

國立臺灣師範大學理學院
生技醫藥產業碩士學位學程

碩士論文

Department of Graduate Programs of Biotechnology and
Pharmaceutical Industries
College of Science

National Taiwan Normal University

Master's Thesis

以糖尿病大鼠模式探討負離子與後生元對皮膚傷口
癒合之效應

Investigating the Effects of Negative Ions and
Postbiotics on Skin Wound Healing in a Diabetic Rat
Model.

黃淨盈

Huang, Jing-Ying

指導教授：鄭劍廷 博士 Ph.D.

Advisor: Chien, Chiang-Ting

中華民國 113 年 7 月

July, 2024

謝辭

在實驗室的日子一下子就過了，其中經歷大大小小的事件，最感謝的莫過於指導教授鄭老師無論於公或於私的體諒與幫助，能進入到鄭教授的實驗室是最棒的決定。

要感謝的人太多，包含實驗室的博士班學長姐們、酸酸亦師亦友的陪伴、小渝、小 Z 的日常陪伴，與助理們 Stacy、毛毛、云云的指導幫助，回首起來，有你們真的很好。

最後，還有一群人在實驗室外以他們的最大支持跟我一起度過這幾年的時間，謝謝翰翰、醬荳夫婦與孩子們跟我的家人，謝謝你們在無數個日夜顛倒的作息中，用你們方法，讓我感受到自己有多大的後盾。

此篇論文獻給萬萬，謝謝你讓我再次學會了珍惜時間。



目錄

謝辭	i
目錄	ii
圖目錄	v
中文摘要	vi
Abstract.....	vii
第一章、緒論	1
1.1. 研究背景	1
第二章、文獻回顧	3
2-1. 皮膚構造	3
2-1-1. 表皮層 (Epidermal)	3
2-1-2. 真皮層 (Dermal)	3
2-1-3. 皮下組織 (Hypodermis)	4
2-2. 皮膚傷口癒合的過程	4
2-2-1. 止血期 (Hemostasis)	4
2-2-2. 發炎期 (Inflammatory phase)	5
2-2-3. 增生期 (Proliferative phase)	6
2-2-4. 重建期 (Remodeling phase)	6
2-3. 傷口癒合相關分子	7
2-3-1. 巨噬細胞	7
2-3-2. 腫瘤壞死因子-alpha	8
2-3-3. 白血球介素-1	9
2-3-4. 細胞基質第九金屬蛋白酶	10
2-3-5. 內源性組織金屬蛋白酶抑制因子	11
2-3-6. 傷口癒合不佳分子機制	12
2-4. 糖尿病與傷口癒合	12
2-4-1. 糖尿病	12
2-4-2. 糖尿病傷口癒合不良	13
2-4-3. 糖尿病傷口癒合分子機制變化	14
2-4-4. 常見促進糖尿病傷口癒合之方法	14
2-5. 負離子	15
2-5-1. 負離子產生來源	15
2-5-2. 負離子與健康	15
2-6. 後生元	16
2-6-1. 後生元產生來源	16
2-6-2. 後生元與健康	16

2-7. 研究目的	17
第三章、研究材料與方法	18
3-1. 實驗動物	18
3-2. 大鼠糖尿病模式建立	19
3-3. 背部全皮層傷口模式建立	19
3-3-1. 傷口癒合大小測量	20
3-4. 治療模式	20
3-4-1 負離子治療模式	20
3-4-2 後生元治療模式	20
3-5. 生理參數測量	21
3-5-1. 體重測量	21
3-5-2. 血糖測量	21
3-6. 組織病理切片染色分析	21
3-6-1. 蘇木精－伊紅染色(Hematoxylin & Eosin stain, H&E stain) ..	21
3-6-2. 馬森三色染色 (Masson's trichrome stain)	22
3-6-3. 天狼星紅染色 (Sirius red stain)	22
3-6-4. 羥脯胺酸呈色分析 (Hydroxyproline colorimetric assay)	23
3-6-5. 西方墨點法(Western blotting)	23
3-7. 脂質過氧化測定 (Lipid peroxidation assay)	24
3-8. 統計分析	24
第四章、實驗結果	26
4-1. 負離子組	26
4-1-1. 負離子清除自由基能力測定	26
4-1-2. 負離子治療脂質過氧化檢測	26
4-1-3. 負離子治療對體重與血糖的影響	26
4-1-4. 負離子治療對皮膚傷口面積的影響	27
4-1-5. 負離子治療造成皮膚組織型態之改變	28
4-1-6. 負離子治療皮膚組織分子改變	29
4-2. 舒洙 LACTERA 水性創傷敷料組	30
4-2-1. LACTERA 清除自由基能力測定	30
4-2-2. LACTERA 治療脂質過氧化檢測	30
4-2-3. LACTERA 治療對體重與血糖的影響	30
4-2-4. LACTERA 治療對皮膚傷口面積的影響	31
4-2-5. LACTERA 作為治療皮膚組織型態之影響	32
4-2-6. LACTERA 治療皮膚組織分子改變	33
第五章、討論	34
第六章、結論	38

參考文獻.....	39
-----------	----



圖目錄

圖 1 糖尿病大鼠與背部全皮層傷口建立模式與實驗設計	47
圖 2 實驗動物分組	48
圖 3 背部全皮層傷口治療模式圖	49
圖 4 負離子自由基測定	50
圖 5 負離子治療脂質過氧化檢測	51
圖 6 負離子治療組平均體重與平均血糖圖	52
圖 7 負離子治療傷口紀錄圖	53
圖 8 負離子治療傷口平均未癒合創面百分比	54
圖 9 負離子治療傷口皮膚蘇木精伊紅染色切片圖	55
圖 10 負離子治療傷口皮膚組織馬森三色圖	56
圖 11 負離子治療傷口皮膚組織天狼星紅染色	57
圖 12 負離子治療傷口皮膚西方墨點法	58
圖 13 LACTERA 自由基測定原始圖	59
圖 14 LACTERA 自由基測定統計圖	60
圖 15 LACTERA 治療脂質過氧化檢測	60
圖 16 LACTERA 治療組體重與血糖圖	61
圖 17 LACTERA 治療傷口紀錄圖	62
圖 18 LACTERA 治療傷口平均未癒合創面百分比統計圖	63
圖 19 LACTERA 治療傷口皮膚蘇木精伊紅染色切片圖	64
圖 20 LACTERA 治療傷口皮膚組織馬森三色染色	65
圖 21 LACTERA 治療傷口皮膚組織天狼星紅染色	66
圖 22 LACTERA 治療傷口皮膚西方墨點法蛋白表現量	67
圖 23 負離子與 LACTERA 促進傷口癒合機制圖	68

中文摘要

傷口癒合是分子秩序井然的協同過程，過程中任一環節調控異常便可能導致傷口癒合不良。傷口癒合不良原因之一為發炎因子 $\text{TNF-}\alpha$ 與 $\text{IL-1}\beta$ 顯著升高，引起 M1 型巨噬細胞過度活化，進而誘發 MMP-9 過度分泌，破壞傷口處的細胞外基質，以至於傷口的重建和癒合被干擾。同時，M1 巨噬細胞透過自泌 $\text{TNF-}\alpha$ 與 $\text{IL-1}\beta$ 自我刺激，保持在促發炎態，形成一發炎正回饋，導致傷口持續發炎延長癒合時間。在糖尿病患者中，傷口癒合困難更為明顯，因高血糖環境使發炎因子濃度居高不下，持續的發炎反應導致傷口癒合被顯著延遲。過去負離子被提出具有促進血液循環、改善氧化壓力的效用；後生元也曾被提出對於皮膚慢性傷口有所幫助，因此，基於上述背景，高表現量的發炎症因子、MMP-9 與 M1 型巨噬細胞的過度活化，是傷口癒合不佳的主因之一，是故，阻斷 M1 型巨噬細胞引起的發炎回饋循環是改善傷口癒合的關鍵，在其中的負離子與後生元角色值得探究。

本研究旨在探討負離子與後生元對糖尿病傷口癒合的影響，研究採用鏈脲佐菌素 (STZ) 誘導糖尿病大鼠模型，建立背部全皮層傷口，實驗分作對照組、糖尿病組、傷口治療組和糖尿病傷口治療共四組。經負離子、後生元處理組的傷口癒合速度與未治療組相比皆顯著加快，同時，負離子與後生元終止傷口的持續發炎，並促進使傷口處膠原蛋白增生、肉芽組織形成與再上皮化發生，使組織修復和傷口癒合。

綜上所述，負離子和後生元兩者可以降低氧化壓力、減少發炎反應，甚至可能可以調節 M1 型巨噬細胞功能，以加速傷口癒合，在改善傷口癒合方面具潛在應用價值，同時提供急性傷口另一新型、有效的治療策略。

關鍵字：傷口癒合、急性傷口、M1 巨噬細胞、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、MMP-9、糖尿病傷口、負離子、後生元

Abstract

Wound healing is a coordinated process that can be disrupted by regulatory abnormalities, leading to impaired healing. Elevated inflammatory factors such as TNF- α , IL-1 β and hyperactivate M1 macrophages, causing excessive secretion of MMP-9, which degrades the extracellular matrix and disrupts wound reconstruction. M1 macrophages self-stimulate through autocrine of TNF- α and IL-1 β , creating a positive feedback loop of inflammation that prolongs healing. In diabetic patients, high blood sugar exacerbates this issue, keeping inflammatory factor levels high and significantly delaying wound healing.

Previous studies suggest that negative ions can promote blood circulation and reduce oxidative stress, while postbiotics may aid in chronic skin wounds. This study investigated the effects of negative ions and postbiotics on diabetic wound healing using a streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat model with full-thickness back wounds. The experiment includes four groups: control, diabetes, wound treatment, and diabetes wound treatment. Treatment with negative ions and postbiotics significantly accelerated wound healing compared to untreated groups. Additionally, these treatments reduced persistent inflammation, promoted collagen proliferation, granulation tissue formation, and re-epithelialization, facilitating tissue repair and wound healing.

In summary, negative ions and postbiotics can reduce oxidative stress and inflammation, and potentially regulate M1 macrophage function to accelerate wound healing. These findings suggest their potential application in improving wound healing, offering a novel and effective treatment strategy for wound healings.

Keywords: wound healing, acute wounds, M1 macrophages, TNF- α , IL-1 β , MMP-9, diabetic wounds, negative ions, postbiotics

第一章、緒論

1.1. 研究背景

皮膚傷口癒合不佳，造成患者身、心靈的諸多不便利，其中又以糖尿病患者，有更高機率伴隨著傷口癒合不良的問題。根據癒合時間和過程的特徵，傷口通常分為急性傷口與慢性傷口。這兩種類型的傷口在生理、病理學、癒合階段和治療策略上存在顯著差異。傷口癒合在正常的時間範圍內，按照預期的止血期、發炎期、增生期與重塑期四個主要階段，順利進行癒合的傷口稱作急性傷口。反之，慢性傷口出現發炎期滯留、增生期延遲、重塑障礙，以至於未能按照預期的癒合階段進行。癒合機制障礙其一筆因為 M1 型巨噬細胞的過度活化，分泌大量促炎性細胞因子 TNF- α 和 IL-1 β ，導致組織持續損傷、細胞外基質破壞，阻礙肉芽組織形成和血管生成受阻，最終影響膠原蛋白的重新排列和組織強度的恢復受阻，導致傷口長期不癒合或癒合不完全(Kloc et al., 2019)。被慢性傷口所困擾的族群中，糖尿病患者為大宗之一，糖尿病的慢性傷口癒合問題主因包含高血糖所造成的血管、神經病變與免疫功能、生化異常，都會導致組織修復的改變(Greenhalgh, 2003)，因此伴隨著傷口的潰瘍與感染、截肢等嚴重併發症的風險。與一般傷口相比，糖尿病傷口的傷口治療發炎期形成的時間更長，巨噬細胞是影響傷口滯留在發炎期關鍵分子。原先急性傷口中巨噬細胞在發炎階段分化為 M1 巨噬細胞後，促進發炎以清除傷口的病原菌，並隨著傷口癒合階段的衍進，M1 巨噬細胞轉而被具有抗發炎、促進細胞合成外基質與促進血管生成的作用的 M2 巨噬細胞所取代，幫助傷口逐漸癒合；慢性傷口下，M1 型巨噬細胞持續活化，分泌大量促發炎因子，阻礙向 M2 型巨噬細胞極化過程(denDekker et al., 2020; Kloc et al., 2019)。因此，如何終止 M1 型巨噬細胞持續的過度活化，以及阻斷受被維持在 M1 型巨噬細胞狀態下所引發的不間斷發炎反應，便是幫助慢性傷口回到正常癒合速度軌道的關鍵(Kotwal & Chien, 2017)。過去針對慢性傷口的治療方式包含傷口敷料、負壓傷口治療、高壓氧甚至是藉由生長因子等生物性治療方式，鑑於考量各類方式對經濟、病患照護以及便利性的影響

(Frykberg & Banks, 2015)，新型材料與分子創新應用對傷口癒合的效用仍是充滿開創可能性的潛能領域(Han & Ceilley, 2017)。



第二章、文獻回顧

2-1. 皮膚構造

皮膚，覆蓋在生物體外部表面，是承受環境中機械作用力及外部壓力、外在病原體與化學物質侵入的第一道防線(Medzhitov, 2001)。除此之外，作為生物體最大器官，皮膚負責調節生物體表面水分的散失、維持身體的恆定溫度。皮膚由豐富多元的細胞群構成，對身體免疫反應也有所貢獻。皮膚構造從外（上）至內（下），依序分為：表皮（epidermis）、真皮（dermis）和皮下組織（hypodermis）三個主要層次(Gharbia et al., 2023)，此三層構造主司不同功能，共同協同皮膚自我修復、恆定維持與免疫調節的網絡(Narauskaite et al., 2021)。

2-1-1. 表皮層（Epidermal）

皮膚表皮層中為數最多的細胞類型是角質細胞(keratinocyte)(Medzhitov, 2001)，總共佔表皮層細胞 95%，在傷口癒合的過程中，角質細胞受到白血球介素（interleukin-1，以下簡稱 IL-1）、腫瘤壞死因子- α （tumor necrosis factor- α ，以下簡稱 TNF- α ）的刺激增生與遷移，同時以自泌（autocrine）與旁泌（paracrine）的方式釋放訊號，自我活化更多角質細胞跟其他傷口癒合相關細胞。當表皮層感知到有受損或面臨外來菌時，角質細胞也可以分泌發炎相關細胞激素（cytokine）、趨化因子（chemokine）、細胞外囊泡（extracellular vesicle），或以抗原呈現（antigen presentation）的方式協助免疫細胞辨認病原菌以招募白血球（leukocyte），防止皮膚傷口進一步感染(Chambers & Vukmanovic-Stejic, 2020)。

2-1-2. 真皮層（Dermal）

皮膚真皮層（dermal）位於表皮與皮下組織中間，由乳突層（stratum papilla）和網狀層（stratum reticular）兩層結締組織組成。乳突層由疏鬆結締組織（loose connective tissue）組成，位於真皮層的較外（上）層；網狀層則在乳突層之下，位

於真皮層較深層（下），由緻密結締組織（dense connective tissue）與膠原纖維束（collagen Bundle）組成。汗腺（sweat glands）、毛囊（hair follicle）、毛髮（hair）、血管（blood vessels）和感覺神經元（sensory neurons）...等構造都位於網狀層中。真皮層中最主要分佈細胞類型為纖維母細胞（fibroblast），纖維母細胞可以釋出與血管新生（angiogenesis）、組織重建（tissue remodeling）相關的生長因子（growth factors）幫助傷口癒合，同樣的，中性球、淋巴細胞與發炎反應相關的細胞在發炎反應下也透過真皮層的血管網絡到達傷口處執行免疫反應，幫助傷口癒合(Gharbia et al., 2023)。

2-1-3. 皮下組織（Hypodermis）

皮下組織是皮膚三層中最深層（下）的層次，為疏鬆結締組織的構造，皮下組織中有大量脂肪細胞與間質幹細胞（mesenchymal stem cells）、血管、淋巴管、毛囊、毛髮與感覺神經元的附屬物(Landen et al., 2016)，又被稱作皮下筋膜（subcutaneous fascia），提供生命體熱量儲存、體溫恆定與緩衝臟器物理性衝擊力的功能。

2-2. 皮膚傷口癒合的過程

皮膚傷口癒合是皮膚組織受損後，所引起的一系列聯級反應。在皮膚受損後，皮膚透過一系列的活動幫助傷口修復，其中步驟若被阻礙，延宕的傷口癒合則稱作慢性傷口(Guo & Dipietro, 2010)。一般正常傷口癒合的過程分作止血期（hemostasis）、發炎期（inflammation）、增生期（proliferation）與重建期（remodeling），這四個相連卻重疊的時期對於傷口的作用各不相同。

2-2-1. 止血期（Hemostasis）

作為傷口癒合的第一時期，止血期發生於皮膚受損初期的 5 至 10 分鐘，持續至受傷後 48 小時(Gurtner et al., 2008)。當皮膚受傷後，損傷處立刻啟動凝血聯級

反應 (clotting cascade)，以形成了纖維蛋白凝塊抑制出血。止血期時血管因為破損暴露血管壁內皮的膠原物(collagen)在外，此膠原物會刺激血小板改變其型態與機能 (transformation)，吸引血液中的血小板黏著於內皮構造，並變得寬大、伸出偽足，與其他血小板接觸聚集 (aggregation)、活化 (activation)，釋出血漿纖維蛋白原(fibrinogen)、水解纖維連結蛋白(fibronectin)、血小板反應素(thrombospondin)等凝血相關的因子，幫助一連串的凝血反應。

2-2-2. 發炎期 (Inflammatory phase)

傷口處的發炎反應 (inflammatory responses) 在受傷後幾小時內經由受傷的組織和外來物感染的刺激而產生，可以持續至傷口產生後約莫 3 天(Landen et al., 2016; Reinke & Sorg, 2012)。當皮膚受傷時，血管內皮細胞受組織胺 (histamine) 刺激收縮導致細胞間隙增加增加血管通透性，一旦免疫細胞從血液循環進入傷口，便代表著發炎階段的開始。發炎反應時多形核中性粒細胞 (polymorphonuclear neutrophils) 最先聚集至傷口處，在發炎處產生高水平的活性氧化物 (ROS)、蛋白酶 (protease) 細胞因子和促發炎細胞因子 (pro-inflammatory cytokine)，以清潔傷口處與進行細胞凋亡(Frykberg & Banks, 2015; Lood et al., 2016)。緊接著，單核細胞 (monocytes) 抵達傷口處分化為巨噬細胞 (macrophage) (Sindrilaru & Scharffetter-Kochanek, 2013)，負責吞噬細菌與傷口碎片，約在第三天左右，大量促發炎型巨噬細胞 (M1 macrophages) 浸潤至受損傷口的邊緣，以清除細菌與死亡的細胞。一般而言，急性傷口 (acute wound) 大部分的巨噬細胞在此時，開始由促發炎型轉變為抗發炎型巨噬細胞 (M2 macrophages)；同時隨著傷口逐漸痊癒，局部巨噬細胞群體的特性也會轉變為抗發炎型巨噬細胞 (M2 macrophages)。最終，纖維母細胞 (fibroblasts)、角質細胞 (keratinocytes) 與內皮細胞 (endothelial cell) 逐步遷移至表皮、真皮與血管處增生，幫助傷口癒合與疤形成。相反的，因壓力性潰瘍 (pressure ulcer)、糖尿病潰瘍 (diabetic ulcer) 與靜脈潰瘍 (venous leg ulcer) …等所造成的

未癒合慢性傷口（chronic wound）(Frykberg & Banks, 2015)，癒合過程中局部性的巨噬細胞持續保持促發炎的特性，無法順利轉變為抗發炎型，導致傷口滯留在發炎階段，影響癒合。

2-2-3. 增生期（Proliferative phase）

傷口增生期（proliferative phase）約莫發生在傷口形成後的 3 至 10 天(Reinke & Sorg, 2012)，巨噬細胞透過分泌生長因子(growth factors)、趨化因子(chemokine)與細胞激素(cytokine)幫助細胞移動進入傷口增生期，爰此，巨噬細胞被視作影響傷口增生的關鍵分子。增生期時，傷口周圍的角質細胞移動至傷口處覆蓋；基底層中的角質細胞則與毛囊、汗腺旁常駐的上皮幹細胞一同增生，這樣皮膚細胞製造新屏障與移動的舉措，則稱作再上皮化(re-epithelialization)。再上皮化的發生可以經由巨噬細胞分泌的一氧化氮、細胞激素或與傷口相關細胞所分泌的生長因子誘發產生(Barrientos et al., 2008)，除了再上皮化以外，傷口的癒合還要經過肉芽組織產生，肉芽組織是由纖維母細胞、顆粒性白血球、巨噬細胞、血管與膠原蛋白束…等多樣類型細胞組織所組成。增生期時，肉芽組織會暫時性覆蓋傷口處並代替其部分功能，待肉芽組織形成後，纖維母細胞持續增生並分泌蛋白酶(protease)降解此暫時性的基質構造以便供細胞外基質相關物質代為填補在傷口處(Guo & Dipietro, 2010)。

2-2-4. 重建期（Remodeling phase）

皮膚在傷口癒合的重建期(remodeling phase)是傷口癒合過程中的最後一階段，通常發生在傷口癒合的第 3 週到 12 週。這個階段著重於組織的再塑造和結締組織的重建，包含膠原蛋白重新排列與血管再結構的過程以恢復傷口的強度和功能。在重建期，膠原蛋白從原先無序填補傷口的方式重新以平行的纖維束的方式排列，使傷口組織更加有結構性且耐磨損；新生血管則是以逆向重塑，與進一步的擴張進行再結構化，提供充足的血液供應和氧氣，促進組織再生和疤痕形成的減少。

重塑期的最後，纖維組織收縮減少傷口的面積，部分細胞會進行自我調節性凋亡與血管縮減保持組織平衡和潔淨，避免不必要的過度增生期。重建期的傷口，皮膚機能會不斷增強，組織結構和功能也會逐漸趨近正常皮膚的狀態(Guo & Dipietro, 2010)。

2-3. 傷口癒合相關分子

2-3-1. 巨噬細胞

巨噬細胞 (macrophages) 起源於骨髓單核球的分化，是適應性免疫中抗原呈現細胞一種，透過吞噬作用與分泌促發炎反應物質清除外來病原菌(Krzyszczuk et al., 2018; Russell et al., 2019)。在皮膚受損後，發炎反應增加了血管通透性使血液循環中的單核球細胞滲出至傷口區域分化為巨噬細胞，巨噬細胞根據微環境中的細胞激素、氧化物、脂類和生長因子等信號刺激下極化為不同的活化型態(Krzyszczuk et al., 2018)，包含典型活化巨噬細胞 (classically activated macrophage, 以下簡稱 M1 巨噬細胞) 和另類活化巨噬細胞 (alternatively activated macrophage, 以下簡稱 M2 巨噬細胞)，巨噬細胞在 M1 與 M2 之間的轉換隨著傷口癒合的不同階段改變(Guo & Dipietro, 2010)。在發炎期下，巨噬細胞受刺激活化為表面有 CD86、CD80、MHC-II、iNOS 和 TLR-2...等特定表面蛋白質為標記的 M1 巨噬細胞，藉由分泌 TNF- α , IL-1 β , IL-6...等促發炎因子，M1 巨噬細胞保持了傷口在發炎狀態，同時又透過其所分泌的 TNF- α 與 IL-1 β ，再招募更多循環中的單核球細胞匯聚至傷口處轉變為 M1 巨噬細胞，而原先的 M1 巨噬細胞也因自泌作用，維持自身處於促發炎型態 (denDekker et al., 2020)。在 M1 巨噬細胞不斷被招募並自我刺激維持在促發炎型，抑制轉變為抗炎性的 M2 巨噬細胞的作用下，形成了一個造成發炎持續的正回饋 (Schilreiff & Alexiev, 2022)，阻礙影響傷口正常癒合。與 M1 巨噬細胞促發炎的主要作用相反，M2 巨噬細胞受抗發炎因子刺激誘導，細胞表現的生物標記物則為 CD163、CD206、Ym1/2 與 FIZZ1...等特定蛋白質。M2 巨噬細胞可以抑制免疫功

能的過度活化、促進血管生成和膠原蛋白排列累積，分泌生長因子調節傷口處的微環境(Kotwal & Chien, 2017; Yao et al., 2019; Yunna et al., 2020)，並促進細胞增生和修復肉芽組織，進而協助傷口的再上皮化(Schilrreff & Alexiev, 2022; Tracy et al., 2016)，在急性傷口中，隨著組織開始修復，巨噬細胞群開始轉變為抗發炎的 M2 巨噬細胞群，故能協助傷口癒合。M1/M2 巨噬細胞的極化是一動態過程，當巨噬細胞從 M1 往 M2 的極化過程受阻，促發炎的巨噬細胞持續存在將導致傷口無法癒合，即與慢性傷口的形成高度相關(Klar et al., 2018; Kuninaka et al., 2022)。

2-3-2. 腫瘤壞死因子- α

腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , 以下簡稱 TNF- α) 是一多效性促發炎細胞因子，受到細菌、免疫複合物、病毒、補體因子、細胞因子、輻射、缺氧等多種刺激調控，TNF- α 由多種類型細胞以及被活化的巨噬細胞分泌(Szondy & Pallai, 2017)，存在跨膜型 TNF- α (transmembrane TNF- α , 簡稱 tmTNF- α)，與經過 TNF- α 轉化酶 (TNF- α -converting enzyme, TACE) 處理後，釋出的水溶型 TNF- α (soluble TNF- α , 以下簡稱 sTNF- α) 兩種類型(Benoit et al., 2021)。TNF- α 透過 Type-1-receptors (以下簡稱 TNFR1) 與 Type-2-receptors (以下簡稱 TNFR2) 進行信號傳導(Weinelt et al., 2021)，TNFR1 在所有組織細胞中表現，是 TNF- α 首要的接受器，可以和 tmTNF- α 或 sTNF- α 結合，與 TNFR1 的結合後，活化 IIa, IIb, IIc 等不同生物途徑複合物，引起 TNF- α 表現細胞毒性、啟動程序性死亡、發炎反應、組織降解等表現；另一個接受器 TNFR2 則表達於免疫細胞上，主要與 tmTNF- α 結合，結合後活化複合物 I (complex I)，引起宿主防禦與發炎反應，也與組織修復、細胞存活有關(Bradley et al., 2020)。TNF- α 除了以跨膜受體進行信號傳遞，tmTNF- α 本身也可以作為配體，將信號反向傳遞給表現 tmTNF- α 的目標細胞以調節細胞增殖、存活、分化和凋亡。TNF- α 的信號傳遞異常已經與風濕性關節炎、動脈粥樣硬化、牛皮癬、多種炎症相關性疾病以及敗血症、糖尿病跟肥胖症的發病機制有關

(Horiuchi et al., 2010)。針對傷口癒合研究中，在慢性傷口滲出液內所測定到的 TNF- α 顯著上升(Mooney et al., 1990)，甚至高於一般急性傷口值的一百倍，相同趨勢也出現在糖尿病慢性傷口中的 TNF- α 表現上，顯著高於正常血糖下傷口的 TNF- α 濃度，另外，在慢性傷口中，給予 TNF- α 的阻抗劑後，再偵測到 M1 巨噬細胞減少，皮膚傷口出現再上皮化程度增加，顯示降低 TNF- α 後可以減緩 M1 巨噬細胞對傷口的負向影響(Ashcroft et al., 2012; Jang et al., 2021; Krzyszczyk et al., 2018)。

2-3-3. 白血球介素-1

白血球介素-1 (interleukin-1，以下簡稱 IL-1) 包含 IL-1 α 與 IL-1 β 兩種相關蛋白，兩者共享相同的受體 IL-1R，與受體的結合後產生結構性的改變，從而引發下游的發炎反應(Dinarello, 2018)。IL-1 β 可以由中性粒細胞、巨噬細胞、成纖維母細胞和角質形成細胞等細胞產生，在發炎過程中，IL-1 β 觸發巨噬細胞的活化，抑制血管生成，延宕傷口癒合，為促發炎因子。IL-1 α 與 IL-1 β 兩者皆會引起發炎反應，性質卻不盡相同。IL-1 α 可以引發急性發炎，但也在避免過度發炎下，IL-1 α 會進入細胞核內，中和發炎相關的細胞因子轉錄，因此 IL-1 α 具有促發炎、抗發炎的雙重性質；相反地，後者 IL-1 β 被認為僅會促進發炎反應。在發炎反應發生時，IL-1 β 進一步誘導 TNF- α 、IL-6 等發炎相關因子分泌，吸引更多巨噬細胞聚集至傷口處，累積的發炎因子維持巨噬細胞在 M1 促發炎型，造成發炎反應持續進行。先前研究中，發現在擦傷、燙傷、凍傷與氧化壓力造成的傷害下，巨噬細胞更傾向釋出 IL-1 β 的前驅態 Pro-IL-1 β 至細胞質中(Verma et al., 2012)，Pro-IL-1 β 本身不具有生物活性，卻隨著釋出 pro-IL-1 β 累積過多，組織被觀察伴隨損傷、細胞壞死的情況發生，且細胞質中的 pro-IL-1 β 又再進一步被浸潤的嗜中性球切割為活化態 IL-1 β ，引起局部發炎反應(Lopez-Castejon & Brough, 2011)。在急性損傷與慢性發炎中，IL-1 β 隨發炎刺激訊號強度增強而增加，誘導更多趨化因子的分泌，吸引發炎相關細胞聚集加劇發炎反應。在糖尿病慢性傷口中，傷口的 IL-1 β 、TNF- α 與正常傷口組

織相比顯著增加(Mirza et al., 2013)，TNF- α 可誘發 IL-1 β 的分泌，因此在兩者的協同下，導致發炎循環持續發生(Lopez-Castejon & Brough, 2011)，同時高表現量 IL-1 β 本身觸發了 MMPs 的分泌並抑制 TIMPs 蛋白的表達(Dai et al., 2021)，被維持在 M1 型的巨噬細胞被活化後又繼續分泌 MMPs、向下調節 TIMPs 的表現量，因此在糖尿病傷口中，高表達量的 IL-1 β 與 TNF- α 維持促發炎狀態的巨噬細胞以及發炎反應的持續發生，並同時調節 MMPs 與 TIMPs 的表現，促進 ECM 降解、干擾皮膚建構過程導致傷口癒合受損、延緩了傷口癒合(Dai et al., 2021)。

2-3-4. 細胞基質第九金屬蛋白酶

細胞基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase，以下簡稱 MMPs)，是鋅離子 (Zn^{2+}) 依賴型金屬蛋白酶，可分解細胞外基質 (extracellular matrix, 以下簡稱 ECM)。依據 MMPs 的蛋白質結構可將 MMPs 至少分為基酶 (matrilysin)、膠原蛋白酶 (collagenase)、明膠酶 (gelatinase)、基質酶 (stromelysin) 與跨膜型 MMP (transmembrane type-MMP) 五類(Caley et al., 2015)。MMPs 參與降解細胞外基質的過程，能水解的蛋白質類型包含不同類膠原蛋白、軟骨特異性蛋白、聚醣核心蛋白、彈性蛋白與原纖維蛋白...等其他細胞外基質相關結構蛋白。皮膚傷口癒合過程中，MMPs 藉由分解一部分的細胞外基質，形成供角質細胞與纖維母細胞遷移至傷口處的通道幫助傷口癒合，因此 MMPs 不僅執行破壞組織結構的功能，同時也扮演著組織結構重組跟修補的重要角色。其中的細胞基質第九金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase-9，以下簡稱 MMP-9)，屬於 MMPs 中的明膠酶，MMP-9 可以分解膠原蛋白，具有高度誘導性表現的特性，受細胞激素、生長因子、趨化因子，與 TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β ...等多種發炎因子誘導(Mirastschijski et al., 2019)，皮膚中的 MMP-9 的分泌細胞包含角質細胞、纖維母細胞、巨噬細胞、內皮細胞、嗜酸性球與肥大細胞。MMP-9 在急性傷口受傷後短期內增加，並在傷口癒合過程中受其所對應的內源性組織金屬蛋白酶抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase, 以

下簡稱 TIMPs) 抑制調節，而恢復回正常濃度(Reiss et al., 2010)；因此，若調節過程出現異常，MMP-9 的過度表現將使細胞外基質蛋白質、非細胞外基質相關蛋白與促進傷口癒合蛋白分子被過度降解，影響組織正常結構(Reiss et al., 2010)，MMP-9 與 TIMP-1 間的調控失衡為慢性傷口癒合肇因之一(Dari et al., 2023; Krishnaswamy et al., 2017)。幾項研究表明，MMPs 是影響糖尿病足潰瘍傷口癒合潛在預測標誌物(Lobmann et al., 2002)，與非糖尿病傷口相比，MMP-2 和 MMP-9 蛋白在糖尿病傷口樣本中的表達量顯著升高，而 TIMP-1 和 TIMP-2 在糖尿病傷口組織中的表達水平顯著降低。綜上所述，癒合不佳的傷口中，MMPs 蛋白的表現量增加，而其抑制物 TIMPs 蛋白表達則是表現量減少。

2-3-5. 內源性組織金屬蛋白酶抑制因子

內源性組織金屬蛋白酶組織抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase, 以下簡稱 TIMPs) 是 MMPs 內源性的調控蛋白，TIMPs 有 TIMP-1,-2,-3,-4 共四種，不同類型的 TIMPs 能與其對應的 MMPs 以 1:1 的比例結合，形成不可逆的抑制性複合物，以控制 MMPs 的活性。除了作為 MMPs 的抑制劑外，TIMPs 也能調節細胞遷移，確保細胞的分佈適當去穩定組織維持正常結構以利組織修復與傷口癒合。TIMPs 中的 TIMP-1 可以抑制 MMP-9 的活性，過去研究曾將兩者量化的數值相除，所得到的 MMP9/TIMP1 比值作為評估基質金屬蛋白酶活性和其抑制之間平衡的指標(Luanraksa et al., 2018; Pietrzak et al., 2023)。當在較高的 MMP-9 / TIMP-1 比值下，通常表示基質降解活性優於抑制的環境，為促進 ECM 降解的情況，可能與組織過度降解、發炎和部分疾病相關；相反的，相對較低的 MMP-9 / TIMP-1 比值則指示環境受更強的抑制效應影響，可能在傷口進入重塑階段有關。除此之外，先前針對糖尿病傷口癒合的研究也得出完全癒合的傷口中 MMP9/TIMP1 低於未癒合傷口的數值，得出 MMP-9 與 TIMP-1 的比率與傷口癒合率呈現負相關，MMP-9 / TIMP-1 比率數值可以作為糖尿病足潰瘍傷口癒合的預測因子(Brew & Nagase, 2010)。

2-3-6. 傷口癒合不佳分子機制

在傷口癒合的早期，促發炎型 M1 型巨噬細胞被活化，大量分泌促發炎因子 TNF- α 、IL-1 β ...等，引發發炎反應，並吸引更多免疫細胞到達傷口，以清除傷口處的細菌與壞死組織，預防傷口進一步感染(Kloc et al., 2019)。適當的發炎反應同時也可以誘導巨噬細胞活化為抗發炎型 M2 巨噬細胞，M2 巨噬細胞除了分泌抗發炎反應因子抑制發炎反應外，同時還能分泌細胞外基質蛋白與生長因子，加速表皮細胞上皮化，促進傷口癒合。傷口癒合在正常情況下，隨著癒合的進行，M1 巨噬細胞逐漸被 M2 型巨噬細胞有序地取代，確保傷口由發炎期進入增生期。在發炎條件下，TNF- α 和 IL-1 β 刺激導 M1 巨噬細胞釋放 MMP-9，M1 巨噬細胞再以自泌作用分泌並接受 TNF- α 自我刺激，吸引更多免疫細胞浸潤導致持續性發炎，釋放的 MMP-9 過度降解 ECM 降解、干擾膠原蛋白累積，在臨床上，許多慢性傷口都觀察到 MMP-9 過度表現。M1 型巨噬細胞持續活化，導致 TNF- α 、IL-1 β 表現量持續不下，更造成其下游分子 MMP-9 過度分解促進癒合相關蛋白，使膠原蛋白無法排列累積而阻礙傷口癒合。因此，受 M1 巨噬細胞的狀態延長，或數量增加而造成的過度發炎反應，是傷口癒合不佳的重要機制之一(Hesketh et al., 2017; Kuninaka et al., 2022)。

2-4. 糖尿病與傷口癒合

2-4-1. 糖尿病

糖尿病是代謝症候群中一類慢性疾病，源於胰島素分泌不足或胰島素阻抗，致使細胞無法利用葡萄糖，而造成血液中葡萄糖含量累積增加。糖尿病是一種慢性代謝疾病，主要特徵是血糖水平過高。糖尿病的共同症狀有多尿、口渴、饑餓感增加、體重減輕、疲勞、視力模糊和傷口癒合緩慢。長期未能控制好血糖會導致心血管疾病、腎病、視網膜病變、神經病變及皮膚問題等併發症。

2-4-2. 糖尿病傷口癒合不良

糖尿病與傷口癒合不佳之間的關聯已被許多研究確認(Xu et al., 2012)，糖尿病患者血管壁長期浸潤在高血糖的環境中，而被不斷誘發發炎，因發炎而聚集的血小板累積導致血管壁增厚、硬化，引起周邊血管硬化或阻塞，限制了血液循環，而持續缺乏血液循環輸送免疫細胞、氧氣與營養物質的狀態下，造成傷口局部性氧化壓力升高，使癒合相關的免疫細胞、氧氣...等參與傷口癒合過程的物質無法到達受傷處，塑造了缺乏細胞清除病原菌與細胞代謝廢物累積的環境，同時多核白血球因長期高血糖導致吞噬作用功能異常，無法順利清除病原菌，造成免疫功能下降(Hesketh et al., 2017; Kotwal & Chien, 2017)。高糖與高脂環境同時使電子傳遞鏈中電子給體產生過量超氧化物，導致能量代謝底物增加、糖基化終末產物（AGEs）的生成，AGEs 在傷口增生期時，除了抑制成纖維母細胞的增生與遷移，誘導細胞凋亡外，也會抑制其他角質細胞、內皮細胞等與傷口癒合相關細胞的遷移，使癒合過程中正常發生的纖維化過程難以進行。此外，活性氧化物（reactive oxygen species, ROS）也是糖尿病傷口癒合不佳另一原因。ROS，活性氧化物或稱自由基，包括含氧自由基、氧離子、過氧化物...等，存在未配對的自由電子而極具活性，在有氧代謝或發炎反應中產生，同時也作為訊息傳遞分子誘發細胞凋亡或分化發生，與老化的過程相關。在 ROS 缺乏清除的過度累積下，對於蛋白質、脂質、核苷酸結構都有負面影響。糖尿病患者體內因糖類代謝異常 ROS 的生成增加，造成氧化壓力升高(Giacco & Brownlee, 2010; Volpe et al., 2018)，因此對包含角質細胞、纖維母細胞等傷口癒合相關的細胞和組織造成損害，導致肉芽組織生長受阻(Guo & Dipietro, 2010)，ROS 除了累積造成氧化壓力使傷口癒合滯留在發炎期，妨礙了新生組織的形成外，ROS 也會降低皮膚微生物群的多樣性，導致生物膜形成，生物膜能夠保護細菌免抗微生物素和免疫系統攻擊，從而增加細菌在傷口內的生存時間和增加速度，也是延宕傷口癒合的原因之一。

2-4-3. 糖尿病傷口癒合分子機制變化

糖尿病患者的傷口癒合過程中，高血糖下累積的 ROS 使膠原蛋白、彈性蛋白和纖維蛋白糖基化，對 MMPs 的抗性增加，影響傷口重建過程中必要的 ECM 降解過程，導致重建障礙；糖化最終產物 AGEs 也造成巨噬細胞吞噬能力異常(Giacco & Brownlee, 2010)，在糖尿病與其相關的心血管病發症研究中指出，巨噬細胞因高血糖環境刺激導致功能異常，而過度活化促進發炎型 M1 型巨噬細胞(Hesketh et al., 2017)，持續釋放 TNF- α 與 IL-1 β ，導致傷口持續處於發炎期(denDekker et al., 2020; Spranger et al., 2003)，當 TNF- α 通過 TNFR1 受體和 TRAF2 的訊息傳遞後，透過原癌基因酪氨酸激酶(proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, c-Src)活化 MMP-9 基因啟動子，引起下游 MMP-9 的表現量增加，過度分解 ECM 與癒合相關蛋白干擾了傷口癒合(Zhang & Zhou, 2022) (Honma et al., 2020)。同時過多的 TNF- α 也讓發炎反應持續不下，傷口進入慢性發炎，阻礙了進入修復和重建階段，延長傷口的癒合時間，最終導致傷口癒合不良和慢性潰瘍的形成(denDekker et al., 2020)。

2-4-4. 常見促進糖尿病傷口癒合之方法

糖尿病常見傷口癒合的方式包括抗生素治療、敷料、清創術、雷射治療、生物支架、特定生長因子的局部給藥、皮膚／皮瓣移植、基因治療和負壓吸引。其中，抗生素避免細菌感染所引起加劇的發炎反應；敷料則分作吸收性敷料、水凝膠敷料，可以保持傷口的清潔和濕潤，促進肉芽組織形成和傷口底部的癒合；負壓治療則是透過促進血流、減少水腫的模式支持傷口的癒合，但較適合於開放性傷口、皮膚移植或壓力損傷，而生物性治療常透過表皮生長因子、角質形成細胞生長因子等外源性生長因子促進傷口癒合(Qin et al., 2023)。儘管治療方式多元，但專業傷口護理產品和持續的醫療護理成本高昂，患者仍受一定的經濟壓力，且治療時間長，仰賴患者的依從性、護理知識和治療習慣的固定，顯示了糖尿病傷口癒合治療的複雜性和挑戰性，因此持續開發更易變操作的治療產品或方法的重要性不容小覷。

2-5. 負離子

2-5-1. 負離子產生來源

空氣離子是存在於大氣中的帶電分子或原子，而負離子（Negative Air Ions, 以下簡稱 NAIs）是指由獲得電子整體電荷為負的分子(Jiang et al., 2018)，自然條件下大氣中的 NAIs 主要來源有三(Kanda et al., 2023)：

1. 電子因宇宙射線、紫外線、微量元素輻射、高壓電場、閃電和水分子碰撞的作用，因而被離子化，並逸出成為帶有負電荷的自由電子，再由空氣分子、氣溶膠和細微粒子捕獲並帶上負電荷。
2. 在自然環境瀑布、海浪和雨雲下，形成帶有負電荷的水霧，被空氣流帶走。

植物通過尖端放電和光合作用釋放自由電子(Xiao et al., 2023)，或透過最常見的電暈放電法，在地面與放電電極之間施加適當高電壓以離子化空氣，產生與應用電壓極性相同的離子電場與分子進行作用。人工離子化空氣通常用於減少室內空氣中的顆粒物濃度。報告指出，負離子可以減少室內空氣中的氣溶膠顆粒、空氣中懸浮微生物、異味和揮發性有機化合物，空氣中的塵埃、花粉、霧霾顆粒及其他懸浮微粒多帶正電荷的顆粒，因此在與負離子相遇後會形成較大的顆粒，因質量增加而下沉到地面或其他表面，從而被移除出呼吸空氣中，達到淨化效果，同時因負離子的強還原性，所帶的高能量電子可以在細菌或病毒的細胞膜或細胞壁上引起氧化反應，氧化脂質、蛋白質和其他生物分子，造成細胞壁的損傷，進而影響細菌的生理功能導致死亡達到抑菌、抗菌的效果。(Adjimani & Asare, 2015)

2-5-2. 負離子與健康

早期研究結果顯示，空氣中正負離子對於皮膚的影響效果各不相同，在皮膚傷害中，NAIs 可以加快傷口癒合的速度；相反的，正離子（positive air ions）卻延緩傷口的癒合(Narauskaite et al., 2021)。對於 NAIs 減緩傷口傷害的作用機制被認為是

NAIs 具有抗發炎抗氧化力，降低細胞中促發炎細胞激素 mRNA 表現量與降低細胞內 ROS 的產生(Chambers & Vukmanovic-Stejic, 2020)，以延緩傷害所引發的發炎反應、氧化壓力以及預防可能更嚴重的發炎與傷害，與皮膚相關疾病(Xu et al., 2015)。負離子治療促進傷口癒合的可能機制包括促進血液循環、減少氧化壓力、促進膠原蛋白合成以及調節免疫反應(Jiang et al., 2018)，同時透過增加血液中的氧氣含量，改善微循環，從而加速新陳代謝和組織再生(Della Vecchia et al., 2021)。

2-6. 後生元

2-6-1. 後生元產生來源

後生元 (postbiotics) 根據 Tsilingiri et al 等人的定義(Zolkiewicz et al., 2020)，後生元包括微生物釋放、經過代謝活動所產生對宿主有益的功能性生物活性化合物，也被稱為「非活性益生菌」或「失活益生菌」。後生元的來源多樣，包含益生菌代謝產物、短鏈脂肪酸 (SCFA)、細胞壁片段、功能蛋白、細胞外多醣 (EPS)、細胞裂解物、有機酸、抗氧化物質、肽聚醣衍生物...等(Jamaran et al., 2021)。

2-6-2. 後生元與健康

研究表明，口服益生菌在管理糖尿病、呼吸道感染、胃腸道問題、泌尿生殖系統感染與皮膚炎症和慢性傷口方面具有顯著效果(Demers et al., 2014; Peral et al., 2010)，同時也有其他研究報告指出，益生菌含有與人體組織中細胞外基質蛋白類似的生物活性肽，這些 ECM 仿生肽可以促進細胞粘附、增殖和遷移增加 ECM 合成和刺激再上皮化來促進傷口癒(Knackstedt et al., 2020)。後生元作為益生菌的有益代謝物，可以協同相關細胞透過釋放 mRNA 調節免疫功能，向下調節發炎因子 TNF- α 與 IL-6 的表現量，甚至提高抗發炎因子 IL-10 的表現。同時後生元透過調節菌叢的組成，影響著免疫屏障的完整性和腸道健康，並有抗發炎、抗氧化、抗高血壓、降血脂和抗癌...等功能(Nataraj et al., 2020)，對於傷口癒合上，後生元阻止

生物膜 (biofilm) 生成以促進傷口癒合(Homayouni-Rad et al., 2016; Wang et al., 2024)。儘管後生元對微生物群落的影響非永久性，但其中的乳酸與乳酸菌素具有直接的抗微生物作用，因此後生元以其抗菌特性可以幫助避免因為感染更加重傷口處的發炎反應(Hacini-Rachinel et al., 2009; Ong et al., 2020)。最後，後生元藉由促進纖維母細胞的增殖和遷移，有益於膠原蛋白和細胞外基質的生成(Ma et al., 2023)。

2-7. 研究目的

本研究旨在研究糖尿病下傷口癒合不全的影響，透過負離子或後生元輔助對 M1 巨噬細胞功能的免疫調節作用，改善傷口癒合不佳的成效。負離子與後生元都是方便取得的素材，兩者對人體的正向影響已被研究，甚至相關應用產品不斷推陳出新，卻鮮少將負離子與後生元應用於傷口癒合上。上述指涉之負離子，所指空氣中整體電荷為負的分子，對人體呼吸道、空氣品質有益的特性已被廣泛研究；後生元，廣義定義為對宿主有益的功能性生物活性化合物，在近幾年逐漸受到矚目，相較於傳統益生菌，後生元並非活生物體，具有在生物體中穩定性更高的優勢，其對於免疫、消化系統的正向影響不容置喙，是故，本研究特此建立糖尿病模式以模擬高血糖下的傷口癒合問題，探討負離子以及後生元對 M1 巨噬細胞所形成的發炎正循環之效應，開發兩者對傷口癒合改善治療模式的成效，潛能評估與幫助建立糖尿病傷口癒合不佳的另類治療可能。

第三章、研究材料與方法

3-1. 實驗動物

本次研究中的實驗大鼠購買自樂斯科生物科技股份有限公司 (BioLASCO Taiwan CO.,Ltd)，為週齡 8 週的雄性 Wistar 大鼠，其平均體重在 300-400 克之間。

實驗大鼠飼養於溫度維持 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 之恆溫環境中，給予自每日上午七點至下午六點的光週期照明。研究過程與實驗動物的照顧均遵守了中華民國國家科學委員會於 1997 年頒布的相關規範 (National Science Council 1997)；所有執行的手術與實驗程序均經過國立台灣師範大學實驗動物照護及使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee of National Taiwan Normal University, NTNU IACUC) 的核准，並遵循中華民國國家科學委員會 (National Science Council of Republic of China) 的規範，盡量減輕實驗動物的痛苦和犧牲量。

本研究會進行給予負離子治療與給與後生元產物兩種療法獨立之動物實驗 (圖 2)。

給予負離子治療的組別主要分為四組，空氣負離子是以歐立得生態負離子機產生提供 (A-168 OLiDE 歐立得科技有限公司，板橋區，新北市，台灣)，組別分別為：

- (1) Control 組, Con 組：對照傷口組，正常值老鼠僅在背部製造全皮層傷口。
- (2) Diabetic mellitus 組, DM 組：糖尿病傷口組，以 STZ 誘發之糖尿病老鼠，僅在背部製造全皮層傷口，不予以治療。
- (3) Negative air ions 組, NAI 組：負離子處理傷口組，血糖正常值老鼠在背部製造全皮層傷口，傷口每日給予負離子吹送一小時。
- (4) Diabetic mellitus+ Negative air ions, DM+NAI 組：負離子處理糖尿病傷口組，以 STZ 誘發之糖尿病老鼠，在背部製造全皮層傷口，傷口每日給予負離子吹送一小時。

給予傷口給予後生元（舒洙 LACTERA 水性創傷敷料，許可證字號衛部醫器製壹字第 008620 號）水性創傷敷料分為四組，LACTERA 藥劑是由寶耕生技股份有限公司(BAO GENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 提供，四組分別為：

（1）Control 組, Con 組：對照傷口組，血糖正常值老鼠僅在背部製造全皮層傷口，傷口每日塗抹食鹽水。

（2）Diabetic mellitus 組, DM 組：糖尿病傷口組，以 STZ 誘發之糖尿病老鼠，在背部製造全皮層傷口，傷口每日塗抹食鹽水。

（3）LACTERA 組, LAC 組：LACTERA 處理傷口組，血糖正常值老鼠在背部製造全皮層傷口，傷口每日予以舒洙 LACTERA 水性創傷敷料一次。

（4）Diabetic mellitus+ LACTERA, DM+LAC 組：LACTERA 處理糖尿病傷口組，以 STZ 誘發之糖尿病老鼠，在背部製造全皮層傷口，傷口每日予以舒洙 LACTERA 水性創傷敷料一次。

3-2. 大鼠糖尿病模式建立

將單次劑量（75 mg/kg）的鏈脲佐菌素（STZ；Sigma Aldrich，美國）溶於 0.1M 檸檬酸緩衝液（pH=4）進行腹腔注射，誘發成年雄性 Wistar 大鼠（平均體重 300-500 克）產生高血糖。在單次注射完後 7 天，大鼠禁食 8 小時後以優安進® 血糖儀測量飯前血糖（Glucose A.C）數值，血糖濃度 $>300 \text{ mgdL}^{-1}$ 者定義為糖尿病動物 (Cheng et al., 2018)。

3-3. 背部全皮層傷口模式建立

將實驗動物以純氧混合 2% isoflurane （Panion & BF Biotech Inc. Taoyuan, Taiwan）固定排氣流量 $0.2 \text{ Liter minute}^{-1}$ ，出氣壓力 2.5 bar 麻醉後，將實驗動物背部以碘酒消毒後剔除背部毛髮，以消毒後之手術剪在背部製造一 3 公分乘以 3 公分、皮層厚度約落在 0.2-0.3mm 之全皮層傷口，使用確認血糖水平高於 300 mg dL^{-1} 的

糖尿病動物。在傷口製造後後第 0、3、7、10、14 和 21 天測量剩餘傷口大小，並於第 21 天時犧牲老鼠，收集傷口皮膚樣品和鄰近的正常皮膚組織，固定在 10% 多聚甲醛中進行組織學檢查或在液氮中速凍保存在 -80°C 中進行進一步分析。

3-3-1. 傷口癒合大小測量

以軟體 Image J (ImageJ 1.53a, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USAI) 偵測傷口大小，計算傷口面積百分比 (Unclosed wound area percentage)，剩餘傷口面積公式為： $\left[\frac{\text{未癒合傷口面積}}{\text{原始開創面積}} \times 100\% \right]$ (9cm²)。

具有突起不平厚痂、持續滲出組織液以及傷口裸露粉紅色濕潤皮膜，尚未長出完整新生皮膚者皆視作未癒合之傷口。所有數值皆以平均值±標準偏差 (standard deviation of the mean, SEM) 表示，採用 image J，以 F 檢定各組變異數是否相異後，採單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 分析剩餘傷口面積百分比各組之顯著性，並以 P 值, $p < 0.05$ 為代表具有統計顯著性意義。

3-4. 治療模式

3-4-1 負離子治療模式

空氣負離子是以歐立得生態負離子機產生提供 (A-168 OLiDE 歐立得科技有限公司，板橋區，新北市，台灣)，將負離子架設在標準 45.5×23×20.5cm³ 實驗飼養籠上，並於每日以負離子吹送傷口一小時作為治療；對照組老鼠則養於另一室，避免受空氣中負離子干擾。

3-4-2 後生元治療模式

後生元 LACTERA 藥劑是由寶耕生技股份有限公司 (BAO GENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 提供，成份為雙歧桿菌和乳酸桿菌厭氧共生發酵分離萃取乳酸菌生成物質，含有有機酸、胺基酸、短鏈脂肪酸、多醣體及生物類黃酮等成分之金色發酵精萃液體。每次按壓嘴頭固定噴出液體體積為 2.4mL，於每日對傷口按

壓兩次，使 LACTERA 液體充滿傷口作為治療；對照組則塗抹食鹽水於傷口。

3-5. 生理參數測量

3-5-1. 體重測量

待實驗動物進行實驗操作後，在給予足夠飼料與飲水下的飼養條件下，於傷口製造後的第 0, 3, 7, 11, 14 及 21 天測量大鼠之體重變化。

3-5-2. 血糖測量

待實驗動物進行實驗操作後，於傷口製造後的第 0, 3, 7, 11, 14 及 21 天時，各天數前一日將大鼠禁食 8 個小時後翌日測量其空腹血糖值(Glucose AC,mgdL⁻¹)，正常血糖值約 50-135 mgdL⁻¹，本次將空腹血糖大於 300 mgdL⁻¹ 者定義為糖尿病大鼠。

3-6. 組織病理切片染色分析

實驗動物犧牲後，將取下的檢體以生理食鹽水潤洗三次，浸泡於 10% 福馬林中，將檢體包埋於石蠟中以獲得組織蠟塊，方便之後實驗切片染色使用。

3-6-1. 蘇木精－伊紅染色(Hematoxylin & Eosin stain, H&E stain)

蘇木精－伊紅染色，於染色前一天，將皮膚組織以每片 4μm 的厚度規格連續切片，貼附在玻片上，放入 37°C 烘箱烘烤隔夜。染色日當天，為了脫去蠟質，將玻片先以 65°C 烘 15 分鐘，再將玻片依序浸泡二甲苯 7 分鐘，重複放入再浸泡 3 分鐘，接著浸泡在無水酒精 5 分鐘共兩次、95% 酒精 5 分鐘共兩次、75% 酒精 5 分鐘一次以及 50% 酒精 5 分鐘一次。藉由溶液不同濃度差進行脫水與復水，最後，靜置在二次去離子水中 10 分鐘。染色以蘇木精染劑浸泡已復水的玻片 1 至 2 分鐘，再將多餘的染劑以自來水潤洗去除。最後以伊紅染劑中浸泡玻片 5 至 10 秒染色。染色完成後，逆濃度改以 50% 酒精 5 分鐘一次、75% 酒精 5 分鐘一次、

95% 酒精 5 分鐘、無水酒精 5 分鐘各共兩次、二甲苯 3 分鐘，重複放入再浸泡 7 分鐘共兩次的相反順序脫水。最終以蓋玻片封片，放置抽風櫥內晾乾數日。

3-6-2. 馬森三色染色 (Masson's trichrome stain)

馬森三色染色於染色前一天，將皮膚組織以每片 4 μ m 的厚度規格連續切片，貼附在玻片上，放入 37°C 烘箱烘烤隔夜。隔日染色時，將玻片先以 65°C 烘 15 分鐘後浸泡於二甲苯兩次，每次浸泡 10 分鐘，以便脫去蠟質。接著，再依次浸泡於 99% 乙醇兩次、95%、85% 以及 75 % 乙醇各一次，每一次浸泡時間皆為 2 分鐘，最後浸泡在二次去離子水中 5 分鐘。將經過不同濃度溶液復水後的玻片，浸泡在 56°C 的 Bouin's 液體中固定 1 小時，再以 Weigert's Hematoxylin 染色 8 分鐘，讓染色劑均勻地著色組織。完成染色後，以自來水沖洗 10 分鐘再以 Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin 染色 10 分鐘。染色完成，以 Phosphomolybdic acid-phosphotungstic acid 進行分色處理，Phosphomolybdic acid-phosphotungstic acid 持續 10 分鐘，使 Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin 從膠原蛋白中擴散出來，同時使肌肉呈現紅色。最後，用 Aniline Blue 染色 3 分鐘，讓染色劑能夠有效地著色。染色步驟完成後，使用 1% 醋酸進行分色處理，持續 15 秒，以調整染色的效果。最後，將玻片以風冷方式晾乾，以二甲苯將切片膠封。在抽風櫥內靜置封片好的玻片，待日後觀察使用。

3-6-3. 天狼星紅染色 (Sirius red stain)

天狼星紅染色，皮膚組織取下後以 10% 福馬林固定，皮膚組織以每片 6 μ m 的厚度規格連續切片，貼附在玻片上，放入 37°C 烘箱烘烤隔夜，染色當日，先以 65°C 烘烤玻片 15 分鐘脫去蠟質，再將玻片依序浸泡二甲苯 7 分鐘，重複放入再浸泡 3 分鐘，接著浸泡在無水酒精 5 分鐘共兩次、95% 酒精 5 分鐘共兩次、75% 酒精 5 分鐘一次以及 50% 酒精 5 分鐘一次。待玻片脫水後，以天狼星紅染色滴染一小時，以 0.5% 之稀乙酸 (acetic acid) 快速沖洗玻片兩次後再以無水乙醇快速沖洗玻片，將玻片以中性樹膠封片後風乾待日後觀察。

3-6-4. 羥脯胺酸呈色分析 (Hydroxyproline colorimetric assay)

羥脯胺酸呈色分析，Hydroxyproline 是一種常用於測量膠原蛋白含量的方法，皮膚組織先以 500W 超音波細胞粉碎機 (Ultrasonic Processorm, Chromtech, 宏濬儀器有限公司，中山區，臺北市，臺灣) 以 50Hz 之頻率裂解皮膚細胞以提取蛋白，以轉速 10000rpm 離心 5 分鐘後，取 10 μ g 的樣本加入二次去離子水調製至 100 μ g 後與 10N 氫氧化鈉 (NaOH) 以 1:1 比例混合，再以 120°C 加熱進行水解反應 1 小時。以室溫冷卻後，加與 NaOH 比為 1:1 之 10N 鹽酸 (HCl) 後以 10000rpm 的離心 5 分鐘以收集上清液加入 96 孔洞，並準備濃度為 0.1 mg/mL 的標準品，加入體積為 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ L 的標準蛋白至孔洞中，加入緩衝溶液與 100 μ L 的 DMAB 混合液以鋁箔遮光在 65°C 下培養 1 小時。最後以 $\lambda = 560\text{nm}$ 的波長測量。最後使用標準曲線法，根據吸光度值推測計算出樣品中的羥脯胺酸含量。

3-6-5. 西方墨點法 (Western blotting)

西方墨點法，在進行實驗前，動物犧牲後的檢體會被置於 -80°C 環境中保存。在使用時，我們將這些檢體研磨成粉末，並將粉末加入 1.5 毫升微量離心管中，然後加入 300 微升細胞裂解液 (radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)，並在冰上混合均勻，讓其作用 10 分鐘。接著，在 14000rpm、4°C 條件下進行 30 分鐘的離心，以收集上清液，完成蛋白質樣本的萃取。為了定量未知樣本蛋白質的濃度，我們使用 BCA 標準溶液進行已知蛋白質濃度的回測，建立標準曲線。我們分別配置了濃度為 0 $\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ 、0.4 $\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ 、0.8 $\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ 、1.6 $\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ 、2 $\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ 的蛋白質溶液，並使用分光光度計在 $\lambda = 562\text{ nm}$ 波長下測定已知蛋白質濃度溶液和未知濃度樣本溶液的濃度。接著，我們使用 5x dye 和 RIPA 溶液來製備各組樣本，使各組別的蛋白質濃度一致。然後，將樣本放入 99°C 的乾浴槽中進行反應 5 分鐘，並立即取出放在冰上冷卻，以完成各組樣本的配置。根據欲觀察特定蛋白質的分子量，我們決定使用 8~12% 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠進行 SDS-PAGE 電泳。在電泳完成後，

將凝膠上的蛋白質以 4°C、100mA 的條件轉漬到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜，過程至少持續 18 小時。轉漬完成後，將膜浸泡於 Ponceau S 中，確保蛋白質已成功轉漬。然後，使用 5% BSA 溶液作為 blocking buffer，在室溫、50rpm 下作用一小時。接著，在 4°C 的環境中，讓一級抗體至少作用 18 小時，然後在室溫、50rpm 下作用一小時，加入使用 TBST 稀釋調配的二級抗體。在所有步驟之間，我們會使用 TBST 在室溫、50rpm 下洗滌三次。最後，取出膜，加入 ECL 溶液，並使用冷光照相系統 (ImageQuant LAS 4000 mini, GE Healthcare Bio-sciences AB, Canada) 進行影像拍攝。後續將使用 Image J 軟體進行影像分析。

3-7. 脂質過氧化測定 (Lipid peroxidation assay)

脂質過氧化會形成丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和 4-羥基壬烯醛 (4-Hydroxy-2-nonenal, 4-HNE)，作為生物體脂質過氧化天然雙產物，用於作為氧化損傷測定指標之一。秤重取大鼠皮膚組織檢體 10mg 以 TBS 清洗後按乾組織，加入 BioVision 脂質過氧化測定試劑盒 (lipid Peroxidation Assay Kit, K739) 中試劑後以玻璃均質器均質化組織十至十五次後以 13000rpm 轉速離心十分鐘取其上清液，在每 well 加入 200 μ L 組織上清液後，與分別濃度為 0 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 6 μ M, 8 μ M, 10 μ M 一起加入硫代巴比妥酸 (thiobarbituric Acid, TBA) 95°C 加熱 60 分鐘反應生成 MDA-TBA 加合物，最後透過比色法在波長 $\lambda = 532$ nm 波長下定量分析。

3-8. 統計分析

西方墨點法結果以 GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., CA, USA) 進行繪圖與分析，組織病理切片染色、西方點墨法所獲取的圖像資料則先以 Image J 處理後再以 GraphPad Prism 8 進行統計分析，Image J 軟體做量化分析，此次研究所收集之各項數據使用 Prism 8 軟體進行統計分析，分析結果皆以平均值 $\pm$ 標準偏差 (standard deviation of the mean, SEM) 呈現，各組別之間統計差異使用 One-way

ANOVA 分析，檢定後各組之間呈現 P 值, $p < 0.05$ 代表有統計上顯著差異。



第四章、實驗結果

4-1. 負離子組

4-1-1. 負離子清除自由基能力測定

實驗分成一般食鹽水、給予負離子處理食鹽水兩組：

以歐立得生態負離子機吹送食鹽水一小時後收集食鹽水與經過負離子吹送後的食鹽水。加入 H_2O_2 後因自由基活性物質刺激 luminol 產生化學發光後，以一般食鹽水 (Saline) 當作對照組與每日經過負離子吹送之食鹽水 (Saline+NAI) 作為自由基物質清除劑以檢測 luminol 殘留訊號。將兩組殘留自由基含量以 T-test 統計分析後，Saline+NAI 組自由基含量與 Control 組相比具有統計上顯著差異 (**, $p<0.01$)，並且為顯著較少 (圖 4)。

4-1-2. 負離子治療脂質過氧化檢測

負離子治療脂質過氧化檢測各組之間的比較以對照組 (Con) 的數值作為表示為傷害下脂質過氧的化的標準條件，NAI 組和與 Con 組相比未達顯著差異 (ns)；DM+NAI 組與 DM 組比顯著降低 (***, $p<0.001$)。脂質過氧化測定數值以 DM 組最高，NAI 組與 Con 組相比數值相近，顯示 DM+NAI 組經過負離子治療後，降低單獨糖尿病條件下細胞內脂質氧化的情形 (圖 5)。

4-1-3. 負離子治療對體重與血糖的影響

給予負離子治療的組別主要分為 Con, DM, NAI, DM+NAI 四組：

在背部傷口製造後第 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天時測量實驗大鼠體重，結果 (圖 6) 所示，四組組內體重均落在 300-450g 之間，並未因實驗有大幅波動，顯示四組生理狀態穩定，透過統計方法 One-way ANOVA 單因子變異數分析四組之間平均體重之差異，體重在四組間並未達顯著差異，顯示實驗過稱中老鼠體重穩定，生理狀況未有異常改變；同樣天數測定大鼠血糖，糖尿病組空腹血糖均在 300 mgdL^{-1} 上下

波動，不同天數下並未有統計上顯著差異，顯示糖尿病誘發成功穩定，正常大鼠血糖同樣在不同天數也未有顯著差異，顯示生理數值穩定並對血糖無影響。

4-1-4. 負離子治療對皮膚傷口面積的影響

負離子實驗組別傷口在 21 日內照片如圖所示（圖 7）：

Con 組：傷口在第 3 天結痂形成；第 11 天至第 14 天時表層結痂脫落，剩下紅色結痂，有輕微滲出，第 21 天時傷口呈現粉紅色，表面乾燥，即將癒合。

DM 組：傷口在第 3 天結痂形成，表面黑色結痂在第 7 天至第 11 天時脫落，剩下紅色濕潤結痂，有持續組織液滲出，第 14 天時紅色結痂範圍縮小，輕微滲出，第 21 天時中間剩餘深紅色乾燥結痂，其餘新生皮膚呈現粉紅色。

NAI 組：傷口在第 3 天結痂形成並於第 7 天至第 11 天時脫落，剩下紅色結痂，未有滲出，第 14 天時傷口完全乾燥，至第 21 天時僅剩新生皮膚。

DM+NAI 組：傷口在第 3 天結痂形成，在第 7 天至第 11 天時脫落，剩下紅色結痂，邊緣有殘留黑色結痂，表面輕微滲出，第 14 天時傷口完全乾燥，至第 21 天時傷口剩餘中心有粉紅色結痂，其餘為粉色新生皮膚。

四組皆在傷口形成後第 3 天形成結痂，傷口後第 7 天時 NAI 組和 DM+NAI 組肉眼所視結痂厚度與範圍較 Con 組和 DM 組小；傷口第 11 天，Con 組結痂尚未脫落；相較其他組別傷口，DM 組傷口形狀外圍具有明顯可觀察到的不平整，脫痂狀況仍不穩定，持續有組織液體滲出，而 NAI 組和 DM+NAI 組傷口邊緣平整，厚痂脫落情況完善，且傷口持續維持乾爽，無大量組織液滲出；傷口第 14 天，四組結痂皆脫落，Con 組傷口略為濕潤；DM 組傷口邊緣殘有凝結血塊，傷口仍有組織液體在表面，呈現濕潤狀，NAI、DM+NAI 組傷口外圍形狀與傷口面積與前一週比沒有顯著改變，而兩者傷口表面更較前一週乾燥；傷口第 21 天，Con, DM 與 DM+NAI 三組傷口仍有未脫落之痂皮（視作傷口未癒合），此時 NAI 組傷口已完成癒合。

分別以紅色、黃色、綠色、藍色、深藍色、桃紅色標記出傷口第 0, 3, 7, 11, 14,

21 的傷口面積，並將每組 0, 3, 7, 11, 14, 21 天傷口面積疊加成同一張圖呈現，比較每組在不同天數時傷口動態差異。傷口第 14 天（深藍色）至 21 天（桃紅色）之間，NAI 與 DM+NAI 組傷口大小的變化相較於 Con 與 DM 組，傷口癒合面積變化明顯較大、剩餘未癒合的傷口面積較少，且又以 NAI 在 14 至 21 天間組癒合範圍最多。

將四個組別分別於 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天時剩餘傷口面積予以量化（

圖 8），用未癒合傷口面積除以初始傷口面積後乘以百分比定義作未癒合傷口面積百分比，並以 One-way ANOVA 單因子變數多重比較（multiple comparison）比較不同天數四組間剩餘傷口面積大小百分比之統計顯著性。經統計計算，在第 11 天，NAI 組與 Con 組相比未癒合傷口面積達統計上顯著差異（*, $p < 0.05$ ）；治療組的 DM+NAI 與 DM 組相比具有統計上顯著差異（##, $p < 0.01$ ）。經過負離子治療組在不同天數未癒合傷口面積皆較未治療組未癒合傷口面積為小。顯示經過負離子治療後，傷口癒合速度的確較快，且經過治療後，糖尿病老鼠傷口癒合的情形可以改善至與正常老鼠傷口癒合的情況相似。

4-1-5. 負離子治療造成皮膚組織型態之改變

4-1-5-1. 蘇木精－伊紅染色 Hematoxylin and eosin stain, H&E stain

將不同組別的皮膚切片組織以蘇木精－伊紅染色（Hematoxylin and eosin stain, H&E stain）（圖 9）。不同組別於傷口製造後 21 天之背部皮膚切片 H&E 結果顯示，黑色箭頭指向為組織中累積的血球細胞。以 One-way ANOVA 單因子變異數分析四組之間單位皮膚面積血管外累積紅血球計數，NAI 組累積組織間之紅血球數量與 Con 組相比顯著下降（*, $p < 0.05$ ）；DM+NAI 組組織間累積之紅血球數量比例與 DM 組相比有統計上的顯著差異（#, $p < 0.05$ ），且皆為顯著較低。

4-1-5-2. 馬森三色染色 Masson's trichrome stain

傷口癒合階段在 21 天後，膠原蛋白纖維與組織走向平行排列，並重新吸收水分使膠原蛋白纖維更緊密靠近排列，減緩疤痕生成厚度，在馬森三色染色 (Masson's trichrome stain) 中 (圖 10)，膠原蛋白先染成藍色，而肌肉組織、表皮等等則呈現粉紅色。負離子組別傷口製造後第 21 天背部皮膚組織切片以馬森三色染色的結果顯示，經治療後，NAI 組膠原蛋白纖維與 Con 組相比有顯著差異 (**, $p < 0.01$)，且為顯著較高；另一組治療組 DM+NAI 與 DM 組相比亦有顯著差異 (#, $p < 0.05$)，且同為顯著較高。

4-1-5-3. 天狼星紅染色 Picro-Sirius Red Stain

天狼星紅染色中 (圖 11)，Con 組組織存有許多空洞，膠原蛋白排列方向有直向有橫向，方向並不一致；DM 膠原蛋白密度低，組織中存有大量纖維缺失，NAI 與 DM+NAI 組膠原蛋白密度高，且為平行整齊排列。NAI 與 Con 組相比有顯著差異 (*, $p < 0.05$)，且為顯著較高；DM+NAI 組與 DM 相比有顯著差異 (##, $p < 0.01$)，且為顯著較高。

4-1-6. 負離子治療皮膚組織分子改變

第 21 天取四個組別的皮膚組織，以西方墨點法測定 cMMP-9 (MMP-9 的切割成熟態)、CD86 和 TNF- α 三種蛋白在皮膚中的表達量。結果顯示 (圖 12)，在 cMMP-9 表現量方面，NAI 組與 Con 組比較，cMMP-9 顯著下降 (*, $p < 0.05$)；DM+NAI 組與 DM 組比較，也達到顯著下降 (##, $p < 0.01$)。在 CD86 表現量上，NAI 組與 Con 組比較顯著降低 (*, $p < 0.05$)；DM+NAI 組與 DM 組比較顯著下降 (#, $p < 0.05$)；在 TNF- α 表現量方面，DM+NAI 組與 DM 組相比顯著降低 (**, $p < 0.01$)。

4-2. 舒洙 LACTERA 水性創傷敷料組

4-2-1. LACTERA 清除自由基能力測定

將後生元（舒洙 LACTERA）水性創傷敷料混合生理食鹽水（Saline）分別稀釋為 $1\times$, $10^{-1}\times$, $20^{-1}\times$, $50^{-1}\times$ 倍濃度，結果如自由基原始圖所示（圖 13），顯示 $1\times$ 原液下的 LACTERA 加入 H_2O_2 後偵測到的 H_2O_2 含量較其他濃度組別相比為最少，顯示抗環境中自由基的能力較好。將五組自由基含量以 One-way ANOVA 單因子變異數統計分析後（圖 14），一倍與三種稀釋濃度下的 LACTERA 組與 Control 組（Saline）相比都具有統計上顯著差異（***, $p < 0.001$ ），且顯著較少，顯示出 LACTERA 具有良好抗氧化力，且以原液 1 倍之 LACTERA 的抗氧化力最好。

4-2-2. LACTERA 治療脂質過氧化檢測

LACTERA 治療脂質過氧化檢測各組之間的比較以對照組（Con）的數值作為表示為傷害下脂質過氧的化的標準條件，LAC 組和與 Con 組相比未達顯著差異（ns）；DM+LAC 組與 DM 組比顯著降低（***, $p < 0.001$ ）。脂質過氧化測定數值以 DM 組最高，LAC 組與 Con 組相比數值相近，顯示 DM+LAC 組經過負離子治療後，中和單獨糖尿病條件下細胞內脂質氧化的情形（圖 15）。

4-2-3. LACTERA 治療對體重與血糖的影響

給予後生元治療的組別主要分為 Con, DM, LAC, DM+LAC 四組：

於第 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天測量大鼠體重（圖 16），四組體重均落在 300-450g 之間，顯示其生理狀態穩定，透過統計方法 One-way ANOVA 分析四組之間平均體重之差異，四組間體重並未達顯著差異，顯示實驗過稱中老鼠體重穩定，生理狀況並未有異常改變。

同樣天數測定大鼠血糖，糖尿病組空腹血糖均在 300 mgdL^{-1} 上下波動，不同天數下並未有統計上顯著差異，顯示糖尿病誘發成功穩定，正常大鼠血糖同樣在不

同天數也未有顯著差異，顯示血糖與生理條件穩定。

4-2-4. LACTERA 治療對皮膚傷口面積的影響

LACTERA 實驗組別傷口在 21 日內照片如（圖 18）所示：

Con 組：傷口在第 3 天結痂形成；第 3 天至第 7 天時表層結痂脫落，剩下紅色結痂，有輕微滲出，至第 14 天時傷口結痂呈現乾燥，第 21 天時傷口呈現粉紅色，表面乾燥，僅剩中心有一點剩餘結痂未脫落。

DM 組：傷口在第 3 天結痂形成，第 7 天時形成深紅色厚痂在表面。至第 11 天時脫落，剩下紅色濕潤結痂與邊緣黑色結痂組織，有持續組織液滲出，第 14 天時紅色結痂範圍縮小，輕微滲出，第 21 天時中間剩深紅色乾燥結痂，其餘新生皮膚呈現粉紅色。

LAC 組：傷口在第 3 天結痂形成，於第 3 天至第 7 天時脫落，剩下紅色結痂，未有滲出，第 14 天時傷口完全乾燥，至第 21 天時結痂全數脫落僅剩新生皮膚。

DM+LAC 組：傷口在第 3 天結痂形成，在第 7 天至第 11 天時脫落，剩下紅色濕潤結痂，輕微滲出，第 14 天時傷口完全乾燥，至第 21 天時傷口剩餘小範圍粉紅色結痂，其餘為粉色新生皮膚。

四組皆在傷口形成後第 3 天形成結痂，傷口後第 7 天時 Con 組和 LAC 組結痂皆已脫落，DM+LAC 肉眼所視結痂厚度與範圍較 DM 組小；傷口第 11 天，僅有 DM 組結痂尚未脫落，DM+LAC 組結痂脫落狀況因仍有組織液，尚不穩定，而 Con 組與 LAC 組傷口邊緣平整，厚痂脫落情況完善，且傷口持續維持乾爽，無組織液滲出；傷口第 14 天，Con 組與 LAC 組傷口範圍持續向內收縮，DM+LAC 組傷口轉為乾燥，傷口第 21 天，Con, DM 傷口仍有未脫落之痂皮（視作傷口未癒合），此時 LAC 組傷口已完成癒合。

分別以紅色、黃色、綠色、藍色、深藍色、桃紅色標記出傷口第 0, 3, 7, 11, 14, 21 的傷口面積，並將每組 0, 3, 7, 11, 14, 21 天傷口面積疊加成同一張圖呈現，比較

每組在不同天數時傷口動態差異。傷口第 14 天（深藍色）至 21 天（桃紅色）之間，LAC 與 DM+LAC 組傷口大小的變化相較於 Con 與 DM 組，傷口癒合面積變化明顯較大、剩餘未癒合的傷口面積較少，且又以 LAC 在 14 至 21 天間組癒合範圍最多。

將四個組別分別於 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天時剩餘傷口面積予以量化（圖 18），用未癒合傷口面積除以初始傷口面積後乘以百分比定義作未癒合傷口面積百分比，並以 One-way ANOVA 單因子變數多重比較（multiple comparison）比較不同天數四組間剩餘傷口面積大小百分比之統計顯著性。經統計計算，在第 11 天，LAC 組與 Con 組相比未癒合傷口面積達統計上顯著差異（*, $p < 0.05$ ）；治療組的 DM+LAC 與 DM 組相比具有統計上顯著差異（#, $p < 0.05$ ）；第 14 天時 DM+LAC 組與 DM 組據統計上顯著差異（##, $p < 0.01$ ），且為顯著較小。經過 LAC 治療組在不同天數未癒合傷口面積皆較未治療組未癒合傷口面積為小。顯示經過 LAC 治療後，傷口癒合速度的確較快，且經過治療後，傷口癒合成效的差異在糖尿病老鼠上更為明顯。

4-2-5. LACTERA 作為治療皮膚組織型態之影響

4-2-5-1. 蘇木精-伊紅染色 H&E stain

將不同組別的皮膚切片組織以蘇木精與伊紅染色後，黑色箭頭所指處為累積在組織間之紅血球細胞（圖 19）。不同組別於傷口製造後 21 天之背部皮膚切片，累積在組織中紅血球數量比例上，LAC 組與 Con 組相比，有統計上顯著差異（*, $p < 0.05$ ），為顯著較少。

4-2-5-2. 馬森三色染色 Masson's trichrome stain

傷口癒合階段在 21 天後，第一類型膠原蛋白纖維與增生在不同實驗組別第 21 天背部皮膚組織切片以馬森三色染色的結果顯示（圖 20），經 LACTERA 水性創傷敷料 LAC 組膠原蛋白纖維與 Con 組相比有顯著差異（**, $p < 0.01$ ），

且為顯著較高。

4-2-5-3. 天狼星紅染色 Sirius red stain

天狼星紅染色下 (圖 21), Con 組膠原蛋白呈平行排列, 膠原蛋白纖維成束狀; DM 組存有明顯組織空洞, 膠原蛋白纖維呈蜷狀; LAC 組膠原蛋白排列整齊緻密; DM+LAC 組膠原蛋白密度增加, 排列方向不一致。以羥脯胺酸呈色分析定量膠原蛋白, LAC 組與 Con 相比有顯著差異 (**, $p < 0.01$), 且為顯著較高。

4-2-6. LACTERA 治療皮膚組織分子改變

第 21 天, 取四個組別的皮膚組織, 以西方墨點法測定 cMMP-9 (MMP-9 的切割成熟態)、IL-1 β 和 TNF- α 三種蛋白在皮膚中的表達量。結果顯示 (圖 22), 在 cMMP-9 表現量方面, LAC 組與 Con 組比較顯著下降 (***, $p < 0.001$); DM+LAC 組與 DM 組比較達到顯著下降 (##, $p < 0.01$)。在 IL-1 β 表現量方面, LAC 組與 Con 組比較顯著下降 (***, $p < 0.001$); DM+LAC 組與 DM 組比較顯著下降 (##, $p < 0.01$)。在 TNF- α 表現量方面, LAC 組與 Con 組比較顯著下降 (***, $p < 0.001$); DM+LAC 組與 DM 組比較達到顯著下降 (##, $p < 0.01$)。

第五章、討論

糖尿病皮膚傷口癒合受許多因素干擾，包含血管受損造成局部血液供應減少、微血管病變局部性缺氧、免疫功能異常引發感染、發炎過程延長或傷口癒合相關細胞功能異常...等。本次研究針對糖尿病涉及巨噬細胞功能異常成過高濃度發炎因子分泌，與過度活化的 MMP-9 活動導致膠原蛋白降解，延宕傷口癒合，形成慢性傷口為主因(Hesketh et al., 2017)，過去研究指出，負離子與後生元有抗氧化與抗發炎的能力，故欲探討兩者對傷口癒合之效用。

本次研究發現，透過負離子治療，偵測到 M1 巨噬細胞標記物 CD86 減少，TNF- α 與 MMP-9 表現量也下降，推知負離子可能是透過調節 M1 巨噬細胞，減緩發炎反應與降低 MMP-9 分泌，進而提高膠原蛋白表現量以促進傷口癒合；給予 LACTERA 的治療上則是發現，LACTERA 降低發炎因子 TNF- α 、IL-1 β 與之下游的 MMP-9 表現，膠原蛋白表現量也同樣上升，促進傷口癒合。兩種治療的結果皆出膠原蛋白表現量提高、傷口癒合情況改善的結果。負離子治療的傷口是在第 7 至 11 天出現大幅進展；LACTERA 治療則是在第 3 至 7 天時出現明顯進步，若按照正常傷口癒合以第 1-4 天定義為發炎期而言，LACTERA 的促進傷口機制可能是將在急性發炎期透過降低發炎初期大量分泌的 TNF- α 與 IL-1 β ，從源頭控制傷口的發炎反應，使傷口按照正常癒合階段進行；反之，負離子作用時間可能出現在傷口 4-21 天的癒合期，透過影響 M1 巨噬細胞以促進傷口癒合，其所降低的 TNF- α ，可能源自於 M1 巨噬細胞所分泌，因此本次實驗顯示負離子與 LACTERA 皆可幫助傷口癒合，但兩者的作用分子對象、傷口階段與分子機制可能相異。

在探討整體對皮膚傷口的效用前，先測定負離子與後生元（舒洙 LACTERA，以下稱 LACTERA）對於體外中自由基的清除效果，與對照組相比有顯著差異後，確認兩物具有抗氧化力。首先，經過負離子吹送後的食鹽水，被偵測到殘餘 H₂O₂ 相較於一般食鹽水較少，推知經過負離子處理的食鹽水清除了較多的 H₂O₂，說明

負離子具備有抗氧化力；與負離子組稍微不同，當測定 LACTERA 自由基清除率時，係以最低有效濃度的考量出發，因此用一般食鹽水將 LACTERA 溶液稀釋為 $10^{-1}x$, $20^{-1}x$, $50^{-1}x$ 不同濃度，測定濃度梯度下的自由基清除率。結果顯示，不論是一倍 LACTERA 原液體，或在 $10^{-1}x$, $20^{-1}x$, $50^{-1}x$ 的稀釋濃度下，四組環境中殘留的 H_2O_2 都顯著少於一般食鹽水的對照組，而組間 H_2O_2 殘餘量則是沒有統計上顯著差異。不過隨 LACTERA 稀釋濃度上升， H_2O_2 殘餘量越多，顯示在這次測定濃度區間內 LACTERA 的抗氧化能力與濃度呈正相關。

動物實驗的期間，參考血糖與體重作為生理條件穩定的指標，觀察到糖尿病組的體重與對照組沒有顯著差異，與原先所預期預期糖尿病大鼠胰島 β 細胞被破壞細胞無法有效利用血糖，導致脂肪和蛋白質的分解，體重應逐漸減輕相異，但參考其他同樣以空腹血糖值 300mgdL^{-1} 作為糖尿病判定的研究，誘發糖尿病後短期內大鼠體重同樣是上升趨勢，推測本次體重未符合預期變化可能是因為大鼠誘發成功後實際患病期間僅為 1-2 個月，實驗期間過短，來不及出現糖尿病體重顯著減輕的症狀；又或者發病初期血糖水平過高，而未給予治療，大鼠可能導致過度攝水與進食導致體重數字增加(Wing et al., 1987)。

在第一部分負離子實驗中，透過 H&E 染色觀察組織紅血球累積的情況，紅血球組織中累積並未被清除的原因可能源於過度發炎、巨噬細胞功能異常或因慢性發炎血管持續保持在高通透性使紅血球滲漏出至組織間，組織間的紅血球可能造成局部氧化壓力增加，甚至是招募更多免疫細胞聚集維持發炎反應，其中糖尿病因免疫功能、巨噬細胞功能異常，加上循環不良，紅血球組織間累積的情況可能更嚴重。在經負離子治療後，NAI 組和 DM+NAI 組的皮膚組織中紅血球的累積顯著減少，可能源於負離子對發炎反應的改善。馬森三色染色結果表明，負離子治療促進了膠原蛋白纖維的生長與平行排列。天狼星紅染色中膠原 I 型在偏振光下呈現明亮的紅色至橙色，膠原 III 型則呈現綠色至黃色，在傷口癒合後期，膠原蛋白應轉變為第 I 型沈積，同時也可以透過纖維結構的排列看出組織癒合的情況。若纖維

為有序平行排列，傾向解讀為正常的組織修復，反之，無序排列則為疤痕、纖維化等病理狀態，再搭配纖維密度解讀，無序排列或密度降低說明傷口可能癒合過程受阻或存在慢性發炎的情形。而本次給予負離子治療的實驗中，Con 與 DM 組天狼星染色下存在許多膠原蛋白的空洞，且排列成捲曲狀；反之 NAI 與 DM+NAI 組與馬森三色染色的結果相符，膠原蛋白纖維增生且為有序平行排列，切片中沒有觀察到明顯的空洞。最後在蛋白質檢驗中看到 TNF- α 表現量在給予負離子的組別下降，說明負離子具有抗發炎的效果，搭配測定 M1 巨噬細胞生物標記物 CD86，發現負離子組的 CD86 蛋白表現較少，因此推測負離子對巨噬細胞有所作用。總結在本次實驗中，看到負離子具有抗氧化能力，可清除自由基、減緩炎症反應，刺激成纖維細胞活動，促進膠原蛋白的合成和排列(Bailey et al., 2018)。

第二部分以 LACTERA 治療的實驗中，同樣 LACTERA 對紅血球組織間累積有明顯減緩，膠原蛋白的含量在給予 LACETRA 的組別中上升，DM+LAC 組與 DM 組雖然統計上未達顯著差異，但染色切片結果明顯，且最終膠原蛋白定量結果仍達顯著差異，可能因馬森染色定量是以軟體讀取顏色數值的結果，仍存有顏色對比明顯與否、顏色閾值等問題。值得一提的是，根據天狼星染色可看出膠原蛋白束在糖尿病組別中的排列呈縱橫交錯的非平行排列(Chang et al., 1980)，且又以未經治療的 DM 組看出組織中存在明顯膠原蛋白的空洞(Spanheimer et al., 1988)，經過 LACTERA 治療後，DM+LAC 膠原蛋白纖維有生長回升的趨勢，但排列情況與 LAC 組相比仍顯凌亂。最後測定 IL-1 β , TNF- α 蛋白質表現量在給予治療後下降；MMP-9 也表現出一樣的趨勢。

在給予負離子與 LACTERA 治療後，負離子和後生物的抗氧化的能力降低 TNF- α 分泌，使傷口周圍的氧化反應減少，降低自由基的產生，打破 M1 巨噬細胞造成發炎反應迴圈 (Inflammatory positive loop)，因此 MMP-9 表現量下降，允許膠原蛋白生成與累積，促進傷口癒合。MMP-9 抑制物對應到 TIMP-1，兩者之間以 1:1 的表現量作為抑制機制(Charzewski et al., 2021)，負離子治療實驗在西方墨點法

中 TIMP-1 並未有顯著上升的表現，但基於負離子實驗整體的蛋白表現量較不明顯，且 TIMP-1 的表現趨勢與 MMP-9 相符，無法判斷負離子是否可以單一針對 TIMP-1 的表現量增加，抑或是 TIMP-1 的表現仍遵循一般途徑根據隨 MMP-9 而變化；LACTERA 治療實驗中 TIMP-1 與 MMP-9 的表現也類似於負離子的機制。因此，僅從本次實驗無法定義出負離子治療與 LACTERA 治療對 TIMP-1 的效用(附錄 1 TIMP-1 蛋白表現量)。此外，實驗中觀察到膠原蛋白增生的現象，途徑可能性有二：(1) 負離子與 LACTERA 藉由阻斷 M1 巨噬細胞引起的發炎反應，幫助傷口進入增生期，抑制 MMP-9 過度活化而對膠原蛋白增生有所幫助；又或者是(2) 負離子與 LACTERA 可以幫助 M1-M2 巨噬細胞極化，增加 M2 巨噬細胞數量直接刺激膠原蛋白增生，在本次實驗中尚未應證。同時，MMP-9 在給予治療後表現量下降的情況，是由於 MMP-9 上游的 TNF- α 表現量下降，或是兩者治療可以增加 TIMP-1 而抑制 MMP-9 表現，無法僅以單一 TNF- α , MMP-9 表現量下降的結果作論述。

此外，直接指涉到 CD86 代表 M1 巨噬細胞仍須複合式標記物輔助判斷，且需搭配細胞實驗才可以確認負離子可以影響 M1 巨噬細胞的數量，故西方墨點法的 CD86 表現量雖然在負離子治療後下降，我們仍無法直接對應負離子對細胞層級的調控效應，需要克服負離子機台與當細胞共室的操作問題搭配標實驗才可以完整負離子對 M1 巨噬細胞的調控途徑。LACTERA 治療的實驗中看出 TNF- α 的表現量顯著降低，然而此 TNF- α 是因發炎反應而產生，又或者是來自 M1 巨噬細胞所分泌，也難以透過單一西方墨點法看出，因次無論是負離子或 LACTERA 的效用，依照本次實驗結果與設計，僅能說 M1 巨噬細胞的發炎回饋可以受阻斷，在下游 MMP-9、膠原蛋白的表現上有所影響，實際上兩者幫助傷口癒合與新生的機制可能有異，其機制作用針對發炎因子 TNF- α ，或是幫助 M2 巨噬細胞的極化，仍待更進一步研究說明。

第六章、結論

巨噬細胞從 M1 型極化為 M2 型是傷口癒合的關鍵步驟。然而，在 TNF- α 的持續刺激下，發炎的循環正回饋使巨噬細胞持續維持在促發炎的 M1 型，導致傷口癒合受阻礙。本研究結果顯示，負離子治療可以降低 TNF- α 和 MMP-9 的蛋白表現，而 LACTERA 治療則能減少 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-9 的表現，最後兩項實驗中經治療後的傷口皆在 21 天內膠原蛋白顯著增生，說明負離子和 LACTERA 可以通過有效抑制持續性發炎反應來促進組織修復和傷口癒合。(圖 23)

本次研究指出，負離子不僅具有抗發炎的能力，還能通過減少 TNF- α 的分泌來終止發炎循環；相似的是，LACTERA 也具有抗發炎的作用，能夠降低 TNF- α 、IL-1 β 的表現，以促進傷口癒合，更初步解密兩者參與傷口癒合階段性的不同。若能進一步研究兩者在不同類型傷口中的有效性和安全性，並結合現有的傷口護理技術將有助於拓展其臨床應用，有望提高傷口癒合的治療效果，縮短癒合時間，提供更新穎的治療策略，具有廣泛的臨床應用前景。

參考文獻

- Adjimani, J. P., & Asare, P. (2015). Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicol Rep*, 2, 721-728. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.04.005>
- Ashcroft, G. S., Jeong, M. J., Ashworth, J. J., Hardman, M., Jin, W., Moutsopoulos, N., Wild, T., McCartney-Francis, N., Sim, D., McGrady, G., Song, X. Y., & Wahl, S. M. (2012). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*, 20(1), 38-49. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00748.x>
- Bailey, W. H., Williams, A. L., & Leonhard, M. J. (2018). Exposure of laboratory animals to small air ions: a systematic review of biological and behavioral studies. *Biomed Eng Online*, 17(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s12938-018-0499-z>
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, 16(5), 585-601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>
- Benoot, T., Piccioni, E., De Ridder, K., & Goyvaerts, C. (2021). TNFalpha and Immune Checkpoint Inhibition: Friend or Foe for Lung Cancer? *Int J Mol Sci*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168691>
- Bradley, J. R., Wang, J., Pacey, S., Warren, A. Y., Pober, J. S., & Al-Lamki, R. S. (2020). Tumor necrosis factor receptor-2 signaling pathways promote survival of cancer stem-like CD133(+) cells in clear cell renal carcinoma. *FASEB Bioadv*, 2(2), 126-144. <https://doi.org/10.1096/fba.2019-00071>
- Brew, K., & Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*, 1803(1), 55-71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.003>
- Caley, M. P., Martins, V. L., & O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(4), 225-234. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0581>
- Chambers, E. S., & Vukmanovic-Stejic, M. (2020). Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*, 160(2), 116-125. <https://doi.org/10.1111/imm.13152>
- Chang, K., Uitto, J., Rowold, E. A., Grant, G. A., Kilo, C., & Williamson, J. R. (1980). Increased collagen cross-linkages in experimental diabetes: reversal by beta-aminopropionitrile and D-penicillamine. *Diabetes*, 29(10), 778-781. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.10.778>
- Charzewski, L., Krzysko, K. A., & Lesyng, B. (2021). Structural characterisation of

inhibitory and non-inhibitory MMP-9-TIMP-1 complexes and implications for regulatory mechanisms of MMP-9. *Sci Rep*, 11(1), 13376.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-92881-x>

Cheng, K. Y., Lin, Z. H., Cheng, Y. P., Chiu, H. Y., Yeh, N. L., Wu, T. K., & Wu, J. S. (2018). Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Using Atmospheric-Pressure Argon Plasma Jet. *Sci Rep*, 8(1), 12214. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30597-1>

Dai, J., Shen, J., Chai, Y., & Chen, H. (2021). IL-1beta Impaired Diabetic Wound Healing by Regulating MMP-2 and MMP-9 through the p38 Pathway. *Mediators Inflamm*, 2021, 6645766. <https://doi.org/10.1155/2021/6645766>

Dari, S., Fadaei, N. T., & O'Dea, R. D. (2023). Modelling the Effect of Matrix Metalloproteinases in Dermal Wound Healing. *Bull Math Biol*, 85(10), 96. <https://doi.org/10.1007/s11538-023-01195-8>

Della Vecchia, A., Mucci, F., Pozza, A., & Marazziti, D. (2021). Negative Air Ions in Neuropsychiatric Disorders. *Curr Med Chem*, 28(13), 2521-2539. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200630104550>

Demers, M., Dagnault, A., & Desjardins, J. (2014). A randomized double-blind controlled trial: impact of probiotics on diarrhea in patients treated with pelvic radiation. *Clin Nutr*, 33(5), 761-767. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.10.015>

denDekker, A. D., Davis, F. M., Joshi, A. D., Wolf, S. J., Allen, R., Lipinski, J., Nguyen, B., Kirma, J., Nycz, D., Bermick, J., Moore, B. B., Gudjonsson, J. E., Kunkel, S. L., & Gallagher, K. A. (2020). TNF-alpha regulates diabetic macrophage function through the histone acetyltransferase MOF. *JCI Insight*, 5(5). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.132306>

Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*, 281(1), 8-27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>

Frykberg, R. G., & Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(9), 560-582. <https://doi.org/10.1089/wound.2015.0635>

Gharbia, F. Z., Abouhashem, A. S., Moqidem, Y. A., Elbaz, A. A., Abdellatif, A., Singh, K., Sen, C. K., & Azzazy, H. M. E. (2023). Adult skin fibroblast state change in murine wound healing. *Sci Rep*, 13(1), 886. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27152-4>

Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 107(9), 1058-1070. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>

- Greenhalgh, D. G. (2003). Wound healing and diabetes mellitus. *Clin Plast Surg*, 30(1), 37-45. [https://doi.org/10.1016/s0094-1298\(02\)00066-4](https://doi.org/10.1016/s0094-1298(02)00066-4)
- Guo, S., & Dipietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *J Dent Res*, 89(3), 219-229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>
- Hacini-Rachinel, F., Gheit, H., Le Luduec, J. B., Dif, F., Nancey, S., & Kaiserlian, D. (2009). Oral probiotic control skin inflammation by acting on both effector and regulatory T cells. *PLoS One*, 4(3), e4903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004903>
- Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther*, 34(3), 599-610. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>
- Hesketh, M., Sahin, K. B., West, Z. E., & Murray, R. Z. (2017). Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071545>
- Homayouni-Rad, A., Soroush, A. R., Khalili, L., Norouzi-Panahi, L., Kasaie, Z., & Ejtahed, H. S. (2016). Diabetes Management by Probiotics: Current Knowledge and Future Pespective. *Int J Vitam Nutr Res*, 86(3-4), 215-227. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000273>
- Honma, K., Machida, C., Mochizuki, K., & Goda, T. (2020). Glucose and TNF enhance expression of TNF and IL1B, and histone H3 acetylation and K4/K36 methylation, in juvenile macrophage cells. *Gene X*, 5, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.100034>
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*, 49(7), 1215-1228. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
- Jamaran, S., Jafari, P., Marjani, A., Akbari, N., & Feizabad, M. M. (2021). Novel Wound Dressing Based on Postbiotic/Chitosan Film Accelerates Cutaneous Wound Healing [Research Article]. *Jundishapur J Microbiol*, 14(12), e120806. <https://doi.org/10.5812/jjm.120806>
- Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alpha) in Autoimmune Disease and Current TNF-alpha Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>

Jiang, S. Y., Ma, A., & Ramachandran, S. (2018). Negative Air Ions and Their Effects on Human Health and Air Quality Improvement. *Int J Mol Sci*, 19(10).

<https://doi.org/10.3390/ijms19102966>

Kanda, K., Nishimura, H., Koiso, T., Takemoto, K., Nakagoe, K., Yamada, T., Takahashi, M., Hanafusa, M., Kawahara, T., Yanagida, Y., Kuramochi, J., & Fujiwara, T. (2023). Applying negative ions and an electric field to countermeasure droplets/aerosol transmission without hindering communication. *Sci Rep*, 13(1), 13965.

<https://doi.org/10.1038/s41598-023-40303-5>

Klar, A. S., Michalak-Micka, K., Biedermann, T., Simmen-Meuli, C., Reichmann, E., & Meuli, M. (2018). Characterization of M1 and M2 polarization of macrophages in vascularized human dermo-epidermal skin substitutes in vivo. *Pediatr Surg Int*, 34(2), 129-135. <https://doi.org/10.1007/s00383-017-4179-z>

Kloc, M., Ghobrial, R. M., Wosik, J., Lewicka, A., Lewicki, S., & Kubiak, J. Z. (2019). Macrophage functions in wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*, 13(1), 99-109. <https://doi.org/10.1002/term.2772>

Knackstedt, R., Knackstedt, T., & Gatherwright, J. (2020). The role of topical probiotics on wound healing: A review of animal and human studies. *Int Wound J*, 17(6), 1687-1694. <https://doi.org/10.1111/iwj.13451>

Kotwal, G. J., & Chien, S. (2017). Macrophage Differentiation in Normal and Accelerated Wound Healing. *Results Probl Cell Differ*, 62, 353-364. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_14

Krishnaswamy, V. R., Mintz, D., & Sagi, I. (2017). Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864(11 Pt B), 2220-2227. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.08.003>

Krzyszczczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., & Berthiaume, F. (2018). The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front Physiol*, 9, 419. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>

Kuninaka, Y., Ishida, Y., Ishigami, A., Nosaka, M., Matsuki, J., Yasuda, H., Kofuna, A., Kimura, A., Furukawa, F., & Kondo, T. (2022). Macrophage polarity and wound age determination. *Sci Rep*, 12(1), 20327. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24577-9>

Landen, N. X., Li, D., & Stahle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci*, 73(20), 3861-3885. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>

Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S., & Lehnert, H.

(2002). Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*, 45(7), 1011-1016.

<https://doi.org/10.1007/s00125-002-0868-8>

Llood, C., Blanco, L. P., Purmalek, M. M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S. S., Smith, C. K., Malech, H. L., Ledbetter, J. A., Elkon, K. B., & Kaplan, M. J. (2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med*, 22(2), 146-153.

<https://doi.org/10.1038/nm.4027>

Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22(4), 189-195.

<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>

Luanraksa, S., Jindatanmanusan, P., Boonsiri, T., Nimmanon, T., Chaovanalikit, T., & Arnutti, P. (2018). An MMP/TIMP ratio scoring system as a potential predictive marker of diabetic foot ulcer healing. *J Wound Care*, 27(12), 849-855.

<https://doi.org/10.12968/jowc.2018.27.12.849>

Ma, L., Tu, H., & Chen, T. (2023). Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. *Nutrients*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/nu15020291>

Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1(2), 135-145. <https://doi.org/10.1038/35100529>

Mirastschijski, U., Lupse, B., Maedler, K., Sarma, B., Radtke, A., Belge, G., Dorsch, M., Wedekind, D., McCawley, L. J., Boehm, G., Zier, U., Yamamoto, K., Kelm, S., & Agren, M. S. (2019). Matrix Metalloproteinase-3 is Key Effector of TNF-alpha-Induced Collagen Degradation in Skin. *Int J Mol Sci*, 20(20).

<https://doi.org/10.3390/ijms20205234>

Mirza, R. E., Fang, M. M., Ennis, W. J., & Koh, T. J. (2013). Blocking interleukin-1beta induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes*, 62(7), 2579-2587. <https://doi.org/10.2337/db12-1450>

Mooney, D. P., O'Reilly, M., & Gamelli, R. L. (1990). Tumor necrosis factor and wound healing. *Ann Surg*, 211(2), 124-129. <https://doi.org/10.1097/00000658-199002000-00002>

Narauskaite, D., Vydmantaitė, G., Rusteikaite, J., Sampath, R., Rudaityte, A., Stasyte, G., Aparicio Calvente, M. I., & Jekabsone, A. (2021). Extracellular Vesicles in Skin Wound Healing. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/ph14080811>

Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V., & Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb Cell Fact*, 19(1),

168. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>

Ong, J. S., Taylor, T. D., Yong, C. C., Khoo, B. Y., Sasidharan, S., Choi, S. B., Ohno, H., & Liong, M. T. (2020). Lactobacillus plantarum USM8613 Aids in Wound Healing and Suppresses Staphylococcus aureus Infection at Wound Sites. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 12(1), 125-137. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9505-9>

Peral, M. C., Rachid, M. M., Gobbato, N. M., Huaman Martinez, M. A., & Valdez, J. C. (2010). Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with Lactobacillus plantarum. *Clin Microbiol Infect*, 16(3), 281-286. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02793.x>

Pietrzak, J., Wosiak, A., Szmajda-Krygier, D., Swiechowski, R., Lochowski, M., Pazik, M., & Balcerczak, E. (2023). Correlation of TIMP1-MMP2/MMP9 Gene Expression Axis Changes with Treatment Efficacy and Survival of NSCLC Patients. *Biomedicines*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071777>

Qin, X., He, J., Wang, X., Wang, J., Yang, R., & Chen, X. (2023). The functions and clinical application potential of exosomes derived from mesenchymal stem cells on wound repair: a review of recent research advances. *Front Immunol*, 14, 1256687. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1256687>

Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*, 49(1), 35-43. <https://doi.org/10.1159/000339613>

Reiss, M. J., Han, Y. P., Garcia, E., Goldberg, M., Yu, H., & Garner, W. L. (2010). Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model. *Surgery*, 147(2), 295-302. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.10.016>

Russell, D. G., Huang, L., & VanderVen, B. C. (2019). Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens. *Nat Rev Immunol*, 19(5), 291-304. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0124-9>

Schilrreff, P., & Alexiev, U. (2022). Chronic Inflammation in Non-Healing Skin Wounds and Promising Natural Bioactive Compounds Treatment. *Int J Mol Sci*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/ijms23094928>

Sindrilaru, A., & Scharffetter-Kochanek, K. (2013). Disclosure of the Culprits: Macrophages-Versatile Regulators of Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2(7), 357-368. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0407>

Spanheimer, R. G., Umpierrez, G. E., & Stumpf, V. (1988). Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes*, 37(4), 371-376. <https://doi.org/10.2337/diab.37.4.371>

Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M.,

Boeing, H., & Pfeiffer, A. F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, 52(3), 812-817. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.812>

Szondy, Z., & Pallai, A. (2017). Transmembrane TNF-alpha reverse signaling leading to TGF-beta production is selectively activated by TNF targeting molecules: Therapeutic implications. *Pharmacol Res*, 115, 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.025>

Tracy, L. E., Minasian, R. A., & Caterson, E. J. (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 5(3), 119-136. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0561>

Verma, P. K., Bala, M., Kumar, N., & Singh, B. (2012). Therapeutic potential of natural products from terrestrial plants as TNF-alpha antagonist. *Curr Top Med Chem*, 12(13), 1422-1435. <https://doi.org/10.2174/156802612801784425>

Volpe, C. M. O., Villar-Delfino, P. H., Dos Anjos, P. M. F., & Nogueira-Machado, J. A. (2018). Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death Dis*, 9(2), 119. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>

Wang, P., Wang, S., Wang, D., Li, Y., Yip, R. C. S., & Chen, H. (2024). Postbiotics-peptidoglycan, lipoteichoic acid, exopolysaccharides, surface layer protein and pili proteins-Structure, activity in wounds and their delivery systems. *Int J Biol Macromol*, 274(Pt 1), 133195. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133195>

Weinelt, N., Karathanasis, C., Smith, S., Medler, J., Malkusch, S., Fulda, S., Wajant, H., Heilemann, M., & van Wijk, S. J. L. (2021). Quantitative single-molecule imaging of TNFR1 reveals zafirlukast as antagonist of TNFR1 clustering and TNFalpha-induced NF-kB signaling. *J Leukoc Biol*, 109(2), 363-371. <https://doi.org/10.1002/JLB.2AB0420-572RR>

Wing, R. R., Marcus, M. D., Epstein, L. H., & Salata, R. (1987). Type II diabetic subjects lose less weight than their overweight nondiabetic spouses. *Diabetes Care*, 10(5), 563-566. <https://doi.org/10.2337/diacare.10.5.563>

Xiao, S., Wei, T., Petersen, J. D., Zhou, J., & Lu, X. (2023). Biological effects of negative air ions on human health and integrated multiomics to identify biomarkers: a literature review. *Environ Sci Pollut Res Int*, 30(27), 69824-69836. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27133-8>

Xu, G. M., Shi, X. M., Cai, J. F., Chen, S. L., Li, P., Yao, C. W., Chang, Z. S., & Zhang, G. J. (2015). Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound

healing of mice. *Wound Repair Regen*, 23(6), 878-884.

<https://doi.org/10.1111/wrr.12364>

Xu, J., Wu, W., Zhang, L., Dorset-Martin, W., Morris, M. W., Mitchell, M. E., & Liechty, K. W. (2012). The role of microRNA-146a in the pathogenesis of the diabetic wound-healing impairment: correction with mesenchymal stem cell treatment. *Diabetes*, 61(11), 2906-2912. <https://doi.org/10.2337/db12-0145>

Yao, Y., Xu, X. H., & Jin, L. (2019). Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol*, 10, 792.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>

Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*, 877, 173090.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>

Zhang, Y., & Zhou, H. (2022). Hyper-reactive platelets and type 2 diabetes. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 47(3), 374-383. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2022.210271> (高敏性血小板与 2 型糖尿病.)

Zolkiewicz, <https://doi.org/10.3390/nu12082189> J., Marzec, A., Ruszczynski, M., & Feleszko, W. (2020). Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients*, 12(8).

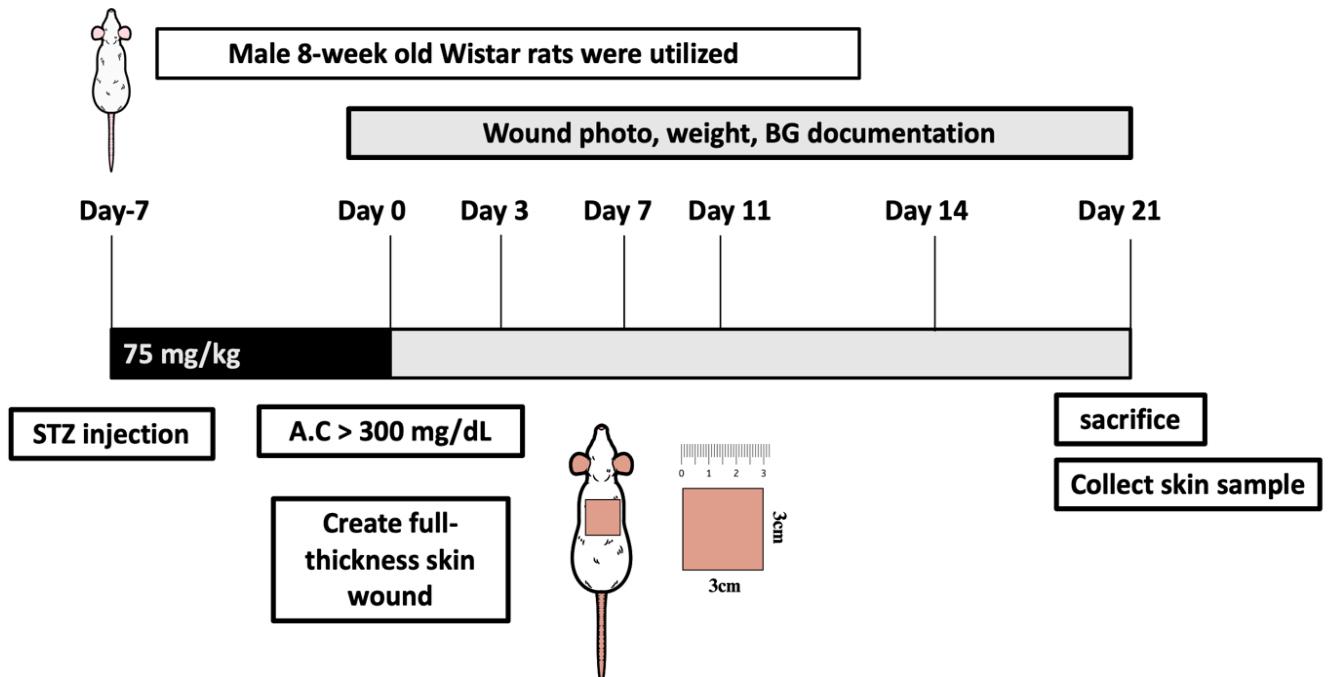


圖 1 糖尿病大鼠與背部全皮層傷口建立模式與實驗設計

八週大大鼠在實驗前一週先以 $\text{STZ } \text{mgkg}^{-1}$ 腹腔注射誘發糖尿病，空腹血糖值高於 300mgdL^{-1} 者定義為糖尿病大鼠。在背部製造 $3 \times 3\text{cm}^2$ 正方形傷口，製造日為 Day0，在 Day0, 3, 7, 11, 14 與 21 天時照片紀錄傷口面積，同時測量體重與血糖，在 Day21 日時犧牲取其皮膚檢體做後續分析。

Animal Model

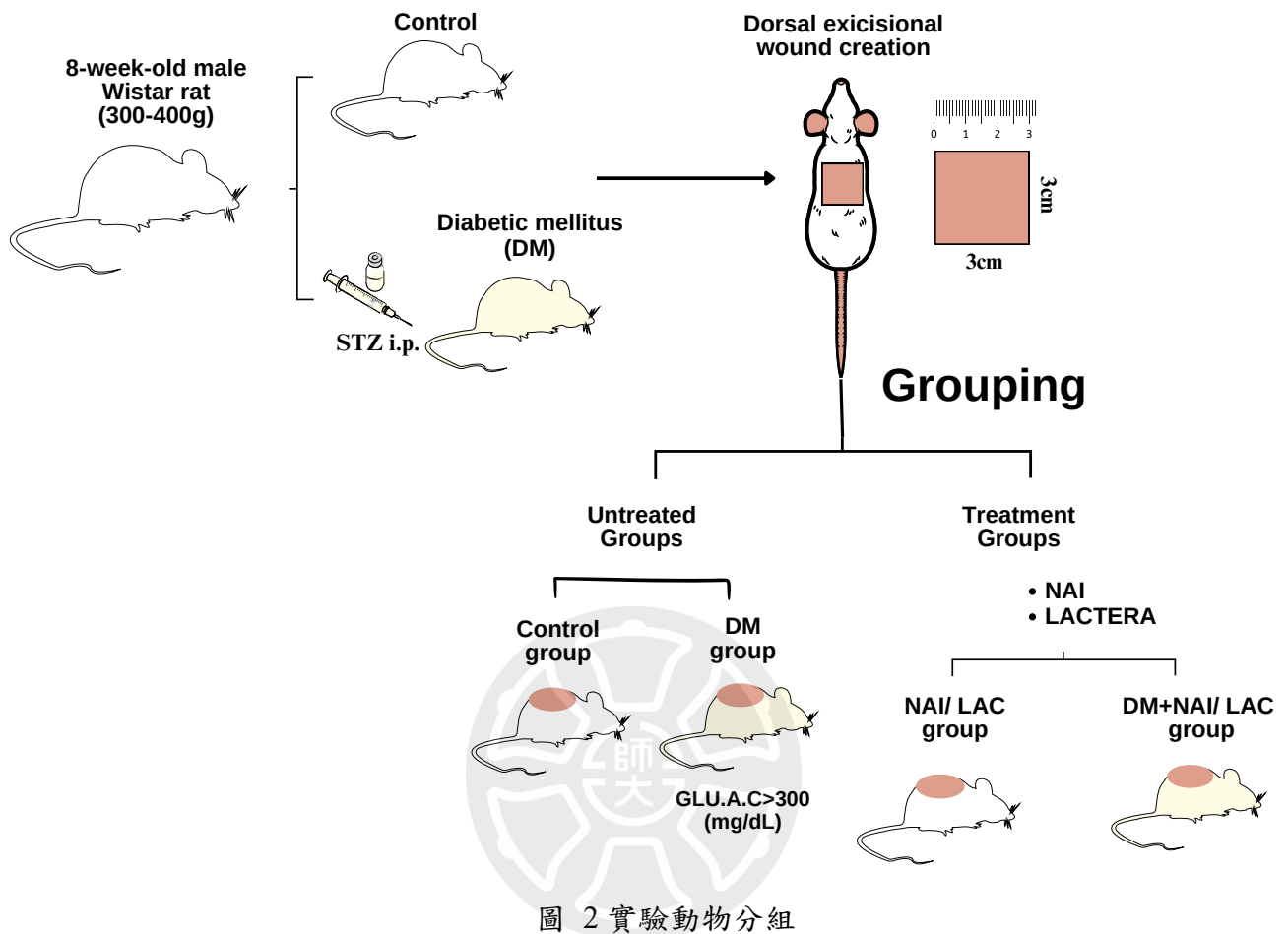


圖 2 實驗動物分組

動物分組，負離子治療實驗分作對照傷口組、糖尿病傷口組、傷口負離子治療組、糖尿病傷口負離子治療組；LACTERA 治療實驗分作：對照傷口組、糖尿病傷口組、傷口 LACTERA 治療組、糖尿病傷口 LACTERA 治療組。

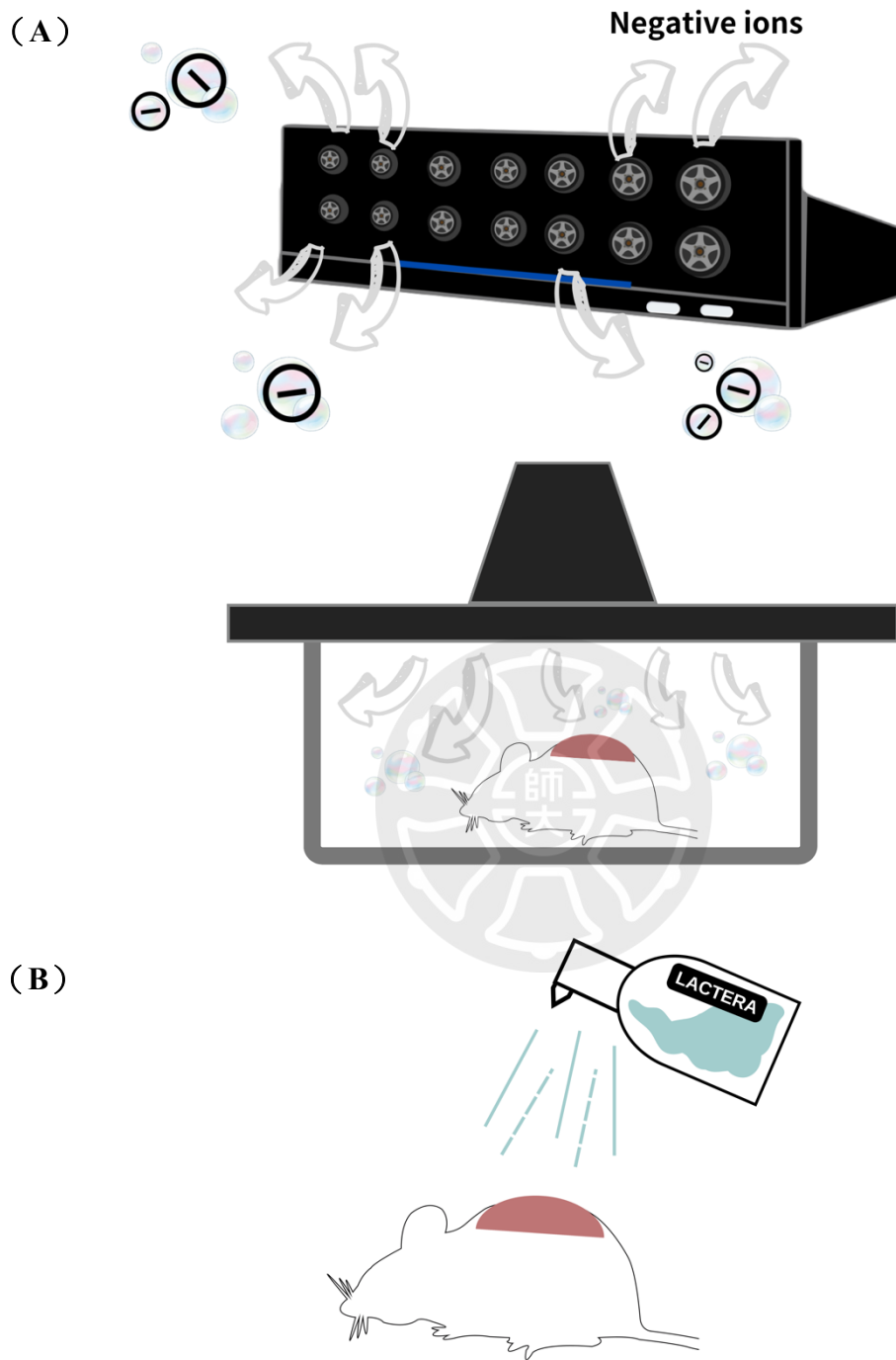


圖 3 背部全皮層傷口治療模式圖

(A) 負離子治療傷口模式圖。將負離子機器出風口朝向標準實驗飼養籠上，每日吹送負離子至實驗籠中一小時作為治療。(B) LACTERA 治療傷口模式圖。每日對傷口按壓兩次固定體積為 2.4mL LACTERTA 液體兩次。

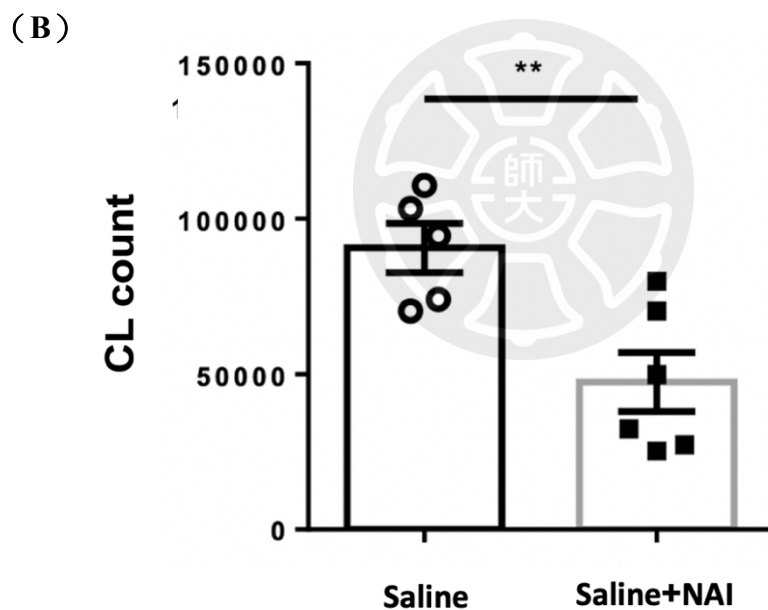
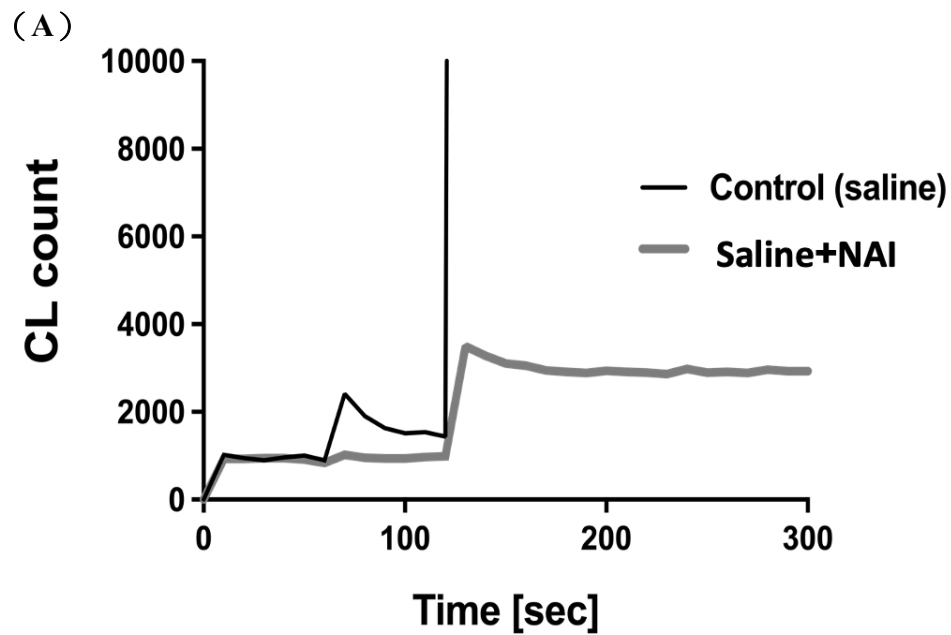


圖 4 負離子自由基測定

(A) 原始數據圖：自由基測定一般食鹽水 (Saline) 與每日經過負離子吹送之食鹽水 (Saline+NAI) 自由基測定原始數據圖。(B) 自由基測定統計分析圖：兩組自由基含量以 T-test 統計後的分析圖， $**$, $p < 0.001$ ，Saline+NAI 組與 Saline 組比較。(n=5)

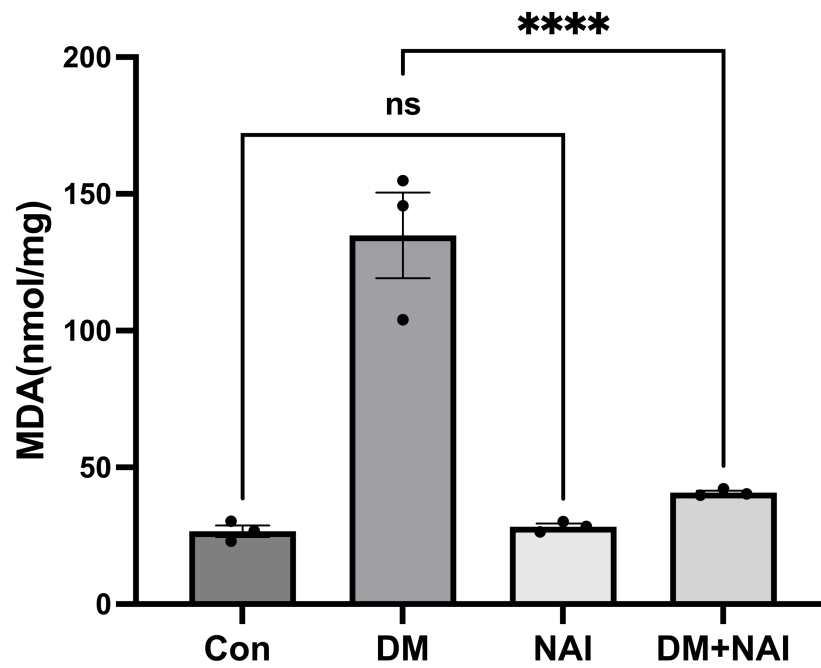


圖 5 負離子治療脂質過氧化檢測

給予負離子治療後取 21 天時皮膚進行 MDA 脂質過氧化檢測統計圖，**ns**，(NAI 組與 Con 組相比)；****, $p < 0.001$ (DM+NAI 組與 DM 組比較)。(n=3)

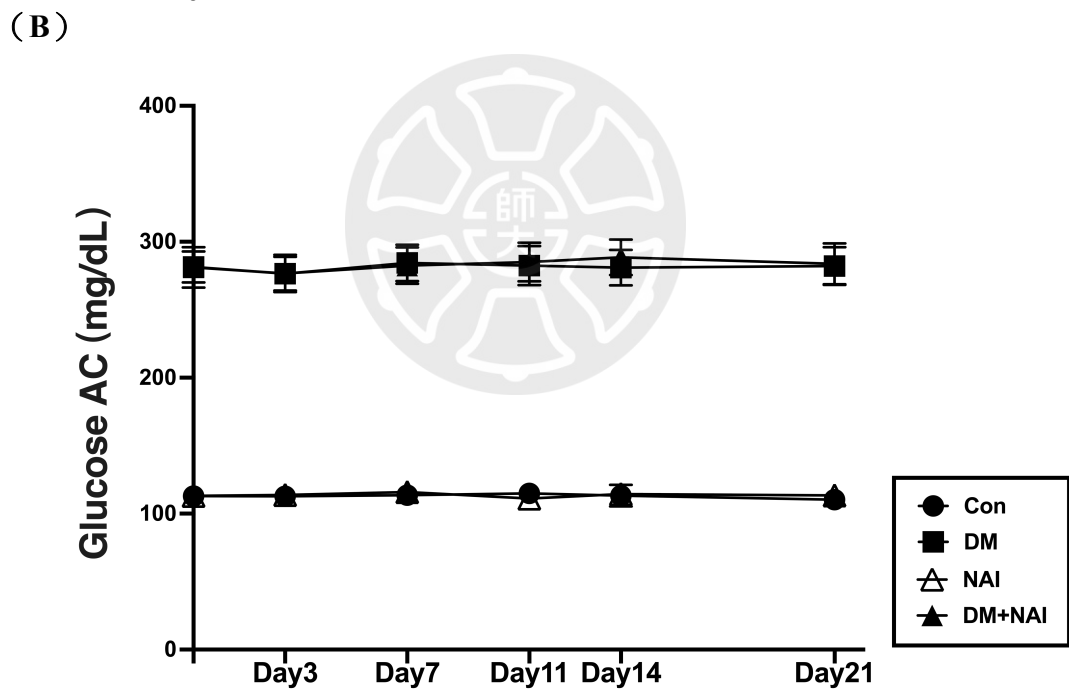
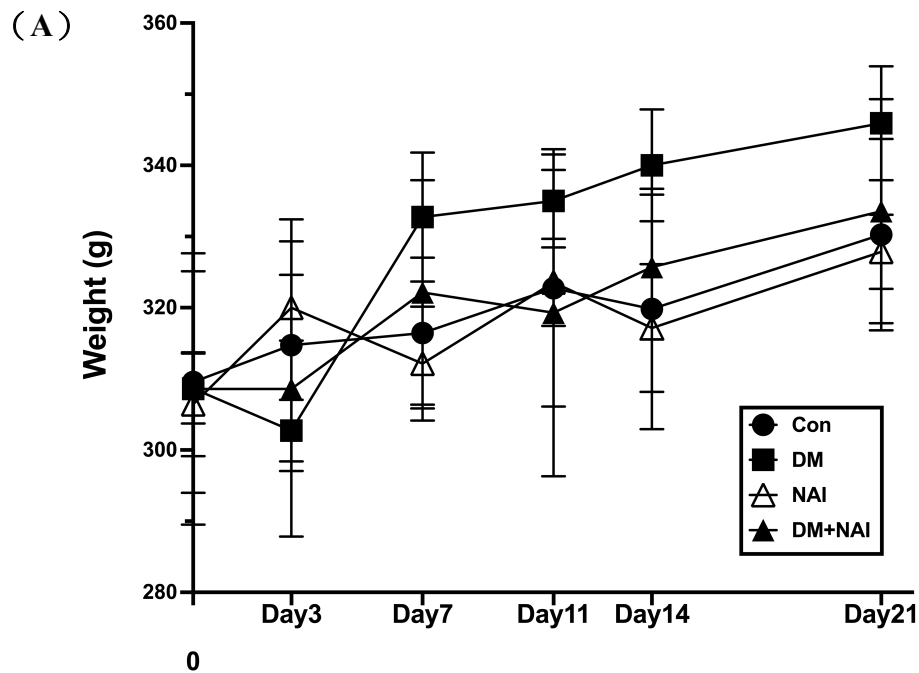
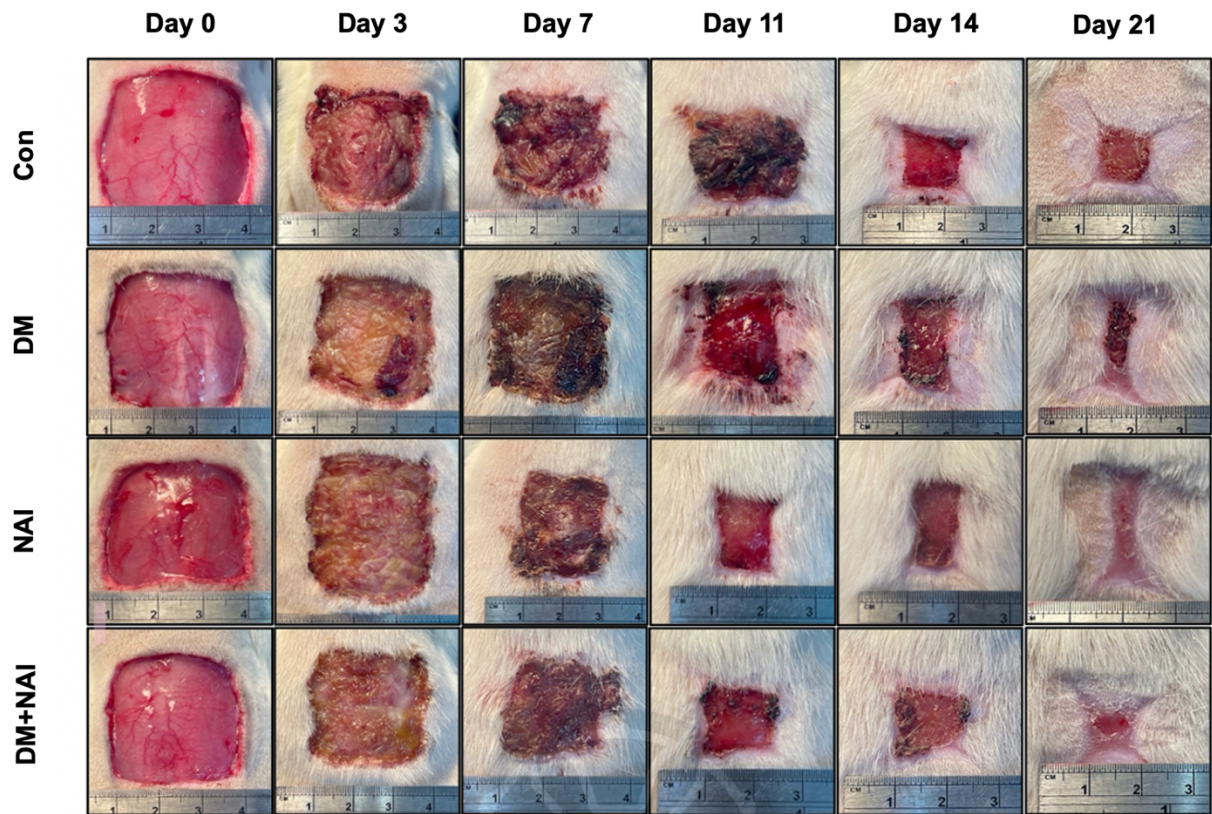


圖 6 負離子治療組平均體重與平均血糖圖

(A) 四組在傷口第 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天平均體重測量值。(n=6) (B) 四組在傷口第 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天空腹血糖測定。(n=6)

(A)



(B)

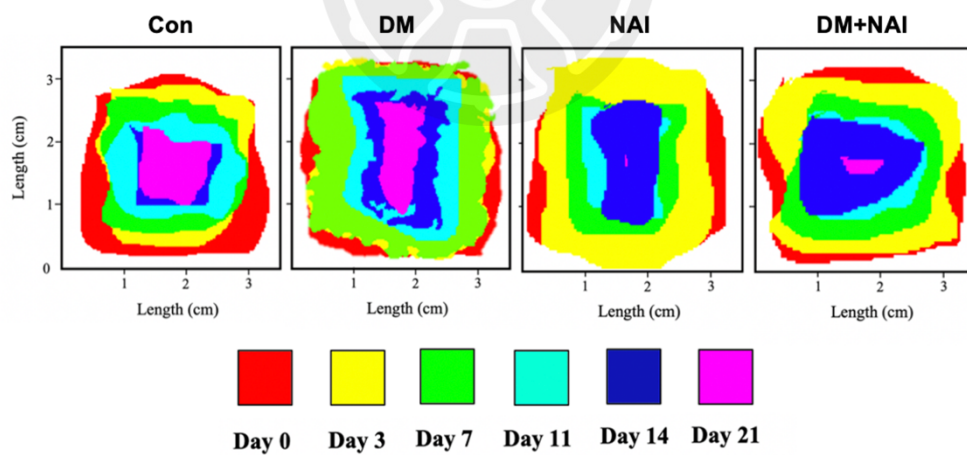


圖 7 負離子治療傷口紀錄圖

(A) 四組在傷口第 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天照片紀錄。(B) 四組在傷口 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天疊加圖表顯示四組在不同天數的創面面積變化，使用不同顏色表示不同天數時傷口範圍大小。

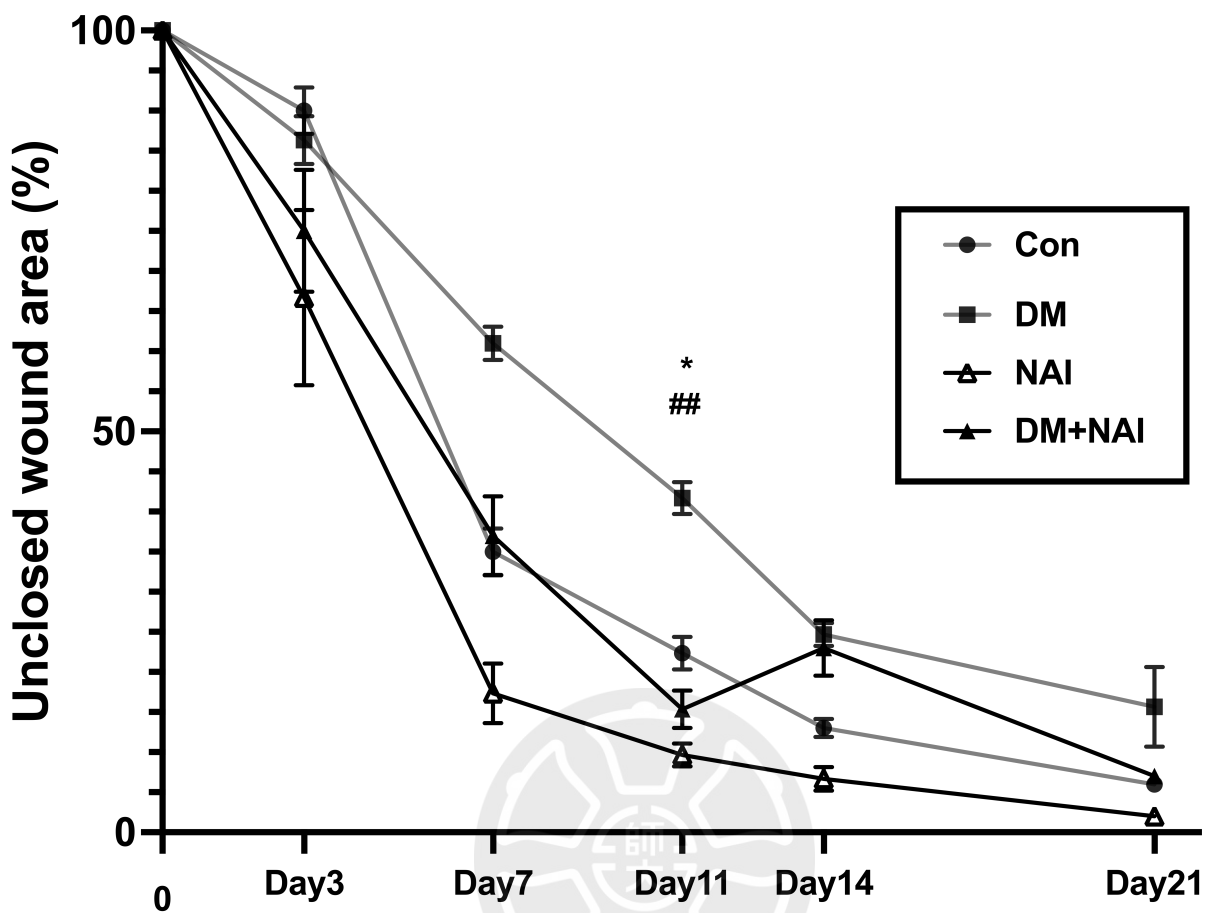
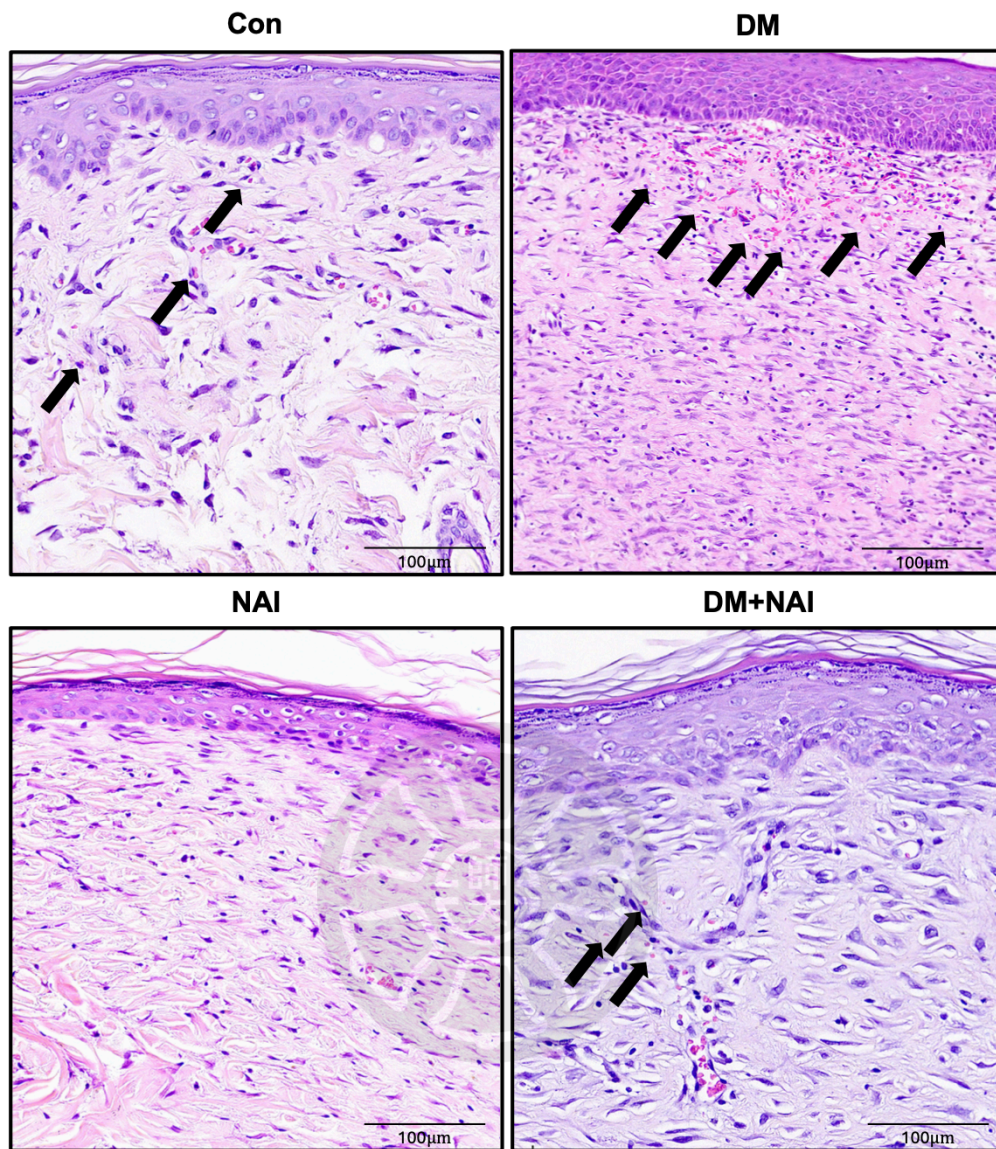


圖 8 負離子治療傷口平均未癒合創面百分比

四組未癒合傷口從第 0 天開始 (100%)，在第 3, 7, 11, 14 與 21 天時剩餘未癒合傷口百分比統計圖，*, $p < 0.05$ (NAI 組與 Con 組比較)；##, $p < 0.01$ (DM+NAI 組與 DM 組相比)。(n=6)

(A)



(B)

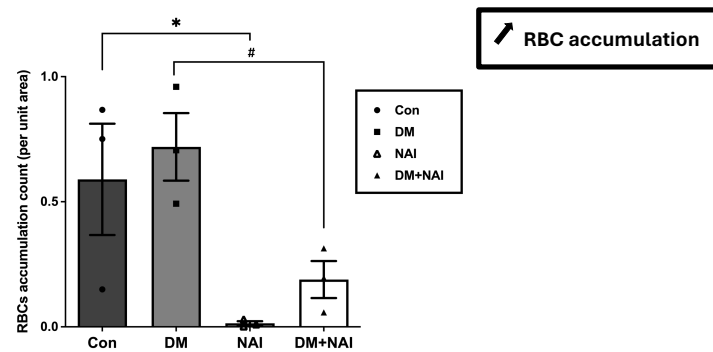
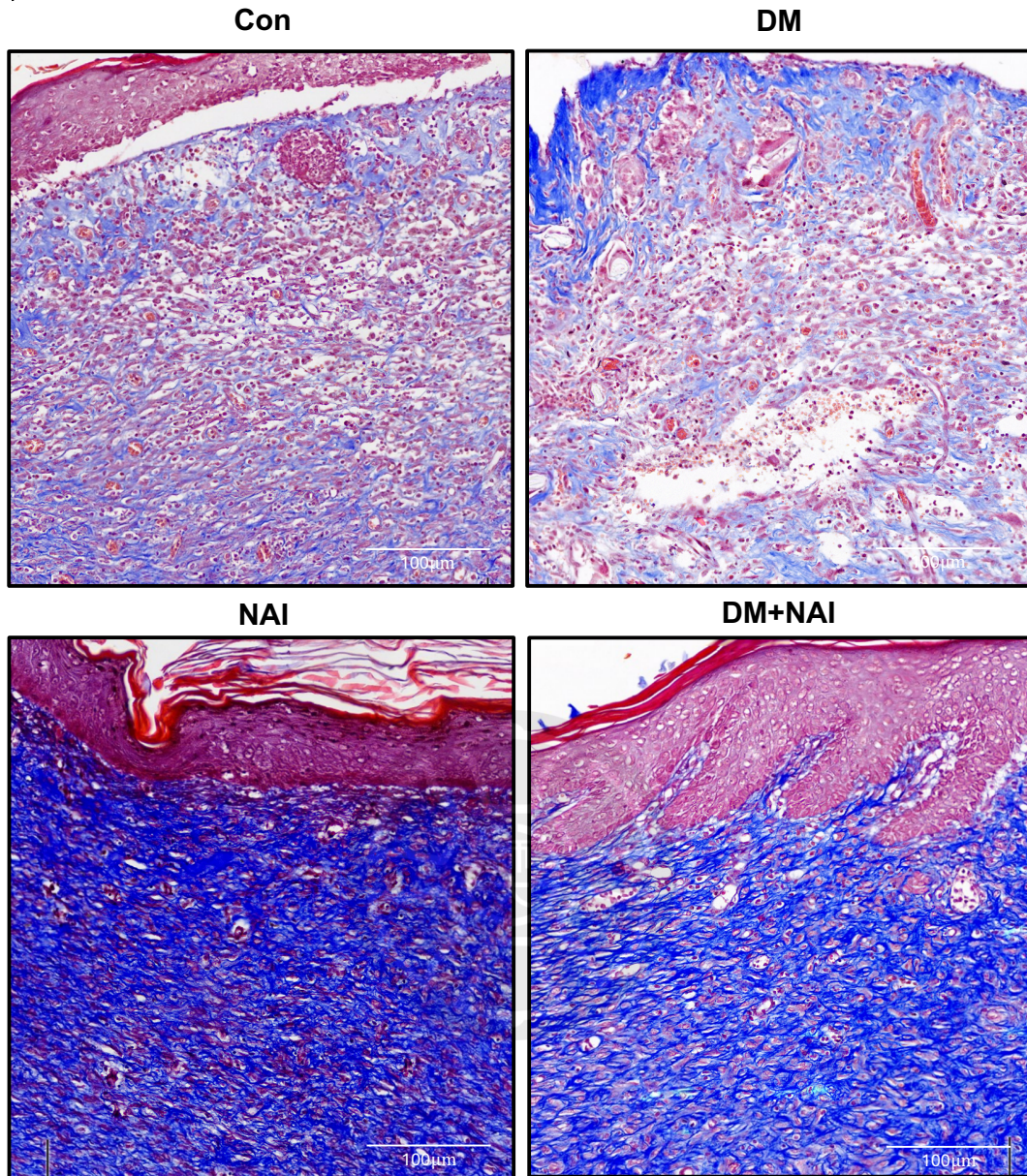


圖 9 負離子治療傷口皮膚蘇木精伊紅染色切片圖

取四組傷口第 21 天時皮膚組織，(A) 以蘇木精伊紅染色，黑色箭頭所指為組織間累積之紅血球。(B) 單因子變異數分析比較四組之間單位皮膚面積血管外累積紅血球的數量。*, $p < 0.05$ (NAI 組與 Con 組比較)；#, $p < 0.05$ (DM+NAI 組與 DM 組比較)。(n=3)

(A)



(B)

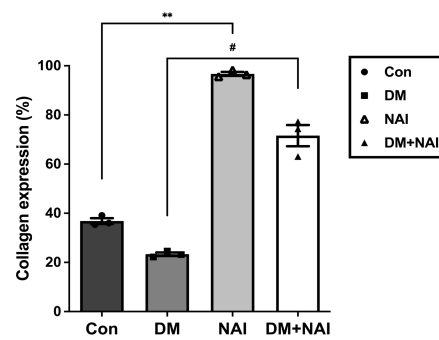
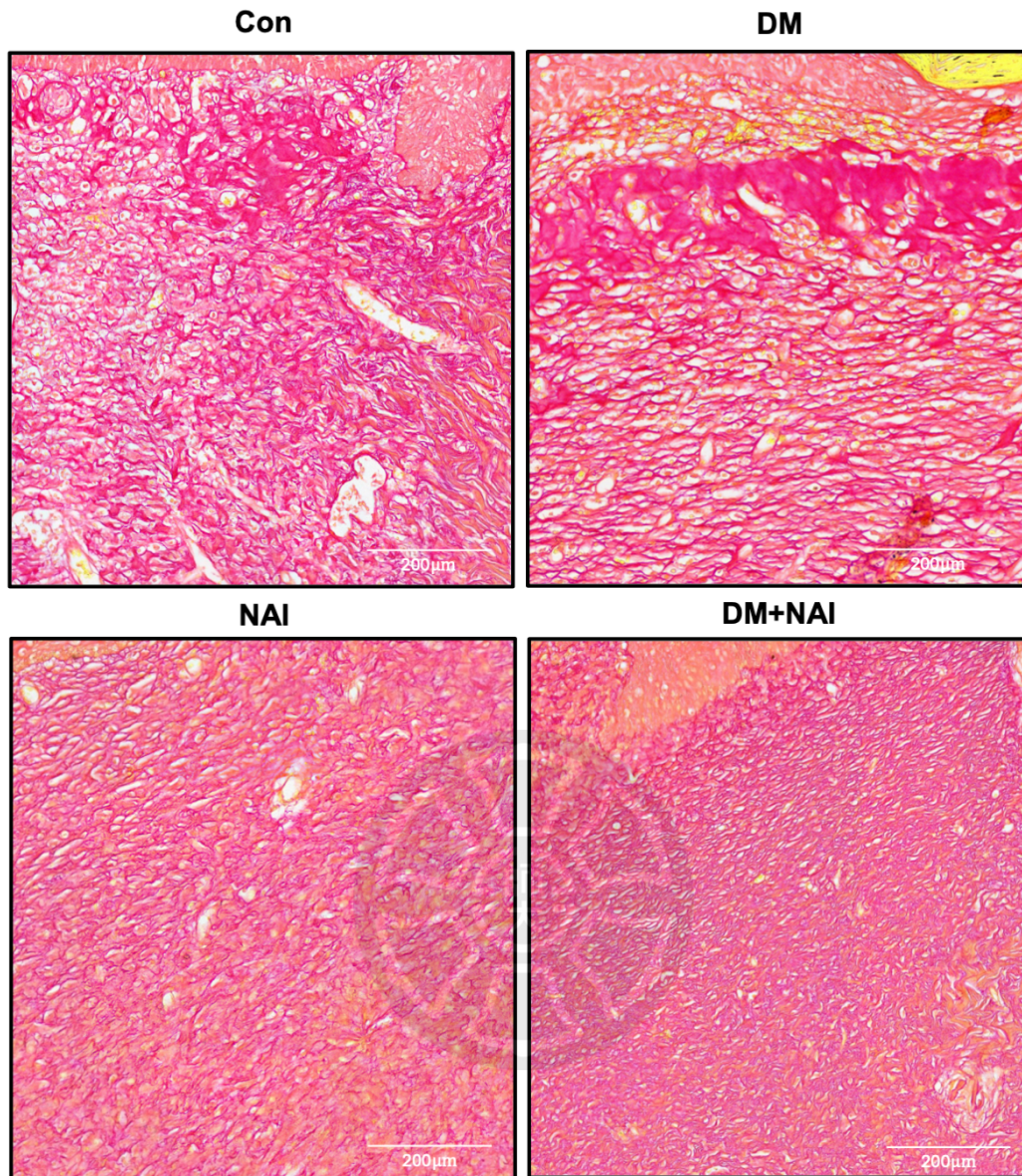


圖 10 負離子治療傷口皮膚組織馬森三色圖

取四組傷口第 21 天時皮膚組織，(A) 以馬森三色染色，藍色處為膠原蛋白。(B) 單因子變異數分析比較四組之間皮膚膠原蛋白表現量百分比。**, $p < 0.01$ (NAI 組與 Con 組比較)；#, $p < 0.05$ (DM+NAI 組與 DM 組比較)。(n=3)

(A)



(B)

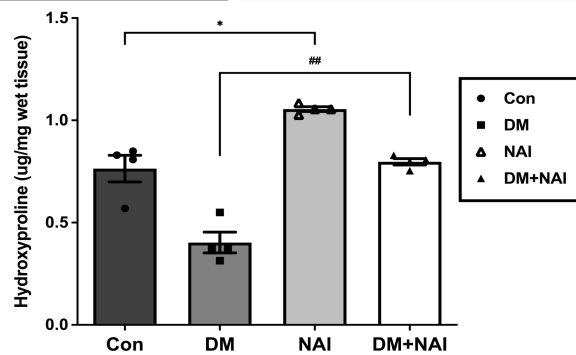


圖 11 負離子治療傷口皮膚組織天狼星紅染色

取四組傷口第 21 天時皮膚組織，(A) 以天狼星紅染色，紅色處為膠原蛋白纖維。負離子治療傷口皮膚羥脯氨酸含量。(B) 組織測定羥脯氨酸含量，用單因子變異數分析比較四組之間皮膚羥脯氨酸含量，*， $p < 0.05$ (NAI 組與 Con 組比較)；##， $p < 0.01$ (DM+NAI 組與 DM 組比較)。(n=4)

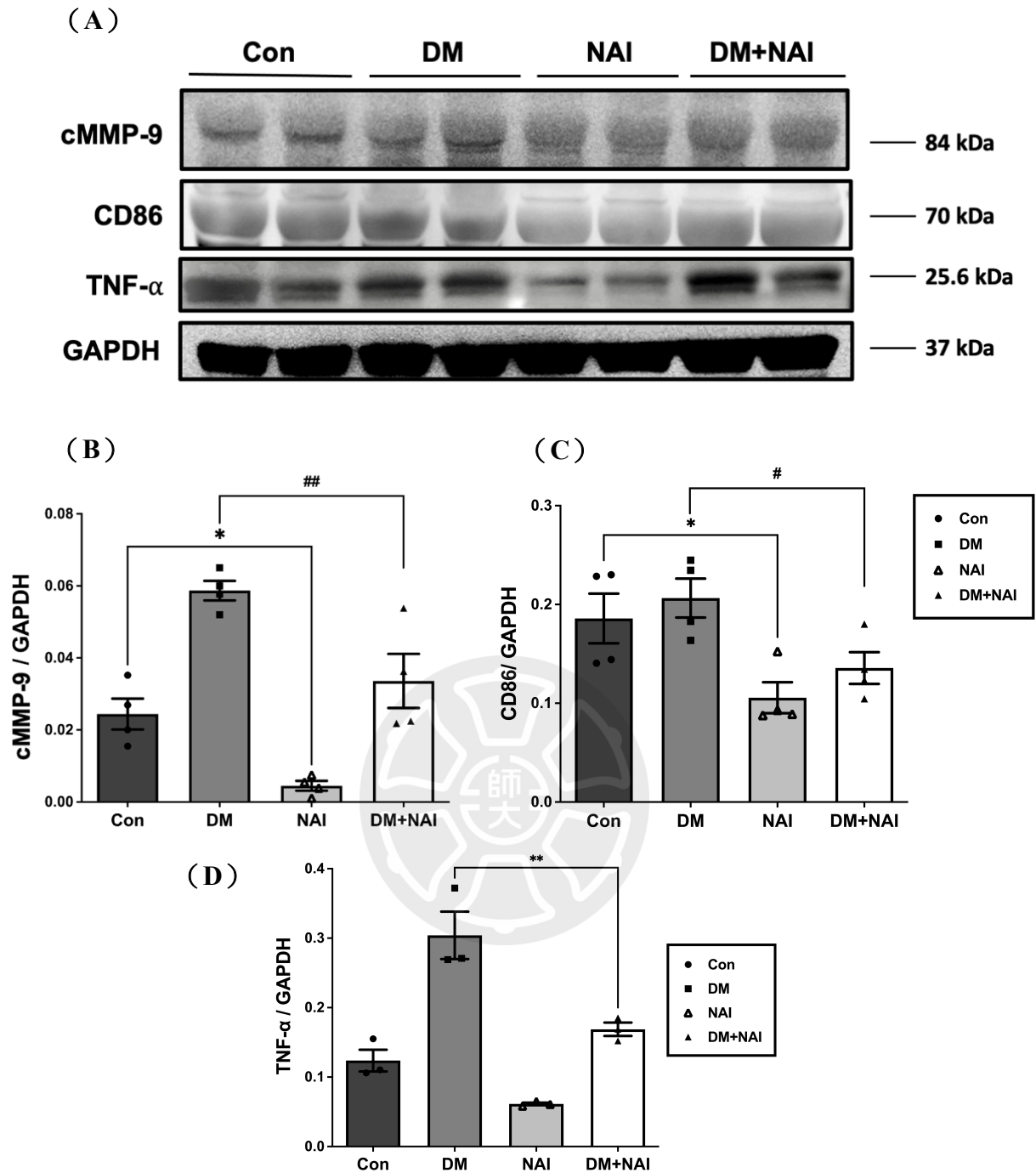


圖 12 負離子治療傷口皮膚西方墨點法

(A) 取第 21 天四個組別皮膚組織以西方墨點法測定 cMMP-9 (MMP-9 的切割成熟態)、CD86 和 TNF- α 三種蛋白在皮膚的表達量。(B) cMMP-9 表現量上, *, $p < 0.01$ (NAI 組與 Con 組比較) (n=4); ##, $p < 0.01$ (DM+NAI 組與 DM 組比較)。(C) CD86 表現量上, *, $p < 0.01$ (NAI 組與 Con 組比較) (n=4); #, $p < 0.05$ (DM+NAI 組與 DM 組比較)。(D) TNF- α 表現量上, *, $p < 0.01$ (NAI 組與 Con 組比較); ##, $p < 0.01$ (DM+NAI 組與 DM 組比較) (n=3)。

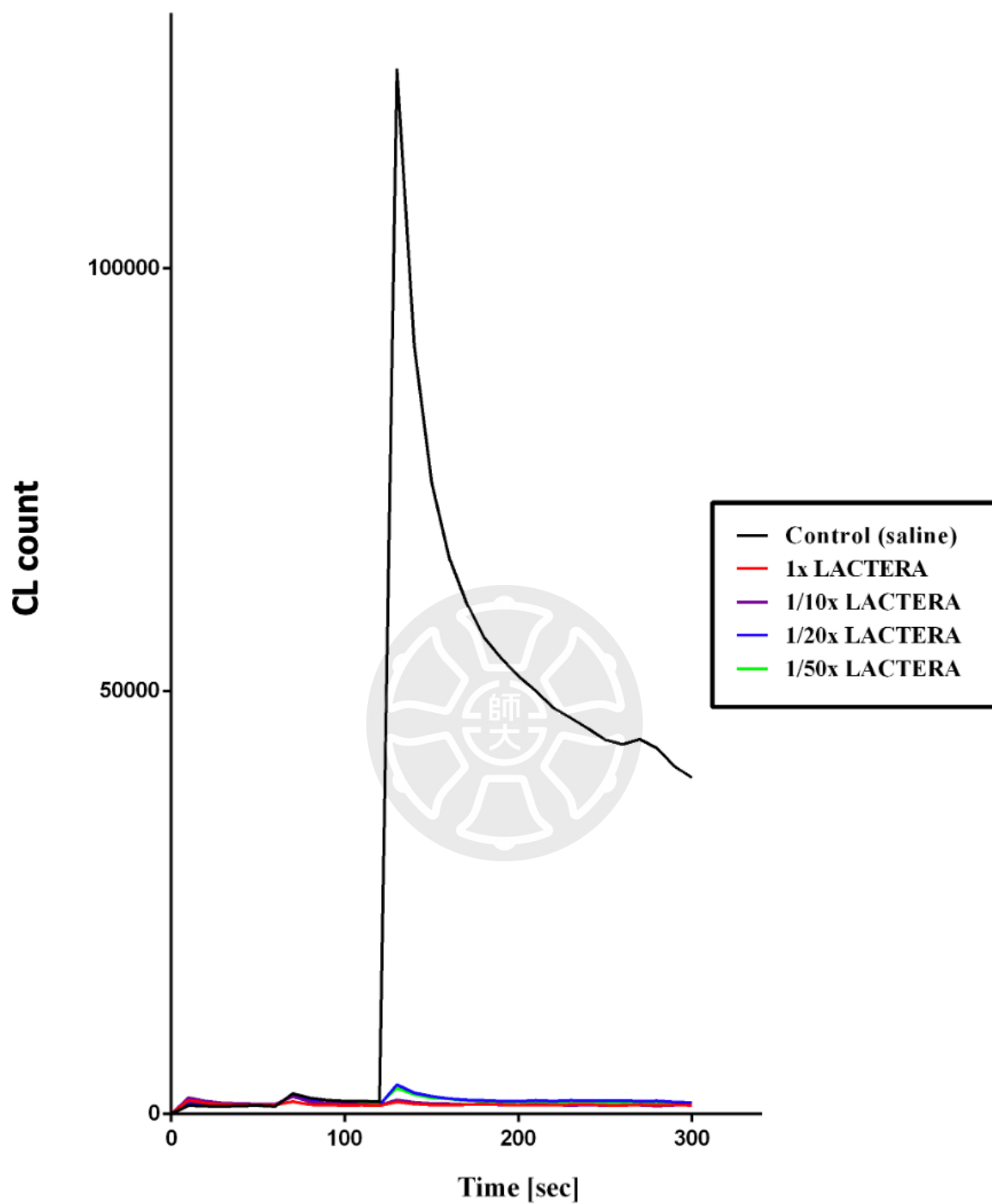


圖 13 LACTERA 自由基測定原始圖

一般食鹽水 (Saline)、一倍 LACTERA 原液與稀釋為不同濃度梯度 LACTERA 自由基在 300 秒內測定原始數據圖。

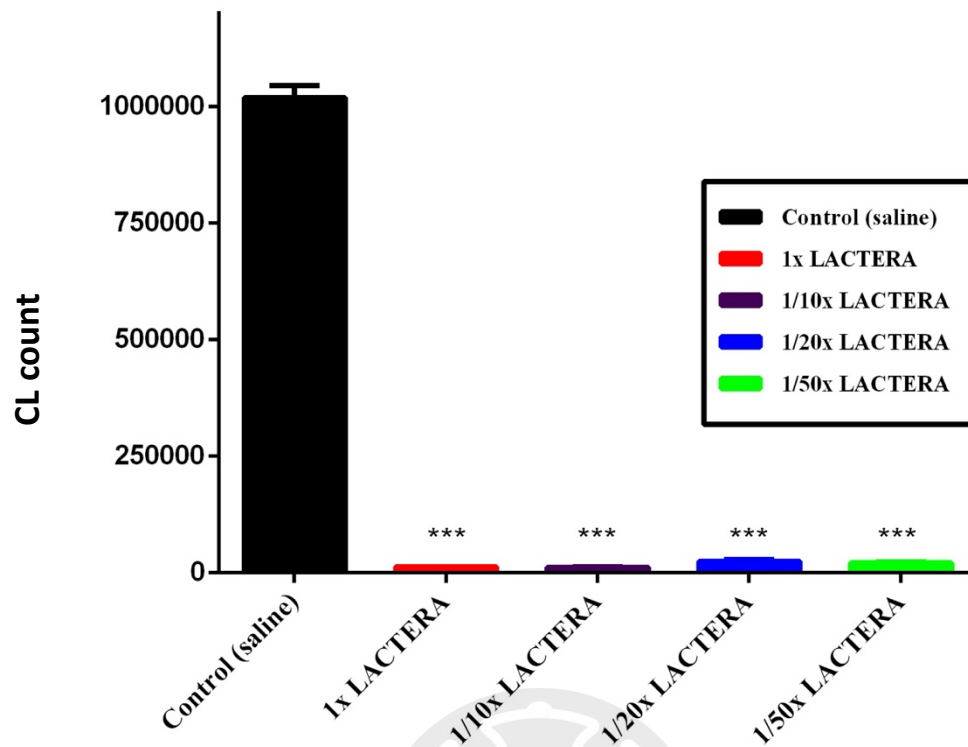


圖 14 LACTERA 自由基測定統計圖

一般食鹽水 (Saline)、一倍 LACTERA 原液與稀釋為不同濃度梯度 LACTERA 單因子變異數分析(One-way ANOVA)比較,***, $p < 0.001$ (1, 10^{-1} , 20^{-1} , 50^{-1} x LACTERA 與 Con 比較)。(n=5)

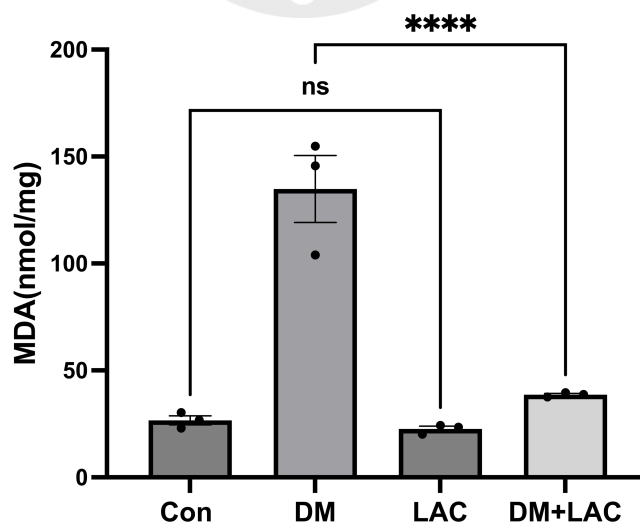
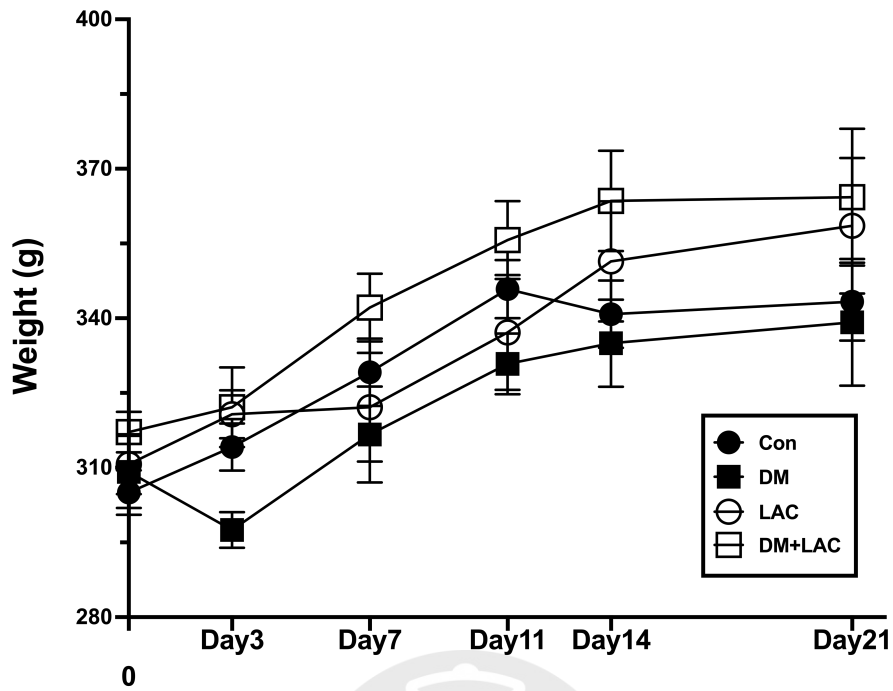


圖 15 LACTERA 治療脂質過氧化檢測

給予 LACTERA 治療後，取 21 天時皮膚進行 MDA 脂質過氧化檢測統計圖，ns, (LAC 組與 Con 組相比)；****, $p < 0.001$ (DM+LAC 組與 DM 組比較)。(n=3)

(A)



(B)

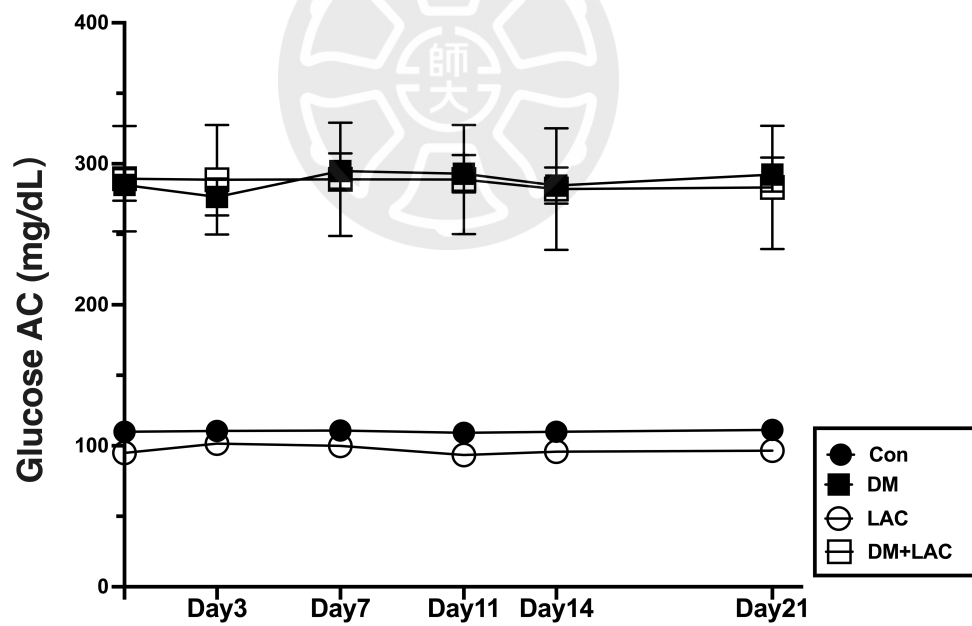
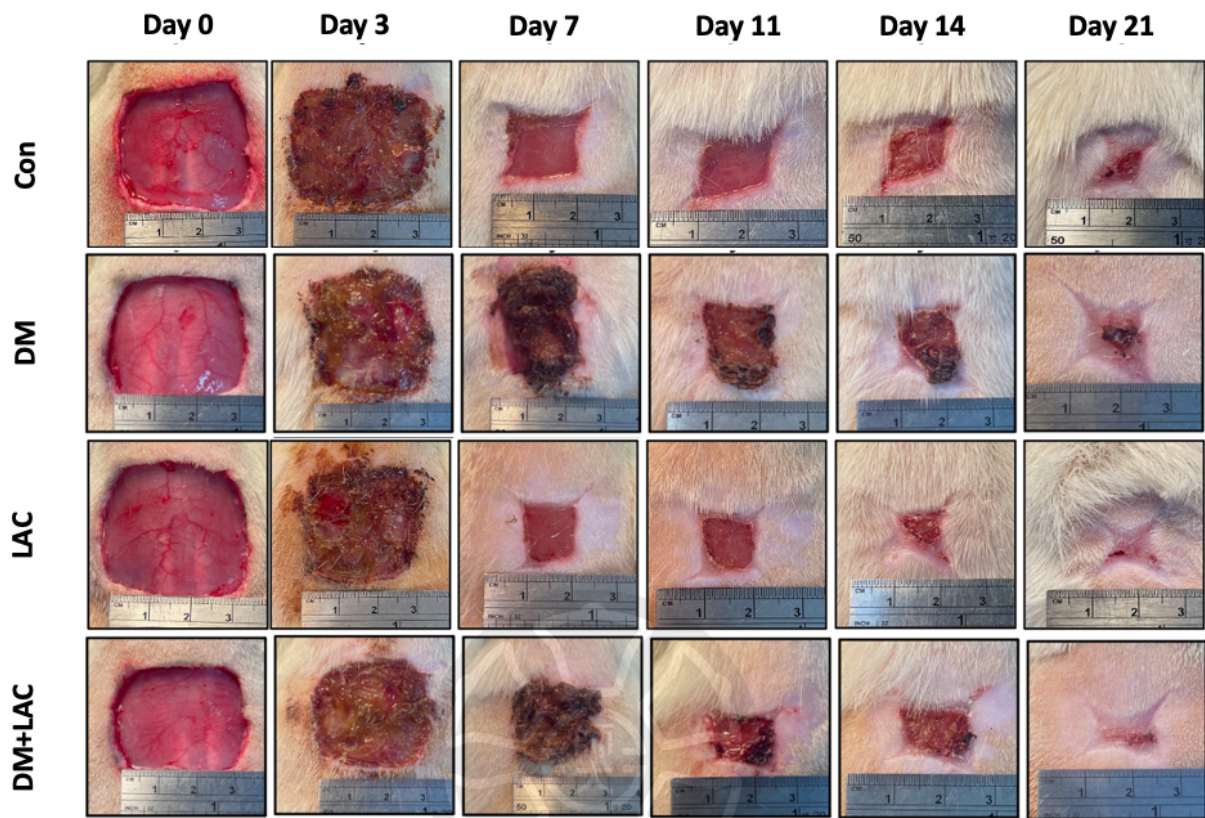


圖 16 LACTERA 治療組體重與血糖圖

(A) 四組在傷口第 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天平均體重測量值。(B) 四組在傷口第 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天空腹血糖測定。(n=6)

(A)



(B)

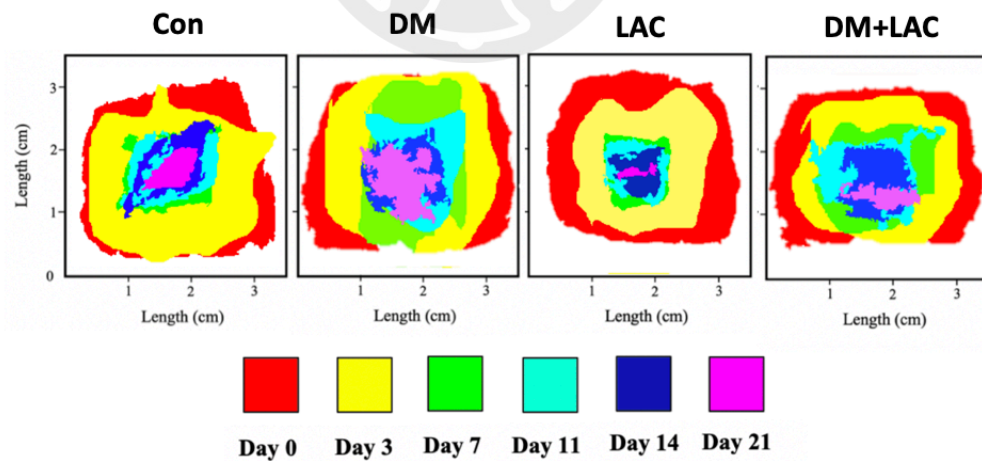


圖 17 LACTERA 治療傷口紀錄圖

(A) 四組在傷口第 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天照片紀錄。(B) 四組在傷口 0, 3, 7, 11, 14 與 21 天疊加圖表顯示四組在不同天數的創面面積變化，使用不同顏色表示不同天數。

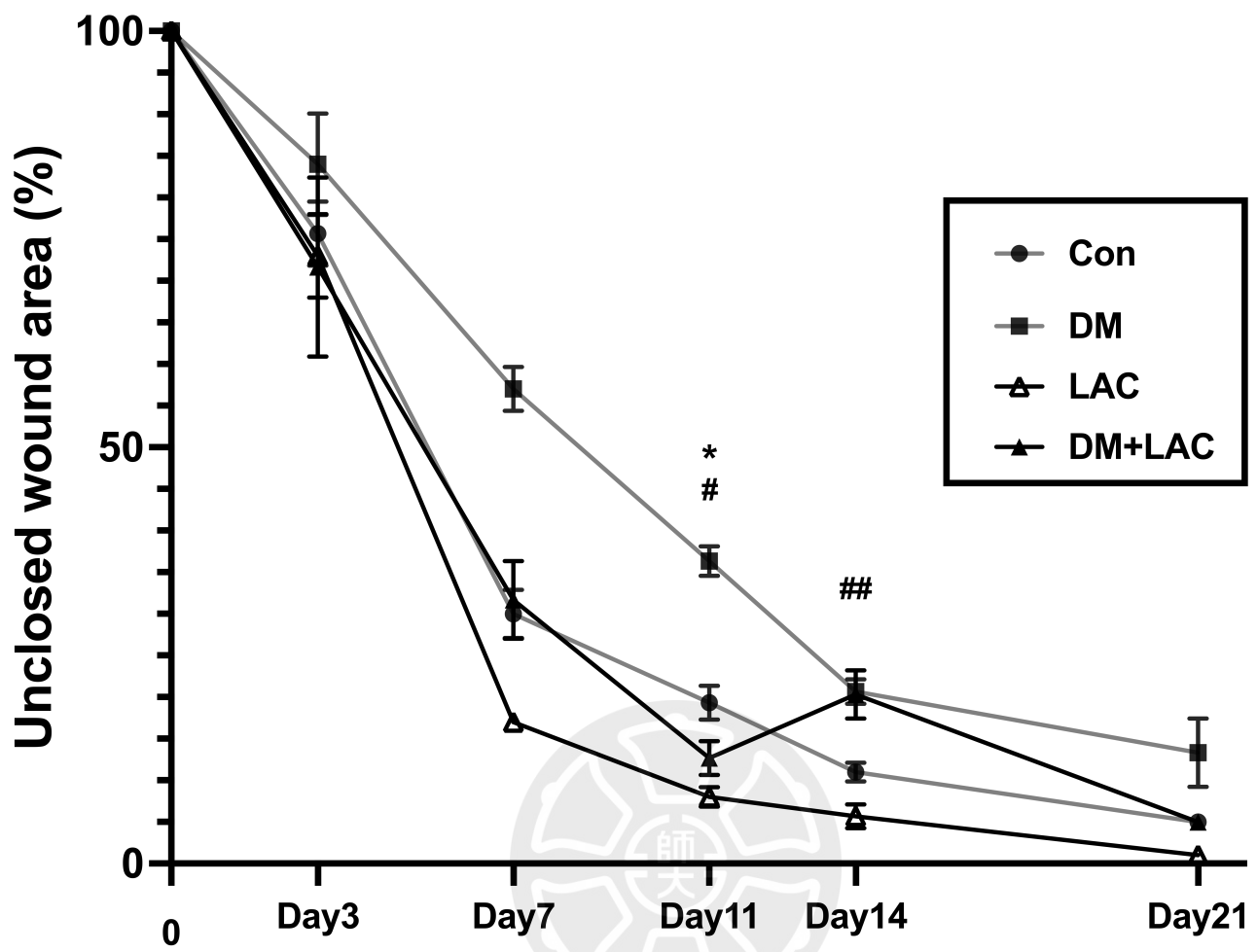
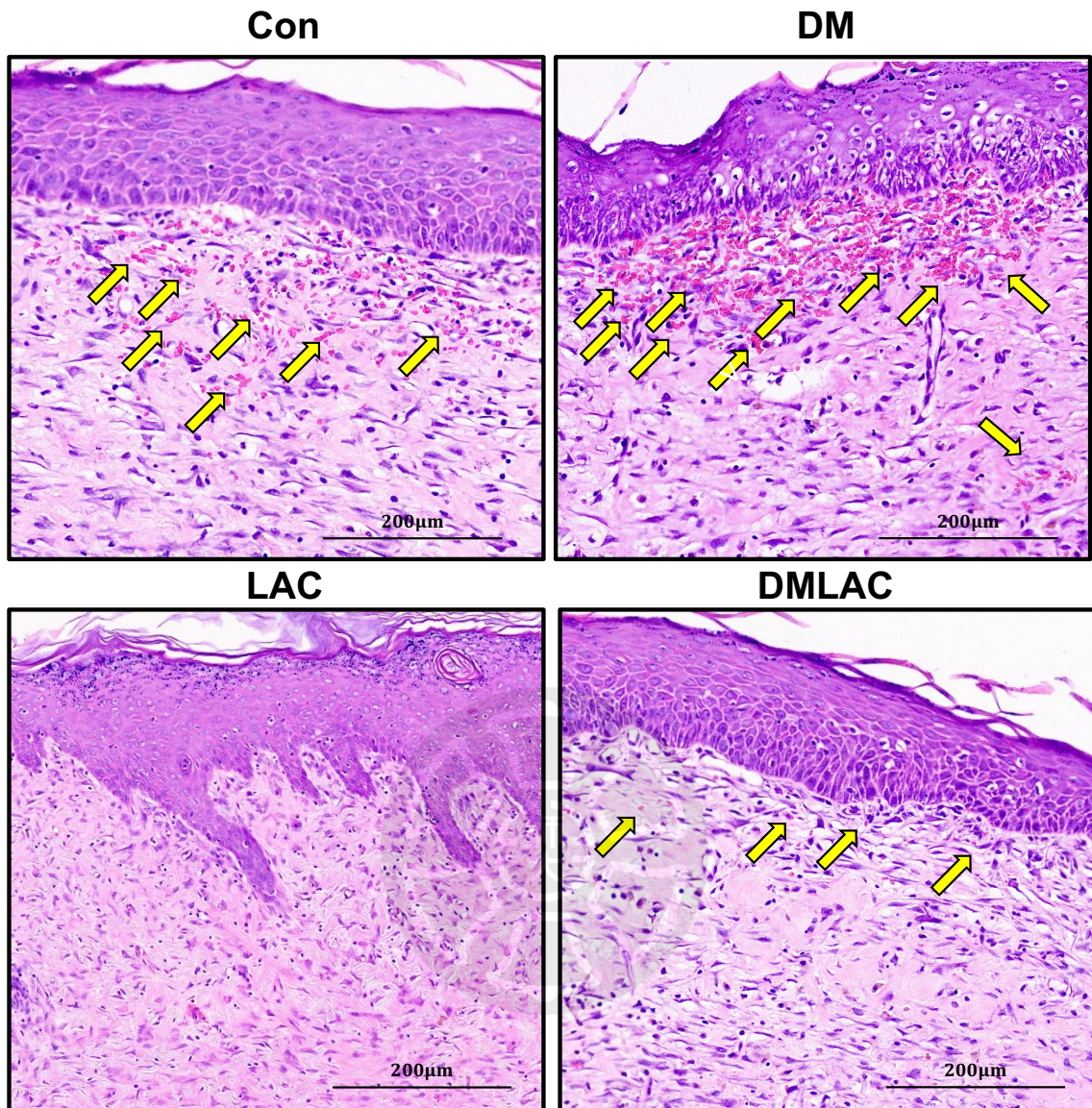


圖 18 LACTERA 治療傷口平均未癒合創面百分比統計圖

四組未癒合傷口從第 0 天開始 (100%)，在第 3, 7, 11, 14 與 21 天時剩餘未癒合傷口百分比統計圖，*, $p < 0.05$ (LAC 組與 Con 組比較)；# $p < 0.05$ (DM+LAC 組與 DM 組比較)；##, $p < 0.01$ (DM+LAC 組與 DM 組比較)。(n=6)

(A)



(B)

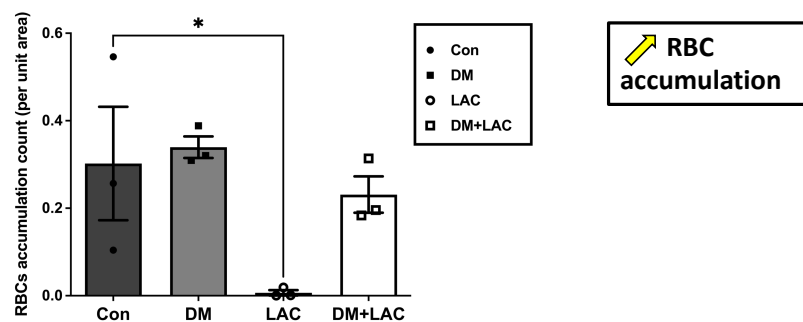
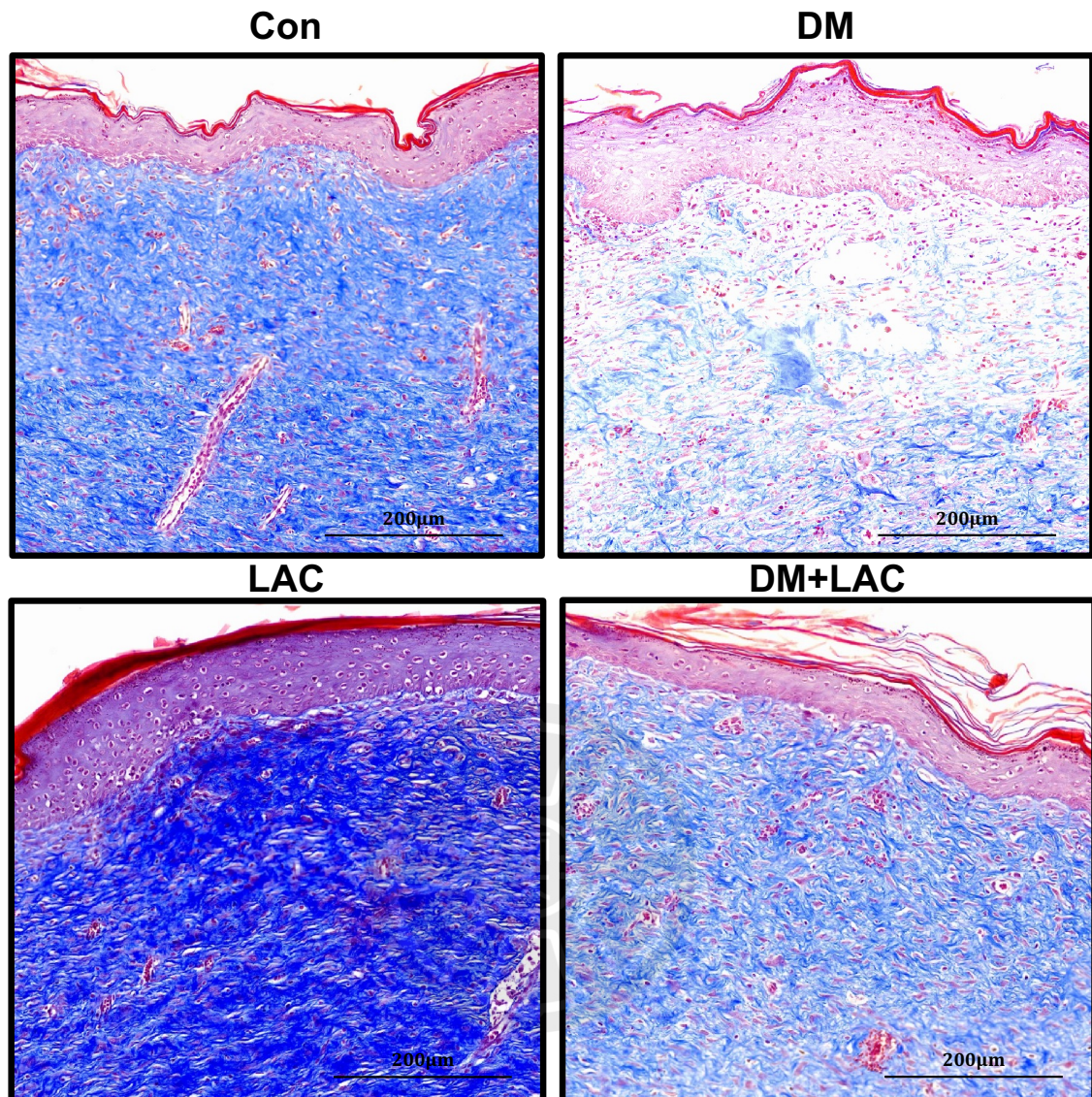


圖 19 LACTERA 治療傷口皮膚蘇木精伊紅染色切片圖

取四組傷口第 21 天時皮膚組織，(A) 以蘇木精伊紅染色，黃箭頭所指為組織間累積之紅血球。(B) 用單因子變異數分析比較四組之間單位皮膚面積血管外累積紅血球的數量。*, $p < 0.05$ (LAC 組與 Con 組比較)。(n=3)

(A)



(B)

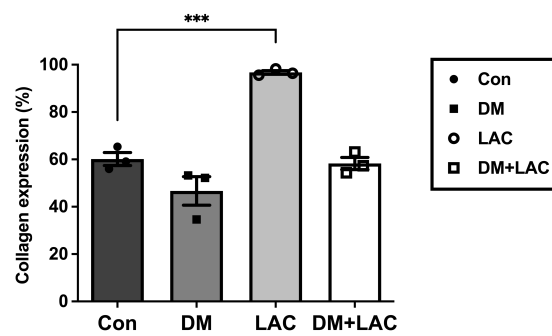
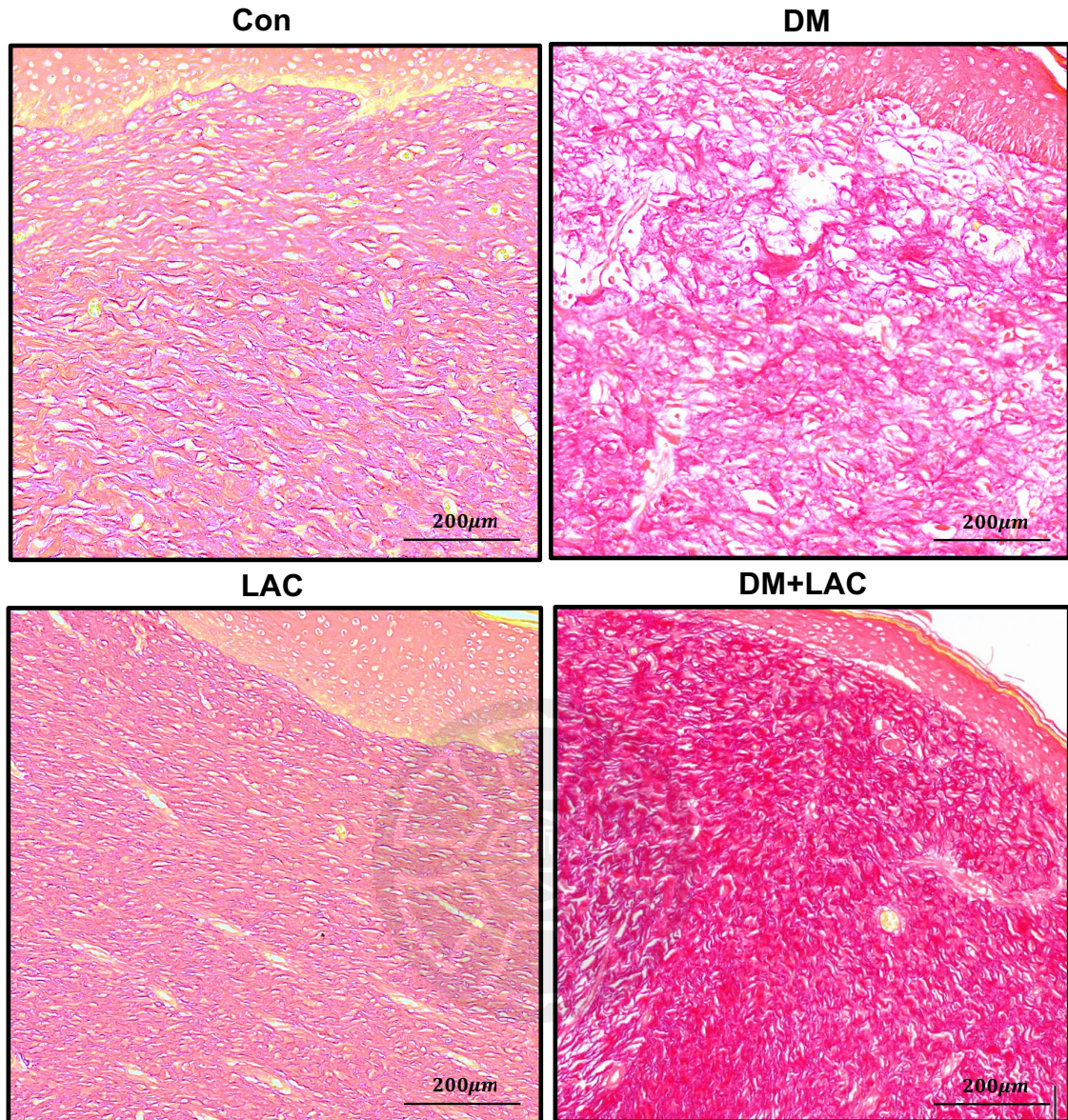


圖 20 LACTERA 治療傷口皮膚組織馬森三色染色

取四組傷口第 21 天時皮膚組織，(A) 以馬森三色染色，藍色處為膠原蛋白。(B) 用單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 比較四組之間皮膚膠原蛋白表現量百分比。***, $p < 0.001$ (LAC 組與 Con 組比較)。(n=3)

(A)



(B)

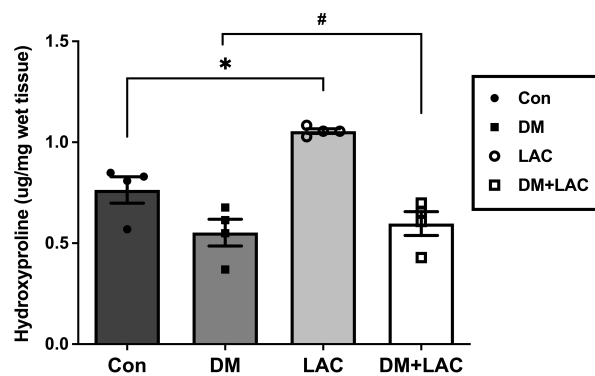
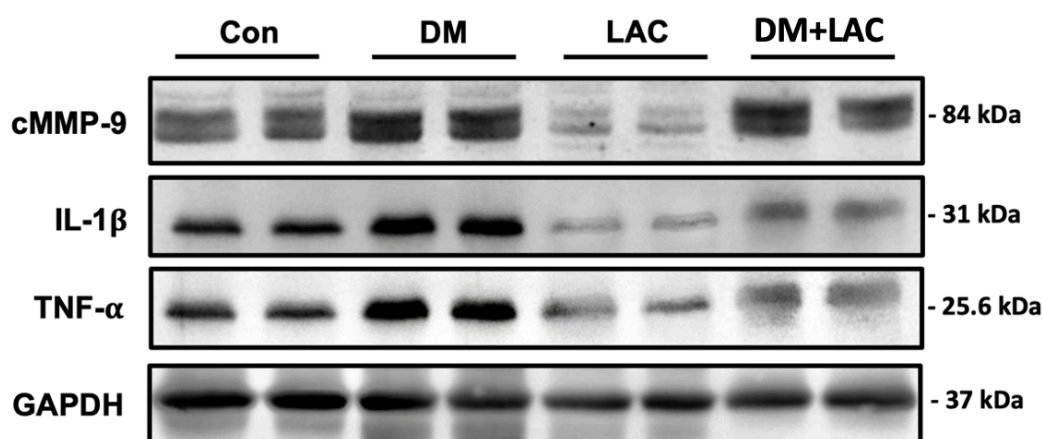


圖 21 LACTERA 治療傷口皮膚組織天狼星紅染色

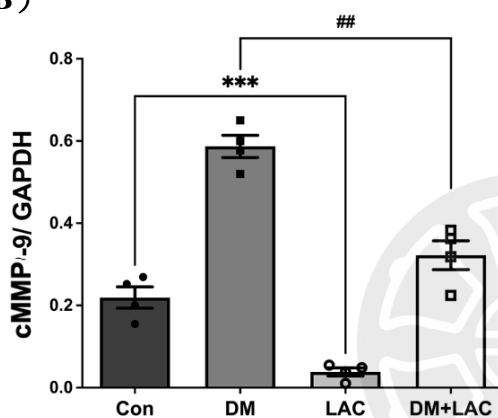
取四組傷口第 21 天時皮膚組織，(A) 以天狼星紅染色，紅色處為膠原蛋白纖維。

(B) 用單因子變異數分析比較四組之間皮膚羥脯氨酸含量， $*$, $p < 0.05$ (LAC 組與 Con 組比較)； $\#$, $p < 0.05$ (DM+LAC 組與 DM 組比較)。(n=4)

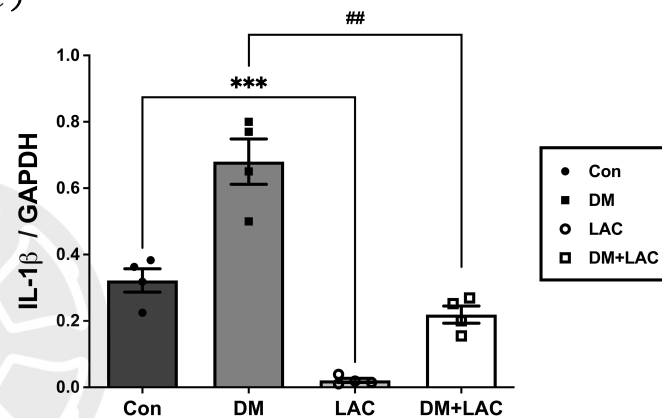
(A)



(B)



(C)



(D)

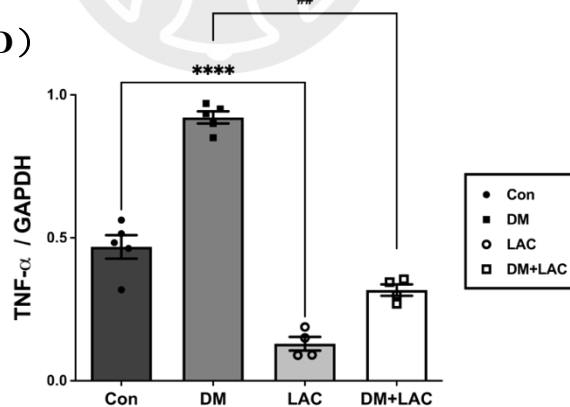


圖 22 LACTERA 治療傷口皮膚西方墨點法蛋白表現量

(A) 取第 21 天四個組別皮膚組織以西方墨點法測定 cMMP-9 (MMP-9 的切割成熟態)、CD86 和 TNF-α 三種蛋白在皮膚的表達量。(B) cMMP-9 表現量上, ***, $p < 0.001$ (LAC 組與 Con 組比較); ##, $p < 0.01$ (DM+LAC 組與 DM 組比較)。(C) IL-1β 表現量上, ***, $p < 0.001$ (LAC 組與 Con 組比較); #, $p < 0.05$ (DM+LAC 組與 DM 組比較)。(D) TNF-α 表現量上, ***, $p < 0.001$ (LAC 組與 Con 組比較); ##, $p < 0.01$ (DM+LAC 組與 DM 組比較)。(n=4)

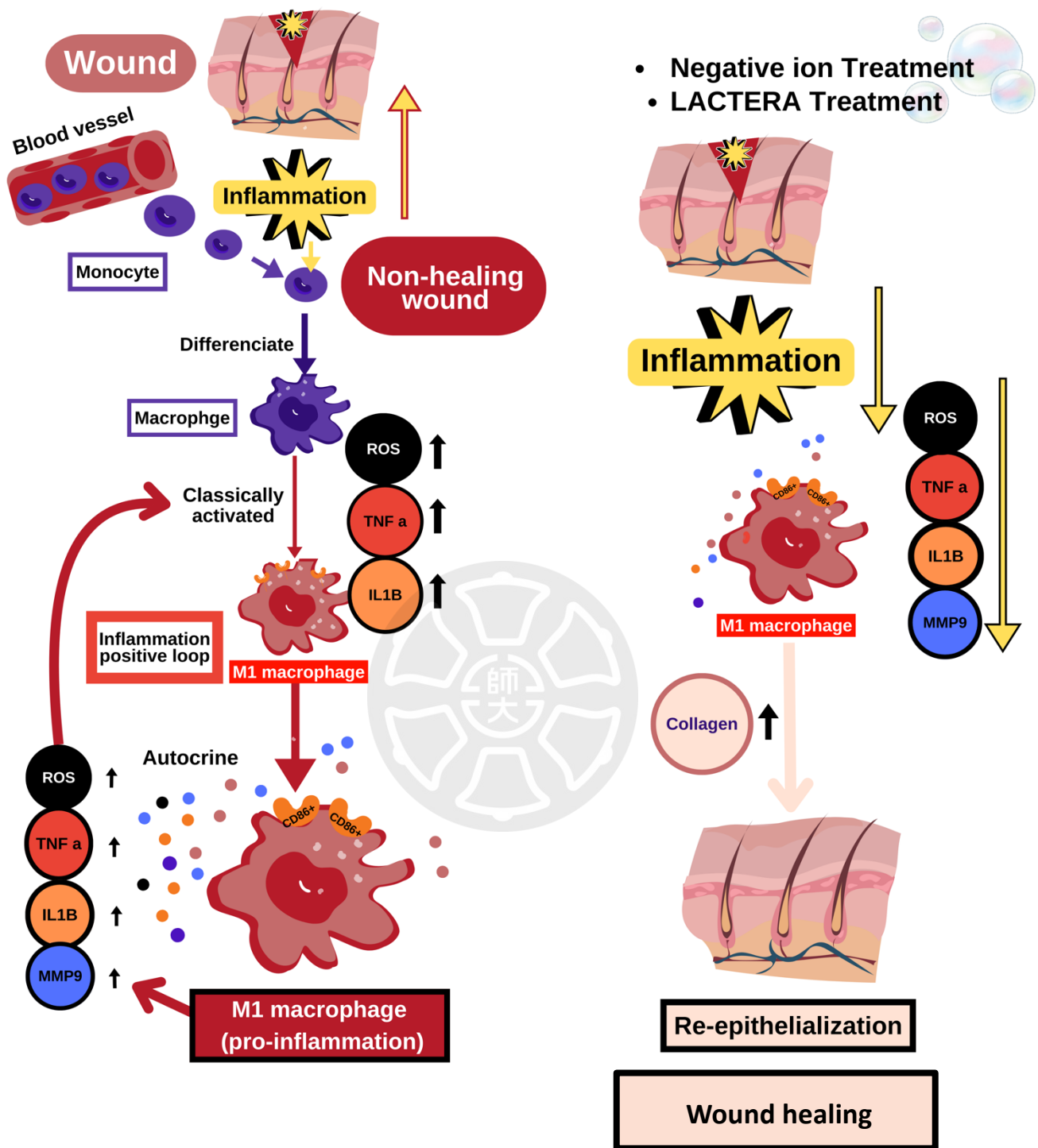
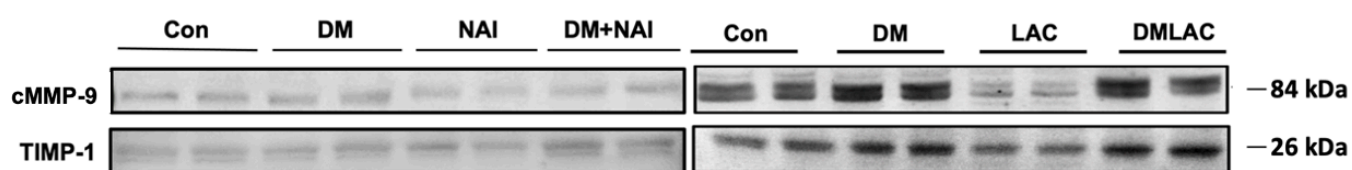


圖 23 負離子與 LACTERA 促進傷口癒合機制圖

(A) 傷口癒合不佳成因圖 (B) 給予負離子和 LACTERA 治療促進傷口癒合路徑圖，給予治療後，透過抑制發炎反應，降低 TNF- α 等表現，促進膠原蛋白增生，加速傷口癒合。



附錄 1 TIMP-1 蛋白表現量

取第 21 天負離子治療四個組別與 LACTERA 治療四個組別皮膚組織以西方墨點法測定 cMMP-9（MMP-9 的切割成熟態）、TIMP-1 三種蛋白在皮膚的表達量。

