

参赛队员姓名： 周康乐

中学： 成都市第七中学（林荫校区）

省份： 四川省

国家/地区： 中国

指导教师姓名： 袁智城、张景浩

指导教师单位： 成都市第七中学（林荫校区）

论文题目： 人工仿生皮肤对糖尿病足溃疡修复的研究

人工仿生皮肤对糖尿病足溃疡修复的研究

高 2022 级 3 班 周康乐

指导教师：袁智城、张景浩

摘要

糖尿病足溃疡是糖尿病患者的严重并发症之一，其治疗难度大、复发率高且常导致感染、坏疽、截肢等严重后果。针对这一问题，本研究构建了一种新型人工仿生皮肤用于糖尿病足溃疡修复。该仿生皮肤由两层结构组成：底层为用可降解高分子材料聚乳酸制备的定向纳米纤维，纤维中包载促进伤口修复的药物维替泊芬；顶层为天然高分子材料壳聚糖形成的凝胶。将载药仿生皮肤贴附于糖尿病足溃疡创口后，底层定向纤维与创口接触，通过释放维替泊芬和引导成纤维细胞定向排布的双重作用促进糖尿病足溃疡伤口快速愈合；顶层壳聚糖凝胶具有广谱抗菌性能，能有效抑制多种细菌和真菌生长，降低糖尿病足溃疡创口的感染风险。本研究有望为糖尿病足溃疡治疗提供一种新方法，所制备的人工仿生皮肤有望成为糖尿病足溃疡治疗的一种新敷料，可为糖尿病足溃疡患者的康复带来希望。

关键词： 仿生皮肤；糖尿病足溃疡；纳米纤维；伤口敷料；高分子材料

目录

一、研究背景.....	1
二、研究思路.....	2
三、创新点.....	3
四、材料与方法.....	4
4.1 实验材料.....	4
4.2 细胞系、细菌株和动物.....	4
4.3 定向结构高分子静电纺丝纤维制备.....	4
4.4 壳聚糖凝胶层制备.....	5
4.5 载药仿生皮肤的形貌观察.....	5
4.6 载药仿生皮肤的细胞毒性与促进基质细胞迁移、增殖效果考察.....	6
4.7 载药仿生皮肤的抗菌效果考察.....	7
4.8 使用化学物质来诱导小鼠发展糖尿病.....	7
4.9 糖尿病小鼠溃疡模型建立.....	8
4.10 糖尿病足溃疡创口修复效果评价.....	8
五、结果与讨论.....	9
5.1 定向聚乳酸纤维和载药仿生皮肤的制备与宏观形貌观察.....	9
5.2 仿生皮肤中纤维层与凝胶层的结构表征.....	11
5.3 定向纤维、仿生皮肤和 Sorbalgon®敷料的亲疏水性能测试.....	14
5.4 仿生皮肤的细胞毒性评价.....	16
5.5 仿生皮肤中定向聚乳酸纤维层对成纤维细胞生长和迁移方向的引导作用.....	15
5.6 仿生皮肤的抗菌效果考察.....	18
5.7 糖尿病小鼠模型及溃疡创口的建立.....	20
5.8 载药仿生皮肤促进糖尿病小鼠创口愈合.....	22
六、结论.....	26
七、参考文献.....	27
八、致谢.....	29
九、实验伦理声明.....	30

一、研究背景

在一次偶然机会，我亲眼目睹了医院中糖尿病足溃疡患者痛苦的换药过程，那个溃疡创面使我不敢直视，令我记忆深刻。另外，听医生说这种足溃疡很难愈合，目前医院里还没有有效的治疗方法，当时我心里就暗暗下定决心将来从事这方面的学习和研究。

国际糖尿病联盟数据显示，目前全球糖尿病患者有 4.25 亿人，其中我国糖尿病患者高达 1.14 亿，且糖尿病患者数量仍在迅速增加，在中国，这部分人群每年将花费 6000 亿治疗费用 [1]。糖尿病通常伴有周围神经病变、周围血管疾病，导致相应的肢体缺血，最终导致糖尿病足溃疡。糖尿病足溃疡是糖尿病严重的并发症。据估计，15%的糖尿病患者将发生糖尿病足溃疡。它可导致感染、坏疽、截肢，如果治疗不及时甚至导致死亡发生。患者 5 年的死亡风险是未发生足溃疡的糖尿病患者的 2.5 倍，截肢后 5 年的病死率超过 70% [2]。糖尿病足溃疡难愈合的主要原因是神经损伤和血管病变原因。一方面，高血糖导致的神经损伤后长期周围神经病变，造成患者远端肢体疼痛或感觉消退，使糖尿病患者不易觉察皮肤破损，从而使细菌等微生物易侵入破损的皮肤，发生溃疡难以愈合 [3, 4]。另一方面，周围动脉硬化或狭窄可导致血管功能受损和血流变缓，使机体不能获取满足代谢所需的氧气及营养物质，引起肢端缺血、缺氧，使得氧自由基水平升高，严重影响伤口局部炎性细胞比例及功能，导致伤口愈合延缓。此外，糖尿病足溃疡久不愈合的原因还有血糖没有控制好 [5, 6]。

糖尿病足溃疡已经成为全球关注的公共卫生健康问题，它的治疗方式主要有血糖控制、清创术、血管重建、局部减压、敷料应用、高压氧治疗、电刺激治疗等 [7]。但是，这些治疗方法的效果有限，难于完全治愈。此外，糖尿病足溃疡复发率高，3 年后复发率可高达 50% 以上，严重影响患者生活质量。因此，本项目拟构建一种新型的人工仿生皮肤，用于糖尿病足溃疡的修复。该人工仿生皮肤由装载药物的生物医用高分子纳米纤维构成。如图 1a 所示，该载药仿生皮肤由两层结构组成：底层为通过静电纺丝技术制备的聚乳酸高分子定向纳米纤维，纤维中包载促伤口修复药物维替泊芬；顶层为天然高分子壳聚糖凝胶，通过具有良好生物相容性的 β -甘油磷酸钠交联。如图 1b 所示，将该载药仿生皮肤贴附于小鼠的糖尿病足溃疡后，底部纤维层与糖尿病足溃疡创口接触，顶层壳聚糖凝胶层

暴露于空气。底层纤维可吸收伤口渗液并释放维替泊芬用于减轻糖尿病足溃疡伤口处的炎症反应，并与纤维的定向结构协同诱导成纤维细胞和表皮细胞的迁移、增殖，促进糖尿病足溃疡的愈合；顶层的壳聚糖凝胶具有广谱抗菌性能，对造成糖尿病足溃疡感染的多种细菌、真菌（如金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和芽生菌等）均有较好的抑制效果。因此，该载药仿生皮肤通过促进基质细胞向糖尿病足溃疡伤口处增殖、迁移以及降低伤口处感染风险的双重作用，加速糖尿病足溃疡的修复。

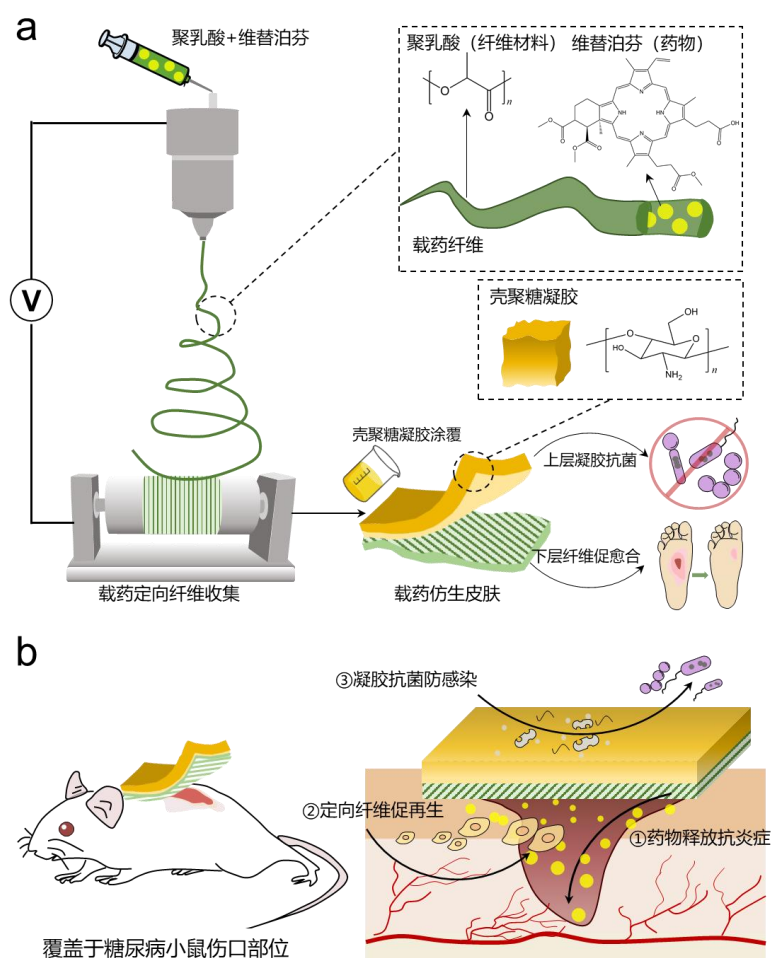


图1 载药人工仿生皮肤对糖尿病足溃疡修复的研究示意图。a) 载药仿生皮肤中聚乳酸定向纳米纤维层的制备和壳聚糖凝胶层的制备；b) 载药仿生皮肤的抗炎、防感染和促进糖尿病足溃疡创口修复作用。

二、研究思路

研究点一：糖尿病患者因自身代谢稳态变化导致基质细胞迁移受限，足溃疡伤口愈合缓慢

拟解决办法：一方面利用高分子纳米纤维产生定向排列结构，诱导成纤维细胞和表皮细胞向足溃疡伤口部位迁移，加快细胞覆盖进程；另一方面利用纤维释放抗炎药物维替泊芬，减轻足溃疡伤口部位的炎症反应，以此提升伤口处成纤维细胞和表皮细胞的增殖活性，促进足溃疡修复。

研究点二：细菌、真菌等微生物易侵入破损的皮肤，使足溃疡难以愈合

拟解决办法：将载药仿生皮肤完全覆盖足溃疡创口，使顶层壳聚糖凝胶暴露在外，利用壳聚糖自身的广谱抗菌特性抵抗外界细菌、真菌等微生物在足溃疡皮肤处定殖，降低足溃疡创口感染风险。

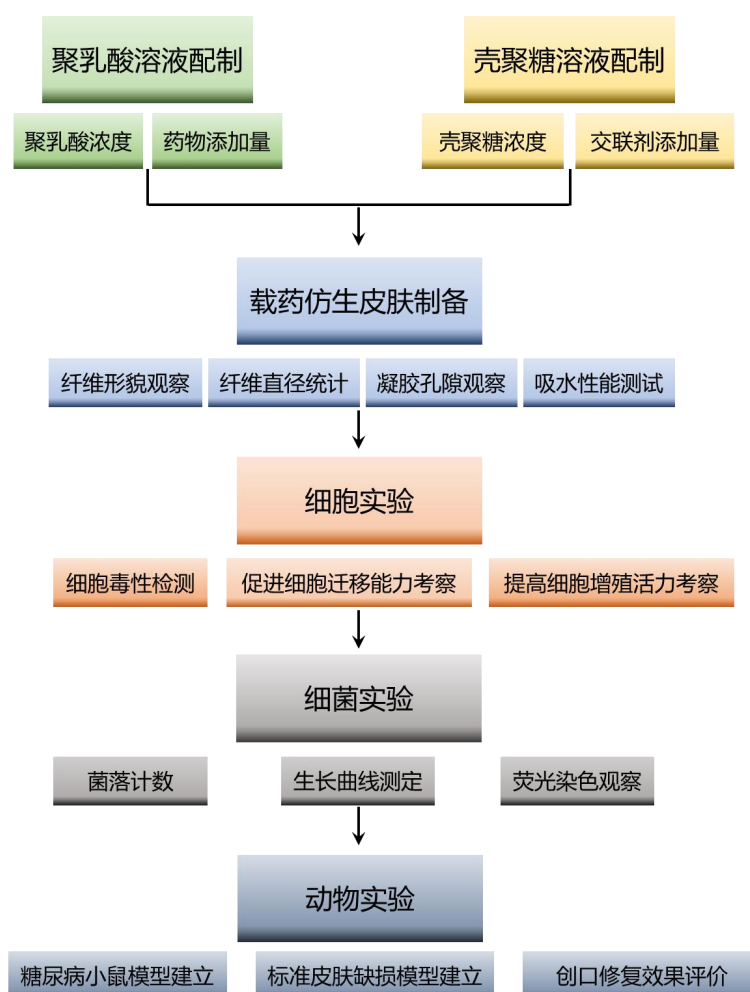


图 2 载药人工仿生皮肤对糖尿病足溃疡修复的研究思路图

三、创新点

1. 治疗方法创新：用仿生人工皮肤进行治疗可起到双重作用：一方面促进溃疡愈合；另一方面可抵抗外界细菌、真菌等微生物在足溃疡皮肤处定殖，降低足溃

疡感染风险。

2.辅料结构的创新：该辅料选用可降解高分子材料，可完全生物降解；静电纺丝技术制备的高分子纳米纤维具有类似自然皮肤多孔和定向结构，有利于引导细胞生长，促进溃疡愈合。

四、材料与方法

4.1 实验材料：本研究所用聚乳酸由西南交通大学材料先进技术教育部重点实验室合成，壳聚糖购买于阿拉丁试剂网（C105802，黏度 200~400 兆帕斯卡·秒），二氯甲烷、二甲亚砜和本研究中所用到的其余试剂均购自成都科隆化学试剂有限公司，链脲佐菌素购于 Sigma-Aldrich 试剂有限公司。实验所用胰蛋白酶-EDTA 溶液、DMEM 高糖细胞培养基和 FBS 胎牛血清均购于美国 Gibco 生物科技有限公司。临床中常用的糖尿病足溃疡敷料 Sorbalgon®由成都市第三人民医院捐赠。

4.2 细胞系、细菌株和动物：本研究中所用人脐静脉内皮细胞和小鼠胚胎成纤维细胞购于中国细胞资源库（上海细胞中心），大肠杆菌菌株购于中国微生物菌种保藏中心，实验用 6~8 周龄雌性 Blab/c 小鼠购于成都达硕实验动物有限公司。

4.3 定向结构高分子静电纺丝纤维制备：利用静电纺丝技术制备聚乳酸纳米纤维，并在制备纤维所用电纺液中加入维替泊芬（4 微摩尔），同时利用高速无刷电机滚筒在 1500 转/分钟的转速下接收纤维，即可得到高定向度的载药聚乳酸纳米纤维。静电纺丝中所用聚乳酸分子量为 18000 道尔顿，溶解于二氯甲烷和二甲亚砜体积比为 5: 1 的混合溶剂中。静电纺丝过程中保持静电电压为 15 千伏，接收距离为 30 厘米，溶液推进速度为 1.5 毫升/小时，连续接收 5 小时后可以得到厚度大约为 0.5 毫米的纤维膜。

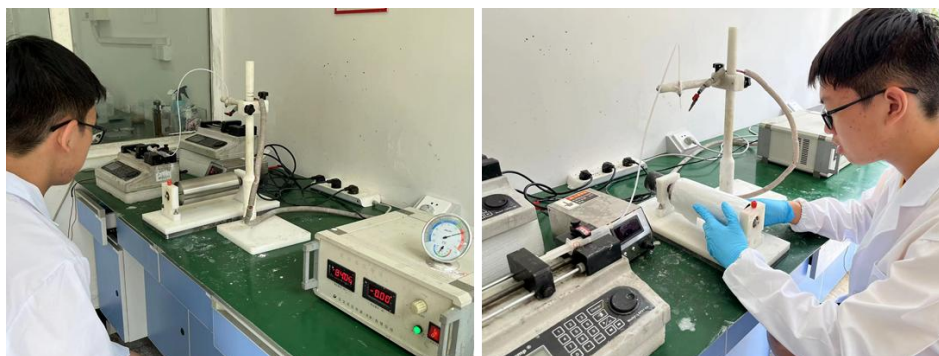


图 3 静电纺丝载药聚乳酸定向纤维的制备过程

4.4 壳聚糖凝胶层制备：配制低季铵盐取代度的壳聚糖水溶液（取代度 $<15\%$ ，壳聚糖质量比浓度为 5% ），向配制好的壳聚糖溶液中加入 β -甘油磷酸钠缓慢交联壳聚糖（图4）。随后将制备好的定向载药聚乳酸纳米纤维置于模具中，在其上缓慢浇注壳聚糖-甘油磷酸钠的混合溶液，形成载药仿生皮肤的顶部凝胶层(图5)。

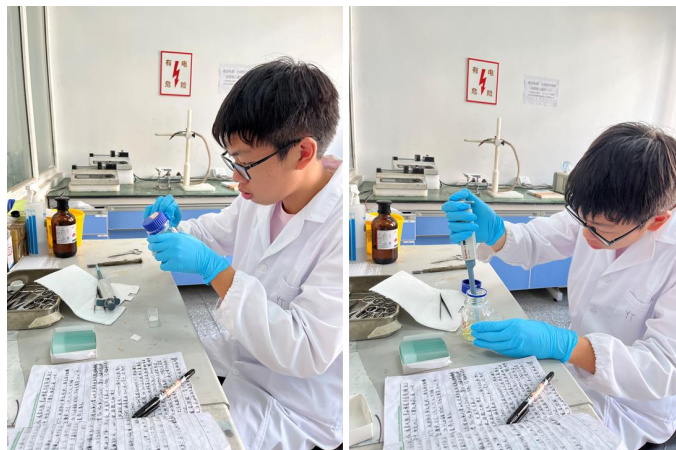


图4 壳聚糖溶液配制与 β -甘油磷酸钠加入过程

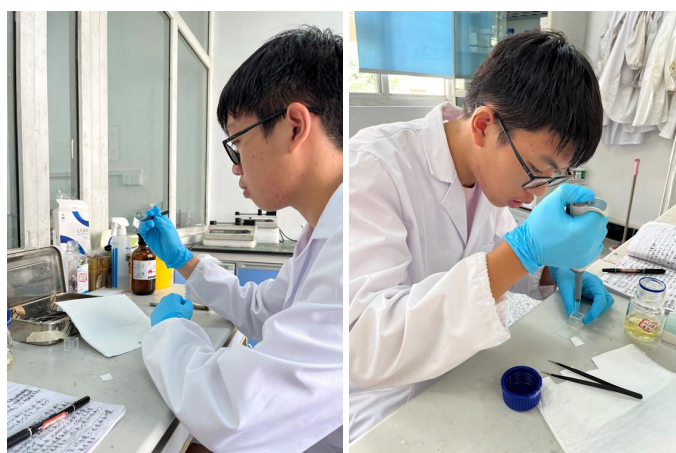


图5 载药仿生皮肤的制备过程

4.5 载药仿生皮肤的形貌观察：通过扫描电子显微镜、荧光显微镜和视频接触角测量仪等设备表征制备得到的载药仿生皮肤的结构与性能，并与临床中常用的糖尿病足溃疡敷料 Sorbalgon®相关对比，观察其结构与性能上的差异（图6）。在荧光显微镜的观察中，纤维被提前进行了香豆素-6染色，随后利用激光共聚焦专用盖玻片覆盖。选择显微镜的 GFP 绿色荧光通道后，显微镜发射出的蓝色激光即可激发出香豆素-6 染料的绿色荧光，以此对纤维进行镜下观察。



图 6 利用荧光显微镜对载药仿生皮肤进行观察

4.6 载药仿生皮肤的细胞毒性与促进基质细胞迁移、增殖效果考察：通过细胞培养与染色技术考察仿生皮肤是否存在细胞毒性，将成纤维细胞接种于定向聚乳酸纳米纤维表面（图 7），观察成纤维细胞能否被纤维定向结构影响产生细胞骨架重排，判断定向聚乳酸纳米纤维是否存在促进体内基质细胞迁移的潜在可能。

本研究中所用小鼠胚胎成纤维细胞和人脐静脉内皮细胞均以高糖 DMEM 培养基培养，所用培养基中需添加 10% 的胎牛血清为细胞的生长、增殖提供必需的营养成分。细胞培养箱的温度为 37℃，气体氛围为 5% 二氧化碳，相对湿度为 85%，确保细胞在适宜的环境中生长。

在细胞毒性测试前，需将细胞与 CCK-8 试剂与培养基按照 1: 100 的体积比混合，以此稀释 CCK-8 试剂的母液。随后将混合后的 CCK-8 试剂均匀加入细胞培养孔板中，并将培养孔板放回细胞培养箱中继续培养 4 小时，期间每隔 1 小时观察一次试剂的颜色变化。CCK-8 试剂会在活细胞中还原产生橙黄色的产物，通过酶标仪检测孵育后细胞的培养基上清液在 450 纳米波长处的吸光度，并与空白组进行相除，可以计算得到测试样品的细胞存活率。同时，也可以通过钙黄绿素和碘化吡啶对与纤维共孵育后的细胞进行染色，于荧光显微镜下观察可判断细胞的存活状态。

此外，利用磷酸缓冲液稀释戊二醛的浓度至 4%，用其浸没细胞表面 30 分钟可固定样本中细胞的蛋白质、脂质和其他生物分子的结构。利用 1000 倍稀释的二脒基苯基吡啶（细胞核染料，蓝色）和 500 倍稀释的罗丹明标记的鬼笔环肽（细胞骨架，红色）对被固定细胞的细胞核和肌动蛋白染色，在荧光显微镜下能精确观察到细胞的形态结构。

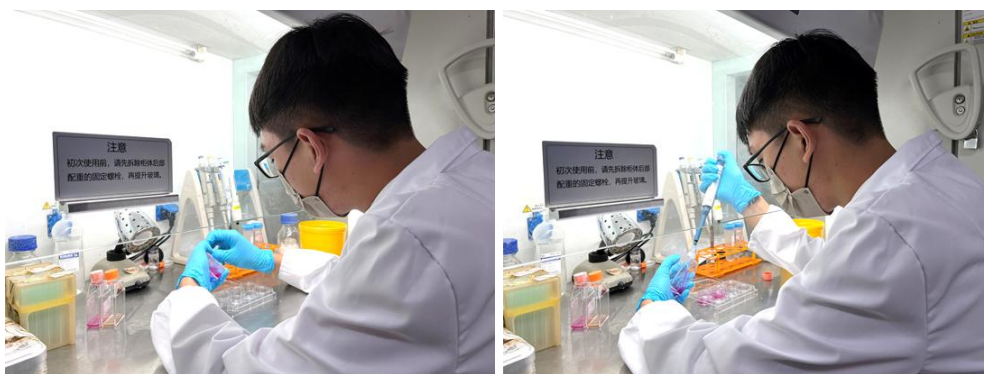


图 7 载药仿生皮肤的细胞毒性与促进基质细胞迁移、增殖实验过程

4.7 载药仿生皮肤的抗菌效果考察：将载药仿生皮肤与易造成糖尿病足溃疡伤口感染的常见细菌（金黄色葡萄球菌、大肠杆菌）接触培养一段时间后，采用常规菌落计数法来测定细菌在材料上的生长情况（图 8）。通过与对照组进行比较，可以评估材料的抗菌效果。较少的菌落数量表示较好的抗菌能力。

细菌培养采用浓度为 1.5% 的琼脂糖培养基 25 毫升，将与仿生皮肤共孵育的细菌均匀滴加、涂覆在有琼脂糖培养基的培养皿表层。将接种细菌的培养皿置于细菌培养箱中孵育 24 小时后，观察细菌的生长情况并进行菌落计数。



图 8 细菌培养基配制及抗菌实验操作

此外，还可通过 SYTO9（染液浓度为 1%，1 毫升）和碘化吡啶（染液浓度为 1%，500 微升）荧光染料标记与测试材料共孵育后的细菌，通过荧光显微镜观察染色 30 分钟后细菌的存活情况，较少的存活细菌数量表示较好的抗菌性能。

4.8 使用化学物质来诱导小鼠发展糖尿病：可以注射低剂量的链脲佐菌素或高脂高糖饮食来诱导胰岛素缺乏或胰岛素抵抗，模拟糖尿病的特征。

a. 链脲佐菌素诱导模型：通过腹腔注射链脲佐菌素来诱导胰岛素产生减少或消失，模拟 I 型糖尿病。注射时必须控制剂量（<15 毫克/千克），以避免对小鼠造成严重的毒性效应（图 9）。

b. 高脂高糖饮食模型：将小鼠喂养高脂高糖饮食，以诱导肥胖和胰岛素抵抗，模拟II型糖尿病。高脂高糖饲料由基础鼠粮加蔗糖、油脂和蛋黄按 0.6（基础鼠粮）：0.2（蔗糖）：0.1（油脂）：0.1（蛋黄）的比例配制而成，保证每只小鼠的饲料摄入量大于 150 克/千克。这种模型的构建需要长时间的高脂高糖饮食喂养，因此需要耐心和控制饮食的准确性。



图 9 糖尿病小鼠模型建立及血糖测定

4.9 糖尿病小鼠溃疡模型建立：首先使用异氟醚对小鼠进行麻醉，确保小鼠无痛感。在手术区域进行消毒，常用消毒剂包括酒精和碘酒。然后，对小鼠背部进行脱毛，并使用手术剪刀和打孔器建立直径为 8 毫米的标准创口模型模拟糖尿病人足溃疡创伤（图 10）。最后，将制备好的载药仿生皮肤贴敷于伤口处并用 3M 膜覆盖，固定载药仿生皮肤。同时设置空白组、载药聚乳酸纤维组和商用 Sorbalgon® 敷料组，对比考察制备的载药仿生皮肤对糖尿病小鼠皮肤创伤的修复效果。

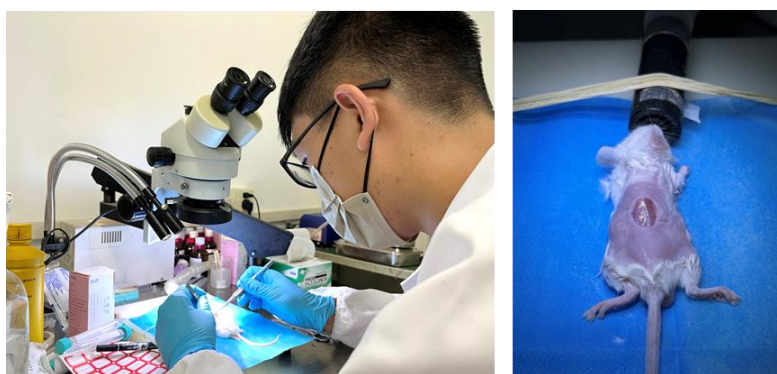


图 10 小鼠糖尿病足溃疡创伤模型建立

4.10 糖尿病足溃疡创口修复效果评价：通过肉眼观察伤口的愈合情况。注意观察伤口的红肿程度、创面收缩、表面覆盖物形成以及新生皮肤的形态和颜色变化等指标。对伤口愈合的各个阶段进行定期观察，并记录相关的变化（图 11）。

在治疗的第 7-10 天，取出伤口周围的皮肤组织，进行组织学检查。通过石

蜡切片和染色技术（以苏木精-伊红染色和 Masson 染色为主），观察组织切片下的新生血管形成、炎症细胞浸润、结缔组织形成和表皮层的完整性等指标，评估不同治疗方式的伤口愈合程度。

采集伤口周围的皮肤组织或血清样本，进行生物化学指标的检测。包括炎症标志物（如白细胞计数、C-反应蛋白等）、胶原合成指标（如羟脯氨酸、羟脯氨酸/脯氨酸比值等）和血管生成指标（如血管内皮生长因子等）。这些指标可以反映伤口愈合的炎症程度、胶原沉积和血管新生等过程。

在伤口愈合后，对小鼠进行相关功能评估。例如，使用行为测试（如运动功能测试、触觉测试等）来评估伤口修复对小鼠的运动和感觉功能的影响。

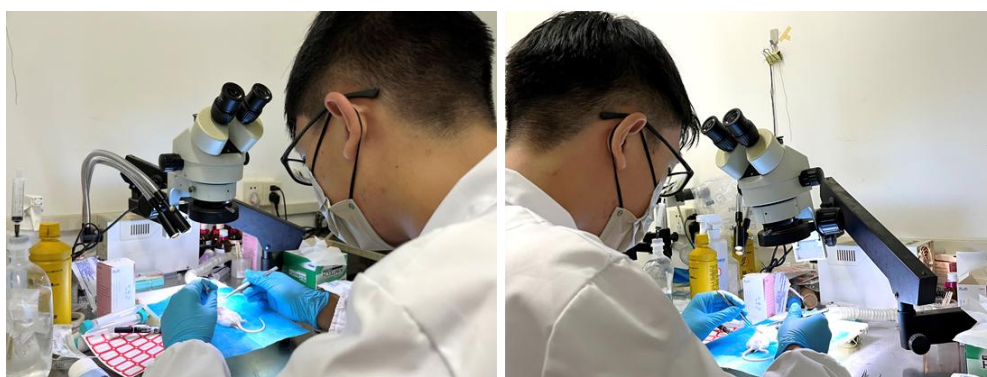


图 11 载药仿生皮肤的贴附与溃疡伤口观察

五、结果与讨论

5.1 定向聚乳酸纤维和载药仿生皮肤的制备与宏观形貌观察

定向载药聚乳酸纤维由静电纺丝技术制备，利用二氯甲烷和二甲亚砜的混合溶剂（5: 1）可以完全溶解聚乳酸颗粒和维替泊芬。在电纺溶液浓度为 10%（质量体积比），静电电压为 15 千伏，接收距离为 30 厘米，无刷电机滚筒转速为 1500 转/分钟条件下，可以连续稳定地得到载药的定向聚乳酸纤维。

连续收集 5 小时后即得到一张包含维替泊芬的聚乳酸纤维膜。在肉眼观察下，可以发现得到的载药定向纤维膜呈现乳白色，与制备用聚乳酸颗粒颜色接近，维替泊芬药物的加入并没有改变纤维的颜色（图 13a）。仔细观察还可以发现纤维膜中的纤维大致朝同一方向有序排列。

我们设计的载药仿生皮肤具有双层结构，底层为定向排列的聚乳酸载药纤维，

顶层为壳聚糖凝胶。为了制备顶部的壳聚糖凝胶层，我们预先配制了浓度为 5%（质量体积比，溶剂为水）的壳聚糖溶液，完全溶解后的壳聚糖溶液澄清透明并略显淡黄色。向其中加入 0.5% 的 β -甘油磷酸钠并迅速搅拌后，将混合溶液缓缓浇注于已装入正方形模具内的载药聚乳酸定向纤维膜上，使其均匀覆盖在纤维膜表面。 β -甘油磷酸钠中的磷酸根离子可以与壳聚糖中的氨基和羟基发生离子键和氢键作用，从而形成化学交联。这种交联作用将壳聚糖链条紧密地连接在一起，增加了壳聚糖材料的物理稳定性和力学强度。等待约 20 分钟后，即可观察到壳聚糖溶液由原先的可流动状态转变为不可流动的凝胶态，仿生皮肤的底部纤维层和顶部凝胶层间也出现了肉眼可分辨的界限（图 13b）。

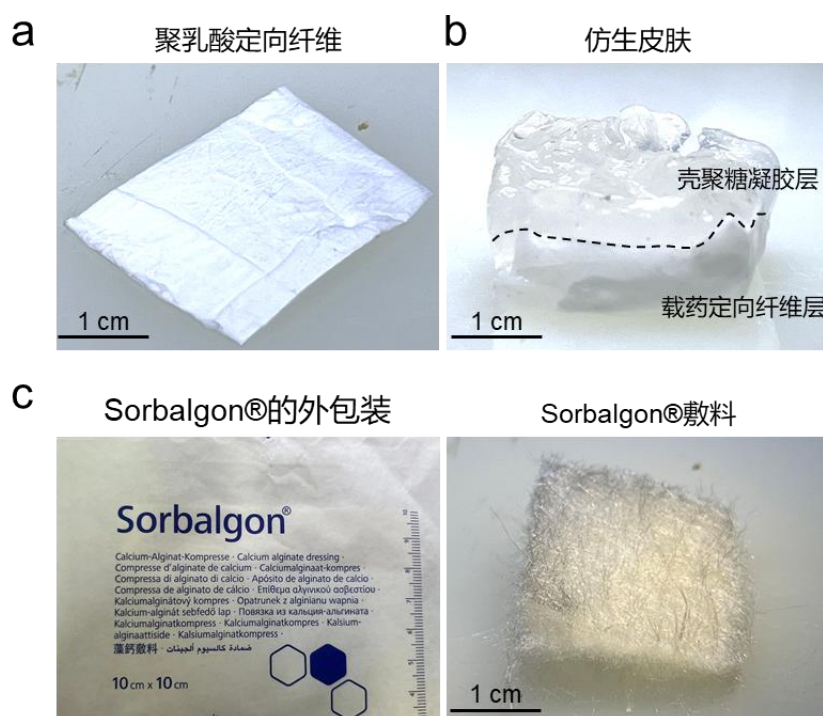


图 13 a) 载药定向聚乳酸纤维膜、b) 载药仿生皮肤和 c) Sorbalgon®敷料的照片

为了在后续实验中进一步比较我们制备的仿生载药皮肤和医院中常用的糖尿病足溃疡患者的伤口敷料在糖尿病足溃疡创口愈合效果上的差异，我们也获取了医院中常用的 Sorbalgon®敷料，对其进行观察。仅观察其外观发现，Sorbalgon®敷料的颜色为淡黄色，敷料主体由直径较粗的无规则排布纤维组成（图 13c）。

5.2 仿生皮肤中纤维层与凝胶层的结构表征

为了确定我们所制备的聚乳酸载药纤维是否为定向结构，在纤维制备过程中

我们向纤维中添加了绿色荧光染料——香豆素 6，并在纤维膜形成过程中利用玻片少量收集纤维，然后用荧光显微镜观察。观察结果显示，在没有滚筒收集的情况下，所得到的纤维比较发散没有固定方向。但在滚筒高速收集的情况下，所获得的纤维几乎都朝着同一侧排列，有明显的方向性（图 14）。

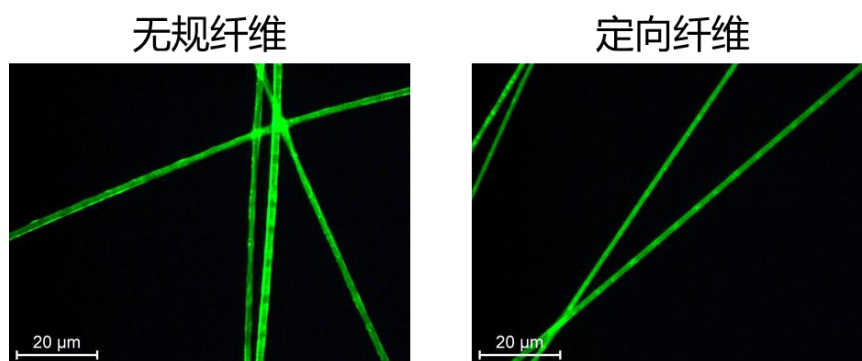


图 14 接收方式不同纤维的荧光显微镜图像，绿色荧光由香豆素 6 激发

为了进一步验证利用滚筒高速收集得到的纤维膜中是否也存在纤维的定向排列，我们利用场发射扫描电子显微镜观察了收集得到的载药纤维膜。结果发现，在 1000×的放大倍数下观察，纤维膜中的纤维大多也朝同一方向排列，具有定向性。在 5000×的放大倍数下继续观察所制备的聚乳酸载药纤维，我们发现纤维的形态连续无断裂，表面光滑，尺寸较为均一（图 15）。

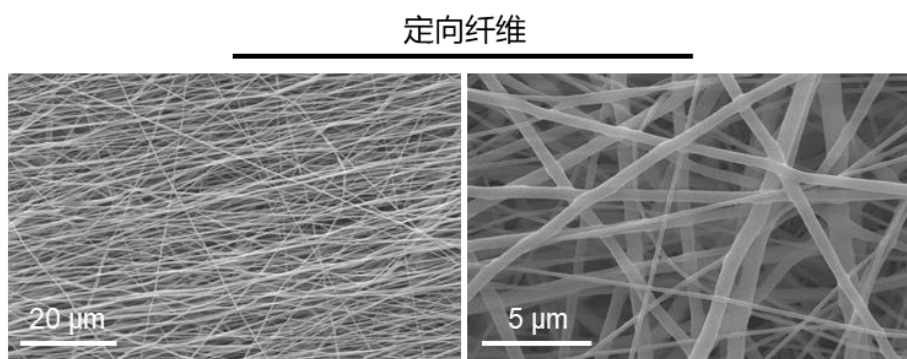


图 15 利用高速滚筒收集的载药聚乳酸纤维膜的扫描电子显微镜照片

随后，我们根据所得到纤维膜的扫描电子显微镜照片统计了载药聚乳酸纤维的直径。结果显示，聚乳酸纤维的直径分布在 150~1600 纳米的范围内，集中于 600~1000 纳米范围，纤维的平均直径为 846 纳米（图 16）。

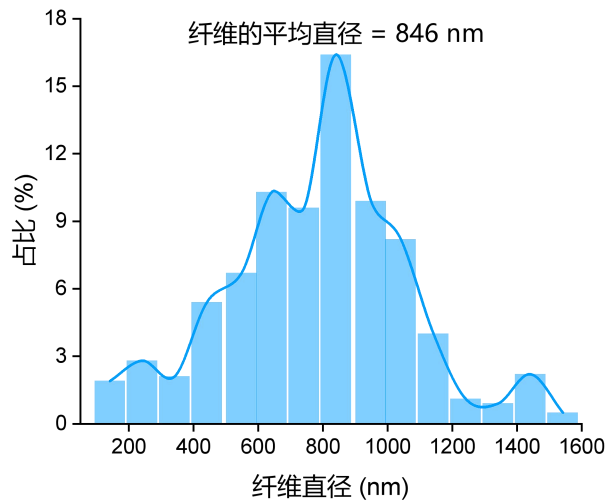


图 16 载药纤维膜中聚乳酸纤维的平均直径与直径分布的统计结果

使用极坐标图对纤维定向分布进行统计可以直观地显示纤维的定向程度。在极坐标图中，角度表示纤维的方向，坐标半径表示该方向上的纤维数量或密度。图 17 显示，无规纤维的极坐标图中，纤维的方向分布是随机的，没有明显的方向性。无规纤维的极坐标图中没有明显的峰值或集中区域，纤维数量和密度在不同角度上分布比较均匀。定向纤维的极坐标图中，纤维的方向分布呈现明显的定向性。图中 $\sim 5^\circ$ 角处出现了明显的峰值，表明有大量纤维沿着此方向排列。

同样的，我们也利用场发射扫描电子显微镜观察了载药仿生皮肤凝胶层中壳聚糖凝胶的显微结构。图 17 结果显示，经过冷冻干燥后的壳聚糖凝胶在扫描电子显微镜下呈现出表面多孔结构。然而，在肉眼或光学显微镜的观察中我们并不能看到凝胶的孔隙结构，这是由于在进行扫描电子显微镜观察前壳聚糖凝胶预先经过冷冻干燥处理，使得原本充盈于凝胶中的水升华消失，只留下许多空隙，形成多孔结构。

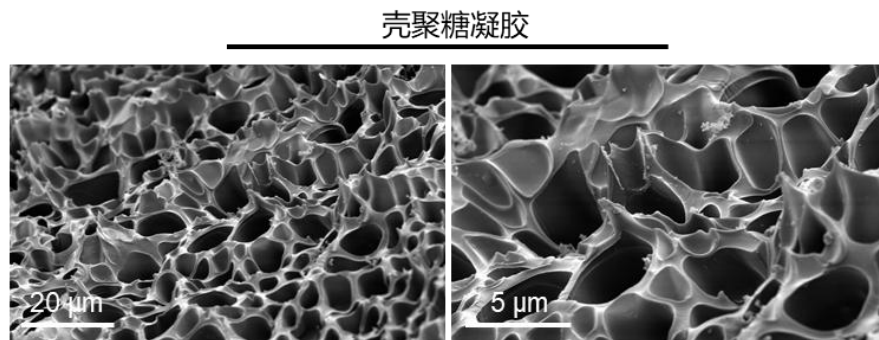


图 17 仿生皮肤顶部壳聚糖凝胶层的扫描电子显微镜照片

这些微小的孔洞分布在整个表面上，对孔洞的大小进行统计分析后我们发现，孔洞的直径分布在 1800~5500 纳米范围内，集中于 3000~4500 纳米的范围，孔洞的平均直径为 3538 纳米（图 18）。

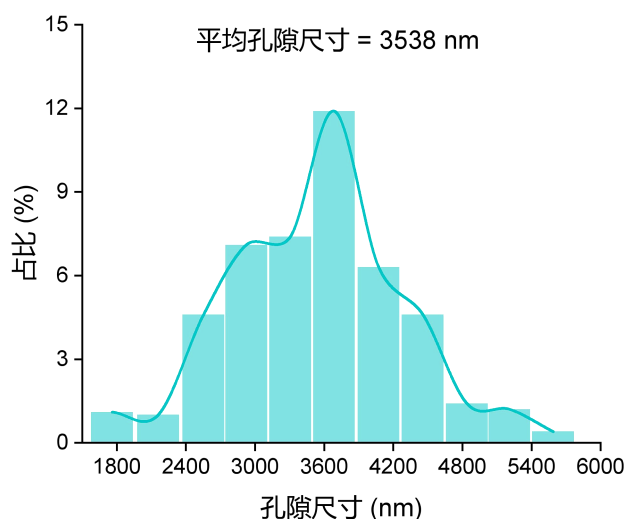


图 18 壳聚糖凝胶孔洞的平均直径与直径分布的统计结果

与此同时，我们还当场发射扫描电子显微镜下观察了医院中治疗糖尿病患者足溃疡常用的 Sorbalgon®敷料。从扫描电子显微镜所拍摄的图像（图 19）我们可以发现，Sorbalgon®敷料也由纤维状结构组成。但与我们所制备的载药聚乳酸纤维不同的是，Sorbalgon®敷料的纤维尺寸均一性较差，直径普遍偏大，纤维呈现无序分散，没有确定排列方向，并且部分纤维上存在不规则的环状褶皱。

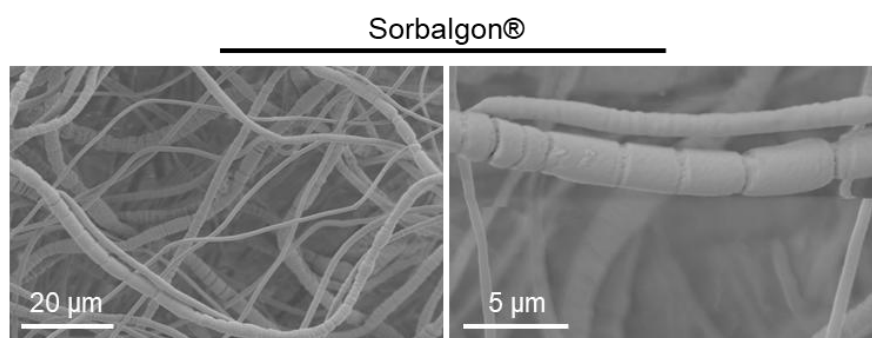


图 19 Sorbalgon®敷料的扫描电子显微镜图像

统计 Sorbalgon®敷料的直径和直径分布后（图 20），我们发现 Sorbalgon®敷料的中纤维的直径在 100~3000 纳米的范围内均有分布，且没有明显的集中区域，纤维的数量在不同直径中分散比较均匀。根据加权平均计算得到 Sorbalgon®敷料中纤维的平均直径为 2019 纳米，大约是载药聚乳酸静电纺丝纤维的 2.4 倍。

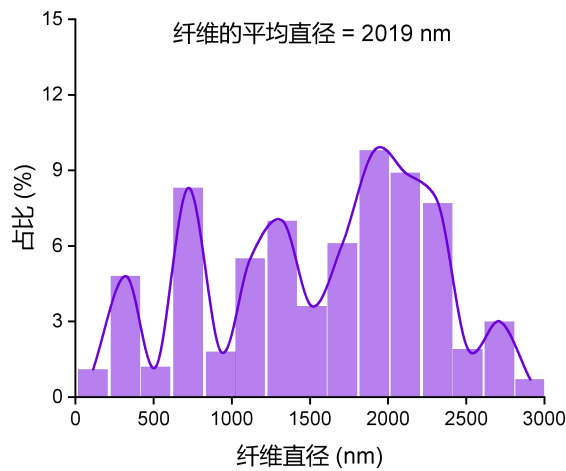


图 20 Sorbalgon®敷料中纤维平均直径与直径分布的统计结果

5.3 定向纤维、仿生皮肤和 Sorbalgon®敷料的亲疏水性能测试

材料的亲疏水性能是指材料表面与水接触时的亲水或疏水程度，亲水性是指材料表面对水有亲和力，使水能够在其表面上展开；疏水性是指材料表面对水有排斥力，使水形成水滴并不易附着在表面上。亲水性材料表面对生物组织有较好的相容性，有助于细胞的黏附和生长，这在医疗器械和组织再生等领域中具有重要意义[9, 10]。

利用视频接触角测量仪，我们分别考察了定向纤维膜、Sorbalgon®敷料和仿生皮肤的水接触角，以分析比较 Sorbalgon®敷料和仿生皮肤在材料自身性质上的差异。水接触角是指水与材料表面之间相互作用的角度，它是衡量材料亲疏水性的重要指标。一般标准认为：1.水在材料表面上完全展开，与材料表面形成一层连续的薄膜，那么水接触角等于 0° ，称为完全润湿；2. 水在材料表面上形成一个完全圆滴，并不与材料表面有任何接触，那么水接触角等于 180° ，称为完全疏水；3.接触角在 $0^\circ\sim 90^\circ$ 之间，表示水在材料表面上有一定程度的润湿，此时材料为亲水性；4. 接触角在 $90^\circ\sim 180^\circ$ 之间，表示水在材料表面上有一定程度的不润湿，此时材料为疏水性。

水接触角的测量结果如图 21 所示，定向聚乳酸纤维在测试中可以明显的观察到水滴在纤维表面驻留，而水滴与仿生皮肤的凝胶层接触后便迅速铺展在凝胶表面。Sorbalgon®敷料具有很强的吸水性，水滴在与 Sorbalgon®敷料接触的一瞬间就会被吸收，在此情况下，视频接触角测量仪并不能测试得出准确的水接触角。因此，我们将 Sorbalgon®敷料的水接触角记为 0° 。

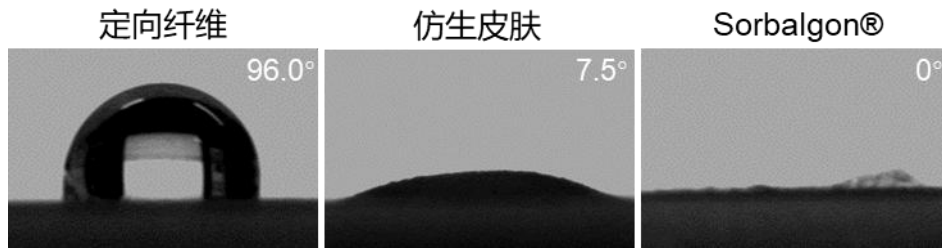


图 21 定向纤维、仿生皮肤和 Sorbalgon®敷料的水接触角图像

为保证测量的准确性，我们对每种样品都进行了三次不同区域的测量，并统计了不同材料的水接触角值。如图 22 所示，载药聚乳酸定向纤维的水接触角最大为 107.3°，最小为 90.4°，平均水接触角值为 97.9°，属于疏水性材料。仿生皮肤顶部壳聚糖凝胶层的水接触角平均值为 6.2°，属于亲水性材料。

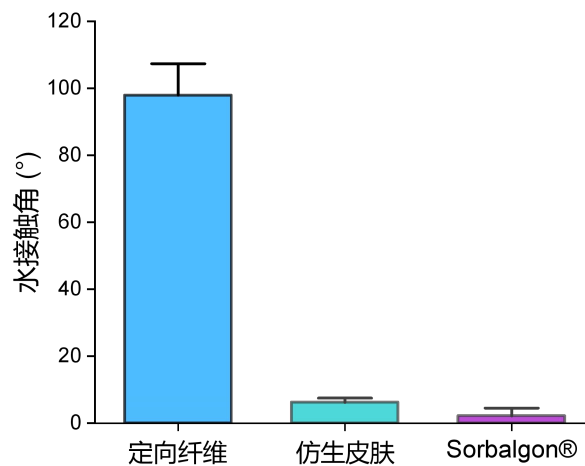


图 22 定向纤维、仿生皮肤和 Sorbalgon®敷料的水接触角统计结果

5.4 仿生皮肤的细胞毒性评价

材料的细胞毒性是指某种材料对生物细胞产生有害影响的能力。当材料与生物细胞接触时，材料可能会对细胞的生存、生长、代谢和功能产生不利影响，导致细胞损伤或死亡。因此，细胞毒性是评估材料生物相容性和安全性的重要指标。

本研究中，我们利用人脐静脉内皮细胞进行仿生皮肤的细胞毒性测试。选用此细胞是因为内皮细胞在糖尿病足溃疡伤口修复的过程中扮演着关键的角色：一方面，在伤口修复的早期阶段，内皮细胞通过增殖和迁移组织成新的血管结构，为修复区域提供氧气和营养物质，有助于伤口愈合[11]；另一方面，内皮细胞在伤口修复过程中还可以合成和释放包括胶原蛋白和纤维蛋白等的细胞外基质，这

些物质在创伤修复和组织再生中起着重要作用[12]。

在实验过程中,我们将内皮细胞以 1×10^5 个/孔的细胞密度接种于 48 孔板内,待细胞完全贴壁后向孔板内加入已预先经过紫外消毒灭菌的仿生皮肤。在仿生皮肤与内皮细胞共孵育 1 天和 3 天后,取样进行染色观察,并进行细胞活力测试,以判断我们制备的仿生皮肤是否存在细胞毒性。对内皮细胞的荧光显微镜观察结果显示(图 23),相比于细胞自由生长组,单独的聚乳酸定向纤维膜和仿生皮肤的加入对细胞生长没有明显的抑制作用。三组中细胞数量均大致相当,细胞形态也都表现铺展状态,说明细胞处于良好的生理状态,能够正常黏附和生长。

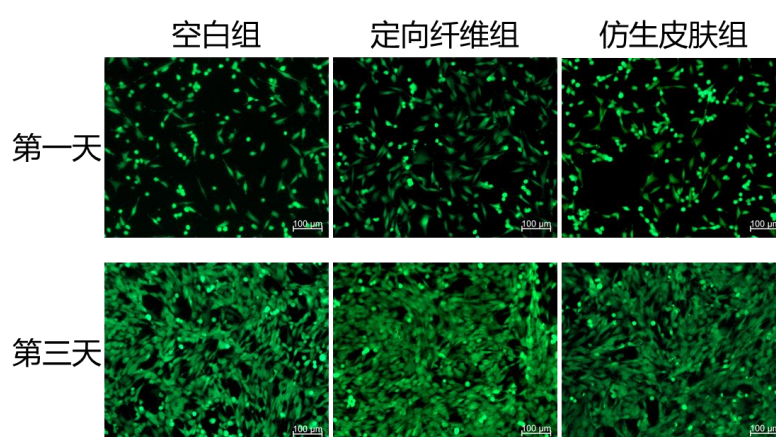


图 23 内皮细胞与聚乳酸定向纤维和仿生皮肤共培养 1 天和 3 天的荧光显微镜图像

利用 CCK-8 试剂,我们测定了与聚乳酸定向纤维和仿生皮肤共培养 1 天和 3 天的内皮细胞的细胞存活率。如图 24 所示,共培养 1 天后,聚乳酸定向纤维组和仿生皮肤组的内皮细胞存活率分别为 98.4%和 96.9%。共培养 3 天后,聚乳酸定向纤维组和仿生皮肤组的内皮细胞存活率分别为 94.4%和 89.9%。此结果说明与聚乳酸定向纤维和仿生皮肤共培养后内皮细胞具有良好的生存和增殖活力,聚乳酸定向纤维和仿生皮肤并无明显的细胞毒性。

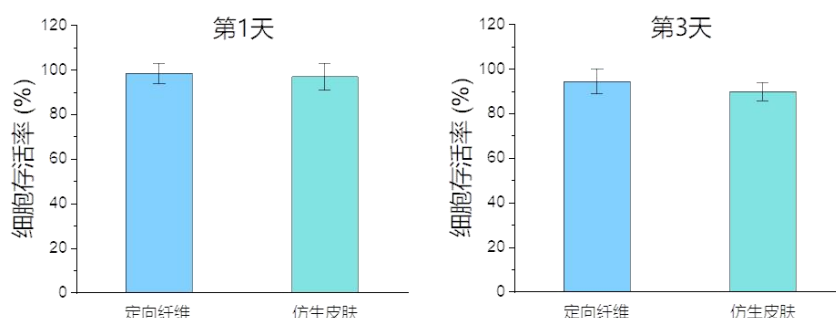


图 24 内皮细胞与聚乳酸定向纤维和仿生皮肤共培养 1 天和 3 天的细胞存活率

5.5 仿生皮肤中定向聚乳酸纤维层对成纤维细胞生长和迁移方向的引导作用

在生物医学和生物工程领域，定向纤维常用于组织再生、细胞培养和局部治疗等方面，其能对细胞行为产生较大影响。细胞在定向纤维表面上可能会显示出明显的方向性迁移，纤维的定向程度可以影响细胞的迁移方向和速度。当细胞与定向纤维平行排列时，它们可能会沿着纤维的方向迁移，这被称为定向性迁移。此外，定向纤维表面的物理特性也可能对细胞黏附和迁移产生影响，这种影响反映在细胞与纤维之间的相互作用，通过细胞-细胞连接、细胞-基质连接等方式影响细胞的迁移与增殖[13]。

为考察仿生皮肤底部的载药聚乳酸定向纤维能否影响成纤维细胞的迁移方向，我们将小鼠胚胎成纤维细胞（3T3 细胞）以 1×10^5 /孔的密度接种于所制备的定向纤维膜上，待细胞完全贴附后再使其于纤维膜上生长 24 小时，随后利用 10% 的戊二醛固定细胞形貌并进行二脒基苯基吡啶（DAPI）和罗丹明标记的鬼笔环肽染色。对染色后的细胞形态进行荧光显微镜观察可以发现（图 25），3T3 细胞在无规纤维膜上的生长呈现无序状态，伸展成长梭形的细胞和未伸展的圆形细胞比例各半。而接种于定向纤维的 3T3 细胞的排布具有明显的方向性，其大都沿纤维的定向方向生长，且绝大多数细胞都呈现长梭形的细胞形态。这一方面可能是由于成纤维细胞自身的定向生长特性，因为在许多组织中细胞外基质具有明显的定向结构，特别是胶原蛋白纤维。这些纤维提供了一种指导成纤维细胞生长方向的框架，成纤维细胞会沿着这些纤维的方向生长以适应组织结构和提供支持。另一方面可能是因为成纤维细胞自身能够感受和适应胞外基质的变化，在定向纤维膜上生长时可以通过细胞自身调节或与其他细胞相互作用来协调生长的方向性。

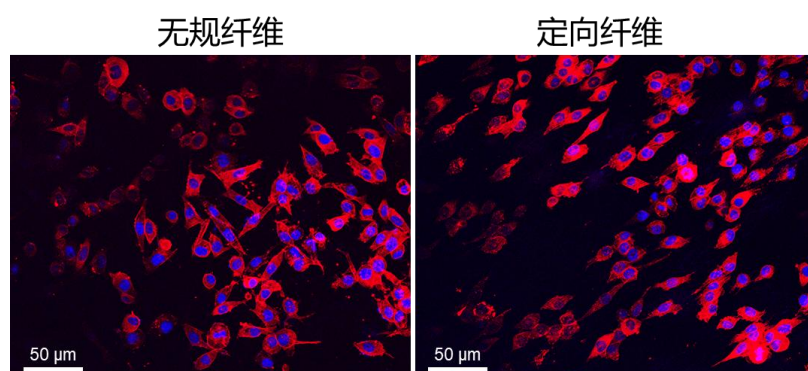


图 25 成纤维细胞在无规纤维膜和定向纤维膜上生长的荧光显微镜图像

此外,我们还利用扫描电子显微镜进一步观察了成纤维细胞在聚乳酸定向纤维膜上的生长状况。扫描电子显微镜结果也同样表明 3T3 细胞在无规纤维膜上的生长没有明显的方向性,而在定向纤维膜上其生长方向与纤维的定向方向相同(图 26),这再一次验证了聚乳酸定向纤维膜对成纤维细胞生长和迁移方向的引导作用。

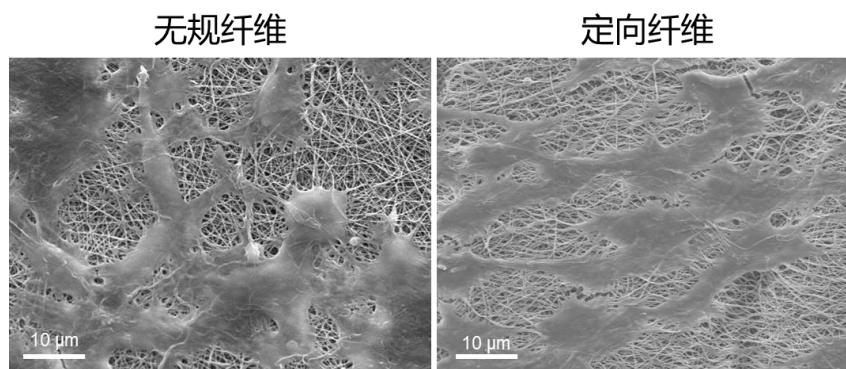


图 26 成纤维细胞在无规纤维膜和定向纤维膜上生长的扫描电子显微镜图像

以上实验结果表明,仿生皮肤中的定向聚乳酸纤维层对成纤维细胞生长和迁移方向具有引导作用,其原因可能是定向聚乳酸纤维层具有明显的纤维定向结构,类似于天然的细胞外基质[14]。这种纤维定向结构为成纤维细胞提供了一个导向框架,使它们可以沿着纤维方向生长。同时,聚乳酸是一种生物可降解材料,对大多数细胞具有良好的生物相容性。这意味着成纤维细胞可以在其表面生长,而不会因内毒素积累等原因死亡。由此我们认为,利用聚乳酸定向纤维作为载药仿生皮肤的底层是一个合适的选择。

5.6 仿生皮肤的抗菌效果考察

本研究所设计的载药仿生皮肤中壳聚糖凝胶层具有一定的抗菌能力。在中性或弱酸性条件下,壳聚糖的抗菌能力主要来自于其分子结构中的大量氨基和羟基,这些官能团使得壳聚糖带有正电荷。细菌表面通常带有负电荷,壳聚糖与细菌表面相互作用能引起细菌细胞膜破坏或细菌细胞膜的渗透性增加,从而导致细菌死亡[15]。对于糖尿病足溃疡患者来说,仿生皮肤中壳聚糖凝胶的抗菌作用可以减少伤口内的细菌负荷,改善伤口环境,有利于细胞增殖和组织修复,从而促进伤口的愈合。此外,仿生皮肤中壳聚糖凝胶层的引入也可以帮助控制感染引起的炎症反应,减轻糖尿病足溃疡患者的症状和不适。

在对仿生皮肤的抗菌效果的测试中,我们选取大肠杆菌这一伤口常见细菌作

为模型菌，进行平板涂覆抗菌实验，并对与材料相孵育后平板中的菌落生长状况进行了观察。结果显示（图 27），聚乳酸定向纤维组和 Sorbalgon®敷料组对细菌生长的抑制效果并不显著，涂覆平板后大肠杆菌的菌落数量依然很多。与之形成鲜明对比的是，仿生皮肤组中菌落数量稀少，抑菌效果显著。这可能是仿生皮肤中的壳聚糖凝胶层发挥了抑制大肠杆菌生长和破坏大肠杆菌细胞壁的作用。

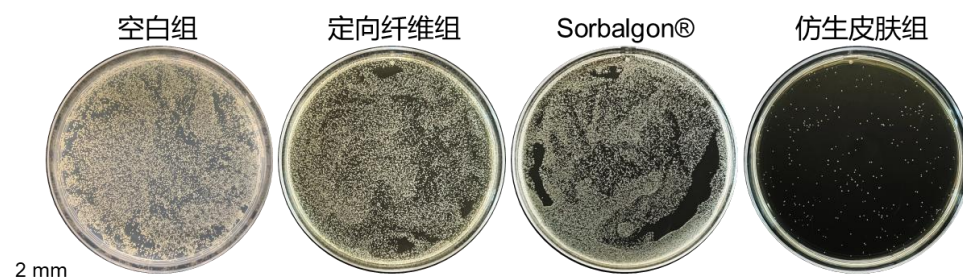


图 27 聚乳酸定向纤维、Sorbalgon®敷料和仿生皮肤抑制大肠杆菌的平板涂覆照片

为了确定仿生皮肤对大肠杆菌的抑制作用是阻止大肠杆菌分裂还是直接导致细菌死亡，我们对与聚乳酸定向纤维、Sorbalgon®敷料和仿生皮肤共孵育 1 天后的大肠杆菌进行了活/死荧光染色，并观察与各组材料共孵育后大肠杆菌的存活状态。利用绿色荧光核酸染料 SYTO9 和碘化吡啶（PI）染色可以同时评估大肠杆菌的细菌活力和大肠杆菌的死亡情况，以此直观反映仿生皮肤的抑菌效果。染色后在荧光显微镜下观察细菌我们可以发现，对照组、聚乳酸定向纤维组和 Sorbalgon®敷料组中的大肠杆菌基本存活（绿色），仅有少量死细菌能被观察到（红色）。但在仿生皮肤组中，我们观察到了大量的死亡大肠杆菌，仅剩余少量大肠杆菌存活（图 28）。这个结果说明相比于临床治疗糖尿病足溃疡患者的 Sorbalgon®敷料，我们制备的仿生皮肤能够通过杀死细菌的方式抑制细菌生长。

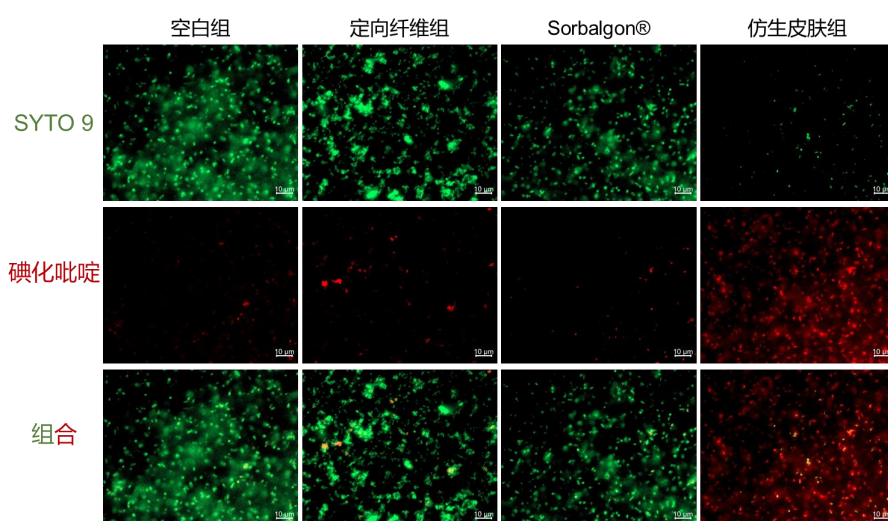


图 28 SYTO9/PI 对大肠杆菌染色的荧光显微镜图像

为了进一步验证仿生皮肤对细菌的抑制效果是否是由其中的壳聚糖凝胶层带来的,我们利用扫描电子显微镜观察了与仿生皮肤顶部凝胶层接触培养后的大肠杆菌。如图 29 所示,在和正常培养的大肠杆菌比较后,我们很容易观察到与仿生皮肤顶部凝胶层接触培养的大肠杆菌细菌表面出现了大量褶皱和凹陷,这表明大肠杆菌的细菌细胞壁已经遭到破坏。此现象与壳聚糖的抗菌原理吻合[15],据此可以初步判断仿生皮肤的抗菌效果来源于顶部的壳聚糖凝胶层。

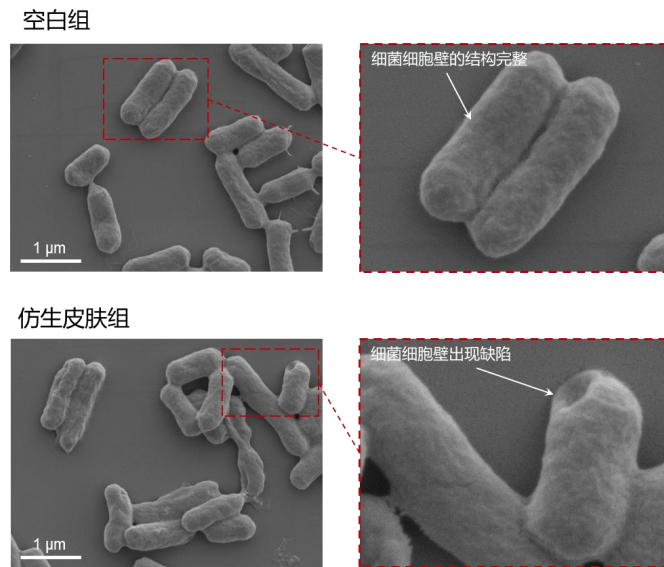


图 29 正常大肠杆菌和与仿生皮肤中壳聚糖凝胶接触培养大肠杆菌的扫描电子显微镜图像

以上实验结果表明,我们所制备的仿生皮肤具有抑制细菌生长的能力,其抑菌能力来自于仿生皮肤顶部的壳聚糖凝胶层。与临床治疗糖尿病足溃疡的 Sorbalgon®敷料相比,仿生皮肤的使用能在很大程度上降低糖尿病足溃疡创口的感染风险,从而促进糖尿病足溃疡创口愈合。

5.7 糖尿病小鼠模型及溃疡创口的建立

糖尿病患者足溃疡难以愈合是由于高血糖导致了多种生理改变,包括免疫功能下降、血液供应不足、神经病变等。为了更贴近糖尿病患者的真实足溃疡伤口情况,我们通过高脂高糖饮食和链脲佐菌素注射两种方式诱发小鼠糖尿病,并建立标准伤口模型,以此模拟糖尿病足溃疡伤口。

在对小鼠血糖的持续监测中我们发现(图 30),正常小鼠的血糖值介于 6.0~8.3 毫摩尔/升的范围内,采样时间和小鼠饮食会导致血糖值发生变化,但血

糖值始终没有超过 8.3 毫摩尔/升。采取高脂高糖饮食的小鼠在两周内血糖水平从初始的 6.8 毫摩尔/升（第 1 天）上升至 13.8 毫摩尔/升（第 14 天），已经满足糖尿病标准。但是，我们发现如果将小鼠饮食恢复正常的糖、脂水平或空腹 12 小时后测量，其血糖值也会下降达到正常水平，这与糖尿病患者的真实情况不符。推测可能是两周的高脂高糖饮食诱导不足以完全使小鼠产生胰岛素抵抗，若要完全模拟人类肥胖和胰岛素抵抗的发生可能还需增加高脂高糖饮食的饲养时间。

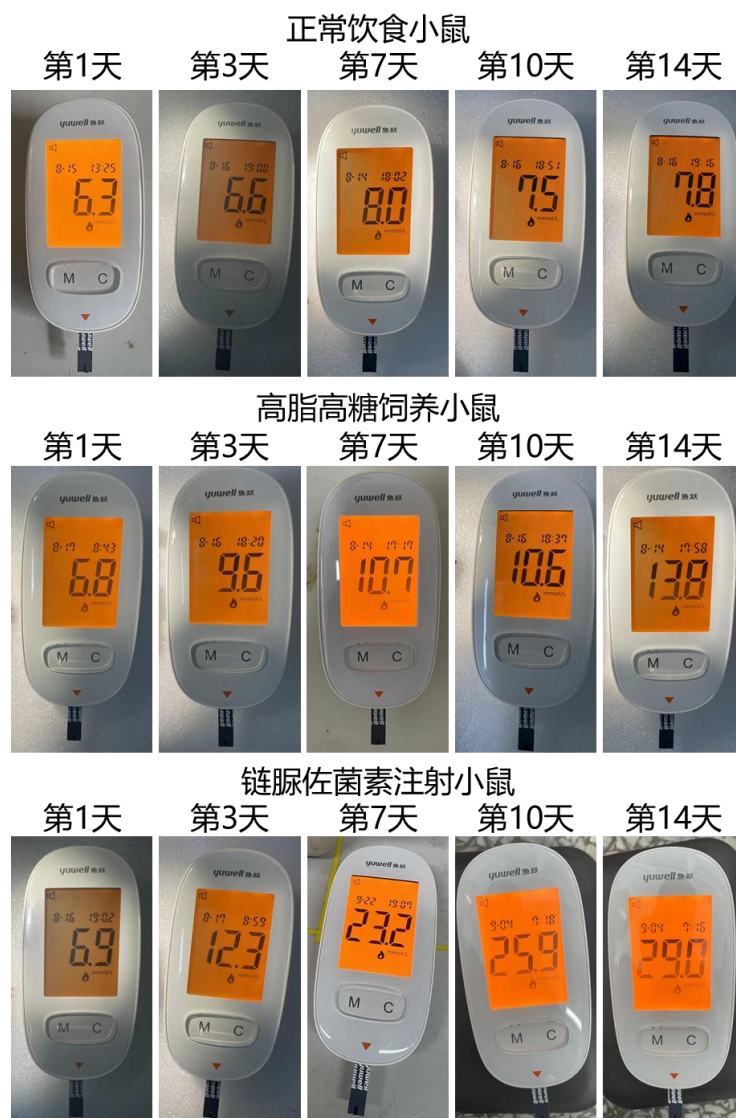


图 30 对正常小鼠、高脂高糖饲养小鼠和链脲佐菌素注射小鼠的 14 天血糖监测

在此情况下，我们选择对小鼠进行腹腔注射链脲佐菌素，期望通过破坏小鼠胰岛的 β 细胞，使胰岛素分泌减少，从而引起糖尿病[16]。结果发现，在注射第 3 天时，小鼠的空腹血糖即飙升至 12.3 毫摩尔/升，达到高血糖标准；注射 7 天到 14 天内，小鼠的空腹血糖值均超过 20 毫摩尔/升，符合糖尿病患病标准（图 31）。

至此，我们可以确定糖尿病小鼠模型已成功建立。

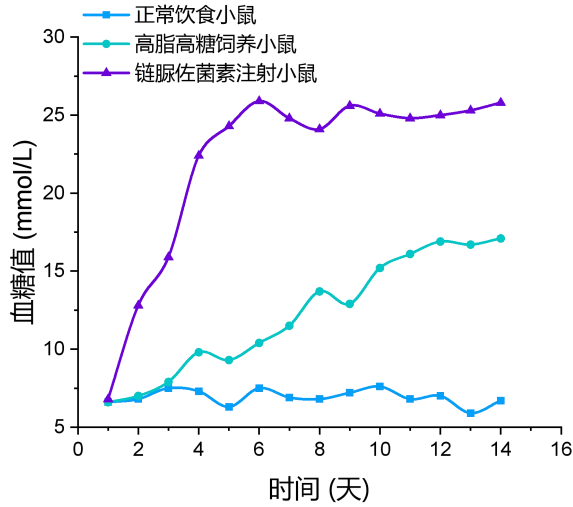


图 31 正常小鼠、高脂高糖饲养小鼠和链脲佐菌素注射小鼠的 14 天血糖变化

随后，我们在糖尿病小鼠背部建立了标准伤口模型来模拟糖尿病患者的足溃疡创口。建立模型前先将糖尿病小鼠置于气体麻醉机中使其吸入异氟烷麻醉，然后剔除小鼠背部毛发以便后续手术操作和伤口观察。利用打孔器和手术剪刀在糖尿病小鼠背部建立直径为 8 毫米深度为 1 毫米的圆形伤口，并分别在不同糖尿病小鼠伤口处贴附载药聚乳酸定向纤维、Sorbalgon®敷料和载药仿生皮肤（图 32），观察 10 天内小鼠的伤口愈合情况，评估载药仿生皮肤是否能够促进糖尿病足溃疡愈合。

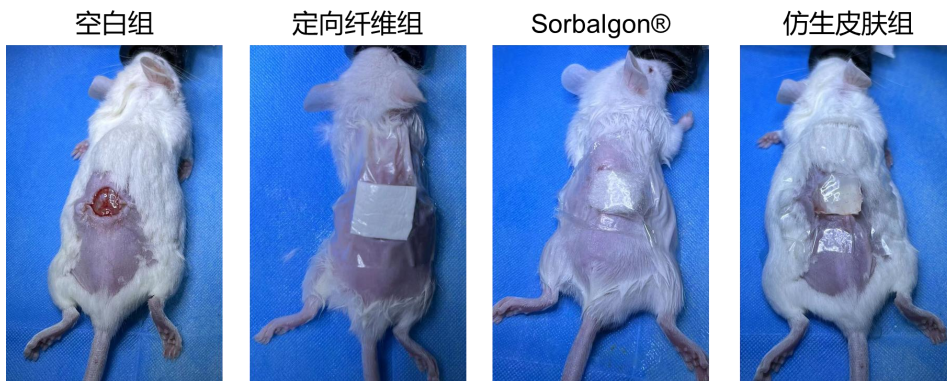


图 32 载药聚乳酸定向纤维、Sorbalgon®敷料和载药仿生皮肤贴附于糖尿病小鼠背部创口的照片

5.8 载药仿生皮肤促进糖尿病小鼠创口愈合

在糖尿病小鼠创口处贴附了载药聚乳酸定向纤维、Sorbalgon®敷料和载药仿

生皮肤后，我们连续 10 天观察并记录了小鼠创口的愈合情况。从拍摄的实物照片和所绘制的伤口变化轨迹图中（图 33）发现，在初始创口尺寸一致的情况下，载药仿生皮肤组小鼠的创口愈合速度最快，第 8 天时伤口的结痂脱落，第 10 天时伤口全部闭合，几乎已恢复到正常状态。载药聚乳酸定向纤维和 Sorbalgon® 敷料组对于糖尿病小鼠创口愈合的促进效果类似，第 10 天时，伤口依然处于结痂状态。对照组小鼠伤口愈合速度缓慢，第 10 天时伤口处依然存在红肿和渗液现象，说明伤口处依然存在炎症。

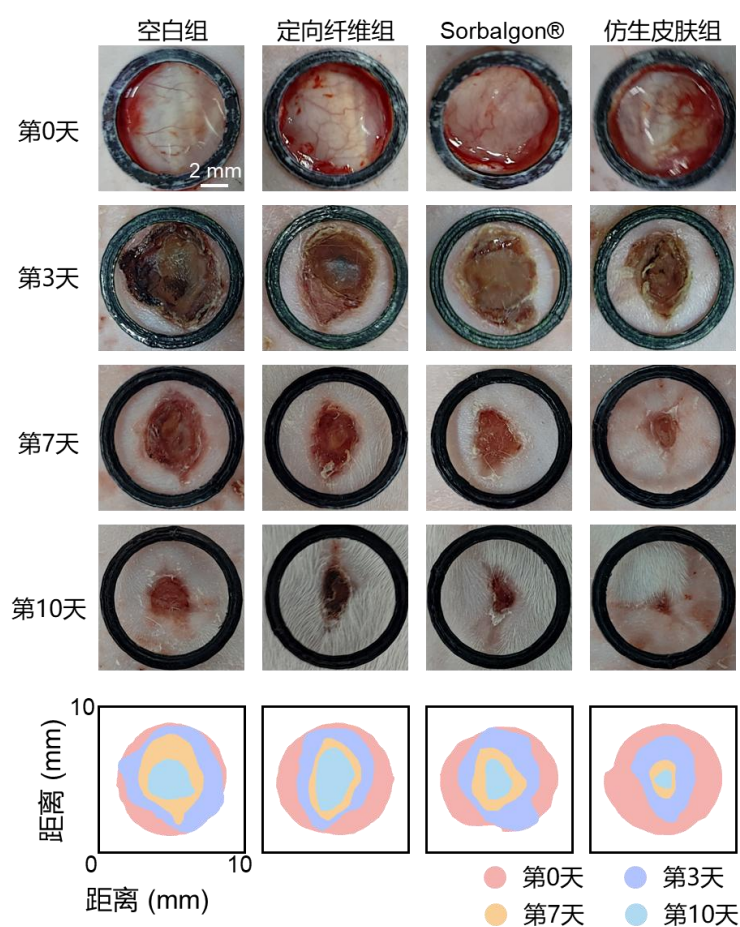


图 33 载药聚乳酸定向纤维、Sorbalgon®敷料和载药仿生皮肤贴附后糖尿病小鼠伤口 10 天内变化的照片和伤口轨迹变化图

为了进一步比较不同伤口敷料对糖尿病小鼠伤口愈合促进作用的差异，在第 10 天时，我们收集了 4 组不同治疗方式小鼠的伤口部位组织分别进行了苏木精-依红染色、Masson 染色和 CD31 染色观察。

苏木精-依红染色是一种常用的组织学染色方法，通过染色可以清晰地观察组织的整体结构、细胞形态和组织器官的组织学特征，是组织学研究中常用的基

基础染色方法。经过固定组织、去水、包埋、切片、苏木精染色、伊红染色、脱色和封片等步骤后，我们获得了小鼠创口组织的苏木精-依红染色切片。如图 34 所示，载药仿生皮肤组小鼠的创口已完全被表皮组织覆盖，其细胞形态结构完整，没有大量免疫细胞聚集，可以判断经载药仿生皮肤治疗的小鼠创口已基本痊愈。相比较而言，对照组、载药聚乳酸定向纤维和 Sorbalgon®敷料组的苏木精-依红染色切片中可以观察到皮肤组织的缺失，说明载药聚乳酸定向纤维和 Sorbalgon®敷料对创口愈合的促进作用有限。

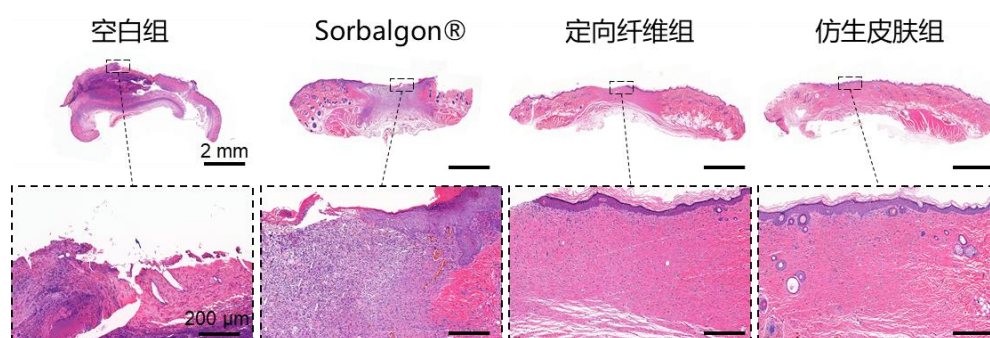


图 34 载药聚乳酸定向纤维、Sorbalgon®敷料和载药仿生皮肤治疗 10 天后小鼠的苏木精-依红染色切片

根据苏木精-依红染色切片，我们统计了不同治疗组中创口的内皮覆盖程度，来说明创口的恢复情况。如图 35 所示，载药仿生皮肤治疗组的内皮覆盖程度最高，其平均值达到了 92.1%。然而，对照组、载药聚乳酸定向纤维组和 Sorbalgon®敷料组的内皮覆盖程度分别为 74.5%，87.2%和 85.0%。这一结果表明我们所制备的载药仿生皮肤确有促进糖尿病小鼠创口愈合的作用。

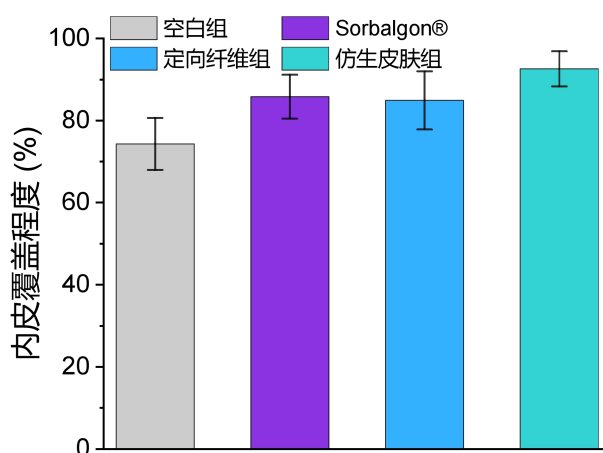


图 35 载药聚乳酸定向纤维、Sorbalgon®敷料和载药仿生皮肤治疗 10 天后糖尿病小鼠

创口的内皮覆盖程度统计

胶原是组织的主要结构蛋白，可以为细胞提供支持和稳定的结构。在伤口愈合过程中，胶原沉积形成了临时的结缔组织，用于填补伤口并提供必要的结构支撑，有助于恢复受损组织的完整性[17]。同时，胶原沉积会产生胶原纤维的收缩和重排，这有助于伤口的收缩，加快愈合过程。

为了考察不同治疗组中胶原的沉积情况，我们对 4 组治疗小鼠的 Masson 染色切片进行了观察。如图 36 所示，载药仿生皮肤组小鼠的 Masson 染色切片中可以明显观察到大量的甲苯胺蓝着色，说明其创口处有大量成纤维细胞和胶原沉积，创口恢复情况良好。甚至在创口处还能观察到毛囊结构，表明其创口已几乎痊愈。而对照组、载药聚乳酸定向纤维组和 Sorbalgon®敷料组的 Masson 染色切片中可以观察到较多红色区域，在取样厚度相同的情况下，说明这些样片组织中肌纤维占多数，表皮层并没有被完全重建。

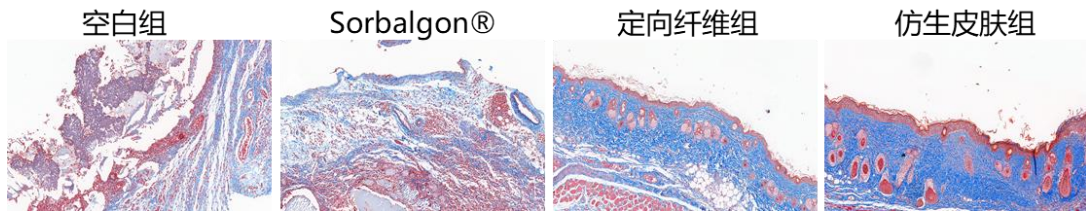


图 36 载药聚乳酸定向纤维、Sorbalgon®敷料和载药仿生皮肤治疗 10 天后小鼠的 Masson 染色切片

血管重建对于伤口修复至关重要，通过促进新血管的生成和维持充足的血液供应，血管重建为伤口恢复提供了必要的生理条件 [18]。CD31 是内皮细胞特异性的标记物，也称为血管内皮细胞抗原 1，它在内皮细胞表面广泛表达，是血管内皮细胞的标志性分子。因此，CD31 染色方法可以帮助确定组织中的血管结构，并评估血管密度。对各治疗组的 CD31 染色切片观察可以发现，载药仿生皮肤组小鼠中能明显观察到被着色（棕色）的内皮细胞组成的环形管状结构，说明糖尿病小鼠创口处已初步形成了新生血管（图 37）。

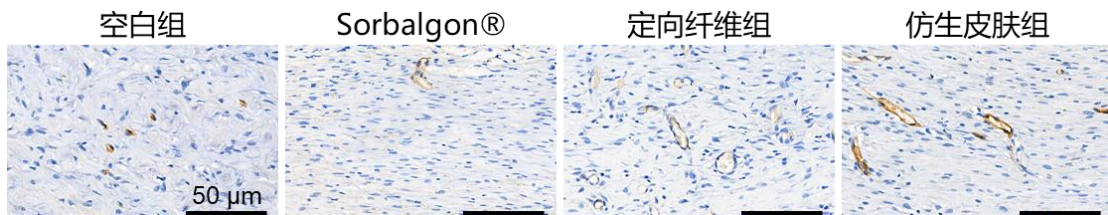


图 37 载药聚乳酸定向纤维、Sorbalgon®敷料和载药仿生皮肤治疗 10 天后小鼠的 CD31

染色切片

对各组切片中 CD31 阳性率统计的结果显示（图 38），载药仿生皮肤组的 CD31 阳性率约为 6%，在各组中最高。值得注意的是，载药聚乳酸定向纤维治疗的小鼠中 CD31 也有高阳性表达（约为 5.3%）。考虑到定向结构纤维对细胞生长方向的调控作用和血管中内皮细胞与平滑肌细胞排布的方向性，我们认为定向结构的载药聚乳酸纤维也在一定程度上具备促进血管再生的能力，这同样有助于加速糖尿病足溃疡创口的愈合。

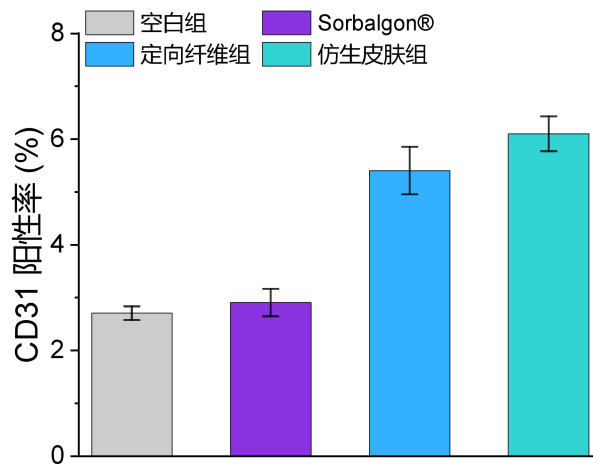


图 38 载药聚乳酸定向纤维、Sorbaldgon®敷料和载药仿生皮肤治疗 10 天后糖尿病小鼠创口的 CD31 阳性率统计结果

六、结论

本研究从材料制备、细胞实验和动物模型三个方面，探讨了载药仿生皮肤对于糖尿病足溃疡创口的愈合促进效果，基于实验结果和与临床治疗糖尿病患者足溃疡常用的 Sorbaldgon®敷料的比较中得出如下结论：

（1）我们制备的载药仿生皮肤能够通过底层载药聚乳酸定向纤维促进基质细胞向糖尿病足溃疡伤口处增殖、迁移，并且载药仿生皮肤顶层的壳聚糖凝胶具有广谱抗菌作用，可以降低伤口处感染风险。

（2）在促进基质细胞迁移、增殖和抗足溃疡部位细菌感染的双重作用下，载药仿生皮肤能够加速糖尿病患者足溃疡创口愈合，且其效果优于临床中常用的 Sorbaldgon®敷料。

（3）该载药仿生皮肤在糖尿病足溃疡创口修复治疗方面有广阔的应用前景。

七、参考文献

1. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the international diabetes federation diabetes atlas, 9th Edition. *Diabetes Res. Clin. Pr.*, 2019,157,107843.
2. Armstrong D.G., Boulton A., Bus S.A. Diabetic foot ulcers and their recurrence. *N. Engl. J. Med.*, 2017, 376 (24): 2367-2375.
3. Saluja S., Anderson S.G., Hambleton I., et al. Foot ulceration and its association with mortality in diabetes mellitus: A Meta-analysis. *Diabet Med.*, 2020, 37(2): 211-218.
4. Fernando M.E., Crowther R.G., Lazzarini P.A., et al. Plantar pressures are higher in cases with diabetic foot ulcers compared to controls despite a longer stance phase duration. *BMC Endocr Disord*, 2016, 16(1): 51.
5. Shettigar K., Murali T.S. Virulence factors and clonal diversity of staphylococcus aureus in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.*, 2020, 39(12): 2235-2246.
6. Falanga V., Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 2005, 366(11): 1736-1743.
7. Grennan D. Diabetic foot ulcers. *JAMA*, 2019, 321 (1):114.
8. He Y., Tian M., Li X., et al. A hierarchical - structured mineralized nanofiber scaffold with osteoimmunomodulatory and osteoinductive functions for enhanced alveolar bone regeneration. *Adv. Healthc. Mater.*, 2022, 11(3): 2102236.
9. Liu Z., Wan X., Wang Z.L., et al. Electroactive biomaterials and systems for cell fate determination and tissue regeneration: design and applications. *Adv. Mater.*, 2021, 33(32): 2007429.
10. Yuk H., Wu J., Zhao X. Hydrogel interfaces for merging humans and machines. *Nat. Rev. Mater.*, 2022, 7(12): 935-952.
11. Shen H., Fan C., You Z., et al. Advances in biomaterial - based spinal cord injury repair. *Adv. Funct. Mater.*, 2022, 32(13): 2110628.

12. Li R., Liu K., Huang X., et al. Bioactive materials promote wound healing through modulation of cell behaviors. *Adv. Sci.*, 2022, 9(10): 2105152.
13. Wang Y., Cui H., Esworthy T., et al. Emerging 4D printing strategies for next - generation tissue regeneration and medical devices. *Adv. Mater.*, 2022, 34(20): 2109198.
14. Snyder Y., Jana S. Strategies for development of synthetic heart valve tissue engineering scaffolds. *Prog. Mater. Sci.*, 2023(1): 101173.
15. Duan S., Wu R., Xiong Y.H., et al. Multifunctional antimicrobial materials: From rational design to biomedical applications. *Pro. Mater. Sci.*, 2022(17), 125: 100887.
16. Zhang Y., Han S., Liu C., et al. THADA inhibition in mice protects against type 2 diabetes mellitus by improving pancreatic β -cell function and preserving β -cell mass. *Nat. Commun.*, 2023, 14(1): 1020.
17. Saghadzadeh S., Rinoldi C., Schot M., et al. Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2018(22), 127: 138-166.
18. Falanga V., Isseroff R.R., Soulika A.M., et al. Chronic wounds. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2022, 8(1): 50.

八、致谢

本研究报告的选题和研究背景来源于：1.对糖尿病足溃疡患者痛苦的目睹。当我因为偶然的机会有幸亲眼目睹医院中糖尿病足溃疡患者的换药过程后，我震惊于这种疾病对患者造成的巨大痛苦。在与临床医生的交流和指导老师的建议下，我决定尝试探索新型的用于糖尿病足溃疡修复的伤口敷料。2.对仿生医学的兴趣。仿生医学是医学、生物学和工程学相结合的学科，旨在通过模仿自然生物体的结构和功能解决医学问题。在人工器官、组织修复和假肢辅助装置等方面，科学家们已经研发出了一些仿生替代产品。但在解决糖尿病足溃疡修复的难题上，目前很少见到使用仿生材料的案例。因此，本研究以仿生材料为基础，尝试构建人工仿生皮肤对糖尿病足溃疡进行修复，期望为糖尿病足溃疡的快速修复提供一种新的解决方案。3.对文献的查询与阅读。从文献阅读中可以发现糖尿病足溃疡修复方面的已有研究成果和存在的问题，为本研究报告提供了知识背景和信息支持。

在此，我要感谢成都七中提供的研究性学习机会。感谢指导老师袁智城和张景浩对我的耐心指导和帮助。整个研究过程中老师们耐心且无偿的指导体现了对我成长的关心和支持，他们的教诲对我学术素养和研究能力的提升起到了重要作用。其次，我还要感谢西南交通大学材料先进技术教育部重点实验室提供的学习条件。在实验室中，我得以接触到最前沿的科研设备和技术，为我的研究提供了良好的平台支撑。最后，我要感谢西南交通大学李西林博士的耐心指导。研究过程中，李西林博士在静电纺丝装置的搭建、细胞培养与观察、细菌平板涂覆、糖尿病小鼠模型建立、免疫组化样本制备和数据处理等方面给予了我很多指导。

我希望这份研究报告能够为糖尿病足溃疡的修复提供一定的启示和帮助，为早日攻克糖尿病足溃疡这一难题做出微小贡献。

作者贡献说明：袁智城和张景浩二位老师是成都市第七中学教师，与我是师生关系。在本研究中，袁智城老师指导了我的论文的选题、研究背景调研和实验过程，张景浩老师在本研究的实验设计和论文报告撰写规范方面给予了我许多指导和帮助，二位老师对我的所有指导均是无偿的。李西林博士对本研究中人工仿生皮肤纤维的制备、细胞实验、动物实验操作以及相应数据分析对本人进行了无偿的讲解与教学。本人全程参与了论文的选题调研、全部实验的开展和研究报告的写作工作。

九、实验伦理声明

本人郑重声明在进行小鼠实验时遵守以下伦理准则，以确保动物福利和道德标准的尊重：

实验目的与科学价值：本实验旨在构建新型人工仿生皮肤用于糖尿病足溃疡修复。实验具有明确的科学目标，并在可能的情况下优先考虑使用替代方法，最大限度地减少动物使用数量。

动物福利：实验用小鼠均在合适的动物设施中饲养，提供充足的食物和水，以及适宜的环境条件，确保它们的健康和舒适。

最小化痛苦：我们采取了合理的措施来减轻小鼠的痛苦和不适。在实验过程中，严格遵循适当的麻醉、镇痛和麻醉复苏方案，并尽可能缩短实验过程。

伦理审查：本实验已经通过西南交通大学伦理委员会的伦理审查并获得许可。

数据共享：本研究的相关数据和研究结果可以分享给其他研究人员及研究机构。

道德责任：实验过程中我们充分尊重动物的权益和利益，保持高度的道德责任感。本人在进行动物实验前接受了相关的操作培训和伦理培训。