面面积大小变化来计算创面的愈合率。创面愈合率 = (创面面积 - 各时相点创面面积) / 创面面积 × 100%。

1.4.5 创面组织形态学观察 创伤后第 3, 10 天分别取创面边缘组织，40 g/L 多聚甲醛溶液固定，石蜡包埋切片，苏木精-伊红染色观察创面边缘组织病理情况。

1.4.6 Western blot 检测蛋白表达水平 Western blot 检测创面组织中血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、缺氧诱导因子 1 α 、p-PI3K、p-Akt、PI3K 和 Akt 蛋白表达水平，以及胶原 I、胶原 III、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和转化生长因子 β 1 蛋白表达水平。

创伤后第 3, 7, 10 天分别取创面边缘组织，用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取各组小鼠经处理的创面组织总蛋白，并检测蛋白浓度，然后将蛋白置于 100 °C 变性 5 min；将蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后再转移到 PVDF 膜；在室温下用含 5% 脱脂牛奶的 BSA 封闭 1 h 后，加入相应的一抗 [血管内皮生长因子 (1 : 1 000)、碱性成纤维细胞生长因子 (1 : 1 000)、p-P13K(1 : 1 000)、P13K(1 : 1 000)、p-AKT (1 : 1 000)、AKT(1 : 1 000)、缺氧诱导因子 1 α (1 : 1 000)] 4 °C 孵育过夜，以 β -actin 作为内参；第 2 天加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 1.5 h；最后加入 ECL 显影液后用凝胶成像仪对条带进行成像，利用软件统计条带灰度值计算相对表达量。实验重复 3 次。

1.4.7 qRT-PCR 检测 利用 qRT-PCR 检测胶原 I、胶原 III、转化生长因子 β 1、白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的 mRNA 表达水平。

创伤后第 3, 7, 10 天分别取创面边缘组织，采用 Trizol 一步法提取小鼠组织中总 RNA，取 2 μ g 反转录为 cDNA。取 2 μ L 反转录产物进行 PCR 反应，以 β -actin 为内参基因。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列

Table 1 | Primer sequences

基因	正义链	反义链
胶原 I	5'-GGG TGA GAC AGG CGA ACA AG-3'	5'-AAC CAG CAG AGC CAG GG-3'
胶原 III	5'-TGC CCA CAG CCT TCT ACA CC-3'	5'-GCC ACC CAT TCC TCC CAC-3'
转化生长因子 β 1	5'-TCC TGG CGA TAC CTC AGC AA-3'	5'-GCT AAG GCG AAA GCC CTC AA-3'
白细胞介素 1 β	5'-GAT GGC TTA TTA CAG TGG C-3'	5'-CCT TGC TGT AGT GGT GGT-3'
肿瘤坏死因子 α	5'-ATG AGC ACT GAA AGC ATG AT-3'	5'-GGG CTG ATT AGA GAG AGG TC-3'
β -actin	5'-CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC-3'	5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT-3'

按试剂盒说明建立体积为 20 μ L 的 PCR 反应体系，反转录产物 2 μ L、SYBR Green Mix 10 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L。PCR 热循环参数为：95 °C 5 min，然后 3 步反应：94 °C 变性 30 s，60 °C 退火 30 s，共 45 个循环。检测结果采用 2^{- Δ ACT} 法进行计算。实验重复 3 次。

1.5 主要观察指标 各组创面愈合、组织形态与相关因子及蛋白表达水平。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 20.0 和 Adobe Photoshop CC 2020 软件进行统计分析，两组间比较采用 t 检验；采用 GraphPad Prism 7 对实验数据进行分析并绘制相关图片。P < 0.05 为差异有显著性意义，P < 0.01 为差异有非常显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 48 只小鼠在实验过程中无死亡，全部进入结果分析。

2.2 深层海水对小鼠体质量与血糖的影响 观察第 3, 7, 10 天小鼠的体质量和血糖值发现，对照组、自来水组及深层海水组小鼠的体质量和血糖值比较差异均无显著性意义 (P > 0.05)，见表 2，说明深层海水对小鼠的体质量和血糖值没有影响。

表 2 | 深层海水对糖尿病小鼠体质量和血糖值的影响 (x \pm s)

Table 2 | Effects of deep seawater on body mass and blood glucose level of diabetic mice

组别	体质量 (g)			血糖值 (mmol/L)		
	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 3 天	第 7 天	第 10 天
对照组	27.21 \pm 3.03	28.63 \pm 2.82	28.38 \pm 2.15	15.57 \pm 1.16	15.21 \pm 1.50	14.98 \pm 1.88
自来水组	28.32 \pm 2.86	27.12 \pm 3.31	28.45 \pm 2.45	15.43 \pm 1.34	15.21 \pm 1.29	14.87 \pm 2.10
深层海水组	28.56 \pm 2.11	28.95 \pm 1.62	27.29 \pm 2.26	16.05 \pm 1.01	15.88 \pm 2.11	15.41 \pm 1.47

表注：3 组间小鼠的体质量和血糖值比较差异均无显著性意义 (P > 0.05)

2.3 深层海水对糖尿病小鼠创面愈合的影响 创伤后不同时间点各组小鼠创面情况见图 1。对照组和自来水组小鼠创伤后第 3 天的创面较红润伴有重度水肿；至第 7 天，创面色泽变为暗红、无光泽，并有肉芽的形成；到第 10 天，创面减小，创面周围形成暗红色新皮及痂皮。深层海水组小鼠创伤后第 3 天小鼠创面创面色泽已呈现暗红，只有轻度水肿；至第 7 天，创面明显减小，有肉芽组织增生及淡红色新皮的生成；至第 10 天，创面进一步减小，肉芽组织填满伤口，并从四周向中央开始上皮化，说明深层海水可促进糖尿病小鼠创面的愈合。

同时对小鼠创面愈合率进行统计发现，相比于对照组和自来水组，深层海水处理后可显著促进小鼠创面的愈合 (P < 0.01)，自来水对小鼠创面愈合的影响与对照组比较差异无显著性意义 (P > 0.05)，见表 3。

表 3 | 深层海水对糖尿病小鼠创面愈合率的影响 (x \pm s, %)

Table 3 | Effect of deep seawater on wound healing rate in diabetic mice

组别	第 3 天	第 7 天	第 10 天
对照组	11.06 \pm 1.09	31.17 \pm 2.34	54.21 \pm 1.07
自来水组	11.43 \pm 0.96	33.46 \pm 1.43	55.21 \pm 1.43
深层海水组	25.76 \pm 1.49 ^{ab}	59.28 \pm 2.01 ^{ab}	91.34 \pm 1.62 ^{ab}

表注：与对照组比较，^aP < 0.01；与自来水组比较，^bP < 0.01

2.4 深层海水对糖尿病小鼠创面肉芽新生血管形成的影响 各组小鼠创面苏木精-伊红染色结果, 见图 2A。对照组和自来水组小鼠创伤后第 3 天创面具有大量炎性细胞浸润及少量纤维母细胞, 第 10 天可见肉芽组织及毛细血管和纤维母细胞; 深层海水组小鼠创伤后第 3 天就可观察到纤维母细胞、毛细血管和少量炎性细胞, 第 10 天可见新生肉芽组织, 有较多胶原纤维和少量毛细血管。

此外 Western blot 检测结果显示, 深层海水组小鼠创伤后第 3, 7, 10 天创面组织中的血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子蛋白表达水平明显高于对照组和自来水组 ($P < 0.01$), 自来水组小鼠创面组织中的血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子蛋白表达水平与对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 2B。结果表明, 深层海水会促进创面新生肉芽的形成, 进一步说明深层海水会促进创面愈合。

2.5 深层海水对创面组织中 PI3K/Akt 信号通路的影响 Western blot 检测结果显示, 深层海水组小鼠创伤后第 3, 7, 10 天创面组织中 p-PI3K、p-Akt 和缺氧诱导因子 1 α 的蛋白表达高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), PI3K 和 Akt 蛋白表达没有变化; 自来水组小鼠创伤后第 3, 7, 10 天创面组织中的 p-PI3K、p-Akt 和缺氧诱导因子 1 α 、PI3K 和 Akt 蛋白表达水平与对照组比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 3。由此可知, 深层海水激活了创面组织中 PI3K/Akt 信号通路, 通过 PI3K/Akt 信号通路上调缺氧诱导因子 1 α 的表达。

2.6 深层海水通过调控 PI3K/Akt 信号通路对糖尿病小鼠创面愈合的影响 基于深层海水处理糖尿病小鼠后对 PI3K/Akt 信号通路的影响, 进一步探讨深层海水是否通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进小鼠创面愈合。

2.6.1 创面苏木精-伊红染色 对照组小鼠创伤后第 3 天创面有大量炎症细胞浸润和纤维母细胞; 第 10 天有少量炎性细胞、大量胶原纤维并有新生表皮。深层海水组小鼠创伤后第 3 天创面只有少量炎性细胞浸润, 并有少量胶原纤维及毛细血管; 第 10 天有较多的胶原纤维和毛细血管, 同时伴有新生表皮的生成。深层海水 +LY294002 组小鼠创面苏木精-伊红染色结果与对照组相似。各组不同时间点创面组织形态观察见图 4。

2.6.2 创面愈合率 与对照组相比, 深层海水组可提高不同时间点的小鼠创面愈合率 ($P < 0.01$), 深层海水 +LY294002 组创面愈合率无明显变化 ($P > 0.05$), 见表 4。说明 PI3K/Akt 信号通路对糖尿病小鼠创面愈合具有重要作用, 抑制 PI3K/Akt 通路影响创面愈合。

表 4 | 深层海水通过调控 PI3K/Akt 信号通路对糖尿病小鼠创面愈合率的影响 ($\bar{x} \pm s$, %)

Table 4 | Effect of deep seawater on wound healing in diabetic mice via regulating the PI3K/Akt pathway

组别	第 3 天	第 7 天	第 10 天
对照组	11.56 \pm 1.00	33.25 \pm 1.55	55.05 \pm 1.46
深层海水组	27.58 \pm 1.21 ^{ab}	59.09 \pm 1.87 ^{ab}	92.01 \pm 2.56 ^{ab}
深层海水 +LY294002 组	12.04 \pm 0.89	34.06 \pm 1.67	55.98 \pm 1.76

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与深层海水 +LY294002 组比较, ^b $P < 0.01$

2.6.3 RT-PCR 与 Western blot 检测结果 qRT-PCR 及 Western blot 检测结果显示见图 5, 6。深层海水组小鼠各时间点创面

组织中胶原 I、胶原 III 和转化生长因子 $\beta 1$ 的蛋白及 mRNA 表达高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且在第 7 天达到最高值; 白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的蛋白及 mRNA 表达低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且在第 7 天达到最低值。深层海水 +LY294002 组胶原 I、胶原 III、转化生长因子 $\beta 1$ 、白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的蛋白及 mRNA 表达与对照组比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$), 说明 LY294002 可逆转深层海水对胶原、促炎因子和促愈合因子表达的调控作用。由此可知, 深层海水通过激活 PI3K/Akt 通路促进了创面组织中胶原和促愈合因子的表达, 从而加速糖尿病小鼠创面愈合。

3 讨论 Discussion

糖尿病是一种全身性的代谢疾病, 胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足引起血糖水平升高^[16-18]。糖尿病创口难愈是糖尿病引起的严重并发症之一, 糖尿病患者创口难愈伴有血管损伤和胶原蛋白异常, 其导致难治的皮肤伤口并经常发展成慢性溃疡。创口愈合是一个需要良好协调的过程, 涉及炎症递质和细胞反应, 如果在此过程中出现任何干扰都会影响组织修复^[19-21]。

深层海水是指水深 200 m 以下的海水, 水质纯净而稳定、弱碱性、富含人体细胞所需的无机盐和微量元素, 其水分子团与人体水分、血液结合角极其近似, 易被人体吸收, 而且深层海水可以参与调控体内代谢的过程^[22-24]。SHIRAISHI 等^[25]研究显示, 深层海水中的矿质元素可参与人体正常免疫调节, 即正常范围内人体摄入的矿质元素含量与生理免疫调节呈正相关。目前, 深层海水已被应用在食品、农业、化妆品、医学领域^[26-29], 例如: 深层海水通过 MAPK/AP-1 和 NF- κ B 信号通路抑制脂多糖诱导巨噬细胞 RAW264.7 的炎症反应^[30]; 同时, 深层海水可抑制阿霉素诱导肿瘤细胞发生上皮间质转化^[31]; 也有利用深层海水改善微量元素失衡来治疗特应性皮炎的报道^[32]。然而, 目前国内外尚未有深层海水应用于糖尿病创面修复的相关研究, 实验通过对创面愈合情况及苏木精-伊红染色观察, 证实深层海水可加快创面的愈合。

大量研究证实, PI3K/Akt 信号通路是由酶联受体介导的信号转导通路, 其在调控机体细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖代谢过程中具有重要作用^[33-36]。实验通过 qRT-PCR 及 Western blot 检测证实, 深层海水通过激活 PI3K/Akt 通路影响下游信号通路分子胶原 I、胶原 III、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和转化生长因子 $\beta 1$ 的表达, 而且上调了缺氧诱导因子 1 α 的表达, 进而促进糖尿病创面愈合。大量研究发现, 缺氧诱导因子 1 α 是创面愈合的关键调控因子, 其转录产物参与创面细胞增殖、分化和凋亡及血管生成和表皮再生等过程^[37-38]。YANG 等^[39]的研究表明, 活化的 PI3K/Akt 信号通路通过促进细胞增殖和侵袭进而加速创伤创面愈合。ZHANG 等^[40]的研究证实, 脂肪间充质干细胞来源的外泌体通过激活 PI3K/Akt 通路促进创面愈合。实验在细胞水平和分子水平证明, 深层海水可以通过 PI3K/Akt 信号通路对创面愈合产生促进作用, 但深层海水如何发挥其作用具体机制还需要进一步探讨。将深层海水运用于临床创面愈合具有重大价值意义, 还需深入研究。

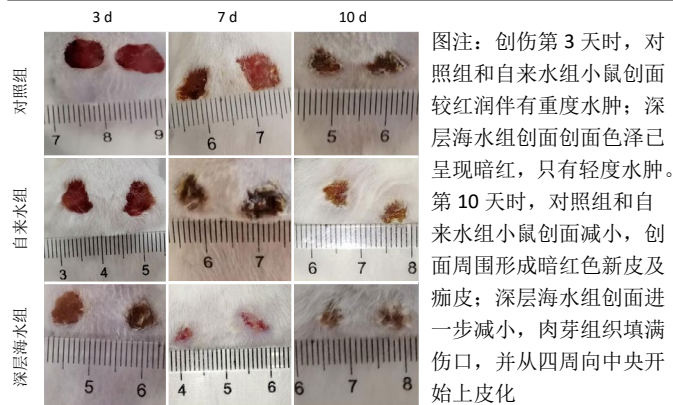
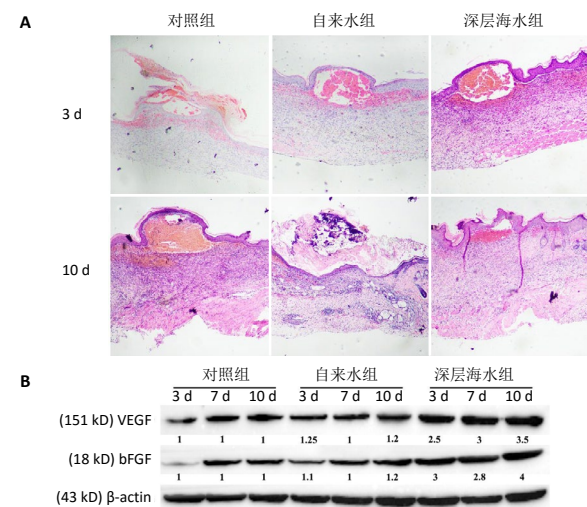


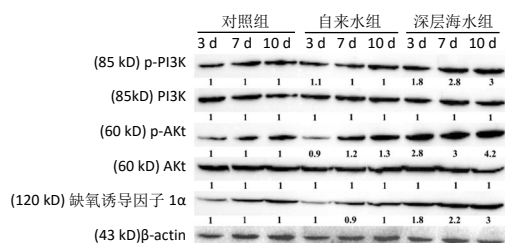
图1 | 深层海水对糖尿病小鼠创面愈合的影响
Figure 1 | Effect of deep seawater on wound healing in diabetic mice



图注: A 为创面苏木精-伊红染色结果 ($\times 40$), 对照组和自来水组小鼠创伤后第 3 天具有大量炎性细胞浸润及少量纤维母细胞, 第 10 天可见肉芽组织及毛细血管和纤维母细胞; 深层海水组小鼠创伤后第 3 天就可观察到纤维母细胞、毛细血管和少量炎性细胞, 第 10 天可见新生肉芽组织, 有较多胶原纤维和少量毛细血管。B 为创面 Western blot 检测结果, 深层海水组小鼠创伤后第 3, 7, 10 天创面组织中的血管内皮生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 蛋白表达水平明显高于对照组和自来水组 ($P < 0.01$), 自来水组两种蛋白表达水平与对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)

图2 | 深层海水对糖尿病小鼠创面肉芽新生血管形成的影响

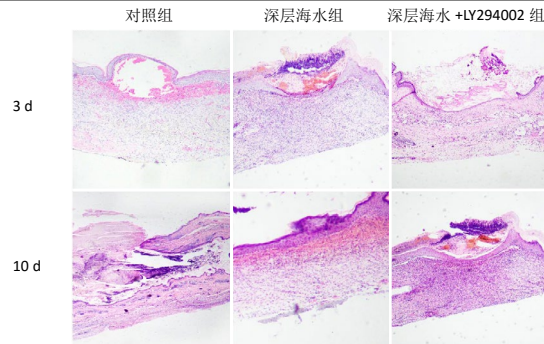
Figure 2 | Effect of deep seawater on granulation tissues and neovascularization on the wound surface of diabetic mice



图注: 深层海水组小鼠创伤后第 3, 7, 10 天创面组织中 p-PI3K、p-Akt 和缺氧诱导因子 1 α 的蛋白表达高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), PI3K 和 Akt 蛋白表达没有变化; 自来水组小鼠创伤后第 3, 7, 10 天创面组织中的 p-PI3K、p-Akt 和缺氧诱导因子 1 α 、PI3K 和 Akt 蛋白表达水平与对照组比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)

图3 | 深层海水对糖尿病小鼠创面组织中 PI3K/Akt 信号通路的影响

Figure 3 | Effect of deep seawater on the PI3K/Akt pathway in the wound tissue



图注: 对照组、深层海水 + LY294002 组小鼠创伤后第 3 天创面有大量炎症细胞浸润和纤维母细胞, 第 10 天有少量炎性细胞、大量胶原纤维并有新生表皮。深层海水组小鼠创伤后第 3 天创面只有少量炎性细胞浸润, 并有少量胶原纤维及毛细血管; 第 10 天有较多的胶原纤维和毛细血管, 同时伴有新生表皮的生成

图4 | 深层海水通过调控 PI3K/Akt 信号通路对糖尿病小鼠创面愈合的影响 (苏木精-伊红染色, $\times 40$)

Figure 4 | Effect of deep seawater on wound healing in diabetic mice via regulating the PI3K/Akt pathway (hematoxylin-eosin staining, $\times 40$)

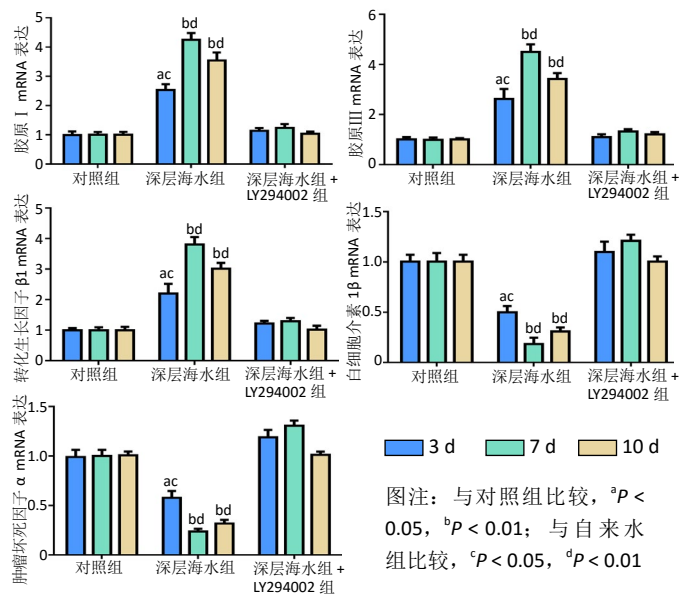
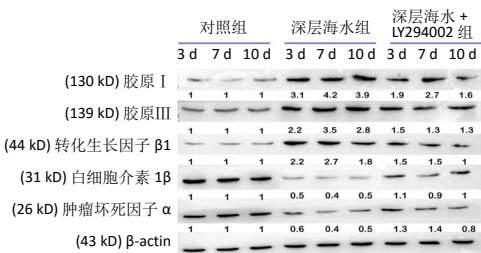


图5 | 深层海水通过调控 PI3K/Akt 信号通路对糖尿病小鼠创面胶原和促愈合因子 mRNA 表达的影响

Figure 5 | Effect of deep sea water on mRNA expression levels of collagens and pro-healing factors on the wound surface of diabetic mice



图注: 深层海水组小鼠各时间点创面组织中胶原 I、胶原 III 和转化生长因子 $\beta 1$ 的蛋白表达高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的蛋白表达低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 深层海水 + LY294002 组胶原 I、胶原 III、转化生长因子 $\beta 1$ 、白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的蛋白表达与对照组比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)

图6 | 深层海水通过调控 PI3K/Akt 信号通路对糖尿病小鼠创面胶原和促愈合因子蛋白表达的影响

Figure 6 | Effect of deep sea water on protein expression levels of collagens and pro-healing factors on the wound surface of diabetic mice

综上所述,实验证实深层海水对糖尿病小鼠创面的作用,通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胶原 I、胶原 III 和转化生长因子 $\beta 1$ 等蛋白的表达,从而加速创面的愈合。深层海水如何发挥具体作用的分子机制仍有待进一步的探索。

作者贡献: 李为明进行实验设计, 实验实施为李为明和许青文, 实验评估为李奕俊, 资料收集为孙岩波, 李为明和崔进成文, 徐鹏远审核。

经费支持: 该文章接受了“云南省应用基础研究(昆医联合专项)资助(2015FB057)、云南省外科临床营养研究中心课题(2016NS272)及云南省卫健委高层次人才项目资助(D-2017037)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验获中国科学院昆明动物研究所实验动物伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经昆明医科大学第二附属医院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- YU T, GAO M, YANG P, et al. Insulin promotes macrophage phenotype transition through PI3K/Akt and PPAR- γ signaling during diabetic wound healing. *J Cell Physiol.* 2018;234(4):4217-4231.
- MCBRIDE JD, JENKINS AJ, LIU X, et al. Elevated circulation levels of an antiangiogenic SERPIN in patients with diabetic microvascular complications impair wound healing through suppression of Wnt signaling. *J Invest Dermatol.* 2014;134(6):1725-1734.
- MORENO-MARIN N, MERINO JM, ALVAREZ-BARRIENTOS A, et al. Aryl hydrocarbon receptor promotes liver polyploidization and inhibits PI3K, ERK, and Wnt/ β -catenin signaling. *iScience.* 2018;4:44-63.
- FAN YS, LI Q, HAMDAN N, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside regulates proliferation, differentiation, and OPG/RANKL/M-CSF expression in MC3T3-E1 cells via the PI3K/Akt pathway. *Molecules.* 2018;23(9):2306-2309.
- SONG BQ, CHI Y, LI X, et al. Inhibition of notch signaling promotes the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells through autophagy activation and PTEN-PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(5):1991-2002.
- YOKOTA J, CHOSA N, SAWADA S, et al. PDGF-induced PI3K-mediated signaling enhances the TGF- β -induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a TGF- β -activated MEK-dependent manner. *Int J Mol Med.* 2014;33(3):534-542.
- YEH YH, HSIAO HF, YEH YC, et al. Inflammatory interferon activates HIF-1 α -mediated epithelial-to-mesenchymal transition via PI3K/AKT/mTOR pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):70.
- XIAOYAN H, ZHIYING H, XINWEI J, et al. Folic Acid Represses Hypoxia-Induced Inflammation in THP-1 Cells through Inhibition of the PI3K/Akt/HIF-1 α Pathway. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151553.
- CHOI YH, JIN GY, LI LC, et al. Inhibition of Protein Kinase C Delta Attenuates Allergic Airway Inflammation through Suppression of PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α /VEGF Pathway. *PLoS One.* 2013;8(11):e81773.
- DINDA M, DASGUPTA U, SINGH N, et al. PI3K-mediated proliferation of fibroblasts by Calendula officinalis tincture: implication in wound healing. *Phytother Res.* 2015; 29(4):607-616.
- 农庆文, 李顺堂, 刘达恩, 等. 弱激光促进糖尿病大鼠皮肤创伤愈合及对 PI3K/Akt-HIF-1 α 信号系统的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(10):2459-2462.
- JINSONG L, LEI C, JIAN X, et al. Effects of Periploca forrestii Schltr on wound healing by Src mediated Mek/Erk and PI3K/Akt signals. *J Ethnopharmacol.* 2019; 237:116-127.
- 李为明, 崔进, 徐鹏远, 等. 深层海水对小鼠创面愈合的促进作用 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(4):462-464.
- 李为明, 崔进, 徐鹏远, 等. “深层海水”对小鼠免疫功能的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(7):903-906.
- 李为明, 崔进, 徐鹏远, 等. “深层海水”对小鼠耐受力的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2013(6):103-106.
- PEI Y, DEMIN Y, JIANCHENG Q, et al. High D-glucose alters PI3K and Akt signaling and leads to endothelial cell migration, proliferation and angiogenesis dysfunction. *National Med J Chin.* 2006;86(48):3425-3430.
- ASSOCIATION AD. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care.* 2018;41(Suppl 1):S51-S54.
- WHITING DR, GUARIGUATA L, WEIL C, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011; 94(3):311-321.
- BARROS JF, WACLAWIAK I, PECLI C, et al. Role of Chemokine Receptor CCR4 and Regulatory T Cells in Wound Healing of Diabetic Mice. *J Invest Dermatol.* 2018; 139(5):1161-1170.
- BONIAKOWSKI AE, KIMBALL AS, JACOBS BN, et al. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *J Immunol.* 2017;199(1):17.
- BALTZIS D, ELEFTHERIADOU I, VEVES A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Adv Ther.* 2014;31(8):817-836.
- HA BG, JUNG SS, JANG YK, et al. Mineral-Enriched Deep-Seawater Modulates Lactate Metabolism via PGC-1 α -Mediated Metabolic Reprogramming. *Mar Drugs.* 2019;17(11):611.
- BYUNG H, EUN S, JUNG-EUN P, et al. Anti-Diabetic Effect of Balanced Deep-Seawater and Its Mode of Action in High-Fat Diet Induced Diabetic Mice. *Mar Drugs.* 2013;11(11):4193-4212.
- HA BG, PARK JE, SHIN EJ, et al. Modulation of Glucose Metabolism by Balanced Deep-Seawater Ameliorates Hyperglycemia and Pancreatic Function in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *PLoS One.* 2014;9(7):e102095.
- SHIRAIISHI H, FUJINO M, SHIRAKAWA N, et al. Effect of minerals on intestinal IgA production using deep seawater drinks. *Biol Pharm Bull.* 2017;40(10):1700-1705.
- LEE CL. The advantages of deep ocean water for the development of functional fermentation food. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(6):2523-2531.
- BAK JP, KIM YM, SON J, et al. Application of concentrated deep seawater inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:108.
- YANG CC, YAO CA, LIN YR, et al. Deep-Seawater Containing Selenium Provides Intestinal Protection against Duodenal Ulcers through the Upregulation of Bcl-2 and Thioredoxin Reductase 1. *PLoS One.* 2014;9(7):e96006.
- YUE Q, PAN X, LIU Y, et al. Protective effects of deep seawater against subacute alcoholic liver injury. *J of hygiene Res.* 2018;47(5):798-803.
- CHUN SY, LEE KS, NAM KS. Refined deep-seawater suppresses inflammatory responses via the MAPK/AP-1 and NF- κ B signaling pathway in LPS-treated RAW 264.7 macrophage cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2282.
- CHUN SY, KIM SNAM KS. The inhibitory effects of deep-seawater on doxorubicin-induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Rep.* 2017;38(2): 1163-1171.
- KIMATA H, TAI H, NAKAGAWA K, et al. Improvement of skin symptoms and mineral imbalance by drinking deep seawater in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS). *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2002;45(2):83-84.
- YOU L, GU W, CHEN L, et al. MiR-378 overexpression attenuates high glucose-suppressed osteogenic differentiation through targeting CASP3 and activating PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(10):7249-7261.
- MA P, GU B, XIONG W, et al. Glipeptide promotes osteogenic differentiation in rat osteoblasts via the PI3K/Akt/eNOS pathway in a high glucose microenvironment. *PLoS One.* 2014; 9(11):e112243.
- ZIRU L, LEI Y, JIN Z, et al. Nobiletin protects PC12 cells from ERS-induced apoptosis in OGD/R injury via activation of the PI3K/AKT pathway. *Exp Ther Med.* 2018;16(2):1470-1476.
- XIA P, XU XY. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *Am J Cancer Res.* 2015;5(5):1602-1609.
- KIM JH, BAE HC, KIM J, et al. HIF-1 α -mediated BMP6 down-regulation leads to hyperproliferation and abnormal differentiation of keratinocytes in vitro. *Exp Dermatol.* 2018;27(11):1287-1293.
- DU J, LIU L, LAY F, et al. Combination of HIF-1 α gene transfection and HIF-1-activated bone marrow-derived angiogenic cell infusion improves burn wound healing in aged mice. *Gene Ther.* 2013;20(11):1070-1076.
- YANG HL, TSAI YC, KORIVI M, et al. Licidone promotes the cutaneous wound healing process via activation of the PI3K/AKT, Wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathways. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(1):151-168.
- ZHANG W, BAI X, ZHAO B, et al. Cell-free therapy based on adipose tissue stem cell-derived exosomes promotes wound healing via the PI3K/Akt signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2018;370(2):333-342.

(责任编辑: GW, ZN, SX)