

第一页为封面页

参赛学生姓名：沈替文

中学：上海星河湾双语学校

省份：上海

国家/地区：中国内地

指导老师姓名：田润

指导老师单位：上海星河湾双语学校

论文题目：葡萄外泌体复合Janus水凝胶在
口腔黏膜损伤修复中的应用

葡萄外泌体复合 Janus 水凝胶在口腔黏膜损伤修复中的应用

沈替文

摘要：复发性口腔溃疡导致活性氧（ROS）不断积累，形成氧化应激与慢性炎症共存的病理微环境。传统的激素药物缺乏 ROS 响应性，不能实现按需降解和药物释放。为了解决这个问题，本研究构建了 ROS 响应的 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶。这种水凝胶由两层组成：外层由氧化壳聚糖（OCS）和甲基丙烯酸透明质酸（HAMA）组成。利用壳聚糖的正电荷达到高效的抗菌效果；内层由二硫键修饰的海藻酸钠（ROS-SA）和 HAMA 组成，其多孔结构有利于营养物质运输、细胞迁移和葡萄外泌体（G-EXO）装载。G-EXO 含有丰富的活性分子，如花青素和白藜芦醇，具有抗炎、抗氧化和高吸收率的特性。表征结果表明，该材料结构稳定，孔隙均匀。功能实验表明，该水凝胶具有良好的生物相容性、促进细胞再生能力和显著的抗菌、抗炎作用。

关键字：口腔黏膜修复，再生微环境，抗菌，G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶，葡萄外泌体，二硫键氧化响应

目录

摘要	1
第一章 绪论	4
1.1 研究背景:	4
1.1.1 复发性口腔溃疡	4
1.1.2 复发性口腔溃疡创面的病理微环境特征	4
1.1.3 传统治疗方案缺陷	5
1.1.4 传统水凝胶	5
1.2 国内外相关材料研究现状	6
1.3 本课题拟解决的核心科学问题	7
1.4 本课题创新点、研究目的与研究内容	7
1.4.1 创新点	7
1.4.2 研究目的	7
1.4.3 研究内容	8
1.5 本章小结	9
第二章 G-EXO 外泌体/ G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的制备与表征	10
2.1 引言	10
2.2 实验试剂与仪器	10
2.2.1 实验试剂及耗材	10
2.2.2 实验仪器明细	11
2.3 实验方法	11
2.3.1 葡萄外泌体提取纯化流程	11
2.3.2 氧化壳聚糖制备	11
2.3.3 ROS 响应性二硫键修饰海藻酸钠的制备	11
2.3.4 甲基丙烯酰化透明质酸 (HAMA) 的合成	12
2.3.5 制备 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶	12
2.4 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的物理化学性能	12
2.4.1 G-EXO 的蛋白质定量	12
2.4.2 G-EXO 的 TEM 测试	12
2.4.3 G-EXO 的 DLS 测试	13
2.4.4 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的 SEM 测试	13
2.5 结果与讨论	13
2.5.1 G-EXO 的表征	13
2.5.2 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的形貌表征	14
2.5.3 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的流变学表征	15
2.6 本章小结	16
第三章 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的体外口腔溃疡微环境的调控	17
3.1 引言	17
3.2 实验试剂及耗材	17
3.3 实验仪器明细	17
3.4 实验步骤	18
3.4.1 细胞复苏	18
3.4.2 细胞传代	18

3.4.3	CCK-8 实验	18
3.4.4	G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的抗菌实验	18
3.4.5	G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的划痕实验:	19
3.4.6	G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶流式细胞实验:	19
3.5	结果与讨论	19
3.5.1	水凝胶 (RSHA/OCS) 的细胞毒性	19
3.5.2	G-EXO 的细胞毒性与促增殖效果	20
3.5.3	G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的生物相容性	20
3.5.4	G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶调控巨噬细胞炎症表型	21
3.5.5	G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的抑菌性能测试	22
3.5.6	G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的细胞恢复性测试	23
3.6	本章小结	24
第四章	总结与展望	25
4.1	总结	25
4.2	展望	25

第一章 绪论

1.1 研究背景

1.1.1 复发性口腔溃疡

我的很多朋友和同学在佩戴金属牙套进行牙齿矫正后，口腔溃疡反复发作。牙套的金属部分不断与口腔黏膜摩擦，导致溃疡频繁出现，严重影响饮食和学习，造成相当大的烦恼和不方便。他们尝试了西瓜霜和口腔溃疡贴剂等常见药物，但这些药物通常都有一个共同的问题：它们很容易被唾液冲走，或者被口腔中的牙套刮掉，往往在生效之前就失效了。而且它们只能暂时缓解疼痛，不能防止溃疡复发。因此，能否设计出一种智能材料，既能像创可贴一样粘附在溃疡表面而不脱落，同时又能感知来自伤口微环境的炎症信号，并在需要时自动释放药物，成为当前口腔溃疡治疗的迫切需要。

根据世界卫生组织（World Health Organization, WHO）及国内外口腔医学机构的流行病学统计，复发性口腔溃疡（Renal Artery Stenosis, RAS）是全球发病率最高的口腔黏膜疾病。这种情况通常是由多种因素共同作用引起的，包括免疫、遗传、心理压力和营养缺乏因素。由于免疫功能障碍、激素变化、生活习惯等原因，大多数患者口腔溃疡经常复发。这种情况通常会在 7 至 14 天内自行愈合，但仍会给患者带来不适和不便。口腔溃疡目前尚无治愈方法，临床治疗的主要原则是“减轻疼痛、促进溃疡愈合、延长复发间隙期”^[1]。

1.1.2 复发性口腔溃疡创面的病理微环境特征

复发性口腔溃疡的创面不仅是一种物理缺损，而且是氧化应激、持续炎症和细菌感染驱动的复杂病理微环境。

首先，复发性口腔溃疡伤口常伴有持续的氧化应激。氧化应激是机体局部产生过多的活性氧（Reactive Oxygen Species, ROS），同时抗氧化防御能力下降，导致两者失衡，进而导致组织损伤的一种现象。在溃疡部位，口腔溃疡的初始触发因素激活 T 淋巴细胞，释放大促炎细胞因子，吸引大量中性粒细胞、巨噬细胞和其他免疫细胞聚集在溃疡部位。当这些细胞清除潜在抗原时，它们产生过多的 ROS，导致细胞氧化应激。

持续的氧化应激不仅是溃疡发生的副产品，也是溃疡难以愈合的罪魁祸首。这些 ROS 不仅直接氧化和损伤细胞膜脂质、蛋白质和 DNA，而且作为关键信号分子激活核因子- κ B（NF- κ B）等炎症通路，上调肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）和白细胞介素-6（IL-6）等促炎因子的转录，推动创面进入持续氧化损伤状态。炎症导致线粒体功能障碍，引起活性氧的大量积累，从而增加细胞氧化应激水平。过度的氧化应激进一步促进炎症因子的释放，最终导致恶性循环。这种恶性循环使伤口长期处于刺激状态。其次，在复发性口腔溃疡伤口中，持续高 ROS 微环境导致巨噬细胞长时间保持 M1 促炎表型。过量的 M1 型细胞不断释放蛋白酶和促炎介质，降解细胞外基质，抑制成纤维细胞增殖和胶原沉积，使创面难以愈合，延长溃疡病程。

氧化应激产物及伴随的高浓度炎性介质直接刺激口腔黏膜下的神经末梢，降低痛觉阈值，引起剧烈疼痛。

最后,一旦黏膜受损形成溃疡,金黄色葡萄球菌等条件致病菌很容易在创面定植和增殖。同时,细菌代谢产生的生物膜阻碍了药物的渗透,使传统的局部药物难以保持有效浓度,导致反复感染和延迟愈合。

1.1.3 传统治疗方案缺陷

临床常用的局部治疗方案主要包含消炎止痛、促进愈合、抗菌消炎等。包括消炎类药物,止痛类药物,局部封闭以及利用治疗仪进行理疗等。消炎类药物有 0.1%曲安西龙(去炎松、醋酸氟羟泼尼松)软膏,含漱液如 3%复方硼砂溶液和 0.02%氯己定(盐酸双氯苯双胍乙烷)液,含片如西地碘片和溶菌酶片,散剂如复方皮质散、中药锡类散、冰硼散及西瓜霜等,止痛类药物包括利多卡因凝胶、喷剂及苯佐卡因凝胶、苄达明喷雾剂、含漱液等。局部封闭则采用曲安奈德或醋酸泼尼松龙悬混液加等量 2%利多卡因液进行溃疡下局部浸润^[1]。

这些传统的治疗方法虽然能在短期内缓解症状,但普遍存在明显的缺陷。药物容易被唾液冲走,在黏膜上的滞留时间短。它们缺乏智能反应机制,不能根据 ROS 水平按需释放药物。长期使用可引起黏膜萎缩或耐药。

在医疗领域的具体应用场景中,根据材料和工艺的不同,水凝胶在临床上发挥着不同的作用。在口腔黏膜修复中,黏附的水凝胶贴片与湿润的口腔黏膜接触后迅速交联并固定,牢固地锁定在溃疡表面,阻断食物和唾液的刺激,同时实现持续的局部药物递送。然而,目前合成的高分子凝胶类镇痛药物如利多卡因凝胶、苯佐卡因凝胶等往往功能单一,无法同时满足缓解疼痛、抗炎抗菌、促进修复等多重需求。因此,在实际处理工艺中也存在明显的不足。

1.1.4 传统水凝胶

水凝胶(Hydrogel)是具备三维交联网络结构的高分子体系,核心特点是能够吸收并锁住大量水分而不溶解。水凝胶亲水、多孔、富有弹性,结构与力学性能和人体天然细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)高度相似,被誉为“理想的敷料包材”,被广泛应用于人体皮肤、黏膜创面修复。

水凝胶可根据不同标准进行分类,各类水凝胶各具优缺点。

1. 按原材料来源分类,可分为天然高分子水凝胶、合成高分子水凝胶以及复合/杂化水凝胶。

天然高分子水凝胶的常见原材料包括海藻酸钠、壳聚糖、明胶、胶原蛋白、透明质酸和纤维素。其优点包括优异的生物相容性、低毒性、生物可降解性,以及含有利于细胞生长的固有细胞结合位点;其缺点则包括机械强度通常较差、降解速率难以精确控制,以及材料性能可能存在批次间差异。

合成高分子水凝胶常见材质有聚乙烯醇,聚丙烯酰胺,聚乙二醇。其优点在于机械结构好,网络结构(孔径、交联度)可控,理化性质稳定,批次差异小。缺点在于由于是合成材料,本身缺乏生物活性,部分单体合成可能具有细胞毒性,降解产物可能引发轻微炎症。

杂化/复合水凝胶是由天然和合成聚合物共混或者共价结合而成。其兼具了天然材料的生物活性和合成材料的优异机械强度。缺点是制备工艺相对复杂,需要严格控制两者的配比和界面相容性^[2]。

2. 按照交联方式可以分为物理水凝胶和化学水凝胶。

物理水凝胶是通过氢键、静电作用、疏水相互作用或链缠结等物理副键形成。其优势是在制备过程中通常不使用有毒的化学交联剂,通常具有温敏性或剪切变稀特性,适合注射。

缺点是环境敏感度高,机械强度低,在体内易快速流失。

化学水凝胶是通过共价键交联形成的三维网络。优势是机械强度高,结构稳定,不会因为温度或溶剂变化而轻易溶解,体内维持时间长。缺点是残留的化学交联剂(如戊二醛)可能带来细胞毒性;一旦结构形成,通常不可逆,难以直接注射。

3. 按照特殊功能分类,可以分为不同的智能水凝胶。

如制作成能对外界刺激(如温度、pH、光、电场、磁场、酶)做出体积或结构响应的水凝胶。这些智能水凝胶的优势在于可以实现药物的精准控释或者在特定病灶(如肿瘤微环境的低 pH)发生响应。其缺点有响应滞后,以及长期循环的体内安全性和复杂环境下的稳定性仍有待验证。上述关于智能刺激响应水凝胶在精准释药中的应用潜力及其在临床转化中面临的响应滞后、环境稳定性与生物安全性等瓶颈的英文学术表述,可参考相关前沿文献^[3]。

根据不同种类的水凝胶的特性,目前水凝胶在医学领域已经在药物释放载体、组织填充材料、医用敷料以及 3D 生物打印等方面展开了不同程度的应用。例如, Anirudhan T S 及他的同事提出了一种水凝胶/胶束复合体系作为双药物释放载体的制备方法。该水凝胶由聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)和聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol, PVA)制备。研究了胶束和 PEG-PVA/胶束 DDDS 的药物释放行为,并将其作为 pH 和温度的函数。通过幂律方程分析药物的释放曲线,揭示药物的释放机制^[4]。Jiang S 等在研究两性离子(甲基丙烯酸磺胺甜菜碱, SBMA)水凝胶敷料对大鼠压疮创面愈合的影响后,得出结论:两性离子水凝胶敷料在促进压疮创面血管生成和再上皮化,促进创面愈合方面具有一定优势^[5]。Wei 等开发了一种两性离子聚合物水凝胶,其独特的三羟基丙烯酸酯结构使其拥有具有合适的黏附性能(约 6.0 kPa),使其与皮肤良好结合,保护伤口并确保其治疗效果^[6]。

这些应用正是利用了水凝胶高含水量、良好的生物相容性、生物降解性的特点。在进一步发挥水凝胶的纳米复合特性,以及创面修复中如何实现智能的多重生化协同机制的建立方面,水凝胶还是具有很大的探索空间。

1.2 国内外相关材料研究现状

近年来,随着生物材料学与组织工程技术快速发展,面向水凝胶以及口腔、皮肤创面修复功能材料的研究不断深入,材料设计思路逐步从被动填充转向主动微环境调控。

甲基丙烯酰化多糖凭借独特加工性能与生物相容性,在创面敷料领域备受关注。HAMA、GelMA 等衍生物可在光引发剂存在条件下通过自由基聚合快速交联成胶。该制备条件温和、成胶速度快,可通过光照实现口腔原位固化。同时,调节预聚液浓度、光照参数,就可以精准调控凝胶孔隙率与力学强度,满足不同创面的贴合与支撑需求。

动态共价化学为智能响应材料设计提供新思路。二硫键(-S-S-)作为活性氧敏感化学键,接枝到多糖主链后,能够赋予材料特异性降解能力。例如二硫键改性海藻酸钠衍生物在正常生理条件下结构稳定;而在高活性氧溃疡微环境中,二硫键断裂,网络发生解离。这种活性氧浓度越高,降解越快的特性,能够实现治疗因子按需释放,更好匹配创面修复的时序变化。二硫键改性海藻酸钠独特氧化还原响应特性,使其在糖尿病足溃疡、溃疡性结肠炎、胃溃疡等高活性氧溃疡微环境中具备极高应用价值。例如肠道炎症部位活性氧大量蓄积,同时消化道内部 pH 复杂变化、酶降解环境复杂。利用海藻酸钠天然结肠靶向特性(耐胃酸、肠道酶降解),结合二硫键修饰,可构建口服微球或者结肠靶向水凝胶。药物在胃酸、上消化道环境稳定包封,到达高氧化应激结肠溃疡病灶处;炎症黏膜蓄积的活性氧(或是浸润巨噬细胞释放还原性物质)特异性触发二硫键断裂,海藻酸钠载体解体。这种环境自适应降解机制大幅降低药物在健康组织提前释放,减少全身毒副作用,集中修复受损肠道黏膜屏障。

植物来源类外泌体纳米颗粒是天然磷脂纳米胶体，在生物治疗领域前景广阔。以葡萄外泌体为代表，具备典型脂质双分子层纳米结构，尺寸纳米级，稳定性好，容易穿透生物屏障。对比动物源外泌体，其来源广泛、免疫原性低，天然携带花青素、白藜芦醇等活性物质。此外，该类纳米胶体还可以作为高效载体保护内部活性物质，促进细胞摄取，为口腔创面抗炎抗氧化治疗提供新策略。目前已有创面修复相关研究：葡萄源纳米囊泡天然搭载白藜芦醇与花青素，白藜芦醇激活 Nrf2 通路，启动内源抗氧化酶（HO-1、SOD）表达；花青素直接清除活性氧自由基，二者协同缓解氧化应激^[7]。还有研究将植物源纳米囊泡载入水凝胶基质，水凝胶同时实现物理屏障、保湿、缓释功能；纳米囊泡在创面高活性氧微环境下从水凝胶网络响应释放，完成“按需给药”^[7]。

科研人员结合光固化成型、动态共价响应、天然纳米载体等多种技术，开发出多种功能复合材料。未来，依托这类新型复合材料，口腔创面修复材料会朝着更高智能化、仿生化方向发展，精准应对复杂损伤微环境。

1.3 本课题拟解决的核心科学问题

第一，依托氧化、酰胺、酯化液相有机反应，如何在海藻酸钠分子链中共价接枝二硫键，构建可特异性识别创面高活性氧微环境高分子载体。

第二，如何设计两步分层紫外可见光聚合工艺，实现力学性能及生物特性差异化的 G-EXO-RSHA/OCS 双体水凝胶。

第三，葡萄外泌体复合二硫键高分子体系在不同氧化还原环境下的释药规律，以及 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶对抗菌、抗炎、抗氧化及损伤修复调控的多重生化协同机制如何实现？

1.4 本课题创新点、研究目的与研究内容

1.4.1 创新点

第一，实现材料对创面高 ROS 环境的特异性响应。通过酰胺化学反应把二硫键接在海藻酸钠分子链上，利用二硫键遇到高活性氧就会断裂的化学特点，只在溃疡损伤位置释放葡萄外泌体活性物质，改变普通敷料活性物质无差别释放的问题。

第二，G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶实现差异化力学与生物学特性。采用两步分层紫外光聚合制备双层水凝胶，再调控原料配比，得到交联结构不同的两层。上层交联致密，实现物理隔离与抗菌。下层交联疏松，用于负载与释放葡萄外泌体。两层依靠双键共聚合结合，不易分层剥离。

第三，实现多重生化协同作用。把葡萄外泌体纳米颗粒负载到响应型多糖网络里面，同时发挥二硫键控释、氧化壳聚糖阳离子抗菌、葡萄外泌体调节巨噬细胞表型的多重作用，同一种敷料可以同时做到物理防护、可控释药、抗菌、调节炎症。

1.4.2 研究目的

本课题针对复发性口腔溃疡创面高活性氧的问题，从多糖改性、水凝胶制备、纳米

胶体几个方面开展研究。先通过氧化、酯化、酰胺反应合成氧化壳聚糖、二硫键改性海藻酸钠、甲基丙烯酰透明质酸这几种多糖材料，再用蔗糖密度梯度超速离心提取葡萄外泌体。使用两步分层紫外光聚合的方法制备双层水凝胶。借助 TEM、DLS 观察葡萄外泌体的形貌和胶体参数，通过扫描电子显微镜（scanning electron microscope, SEM）、流变仪测试水凝胶两层微观结构和力学性能，验证二硫键的 ROS 响应释放效果。再结合 CCK-8、巨噬细胞流式、体外抗菌这些体外细胞、细菌实验，搞清楚这套材料发挥作用的内在机理，为口腔修复敷料提供一套完整的体外研究参考。

1.4.3 研究内容

第一，通过高碘酸钠氧化、EDC/NHS 介导的酰胺化反应及甲基丙烯酸酐酯化等有机改性手段，分别制备了具备正电荷抗菌功能的氧化壳聚糖（OCS）、含 ROS 敏感二硫键的海藻酸钠（ROS-SA）及可光交联的甲基丙烯酰化透明质酸（HAMA）；在此基础上，采用两步分层紫外光聚合法，构建了内外层功能分化的 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶，并以蔗糖密度梯度超速离心法从葡萄果肉中分离提取了具有高生物活性的葡萄外泌体（G-EXO），将其作为天然抗炎药物负载于水凝胶内层。

第二，借助扫描电子显微镜（SEM）、动态光散射（dynamic light scattering, DLS）、流变测试，系统表征改性多糖化学结构、水凝胶内外层微观结构差异、孔径分布、Zeta 电位、力学性能。重点验证二硫键的活性氧响应断裂行为，以及水凝胶网络稳定性、界面黏附等理化性能。

第三，通过 细胞活力检测试剂盒（CCK-8）细胞增殖实验、巨噬细胞极化流式分析、ROS 清除实验、体外抗菌实验等手段，验证了材料细胞生物相容性、抗炎免疫调控能力与抗菌性能。进一步构建大鼠复发性口腔溃疡模型，结合组织染色、炎症因子检测，在细胞层面验证了 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶促进溃疡愈合效果以及生物安全性，综合评价该材料作为口腔敷料的临床应用潜力。

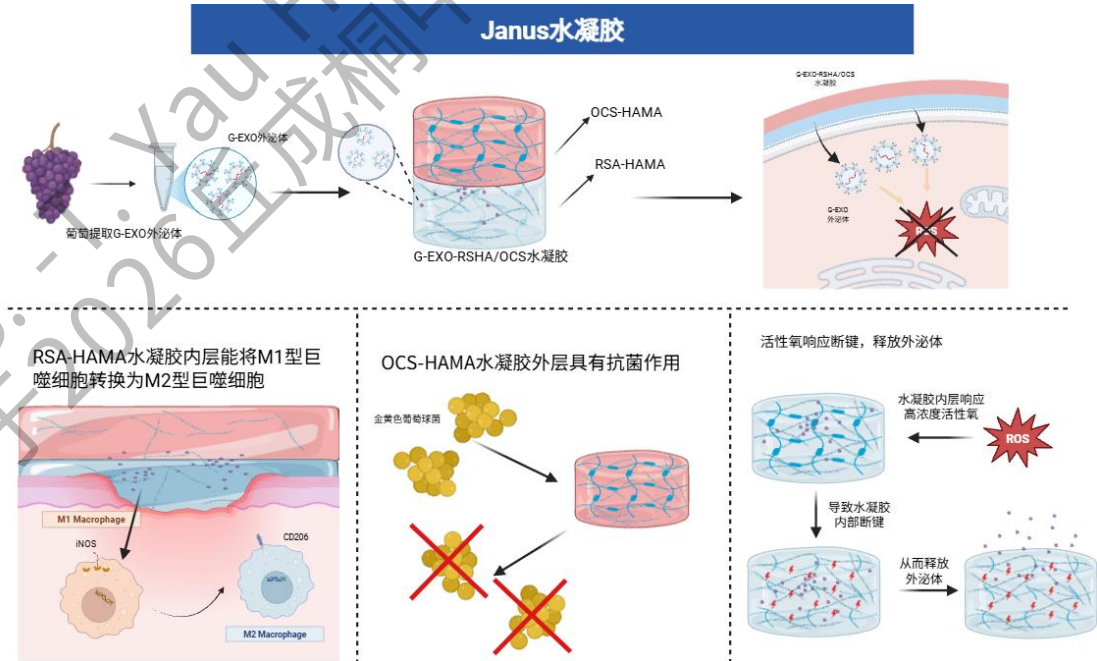


图 1.1 A 实验设计示意图

B

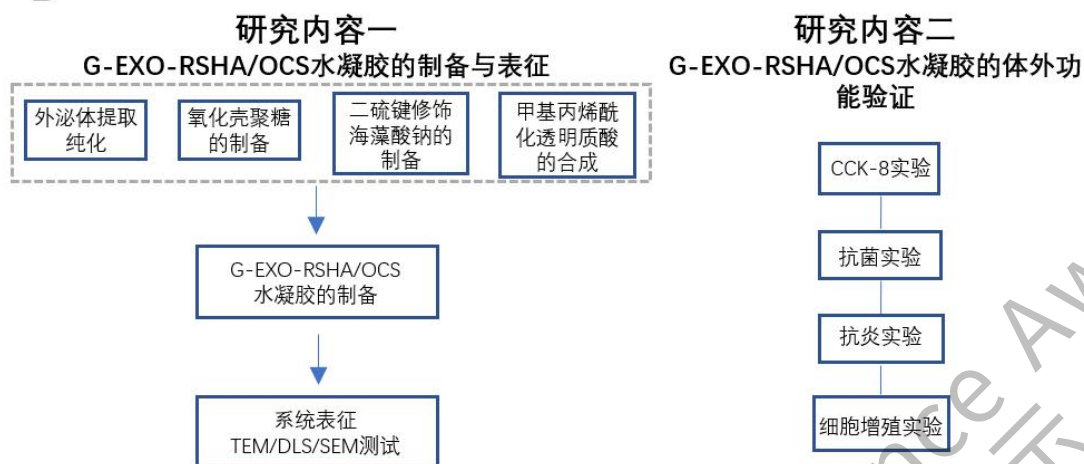


图 1.1 B 技术路线图

1.5 本章小结

本章从口腔溃疡创面氧化还原微环境切入，系统性的分析了市面上的敷料在分子响应胶体交联结构，力学适配方面固有的短板。依次梳理了甲基丙烯酰化的聚合物，二硫键响应机制，植物纳米胶体的国内外研究进展，明确现有的研究的空白，提炼三项可落地的核心科学问题。围绕有机改性、分层光聚合、多层水凝胶及生化协同机制角度拆解课题创新点，匹配研究目的与实验内容。从临床痛点、科学问题、实验设计，形成连贯的课题方案，最终实现制造一种能够从抗菌抗炎的多角度促进口腔黏膜高效修复的水凝胶，为口腔黏膜修复提供了一个新型的高效的方案。

第二章 G-EXO 外泌体/ G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的制备与表征

2.1 引言

第一章指出了口腔溃疡治疗存在的三大核心问题：药物留存时间短、释放过程不可控、功能单一。本章旨在构建一套能够同时解决上述三个问题的材料体系。本研究采用双层分工的设计思路：外层利用氧化壳聚糖（OCS）的正电荷实现即时抗菌效果，内层借助二硫键改性海藻酸钠（ROS-SA）实现活性氧响应释药，并负载葡萄外泌体（G-EXO），发挥抗炎以及促进修复的作用。本章将依次完成三种改性多糖的合成、葡萄外泌体的提取、双层水凝胶的制备，并对材料微观结构与力学性能开展系统表征，为后续体外功能验证奠定材料学基础。

2.2 实验试剂与仪器

2.2.1 实验试剂及耗材

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/耗材名称	生产厂商	货号
新鲜葡萄	食品级	本地生鲜商超
蔗糖		
无菌 PBS 缓冲液 (pH7.4, 0.01M)	500mL / 瓶	Meilunbio
无水乙醇	分析纯 500mL	国药集团化学试剂有限公司
无菌离心管 (50mL/10mL)	无菌无酶	Axygen
透射电镜铜网	200 目	中镜科仪
磷钨酸负染液	1% 水溶液	Solarbio
无菌滤器 (0.22 μ m)	水系	Millipore
壳聚糖	阿拉丁	C1501897
高碘酸钠	阿拉丁	S616472
乙酸溶液	阿拉丁	A433220
乙二醇	阿拉丁	E1523566
氯化钠	阿拉丁	S774705
海藻酸钠	阿拉丁	S100126
EDC	阿拉丁	E106172
NHS	阿拉丁	H109330
透明质酸	阿拉丁	H131007
甲基丙烯酸酐	Sigma	276685

2.2.2 实验仪器明细

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
高速冷冻离心机	Eppendorf	5810R
超速冷冻离心机	Hitachi	CP100WX
透射电子显微镜	日立（HITACHI）	HT7700
马尔文动态光散射粒径电位仪	Malvern	Zetasizer Nano ZS
超纯水仪	Millipore	Milli-Q Reference A+
低温组织匀浆机	Qiagen	TissueLyser II
-80℃超低温冰箱	松下	MDF-382E

2.3 实验方法

2.3.1 葡萄外泌体提取纯化流程

果肉预先用 75%乙醇浸泡 5 min，使用无菌水清洗。然后将 200 g 果肉加等体积 PBS 使用匀浆机破碎。用 5,000 rpm 离心 20 min 以去除纤维碎片，取上清液；再用 10000 rpm 离心 30 分钟去除细胞器，取上清液；再用 110,000rpm 离心 70 分钟收集沉淀得到粗外泌体；然后进行纯化，按从上往下浓度 8%/16%/24%/30%配蔗糖溶液，每层 2 mL，在 4℃ 静置 15 分钟，再用移液枪沿着离心管壁缓慢将粗外泌体加至顶层，100,000 rpm 离心 2 小时。得到 16%-24%层白色絮状物为外泌体；最后，用 PBS 溶解后洗涤，冻干保存备用^[8]。

2.3.2 氧化壳聚糖制备

将 1 g 壳聚糖溶解于 100 毫升室温的 1%乙酸溶液。按重量比 0.6:1 加入高碘酸钠，避光搅拌 24 h，进行氧化后加入等量乙二醇并搅拌 30 分钟，终止反应。后续透析纯化，使用 MWCO 8000-14000 透析袋装载混合液，置于纯水中，每天换水三次，持续三天，以去除杂质如高碘酸钠。最后冻干并将产物于 -20℃ 中保存。

2.3.3 ROS 响应性二硫键修饰海藻酸钠的制备

活性氧响应二硫键改性海藻酸钠制备流程如下：首先将 2 g 海藻酸钠溶于 50 mL 去离子水，室温持续搅拌配制成 2% (w/v) 水溶液。为活化多糖主链上的羧基，依次加入 2.3 g EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) 与 1.5 g NHS (N-Hydroxysuccinimide)，25℃ 避光搅拌 30 min，避免活化中间体提前水解。活化完成后，向反应体系加入 5 mL 含二硫键的伯胺二盐酸盐化合物，25℃ 避光温和搅拌 12 h。活化后的羧基与氨基发生高效酰胺化反应，生成稳定酰胺键，将二硫键共价接枝到海藻酸钠高分子链上，得到改性聚合物粗产物。随后将粗产物装入截留分子量 7 kDa 的透析袋，置于去离子水中透析纯化 3 天，外部透析液每日更换 2 次，除去残留试剂与副产物。透析结束，收集纯化后的溶液，冻干，密封，室温保存，保证二硫键结构完整，备用^[9, 10]。

2.3.4 甲基丙烯酰化透明质酸（HAMA）的合成

甲基丙烯酰化透明质酸（HAMA）的合成过程如下：首先将 1.5 g 透明质酸溶于 500 mL 去离子水中，随后按聚合物与酸酐质量比为 1:1.4 的条件，分三次分别加入 2.17 mL, 1.08 mL, 1.08 mL 甲基丙烯酸酐，每次加入后均使用碱液将反应体系的 pH 调节至 5.5~6.0，并依次搅拌 12, 8, 4 h。反应结束后，将粗产物装入截留分子量为 7 kDa 的透析袋中，在去离子水中透析纯化 72 h，期间每天更换两次外部透析液。最后，将纯化后的 HAMA 溶液冷冻干燥，得到干燥的白色多孔固体，并于 -20 °C 密封干燥保存，以备长期使用^[11]。

2.3.5 制备 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶

制备 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶流程如下：首先配制内层水凝胶液，包含 ROS-SA 8wt%，HAMA 4wt%，G-EXO 200 µg/mL，LAP 0.4wt%，然后制备外层水凝胶液，包含 HAMA 8wt%，LAP 0.4wt%，OCS 4wt%。用紫外灭菌 30min 完成模具的预处理。然后吸取 5 mL 配置好的内层水凝胶液，加入模具底部，并通过抽真空来消泡。然后用 395 nm 紫外灯照射 3 min，使得 LAP 引发交联，直到下层固化。接着沿模具加入 5 mL 外层水凝胶液到内液上，并抽真空消泡，用 395 nm 紫外灯照射 3 min，得到一体化的 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶。水凝胶从模具取出后，用 PBS 洗涤三次，在 4°C 下密封保存。（光固化与后处理工艺参考^[12]）

2.4 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的物理化学性能

2.4.1 G-EXO 的蛋白质定量

首先将试剂 A 与试剂 B 按 50:1 的比例混合以配制工作液。在 96 孔板中，依次加入 20 µL 浓度由低到高的标准品；目标蛋白样品需先进行稀释，每个样品设置两至三个复孔进行测试。随后，向每孔中加入 200 µL BCA 工作液，并将酶标板避光保存以防止干扰。反应混合物于 37°C 孵育 30 min。反应结束后，标准品孔中会出现明显的颜色梯度，从低浓度的浅绿色逐渐变为高浓度的深紫色，反映出蛋白质浓度的递增。使用酶标仪或紫外分光光度计在 562 nm 波长处测定吸光度。仪器自动输出吸光度值，并根据已知标准品绘制的标准曲线计算蛋白质浓度，从而确定待测样品的蛋白质含量。

试剂 A 与试剂 B 按照 50:1 比例混合，配制工作液。96 孔板中依次加入 20 µL 由低到高浓度的蛋白标准品。待测蛋白样品预先稀释，每个样品设置 2-3 个复孔。每孔加入 200 µL BCA 工作液，酶标板避光放置，避免干扰。37 °C 孵育 30 min。反应结束后，标准孔会出现明显颜色梯度，低浓度呈浅绿色，高浓度变为深紫色，反映蛋白浓度逐步升高。使用酶标仪或者紫外分光光度计在 562 nm 波长测定吸光度。仪器输出吸光度数值，根据标准品绘制标准曲线，计算得到待测样品蛋白浓度，以此确定 G-EXO 的蛋白含量。（这段描述的操作步骤是经典的 BCA 法（二喹啉甲酸法，Bicinchoninic Acid Assay）蛋白质浓度测定^[13]）

2.4.2 G-EXO 的 TEM 测试

透射电子显微镜（TEM）以铜网为载体，操作时用镊子小心夹持铜网。首先将样品分

散至合适溶剂，保证颗粒分散均匀。然后将外泌体需悬浮于去离子水中，防止结构被破坏。一般需要配制一系列梯度稀释样品（例如 10、50、100、200、500 $\mu\text{g/mL}$ ）。再将样品溶液滴加到铜网。滴加完成后室温自然晾干，溶剂挥发，纳米颗粒附着于铜网表面。将制备完成的铜网放入透射电镜，开展成像分析。

2.4.3 G-EXO 的 DLS 测试

将样品溶于去离子水配制成 50 mg/mL 溶液，充分溶解后转移至样品池。将样品池插入仪器样品仓，盖好遮光盖隔绝外界光线。仪器输出原始数据经过处理拟合，得到粒径分布、Zeta 电位、多分散指数（PDI）等参数。

2.4.4 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的 SEM 测试

需要先对成胶后的水凝胶进行冷冻干燥，通过低温升华去除水分。然后，将冻干后的水凝胶贴在固定于导电台的导电胶上，避免抽真空时样品移位。接着在样品表面磁控溅射一层薄金膜提升导电性，以改善成像质量，用 30-35 毫安喷 3 分钟即可。喷金完成后即可上机测试，卡入样品后抽真空、加电压、对焦即可观测。

2.5 结果与讨论

2.5.1 G-EXO 的表征

G-EXO 的微观形态、粒径分布及胶体稳定性直接决定其是否能负载于水凝胶内层。通过 TEM 的手段检测了 G-EXO 的内部形态。结果如图 2.1 显示。得到的画面显示 G-EXO 内部呈现多个不规则圆形，表现出了外泌体的磷脂双分子层结构。该外泌体的磷脂双分子层结构使得其能抵抗细胞外 RNase、蛋白酶及损伤后微环境的降解，还能与靶细胞膜发生膜融合将内容物直接送入细胞质，拥有高递送效率。甘勇/俞淼荣团队通过工程化调控外泌体膜胆固醇含量，证实外泌体磷脂双分子层可使包载的 siRNA 抵抗 RNase 降解，并能与靶细胞膜发生融合将 siRNA 直接递送入细胞质、绕过溶酶体降解，从而使 siRNA 的基因沉默效率显著优于传统脂质纳米粒，实现了更高效率的 RNA 胞质递送^[14]。

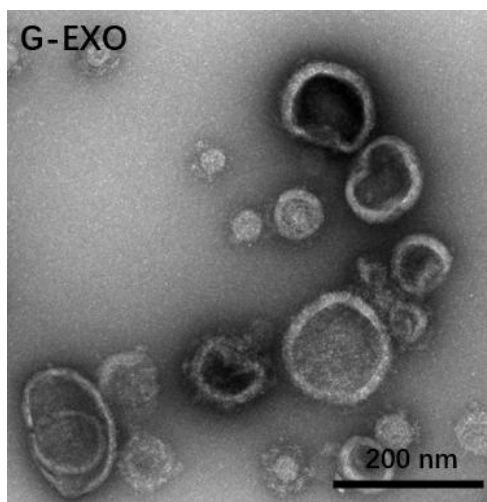


图 2.1 G-EXO 的 TEM 表征

DLS 测试结果（图 2.2 A-C）显示：G-EXO 平均水合粒径为 133.3 ± 4.5 nm（图 2.2A），多分散指数 $PDI = 0.296 \pm 0.017$ （图 2.2B）。PDI 小于 0.3 说明 G-EXO 粒径分布较为均一，样品分散性良好，适合后续载入水凝胶基质。G-EXO 的 Zeta 电位为 -12.9 ± 0.4 mV（图 2.2C）。对于生物来源的囊泡体系，该电位水平可以维持胶体体系的短期基本稳定。

DLS 与 TEM 两种独立检测手段得到一致结论：G-EXO 粒径适中（ 133.3 ± 4.5 nm）、分散均一（ $PDI 0.296 \pm 0.017$ ），满足后续水凝胶负载的尺寸要求。

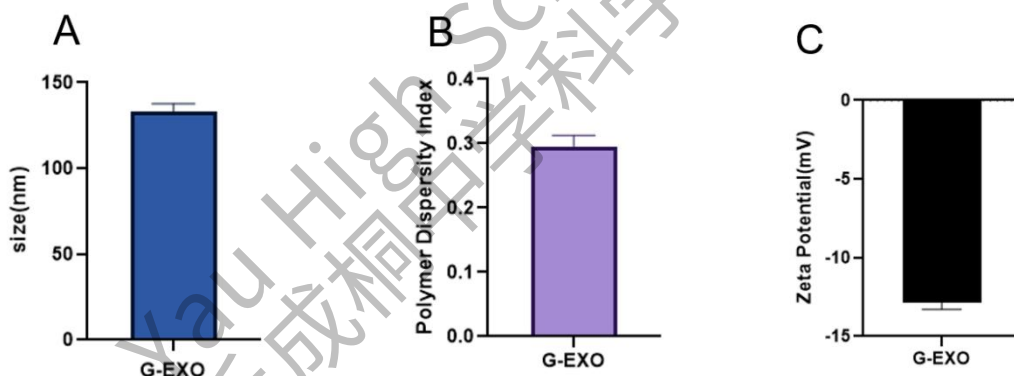


图 2.2 G-EXO 的 DLS 表征。（A）G-EXO 的平均水合粒径，（B）G-EXO 的多分散指数，（C）G-EXO 的 Zeta 电位

2.5.2 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的形貌表征

冻干后的水凝胶外层（OCS/HAMA 层）和内层（RSA/HAMA 层）在扫描电子显微镜（SEM）下呈现截然不同的微观形貌和结构特征。如图 2.3 所示，水凝胶外层（OCS/HAMA 层）呈现出较为致密的折叠片层状结构，与下层相比孔隙率较低，层间形成较为紧密的堆叠形貌。上层的致密结构有利于在口腔侧形成有效的物理屏障，阻隔食物残渣和细菌等外源污染物的侵入，同时壳聚糖的阳离子特性可进一步发挥主动抗菌作用。

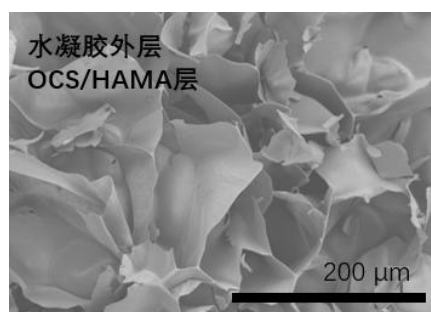


图 2.3 用 SEM 对水凝胶外层（OCS/HAMA 层）进行表征

如图 2.4 所示，水凝胶内层（RSA/HAMA 层）呈现出高度多孔的三维连通网络结构，孔径范围约为 50 - 200 μm ，孔壁之间相互交联形成类似海绵状的支架结构。这种高度多孔的微观形貌有利于营养物质的扩散传输和细胞的迁移渗透，同时为负载的 G-EXO 提供了充足的储存空间和释放通道。

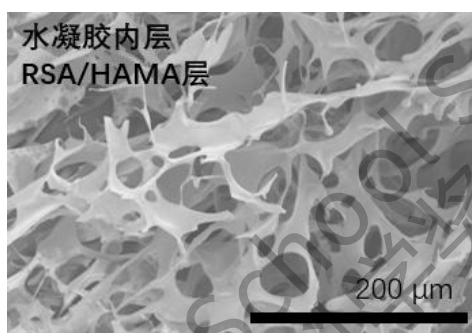


图 2.4 用 SEM 对水凝胶内层（RSA/HAMA 层）进行表征

2.5.3 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的流变学表征

如图 2.5 所示，光照前（0-70 s），两组体系均表现为典型的黏性流体特征， G' 与 G'' 处于低模量区且相互接近。约 75 s 开启 395 nm 紫外光照后，LAP 引发甲基丙烯酸酯双键发生自由基交联， G' 急剧上升并在短时间内大幅度超越 G'' ，标志着体系完成溶胶-凝胶转变，形成稳定的三维弹性网络。具体而言，RSHA/OCS 组 G' 迅速升至约 1×10^4 Pa 的平台， G'' 稳定在约 5×10^1 Pa。G-EXO-RSHA/OCS 组呈现几乎一致的固化轨迹， G' 平台同样达到约等于 1×10^4 Pa， G'' 约为 5×10^1 - 7×10^1 Pa。上述结果表明，G-EXO 的引入并未干扰光交联反应，复合水凝胶仍具备快速固化的能力。整个测试过程中， G' 始终高于 G'' 且两者差距达 2 - 3 个数量级，证实材料具有优异的弹性凝胶行为。

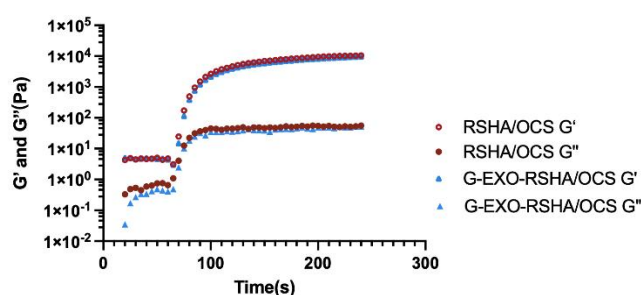


图 2.5 用流变仪对 RSHA/OCS 水凝胶及 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶进行流变学表征

2.6 本章小结

本章成功合成 OCS、ROS-SA、HAMA 三种改性多糖，并通过两步分层紫外光聚合制备 G-EXO-RSHA/OCS 双层水凝胶，同时利用超速离心提取 G-EXO。表征结果如下：透射电镜证实 G-EXO 具备典型磷脂双分子层结构。DLS 测得平均水合粒径 $133.3 \pm 4.5 \text{ nm}$ ，PDI 为 0.296 ± 0.017 ，Zeta 电位 -12.9 mV ，说明样品分散均匀、胶体稳定性良好。SEM 显示水凝胶外层为致密片层结构，提供物理屏障与抗菌界面。内层为 $50\text{-}200 \text{ }\mu\text{m}$ 连通多孔网络，利于物质转运以及 G-EXO 负载。流变测试表明， 395 nm 光照下体系快速发生溶胶-凝胶转变， G' 最终可达约 $1 \times 10^4 \text{ Pa}$ 且始终高于 G'' ，证实材料可快速固化，形成稳定弹性网络；引入 G-EXO 不会干扰光交联反应。上述结果为后续体外微环境调控相关实验提供了可靠的材料基础。

第三章 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的体外口腔 溃疡微环境的调控

3.1 引言

第二章证实了 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶具有合适的微观结构和力学性能。但材料的结构和力学性能好不等于有效果。在真实的口腔溃疡微环境中，这套材料能否有效抗菌？能否调控炎症？能否安全地促进细胞修复？这些问题则需要通过体外实验来回答。

本章从三个维度验证材料的体外功能，通过 CCK-8 法评估材料生物相容性并筛选最佳浓度；利用流式细胞术分析巨噬细胞 M1/M2 极化表型转化；采用平板菌落计数法检测对金黄色葡萄球菌的抑制效果；并通过划痕实验初步考察细胞迁移能力。这些实验的结果将直接决定该材料是否值得进入动物实验阶段。

3.2 实验试剂及耗材

本章节使用的有关实验试剂及耗材如表 3.1 所示。

表 3.1：试剂与耗材

试剂/耗材名称	生产厂商	货号
HOK 细胞系	万物生物	Delf-16831
基础培养基	Gibco	11965118
胰酶消化液	Gibco	12605010
胎牛血清	Gibco	A3160801
青霉素-链霉素双抗	Gibco	15140-122
CCK-8 试剂盒	Bimake	230063

3.3 实验仪器明细

本章节使用的有关实验试剂及耗材如表 3.2 所示。

表 3.2：实验仪器

实验仪器名称	生产厂商	型号
酶标仪	BioTek	Cytation 3
培养基箱	Thermo	-
离心机	Eppendof	Centrifuge 5452R

3.4 实验步骤

3.4.1 细胞复苏

将冻存于液氮中的 HOK 细胞放入 37°C 水浴，融化后加入培养基离心 5 min, 150 g, 去除上清液，重悬于含有 10%胎牛血清+1%双抗的培养基中，再放入培养皿于 37°C 培养箱里培养复苏。

3.4.2 细胞传代

当细胞培养到培养 85%的密度时，需要进行传代。首先去除上清培养基，仅留下层的贴壁细胞，并用 PBS 缓冲液清洗细胞 3 次以去除残留糖分和杂质。然后加入 1-2mL 少量胰酶消化酶，浸润细胞 3-5 分钟使贴壁细胞从容器底部自然脱落，接着加入等量 1-2 mL FBS 以终止消化。最后在离心之后去除上清，最终得到的沉淀就是扩增后的细胞。将细胞重悬于培养基中，进行扩增培养。

3.4.3 CCK-8 实验

取合适密度的细胞进行消化后，重选在培养基中计算密度，均匀地加入 10^5 个细胞到 96 孔板中。加样完成后，需让细胞贴壁 12 h 后，向对应孔中放入检测的材料并培养 24 h。检测的材料有水凝胶组（按 0%，10%，20%，40%，80%浓度配置），和外泌体组（按 0 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 800 $\mu\text{g/mL}$, 1600 $\mu\text{g/mL}$ (1.6 μL) 配置)。培养结束后，弃掉孔内原有的材料和液体，再在每孔中加入 90 μL 的新鲜培养基和 10 μL 的 CCK-8 试剂，反应 2 个小时后，将 96 孔板放入酶标仪以进行 495 nm 波长检测即可得到每个孔的吸光度(A)。并计算细胞存活率 (%) [15]:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_{\text{treated}} - A_0}{A_{\text{blank}} - A_0} * 100\%$$

A_{treated} : 经过材料干预 24 h 后的细胞吸光度; A_{blank} : 无材料无细胞的空白对照组吸光度;
 A_0 : 无材料干预的细胞吸光度。

3.4.4 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的抗菌实验

首先用无菌水配置 LB 液体培养基 (10g/L 胰蛋白胨, 5g/L 酵母提取物, 10g/L 氯化钠)。然后在 121°C 下高压灭菌 20 分钟，冷却后使用。灭菌后，将菌体放入摇床振荡培养 12-24 小时，待细菌进入对数生长期时将菌液分组，分为对照组和多个实验组。在实验组中加入制备的水凝胶，对照组不加水凝胶，继续在摇床培养数个小时，通过测定 OD 值和 CFU 以判断抗菌效果。

3.4.5 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的划痕实验：

将贴壁细胞培养，使得细胞铺满整个培养皿的底部，形成完整的一层，无明显空隙的细胞。然后使用移液枪头垂直于板底划一条宽度均匀的直线划痕，即可得到模拟的伤口。划痕完成后立即在显微镜下拍摄照片，用软件测量划痕的面积和宽度。培养 24 h 后再次拍摄照片，测量此时划痕的面积和宽度，并计算愈合率：

$$\text{愈合率 (\%)} = \frac{\text{初始划痕宽度} - \text{对应时间划痕宽度}}{\text{初始划痕宽度}} * 100\%$$

3.4.6 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶流式细胞实验：

细胞收集后经 PBS 缓冲液清洗 3 次，用 1% FBS 室温孵育 1 h，封闭非特异性结合位点。然后 4℃ 避光孵育一抗及荧光二抗，用 PBS 洗去游离抗体后重悬为单细胞悬液上机。仪器通过流体聚焦使细胞单列通过检测孔，采集前向/侧向散射光及荧光信号，软件先以 FSC-SSC 散点图圈选目标细胞群，再通过直方图分析荧光强度，以 10^3 为阈值判断荧光信号强弱。

3.5 结果与讨论

3.5.1 水凝胶（RSHA/OCS）的细胞毒性

生物安全性是水凝胶是否能用于口腔黏膜修复的首要前提。而通过 CCK-8 法可以检测出不同浓度水凝胶（RSHA/OCS）和葡萄外泌体（G-EXO）对于细胞存活率的影响，以筛选出各组中的最优使用浓度并确认其生物相容性。

水凝胶的细胞毒性呈现出清晰的浓度依赖性（如图 3.1）。低浓度组（10%、20%）的细胞存活率达到 $99.2 \pm 2.5\%$ 和 $93.1 \pm 5.2\%$ ，与对照组相比无显著差异，说明低浓度范围内的材料具有良好的生物安全性。然而，当浓度升高至 40% 时，细胞存活率则下降至 $88.4 \pm 3.7\%$ ，80% 高浓度下又进一步降低至 $70.8 \pm 2.0\%$ 。后两组均表现出显著的细胞毒性。

鉴于此，水凝胶在低浓度范围内（ $\leq 20\%$ ）具有良好的生物相容性，但在高浓度下（ $\geq 40\%$ ）对细胞活力产生一定抑制作用。所以，我们将在后续功能性实验中将水凝胶浓度控制在 20% 以内。

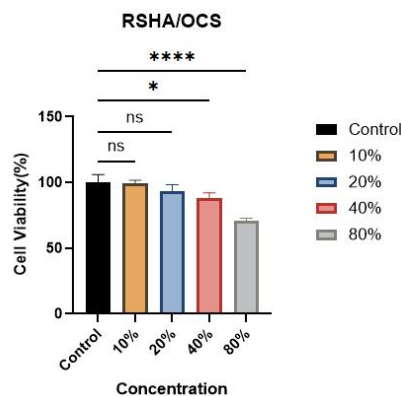


图 3.1 不同浓度 RSHA/OCS 水凝胶的细胞存活率

3.5.2 G-EXO 的细胞毒性与促增殖效果

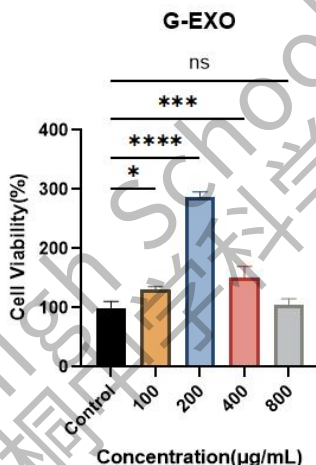


图 3.2 不同浓度的 G-EXO 的细胞存活率

如图 3.2 所示，G-EXO 对细胞活力的影响呈现出明显的浓度依赖性双向效应。在 100 - 400 µg/mL 浓度范围内，G-EXO 均表现出促进细胞增殖的作用。其中，200 µg/mL 浓度下细胞存活率最高，达 $143.3 \pm 2.1\%$ ，与对照组相比具有极显著差异，表明该浓度下 G-EXO 可显著促进细胞增殖。100 µg/mL 和 400 µg/mL 浓度下细胞存活率分别为 $105.1 \pm 1.0\%$ 和 $110.0 \pm 4.5\%$ ，均高于对照组但促增殖效果弱于 200 µg/mL。当浓度进一步升高至 800 µg/mL 时，细胞存活率回落至 $98.4 \pm 2.6\%$ ，与对照组无显著差异。而在 1600 µg/mL 高浓度下，细胞存活率显著下降至 $72.7 \pm 2.7\%$ ，表现出明显的细胞毒性。

基于以上数据，后续实验统一采用 200 µg/mL，这一浓度既能触发显著促增殖效应，又远低于毒性阈值。

3.5.3 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的生物相容性

在前两个实验中，已经确认了 RSHA/OCS 空白水凝胶在低浓度范围 ($\leq 20\%$) 内具有

良好的生物安全性，且 G-EXO 在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可显著促进细胞增殖并无明显毒性。但是，将两者复合为 G-EXO-RSHA/OCS 双层水凝胶后，其中是否会产生协同毒性效应，和其复合体系是否仍然满足口腔黏膜修复的生物相容性要求，这些问题还需要继续进行验证。

如图 3.3 所示，G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶组的细胞存活率为 108.5%，与空白对照组相比具有显著性差异，表明该复合水凝胶可显著提升细胞存活率，且未表现出明显的细胞毒性。所以，G-EXO-RSHA/OCS 复合水凝胶可以用在后续实验中。

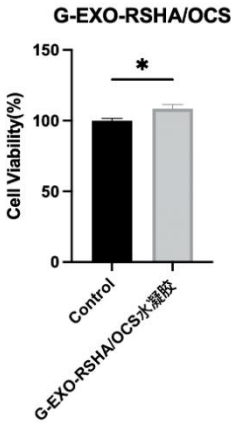


图 3.3 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的细胞存活率

3.5.4 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶调控巨噬细胞炎症表型

本实验使用脂多糖 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞构建体外炎症模型，借助流式细胞仪检测 M1 促炎型标志物 iNOS 及 M2 修复型标志物 CD206 的阳性表达占比，以此评估不同多糖材料调控巨噬细胞表型转化的能力。实验组别分为空白对照，游离 G-EXO 组，RSHA/OCS 空白水凝胶组，以及 G-EXO-RSHA/OCS 复合水凝胶组。

iNOS 作为 M1 促炎巨噬细胞的特征标记蛋白。如图 3.4 A 所示 LPS 刺激后空白对照组，iNOS 阳性细胞占比达到 64.9%，代表绝大多数的巨噬细胞已转化为促炎表型。促炎表型会释放大量促炎因子，加重创面的红肿和炎症。经过游离 G-EXO 外泌体干扰后，iNOS 阳性细胞占比下降到 43.8%；单纯的 RSHA/OCS 水凝胶对于 iNOS 阳性细胞占比的影响有限，占比为 59.1%；而负载 G-EXO 外泌体的 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶可以将 iNOS 阳性细胞比例下调至 46.0%。以上数据说明纯 RSHA/OCS 水凝胶的抗炎调控能力相对薄弱，敷料中主要起到抑制 M1 促炎巨噬细胞作用的是负载的 G-EXO 外泌体。相比于游离外泌体组，被 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶包裹的外泌体展现出了相对较弱的抗炎能力。这是由于水凝胶的包裹限制了细胞与 G-EXO 外泌体的直接接触，在口腔损伤微环境中，高活性氧能够裂解 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶，释放外泌体，实现活性成分的高效控制释放。

CD206 作为 M2 抗炎修复型巨噬细胞的特征标记蛋白，可以反映细胞促进抗炎修复的水平。如图 3.4 B 所示空白对照组仅有 5.86% 的巨噬细胞表达出 CD206 阳性。游离状态下的 G-EXO 外泌体有着出色的诱导巨噬细胞向修复表型转化的能力，阳性细胞占比升到 48.8%；空白 RSHA/OCS 水凝胶对于 CD206 阳性细胞占比的影响有限，占比为 12.4%。而负载 G-EXO 外泌体的 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶可以将 CD206 阳性细胞占比提升至 24.9%。对比游离囊泡，G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶缓释体系的即时 M2 诱导数值低于游离外泌体组，但可实现长时间持续的调控。

综合以上实验可以得出结论：G-EXO-RSHA/OCS 双层响应型水凝胶依靠可控释放

G-EXO 外泌体抑制 M1 促炎巨噬细胞活化，诱导巨噬细胞转向 M2 抗炎修复型，以此改善口腔溃疡部位失衡的炎症微环境，减轻过度炎症损伤，加速口腔黏膜组织愈合。

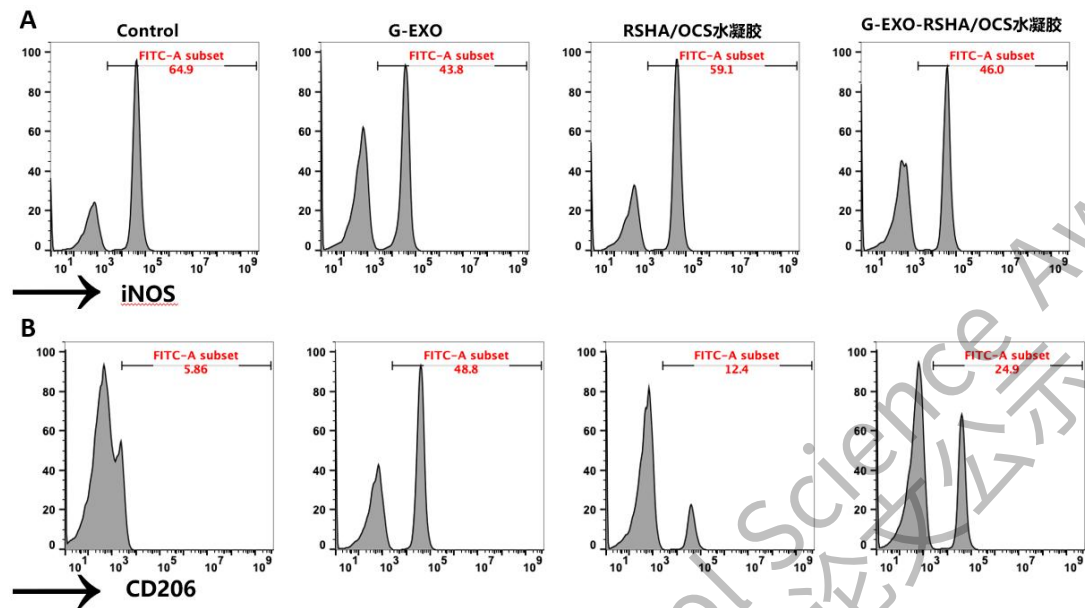


图 3.4 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶对巨噬细胞的表型调控能力

3.5.5 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的抑菌性能测试

采用平板菌落计数法探究各组样品对金黄色葡萄球菌的抑制效果。金黄色葡萄球菌属于常见的口腔溃疡创面常见的条件致病菌。病菌定植繁殖会持续加重伤口感染，维持局部炎症反应。本实验设置空白对照组，G-EXO 外泌体组，水凝胶内层 RSA/HAMA 组，RSHA/OCS 水凝胶组，以及 G-EXO-RSHA/OCS 复合水凝胶组。

结合琼脂平板实拍图片（图 3.5）以及活菌定量数据，细菌下降对数值（表 3.3）展开分析。空白对照组活菌浓度到达 6.21×10^{10} CFU/mL，平板表面布满密集的菌落。经 G-EXO 外泌体处理的活菌浓度为 6.15×10^{10} CFU/mL，细菌对数下降值为 0.01 ± 0.24 ；单内层 RSA/HAMA 水凝胶处理的活菌浓度是 5.98×10^{10} CFU/mL，细菌对数下降值是 0.03 ± 0.15 ，肉眼能够观察到该两组培养皿遍布菌落，证明单纯囊泡以及不带阳离子基团的多糖支架几乎不存在抑菌作用。当多糖水凝胶中引入阳离子氧化壳聚糖后，RSHA/OCS 水凝胶组的活菌浓度下降至 2.91×10^7 CFU/mL，细菌对数下降值为 3.32 ± 1.19 ，带正电荷的氧化壳聚糖依靠静电吸附作用粘附组带负电的细菌外膜，破坏细胞外结构，由此产生高效的抑菌效果。负载活性囊泡的 G-EXO-RSHA/OCS 双层水凝胶组表现出类似的抗菌能力，培养液活菌浓度为 8.14×10^8 CFU/mL，细菌对数下降值为 1.88 ± 0.62 。敷料上层的 OCS 屏障层可以立刻接触到细菌产生抗菌作用，下层具备 ROS 响应特征的水凝胶能够在溃疡的高活性氧微环境下缓释囊泡内的多酚活性成分，进一步干扰细菌代谢蛋白活性。二者形成协同抗菌机制。该复合敷料高效抑制细菌增殖能够减少创口病菌定植风险，阻断感染持续诱发炎症，为口腔修复创造洁净的修复环境。

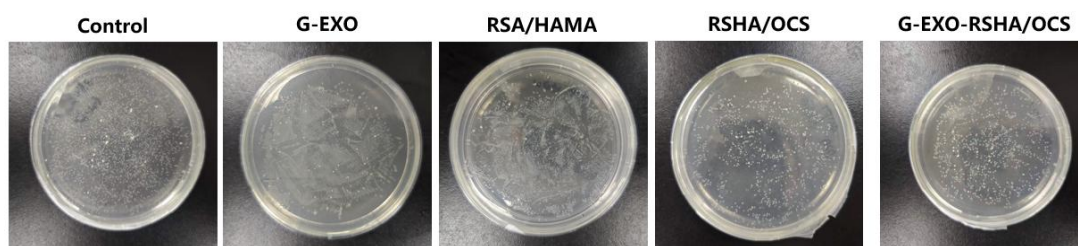


图 3.5 G-EXO-RSHA/OCS 的抑菌性能照片

表 3.3 G-EXO-RSHA/OCS 的抗菌定量数据

Series	CFU/mL	Log Reduction
Control	6.21×10^{10}	-
G-EXO	6.15×10^{10}	0.01 ± 0.24
RSA/HAMA	5.98×10^{10}	0.03 ± 0.15
RSHA/OCS	2.91×10^7	3.32 ± 1.19
G-EXO-RSHA/OCS	8.14×10^8	1.88 ± 0.62

表 3.3 G-EXO-RSHA/OCS 的抗菌定量数据

Series	CFU/mL	Log Reduction
Control	6.21×10^{10}	-
G-EXO	6.15×10^{10}	0.01 ± 0.24
RSA/HAMA	5.98×10^{10}	0.03 ± 0.15
RSHA/OCS	2.91×10^7	3.32 ± 1.19
G-EXO-RSHA/OCS	8.14×10^8	1.88 ± 0.62

3.5.6 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的细胞恢复性测试

本实验采用体外划痕愈合模型，用 HOK 细胞为实验对象，模拟口腔溃疡创面的物理缺损和测量一定时间后划痕宽度的变化来评估各组材料对细胞迁移修复的效果。实验设置了空白对照组（control）、RSHA/OCS 空白水凝胶组以及 G-EXO-RSHA/OCS 复合水凝胶组，在划痕 0 h 和 72 h 分别采集显微图像（图 3.6）。如图像所示，在划痕后 0 h 各组宽度基本一致，而在 72 h 后各组划痕面积呈现出明显差异。空白对照组有部分细胞向中心迁移，划痕仍较宽。RSHA/OCS 水凝胶组的划痕收窄程度略优于对照组，但明显弱于含 G-EXO 的实验组。G-EXO-RSHA/OCS 复合水凝胶组的划痕愈合程度显著优于前两组，表面复合水凝胶具有最优秀的愈合率，也表明 G-EXO 外泌体具有帮助细胞愈合的能力。

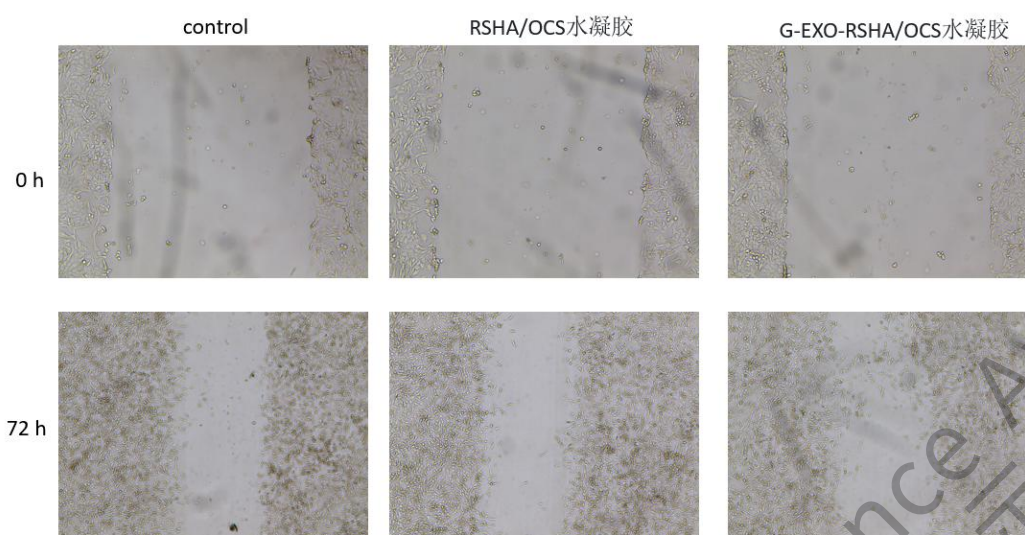


图 3.6 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的伤口愈合模型

3.6 本章小结

本章通过体外细胞与抗菌实验，系统评价了 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的生物相容性及调控口腔溃疡微环境的能力。CCK-8 结果显示，水凝胶浓度 $\leq 20\%$ 时细胞存活率 $>93\%$ ，无明显毒性；G-EXO 在 $200 \mu\text{g/mL}$ 时促增殖效果最佳， $1600 \mu\text{g/mL}$ 时呈现毒性。流式细胞术表明，该水凝胶可将 LPS 诱导的巨噬细胞 iNOS 阳性率从 64.9% 下调至 46.0% ，并将 CD206 阳性率从 5.86% 提升至 24.9% ，证实其能抑制 M1 型促炎表型并诱导向 M2 型修复表型转化，且 G-EXO 的包裹可实现长效缓释。抗菌实验显示，外层 OCS 凭借正电荷破坏细菌膜，使金葡萄活菌浓度从 $6.21 \times 10^{10} \text{ CFU/mL}$ 降至 $2.91 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$ ，对数下降 3.32 ，复合体系亦达对数 1.88 降幅，体现即时抗菌与缓释协同。上述结果证明该水凝胶在体外具有优异的生物安全性、免疫调控与抗菌功能，为后续动物实验与临床转化提供了实验依据。

第四章 总结与展望

4.1 总结

本研究构建了活性氧响应型 G-EXO-RSHA/OCS 双层水凝胶体系，利用动态二硫键在氧化应激微环境下的特异性断裂特性，以及氧化壳聚糖的正电荷抗菌性能。通过两步分层紫外光聚合工艺与植物外泌体密度梯度超速离心提取方法，制备得到兼具即时抗菌与长期免疫调控功能的智能敷料，旨在解决复发性口腔溃疡传统治疗方案无法同时实现抗感染与炎症调控、药物释放不可控的痛点。

体外实验层面，该水凝胶展现出三项明确的功能优势：外层氧化壳聚糖可在 30 min 内将金黄色葡萄球菌活菌浓度降低 3 个数量级；200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的葡萄外泌体可将巨噬细胞 M2 型极化率由 5.9% 提升至 24.9%；整套体系可使细胞存活率维持在 93% 以上。上述数据总体证实，该活性氧响应双层水凝胶用于口腔溃疡创面修复具备可行性，有望改善现有激素类、抗炎镇痛类常用治疗手段药效持续时间短、药物功能单一、溃疡易复发、无法阻断炎症恶性循环等缺陷。但要实现临床转化，仍需借助动物模型验证该材料在口腔动态环境（唾液稀释、咬合力、微生物群落）下的实际作用效果。

4.2 展望

目前 G-EXO-RSHA/OCS 双层水凝胶的制备、理化及生物学表征工作已全部完成，但距离实际临床应用仍存在明显差距。以植物外泌体筛选为例：尽管本研究证实葡萄外泌体具备抗炎、促修复活性，但其提取成本较高，不同批次间基质成分存在波动。该不稳定性直接制约规模化制备的可行性。可利用不同分子特征的植物外泌体拓展该材料在更多疾病模型中的应用。

从材料设计角度来看，二硫键接枝率尚未实现精准调控，而接枝率高低会直接决定水凝胶在活性氧微环境中的降解速率与药物释放曲线。与此同时，虽然细胞模型实验能够初步验证材料的生物安全性与促愈合效果，但动物与人类的口腔解剖结构、免疫微环境存在显著差异，动物模型安全性评价环节必不可少。最后，实验室阶段的手工制备工艺难以满足临床所需要的产品一致性与产量要求，开发规模化制备工艺是连接实验室原型与商品化产品的必经环节。只有逐一攻克上述问题，该类基于动态共价化学的智能敷料才具备走向临床精准治疗的基础。

参考文献

- [1] 张志愿, 周学东, 郭传瑛, 程斌. 口腔科学 [M]. 2018.
- [2] SEGNEANU A E, BEJENARU L E, BEJENARU C, et al. Advancements in Hydrogels: A Comprehensive Review of Natural and Synthetic Innovations for Biomedical Applications [J]. *Polymers (Basel)*, 2025, 17(15).
- [3] CHOI H, CHOI W S, JEONG J O. A Review of Advanced Hydrogel Applications for Tissue Engineering and Drug Delivery Systems as Biomaterials [J]. *Gels*, 2024, 10(11).
- [4] ANIRUDHAN T S, PARVATHY J, NAIR A S. A novel composite matrix based on polymeric micelle and hydrogel as a drug carrier for the controlled release of dual drugs [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 136: 1118–27.
- [5] LI Y, JIANG S, SONG L, et al. Zwitterionic Hydrogel Activates Autophagy to Promote Extracellular Matrix Remodeling for Improved Pressure Ulcer Healing [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 740863.
- [6] WEI M, WANG H, WU J, et al. Multihydrogen Bond Modulated Polyzwitterionic Removable Adhesive Hydrogel with Antibacterial and Hemostatic Function for Wound Healing [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16(17): 21472–85.
- [7] WU W, ZHANG B, WANG W, et al. Plant-Derived Exosome-Like Nanovesicles in Chronic Wound Healing [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 11293–303.
- [8] TENG Y, HE J, ZHONG Q, et al. Grape exosome-like nanoparticles: A potential therapeutic strategy for vascular calcification [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1025768.
- [9] ROWLEY J A, MADLAMBAYAN G, MOONEY D J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials [J]. *Biomaterials*, 1999, 20(1): 45–53.
- [10] MA W, WANG X, ZHANG D, et al. Research Progress of Disulfide Bond Based Tumor Microenvironment Targeted Drug Delivery System [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 7547–66.
- [11] PRATA J E, BARTH T A, BENCHERIF S A, et al. Complex fluids based on methacrylated hyaluronic acid [J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(3): 769–75.
- [12] AHMED E M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review [J]. *J Adv Res*, 2015, 6(2): 105–21.
- [13] SMITH P K, KROHN R I, HERMANSON G T, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid [J]. *Anal Biochem*, 1985, 150(1): 76–85.
- [14] ZHUO Y, LUO Z, ZHU Z, et al. Direct cytosolic delivery of siRNA via cell membrane fusion using cholesterol-enriched exosomes [J]. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19(12): 1858–68.

致谢

首先，我要感谢我的指导老师田润老师（上海星河湾双语学校一级教师）。她无偿为了我提供了指导，教我本课题相关的理论知识，带我设计实验细节，让我开始深入接触到医疗化学。没有田老师的帮助，我不会意识到原来要取得研究成果究竟是如此的艰难。

我一直对以食物为基础研制的化学药品感兴趣，也对其背后的生化知识感兴趣。我注意到在日常生活中复发性口腔溃疡对人们带来非常多的困扰，比如我的许多同学都因为佩戴金属牙箍而导致口腔溃疡常常复发且难以康复。因此，我才会想到要设计一款药物能够帮助复发性口腔溃疡的恢复。项目开始时，我学习了关于水凝胶及其在医疗方面上的应用、外泌体的医学疗效，及复发性口腔溃疡的发病原因及治疗方法。我的指导老师田润老师提出了设计一种双层水凝胶的大方向，启发我可以结合使用葡萄外泌体来辅助修复口腔黏膜损伤。围绕这个想法，我阅读了非常多的文献材料，并与她讨论了几种可能的模型之后，我最终确定了“葡萄外泌体复合修复水凝胶在口腔黏膜损伤修复中的应用”这一具体课题，目标是设计并测试一种含葡萄外泌体的 Janus 水凝胶（G-EXO-RSHA/OCS）及其对于口腔溃疡损伤的修复效果和生物安全性。

我自学了关于水凝胶、口腔溃疡及口腔溃疡的治疗修复方面的知识，完成了论文中 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶整体的全部设计及研发。此外，针对这款水凝胶的疗效的测试，我自己选择了并使用多种表征测试方法及抗菌、抗炎实验等方式评定了这款水凝胶的治疗效果及生物安全与相容性，并将结果绘制成论文中的图表。我亲自进行测试、完成实验、调整对照组与实验组，最终整理出论文中的表格与图形。论文初稿由我根据我进行实验时的实验日志独立写成，之后根据指导老师的意见进行修改。

田润老师帮助我设计了切实可行的研究计划，为我推荐了关于口腔溃疡和水凝胶的书籍与文献，讲解了我此前没有接触过的 Janus 水凝胶的原理和制备方式，并经常要求我为每一步推导给出理由。她建议我用多种测试交叉判断我制作的水凝胶的表征和效果，比如 DLS, TEM, CCK-8 等方式。同时，她还对我论文的结构与写作提出了建议。她阅读了我的每一稿，对图表设计、实验设计、参考文献等提出了意见。在理解论证之后重新完成设计、实操、测试并分析数据、解释结果以及撰写最终版本都是由我本人完成的。

我最先卡住的地方是如何将一个理想的想法落实到实打实的设计和实操。作为一个高中生，对于将想法落实的办法还缺少一些经验。而在我请教了田润老师，并阅读了她推荐给我的和我搜索到的参考文献后，提升了许多我所不足的实验技能，并帮助我完成了这份研究。第二个碰到的困难是如何控制实验测试得到的数据误差。我通过增加样本数量、添加对照组与空白组、反复测试误差较大的部分，最终发现了某些误差的原因也将误差降到了可接受的范围。在我的研究过程里，我非常感谢中国科学技术大学高等研究院提供了实验室，让我能够在专业老师的指导下完成实验。作为一名高中生，本次实验均在中国科学技术大学高等研究院叶老师的指导下进行，如叶老师提供了包括葡萄外泌体的提取与纯化、功能高分子材料的合成等相关的实验指导以及对于实验设备，如 CCK-8 试剂盒，流式细胞仪等设备的操作指导。在叶老师的帮助下我完成了我所设计的 G-EXO-RSHA/OCS 水凝胶的制备，以及对这款水凝胶的表征及物理化学性能的测试与分析。实验室以及实验指导老师叶老师均为无偿帮助。非常感谢他们给予的帮助和支持。

在本研究过程中，我仅在最初搜索参考文献、学习相关背景知识和最后帮助论文进行排版时用到了 AI。我在使用 AI 之前，征求了指导老师田润老师的许可，她表示同意并鼓励我借助 AI 学习相关背景知识，但不能用于实验设计或论文主体的写作。我使用的 AI 工具为 Google Gemini，除此之外我未使用其他 AI 工具。

2026 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖论文公示