

参赛队员姓名：唐祺瑶

中学：上海民办包玉刚实验高中

省份：上海

国家/地区：中国

指导教师姓名：王启刚、李曦

指导教师单位：同济大学化学科学与工程学院、上海民办包玉刚实验高中

论文题目：多功能铈纳米酶水凝胶的构建及其在皮肤损伤修复中的微环境调控机制研究

多功能铈纳米酶水凝胶的构建 及其在皮肤损伤修复中的微环境调控机制研究

唐祺瑶

摘要

皮肤损伤修复是一个涉及氧化应激、炎症反应和细菌感染等多重因素的复杂生理过程。传统敷料难以主动调控创伤微环境，尤其是清除过量活性氧（ROS）并缓解其引发的炎症与感染问题。本研究旨在开发一种多功能铈纳米酶复合水凝胶，通过协同抗氧化、抗炎与抗菌作用，重塑损伤微环境，促进皮肤组织再生。

我们首先通过配位覆盖法与表面修饰技术，成功制备了超支化聚-L-赖氨酸修饰的氧化铈纳米颗粒（CeO₂-HBPL），其水合粒径约为 303.84 nm，Zeta 电位显著提高，分散性与稳定性良好。进一步将其与甲基丙烯酸酐化明胶（GelMA）和甘草酸（GA）复合，利用可见光交联技术构建了 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 复合水凝胶。该水凝胶具备优异的组织粘附性、生物相容性和与皮肤相似的力学性能。

体外实验表明，CeO₂-HBPL 能有效清除 ROS，降低 L929 细胞在氧化应激下的损伤；同时表现出显著抗菌性能，对大肠杆菌抑制效果明显。巨噬细胞极化实验显示，该水凝胶能促进 M1 型向 M2 型转化，表明其具有良好的抗炎与免疫调节功能。此外，Ki67 染色证实该材料能显著促进成纤维细胞增殖。

通过建立 C57BL/6 小鼠全层皮肤缺损模型，体内实验进一步验证了该水凝胶的修复效果。术后 21 d，CeO-HBPL/GA/GelMA 组创面愈合完全，瘢痕不明显，H&E 与 Masson 染色显示其表皮结构完整、真皮层炎症细胞浸润少、胶原纤维沉积量高且排列有序，最接近正常皮肤组织结构。

本研究创新性地将铈纳米酶与生物水凝胶结合，突破了传统敷料的被动保护局限，实现了对皮肤损伤微环境的主动调控与多功能协同治疗，为临床难愈性创面修复提供了一种具有潜力的新材料策略。

关键词：铈纳米酶；水凝胶；伤口愈合；抗氧化；免疫调控；

目录

第 1 章绪论.....	1
1.1 研究背景与意义.....	1
1.2 皮肤损伤愈合的过程及特点.....	1
1.3 纳米酶与水凝胶在损伤修复中的研究进展.....	2
1.3.1 纳米酶催化治疗.....	2
1.3.2 水凝胶材料.....	3
1.4 本课题研究目的与内容.....	3
1.4.1 研究目的.....	3
1.4.2 研究内容.....	3
第 2 章 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 水凝胶的制备与表征.....	6
2.1 引言.....	6
2.2 实验试剂与仪器.....	7
2.2.1 实验试剂与耗材.....	7
2.2.2 实验仪器与设备.....	7
2.3 实验方法.....	8
2.3.1 CeO ₂ 与 CeO ₂ -HBPL 的制备.....	8
2.3.2 CeO ₂ 与 CeO ₂ -HBPL 的表征.....	8
2.3.3 GelMA 的制备.....	9
2.3.4 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 水凝胶的制备.....	9
2.3.5 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 水凝胶的表征.....	10
2.3.6 数据分析.....	10
2.4 结果与讨论.....	11
2.4.1 CeO ₂ 与 CeO ₂ -HBPL 的形貌、晶型与表面性质分析.....	11
2.4.2 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 水凝胶的微观结构与力学性能.....	13
第 3 章 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 水凝胶的体外抗氧化、抗炎及抗菌作用.....	16
3.1 引言.....	16
3.2 实验试剂与仪器.....	16
3.2.1 实验试剂与耗材.....	16
3.2.2 实验仪器与设备.....	17

3.3 实验方法.....	17
3.3.1 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 对小鼠成纤维细胞系（L929）的体外毒性实验.....	17
3.3.2 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 调节 L929 细胞系氧化应激水平实验.....	18
3.3.3 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 调控 THP-1 巨噬细胞表型实验.....	18
3.3.4 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 对大肠杆菌的抑制实验.....	18
3.3.5 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 对 L929 细胞系的增殖实验.....	18
3.3.6 数据分析.....	19
3.4 结果与讨论.....	19
3.4.1 生物相容性影响.....	19
3.4.2 抗氧化应激水平的评估.....	20
3.4.3 抗炎与免疫调节性能分析.....	21
3.4.4 抑制能力评估.....	22
3.4.5 促细胞增殖能力评估.....	23
3.5 本章小结.....	23
第 4 章 CeO ₂ -HBPL/GA/GelMA 水凝胶的体内皮肤损伤修复效果评估.....	25
4.1 引言.....	25
4.2 实验试剂与仪器.....	25
4.2.1 实验试剂与耗材.....	25
4.2.2 实验仪器与设备.....	26
4.3 实验方法.....	26
4.3.1 实验动物分组与模型建立.....	26
4.3.2 创面处理与样本收集.....	27
4.3.3 H&E 染色与组织形态分析.....	28
4.3.4 马松染色与胶原分析.....	29
4.3.5 数据分析.....	30
4.4 结果与讨论.....	30
4.4.1 创面愈合效果.....	30
4.4.2 H&E 染色结果分析.....	31
4.4.3 马松染色结果分析.....	32
4.5 本章小结.....	33
第 5 章总结与展望.....	35

5.1 总结.....	35
5.2 未来展望.....	36
参考文献.....	37
致谢.....	39

2025 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2025丘成桐中学科学奖论文公示

第 1 章绪论

1.1 研究背景与意义

皮肤作为人体最大的器官，发挥着至关重要的屏障作用，不仅能保护内脏、调节体温，还参与免疫反应，帮助我们抵御外界侵害。皮肤受损不仅会对个体的外观造成影响，还可能导致细胞功能的丧失、局部组织的脆弱化，甚至引发感染和其它并发症。据统计，全球每年有数以百万计的患者因创伤、烧伤、糖尿病溃疡等急慢性皮肤损伤而需要医疗干预，给社会医疗系统带来沉重负担 [1]。传统的伤口敷料如纱布、绷带等，主要起被动覆盖和保护作用，难以实现替代皮肤屏障及主动调控创伤区域微环境的功能，对复杂难愈性创面的治疗效果有限。因此，探索有效的创伤修复策略，一直是医学领域研究的重要课题。

近年来，随着材料科学、纳米技术和再生医学的交叉融合，纳米酶和相关材料在创伤修复中取得了显著进展。特别是像具备抗氧化、抗炎、抗菌等多重功能的二氧化铈 (CeO_2) 纳米颗粒，通过表面功能化修饰或其他活性分子符合，可以进一步提升其治疗效果。此外，甲基丙烯酸酐化明胶 (methacrylated gelatin, GelMA)，因其能够为伤口提供结构支撑并通过实现药物缓释来加速伤口愈合，显示出在皮肤损伤修复中的巨大潜力。

基于这些先进技术的复合材料，本研究的目标是制作一种基于 CeO_2 纳米颗粒及其改性材料与 GelMA 水凝胶结合的新型伤口敷料，通过化学设计实现对创伤微环境的主动调控并测试其在伤口愈合中的应用，为皮肤损伤修复提供新的解决方案。

1.2 皮肤损伤愈合的过程及特点

皮肤损伤通常包括机械性创伤、热损伤、化学损伤和病理性损伤等，其愈合是一个高度协调的动态过程，通常分为四个相互重叠的阶段：止血阶段、炎症阶段、增生阶段和重塑阶段[2]。

止血阶段：皮肤损伤后，血管破裂引发血液渗漏，伤口边缘的血小板和白细胞迅速聚集，形成血栓，起到止血作用。此外，血栓中的细胞因子也启动了后续的炎症反应[3]。

炎症阶段：这一阶段中产生的活性氧（ROS）可以帮助清除伤口处的细菌、死细胞及其他杂质，但过量的 ROS 也可能导致细胞损伤延缓愈合进程[4]。

增生阶段：在此阶段，新生的血管开始为损伤区域提供营养和氧气，ROS 有助于调控成纤维细胞的增殖和胶原合成。然而持续氧化则可能会破坏新生血管的形成，影响组织修复[5]。

重塑阶段：此阶段的目标是修复后的组织趋向稳定，并恢复其结构和功能。虽然伤口已经愈合，但在此过程中，伤口部位的皮肤组织仍然会经历一定的重塑，逐渐恢复到与周围组织相似的形态。

由此可见，控制活性氧（ROS）的动态平衡对整个皮肤损伤愈合过程中具有决定性的作用，因此，针对不同类型的皮肤损伤，开发具有干预与调控这一化学微环境功能的治疗材料，对于加速损伤愈合至关重要。

1.3 纳米酶与水凝胶在损伤修复中的研究进展

1.3.1 纳米酶催化治疗

纳米酶是一类具有类酶催化活性的纳米材料，它结合了天然酶的高催化效率和纳米材料的高稳定性、可大规模制备的优点，在伤口修复中展现了显著优势[6]。例如，纳米银、纳米 CeO_2 [7]等具有良好抗菌、抗氧化及催化活性的纳米颗粒，可以有效清除伤口部位的过量 ROS，减轻氧化应激反应，并促进细胞增殖与迁移。此外，纳米颗粒的高比表面积使其与皮肤损伤的接触更加紧密，能够加速药物的释放和生物活性分子的传递。

然而，纯 CeO_2 纳米酶在生理环境中存在易聚集，且功能相对单一等问题，可能导致催化效率较低。通过用聚合物修饰或与天然抗氧化物复合的方法，可改善其分散性并产生协同抗氧化效应。

1.3.2 水凝胶材料

水凝胶作为一种具有良好生物相容性的材料，因其优异的保湿性、低毒性和高机械适应性，广泛应用于伤口敷料。通过调控水凝胶的网络结构、力学性能及药物释放功能，可以有效地促进伤口愈合和防止感染[8]。甲基丙烯酸酯明胶 GelMA 作为一种可调控力学性能和可通过光交联形成三维结构的水凝胶，已经被广泛用于伤口修复[9]。

将纳米材料与水凝胶、聚合物等生物基质复合，能够赋予材料抗菌、抗氧化、促进细胞生长等功能，让这些复合材料不仅能够更好地模拟皮肤组织的微环境，还能通过智能响应外界刺激（如 pH、温度、光照等）来调控伤口修复进程。

1.4 本课题研究目的与内容

1.4.1 研究目的

基于上述科学背景启发，本研究主要目的是通过制备并研究 CeO_2 纳米颗粒及其 HBPL 修饰体在皮肤损伤修复中的应用（如图 1.1 所示），将纳米技术和生物材料的结合，设计并构建一种多功能纳米酶复合水凝胶敷料，并使其实现抗氧化、抗炎、抗菌等多重功能，从而实现皮肤损伤的高效修复与再生。

1.4.2 研究内容

为实现上述目标，本研究将开展以下工作：

（1） CeO_2 纳米颗粒的制备与表征：本研究将采用合成方法制备 CeO_2 纳米颗粒，并利用透射电子显微镜（TEM）、扫描电子显微镜（SEM）、X 射线衍射（XRD）等表征技术，分析 CeO_2 纳米颗粒的形貌、晶型、分散性及比表面积等重要性能。

(2) CeO_2 纳米颗粒的表面功能化修饰：本研究通过超支化聚-L-赖氨酸 (HBPL) 对 CeO_2 纳米颗粒进行表面修饰。提升比表面积和稳定性，增强其清除过量 ROS 的能力。此外，与天然抗炎分子甘草酸 GA 复合，进一步赋予 CeO_2 纳米颗粒抗炎、抗菌等多重生物功能，以增强其在创伤修复中的治疗效果。

(3) GelMA 水凝胶的制备与复合：制备可见光交联的 GelMA 水凝胶，并将 HBPL 修饰的 CeO_2 纳米颗粒与 GA 复合，形成功能化的复合水凝胶材料— CeO_2 -HBPL/GA/GelMA。

(4) 复合材料的性能评估与应用探索：通过调整水凝胶的交联密度、力学性能及与纳米颗粒的结合方式对所制备的复合水凝胶材料进行多维度性能评估，包括使用 CCK-8 试剂盒评估 CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 复合材料对细胞的活力影响。

(5) 复合材料的体外功能验证：通过模拟 ROS 异常积累的病理环境，研究该材料在清除 ROS、缓解细胞损伤中的作用，其次，研究该材料对巨噬细胞极化状态的调节作用，探讨其在炎症反应中的功能，尤其是如何促进抗炎性 M2 型巨噬细胞的生成，从而加速创伤愈合过程。

(6) 复合材料的体内疗效评估：建立小鼠全层皮肤缺损模型，通过苏木精-伊红 (H&E) 染色和马松 (Masson) 染色，从组织形态修复及胶原重塑两个维度，评估复合材料的体内皮肤损伤修复效果。

本研究创新性的提出了一种基于化学微环境调控的主动式皮肤损伤修复策略，设计并构建出复合水凝胶材料 CeO_2 -HBPL/GA/GelMA，通过调节局部微环境、提高抗氧化、抗炎和抗菌能力，突破了传统敷料被动保护的局限性，为皮肤损伤修复提供了全新解决方案。

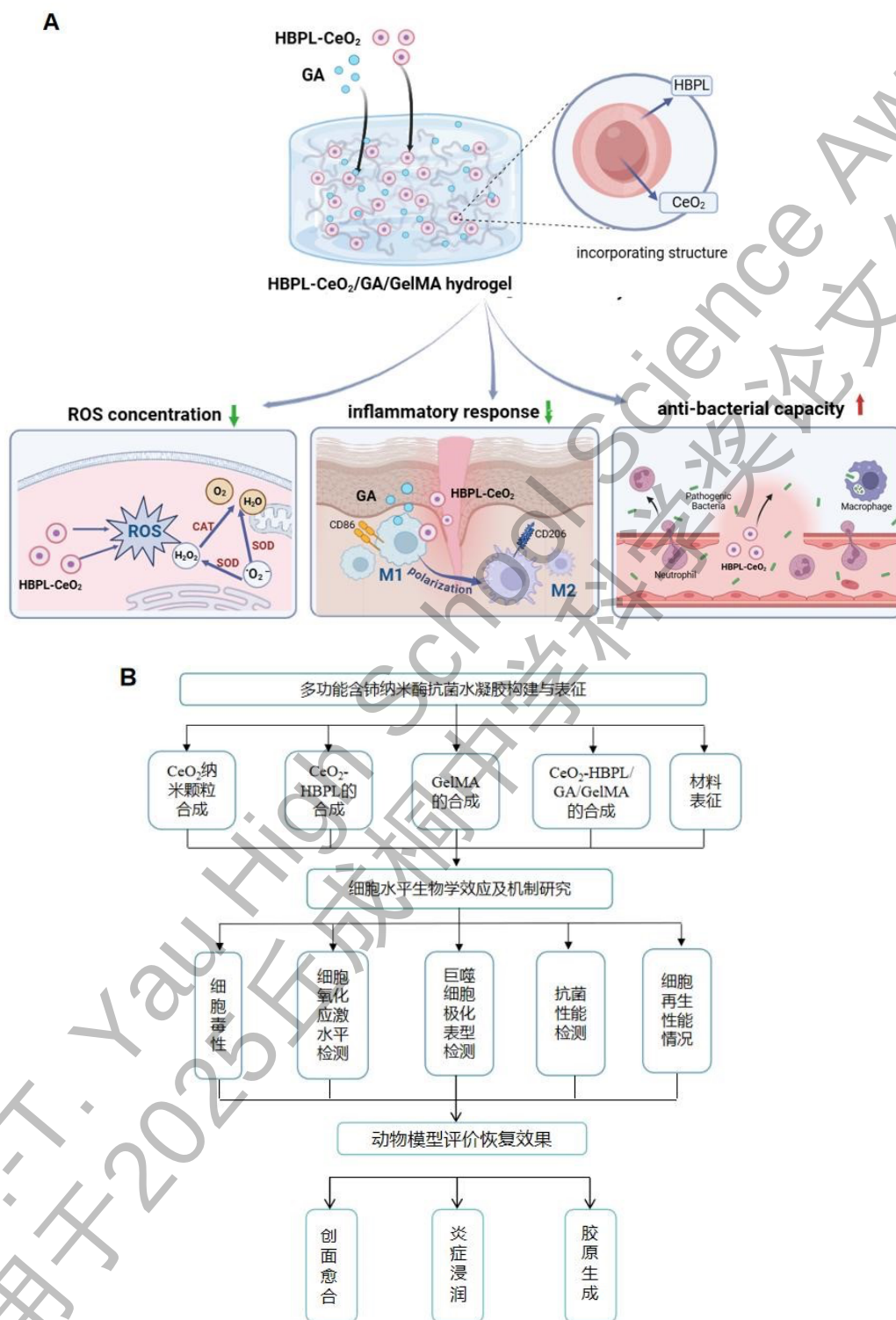


图 1.1 多功能含铈纳米酶抗菌水凝胶促进皮肤损伤修复

A)实验设计示意图及 B)技术路线图。

第 2 章 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶的制备与表征

2.1 引言

在本研究中，我们选择 CeO₂ 纳米颗粒作为核心功能组成部分，CeO₂ 纳米颗粒因为表面积大、稳定性好，能够有效清除伤口处的过多 ROS，从而减轻氧化压力，加速创伤愈合。为进一步提升其稳定性和生物活性，我们采用 HBPL 对 CeO₂ 进行表面修饰，形成了一种新型的复合纳米颗粒——CeO₂-HBPL。这种修饰不仅能改善 CeO₂ 的分散性和稳定性，还能增强它与皮肤损伤部位的互动。通过调节纳米颗粒的表面，我们可以提高它清除 ROS 的能力，进而加速伤口的修复。

为协同增强抗炎效果，我们把 CeO₂ 和 CeO₂-HBPL 纳米颗粒复合到 GelMA 中，GelMA 本身具有很好的生物相容性和可调节的硬度，而结合纳米颗粒和甘草酸 GA，能够进一步提升水凝胶的治疗效果。特别是利用可见光交联技术，我们可以在不影响治疗效果的同时，更精确地控制材料的定位和释放，使治疗效果更加持续。

本章将详细阐述 CeO₂-HBPL 纳米酶及复合水凝胶的化学合成方法、表面修饰机理，并通过多种表征手段系统分析其理化性质，为后续生物学功能研究奠定材料基础。

2.2 实验试剂与仪器

2.2.1 实验试剂与耗材

本章节使用的有关实验试剂及耗材如表 2.1 所示。

表 2.1 试剂与耗材

试剂与耗材	生产厂商	货号
水合醋酸铈	Adamas	537-00-8
氨水	Sigma	1054239025

乙二醇	Sigma	324558
甘草酸	Adamas	1405-86-3
盐酸	Sigma	258148
氢氧化钾	Sigma	221473
明胶	Sigma	V900863
75%乙醇	国药	801769610
光引发剂 LAP	Sigma	900889
甲基丙烯酸酐	Sigma	M543000

2.2.2 实验仪器与设备

本章节使用的仪器与设备如表 2.2 所示。

表 2.2 仪器与设备

仪器名称	生产厂家	仪器型号
离心机	Eppendof	Centrifuge5452R
冷冻干燥机	Christ	ALPHA1-4/LDPlus
电子分析天平	梅特勒-托利多	ML204L
纯水仪	Milli-Q	ReferenceA+
数显鼓风干燥箱	博讯实业有限公司	GZX-9070MBE
透射电子显微镜	日立 HITACHI	HT7700
马尔文电位仪	Malvern	ZetasizerNanoserise
X 射线衍射仪	BrukerAXS	D8Advance
扫描电子显微镜	日立 HITACHI	S-4800
旋转流变仪	Malvern	Kinexuspro+

2.3 实验方法

2.3.1 CeO₂ 与 CeO₂-HBPL 的制备

(1) CeO_2 的合成: 使用乙二醇 (EG) 配位并覆盖 Ce^{3+} 离子, 用氢氧化铵沉淀形成的纳米粒子。配置 10% 的 EG 溶液, 加入 20 mM 水合醋酸铈和 1M 盐酸溶液 20 min、600 rpm, 直到铈盐完全溶解。滴加 28-30% 的氨水溶液, 直至 pH 值达到 9.4 后, 磁力搅拌 90 min 后, 颜色从深紫色变为黄紫色。3000rpm 离心 5 min, 收集沉淀后, 用去离子水和乙醇交换洗涤三次, 65°C 干燥过夜。

(2) HBPL 的合成: 在 2.7mol/L 的 L- 赖氨酸盐酸盐溶液中加入 0.15molKOH 中和, 并在氮气流下将混合水溶液加热至 150 °C, 持续 48 h。然后, 首先将粗聚合产物透析 3 d 后 (分子截留量为 3000DA), 冷冻干燥, 以去除多余的盐分和未反应的单体。此后, 配置含有 2mg/mLHBPL 的 0.01M 盐酸混合溶液, 并在 Sephadex G75 凝胶过滤柱上进行分馏。用 0.01M 盐酸洗脱后, 收集 20mL 纯化的 HBPL 并冻干。最终产品以粉末状保存在 -20°C 下。

(3) CeO_2 -HBPL 的制备: 将 45mg/mL 的 HBPL 溶液与 1mg/mL CeO_2 纳米酶以 1:1 的体积比混合后, 超声 30 min。将混合物在 1000rpm 转速下离心 5 min 以除去团聚的 CeO_2 , 然后在 10000rpm 转速下离心 10 min, 得到 CeO_2 -HBPL 纳米片复合材料。

2.3.2 CeO_2 与 CeO_2 -HBPL 的表征

(1) CeO_2 的 X 射线衍射谱 (X-ray diffraction, XRD)

设置铜 $K\alpha$ 辐射范围为 10–85 (2 θ), 扫描速度为 8°/min。并结合以下公式计算晶面指数:

$$n = 2d \quad (2.1)$$

$$= \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (2.2)$$

n 为表示衍射的阶次, λ 为入射 X 射线的波长, d 为晶面的间距, θ 为入射角, a 为晶格常数, h、k、l 为晶面指数。

(2) CeO_2 和 CeO_2 -HBPL 的透射电子显微镜

(transmission electron microscope, TEM) 表征：配置适合浓度的 CeO_2 和 CeO_2 -HBPL 溶液，取 10 μL 溶液，滴加铜网表面并烘干。通过 TEM，在 80kV 的电压下拍摄纳米颗粒内部形貌。

(3) CeO_2 和 CeO_2 -HBPL 的动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 表征：配置适合浓度的 CeO_2 和 CeO_2 -HBPL 溶液，利用马尔文电位仪测量纳米颗粒的水合粒径以及 Zeta 电位。

(4) CeO_2 和 CeO_2 -HBPL 的扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)：配置适合浓度的 CeO_2 和 CeO_2 -HBPL 溶液，取一小块硅片贴在含有导电胶的导电台上，并取适量体积的 CeO_2 和 CeO_2 -HBPL 溶液滴加在硅片上，烘干后，对样品进行喷金，设置喷金电流为 15mA，喷射时长为 3 min。通过 SEM 在 5kV 电压，拍摄纳米颗粒表面形态。

2.3.3 GelMA 的制备

将 1.5 g 明胶溶解在 50 mL 去离子水中，调节 pH 约为 7-8 后，加入甲基丙烯酸酐 0.53 mL，调整 pH 值比之前略高 0.5 个单位。反应 8 h 后，再次加入甲基丙烯酸酐 0.53 mL 后，调整 pH 值比之前略高 0.5 个单位。再次反应 8 h，并加入 0.53 mL 甲基丙烯酸酐后调整 pH 至，共计在 42°C 下反应 24 h。反应完成后 3500DA 透析 3 d，冻干后配成约 10 wt% 的浓度使用。

2.3.4 CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 水凝胶的制备

通过彻底混合 GelMA (10wt%)，GA (0.5wt%) 和 LAP (0.4wt%，紫外光引发剂) 来制备前体溶液。随后，将 CeO_2 -HBPL 纳米球 (20mg/mL) 掺入上述混合物中。超声 30 min 后，将合并的前体溶液转移到模具中并暴露于紫外光 3 min。制备 CeO_2 -HBPL/GA/GelMA。

2.3.5 CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 水凝胶的表征

(1) CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 水凝胶的 SEM 表征：将所制备

CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶冻干撕碎后，粘贴到贴有导电胶的导电台上，对样品进行喷金，设置喷金电流为 30mA，喷射时长为 3 min。通过扫描电子显微镜在 5kV 电压，拍摄水凝胶微观表面形态。

(2) CeO₂-HBPL/GA/GelMA 的流变学测试：设置旋转流变仪工作温度 37°C，配置 80mm 平行板。向平行板上加入约 50 μ L 的 GelMA 和 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 材料，待参数稳定后，点击开始，记录材料未成胶时的弹性模量。40 s 后，打开紫外光光源（395nm,5W），使水凝胶开始成胶，待固化完成后，记录成胶后的各组材料的弹性模量。比较各组水凝胶在成胶前后弹性模量的变化，以及成胶后加入 CeO₂-HBPL 纳米颗粒的对弹性模量有何影响。

2.3.6 数据分析

本课题所有数据均至少重复三次的实验。实验所得的原始数据用于绘图和定量分析。所有数据图表均使用 GraphPadPrism8.0 软件绘制，结果以平均数 $\pm$ 标准差（mean $\pm$ SD）形式展示。所有数据采用单因素方差分析方法，统计不同组别之间的差异。P 值小于 0.05、0.01、0.001 时，分别标注为*、**、***，其含义分别为具有显著性差异、十分具有显著性差异和极具显著性差异。

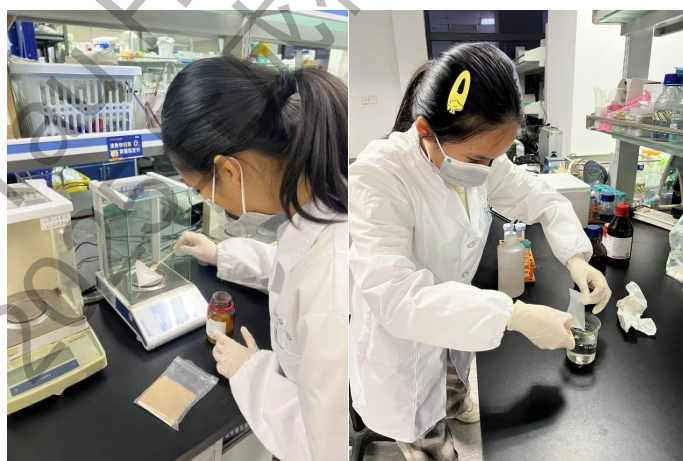


图 2.1 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶的制备

2.4 结果与讨论

2.4.1 CeO₂ 与 CeO₂-HBPL 的形貌、晶型与表面性质分析

首先，我们通过透射电子显微镜（TEM）对所制备的 CeO_2 纳米颗粒和 HBPL 修饰的 CeO_2 纳米颗粒（ $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ ）进行了形貌学分析。如图 2.2A 和 B 所示，

TEM 图像清晰地显示了 CeO_2 纳米颗粒为实心结构，且粒径均一，然而其边缘呈现松散、不规则的形态，形成典型的“花状”结构。经 HBPL 修饰后，如图 2.2B 所示，纳米颗粒的比表面积明显增大，且“花状”结构更加突出，表明 HBPL 的修饰有效增强了纳米颗粒的表面特性。

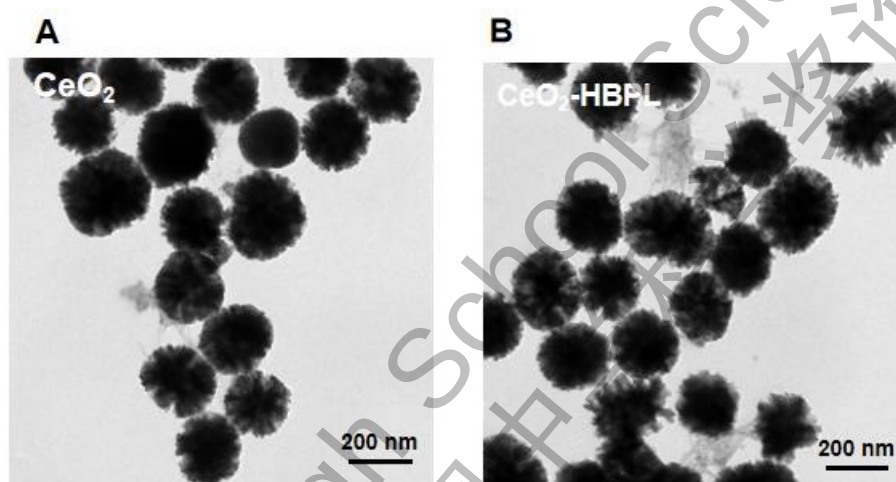


图 2.2 A) CeO_2 和 B) $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 纳米颗粒的 TEM 图像

为了进一步验证 CeO_2 和 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 纳米颗粒表面形态，我们采用扫描电子显微镜（SEM）进行了观察。如图 2.3A 和 B 所示， CeO_2 纳米颗粒表面呈现出典型的“花状”结构，表面存在显著的孔隙，提供了较大的比表面积。该结构的存在有助于 CeO_2 纳米颗粒与局部过量 ROS 快速接触，从而加速 ROS 的清除过程。与 TEM 观察结果一致，通过 HBPL 修饰含氧化铈纳米酶，其比表面积得到了进一步的增强，这提升了其清除 ROS 的潜力。

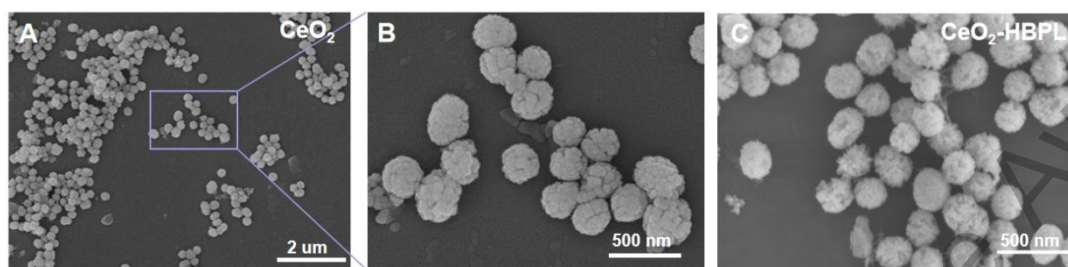


图 2.3 A) CeO_2 和 B) $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 纳米颗粒的 SEM 图像

此外，为了确认 CeO_2 的晶体结构，我们进行了 X 射线衍射 (XRD) 分析。如图 2.4 所示，XRD 谱图显示 CeO_2 纳米颗粒在特定的衍射角度处产生了多个明显的衍射峰，分别对应于 (111)、(200)、(220)、(311)、(222)、(400)、(331) 和 (420) 晶面，这些峰位与标准氧化铈的 XRD 谱图完全吻合，表明所制备的 CeO_2 为具有良好结晶性的纳米材料。这一结论表明 CeO_2 纳米颗粒具备较强的稳定性，能够长时间驻留在皮肤损伤部位，从而提供持续的治疗效果，且不易被降解。

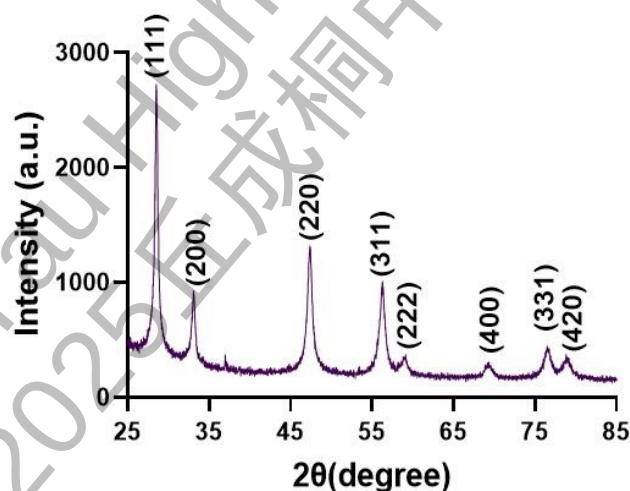


图 2.4 CeO_2 的 XRD 谱

最后，我们通过动态光散射 (DLS) 技术对 CeO_2 和 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 纳米颗粒的粒径和分散性进行了评估。如图 2.5 A-C 所示， CeO_2 纳米颗粒的水合粒径约为 277.53nm，Zeta 电位为 $16.8 \pm 0.5\text{mV}$ ，PDI 值为 0.098 ± 0.013 ，显示出粒径均

一旦在溶液中具有良好的分散性和稳定性。经过 HBPL 修饰后, $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 的水合粒径增大至 303.84nm, 较 CeO_2 增大了 26.31nm, Zeta 电位上升至 $30.8\pm 2.9\text{mV}$, PDI 值为 0.255 ± 0.021 。水合粒径的增大表明 HBPL 成功修饰了 CeO_2 纳米颗粒, 而 Zeta 电位的增高则表明 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 纳米颗粒在溶液中的分散性和稳定性得到了增强。

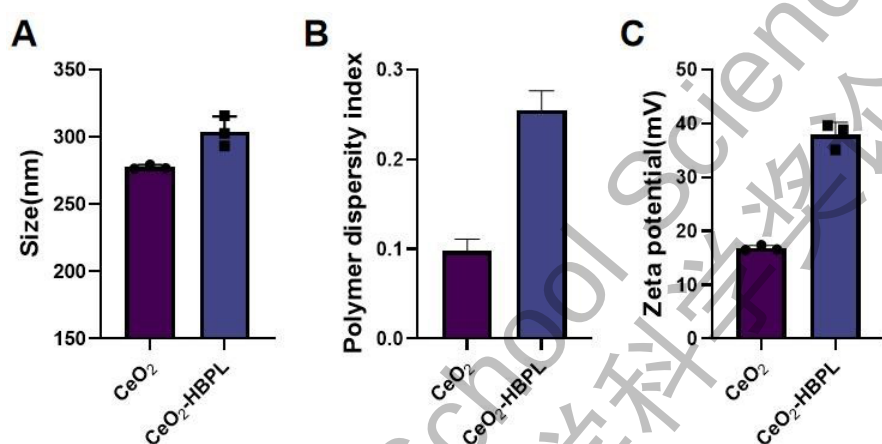


图 2.5 通过 DLS 所得的 CeO_2 和 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 纳米颗粒的
A) 水合粒径、B)PDI 系数和 C)Zeta 电位

通过上述实验结果的分析, 可以确认 HBPL 修饰的 CeO_2 纳米颗粒在粒径、比表面积、晶体结构及稳定性等方面表现出优异的特性, 为后续在皮肤损伤修复中的应用提供了坚实的基础。

2.4.2 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶的微观结构与力学性能

通过进一步修饰明胶, 我们成功制备了可见光交联的 GelMA 水凝胶, 并将其与 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 纳米颗粒和 GA 复合。利用 405nm 波长的可见光进行光固化处理, 有效将这些生物活性成分固定在水凝胶基质中, 形成了功能化的复合水凝胶材料。

为了分析 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶的微观结构, 我们对其进行了 SEM 观察。如图 2.6 所示, 结果表明, $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 纳米颗粒和 GA 均匀分散于 GelMA 水凝胶基质中, 水凝胶呈现出不规则的多孔结构。这种多孔结构不

仅为皮肤损伤提供了理想的支架，且能够有效促进营养物质和气体的交换，保持创面湿润并支持药物的控释。

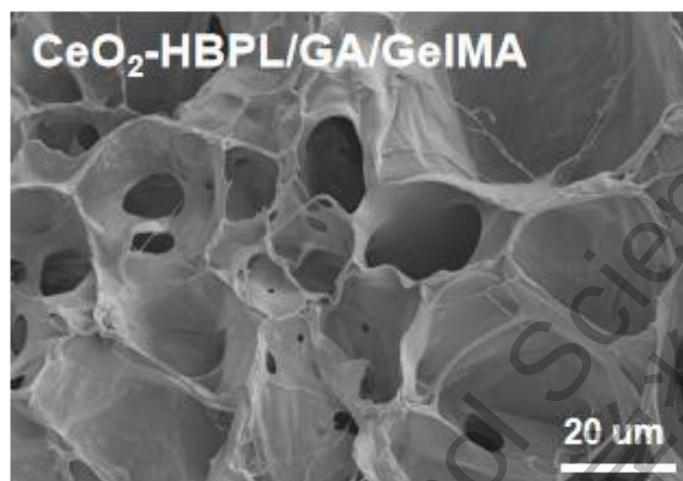


图 2.6 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶的 SEM 图像

为了评估该水凝胶的力学性能，我们通过流变学测试了 GelMA 和 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶的弹性模量。测试结果如图 2.7 所示，CeO₂-HBPL 和 GA 的加入显著提高了水凝胶的弹性模量，由原先的 1316Pa 增加至 1741Pa。这一结果表明，含有铈纳米颗粒的复合水凝胶材料的力学性能得到了增强。考虑到细胞行为和组织发育在一定程度上受到基质生物力学性能的影响，我们所制备的水凝胶材料通过仿生皮肤的力学特性，能够为细胞提供合适的力学支持，促进细胞的增殖和分化，尤其有助于纤维细胞的再生[10]。通过调控水凝胶的力学性质，我们能够为皮肤损伤修复提供更优的生物力学环境，进一步促进创伤愈合过程中的组织再生和功能恢复。

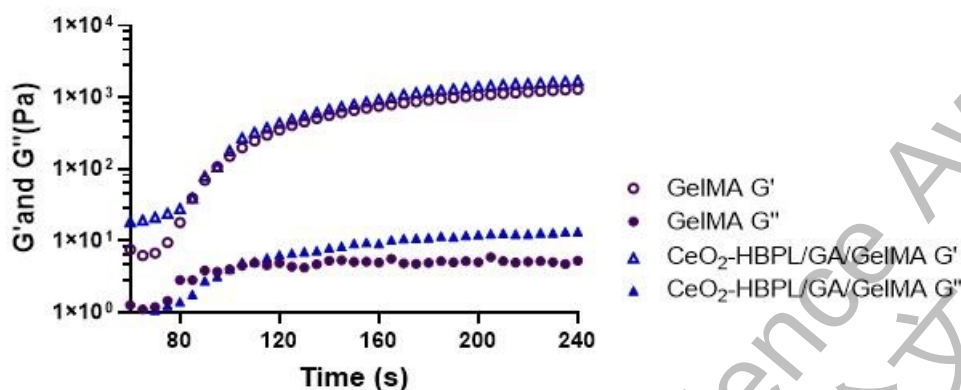


图 2.7 GelMA 和 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶力学性能

调控损伤后的微环境是促进修复的重要手段。然而，当前较少有将纳米酶与生物材料结合来调控损伤微环境的方案用于改善皮肤损伤愈合的研究。因此，本章旨在设计一种含 HBPL 修饰的铈氧化物纳米酶水凝胶，具体包括：

- (1) 采用配位法制备 CeO₂ 纳米酶颗粒，并将 CeO₂ 表面修饰 HBPL 层，制备多功能化的 CeO₂-HBPL 纳米颗粒
- (2) 通过多种表征手段（TEM、SEM、XRD、DLS）证实，HBPL 修饰不仅改善了 CeO₂ 的分散稳定性，还显著提高了其表面正电性，为后续的抗菌应用奠定了基础。
- (3) 制备 GelMA，并将 CeO₂-HBPL 和 GA 负载到 GelMA 中，制备 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 修饰的水凝胶补片材料。
- (4) 通过 SEM、流变学实验等实验，表征了 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶材料的物理化学性质，提供其应用于皮肤组织的可能性。

综上所述，我们成功构建了一种具有适宜理化性质的多功能复合水凝胶，为后续的体内外功能验证提供了理论支持和实验依据。

第 3 章 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶的体外抗氧化、抗炎及抗菌作用

3.1 引言

皮肤损伤的修复效果，不仅取决于修复材料的物理化学特性，更关键在于其是否对身体有害。只有确保这些材料对细胞没有毒害作用，才有可能在实际治疗中发挥作用。基于此，本章旨在从细胞水平系统评价 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 复合材料的安全性，并探讨它如何帮助改善皮肤损伤愈合的环境。

首先，我们通过一系列细胞活力测试验证了 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 复合材料的生物相容性。随后我们模拟了皮肤损伤后可能出现的 ROS 积累情况，用过氧化氢（H₂O₂）处理培养基，测试了 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 复合水凝胶在这一环境中的 ROS 清除能力。接着，炎症反应的调控也是伤口愈合中的重要环节。特别是巨噬细胞的“角色转换”决定了炎症反应的强度和修复的速度。我们发现，这种复合材料能有效促进巨噬细胞从 M1 型（促炎）向 M2 型（抗炎）转化，从而减轻炎症反应，推动修复过程。

此外，我们还进行了细菌感染的模拟实验，验证了这种材料对大肠杆菌生长的抑制作用，表明它具有很强的抗菌性能，可以有效预防创伤感染，减少感染对愈合的干扰。最后，通过细胞增殖实验，我们确认了 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶对细胞增殖的促进作用。

3.2 实验试剂与仪器

3.2.1 实验试剂与耗材

表 3.1 试剂与耗材

试剂与耗材	生产厂商	货号
PBS 溶液	Meilunbio	MA0015
双抗 PS	Gibco	15140-122
DMEM 培养基	Gibco	11965-092
胎牛血清 FBS	Gibco	A3160801

CellCountingKit-8	Bimake	230063
4%多聚甲醛	Biosharp	69080900
DCFH-DA	Sigma	D6883
DAPI	Abcam	Ab285390
IFN- γ	Novoprotein	C746-50

3.2.2 实验仪器与设备

表 3.2 仪器与设备

仪器名称	生产厂家	仪器型号
冷冻离心机	Eppendorf	5415D
多功能酶标仪	BioTek	Cytation3
流式细胞仪	beckman	cytoflexs
激光共聚焦显微镜	Olympus	FV3000

3.3 实验方法

3.3.1 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 对小鼠成纤维细胞系（L929）的体外毒性实验

将密度为 1×10^4 个/孔的 L929 细胞系接种于 96 孔板中，向 96 孔板中加入含有不同材料的培养基 CeO₂、CeO₂-HBPL、CeO₂-HBPL/GA/GelMA，处理 24 h。去除 96 孔板中原有的培养基后加入含有 10% CCK-8 的培养基。将细胞放置在 37°C 的温度下孵育 2 h。利用酶标仪测定并记录在细胞在 450nm 处的 OD 值，进行定量分析。

3.3.2 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 调节 L929 细胞系氧化应激水平实验

采用活性氧探针（DCFH-DA）测定含铈纳米酶抗菌水凝胶对于细胞氧化应激的保护能力：将适当密度的 L929 细胞系接种到 24 板孔板中，并加入含有 0.4uM 的 H₂O₂ 和不同材料（CeO₂、CeO₂-HBPL、CeO₂-HBPL/GA/GelMA）的培

培养基。共孵育 24 h 后，加入工作浓度为 10 μ M 的 DCFH-DA，孵育 30min，使用共聚焦荧光显微镜观察并拍摄细胞 ROS 情况。

3.3.3 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 调控 THP-1 巨噬细胞表型实验

用流式细胞术检测对炎症细胞的调控作用：将 4 $\times$ 10⁶ 个 THP-1 细胞接种在直径为 10cm 的培养皿中。加入 100ng/mL 的佛波酯，孵育 48h，将 THP-1 细胞诱导成为成熟巨噬细胞。接着加入 10mL 含有 20ng/mL 的 INF- γ 和 100ng/mL 脂多糖的培养基，将成熟的巨噬细胞诱导成为 M1 型巨噬细胞。48 h 后，向培养皿中加入含有不同材料（CeO₂、CeO₂-HBPL、CeO₂-HBPL/GA/GelMA）的培养基，并处理 24 h。通过流式细胞仪检测细胞的巨噬细胞 M1/M2 极化比例情况。

3.3.4 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 对大肠杆菌的抑制实验

通过抗菌圈法评估抗菌效果：选择大肠杆菌并准备含有适当浓度的 LB 琼脂培养基并将其在 35-37 $^{\circ}$ C 条件下培养至对数生长期。在培养皿中铺设适量的琼脂培养基，待其固化。用无菌棉签蘸取细菌悬液，均匀地涂布于琼脂表面，确保细菌均匀分布。将不同材料（CeO₂、CeO₂-HBPL、CeO₂-HBPL/GA/GelMA）放入琼脂表面，在 37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中孵育 24-48 h。观察并测量抑菌圈的。抑菌圈的大小与抗菌效果成正比。

3.3.5 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 对 L929 细胞系的增殖实验

采用 Ki67 免疫荧光染色评估材料对细胞增殖的促进作用。将适当密度的 L929 内皮细胞接种在 24 孔板中，并加入含有不同材料（GelMA，CeO₂-HBPL/GelMA，CeO₂-HBPL/GA/GelMA）的培养基，处理 24 h。通过 Ki67 增殖抗原对内皮细胞进行染色，并使用免疫荧光法观察并记录内皮细胞再生情况。

3.3.6 数据分析

数据分析及统计方法同 2.3.6 所述。



图 3.1 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶体外抗氧化、抗炎及抗菌作用验证

3.4 结果与讨论

3.4.1 生物相容性影响

为了评估所制备生物材料的生物相容性，我们采用了 CCK-8 试剂盒进行细胞活力检测。如图 3.2A 所示，CeO₂ 纳米酶在不同浓度下对细胞表现出不同的毒性。CeO₂ 的浓度范围从 0 μg/mL 到 100 μg/mL，结果表明，浓度为 10 μg/mL 时，CeO₂ 未表现出显著的细胞毒性，而在更高浓度下，细胞活力则出现明显下降。为了确保所用材料的良好生物相容性，后续实验中我们选定了 10 μg/mL 浓度的 CeO₂ 用于进一步的制备与研究。进一步的实验中，我们对 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 复合材料及其各类前体材料进行了细胞毒性测试，如图 3.2B 所示，CeO₂、CeO₂-HBPL 及 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 均表现出良好的细胞相容性，未对细胞造成明显的损害。

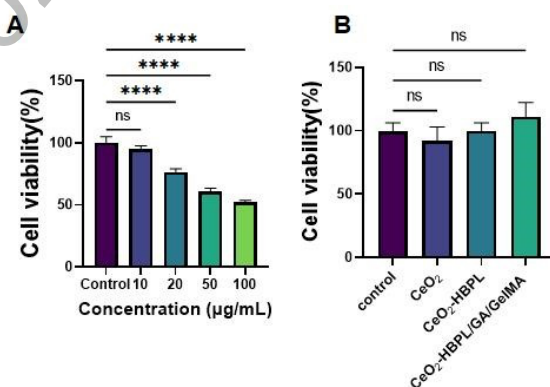


图 3.2 A) CeO_2 和 B) $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶的生物相容性。

3.4.2 抗氧化应激水平的评估

在验证了 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 生物支架材料的生物相容性后，我们进一步探讨了其调控微环境的能力，特别是其在皮肤损伤修复中的功能性。我们重点从皮肤损伤后异常 ROS 水平、炎症反应以及细菌感染三个方面评估材料的调控效果。

首先，我们通过向培养基中添加 H_2O_2 模拟了 ROS 异常激增的病理环境，并研究 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶材料在该环境中的 ROS 清除效果。ROS 的过量积累会导致氧化应激，进而对细胞造成严重损害[11]。为了监测细胞内 ROS 的水平，我们使用 DCFH-DA 探针，该探针在细胞内通过酯酶切割生成 DCFH，后者在 ROS 的氧化作用下转变为绿色荧光的 2',7'-二氯荧光素。图 3.3 的结果表明，含有 CeO_2 的各組细胞中，荧光强度显著降低，表明 ROS 的含量有效降低。作为一种仿生纳米酶， CeO_2 具有超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化氢酶（CAT）的双重功能，可以通过电子转移机制清除 ROS，显著减少 H_2O_2 进入细胞的数量，从而缓解成纤维细胞在氧化应激中的损伤[12]。

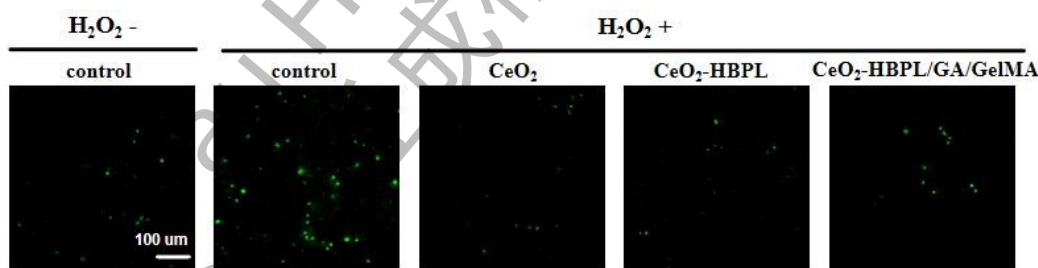


图 3.3 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶的 ROS 清除性能

3.4.3 抗炎与免疫调节性能分析

持续的促炎因子浸润是慢性伤口形成及皮肤疤痕生成的主要原因，因此，调控炎症反应、加速炎症期的结束对于创伤修复至关重要。巨噬细胞在炎症反应中的表型变化是调控炎症微环境的关键。巨噬细胞在受到激活后可以极化为促炎性 M1 型和抗炎性 M2 型，其中 M1 型巨噬细胞通过分泌促炎因子杀伤病原体，而

M2 型则通过分泌抗炎因子抑制炎症反应，促进组织修复。此外，ROS 的异常产生在一定程度上促进着促炎反应[13]。我们通过流式细胞术检测了巨噬细胞表型的变化，以评估 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 材料对炎症微环境的调控作用及改善 ROS 后对于细胞炎症表型的转化情况。

如图 3.4 所示，与对照组相比， $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 的处理使得 M2 ($\text{CD}206^+\text{CD}86^-$) 巨噬细胞的比例从 18.7%增加至 32.2%，而 M1 ($\text{CD}206^-\text{CD}86^+$) 型巨噬细胞的比例从 81.0%下降至 68.6%。在含有水凝胶的处理下，这一趋势得到了进一步加强，M2 型巨噬细胞的比例上升至 41.1%，而 M1 型则下降至 57.9%，表明水凝胶材料对抗炎反应有进一步的促进作用[14]。更为显著的是，当加入 GA 后， $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 复合材料使 M2 型巨噬细胞的比例达到 58.3%，M1 型巨噬细胞的比例进一步下降至 40.6%。这一变化可能与 GA 的抗炎作用相关，GA 作为一种天然的抗炎药物，能够增强 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 复合材料的抗炎效果，从而有助于更好地调控创伤修复过程中的炎症反应[15]。

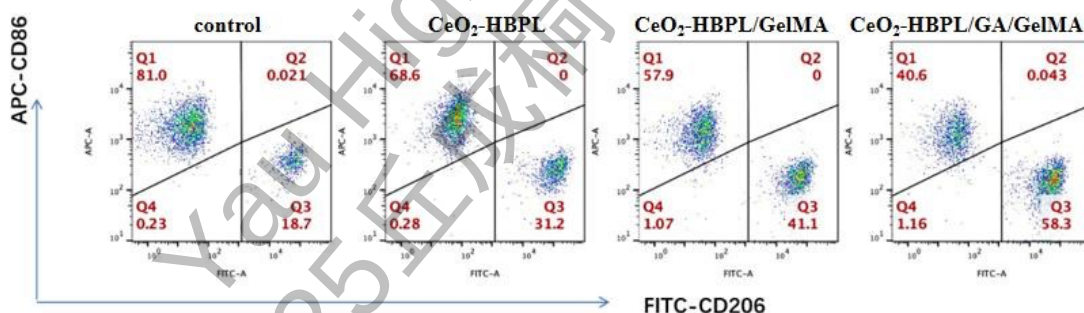


图 3.4 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶的巨噬细胞表型调控能力

3.4.4 抑制能力评估

在本实验中，我们评估了不同组别材料对大肠杆菌抑制能力的效果，包括 Control 组、 CeO_2 组、 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 组以及 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 组。如图 3.5 所示，实验结果显示， CeO_2 组与 Control 组的大肠杆菌生长较为旺盛，两组并未表现出显著差异，这意味着 CeO_2 的抑菌效果不佳。相比之下，含有 HBPL

修饰的 CeO_2 (CeO_2 -HBPL 组) 展现了显著的抗菌活性, 抑制了大肠杆菌的生长。

进一步地, 我们将 CeO_2 -HBPL 复合水凝胶后的 CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 组, 在对大肠杆菌的抑制方面也表现出了与 CeO_2 -HBPL 组相似的能力, 表明该复合材料对细菌具有一定的抑制效果。这种材料的抗菌性能为其在皮肤损伤修复中的应用提供了强有力的支持, 尤其是在防止感染和促进愈合方面。通过抑制细菌的生长, CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 复合材料不仅能够降低感染风险, 还能够促进皮肤组织的修复过程。因此, 该复合材料在皮肤损伤修复领域具有重要的应用潜力, 尤其适用于需要抗菌保护的伤口护理。

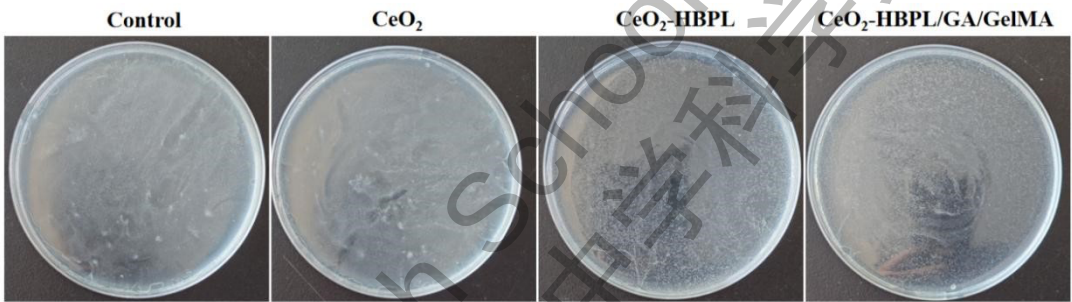


图 3.5 CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 水凝胶抗菌能力

3.4.5 促细胞增殖能力评估

在本实验中, 我们通过 Ki67 染色法评估了不同处理组对 L929 增殖能力的影响。如图 3.6 所示, Ki67 染色结果显示, CeO_2 -HBPL/GelMA 组和 CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 组均能显著提高 L929 细胞的增殖水平, 相较于对照组, 两组细胞的 Ki67 阳性率均有明显上升。这表明, CeO_2 -HBPL/GelMA 具有一定的促进细胞增殖的作用。然而, CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 组的 Ki67 阳性率明显高于 CeO_2 -HBPL/GelMA 组, 提示添加了 GA 的复合材料对 L929 细胞增殖具有更强的微环境调控作用。这一结果表明, CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 不仅增强了细胞增殖能力, 而且可能通过促进细胞增殖进一步加速皮肤损伤的修复过程。

特别是 GA 的添加，可能通过调节细胞微环境、增加细胞间的相互作用或提供更适宜的生物力学性能，从而有效提升了增殖效果。

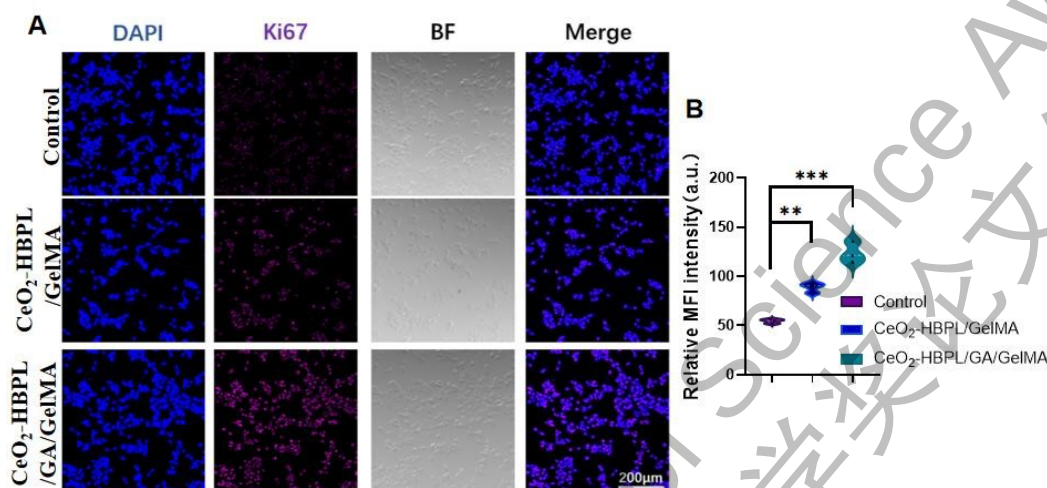


图 3.6 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶对 L929 细胞系 Ki67 分析
A) 荧光成像和 B) 定量分析

3.5 本章小结

本章内容主要展示了所制备的 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶材料在体外的调控微环境和促进成纤维细胞再生的能力。

通过选择不同浓度的 CeO₂-HBPL 干预 L929 细胞系并评估其细胞毒性，验证了在 10 μg/mL 浓度下该材料具有最佳的生物相容性。因此，最终选择 10 μg/mL 的 CeO₂-HBPL 浓度用于进一步制备 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶。

随后，我们通过复现皮肤损伤后成纤维细胞氧化应激、巨噬细胞 M1 表型激活以及金黄色葡萄球菌感染等状态，验证了 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 材料在抗氧化、抗炎、抗菌、促增殖的多功能协同作用，这些结果强有力地验证了本研究最初的设计理念：通过化学材料手段主动调控生物学过程以促进再生修复。

第 4 章 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶的体内皮肤损伤修复效果评估

4.1 引言

体外实验已从细胞层面证实 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶具备抗氧化、抗炎、抗菌及促成纤维细胞增殖的多重功能，但其在复杂体内环境中的作用效果仍需进一步验证。然而仅依靠体外实验无法完全模拟临床皮肤缺损的真实修复场景，因此，在进入临床研究之前，通过可靠的动物模型评价材料的体内修复效果和生物安全性至关重要。

C57BL/6 小鼠作为皮肤损伤研究的经典动物模型，其皮肤结构与人类皮肤具有一定相似性，且遗传背景清晰、个体差异小，可稳定复现皮肤全层损伤后的愈合过程，是评估修复材料体内疗效的理想模型。

本章节通过建立 C57 小鼠 4mm 全层皮肤缺损模型，将水凝胶应用于创面，通过动态监测创面愈合进程，结合苏木精-伊红（H&E）染色和马松（Masson）染色，从组织水平系统验证该水凝胶的体内修复效果，同时对比无损伤组、空白对照、纯 GelMA 水凝胶、CeO₂-HBPL/GelMA 水凝胶及 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 复合水凝胶的修复差异，明确 CeO₂-HBPL、GA、GelMA 三种关键组分在协同增强修复功能中的作用，为该材料的临床转化提供关键的体内实验依据。

4.2 实验试剂与仪器

4.2.1 实验试剂与耗材

本章节使用的有关实验试剂及耗材如表 4.1 所示。

表 4.1 试剂与耗材

试剂与耗材	生产厂商	货号
-------	------	----

4%多聚甲醛	Biosharp	69080900
生理盐水	科伦药业	-
H&E 染色试剂盒	Solarbio	G1120
Masson 三色染色试剂盒	Solarbio	G1340
异氟烷	Sigma	792632
载玻片	Citotest	80302-3111
盖玻片	Citotest	80340-0630

4.2.2 实验仪器与设备

表 4.2 仪器与设备

仪器名称	生产厂家	仪器型号
小动物麻醉机	瑞沃德	R500
石蜡切片机	Leica	RM2235
光学显微镜	Olympus	CX23

4.3 实验方法

4.3.1 实验动物分组与模型建立

1、选取 6-8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠 20 只，雌，体重 20-22g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有小鼠均饲养于 SPF 级动物房，饲养环境严格控制：温度 22-25℃，湿度 50%-60%，12h 光暗循环，自由摄食标准小鼠饲料与无菌饮用水。饲养期间每日观察小鼠精神状态、食欲及活动情况，确保无疾病感染，适应环境 1 周后开始实验，以减少应激反应对实验结果的影响。

2、采用随机数字表法将 20 只小鼠分为 5 组，每组 4 只，具体分组如下：

(1) 空白组 (Blank)：正常小鼠，不进行任何损伤。

- (2) 对照组 (Control): 仅构建皮肤损伤模型, 不进行任何药物或材料干预, 仅用无菌纱布覆盖创面;
- (3) GelMA 组: 皮肤损伤模型构建后, 在创面均匀涂抹纯 GelMA 水凝胶 (浓度 10wt%, 含 0.4wt% 光引发剂 LAP), 随后用 405nm 可见光 (功率 5W) 照射 3min 实现原位交联;
- (4) CeO₂-HBPL/GelMA 组: 创面涂抹 CeO₂-HBPL/GelMA 复合水凝胶 (GelMA 浓度 10wt%, CeO₂-HBPL 浓度 20mg/mL, 含 0.4wt% LAP), 同样经 405nm 可见光交联 3min;
- (5) CeO₂-HBPL/GA/GelMA 组: 创面涂抹 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 复合水凝胶 (GelMA 浓度 10wt%, CeO₂-HBPL 浓度 20 mg/mL, GA 浓度 0.5wt%, 含 0.4wt% LAP), 405 nm 可见光交联 3 min。

3、模型构建前, 先对实验器械 (手术刀片、止血钳、镊子、打孔器) 进行高压蒸汽灭菌 (121°C, 20 min), 并准备好无菌纱布、生理盐水、异氟烷等物品。首先对小鼠进行麻醉处理, 将小鼠放入麻醉诱导盒, 通入含 3%-4% 异氟烷的氧气 (流量 0.5L/min), 待小鼠角膜反射消失、肢体无自主活动后, 将其转移至手术台, 注射 0.1mL 1.25% 三溴乙醇进行深度麻醉。用电动剃毛器去除小鼠背部脊柱两侧的毛发, 再用碘酒棉球和对剃毛区域进行反复消毒 3 次, 每次消毒后等待碘酒自然挥发。用直径 4mm 的无菌打孔器在小鼠背部脊柱两侧对称位置轻轻按压, 标记创面位置, 然后用无菌手术刀片沿标记线垂直切割, 深至筋膜层 (确保皮肤全层缺损, 不损伤皮下血管与肌肉组织), 每个小鼠制作 1 个创面。创面制作完成后, 用无菌生理盐水轻轻冲洗创面, 去除残留组织碎屑, 用无菌纱布吸干创面表面液体, 随后根据分组进行水凝胶涂抹与交联处理, 最后用无菌贴布覆盖创面, 并用医用纱布轻轻固定, 防止贴布脱落。

4.3.2 创面处理与样本收集

1、术后将小鼠单独饲养, 避免群体饲养中相互撕咬导致创面纱布脱落或二次损伤。每日各组小鼠进行创面护理。若纱布被渗液浸湿或污染, 及时更换无

菌纱布，更换前用生理盐水轻轻擦拭创面周围皮肤，避免触碰创面；若创面干燥结痂，无需频繁更换纱布，仅观察结痂完整性即可；

2、术后 21 d，进行小鼠进行样本收集。将小鼠放入麻醉盒，通入 4%异氟烷深度麻醉后，通过颈椎脱臼法处死小鼠，随后立即将小鼠转移至超净工作台，用 75%乙醇对全身皮肤进行消毒，用无菌镊子轻轻提起小鼠背部创面边缘皮肤，用手术刀片沿创面边缘 1cm 处（确保包含完整的创面区域及周围正常皮肤组织）剪下皮肤组织（大小约 1cm×1cm）。将取下的皮肤组织立即放入装有 4%多聚甲醛固定液的离心管中，轻轻摇晃离心管，使组织完全浸没在固定液中，室温下固定 24h，期间每隔 6h 摇晃 1 次，确保固定均匀。

4.3.3 H&E 染色与组织形态分析

石蜡切片制备流程

（1）梯度脱水：将固定后的组织依次放入 70%、80%、90%、95%和 100% 浓度的乙醇溶液中 2h，每个步骤在摇床上（转速 50rpm）振荡处理，确保脱水充分。

（2）二甲苯透明：将脱水后的组织转移至二甲苯溶液中，室温摇床振荡处理 50 min，直至组织半透明。

（3）石蜡浸润：将透明后的组织放入 56-58℃的融化石蜡中，在恒温培养箱中进行石蜡浸润，共 3 次，每次 1h，期间每隔 20 min 轻轻摇晃培养皿，确保石蜡充分渗入组织；

（4）石蜡包埋：将浸润好的组织放入包埋模具中，调整组织方向，然后倒入融化的石蜡，待石蜡表面凝固后，将模具放入 4℃冰箱中冷却 10 min，使石蜡完全硬化，形成石蜡块。

（5）切片与贴片：将石蜡块固定在切片机样品台上，调整切片厚度为 5μm 进行切片，将切片放入 40℃的无菌蒸馏水中使切片展平，消除褶皱，然后

用载玻片将展平的切片捞起，放入 60℃鼓风干燥箱中烤片 2 h，使切片与载玻片牢固结合，冷却后备用。H&E 染色详细步骤

(1) 脱蜡与水化：将烤好的切片依次放入二甲苯、无水乙醇、95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、去离子水中各 5 min。

(2) 细胞核染色：将切片放入苏木精染液中，室温染色 5 min（期间轻轻摇晃染液，确保染色均匀），然后用去离子水洗涤切片 2 min，去除多余染液；

(3) 分化与返蓝：将切片放入 1%盐酸乙醇分化液中，轻轻摇晃 30 s 观察切片颜色从深蓝色变为淡蓝色，用去离子水洗涤切片 5 min，使切片颜色返蓝。

(4) 细胞质染色：将切片放入伊红染液中，室温染色 2 min，然后用去离子水洗涤，去除多余伊红染液。

(5) 脱水与透明：将染色后的切片依次放入 70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇和二甲苯各 5 min。

(6) 封片：将透明后的切片从二甲苯中取出，立即在切片中央滴加 1 滴中性树胶，盖上盖玻片，然后将切片放入干燥箱中，待中性树胶凝固后即可。

(7) 将 HE 染色后的切片放在光学显微镜下进行观察。

4.3.4 马松染色与胶原分析

马松染色步骤

(1) 切片脱蜡与水化步骤同 H&E 染色。

(2) 复红染色：将水化后的切片放入丽春红酸性复红染液中室温染色 10 min，然后用去离子水清洗切片。

(3) 分化处理：将切片放入 1%磷钼酸溶液中，室温 5 min（期间观察切片颜色变化，当细胞质呈淡红色、胶原纤维颜色开始变浅时停止），然后用去离子水清洗切片。

(4) 苯胺蓝染色：将分化后的切片放入苯胺蓝染液中，室温摇床振荡染色

5 min，使胶原纤维呈蓝色，用去离子水清洗切片 1 min。

(5) 冰醋酸固色：将切片放入 1%冰醋酸溶液中浸泡 1 min，固定染色效果。

(6) 脱水与透明：同 H&E 染色的脱水与透明步骤

(7) 封片：滴加中性树胶，盖上盖玻片，烘干。

(8) 将马松染色后的切片在光学显微镜下观察，胶原纤维呈蓝色，细胞质呈红色。

4.3.5 数据分析

数据分析及统计方法同 2.3.6 所述。



图 4.1 CeO₂-HBPL/GA/GelMA 水凝胶的体内皮肤损伤修复效果评估

4.4 结果与讨论

4.4.1 创面愈合效果

如图 4.2 所示，术后 Day 0 时四组小鼠背部均形成直径约 4mm 的全层皮肤缺损，创面形态规整、边界清晰，初始条件一致。至术后 21 d，Control 组创面愈合最差，遗留明显凹陷性瘢痕及色素沉着，皮肤表面凹凸不平。GelMA 组创

面基本闭合，但仍可见浅淡瘢痕，皮肤色泽与周围组织存在差异。 CeO_2 -HBPL/GelMA 组瘢痕更浅，皮肤平整度显著提升，色泽更接近正常；而 CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 组创面几乎完全愈合，瘢痕极不明显，皮肤的色泽和平整度最接近正常组织。直观的外观对比表明， CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 水凝胶组的创面修复效果显著优于其他组，推测 GA 的加入进一步优化了水凝胶的生物相容性与促修复能力，加速了创面上皮化与组织重塑进程。

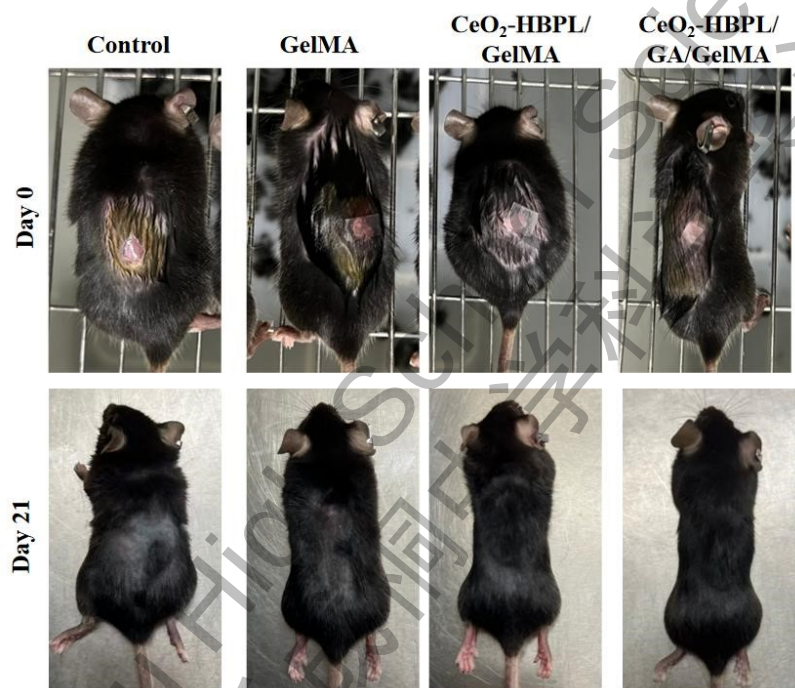


图 4.2 术后 Day 0 与 Day 21 小鼠背部创面外观对比 (n=3)。

4.4.2 H&E 染色结果分析

以正常皮肤 (Blank 组，表皮分层清晰、真皮胶原排列有序) 为对照，如图 4.3 所示，H&E 染色从表皮完整性、真皮炎症浸润及组织排列层面解析修复差异。Control 组表皮连续性破坏，局部存在缺损，角质层极薄；真皮层大量淋巴细胞、巨噬细胞浸润，组织紊乱，血管新生稀少，提示创面处于慢性炎症状态，修复受阻。GelMA 组表皮基本连续，但角质层较薄，分层尚不完全，真皮炎症细胞较 Control 组减少，但仍有散在浸润，血管新生略有增加，说明 GelMA 可初步促进表皮修复，但抗炎能力有限。 CeO_2 -HBPL/GelMA 组表皮完整性进一步

提升，角质层增厚，分层更清晰；真皮炎症细胞显著减少，血管新生增多，组织排列更规整，表明 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 的抗氧化、抗炎特性协同 GelMA 的支架功能，加速了炎症消退与修复进程。 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 组表皮结构最接近 Blank 组，分层清晰，角质层厚度与正常皮肤无明显差异；真皮炎症细胞极少，血管分布均匀，组织致密性显著提升，证实 GA 进一步强化了抗炎效果，为表皮再生与真皮重塑创造了更优的微环境。

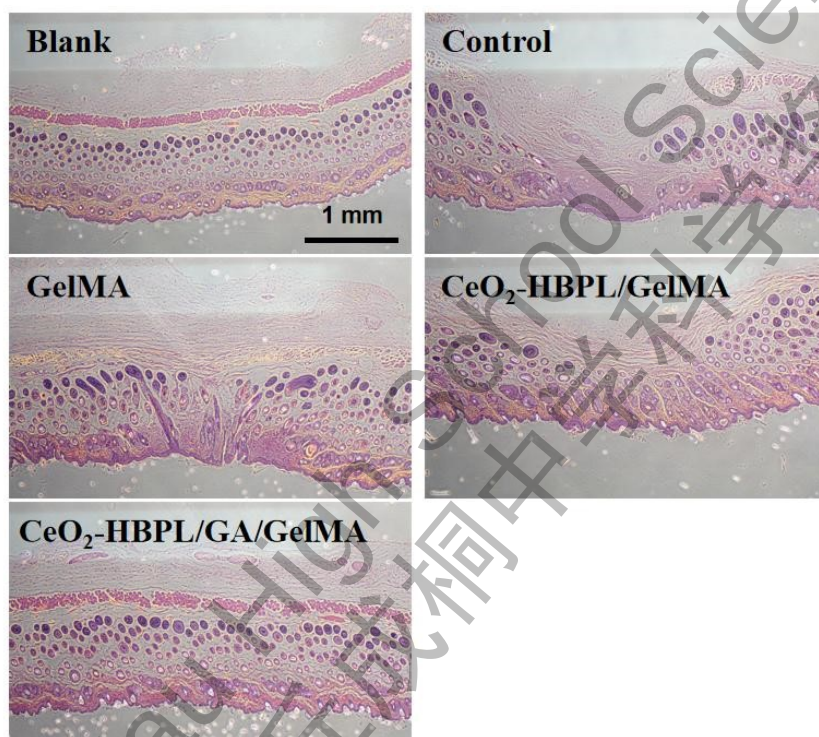


图 4.3 不同材料作用于损伤皮肤组织 H&E 染色结果 (n=3)。

4.4.3 马松染色结果分析

马松染色中胶原纤维呈蓝色，图 4.4 直观反映了各组胶原的沉积量、排列秩序及结构完整性。Blank 组的胶原纤维致密且平行于表皮有序排列，支撑稳定的真皮结构。Control 组胶原纤维稀疏、断裂，排列紊乱，沉积量显著低于正常皮肤，提示胶原合成不足且结构异常，导致瘢痕形成。GelMA 组胶原沉积较 Control 组增加，但纤维仍无序分布，局部存在断裂，说明 GelMA 可促进胶原合成，但对胶原排列的调控能力有限。 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GelMA}$ 组胶原沉积进一步提

升，纤维排列较 GelMA 组更规整，断裂减少，表明 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 有助于调控成纤维细胞功能，改善胶原结构。 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 组的胶原纤维致密性与 Blank 组最接近，排列高度有序，断裂几乎消失，显著优化了胶原的合成与组装，提升了修复质量。

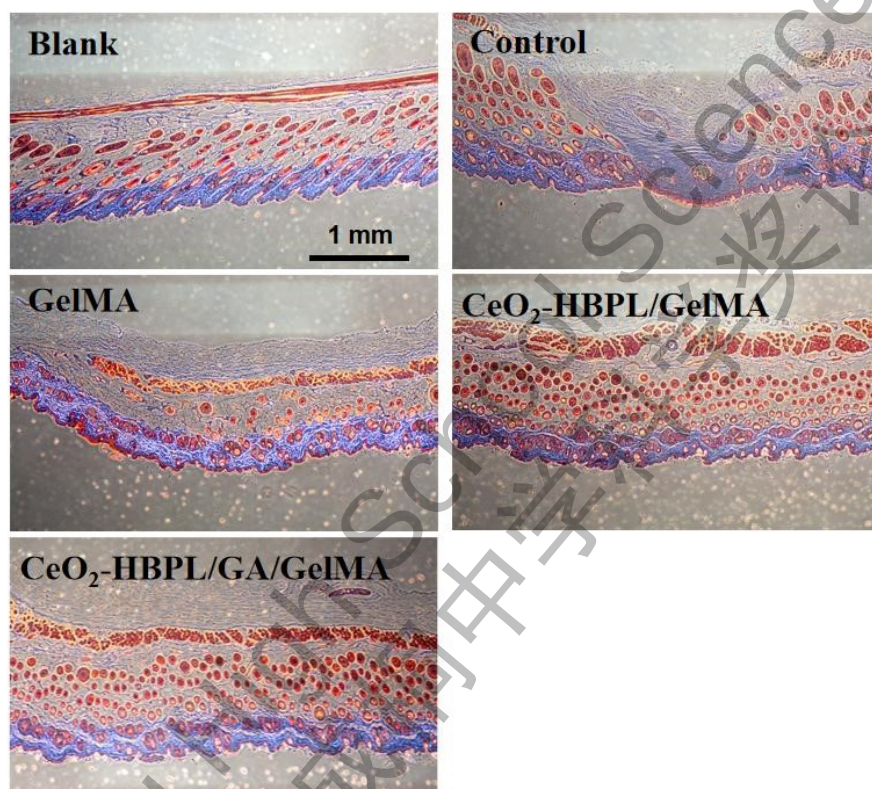


图 4.4 不同材料作用于损伤皮肤组织马松染色结果 (n=3)。

4.5 本章小结

本章节以 C57BL/6 小鼠 4mm 全层皮肤缺损模型为研究对象，通过系统的体内实验，从组织形态修复及胶原重塑两个维度，验证了 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶的体内修复效果，同时明确了该水凝胶与空白对照、纯 GelMA 水凝胶及 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GelMA}$ 复合水凝胶的修复差异。

H&E 染色结果显示， $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶可有效促进表皮完整再生，角质层厚度接近正常皮肤、减少真皮层炎症细胞浸润，同时增加真皮层厚度

与血管新生数量，这得益于 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 清除创面过量 ROS 以减轻氧化损伤，GA 增强抗炎效果以抑制慢性炎症，GelMA 水凝胶为血管新生提供支架，共同为组织修复创造良好微环境。此外，马松染色结果证实， $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶可显著提高真皮层胶原纤维的沉积量，并促进胶原纤维呈平行有序排列，而胶原的沉积量与排列秩序直接决定皮肤修复后的力学性能与外观，这表明该水凝胶不仅能加速愈合，还能提升修复质量，减少疤痕形成风险。

综上所述， $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶可通过抗氧化、抗炎、促细胞增殖、促胶原重塑的多重机制，在体内外均能有效优化皮肤损伤微环境，促进皮肤组织修复，为该材料的后续临床转化研究奠定了重要基础。

第 5 章总结与展望

5.1 总结

本研究针对皮肤损伤修复过程中出现的氧化应激、炎症反应和细菌感染等多重障碍的临床难题，采用材料化学与再生医学的交叉学科方法，成功开发出一种多功能纳米酶复合水凝胶 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 。该水凝胶集抗氧化、抗炎、抗菌和促进组织再生功能于一体，并通过体外和体内实验对其功效进行了验证。

研究首先通过超支化聚-L-赖氨酸（HBPL）对 CeO_2 纳米颗粒进行表面功能化修饰，修饰后的 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 纳米酶显著提升分散稳定性与表面正电性。进一步通过可见光引发聚合技术，将 $\text{CeO}_2\text{-HBPL}$ 纳米酶与 GA、GelMA 复合，构建了具有三维多孔结构的新型复合水凝胶 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 。

体外细胞实验表明，该复合水凝胶具备优异的生物相容性，能有效清除伤口愈合过程中产生的过量 ROS，通过调节巨噬细胞的极化状态，促进从促炎到抗炎的转变，对大肠杆菌具有明显抑制作用，有效减少了皮肤损伤后的感染风险，提升成纤维细胞的增殖活性。

通过 C57BL/6 小鼠全层皮肤缺损模型，从组织形态修复及胶原重塑两个维度，证实了 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ 水凝胶能显著提高创面愈合率，促进表皮完整再生、减轻炎症浸润、并促进胶原大量沉积形成有序、致密的束状结构，接近正常皮肤水平。本研究最大的创新点在于打破了传统敷料被动保护的局限，通过化学材料设计主动调控创伤微环境中的关键化学与生物学过程，实现了对皮肤损伤的协同治疗与功能性再生。

本研究创新性的提出了一种基于化学微环境调控的主动式皮肤损伤修复策略，设计并构建出复合水凝胶材料 $\text{CeO}_2\text{-HBPL/GA/GelMA}$ ，实现对皮肤损伤的协同治疗和功能性再生，突破了传统敷料被动保护的单一功能局限，为皮肤损伤修复提供了全新解决方案，具有较高的理论意义和应用价值。

5.2 未来展望

尽管本研究取得了初步的成果，但仍然存在一些待解决的问题和挑战，未来的研究可以从以下几个方面展开：

(1) 材料的长期稳定性与可控性：本研究开发的复合水凝胶能够在皮肤损伤部位迅速交联并展现良好的生物性能。然而，水凝胶的长期稳定性及其在不同创伤环境中的可控释放能力仍需进一步优化。未来可以探索更稳定的交联技术以及更精细的药物释放调控机制，以提高材料的持续治疗效果。

(2) 个性化定制与智能响应：皮肤损伤的类型和严重程度各不相同，本研究仅在全层缺损模型中进行验证，未来的研究可以着眼于开发个性化的创伤修复水凝胶，依据创伤的具体情况进行精准设计，如可以根据创伤区域的 pH 值、温度或光照等外界刺激，智能响应并释放药物实现创伤修复的个性化治疗。

(3) 多功能复合材料的进一步优化：尽管 CeO_2 -HBPL/GA/GelMA 水凝胶已表现出抗氧化、抗炎、抗菌等多重功能，但材料的多功能性仍有提升空间。未来可以通过引入生长因子、抗纤维化因子等生物活性分子进一步提升其在创伤修复中的整体治疗效果。

总的来说，基于纳米酶的复合材料在创伤修复中的前景非常广阔，未来随着技术的不断发展和完善，其在皮肤损伤及其他医学领域的应用将成为一个重要的研究热点。本研究所提出的多功能复合水凝胶，作为一种高效、智能、可控的创伤修复材料，预期将为难愈性创面患者带来新的希望。

参考文献

- [1] Guo S a, DiPietro L A. Factors affecting wound healing [J]. Journal of dental research, 2010, 89(3): 219-29.
- [2] Gonzalez A C d O, Costa T F, Andrade Z d A, et al. Wound healing-A literature review [J]. Anais brasileiros de dermatologia, 2016, 91(5): 614-20.
- [3] Dunnill C, Patton T, Brennan J, et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for

augmentation of the healing process [J]. International wound journal, 2017, 14(1): 89-96.

[4] Polaka S, Katare P, Pawar B, et al. Emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the wound healing process [J]. ACS omega, 2022, 7(35): 30657-72.

[5] Wang H, Wan K, Shi X. Recent advances in nanozyme research [J]. Advanced materials, 2019, 31(45): 1805368.

[6] Shcherbakov A B, Reukov V V, Yakimansky A V, et al. CeO₂ nanoparticle-containing polymers for biomedical applications: A review [J]. Polymers, 2021, 13(6): 924.

[7] Ahmed E M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review [J]. Journal of advanced research, 2015, 6(2): 105-21.

[8] Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez M M, et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels [J]. Biomaterials, 2015, 73: 254-71.

[9] Guan S, Xu C, Dong X, et al. A highly tough, fatigue-resistant, low hysteresis hybrid hydrogel with a hierarchical cross-linked structure for wearable strain sensors [J]. Journal of Materials Chemistry A, 2023, 11(28): 15404-15.

[10] Yi L, Yu L, Chen S, et al. The regulatory mechanisms of cerium oxide nanoparticles in oxidative stress and emerging applications in refractory wound care [J]. Frontiers in Pharmacology, 2024, 15: 1439960.

[11] Nqakala Z B, Sibuyi N R, Fadaka A O, et al. Advances in nanotechnology towards development of silver nanoparticle-based wound-healing agents [J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(20): 11272.

[12] Lugin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes [J]. Biological chemistry, 2014, 395(2): 203-30.

[13] Raja I S, Fathima N N. Gelatin–cerium oxide nanocomposite for enhanced excisional wound healing [J]. ACS Applied Bio Materials, 2018, 1(2): 487-95.

[14] Bhattacharya D, Tiwari R, Bhatia T, et al. Accelerated and scarless wound repair by a multicomponent hydrogel through simultaneous activation of multiple pathways [J]. Drug Delivery and Translational Research, 2019, 9: 1143-58.

[15] Tu C, Lu H, Zhou T, et al. Promoting the healing of infected diabetic wound by an anti-bacterial and nano-enzyme-containing hydrogel with inflammation-suppressing, ROS-scavenging, oxygen and nitric oxide-generating properties [J]. Biomaterials, 2022, 286: 121597.

致谢

行文至此，回顾这段研究旅程，心中充满了难以言喻的感慨与依依不舍。这场始于偶然的科学探索，让我第一次真正意义上感受到了科研的严谨与温度。在无数人的支持与陪伴下，领悟到了热爱与坚持的分量。

故事的起点，是去年暑假期间一次莽撞的滑板冒险。我的膝盖被粗糙的地面擦伤，因害怕被父母发现而责备，我偷偷在“小红书”上寻找擦伤愈合的方法。也正是这次偶然，让我第一次接触到“湿性愈合”的概念，原来人们习惯使用的干性愈合方法，不仅存在愈合周期长、易感染的局限，更可能因结痂过程牵拉皮肤而留下明显疤痕。这个发现像一颗石子投入平静的湖面，让我猛然想起小时候不小心留下的疤痕，终于明白了它们的成因。既然传统愈合方法存在这样的不足，是否可以通过材料创新，开发出一种既能清除伤口活性氧、又能促进细胞再生的新型敷料，解决两者之间的平衡难题？尽管这个构想在当时还很稚嫩，但它承载着我用科学解决实际生活问题的最初热情。

为了将这份热情转化为实际研究，我从学校老师那里了解到“英才计划”，得知王启刚教授是化学材料领域的专家后，我立刻提交了申请。遗憾的是我未能入选，但这份挫折没有冷却我的热情，于是，我鼓起勇气给王教授发送了邮件，字斟句酌地表达了我的研究初衷、初步构想，以及那份不愿轻易放弃的热情。令我既紧张又惊喜的是，邮件发出不久后，我就收到了王教授的回复。更让我受宠若惊的是，他不仅肯定了我的想法，还愿意将我纳入他的研究团队中，正这份打破身份局限的信任，让我真正体验了从理论设计到实验验证的完整科研流程。

首先感谢王教授，在整个项目中提供的实验资源，这是贯穿研究全程的核心保障。特别是在体外实验完成后，我特别渴望通过动物实验验证敷料的体内疗效。我深知动物实验审核流程严格，且需要专业培训才能操作，感谢王教授允许我在师兄师姐的全程指导与监管下参与动物实验，感谢课题组的师兄师姐全程指导我按照规范流程操作：从小鼠的抓取、麻醉，到伤口造模、敷料敷贴，再到后续的观察与数据记录。还要感谢这些科学小鼠，正是它们的牺牲，让我深刻了解到，科研从来不是仅凭好奇心驱动的冒险，更需要对生命的敬畏之心与对研究的责任担当，每一组数据背后，都承载着严谨的态度与对生命的珍视。同样要感谢我的校内科学老师李老师。在整个研究过程中，化学知识是支撑实验设计与推进的核心基础，而许多内容早已超出了课本范畴。李老师不厌其烦的耐心与细致，

帮我一点点填补了知识空白，让我在面对复杂的实验原理时不再迷茫，也让我更加坚信，扎实的学科基础是科研探索的基石。

特别要向我的父母表达最深的谢意，他们从未接触过科学研究，却始终无条件地支持我的选择。正是这份包容与信任，让我能毫无顾虑地在科研道路上大胆试错、勇敢前行。

最后，我想感谢那个活泼好动的自己，尽管那次滑板受伤带来了疼痛，却意外地为我打开了一扇通往科研世界的大门。这段研究经历教会我的，不仅是如何设计实验、分析数据的技能，更有面对困难时的坚韧、解决问题时的耐心。我将带着这些感恩与收获，继续保持对科学的热爱与敬畏，在探索真理的道路上坚定前行，不辜负每一份信任与期待。