参赛学生姓名：李浚哲

中学：上海外国语大学附属外国语学校

省份：上海

国家/地区：中国

指导老师姓名：李启翔、张一凡

指导老师单位：上海外国语大学附属外国语学校

论文题目：pH/ROS 双响应水凝胶-微球负载姜黄素用于中枢神经损伤再生修复

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

pH/ROS 双响应水凝胶-微球负载姜黄素用于中枢神经损伤再生修复

李浚哲

摘　要

中枢神经系统损伤后常伴随酸化、高水平活性氧（ROS）、炎症及胶质瘢痕相关的病理微环境，现有生物支架及药物递送体系存在病灶靶向性不足、早期突释以及单一刺激响应机制难以适应多重病理微环境等问题。因此，本课题设计了一种含有 pH/ROS 双响应机制的光交联水凝胶-姜黄素微球复合释药体系，该体系由甲基丙烯酸化透明质酸与羧甲基壳聚糖交联的复合水凝胶（HAMA-CS）包裹姜黄素@明胶微球（Cur@GL）制得，HAMA-CS 复合水凝胶具有 pH/ROS 双响应性能，可以实现姜黄素的按需释放。同时，其三维多孔结构及较低刚度黏弹性特征可提供接近中枢神经组织的物理微环境，具备神经组织力学适配能力。通过体外实验发现该复合体系不仅具有较高的生物相容性，同时还可以诱导巨噬细胞由促炎 M1 表型向抗炎 M2 表型极化，改善炎症微环境，进一步通过巨噬细胞与神经干细胞共培养观察到 GFAP 阳性细胞比例降低、Tuj1 阳性细胞比例升高，表明其可以抑制星形胶质相关分化并促进神经元相关分化。最后，Ki67 与 MAP2 的表达上调，提示其具有促进神经元相关表型及细胞增殖的潜力。本课题在常温条件下构建了基于亚胺键和二硫键的修饰工艺，避免了高温、高压等复杂的合成条件，建立了涵盖微观结构、力学性能、响应性释药及细胞功能评价的体外评价体系，为低成本、高生物安全性、多功能一体化中枢神经修复材料提供新的设计策略和实验支撑，具有一定的研究价值与潜在转化意义。

关键词：中枢神经损伤修复；水凝胶；pH 响应；ROS 响应；姜黄素；抗炎

2026 Youth Science Award
仅用于2026全国青少年科学创新大赛

目　录

摘　要 II
目　录 III
第一章 绪论 1
1.1 引言 1
1.2 中枢神经损伤和治疗的过程及特点 1
1.3 中枢神经再生修复领域的研究进展 2
1.3.1 pH 响应型中枢神经修复材料研究现状 3
1.3.2 ROS 响应型中枢神经修复材料研究现状 3
1.3.3 高分子水凝胶在中枢神经损伤修复中的应用 3
1.4 本课题核心思路、创新点、研究目的及内容 4
1.4.1 核心科学思路与创新点 4
1.4.2 研究目的 5
1.4.3 研究内容 5
第二章 Cur@GL/HAMA-CS 的制备、表征与性能测试 8
2.1 引言 8
2.2 实验试剂与仪器 8
2.2.1 实验试剂与耗材 8
2.2.2 实验仪器与设备 9
2.3 实验方法 9
2.3.1 羧甲基壳聚糖的改性 9
2.3.2 HAMA 的制备 10
2.3.3 Cur@GL 微球的制备 10
2.3.4 HAMA-CS 复合水凝胶以及 Cur@GL/HAMA-CS 的制备 10
2.3.5 Cur@GL/HAMA-CS 的微观结构表征 11
2.3.6 HAMA 和 CS 的结构表征 11
2.3.7 Cur@GL/HAMA-CS 的流变学性能测试 11
2.3.8 Cur@GL/HAMA-CS 的姜黄素释放性能测试 11
2.3.9 数据分析 11
2.4 结果与讨论 12
2.4.1 Cur@GL/HAMA-CS 的微观结构 12
2.4.2 HAMA 和 CS 的结构表征结果 12

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

2.4.3 Cur@GL/HAMA-CS 的流变学性能 14
2.4.4 Cur@GL/HAMA-CS 的姜黄素释放性能 15
2.5 本章小结 17
第三章 Cur@GL/HAMA-CS 的生物相容性、抗炎作用与在中枢神经损伤修复中的应用 19
3.1 引言 19
3.2 实验试剂与仪器 19
3.2.1 实验试剂与耗材 19
3.2.2 实验仪器与设备 20
3.3 实验方法 20
3.3.1 HT22、RAW264.7 及神经干细胞的培养 21
3.3.2 Cur@GL/HAMA-CS 的生物相容性实验 21
3.3.3 Cur@GL/HAMA-CS 的抗炎作用实验 22
3.3.4 Cur@GL/HAMA-CS 的胶质瘢痕相关表型调控作用实验 22
3.3.5 Cur@GL/HAMA-CS 促进神经元相关表型及细胞增殖作用实验 23
3.3.6 数据分析 23
3.4 结果与讨论 23
3.4.1 Cur@GL/HAMA-CS 的生物相容性 23
3.4.2 Cur@GL/HAMA-CS 的抗炎作用 24
3.4.3 Cur@GL/HAMA-CS 的胶质瘢痕相关表型调控作用 26
3.4.4 Cur@GL/HAMA-CS 促进神经元相关表型及细胞增殖作用 27
3.5 本章小结 29
第四章 总结与展望 30
4.1 总结 30
4.1.1 本课题创新性 30
4.1.2 Cur@GL/HAMA-CS 干预中枢神经损伤修复的作用机制 30
4.1.3 总结 31
4.2 展望 31
4.2.1 研究局限性 31
4.2.2 研究展望 32
参考文献 33
致谢 36
论文修改说明 38

2026 S.T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖公示

第一章 绪论

1.1 引言

中枢神经系统创伤主要包括创伤性脑损伤和创伤性脊髓损伤，属于全球致残率极高的重大医学难题之一。人体中枢神经受损后，往往会留下长期运动、感觉功能障碍。根据全球疾病负担研究，2021 年全球创伤性脑损伤（TBI）患病人数约为 3793 万例，新发病例约为 2084 万例[1]；同期全球脊髓损伤（SCI）患病人数约为 1540 万例，新发病例约为 57.4 万例[2]。庞大的疾病负担及其造成的长期神经功能障碍表明，如何促进损伤后中枢神经组织再生并改善功能恢复仍是亟待解决的问题[1,2]。

和外周神经不同，中枢神经受损后再生修复难度较高。其困难主要与以下四方面因素有关。首先是局部的酸性环境。血管受损引发缺血缺氧，导致乳酸堆积；同时，细胞破坏释放出氢离子。酸化环境会进一步损伤存活的神经细胞。第二，创伤后病灶处活性氧（ROS）急剧升高。氧化应激状态会直接破坏神经元的脂质及 DNA，诱导细胞走向凋亡。第三，损伤使免疫细胞异常激活。它们在早期大多处于促炎的 M1 型，释放促炎因子，而抑制炎症并促进修复的 M2 型极少，导致局部陷入慢性和破坏性的免疫反应。第四是胶质瘢痕的形成。活化后的星形胶质细胞大量增殖、聚集，形成致密的胶质瘢痕。胶质瘢痕在限制损伤扩散方面具有一定保护作用，但其持续形成可产生物理和化学抑制性微环境，从而限制轴突再生[3]。

此外，中枢神经损伤常伴随组织结构及细胞外基质破坏，因此修复过程中不仅需要调控损伤区域的病理微环境，还需要构建与中枢神经组织力学特性相适应的三维生物支架，为细胞黏附、迁移及轴突再生提供物理支撑，同时为药物的局部负载与持续释放提供载体基础。现阶段可供选择的修复支架材料包含天然高分子、人工合成高分子以及复合支架等。其中，多糖、蛋白质来源的天然高分子具有优异的生物相容性，但普遍存在力学性能偏弱、降解速率难以调控等短板，限制其实际应用。

1.2 中枢神经损伤和治疗的过程及特点

中枢神经系统遭受创伤后的病理生理演变十分复杂，分为原发性损伤与继发性损伤两大损伤阶段[4]。机械外力直接造成的神经元破裂、轴突断裂以及局部微

2026 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2026正式提交科学奖论文公示

血管网物理性损伤属于原发性损伤，该阶段损伤不可逆。真正决定最终功能的是创伤后数小时至数周持续进展的继发性损伤过程。

继发性损伤拥有四项典型病理特征：

局部酸性微环境：损伤区域微血管破坏引发持续的局部缺血与缺氧。缺血缺氧状态使细胞进行无氧糖酵解，乳酸不断积累。坏死细胞还会释放出氢离子。导致损伤部位 pH 明显下降。酸性微环境进一步可激活酸敏感离子通道 ASIC1A，影响细胞离子稳态并参与 SCI 后的再生障碍[5]。

ROS 爆发与氧化应激：线粒体功能紊乱会造成损伤区域 ROS 大量积累，诱导脂质、蛋白质及 DNA 的氧化破坏，加速神经细胞死亡，推动神经退行性改变[6,7]。

持续性炎症反应：氧化应激与细胞碎片会持续激活 NF-κB 炎症转录通路，大量诱导 TNF-α、IL-1β及 iNOS 等促炎因子表达。小胶质细胞和浸润性巨噬细胞参与持续性炎症反应[8]。

胶质瘢痕的形成：长期炎症刺激会激活星形胶质细胞，生成胶质瘢痕。胶质瘢痕虽然在创伤早期起到了限制炎症扩散的保护作用，但在损伤中后期却构成了坚固的物理屏障与生化抑制微环境，可显著限制轴突的通过与再生[3]。

在正常中枢神经组织中，星形胶质细胞、神经元等细胞与细胞外基质共同构成复杂的三维微环境，在损伤发生后出现的组织缺损、细胞外基质破坏及炎症反应等现象使神经细胞与轴突的再生增殖缺少适宜的空间结构与力学环境。因此，在修复过程中，不仅需要对损伤区域的病理微环境进行调控，还需要构建与中枢神经组织力学特性相匹配的三维生物支架，为细胞黏附、迁移及轴突再生提供物理支撑。该支架主要承担三个作用。第一，模拟细胞外基质的三维结构，为细胞的黏附、迁移和存活提供空间；第二，为轴突跨越损伤区域提供一定的结构支撑和生长引导；第三，通过构建接近中枢神经系统的低刚度、具备适宜的黏弹性特征和三维多孔结构的微环境，改善力学失衡，从而为细胞行为和组织再生提供适宜的物理环境。

因此，现代治疗策略亟需依靠能够直接植入病灶部位、生物相容性强、力学性能适中、降解速率可控的生物修复支架，在提供三维物理支撑的同时，实现对酸化、高水平 ROS、持续炎症及胶质瘢痕等多重病理微环境的精准调控与按需给药。

1.3 中枢神经再生修复领域的研究进展

中枢神经损伤微环境具有细胞凋亡、酸化、氧化应激、炎症及瘢痕形成等多种病理过程相互作用的特点。现有生物支架及药物递送体系大多无法根据多重病

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

理微环境特征进行按需释药，容易出现病灶靶向性不足、早期突释以及响应机制难以适应多重病理微环境等问题，且多数研究无法同时实现良好的生物相容性与适宜中枢神经组织的力学性能。因此，如何调控损伤后的病理微环境，并为细胞存活和轴突再生提供适宜的结构支持，实现更加精准的药物释放，成为中枢神经损伤修复材料研究的重要方向。

下文以中枢神经损伤中的 SCI 为例，分别从 pH 响应型修复材料、ROS 响应型修复材料以及水凝胶材料性能三个方面进行中枢神经再生修复领域研究进展的讨论。

1.3.1 pH 响应型中枢神经修复材料研究现状

SCI 局部组织因细胞代谢紊乱、缺血缺氧及炎症反应可发生明显酸化，形成区别于正常组织的病理微环境。Li 等在小鼠脊髓挫伤模型中发现，损伤后第一周病灶组织 pH 明显降低，提示酸化是 SCI 继发性损伤的重要病理特征[9]。因此，酸性微环境既是 SCI 继发性损伤的重要特征，也可作为响应性药物递送的内源性刺激信号。亚胺键，基于其酸敏感水解特性，已被广泛用于 pH 响应型水凝胶构建及药物控释[10,11]。Li 等进一步构建了 pH 响应型双膦酸盐水凝胶，利用 SCI 局部酸性环境实现药物响应性释放，表明 pH 响应递药用于 SCI 具有可行性，并在酸性条件下评价 SCI pH 响应型水凝胶的药物释放行为[12]。然而，现有体系主要依赖单一 pH 信号，且多集中于炎症调控，对 SCI 中酸化与氧化应激等多种病理信号并存的特点考虑不足。

1.3.2 ROS 响应型中枢神经修复材料研究现状

与酸化相伴，SCI 后还会产生明显的氧化应激。ROS 大量积累可直接造成神经细胞氧化损伤，并参与炎症微环境维持及继发性损伤进展。因此，研究者通过引入 ROS 敏感结构构建 ROS 响应型水凝胶，使材料能够在氧化应激环境下发生结构变化并促进药物释放[7,13]。部分 ROS 响应型材料还可通过调节氧化应激及巨噬细胞 M1/M2 极化改善损伤后炎症微环境[13]。然而，SCI 中酸化与氧化应激并非相互独立，单一 ROS 响应体系同样难以充分适应复杂且动态变化的病灶环境。

1.3.3 高分子水凝胶在中枢神经损伤修复中的应用

高分子水凝胶含水量高，内部三维多孔结构可模拟细胞外基质，给神经细胞黏附、迁移和生长提供合适微环境。其中，透明质酸、壳聚糖和明胶等天然高分子生物具备突出的生物相容性，在神经组织工程领域被广泛应用。

现有中枢神经修复水凝胶材料仍面临多项限制。首先，水凝胶的交联密度、孔隙结构与释药性能之间往往难以达到平衡：提高交联程度虽可增强材料稳定性

2026 Siyuan High School Science Award 仅用于2026年思源高中学科竞赛公示

和形态保持能力，却可能降低网络孔隙连通性、限制细胞迁移及药物扩散；而交联度过低又可能导致材料力学支撑不足、降解过快或植入后结构难以维持。其次，天然高分子水凝胶尽管通常具有良好生物相容性，但其力学强度、批次稳定性及降解行为仍较难精确调控；部分合成高分子材料则可能面临细胞黏附位点不足、生物活性有限等问题。

水凝胶的基质刚度不仅关系到材料与损伤组织界面的力学适配，还可能影响神经干细胞的增殖、形态及谱系分化。Yang 等构建的 Aga/Gel/PPy 导电水凝胶储能模量约为 1470 Pa，并观察到 Tuj1 和 MAP2 表达升高及 GFAP 表达降低，表明较低刚度的水凝胶可为神经干细胞提供有利于神经元分化的力学微环境[14]。三维培养研究表明，神经干细胞对基质刚度具有明显敏感性，较软基质总体上更有利于神经元分化，而刚度升高可能增强神经干细胞的星形胶质相关分化[15,16]；脊髓来源神经前体细胞的生长同样受到基质弹性影响[14]。近年来，动态化学键、光交联及微环境响应机制被进一步引入水凝胶，使其兼具结构支撑和主动调控功能。已有研究表明，水凝胶可结合干细胞或药物改善 SCI 后的炎症及神经再生微环境[18-20]。

因此，如何在生物相容性、力学适配性、三维孔隙结构、降解稳定性及药物递送能力之间实现平衡，仍是神经组织工程水凝胶设计的重要挑战[21-25]。

1.4 本课题核心思路、创新点、研究目的及内容

1.4.1 核心科学思路与创新点

核心思路：针对现有药物递送体系的不足，本课题提出一种用于中枢神经损伤再生修复的高分子双动态键修饰光交联水凝胶-姜黄素微球复合释药体系的构建策略。

分子层面：在羧甲基壳聚糖分子上分步引入由丙酮醛与壳聚糖氨基反应形成的 pH 敏感亚胺键结构，以及由胱胺二盐酸盐引入的 ROS 敏感二硫键结构，赋予材料 pH/ROS 双重响应性能，常温常压下完成反应修饰，无需复杂合成条件。

结构层面：并通过 FT-IR 与^{1}H NMR 对 HAMA、CS 及复合水凝胶的化学结构与基团组成进行确证，明确光交联网络与双动态键修饰结构的形成。制备姜黄素@明胶微球。将微球均匀分散在 HAMA-CS 光交联网络中，构建三维模仿细胞外基质多孔结构，解决药物突释的问题。

性能层面：通过扫描电子显微镜、流变学测试等表征筛选兼顾微观孔隙、较低刚度及神经组织力学适配潜力、以及双响应释药特性的较优制备配比，结合已有研究中基质刚度对神经干细胞谱系分化的调控作用，进一步评价材料对 GFAP、

2026 Sir Yuyi High School Science Award 仅用于2026年成都中学科学奖论文参考

Tuj1 等神经胶质及神经元相关表型的影响，并通过 CCK-8、RT-qPCR、ELISA 及免疫荧光评价其生物相容性、抗炎及神经再生性能。

创新点：

分子机制创新：通过在羧甲基壳聚糖分子链上引入 pH 响应性亚胺键和 ROS 响应性二硫键结构，实现 pH/ROS 双响应的性能。

一体化结构创新：载药微球原位光交联复合体系解决疏水药物突释。区别于现有直接药物共混的方案，独立制备 Cur@GL 微球后与 HAMA-CS 共混，未观察到微球明显团聚或药物结晶析出，保留完整三维多孔结构。微球作为药物存储库，有利于实现较为平稳的释放，三维支架同步提供细胞黏附支撑，结构设计优于单一功能支架。

制备工艺创新：整套修饰、微球合成、光交联成型全程常温常压，仅使用 405 nm 普通 LED 光源，无需手套箱、高温反应釜等精密设备。主体基材采用天然高分子透明质酸、羧甲基壳聚糖和明胶，生物相容性强，透析纯化工艺去除丙酮醛、戊二醛等小分子，具有进一步开展转化研究的潜力。

1.4.2 研究目的

本课题制备了一种含有 pH/ROS 双响应机制的光交联水凝胶-姜黄素微球复合释药体系（Cur@GL/HAMA-CS）。该体系利用明胶（GL）包裹姜黄素（Cur）构建出微球颗粒（Cur@GL），并将其混合于具备光响应特性的甲基丙烯酸化透明质酸-羧甲基壳聚糖（HAMA-CS）水凝胶基质中，最终构建一种具备 pH/ROS 双重响应性，用于中枢神经再生修复的水凝胶-微球复合体系。

1.4.3 研究内容

水凝胶合成：分步制备 pH/ROS 响应型改性羧甲基壳聚糖、光交联 HAMA；制备 Cur@GL 微球；混合后制备 Cur@GL/HAMA-CS。

理化性能表征：SEM 观测各组微观孔隙与微球分布状态；并结合 FT-IR 与 ^{1}H NMR 对改性羧甲基壳聚糖、HAMA 及 Cur@GL/HAMA-CS 复合水凝胶的化学结构与基团组成进行确证，明确 pH/ROS 双动态键修饰结构及光交联网络的形成；旋转流变仪测试交联前后力学性能特征；紫外分光光度计建立姜黄素吸光度标准曲线，并展开五组微环境双响应释药实验，筛选综合性能较优的配比。

生物安全评价：CCK-8 细胞活力检测验证不同浓度水凝胶和微球的细胞毒性。

抗炎性能评价：RAW264.7 巨噬细胞炎症模型，通过 RT-qPCR 定量 M1 (*Nos2*) 和 M2（*Mrc1*）基因表达以及 ELISA 定量促炎细胞因子（TNF-α、IL-6）及抗炎细胞因子（IL-10）的分泌水平，评价材料对巨噬细胞炎症相关表型的调控作用。

2026 Tsinghua University Undergraduate Science Award
仅用于2026年度挑战杯大学生科学论文公示

胶质瘢痕相关表型调控性能评价：通过巨噬细胞与神经干细胞共培养，利用流式细胞仪定量 GFAP 和 Tuj1 阳性细胞比例，评估材料对星形胶质相关表型及神经元相关表型的调控作用，并结合材料力学性质讨论其潜在的神经干细胞谱系调控作用。

神经元再生评价：通过 HT22 细胞 Ki67 和 MAP2 特异性染色，利用激光共聚焦显微镜观测荧光情况，评估材料对神经元相关成熟表型及细胞增殖的影响。

在物化性能方面，该水凝胶具有较低刚度的黏弹性，兼顾结构稳定性与神经组织力学适配潜力。已有三维培养研究表明，神经干细胞对基质刚度具有明显敏感性，较软基质更有利于神经元分化，而较高刚度可能增加星形胶质相关分化[15,16]。Yang 等报道脊髓组织力学模量约为 100-3000 Pa，其构建的 AGP3 水凝胶储能模量约为 1470 Pa，并表现出有利于神经元相关表型的作用[14]。因此，本课题 1740 Pa 的储能模量与该类神经修复水凝胶较为接近，具有一定的神经组织力学适配潜力。水凝胶内部的三维多孔结构为神经细胞的黏附、迁移与增殖提供了合适的空间。同时，该复合材料具备 pH/ROS 双响应能力，能够针对受损神经区域高水平 ROS 及酸性微环境做出特异性响应，促进水凝胶的降解与小分子药物的按需释放。姜黄素通过抗炎反应实现了抑制星形胶质细胞活化，减少胶质瘢痕生成。本课题开发的 Cur@GL/HAMA-CS 集微环境响应与中枢神经损伤按需治疗于一体，为中枢神经损伤修复材料设计提供一种具有研究价值的新策略。

本课题流程图如下所示：

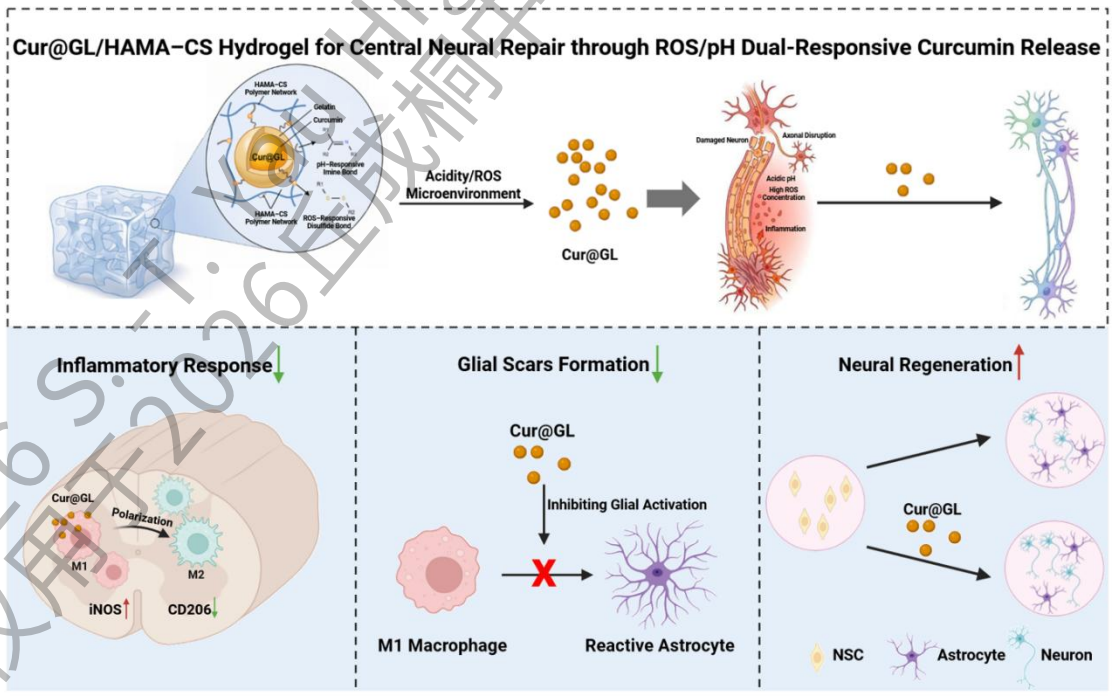


图 1.1 Cur@GL/HAMA-CS 水凝胶通过 ROS/pH 双响应释放姜黄素用于中枢神经修复

2026 S.T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖公示

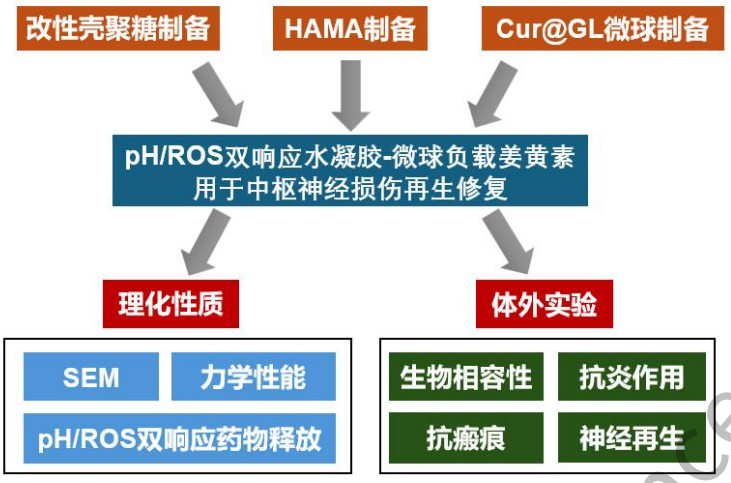


图 1.2 Cur@GL/HAMA-CS 的技术路线图

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

第二章 Cur@GL/HAMA-CS 的制备、表征与性能测试

2.1 引言

基于第一章梳理的现有材料响应单一、力学失衡、药物突释、制备门槛高等缺陷，本章通过天然高分子搭建的双动态共价键修饰体系，分别合成具有亚胺键和二硫键修饰的羧甲基壳聚糖、可见光交联甲基丙烯酸化透明质酸（HAMA）及姜黄素@明胶微球（Cur@GL），通过微球梯度填充制备光交联水凝胶-姜黄素微球复合释药体系。并采用 FT-IR 与 ^{1}H NMR 对改性羧甲基壳聚糖、HAMA 及 Cur@GL/HAMA-CS 复合水凝胶的化学结构与基团组成进行确证，明确亚胺键、二硫键及光交联网络的形成。借助扫描电子显微镜观测材料的微观多孔拓扑结构与微球分散均匀性，利用旋转流变仪原位监测光交联固化全过程，并比较不同填充度下储能模量和损耗模量的变化，通过 pH 响应及 ROS 响应模拟不同病理状态，完成 24 h 以及长期 16 天的持续释药检测。从微观结构、宏观力学、分子响应释药三个维度完成全套理化性能定性及定量表征，对比现有文献同类材料性能差异，筛选兼顾孔隙连通、神经组织匹配力学、双响应靶向缓释的较优梯度微球配比及水凝胶浓度配比，为第三章多角度的体外生物学评价提供标准统一的材料。同时完整建立天然高分子双响应载药支架的理化筛选标准化实验流程。

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
羧甲基壳聚糖	阿拉丁	C1501897
冰醋酸	阿拉丁	A116166
丙酮醛	阿拉丁	M109035
1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）	阿拉丁	E106172
N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）	阿拉丁	H109330
胱胺二盐酸盐	阿拉丁	C597659
透明质酸	阿拉丁	H131007
甲基丙烯酸酐	Sigma	276685
光引发剂 LAP	Lingel	LAP-NG
姜黄素	阿拉丁	C408195

试剂与耗材	生产厂商	货号
明胶	Sigma	V900863
戊二醛	阿拉丁	G105906

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	生产厂商	仪器型号
离心机	Eppendorf	Centrifuge 5452R
电子分析天平	梅特勒-托利多	ML204L
冷冻干燥机	Christ	ALPHAI-4/LD Plus
磁力搅拌机	越众仪器	ZNCL-90-1B
扫描电子显微镜	日立 HITACHI	S-4800
旋转流变仪	Malvern	Kinexus pro+
紫外分光光度计	日立 HITACHI	u-3900H
傅里叶变换红外光谱仪	Thermo Fisher	Nicolet 6700
核磁共振波谱仪	Varian	Varian Mercury Plus 400

2.3 实验方法

本章节的实验流程示意图如图 2.1 所示。

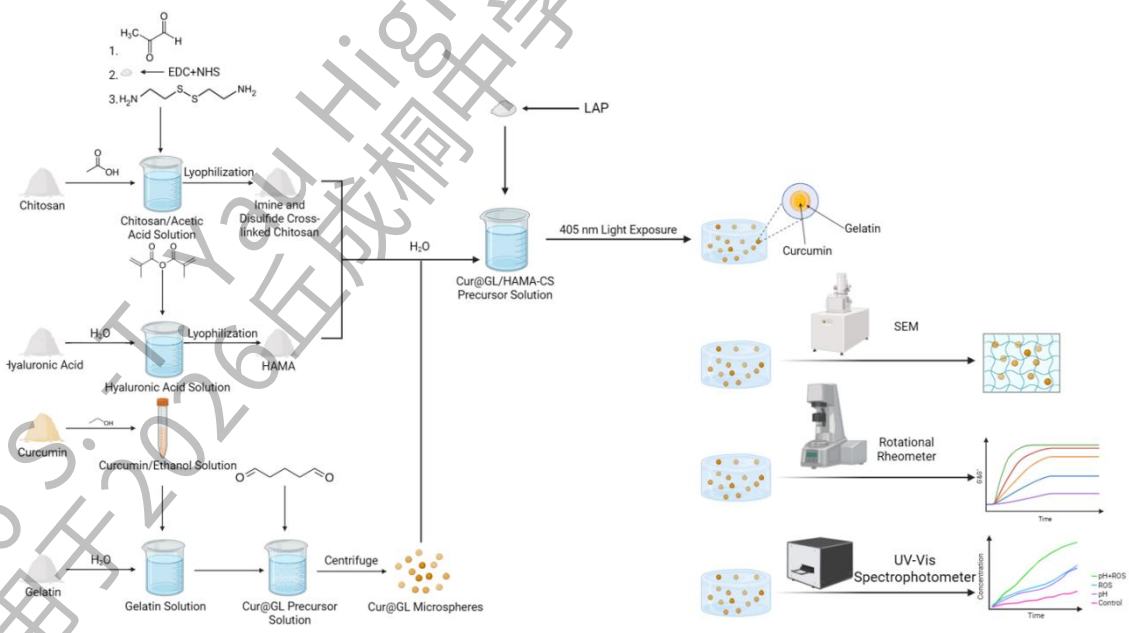


图 2.1 Cur@GL/HAMA-CS 的制备、表征与性能测试

2.3.1 羧甲基壳聚糖的改性

称取 1.0 g 羧甲基壳聚糖粉末加入 50 mL 2%（v/v）冰醋酸溶液。将混合物

2026 届 Tsinghua High School Science Award
仅用于 2026 届清华中学科学奖论文公示

于室温下持续搅拌 4 h，直至形成完全透明且无颗粒的均匀溶液。在避光条件下，向上述溶液中加入 10 mL 丙酮醛。于室温下持续搅拌反应 5 h。向上述溶液中加入 0.75 g 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）和 0.85 g N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）。混合物先搅拌 30 min，随后加入 0.6 g 胱胺二盐酸盐，于室温下继续搅拌 8 h。将反应后的混合溶液透析 48 h，每隔 6 h 更换一次去离子水。将纯化后的羧甲基壳聚糖溶液进行冷冻干燥，-20℃保存。将改性后的羧甲基壳聚糖溶液命名为 CS。

2.3.2 HAMA 的制备

称取 1.5 g 透明质酸（HA）固体加入于 400 mL 去离子水中，将混合物于室温下持续搅拌直至形成完全透明且无颗粒的均匀溶液。向体系中缓慢滴加 0.8 mL 甲基丙烯酸酐，调节溶液 pH 并稳定在 5.5-6.0 之间，搅拌反应 12 h。随后向反应体系中加入 0.5 mL 甲基丙烯酸酐，并重新调节 pH 至上述范围，继续反应 7 h。最后加入 0.3 mL 甲基丙烯酸酐，调节 pH 至 5.5-6.0，反应 5 h。将所得溶液转移置于去离子水中透析 48 h，每隔 6 h 更换一次去离子水。纯化产物进行冷冻干燥，-20℃保存。

2.3.3 Cur@GL 微球的制备

把姜黄素粉末溶解于无水乙醇，配制成 400 μg/mL 储备液。将 2.0 g 明胶溶于 20 mL 去离子水中，充分溶解，形成明胶水溶液。避光的条件下，将 5 mL 姜黄素乙醇溶液缓慢滴入明胶水溶液中，持续搅拌。在冰水浴条件下向上述溶液中滴入 1.0 mL 戊二醛，完成交联反应，交联时间为 10 min。反应结束后，800 rpm 离心 5 min 收集沉淀，PBS 洗涤沉淀物 3 次。冻干得到获得 Cur@GL 载药微球，-20℃保存。

2.3.4 HAMA-CS 复合水凝胶以及 Cur@GL/HAMA-CS 的制备

分别称取适量的改性壳聚糖与纯化后的 HAMA 固体溶解于去离子水中，分别按照 4:3 的质量比配制成 5 wt%、10 wt%、15 wt%以及 20 wt%的水凝胶前体溶液。随后，向该溶液中加入 0.04 wt%的 LAP，在室温下超声分散均匀。将混合均匀的溶液注入 15 mL 离心管中，分别取部分 5 wt%及 10 wt% 前体溶液，向其中加入适量 Cur@GL 微球，使其浓度达到 100 μg/mL，并另取部分的 10 wt% 前体溶液，向其中加入适量微球使其浓度达到 200 μg/mL，随后开启波长为 405 nm 的光源，连续照射各组前体溶液 30 s，最终获得 HAMA-CS 复合水凝胶以及 Cur@GL/HAMA-CS。

2026 S.T. Yau High School Science Award 仅用于2026丘成桐中学科学奖公示

2.3.5 Cur@GL/HAMA-CS 的微观结构表征

将制备好的 Cur@GL 微球，HAMA-CS 复合水凝胶及 Cur@GL/HAMA-CS 样品分别置于冷冻干燥机中冻干 24 h。取适量大小的截面样品，通过导电胶将其固定在导电台上，并在其表面以 30 mA 电流进行 3 min 喷镀金膜处理。将样品置于 SEM 仪器中，在 10 kV 电压下进行上机观测。在高倍镜下对焦完成后，调整至适当放大倍数下对样品进行拍摄记录，以评估微球的形态、HAMA-CS 复合水凝胶的微观三维孔隙结构及 Cur@GL/HAMA-CS 的孔隙结构与微球分布情况。

2.3.6 HAMA 和 CS 的结构表征

首先，利用核磁共振波谱仪（^{1}H NMR）以重水（D_2O）为溶剂，对羧甲基壳聚糖、CS、HA 以及 HAMA 的化学结构进行进一步确证。另外，采用傅里叶变换红外光谱仪（FT-IR）对羧甲基壳聚糖、CS、HA、HAMA 和合成的复合水凝胶的化学基团进行分析，扫描范围设为 500-4000 cm^{-1}。

2.3.7 Cur@GL/HAMA-CS 的流变学性能测试

将旋转流变仪测试平台的温度设定为 37 ℃，并将上下压板间距设置为 1 mm。进行两次独立的样品力学性能测试。第一次测取 80 μL HAMA-CS 复合水凝胶前体样品，测试总时长为 240 s，在 90 s 时开启波长 405 nm 的光进行原位照射以引发交联反应，在 120 s 时停止照射，并持续监测至 240 s；第二次测试则取 80 μL Cur@GL/HAMA-CS 样品进行 240 s 的流变学测试。记录随时间变化的储能模量（G'）和损耗模量（G''），以评估样品的光交联固化过程及黏弹性变化。

2.3.8 Cur@GL/HAMA-CS 的姜黄素释放性能测试

称取适量姜黄素粉末，分别配制浓度为 5、10、20、40、80 μg/L 的溶液，于 425 nm 波长下使用紫外分光光度计测定吸光度，线性拟合得到姜黄素标准浓度-吸光度曲线。随后，分别配制 pH 7.4+PBS、pH 5.0+PBS、pH 7.4+100 μM H_2O_2、pH 5.0+100 μM H_2O_2、pH 6.5+10 μM H_2O_2 缓冲液，将等质量的 Cur@GL/HAMA-CS 浸泡到上述溶液中，经过 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 以及第 2、4、6、8 和 16 天定时取样（每次取样后补充等体积的新鲜缓冲液以保持释放体系总体积恒定）。将取出的样品加入比色皿中，并将比色皿置于紫外分光光度计中，进行吸光度测试，与标准浓度-吸光度曲线比照，计算得到姜黄素在缓冲液中的浓度，以确定其短期及长期的释放效果。

2.3.9 数据分析

两组间比较采用独立样本 t 检验。三组及以上组间比较采用单因素方差分析，并使用 Tukey's 多重比较事后检验。所有统计分析使用 Graphpad Prism 软件完成。

2026 S. Tianyu High School Science Award 仅用于2026年天域杯科学论文公示

每组实验至少设置三个生物学平行，实验重复不少于三次，以确保数据的可靠性。

2.4 结果与讨论

2.4.1 Cur@GL/HAMA-CS 的微观结构

为了对 Cur@GL/HAMA-CS 的微观结构进行表征，分别对 Cur@GL 微球，HAMA-CS 复合水凝胶及 Cur@GL/HAMA-CS 在 SEM 下进行了观察。结果如图 2.2 所示。Cur@GL 微球呈现规则的球形，大小均一，可以均匀分散在凝胶内部。HAMA-CS 复合水凝胶具有连续贯通的不规则三维多孔结构，有助于营养物质交换。Cur@GL/HAMA-CS 与 HAMA-CS 复合水凝胶整体孔隙形貌相近，但可观察到部分微球暴露于 Cur@GL/HAMA-CS 表面。Cur@GL/HAMA-CS 的多孔结构为神经细胞提供了迁移与黏附的位点，有助于代谢及营养物质的交换与运输，同时可模拟天然的神经细胞外基质，为细胞提供物理性的支撑。

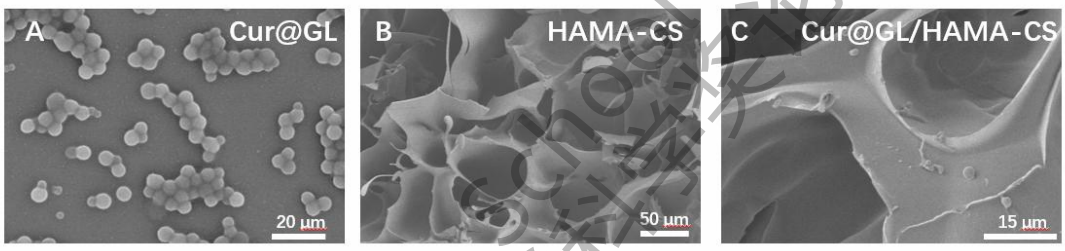


图 2.2 A）Cur@GL，B）HAMA-CS 及 C）Cur@GL/HAMA-CS 的 SEM 图像

2.4.2 HAMA 和 CS 的结构表征结果

为了验证材料的成功合成与化学改性，进一步对各组样品进行了 ^{1}H NMR 测试分析。为了验证羧甲基壳聚糖分子链上 pH/ROS 双响应结构（亚胺键与二硫键）的成功引入，结果如图 2.3 A 所示，在 ^{1}H NMR 图谱中，对比了原料羧甲基壳聚糖与 CS 的核磁图谱。通过对比可以发现，改性后的 CS 图谱在化学位移 1.0~3.5 ppm 的高场区域出现了众多显著增强的新特征峰，这些峰的出现为化学改性提供了直接的证据。首先，化学位移在 1.3~1.5 ppm 以及 2.1~2.3 ppm 附近出现的新尖锐峰，归属于丙酮醛片段上甲基的质子共振信号。其次，胱胺分子中两个亚甲基（-CH_2-CH_2-S-S-）的质子信号通常出现在 2.7~3.0 ppm 之间。在 CS 图谱中，红线在该区域出现了一组强烈且密集的共振峰，证实了含有二硫键的胱胺侧链被成功偶联。为后续水凝胶在病理微环境中实现 pH（亚胺键水解）与 ROS（二硫键断裂）的双响应按需释药奠定了坚实的化学基础。为了验证透明质酸的光交联改性是否成功，结果如图 2.3 B 所示，对比黑色曲线（HA）和蓝色曲线（HAMA）可以发现，在 3.0-4.5 ppm 区域出现相同的密集的多重峰，这是 HA 糖环骨架上的特征质子峰（包括各个碳上的-CH-以及-CH_2 -质子）。黑线和蓝线

2026 CSC-Tianqi Cup High School Science Award
仅用于2026年度中学科学奖论文公示

在这个区域的轮廓高度一致，说明接枝反应主要发生在羟基/羧基上，而没有破坏糖环骨架。除此之外，在 4.4 ppm 处从双峰变为单峰（且轻微位移），是由于大体积甲基丙烯酰基的引入改变了糖环构象、破坏了内部氢键，并带来了吸电子诱导效应所致。这是多糖衍生物核磁图谱中非常常见且合理的现象，进一步印证了接枝反应的成功。证明了甲基丙烯酸酐已成功与 HA 分子链上的羟基发生酯化反应，双键被成功引入到高分子骨架上，成功合成了具备光交联活性的 HAMA。

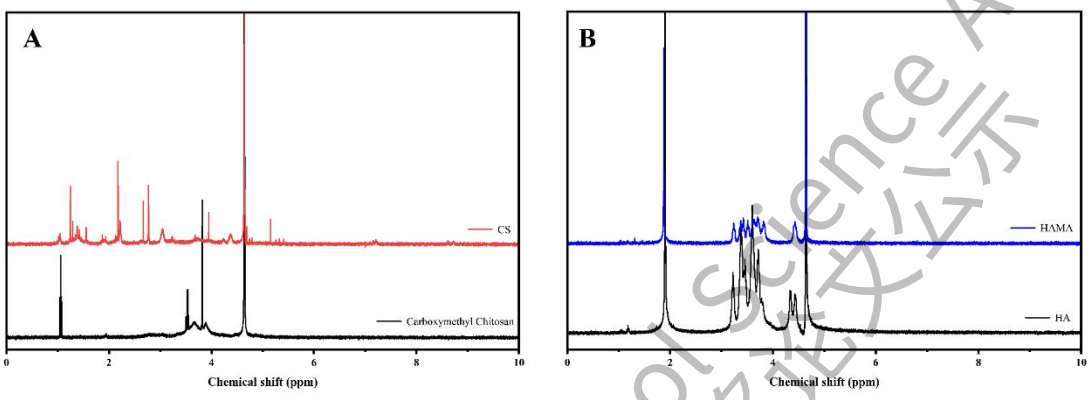


图 2.3 A）羧甲基壳聚糖和 CS 的 ^{1}H NMR 图谱，B）HA 和 HAMA 的 ^{1}H NMR 图谱

为了进一步确认各组分化学结构的演变以及复合水凝胶网络的成功构建，对各原料及终产物进行了 FT-IR 表征，结果如图 2.4 所示。首先，对比羧甲基壳聚糖（黑线）与改性后的羧甲基壳聚糖（CS，蓝线）可以观察到明显的结构变化。CS 在~1600 cm^{-1} 附近（图中蓝色阴影区域）出现了明显的吸收峰增强，这主要归属于新生成的亚胺键（C=N）伸缩振动，同时该区域也包含了后续 EDC/NHS 活化胱胺后形成的酰胺键（−CO−NH−）特征峰，以及壳聚糖本身的氨基（−C−N/N−H）振动。此外，蓝线在 1708 cm^{-1} 附近的吸收峰形也发生改变，综合证实了丙酮醛和胱胺已成功对羧甲基壳聚糖进行了双步修饰。其次，在透明质酸（HA，紫线）与甲基丙烯酸化透明质酸（HAMA，绿线）的对比中，改性效果十分显著。绿线在~1708 cm^{-1}（红色阴影区域）出现了一个尖锐且强烈的吸收峰，这归属于甲基丙烯酸酐与 HA 羟基反应生成的酯键羰基（−CO−O−）伸缩振动。同时，绿线在~1600 cm^{-1} 处出现了对应于甲基丙烯酰基中双键（−C=C−）的伸缩振动峰。这两个新峰的出现确凿地证明了光敏基团被成功接枝到了 HA 骨架上。最后，观察复合水凝胶（HAMA-CS gel，红线）的光谱，该曲线完美地体现了两种改性高分子的特征叠加。红线不仅保留了 3000~3500 cm^{-1} 处多糖骨架宽泛的−OH 和−NH 伸缩振动，而且在~1708 cm^{-1} 处保留了明显的−CO−O−酯键特征峰，在~1600 cm^{-1} 处同样保留了强烈的−C=C−及−CO−NH−等特征吸收带。红外结果证实，改性后的羧甲基壳聚糖与 HAMA 成功复合，且双响应动态化学

2026 Shanghai High School Science Award 仅用于2026上海市中学生科学奖论文公示

键（亚胺键、二硫键）及光交联双键均稳定存在于最终的复合水凝胶体系中。

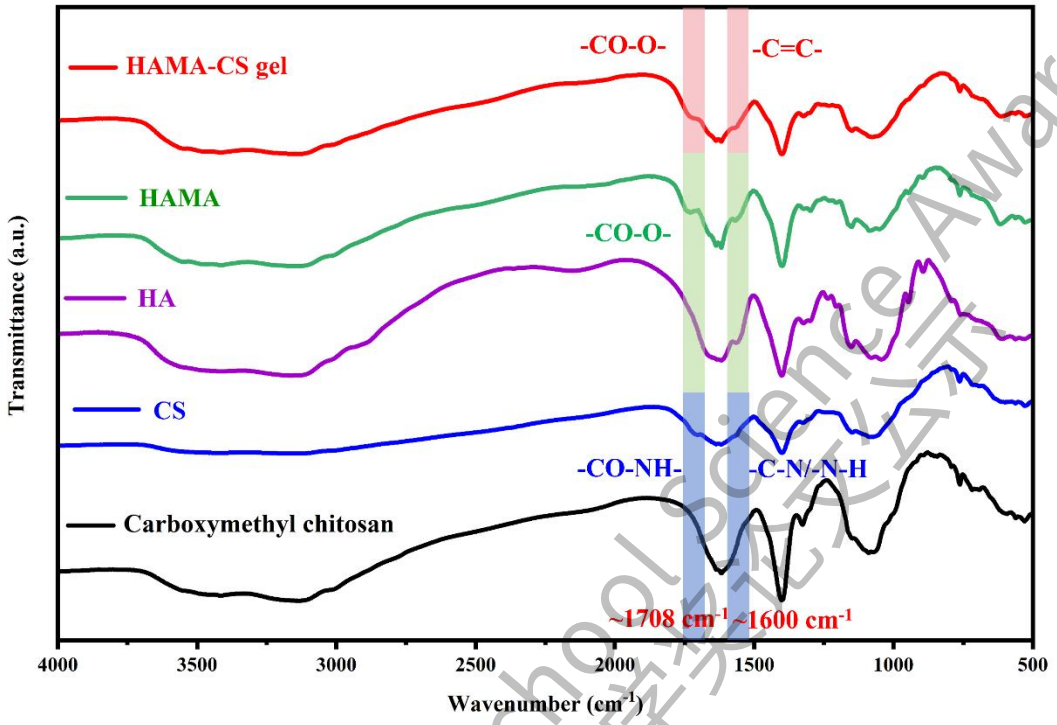


图 2.4 羧甲基壳聚糖、CS、HA、HAMA 和 HAMA-CS 复合水凝胶的 FT-IR 图

2.4.3 Cur@GL/HAMA-CS 的流变学性能

为了评价 Cur@GL/HAMA-CS 的力学性能，本课题通过流变学测试比较 HAMA-CS 复合水凝胶与 Cur@GL/HAMA-CS 水凝胶的 G′和 G″。结果如图 2.5 所示。在 90 s 时使用 405 nm 光照射水凝胶 30 s，水凝胶于约 100 s 开始发生明显固化，并于约 120 s 时基本完成光交联固化。最终，HAMA-CS 的储能模量与损耗模量及 Cur@GL/HAMA-CS 的储能模量与损耗模量分别由 14.62 Pa, 0.25 Pa, 18.25 Pa 及 0.75 Pa 提升至 1160.00 Pa，8.26 Pa，1740.00 Pa 及 13.67 Pa。通过实验数据得知光交联能够提高两种水凝胶的力学性能，且 Cur@GL 微球的加入进一步提高了水凝胶的储能模量和损耗模量，说明其提高了复合水凝胶的黏弹性及力学支撑能力。本课题中 Cur@GL/HAMA-CS 的储能模量为 1740 Pa，处于较低刚度水凝胶范围。Yang 等报道脊髓组织力学模量约为 100-3000 Pa，其 AGP3 水凝胶储能模量约为 1470 Pa，并表现出有利于神经元相关表型的作用[14]。因此，本课题材料的储能模量处于部分神经修复水凝胶报道范围内，提示其具有一定神经组织力学适配潜力。有研究表明，基质刚度能够影响神经干细胞的增殖及谱系分化，三维软基质总体上更有利于神经元分化，而较高刚度可能增加星形胶质相关分化[15,16,26]。因此，本课题 1740 Pa 的力学环境具备参与神经干细胞相关表型

2026 Sichuan University School Science Award 仅用于2026年度校级中学科学奖公示

调控的能力。

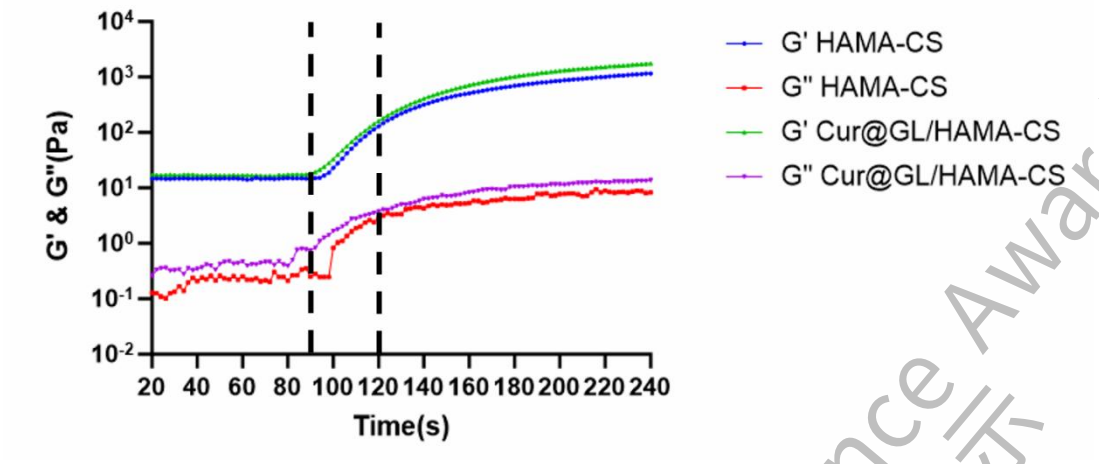


图 2.5 HAMA-CS 和 Cur@GL/HAMA-CS 的储能模量（G′）和损耗模量（G″）

2.4.4 Cur@GL/HAMA-CS 的姜黄素释放性能

为了评估 Cur@GL/HAMA-CS 的姜黄素响应性释放性能，本课题建立姜黄素标准浓度-吸光度曲线，并于 425 nm 下检测不同微环境条件下 Cur@GL/HAMA-CS 后 1 h、3 h、6 h、12 h 及 24 h 的溶液吸光度，并根据标准曲线换算释放介质中的姜黄素浓度，用于比较不同微环境下的实际释放水平。结果如图 2.6 和图 2.7 所示。姜黄素的标准浓度-吸光度拟合方程为 $y=0.02463+0.02511x$（$R^2=0.9927$）。在释放实验中，在 pH 7.4 的普通 PBS 缓冲液（即正常生理条件）中，24 h 后溶液中姜黄素浓度最低，为 17.34±0.65μg/L；当处于酸性环境（pH 5.0）或高水平 ROS 环境（pH 7.4 + 100 μM H_2O_2）时，溶液中姜黄素浓度增加，分别为 46.41±0.86 μg/L 及 44.55±2.53 μg/L；在模拟损伤微环境的酸性及高水平 ROS 条件（pH 5.0 + 100 μM H_2O_2）下，姜黄素表现出较高的释放速率与释放浓度，为 70.17±1.14 μg/L，能够在酸性与高水平 ROS 的模拟病理条件中实现药物的较高的响应性释放。值得注意的是，进一步测试了在弱酸性及低水平 ROS 条件下（pH 6.5 + 10 μM H_2O_2），Cur@GL/HAMA-CS 在 24h 后释放量依然可以达到 56.36±3.10 μg/L，表明 Cur@GL/HAMA-CS 具有较好的响应性释放性能。已有研究表明，姜黄素负载于脊髓基质水凝胶后可促进神经干细胞增殖及神经元分化，但其在早期阶段存在较为明显的快速释放现象，提示姜黄素的载药方式及释放动力学仍有进一步优化空间[27]。而本课题构建的 Cur@GL/HAMA-CS 采用了亚胺键与二硫键的双重修饰，在所设定的模拟病理条件（pH 5.0 及高水平 ROS）下 24 h 后达到超 70 μg/L 的响应性释放浓度，相较单一响应载体，实现了按需给药的性能。

为了进一步考察复合体系在中枢神经损伤漫长修复周期内的药物递送潜力，本课题将释药监测周期延长至 16 天。长期释放曲线（图 2.8）显示，在 pH 7.4

2026 Shanghai High School Science Award 仅用于2026年上海中学科学论文公示

的普通 PBS 环境中，体系表现出明显的“防突释”特性，16 天后的累计释放浓度仅为约 48±1.1μg/L；而在模拟病理微环境（pH 5.0 + 100 μM H_2O_2）下，体系在早期 24 h 内快速响应后，在随后的 16 天内依然保持着平稳且持续的释放趋势，最终浓度达到约 89±2.2 μg/L；弱酸性及低水平 ROS 条件（pH 6.5 + 10 μM H_2O_2）下的释放量则介于两者之间。这表明 Cur@GL/HAMA-CS 不仅能在损伤急性期对病理信号做出快速响应，还能在后续长达半个月的修复期内作为药物持续发挥作用，实现了长效的按需给药。

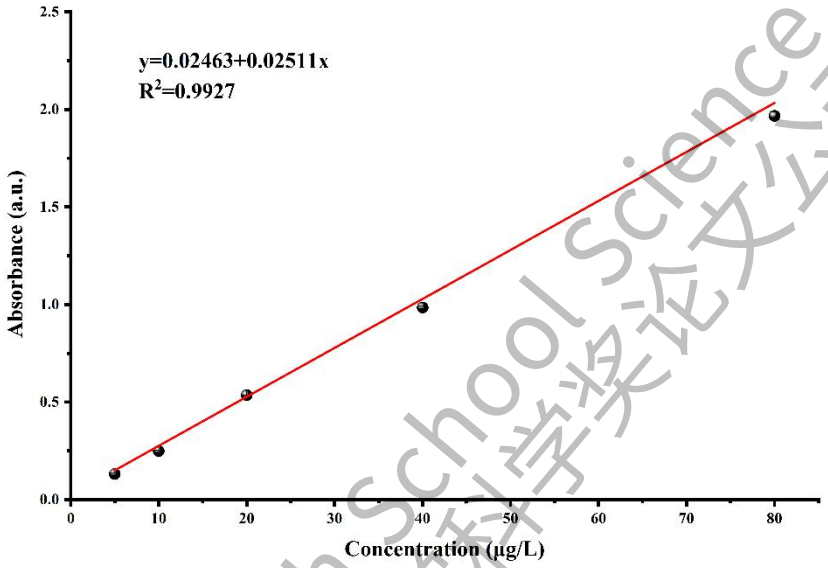


图 2.6 姜黄素的标准浓度-吸光度曲线

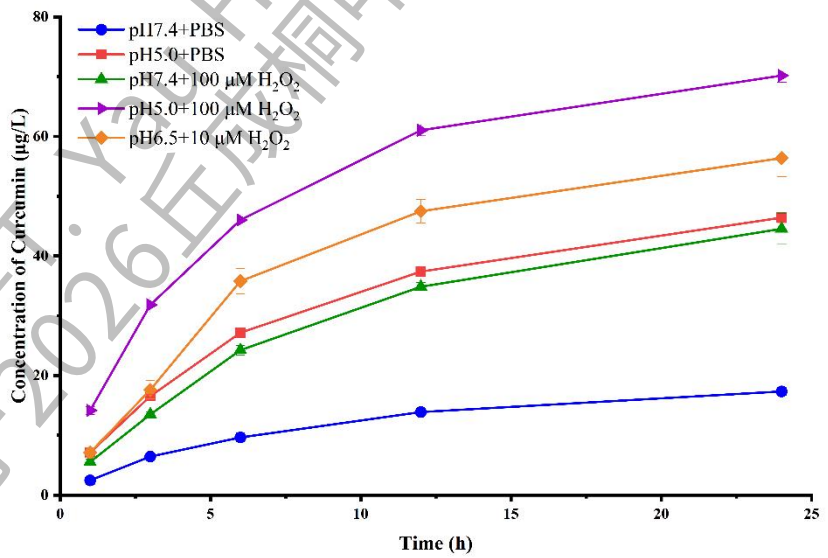


图 2.7 姜黄素在不同环境下的短时间-释放浓度曲线

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

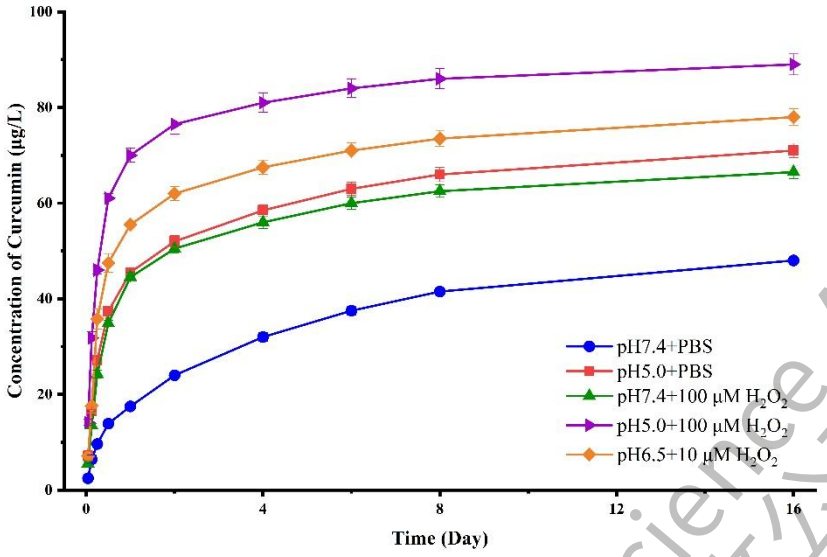


图 2.8 姜黄素在不同环境下的长时间-释放浓度曲线

2.5 本章小结

本章首先通过丙酮醛与羧甲基壳聚糖分子链上部分氨基发生反应，并进一步通过 EDC/NHS 活化体系与胱胺二盐酸盐进行偶联，对羧甲基壳聚糖进行分步化学改性。利用 ^{1}H NMR 与 FT-IR 测试证实了含亚胺键与二硫键的侧链以及光敏双键的成功接枝，从分子层面确证了改性材料的成功合成。将改性羧甲基壳聚糖与 HAMA 混合，并加入 Cur@GL 微球，经光交联制得 Cur@GL/HAMA-CS。在进行了 Cur@GL/HAMA-CS 的微观结构表征，流变学测试及 pH/ROS 响应性释药性能测试后，SEM 结果显示 Cur@GL/HAMA-CS 在冻干状态下具有连续的三维多孔结构，并可观察到微球分布。流变学测试表明，Cur@GL/HAMA-CS 固化后储能模量约为 1740 Pa，属于较低刚度水凝胶范围，与已报道的部分中枢神经修复水凝胶力学水平接近，具有一定的神经组织力学适配潜力，可为神经细胞提供力学支撑[14]。pH/ROS 响应性释药测试中，中性组织药物 24 h 后浓度仅 17.34±0.65μg/L，处于酸性环境或高水平 ROS 环境时，溶液中 24 h 药物浓度增加分别至 46.41±0.86 μg/L 及 44.55±2.53 μg/L，在弱酸性及低水平 ROS 条件下 24h 药物浓度达到 56.36±3.10 μg/L，较强酸性及高水平 ROS 微环境中 24 h 后药物浓度达到 70.17±1.14 μg/L，说明 Cur@GL/HAMA-CS 具备良好的 pH/ROS 双响应能力。进一步将释药监测周期延长至 16 天的长期释放实验表明，该体系在正常生理环境下 16 天后累计释放浓度仅为约 48±1.1 μg/L，展现出优异的“防突释”特性；而在模拟病理微环境中，早期快速响应后依然能保持 16 天平稳持续的释放（最

2026 Sichuan University School Science Award
仅用于2026年四川大学科学奖论文公示

终达约 89±2.2 μg/L）。在双重刺激的微环境下表现出较好的姜黄素响应性释放效果。该体系依托高分子常温修饰工艺，具有制备简便性及 pH/ROS 信号同步响应能力，从微观结构，力学，分子响应机制三个角度完成材料的理化性能验证，为后续细胞功能评价筛选出较优性能的材料配方。

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

第三章 Cur@GL/HAMA-CS 的生物相容性、抗炎作用与在中枢神经损伤修复中的应用

3.1 引言

基于第二章理化表征筛选出的 Cur@GL/HAMA-CS 配方，本章开展多层次体外细胞评价。各独立实验至少进行 3 次生物学重复，并在相应检测中设置技术复孔，弥补现有同类型研究仅单一神经元培养、缺少免疫调控与胶质瘢痕定量的短板。实验层层递进，首先以 HT22 小鼠海马神经元开展 CCK-8 细胞活力检测，全面验证材料的生物安全性，确定无毒浓度使用区间。其次，构建 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞体外炎症模型，通过 RT-qPCR 法定量 M1 促炎表型及 M2 抗炎表型的特征基因表达并采用 ELISA 法定量促炎与抗炎细胞因子的分泌水平，以评价炎症相关表型变化。进一步构建巨噬细胞与神经干细胞的共培养体系，模拟中枢神经损伤后免疫细胞与神经细胞体内交互的过程，通过流式细胞仪定量 GFAP 星形胶质瘢痕标记、Tuj1 早期神经元阳性细胞比例，评价材料调控 GFAP/Tuj1 相关表型变化的作用，促进神经干细胞向神经元分化的能力。最后，开展 HT22 神经元 Ki67 细胞增殖抗原与 MAP2 神经元相关标志蛋白免疫荧光染色，可视化验证材料对于促进神经元增殖的效果。闭环的细胞实验形成了从生物安全到免疫抗炎调控、胶质瘢痕抑制及神经元再生的完整评价体系，多角度阐明了 Cur@GL/HAMA-CS 干预中枢神经损伤促进神经再生修复的生物学功能。

3.2 实验试剂与仪器

3.2.1 实验试剂与耗材

本章节使用的有关实验试剂与耗材如表 3.1 所示。

表 3.1 试剂与耗材

试剂与耗材	生产厂商	货号
HT22 细胞系	尚恩生物	SNL-202
RAW264.7 细胞系	尚恩生物	SNL-112
神经干细胞	美森生物	CTCC-165-HUM
DMEM 培养基	Gibco	11965118
胎牛血清	Gibco	A3160801
胰蛋白酶	Gibco	12605010

2026 S.T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖公示

试剂与耗材	生产厂商	货号
CCK-8 试剂	Bimake	230063
多聚甲醛	Biosarp	69080900
Triton X-100	Sigma	H8502-100g
牛血清白蛋白	源叶生物	9048-46-8
TRIzol 裂解液	Invitrogen	15596026
氯仿	阿拉丁	C776739
异丙醇	阿拉丁	P433289
逆转录试剂盒	翌圣	11123ES60
SYBR Green 荧光染料	翌圣	11185ES08
小鼠 TNF-α ELISA 试剂盒 (快速)	Adamas life	P4093-96T
小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒	Adamas life	P8038-2
小鼠 IL-10 ELISA 试剂盒	Adamas life	P8039-2

3.2.2 实验仪器与设备

本章节使用的仪器与设备如表 3.2 所示。

表 3.2 仪器与设备

仪器名称	生产厂商	仪器型号
电子分析天平	梅特勒-托利多	ML204L
磁力搅拌机	上海比朗仪器有限公司	HH-4
酶标仪	越众仪器	ZNCL-90-1B
激光共聚焦显微镜	BioTek	Cytation 3
RT-qPCR 仪	Olympus	FV3000
流式细胞仪	Roche	LightCycler 480 II
基因扩增仪	贝克曼	CytoFLEX
离心机	Eppendorf	Centrifuge 5452R

3.3 实验方法

本章节的实验流程示意图如图 3.1 所示。

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

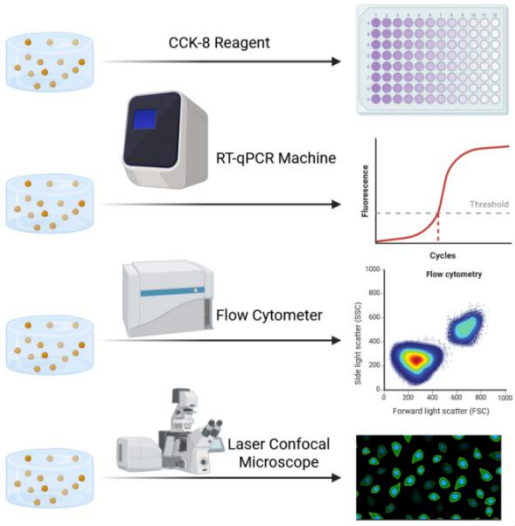


图 3.1 Cur@GL/HAMA-CS 的生物相容性与抗炎作用

3.3.1 HT22、RAW264.7 及神经干细胞的培养

将冻存的 HT22 细胞和 RAW264.7 细胞分别从液氮中取出后，立即置于 37 ℃水浴中快速复苏。待细胞悬液完全融化后，放置于含 10% 胎牛血清（FBS）的 DMEM 培养基中，以 300g 离心 5 min，弃去上清液。将细胞沉淀分别重悬于 DMEM 完全培养基中，并转移至 10 cm 培养皿中，在 37 ℃、5% CO_2 的培养箱内培养。当细胞融合度达到约 80%—85%时进行传代操作。

神经干细胞培养及传代按传统操作方法进行。神经干细胞完全培养基内容包括 1% 链霉素-青霉素双抗、0.1 mL 碱性成纤维细胞生长因子、0.1 μL 表皮生长因子、1 mL B27 及 500 mLDMEM-F12 培养基。

3.3.2 Cur@GL/HAMA-CS 的生物相容性实验

在 96 孔板的 12 个孔中分别种入约 1 ×10^4 个 HT22 细胞，培养 24 h，将 HAMA-CS 复合水凝胶，Cur@GL 微球，以及 Cur@GL/HAMA-CS 分别按照计划浓度加入其中的 3 个孔中，每个梯度单独进行独立实验，培养 24 h。弃去加入的材料以及培养基，使用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。向孔中分别加入 90 μL DMEM 培养基以及 10 μL CCK-8 试剂，在 37 ℃下反应 2 h。使用酶标仪分别测定各孔中混悬液以及仅含有 90 μL DMEM 培养基及 10 μL CCK-8 试剂的混悬液的吸光度，并根据以下公式计算细胞活力：

$$Cell\ Viability(\%)=\frac{A_{treated}-A_0}{A_{blank}-A_0}\times 100\% \tag{3.1}$$

其中$A_{treated}$为加入材料后的种有细胞的含有 90 μL DMEM 培养基及 10 μL CCK-8 试剂的混悬液的吸光度，A_{blank}为未加入材料的种有细胞的含有 90 μL DMEM 培养基及 10 μL CCK-8 试剂的混悬液的吸光度，A_0为仅含有 90 μL

2026 CSTJ Yau Hua School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖公示

DMEM 培养基及 10 μL CCK-8 试剂的混悬液的吸光度。

3.3.3 Cur@GL/HAMA-CS 的抗炎作用实验

在 96 孔板中分别种入约 1×10^4 个 RAW264.7 细胞，采用 LPS 建立炎症模型, LPS 工作终浓度为 10 μg/mL, 培养 24 h, 将 HAMA-CS 复合水凝胶, Cur@GL 微球，以及 Cur@GL/HAMA-CS 分别等量各自加入其中的 3 个孔中，培养 24 h。用 PBS 缓冲液冲洗加入材料的细胞，将混悬液转移至离心管中，每管加入 1 mL TRIzol, 反应 5 min。加入 200 μL 氯仿, 震荡混匀, 于 4 ℃下以 12000g 离心 15 min。吸取上清液至新离心管中，加入 500 μL 异丙醇混匀，静置 10 min，于 4 ℃下以 12000g 离心 10 min。加入 75% 乙醇洗涤沉淀，于 4 ℃下以 7500g 离心 10 min。随后，弃去上清液，将沉淀于室温下风干。RNA 提取完成后，按照逆转录试剂盒说明书将所得 RNA 逆转录为 cDNA，并用于后续 RT-qPCR 检测。以 GAPDH 作为内参基因，采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 体系对巨噬细胞炎症相关表型基因进行检测。其中，*Nos2* 基因的引物序列为：前向引物（F）5′-GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA-3′，反向引物（R）5′-GTGGACGGGTCGATGTCAC-3′；*Mrc1* 基因的引物序列为：前向引物（F）5′-CTCTGTTCAGCTATTGGACGC-3′，反向引物（R）5′-TGGCACTCCCAAACATAATTTGA-3′。通过比较目标基因与内参基因的 Ct 值，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *Nos2* 和 *Mrc1* 的相对表达水平。采用商品化 ELISA 试剂盒（按说明书进行标准品稀释、加样、洗板、加检测抗体和 HRP 标记物、TMB 显色及终止反应）在 450 nm 波长下读取吸光度，依据标准曲线定量分泌至培养基中的 TNF-α、IL-6 和 IL-10 蛋白浓度；所有样品均设至少 4 个复孔，综合基因转录和蛋白分泌水平以全面评估细胞的炎症应答状态。

3.3.4 Cur@GL/HAMA-CS 的胶质瘢痕相关表型调控作用实验

在 96 孔板的 12 个孔中分别种入约 5×10^3 个 RAW264.7 细胞及约 5×10^3 个神经干细胞，培养 24 h，将 HAMA-CS 复合水凝胶，Cur@GL 微球，以及 Cur@GL/HAMA-CS 分别等量各自加入其中的 3 个孔中，培养 24 h。用 PBS 缓冲液清洗并消化，分别移入 EP 管中，每管加入约 100 μL 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 加入 100 μL 0.5% Triton X-100 室温孵育 5 min。加入各 10 μL 按照说明书稀释后的 GFAP 一抗和 Tuj1 一抗，在 4 ℃下孵育过夜。次日，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。随后，加入 10 μL 按照说明书稀释后的荧光标记的二抗，于室温下孵育 1 h。用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，将细胞转移至流式管中，采用流式细胞仪检测相应荧光信号。采集获得的细胞事件首先根据细胞散射信号排除明显碎片，并在后续分析中统计 GFAP 和 Tuj1 阳性细胞所占比例。

2026 Yan Huang School Science Award 仅用于2026年成都学科学论文公示

3.3.5 Cur@GL/HAMA-CS 促进神经元相关表型及细胞增殖作用实验

在 96 孔板的 12 个孔中分别种入约 1x10^4 个 HT22 细胞，培养 24 h，将 HAMA-CS 复合水凝胶，Cur@GL 微球，以及 Cur@GL/HAMA-CS 分别等量各自加入其中的 3 个孔中，余下 3 个孔为只含有细胞和培养基的对照组，培养 24 h。用 PBS 缓冲液冲洗加入材料的细胞，每孔加入约 100 μL 4% 多聚甲醛溶液，于室温下反应 10 min。用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 5 min，向孔内加入 0.5% Triton X-100 溶液处理 5 min，再用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。加入 5% 牛血清白蛋白溶液，于 25 ℃下封闭 1 h。随后，弃去封闭液，向孔中加入各 10 μL 按照说明书稀释后的 Ki67 一抗与 MAP2 一抗，在 4 ℃下孵育过夜。次日，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。随后，加入 10 μL 按照说明书稀释后的荧光标记的二抗及 DAPI，于室温下孵育 1 h。随后，孵育后用 PBS 洗涤，并进行激光共聚焦显微镜成像。

3.3.6 数据分析

两组间比较采用独立样本 *t* 检验。三组及以上组间比较采用单因素方差分析，并使用 Tukey's 多重比较事后检验。所有统计分析使用 Graphpad Prism 软件完成。每组实验至少设置三个生物学平行，实验重复不少于三次，以确保数据的可靠性。

3.4 结果与讨论

3.4.1 Cur@GL/HAMA-CS 的生物相容性

良好的生物相容性是生物材料应用于组织修复的前提，因此本课题需要评估不同处理组对神经元存活率的影响。在 HT22 细胞系进行培养后，采用 CCK-8 试剂对 HAMA-CS 复合水凝胶、Cur@GL 微球及 Cur@GL/HAMA-CS 的生物相容性进行了检测。结果如图 3.2 所示。在 Cur@GL 微球组中，对照组的细胞存活率为（100.00±4.182）%。在 100 μg/mL 组中，细胞存活率为（96.93±5.069）%（$P > 0.05$），与对照组无显著差异。在 200 μg/mL 组，400 μg/mL 组和 800 μg/mL 组中，细胞存活率分别为（91.18±4.237）%（$P < 0.05$），（65.90±9.039）%（$P < 0.0001$）及（43.61±4.977）%（$P < 0.0001$），相较对照组显著降低。在 HAMA-CS 复合水凝胶组中，对照组的细胞存活率为（100.00±8.636）%。在 5 wt%组和 10 wt%组中，细胞存活率分别为（98.72±9.256）%及（93.57±1.405）%，与对照组无显著差异（$P > 0.05$）。在 15 wt%组和 20 wt%组中，细胞存活率分别为（80.81±6.362）%（$P < 0.001$）及（66.90±4.342）%（$P < 0.0001$），相较对照组显著降低。在 Cur@GL/HAMA-CS 组中，对照组的细胞存活率为（100.00±8.636）%，在 200 μg/mL 微球，10 wt%复合水凝胶组和 100 μg/mL 微球，5 wt%复合水凝胶

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

组中，细胞存活率分别为（93.87±10.170）%及（103.44±9.459）%（P > 0.05），与对照组无显著差异。在 100 μg/mL 微球，10 wt%复合水凝胶组中，细胞存活率为（117.07±1.003）%（P < 0.05），相较 Control 组显著升高。其中 Cur@GL/HAMA-CS 组 100 μg/mL 微球，10 wt%复合水凝胶组中表现出较高的细胞活性，提示微球与水凝胶复合体系具有良好的细胞相容性，有利于为神经再生提供适宜的支撑载体。近年来，姜黄素负载水凝胶已被用于严重 SCI 的神经保护及神经组织修复，进一步证明了姜黄素与水凝胶载体联合应用的治疗潜力[28]。而本课题将 Cur@GL 微球与 HAMA-CS 复合水凝胶结合后，受控的响应性缓释机制可能通过降低瞬时局部姜黄素暴露而改善了细胞相容性，CCK-8 代谢活性较高，优于单纯的游离姜黄素药物基质。

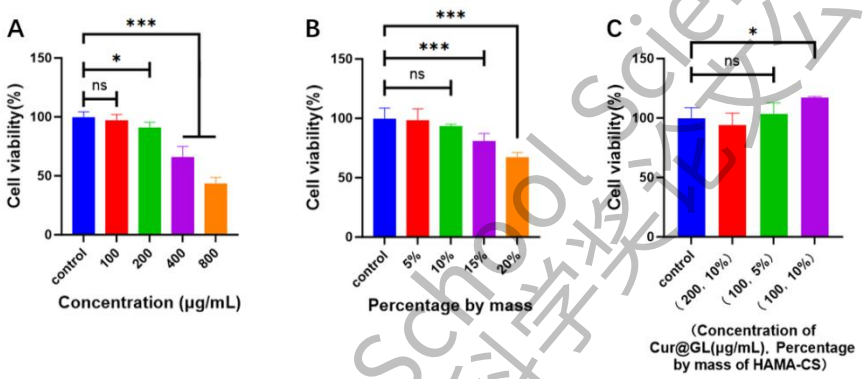


图 3.2 A）Cur@GL 微球组，B）HAMA-CS 复合水凝胶组及 C）Cur@GL/HAMA-CS 组的细胞存活率

3.4.2 Cur@GL/HAMA-CS 的抗炎作用

巨噬细胞在损伤后分化为促炎 M1 表型或抗炎 M2 表型，M1 表型会加剧神经损伤，M2 表型有助于维持细胞稳定状态。因此，在中枢神经修复过程中需要实现调控巨噬细胞分化方向的目的。我们在用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞系建立炎症模型后，分别引入 HAMA-CS 复合水凝胶、Cur@GL 微球及 Cur@GL/HAMA-CS，提取总 RNA 并使用 RT-qPCR 法检测促炎基因 *Nos2* 和抗炎基因 *Mrc1* 的相对表达量，以评价巨噬细胞炎症相关表型变化。结果如图 3.3 所示。在 *Nos2* 基因表达的检测中，对照组相对表达量为 1.00±0.100，HAMA-CS 复合水凝胶组为 1.00±0.170，与对照组无显著差异（$P > 0.05$）。Cur@GL 微球组及 Cur@GL/HAMA-CS 组分别显著下调至 0.61±0.096（$P < 0.01$）和 0.36±0.063（$P < 0.0001$），其中 Cur@GL/HAMA-CS 组的 *Nos2* 基因相对表达量最低，表明其可显著抑制促炎基因表达。在 *Mrc1* 基因表达的检测中，对照组相对表达量为 1.00±0.114, HAMA-CS 复合水凝胶组为 1.35±0.204, 与对照组无显著差异（$P > 0.05$）。Cur@GL 微球组及 Cur@GL/HAMA-CS 组分别显著上调至 2.06±0.329（$P < 0.01$）及 3.79±0.412（$P < 0.0001$），其中 Cur@GL/HAMA-CS 组的 *Mrc1* 基因

2026 S.T. Yau High School Science Award 仅用于2026上海科学奖公示

相对表达量最高，提示其可促进抗炎相关基因表达并抑制促炎相关基因表达，有利于改善中枢神经损伤区域的炎症微环境。已有研究表明，透明质酸基水凝胶及免疫调控材料能够促进巨噬细胞 M2 极化[26]。本课题中，Cur@GL/HAMA-CS 处理后 *Mrc1* 相对表达量升高至 3.79±0.412，同时 *Nos2* 降至 0.36±0.063，提示该材料具有明显的抗炎调控作用。

进一步进行了 ELISA 分析，评估了各组 LPS 刺激 RAW264.7 细胞系建立炎症模型后炎症因子水平变化，探究了 HAMA-CS 复合水凝胶、Cur@GL 微球及 Cur@GL/HAMA-CS 对活化的巨噬细胞中炎症因子在分子水平上的变化。结果如图 3.4 所示，检测了典型促炎细胞因子肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、白介素-6 (IL-6) 和抗炎细胞因子白介素-10（IL-10）的分泌水平。与 RT-qPCR 结果一致，LPS 刺激后对照组 TNF-α和 IL-6 含量显著升高，分别为 TNF-α 47.89±2.84 pg/L、IL-6 113.92±7.49 pg/L，而 HAMA-CS 复合水凝胶组（TNF-α 41.84±3.26 pg/L，IL-6 89.92±2.91 pg/L）与对照组相比无明显差异，表明单纯 HAMA-CS 水凝胶对已活化的炎症反应缺乏直接抑制作用。然而，Cur@GL 微球组可以降低了 TNF-α（30.02±0.80 pg/L）和 IL-6（73.00±6.52 pg/L）的水平，同时提升了 IL-10 的分泌量（从对照组的 31.53±3.90 pg/L 升至 112.61±6.88 pg/L）。更为突出的是，Cur@GL/HAMA-CS 联合处理组将 TNF-α和 IL-6 分别抑制至 21.10 ±1.96 pg/L 和 49.55±2.87pg/L，而 IL-10 浓度则达到 151.89±5.97 pg/L，显著优于其他各组。这些结果与基因表达谱变化相呼应，证实 Cur@GL/HAMA-CS 复合材料能够在转录和蛋白水平上双重重塑巨噬细胞的炎症极化状态——不仅下调 M1 型促炎介质，还有效上调 M2 型抗炎介质，从而将局部微环境从“促炎破坏”转向“修复支持”。

值得注意的是，Cur@GL 微球单独给药虽有一定调节效果，但其作用强度不及与 HAMA-CS 水凝胶复合后的体系。这可能得益于水凝胶三维网络结构对姜黄素（Cur）的缓释作用，延长了药物的局部作用时间，同时透明质酸（HA）本身作为 CD44 配体，可通过激活 STAT6 信号通路协同增强 M2 极化倾向。既往研究已表明，透明质酸基材料能够通过调控巨噬细胞代谢重编程促进抗炎表型转换，而本课题所设计的 Cur@GL/HAMA-CS 体系则将材料自身的免疫调节活性与姜黄素的药理学作用有机整合，实现了“材料 – 药物”协同增效。综上，基因和蛋白水平的双重证据一致表明，该复合体系具备强劲的巨噬细胞表型调控能力，为中枢神经损伤后炎症微环境的改善提供了有力的分子基础。

2026 S.T. Yau High School Science Award
仅用于2026年丘成桐中学科学奖公示

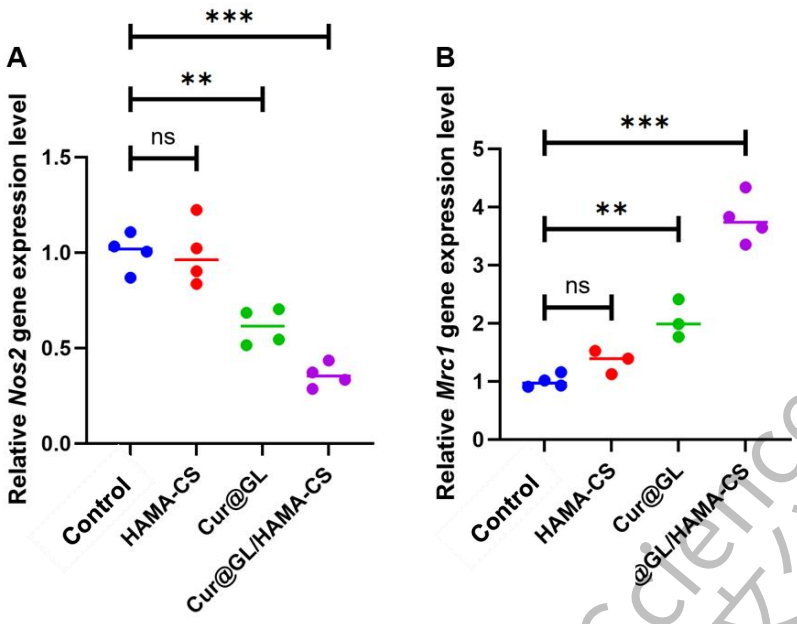


图 3.3 HAMA-CS 复合水凝胶，Cur@GL 微球及 Cur@GL/HAMA-CS 组的 A）*Nos2* 及 B）*Mrc1* 相对基因表达量

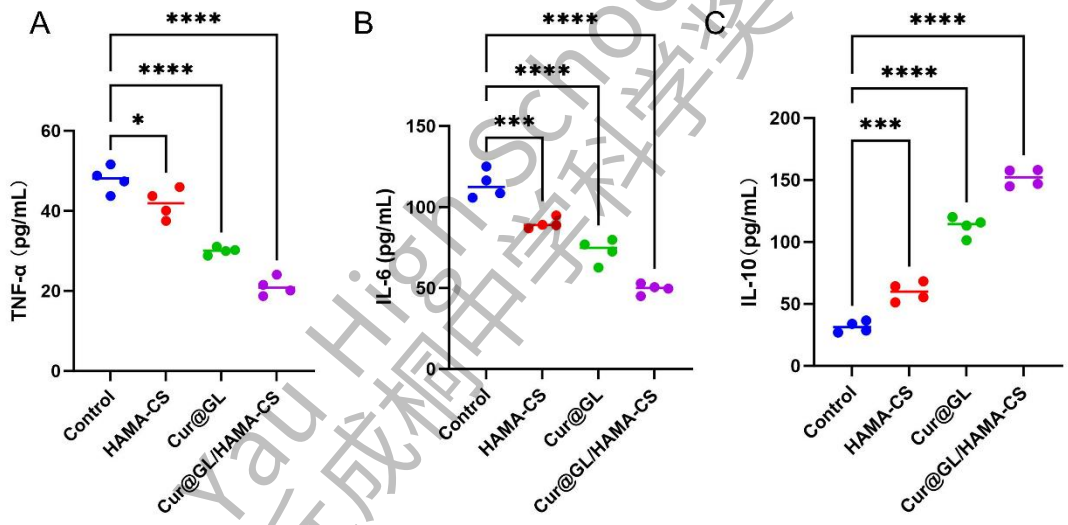


图 3.4 HAMA-CS 复合水凝胶，Cur@GL 微球及 Cur@GL/HAMA-CS 组的细胞炎症因子水平定量分析 A）TNF-α；B）IL-6；C）IL-10

3.4.3 Cur@GL/HAMA-CS 的胶质瘢痕相关表型调控作用

胶质瘢痕可形成具有物理和分子抑制作用的微环境，阻断神经元再生通路，因此，我们在中枢神经损伤修复的过程中需要实现抗瘢痕增生的效果。我们将 RAW264.7 细胞系及神经干细胞共培养后，使用流式细胞术对 Cur@GL 微球，HAMA-CS 复合水凝胶及 Cur@GL/HAMA-CS 的胶质瘢痕相关表型调控作用进行了检测。结果如图 3.5 所示。在 GFAP 的检测中，对照组中的阳性细胞比例为 43.0%，HAMA-CS 复合水凝胶组中阳性细胞比例上调至 45.5%，Cur@GL 微球

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

组及Cur@GL/HAMA-CS组分别下调至34.4%及24.6%, 其中Cur@GL/HAMA-CS组具有最好的下调效果，表明其胶质瘢痕相关表型调控作用较优，有助于神经元再生通路形成。在 Tuj1 的检测中, 对照组中的阳性细胞比例为 43.3%, HAMA-CS 复合水凝胶组，Cur@GL 微球组及 Cur@GL/HAMA-CS 组中阳性细胞比例分别上调至 48.7%，58.5%及 64.3%，其中 Cur@GL/HAMA-CS 组具有最好的上调效果，表明其促进神经再生的性能较好。已有研究指出，仅提供结构支撑的传统材料难以同时满足 SCI 修复过程中炎症调控和神经再生需求, 因此发展具有细胞调控功能的多功能水凝胶成为重要策略[20]。本课题中, Control、HAMA-CS、Cur@GL 和 Cur@GL/HAMA-CS 组的 GFAP 阳性细胞比例分别为 43.0%、45.5%、34.4%和 24.6%，而 Tuj1 阳性细胞比例分别为 43.3%、48.7%、58.5%和 64.3%。因此，Cur@GL/HAMA-CS 同时表现出降低 GFAP 阳性细胞比例和提高 Tuj1 阳性细胞比例的趋势，提示其可能抑制星形胶质相关分化并促进神经元相关分化。结合已有研究中基质刚度对神经干细胞谱系命运的调控作用[14-16,29]，本课题 1740 Pa 的低刚度三维力学环境可能参与上述表型变化。

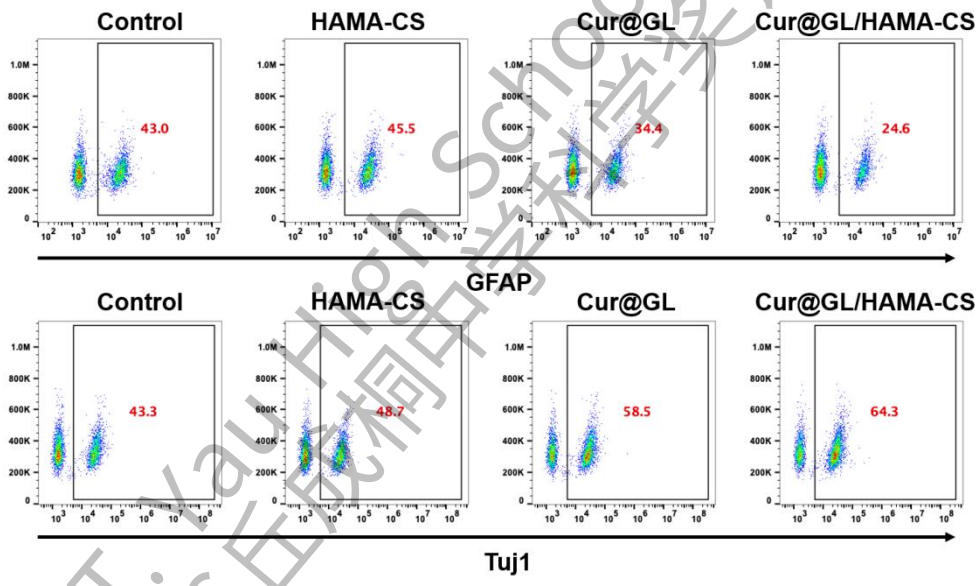


图 3.5 HAMA-CS 复合水凝胶，Cur@GL 微球及 Cur@GL/HAMA-CS 组的 GFAP 与 Tuj1 的标记物检测

3.4.4 Cur@GL/HAMA-CS 促进神经元相关表型及细胞增殖作用

神经元再生与增殖对于神经损伤后的功能修复至关重要，因此，我们在神经损伤修复的过程中需要评估各组材料对神经元成熟与增殖能力的促进作用。我们将 HT22 细胞系分别与 HAMA-CS 复合水凝胶、Cur@GL 微球及 Cur@GL/HAMA-CS 共培养后，采用免疫荧光染色法对神经元相关标志蛋白 MAP2（绿）和增殖标记物 Ki67（红）进行染色。结果如图 3.6 所示。对照组 MAP2 荧光信号较弱；HAMA-CS 复合水凝胶组与 Cur@GL 微球组的 MAP2 绿

2026 S. T. Yau High School Science Award 仅用于2026丘成桐中学科学奖公示

色荧光强度略有增强；而 Cur@GL/HAMA-CS 组呈较强的绿色荧光表达，表明其对神经元成熟具有较优促进作用。在 Ki67 的表达检测中，对照组仅可见稀疏的红色荧光信号；HAMA-CS 复合水凝胶组和 Cur@GL 微球组阳性信号略有增多；Cur@GL/HAMA-CS 组中红色荧光显著增强，较为强烈，表明其具有较优的促进神经元增殖效果。综上所述，Cur@GL/HAMA-CS 能够促进神经元的增殖与成熟，为神经再生的通路构建提供了良好的微环境支撑。近年来，针对中枢神经损伤局部氧化应激微环境的 ROS 调控型生物材料受到广泛关注。过量 ROS 可加重神经细胞氧化损伤并阻碍神经修复，而 ROS 清除或氧化应激调控有助于改善损伤微环境[13]。姜黄素作为具有抗氧化活性的天然多酚，可通过清除 ROS、抑制脂质过氧化及调节内源性抗氧化系统发挥氧化应激调控作用。已有研究进一步表明，姜黄素负载水凝胶应用于 SCI 后能够降低损伤组织中的 ROS 水平并减轻氧化损伤[28]。本课题构建的 Cur@GL/HAMA-CS 体系可在 ROS 刺激条件下增强姜黄素释放，因此推测其有望通过姜黄素的抗氧化作用缓解局部氧化应激，并与三维支架提供的细胞黏附及力学支撑共同改善神经细胞生长微环境。与此同时，Cur@GL/HAMA-CS 组 MAP2 和 Ki67 荧光信号较其他组增强，提示该体系具有促进神经元相关表型及细胞增殖的潜力。

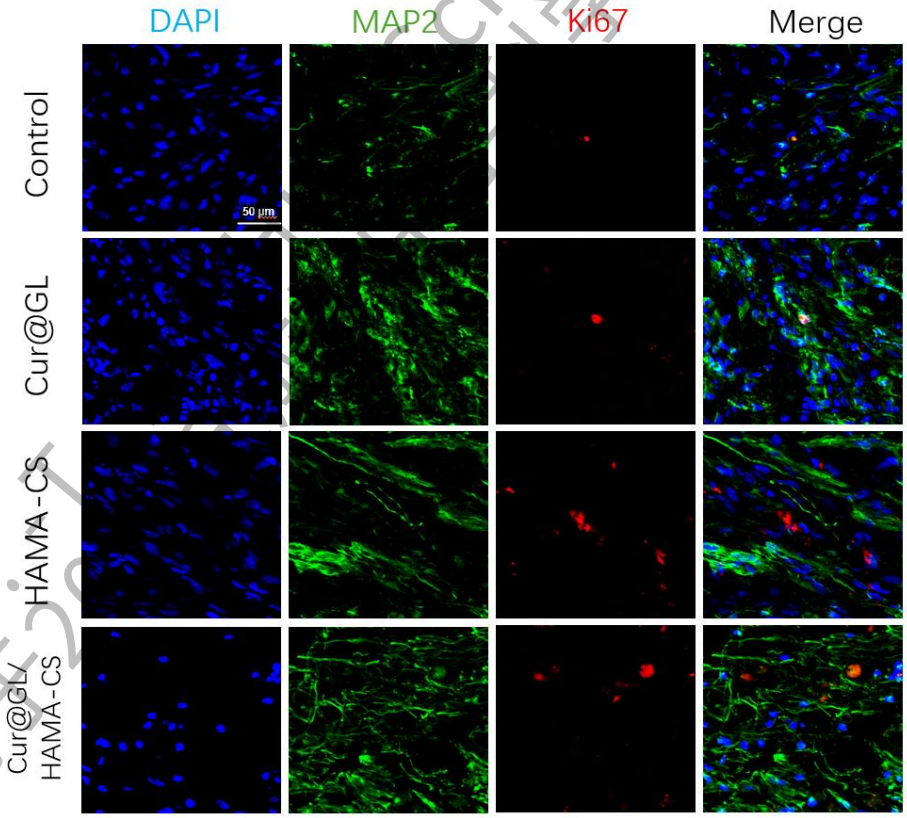


图 3.6 Cur@GL 微球，HAMA-CS 复合水凝胶及 Cur@GL/HAMA-CS 组的 MAP2，Ki67 荧光信号检测

2026 S.T. 仅用于 Science Award

3.5 本章小结

本章完成了 Cur@GL 微球，HAMA-CS 复合水凝胶及 Cur@GL/HAMA-CS 的生物相容性测试、抗炎作用测试、胶质瘢痕相关表型调控作用测试及对神经再生的作用测试。CCK-8 试剂的细胞存活率结果表明，100 μg/mL Cur@GL 微球，10 wt% HAMA-CS 复合水凝胶的 Cur@GL/HAMA-CS 配方具有较优的生物相容性，能够为神经再生提供有力的支撑载体。采用 RT-qPCR 法进行的抗炎作用测试结果证实，Cur@GL/HAMA-CS 具有促进巨噬细胞向抗炎表型分化的能力，ELISA 结果进一步在蛋白水平上验证了这一趋势，该复合材料可在转录与翻译水平协同驱动巨噬细胞从 M1 型向 M2 型极化，

有助于改善中枢神经损伤区域的炎症微环境。通过流式细胞术进行的胶质瘢痕相关表型调控作用测试表明，Cur@GL/HAMA-CS 可下调 GFAP 阳性细胞比例并提高 Tuj1 阳性细胞比例，提示其可能抑制星形胶质相关分化并促进神经元相关分化。采用免疫荧光法进行的对神经再生作用的测试则说明，Cur@GL/HAMA-CS 增强了染色 MAP2 与 Ki67 的荧光信号表达，具备促进神经元的增殖与成熟的性能。该体系通过天然高分子基质成分与姜黄素药物的按需释放，展现出较高的生物相容性，较强的抗炎作用，胶质瘢痕相关表型调控作用以及促进中枢神经再生的作用，通过基因与标记物的特异性检测完成材料的生物医学性能验证，证实了该复合释药体系在中枢神经再生修复中具备较高的生物相容性与有效的促进中枢神经再生作用，为神经医学提供了一种具备应用潜力的新材料。

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

第四章 总结与展望

4.1 总结

4.1.1 本课题创新性

目前，现有药物递送体系难以同时适应中枢神经损伤后酸化、氧化应激与炎症反应并存的复杂病理微环境[12,13]，在制备条件相对简便的前提下，如何将多重病理信号响应、药物储存与三维支架功能集成于同一体系，并进一步阐明材料结构与释药行为之间的关系，仍是值得深入探索的问题。基于此，本课题构建了Cur@GL/HAMA-CS 复合体系：以双响应改性壳聚糖和 HAMA 构成外部水凝胶网络，以姜黄素@明胶微球作为内部药物储库，从而将“病理信号感知—网络状态变化—姜黄素释放—三维支架支持”整合在同一材料体系中。

在分子设计方面，本课题在羧甲基壳聚糖分子链上分别引入 pH 敏感的亚胺键结构和 ROS 敏感的二硫键结构。在中性生理模拟条件、pH 或 ROS 单刺激条件下，该体系的姜黄素释放水平较低，在 pH 与 ROS 双刺激条件下，姜黄素释放量显著升高，显示出该体系可以根据病理微环境变化按需药物释放。

在体系结构方面，考虑到姜黄素水溶性较低，直接混入水凝胶前驱液可能出现分散不均和早期快速释放等问题，本课题采用先独立制备 Cur@GL 明胶微球，再与 HAMA-CS 前驱液原位共混的方式一体成型，无需微球表面修饰即可实现颗粒的均匀分散，明胶微球包裹姜黄素，实现药物平稳释放。由此，材料能够同时兼顾三维模仿细胞外基质支撑、双信号响应、长效药物储存三项功能，为中枢神经损伤微环境响应型材料提供了一种较为简便的构建策略。

在制备工艺方面，该体系可在常温常压下完成改性，无需高温、高压等严苛反应条件。其主体基材采用生物相容性良好的天然高分子透明质酸、羧甲基壳聚糖和明胶；经透析纯化可去除丙酮醛、戊二醛等小分子，因而具有进一步开展转化研究的潜力。

4.1.2 Cur@GL/HAMA-CS 干预中枢神经损伤修复的作用机制

复合释药材料植入损伤组织后，Cur@GL/HAMA-CS 通过三维孔洞状互通结构为神经细胞提供细胞黏附支架。其 1740 Pa 的低刚度力学环境与已报道的中枢神经修复水凝胶力学水平接近，具有一定的中枢神经组织力学适配能力，并可促进神经元性分化[14-16,29]。当所处环境同时出现酸性和高 ROS 信号时水凝胶内部亚胺键、二硫键发生断裂，释放包裹的姜黄素，释放后发挥抗氧化作用，有望降

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

低细胞内 ROS 积累并减轻脂质过氧化及氧化应激相关的神经元损伤；下调 *Nos2* 等 M1 促炎基因表达与促炎细胞因子分泌水平，促进抗炎相关基因表达并提升抗炎细胞因子分泌水平。打破氧化应激与炎症相互促进的恶性循环，弱化炎症信号对星形胶质细胞的持续刺激，降低 GFAP 蛋白表达，抑制致密胶质瘢痕生成，促进神经干细胞向神经元分化，上调 MAP2、Tuj1 及 Ki67 的表达，促进神经元的增殖与生长。Cur@GL/HAMA-CS 依靠双响应结构实现病灶定点按需给药，可改善部分炎症和氧化应激相关微环境，并影响神经干细胞分化方向，形成支架材料与靶向修复为一体的新型复合释药体系。

4.1.3 总结

本课题完成了 pH/ROS 双响应改性羧甲基壳聚糖、光交联 HAMA、姜黄素微球三类核心材料的标准化常温制备。通过 SEM 表征证实样品具有多孔结构，利用 ^{1}H NMR 与 FT-IR 测试证实了含亚胺键与二硫键的侧链以及光敏双键的成功接枝，流变测试证明材料储能模量具有一定软组织工程应用潜力，体外多环境释药实验验证体系具有 pH/ROS 相关双响应性，中性组织药物 24 h 后浓度仅 17.34±0.65μg/L，处于酸性环境或高水平 ROS 环境时，溶液中 24 h 药物浓度增加分别至 46.41±0.86 μg/L 及 44.55±2.53 μg/L，在弱酸性及低水平 ROS 条件下 24h 药物浓度达到 56.36±3.10 μg/L，较强酸性及高水平 ROS 微环境中 24 h 后药物浓度达到 70.17±1.14 μg/L，表现出 24 h 内病灶刺激依赖性释药。进一步的长效释药评价证实，体系在正常生理条件下 16 天内几乎无突释（累计约 48±1.1 μg/L），而在病理微环境中能够维持长达 16 天的平稳持续释放（最终约 89±2.2 μg/L），展现出契合神经损伤修复周期的长效按需给药能力。此外，材料表现出良好的生物相容性。LPS 诱导巨噬细胞模型表明载药微球可下调 M1 促炎基因与细胞因子，上调 M2 抗炎基因与细胞因子，从免疫源头缓解持续的炎症。巨噬细胞、神经干细胞共培养证明材料可有效抑制胶质瘢痕形成。此外，材料具有促进神经元相关表型及细胞增殖的潜力。本课题可为中枢神经损伤修复材料提供新的设计思路与体外实验依据。

4.2 展望

4.2.1 研究局限性

本课题虽然完成多层次的理化与细胞验证，但受到研究周期限制，仍存在几处客观短板，也是后续完善研究的核心方向：

（1）仅开展材料理化与体外细胞实验，尚未构建动物 TBI 或 SCI 模型，缺少动物组织病理学数据及运动功能恢复的行为学数据，体外细胞微环境与体内血

2026 S.T. Yau High School Science Award 仅用于2026丘成桐中学科学奖公示

液及多重免疫细胞共存的复杂生理环境存在差异，材料体内长期修复效果仍需动物实验佐证。

（2）本体系仅负载单一的姜黄素活性药物，未结合神经营养因子、活细胞等活性分子，修复功能仍有进一步提升空间。

（3）本课题仅评价了单一配方的力学性能，尚未设置不同刚度梯度的同组成水凝胶，因此目前尚不能明确区分力学因素与材料化学组成、姜黄素释放及抗炎作用对 GFAP/Tuj1 表型的相对贡献，后续可通过构建力学梯度体系进一步验证基质刚度对神经干细胞谱系分化的独立调控作用。

4.2.2 研究展望

该研究体系可进一步补充体内动物实验构建大鼠中枢神经损伤模型，原位植入 Cur@GL/HAMA-CS，在术后采集损伤脊髓组织，通过免疫荧光切片观测神经再生效果，同步展开运动功能评分量化动物肢体运动恢复水平，补充体内修复直接证据，同时完善体内安全性评价，采集心、肝、脾、肺、肾脏器作为病理切片，评估材料全身与局部慢性异物风险。对于材料工艺优化而言，水凝胶可进一步引入神经黏附多肽，进一步提升神经黏附效率，强化支架模仿细胞外基质特性。

本课题建立的亚胺键、二硫键动态共价修饰的光交联水凝胶-姜黄素微球复合体系，不局限于中枢神经损伤修复，皮肤慢性溃疡、类风湿关节炎、视网膜缺血损伤等疾病同样伴有局部低 pH、高水平 ROS 的病理特征，本材料修饰、药物递送、体外评价模型均具备迁移至上述疾病靶向给药支架的研发潜力，但仍需针对具体疾病验证。整套工艺原料价格合适，常温易操作，适合基础实验室开展生物材料创新研究，同时，全天然基材可降解水凝胶基质毒性低，免疫原性弱，具备良好临床转化的潜能，为低成本、多功能微环境响应材料提供长期可发掘的研究方向。

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

参考文献

[1] LI J, XU A, ZHAO Z, et al. The burden of traumatic brain injury, its causes, and future trend predictions in 204 countries and territories (1990-2021): results from the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. Neuroepidemiology, 2026, 60 (1): 1-15. DOI:10.1159/000547563.

[2] WANG S, CHEN S, FAN W, et al. Global inequalities in the burden of traumatic spinal cord injury from 1990 to 2021: findings from the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. Neuroepidemiology, 2025. Epub ahead of print. DOI:10.1159/000548481.

[3] BHATT M, SHARMA M, DAS B. The role of inflammatory cascade and reactive astrogliosis in glial scar formation post-spinal cord injury [J]. Cell and Molecular Neurobiology, 2024, 44 (1): 78. DOI:10.1007/s10571-024-01519-9.

[4] PATEL M, DENG A J, HASOON J, et al. A review of pathophysiology, molecular mechanisms, and omics approaches of spinal cord injury [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26 (16): 7895. DOI:10.3390/ijms26167895.

[5] WU Z, HAN T, DONG Y, et al. Acid-sensing ion channel-1 contributes to the failure of myelin sheath regeneration following spinal cord injury by transcellular delivery of PGE2 [J]. Cellular and Molecular Biology Letters, 2024, 29 (1): 149. DOI:10.1186/s11658-024-00672-9.

[6] YIN Z, WAN B, GONG G, et al. ROS: executioner of regulating cell death in spinal cord injury [J]. Frontiers in Immunology, 2024, 15: 1330678. DOI:10.3389/fimmu.2024.1330678.

[7] WEI F, YANG W, WANG H, et al. Reactive oxygen species-scavenging biomaterials for neural regenerative medicine [J]. Biomaterials Science, 2025, 13 (2): 343-363. DOI:10.1039/d4bm01221f.

[8] LUO J, HU W, GAO X, et al. Macrophage polarization-based biomaterials for repairing spinal cord injury [J]. ACS Materials Letters, 2024, 6 (12): 5438-5453. DOI:10.1021/acsmaterialslett.4c01701.

[9] LI Y, RITZEL R M, HE J, et al. The voltage-gated proton channel Hv1 plays a detrimental role in contusion spinal cord injury via extracellular acidosis-mediated neuroinflammation [J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2021, 91: 267-283. DOI:10.1016/j.bbi.2020.10.005.

[10] LIU Q, WANG W, YANG H, et al. Microenvironment-responsive injectable conductive hydrogel for spinal cord injury repair [J]. Advanced Functional Materials, 2024, 34 (46): 2406376. DOI:10.1002/adfm.202406376.

[11] SHARMA P K, TANEJA S, SINGH Y. Hydrazone-linkage-based self-healing and injectable xanthan-poly (ethylene glycol) hydrogels for controlled drug release and 3D cell culture [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10 (37): 30936-30945. DOI:10.1021/acsami.8b07310.

[12] LI Y, WANG Z, PEI S, et al. Bisphosphonate-based hydrogel with pH-responsive minocycline release inhibits microglia/macrophages of M1 polarization for spinal cord injury therapy [J]. ACS Materials Letters, 2024, 6 (2): 553-565.

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

DOI:10.1021/acsmaterialslett.3c01126.

[13]LI Z, ZHAO Q, ZHOU J, et al. A reactive oxygen species-responsive hydrogel loaded with Apelin-13 promotes the repair of spinal cord injury by regulating macrophage M1/M2 polarization and neuroinflammation [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2025, 23 (1): 12. DOI:10.1186/s12951-024-02978-4.

[14]YANG B, LIANG C, CHEN D, et al. A conductive supramolecular hydrogel creates ideal endogenous niches to promote spinal cord injury repair [J]. Bioactive Materials, 2022, 15: 103-119. DOI:10.1016/j.bioactmat.2021.11.032.

[15]BAEK J, LOPEZ P A, LEE S, et al. Egr1 is a 3D matrix-specific mediator of mechanosensitive stem cell lineage commitment [J]. Science Advances, 2022, 8 (15): eabm4646. DOI:10.1126/sciadv.abm4646.

[16]LIANG Y, LI S, LI Y, et al. Impact of hydrogel stiffness on the induced neural stem cells modulation [J]. Annals of Translational Medicine, 2021, 9 (24): 1784. DOI:10.21037/atm-21-6189.

[17]PREVITERA M L, HUI M, VERMA D, et al. The effects of substrate elastic modulus on neural precursor cell behavior [J]. Annals of Biomedical Engineering, 2013, 41 (6): 1193-1207. DOI:10.1007/s10439-013-0765-y.

[18]CHEN H, WANG W, YANG Y, et al. A sequential stimuli-responsive hydrogel promotes structural and functional recovery of severe spinal cord injury [J]. Biomaterials, 2025, 316: 122995. DOI:10.1016/j.biomaterials.2024.122995.

[19]BAI J, LIU G, GAO Y, et al. Co-culturing neural and bone mesenchymal stem cells in photosensitive hydrogel enhances spinal cord injury repair [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12: 1431420. DOI:10.3389/fbioe.2024.1431420.

[20]ZHANG R, ZOU C, JIANG L, et al. Repair of spinal cord injury using a time-specific four-dimensional multifunctional hydrogel with anti-inflammatory and neuronal differentiated microenvironments [J]. Biomaterials Science, 2025, 13 (15): 4153-4167. DOI:10.1039/d4bm01586j.

[21]TIBBITT M W, ANSETH K S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 103 (4): 655-663. DOI:10.1002/bit.22361.

[22]LI J, MOONEY D J. Designing hydrogels for controlled drug delivery [J]. Nature Reviews Materials, 2016, 1: 16071. DOI:10.1038/natrevmats.2016.71.

[23]CALIARI S R, BURDICK J A. A practical guide to hydrogels for cell culture [J]. Nature Methods, 2016, 13 (5): 405-414. DOI:10.1038/nmeth.3839.

[24]KHACHATRYAN K, MICHALSKI O, MICHALSKA K. Intelligent hydrocolloid-based delivery systems: innovations in pharmacy and cosmetics [J]. Molecules, 2026, 31 (14): 2468. DOI:10.3390/molecules31142468.

[25]NEUMANN O, SURANA H V, MELLY S, et al. Mechanical characteristics of spinal cord tissue by indentation [J]. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2025, 163: 106863. DOI:10.1016/j.jmbbm.2024.106863.

[26]WANG Z, LI D, WANG Y, et al. Hyaluronic acid methacryloyl hydrogel with sustained IL-10 release promotes macrophage M2 polarization and motor function after spinal cord injury [J]. Journal of Biomaterials Applications, 2025, 40 (1): 3-19.

2026 S.T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖公示

DOI:10.1177/08853282251329302.

[27]CHEN J, CHENG X, YU Z, et al. Sustained delivery of NT-3 and curcumin augments microenvironment modulation effects of decellularized spinal cord matrix hydrogel for spinal cord injury repair [J]. Regenerative Biomaterials, 2024, 11: rbae039. DOI:10.1093/rb/rbae039.

[28]ZHANG Z, MA H, TIAN R, et al. An injectable curcumin-loaded hydrogel for neuroprotective treatment promote nerve tissue repair in rat severe spinal cord injury [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2025, 13: 1655686. DOI:10.3389/fbioe.2025.1655686.

[29]LEIPZIG N D, SHOICHET M S. The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior [J]. Biomaterials, 2009, 30 (36): 6867-6878. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.09.002.

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

致谢

时光如箭，回望一路走来的课题研究之路，其中的艰辛与不易难以言表。

至此论文即将完成之际，我首先要特别感谢上海外国语大学附属外国语学校的李启翔老师。作为我在化学学习上的领路人，他凭借专业的知识与丰富的经验，在我确定课题研究方向及进行研究的过程中，无偿提供了诸多实用的建议与专业的指导。在他的引导下，我查阅了相关的研究文献，独立完成了本课题的背景调研、模型搭建、实验设计与实施、数据分析以及论文撰写等工作。

同时，我也要感谢上海外国语大学附属外国语学校的张一凡老师。作为学校负责科创的老师，在我进行课题研究期间，无偿提供各种校内外的资源与支持。在我需要进行化学及细胞学的实验时，他帮助我联系满足需求的实验室。由于实验整体过程繁杂冗长（其中仅 HAMA 的制备就需要耗费 72 小时以上），同时对药品的添加剂量、添加时间以及实验环境的要求也极高，他全程对此保持关注，并保障我能够随时进入实验室监控实验的进展，为课题研究的顺利完成奠定了坚实的基础。

我也非常感谢实验室中帮助过我的中国科学技术大学高等研究院袁伟老师和他课题组的师哥师姐们。在正式开始实验之前，他们向我讲解了实验室的基本规范、仪器使用要求以及安全注意事项。在一些具体实验操作过程中，他们也在旁边给予指导和陪同，帮助我及时发现操作中可能存在的问题。通过这段经历，我不仅完成了研究所需要的实验，也学到了很多以前在课堂上接触不到的实验方法和操作经验。

本次研究，从选题、实验方案的制定和执行，到最后的数据分析和论文写作，主要工作均是在李启翔老师和张一凡老师的无偿指导下由我独立完成。回顾整个过程，我印象最深的并不是某一次实验成功，而是在实验遇到问题以后不断检查和调整的过程。有些实验步骤耗时很长，一旦在药品剂量、添加时间或者实验条件上出现偏差，就可能影响后续结果。面对这些问题，我都需要推翻重来，重新核对实验记录，查阅相关文献，比较不同实验条件下的数据，再对下一次实验方案进行调整。这个过程有时很慢，也会让人产生挫败感，但也是在一次次修改和验证中，我开始理解科研并不是简单地按照既定步骤得到结果，而是需要不断发现问题、分析问题，再想办法解决问题。

最后，我要感谢我的家人、朋友以及所有支持我前行的人。你们的陪伴与理解是我在繁重的课题研究中最坚实的后盾。感谢你们在我遇到理论和实验瓶颈时的疏导与鼓励，让我能够全身心地投入到研究中，最终顺利完成这项课题。

2026 STEAM High School Science Award
仅用于2026年成都市科学奖公示

本论文的研究设计、实验实施、数据收集与分析、论文撰写及修改等工作，均由我本人在上文致谢中所提及的指导老师的指导下独立完成。在上述过程中，我未使用任何人工智能工具。特此声明。

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

论文修改说明

李浚哲

上海外国语大学附属外国语学校

修改处 1

修改内容：对论文 **1.4.1 核心科学思路与创新点**进行了修改，修改后如下（Page 4）：

结构层面：并通过 FT-IR 与^{1}H NMR 对 HAMA、CS 及复合水凝胶的化学结构与基团组成进行确证，明确光交联网络与双动态键修饰结构的形成。制备姜黄素@明胶微球。将微球均匀分散在 HAMA-CS 光交联网络中，构建三维模仿细胞外基质多孔结构，解决药物突释的问题。

修改说明：补充 FT-IR 与^{1}H NMR 对 HAMA、CS 及复合水凝胶的结构确证，明确光交联网络与双动态键修饰结构的形成；并调整语序，使“结构确证—微球制备—三维网络构建”逻辑更连贯，与 2.3.6 结构表征内容相呼应。

修改处 2

修改内容：对论文 **1.4.3 研究内容**进行了修改，修改后如下（Page 5）：

理化性能表征: SEM 观测各组微观孔隙与微球分布状态; 并结合 FT-IR 与^{1}H NMR 对改性羧甲基壳聚糖、HAMA 及 Cur@GL/HAMA-CS 复合水凝胶的化学结构与基团组成进行确证，明确 pH/ROS 双动态键修饰结构及光交联网络的形成; 旋转流变仪测试交联前后力学性能特征; 紫外分光光度计建立姜黄素吸光度标准曲线，并展开五组微环境双响应释药实验，筛选综合性能较优的配比。

修改说明：补充 FT-IR 与^{1}H NMR 对改性羧甲基壳聚糖、HAMA 及复合水凝胶的结构确证，明确双动态键修饰结构及光交联网络的形成；并调整其位置至 SEM 之后、流变测试之前，使“微观形貌—化学结构—宏观力学—释药性能”的表征链条更清晰，与 2.3.6 结构表征相呼应。

修改处 3

修改内容：对论文 **2.1 引言**进行了修改，修改后如下（Page 8）：

基于第一章梳理的现有材料响应单一、力学失衡、药物突释、制备门槛高等缺陷，本章通过天然高分子搭建的双动态共价键修饰体系，分别合成具有亚胺键

2026 Tiyu High School Science Award
仅用于2026年体育高中学科学术论文设计

和二硫键修饰的羧甲基壳聚糖、可见光交联甲基丙烯酸化透明质酸（HAMA）及姜黄素@明胶微球（Cur@GL），通过微球梯度填充制备光交联水凝胶-姜黄素微球复合释药体系。并采用 FT-IR 与^{1}H NMR 对改性羧甲基壳聚糖、HAMA 及 Cur@GL/HAMA-CS 复合水凝胶的化学结构与基团组成进行确证，明确亚胺键、二硫键及光交联网络的形成。借助扫描电子显微镜观测材料的微观多孔拓扑结构与微球分散均匀性，利用旋转流变仪原位监测光交联固化全过程，并比较不同填充度下储能模量和损耗模量的变化，通过 pH 响应及 ROS 响应模拟不同病理状态，完成 24 h 以及长期 16 天的持续释药检测。从微观结构、宏观力学、分子响应释药三个维度完成全套理化性能定性及定量表征，对比现有文献同类材料性能差异，筛选兼顾孔隙连通、神经组织匹配力学、双响应靶向缓释的较优梯度微球配比及水凝胶浓度配比，为第三章多角度的体外生物学评价提供标准统一的材料。同时完整建立天然高分子双响应载药支架的理化筛选标准化实验流程。

修改说明：补充 FT-IR 与^{1}H NMR 对改性羧甲基壳聚糖、HAMA 及复合水凝胶的结构确证，明确亚胺键、二硫键及光交联网络的形成，使“合成—结构确证—理化表征”逻辑更完整，并与 2.3.6 结构表征相衔接；同时将释药检测补充为“24 h 以及长期 16 天”，兼顾短期释放与长期缓释评价。

修改处 4

修改内容：对论文 **2.2.2 实验仪器与设备**进行了修改，修改后如下（Page 9）：

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	生产厂商	仪器型号
离心机	Eppendorf	Centrifuge 5452R
电子分析天平	梅特勒-托利多	ML204L
冷冻干燥机	Christ	ALPHAI-4/LD Plus
磁力搅拌机	越众仪器	ZNCL-90-1B
扫描电子显微镜	日立 HITACHI	S-4800
旋转流变仪	Malvern	Kinexus pro+
紫外分光光度计	日立 HITACHI	u-3900H
傅里叶变换红外光谱仪	Thermo Fisher	Nicolet 6700
核磁共振波谱仪	Varian	Varian Mercury Plus 400

修改说明：增加了傅里叶变换红外光谱仪和核磁共振波谱仪测试，增加了其生产厂商和仪器型号。

2026 Siyau High School Science Award
仅用于2026年成都中学科学论文公示

修改处 5

修改内容：对论文 **2.3.1 羧甲基壳聚糖的改性**进行了修改，修改后如下 (Page 9)：

称取 1.0 g 羧甲基壳聚糖粉末加入 50 mL 2%（v/v）冰醋酸溶液。将混合物于室温下持续搅拌 4 h，直至形成完全透明且无颗粒的均匀溶液。在避光条件下，向上述溶液中加入 10 mL 丙酮醛。于室温下持续搅拌反应 5 h。向上述溶液中加入 0.75 g 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）和 0.85 g N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）。混合物先搅拌 30 min，随后加入 0.6 g 胱胺二盐酸盐，于室温下继续搅拌 8 h。将反应后的混合溶液透析 48 h，每隔 6 h 更换一次去离子水。将纯化后的羧甲基壳聚糖溶液进行冷冻干燥，-20℃保存。将改性后的羧甲基壳聚糖溶液命名为 CS。

修改说明：增加了将改性后的羧甲基壳聚糖溶液命名为 CS。增加了对改性产物的命名定义。明确了“CS”的具体指代对象，使全文的化学缩写定义更加清晰、规范，方便读者和评审专家在后文中准确对应和理解材料的表征结果，提升了论文的逻辑严谨性。

修改处 6

修改内容：增加了论文 **2.3.6 HAMA 和 CS 的结构表征**，修改后如下（Page 11）：

首先，利用核磁共振波谱仪（^{1}H NMR）以重水（D_2O）为溶剂，对羧甲基壳聚糖、CS、HA 以及 HAMA 的化学结构进行进一步确证。另外，采用傅里叶变换红外光谱仪（FT-IR）对羧甲基壳聚糖、CS、HA、HAMA 和合成的复合水凝胶的化学基团进行分析，扫描范围设为 500-4000 cm^{-1}。

修改说明：在第二章实验方法中新增了化学结构表征的具体实验步骤。使实验设计更加完整，确保论文中关于化学改性成功（亚胺键、二硫键及光敏双键的引入）的结论具有严谨、可复现的方法学支撑。

修改处 7

修改内容：修改了论文 **2.3.8 Cur@GL/HAMA-CS 的姜黄素释放性能测试**，修改后如下（Page 11）：

称取适量姜黄素粉末，分别配制浓度为 5、10、20、40、80 μg/L 的溶液，于 425 nm 波长下使用紫外分光光度计测定吸光度，线性拟合得到姜黄素标准浓度-吸光度曲线。随后，分别配制 pH 7.4+PBS、pH 5.0+PBS、pH 7.4+100 μM H_2O_2、pH 5.0+100 μM H_2O_2、pH 6.5+10 μM H_2O_2 缓冲液，将等质量的

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

Cur@GL/HAMA-CS 浸泡到上述溶液中，经过 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 以及第 2、4、6、8 和 16 天定时取样（每次取样后补充等体积的新鲜缓冲液以保持释放体系总体积恒定）。将取出的样品加入比色皿中，并将比色皿置于紫外分光光度计中，进行吸光度测试，与标准浓度-吸光度曲线比照，计算得到姜黄素在缓冲液中的浓度，以确定其短期及长期的释放效果。

修改说明：补充了长期释药实验的具体操作步骤。修改后，将释药监测周期延长至 16 天，并明确增加了“每次取样后补充等体积的新鲜缓冲液以保持释放体系总体积恒定”的操作说明。这一修改不仅使实验方法更加严谨、可重复，也为新增的 16 天长期释放曲线（图 2.8）提供了详实的方法学支撑，以证明该体系具有优异的防突释特性和长效按需给药潜力。

修改处 8

修改内容：增加了论文 **2.4.2 HAMA 和 CS 的结构表征结果**，修改后如下（Page 12-14）：

为了验证材料的成功合成与化学改性，进一步对各组样品进行了 ^{1}H NMR 测试分析。为了验证羧甲基壳聚糖分子链上 pH/ROS 双响应结构（亚胺键与二硫键）的成功引入，结果如图 2.3 A 所示，在 ^{1}H NMR 图谱中，对比了原料羧甲基壳聚糖与 CS 的核磁图谱。通过对比可以发现，改性后的 CS 图谱在化学位移 1.0~3.5 ppm 的高场区域出现了众多显著增强的新特征峰，这些峰的出现为化学改性提供了直接的证据。首先，化学位移在 1.3~1.5 ppm 以及 2.1~2.3 ppm 附近出现的新尖锐峰，归属于丙酮醛片段上甲基的质子共振信号。其次，胱胺分子中两个亚甲基（-CH_2-CH_2-S-S-）的质子信号通常出现在 2.7~3.0 ppm 之间。在 CS 图谱中，红线在该区域出现了一组强烈且密集的共振峰，证实了含有二硫键的胱胺侧链被成功偶联。为后续水凝胶在病理微环境中实现 pH（亚胺键水解）与 ROS（二硫键断裂）的双响应按需释药奠定了坚实的化学基础。为了验证透明质酸的光交联改性是否成功，结果如图 2.3 B 所示，对比黑色曲线（HA）和蓝色曲线（HAMA）可以发现，在 3.0-4.5 ppm 区域出现相同的密集的多重峰，这是 HA 糖环骨架上的特征质子峰（包括各个碳上的-CH-以及-CH_2 -质子）。黑线和蓝线在这个区域的轮廓高度一致，说明接枝反应主要发生在羟基/羧基上，而没有破坏糖环骨架。除此之外，在 4.4 ppm 处从双峰变为单峰（且轻微位移），是由于大体积甲基丙烯酰基的引入改变了糖环构象、破坏了内部氢键，并带来了吸电子诱导效应所致。这是多糖衍生物核磁图谱中非常常见且合理的现象，进一步印证了接枝反应的成功。证明了甲基丙烯酸酐已成功与 HA 分子链上的羟基发生酯化

2026 CSTAM Undergraduate School Science Award 仅用于2026年成都科学奖论文公示

反应，双键被成功引入到高分子骨架上，成功合成了具备光交联活性的 HAMA。

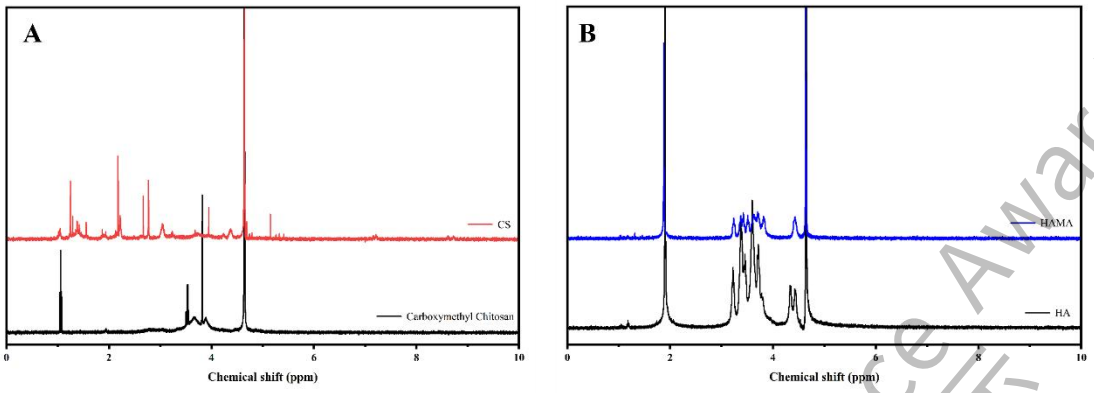


图 2.3 A）羧甲基壳聚糖和 CS 的 ^{1}H NMR 图谱，B）HA 和 HAMA 的 ^{1}H NMR 图谱

为了进一步确认各组分化学结构的演变以及复合水凝胶网络的成功构建，对各原料及终产物进行了 FT-IR 表征，结果如图 2.4 所示。首先，对比羧甲基壳聚糖（黑线）与改性后的羧甲基壳聚糖（CS，蓝线）可以观察到明显的结构变化。CS 在~1600 cm^{-1} 附近（图中蓝色阴影区域）出现了明显的吸收峰增强，这主要归属于新生成的亚胺键（C=N）伸缩振动，同时该区域也包含了后续 EDC/NHS 活化胱胺后形成的酰胺键（−CO−NH−）特征峰，以及壳聚糖本身的氨基（−C−N/N−H）振动。此外，蓝线在 1708 cm^{-1} 附近的吸收峰形也发生改变，综合证实了丙酮醛和胱胺已成功对羧甲基壳聚糖进行了双步修饰。其次，在透明质酸（HA，紫线）与甲基丙烯酸化透明质酸（HAMA，绿线）的对比中，改性效果十分显著。绿线在~1708 cm^{-1}（红色阴影区域）出现了一个尖锐且强烈的吸收峰，这归属于甲基丙烯酸酐与 HA 羟基反应生成的酯键羰基（−CO−O−）伸缩振动。同时，绿线在~1600 cm^{-1} 处出现了对应于甲基丙烯酰基中双键（−C=C−）的伸缩振动峰。这两个新峰的出现确凿地证明了光敏基团被成功接枝到了 HA 骨架上。最后，观察复合水凝胶（HAMA-CS gel，红线）的光谱，该曲线完美地体现了两种改性高分子的特征叠加。红线不仅保留了 3000~3500 cm^{-1} 处多糖骨架宽泛的−OH 和−NH 伸缩振动，而且在~1708 cm^{-1} 处保留了明显的−CO−O−酯键特征峰，在~1600 cm^{-1} 处同样保留了强烈的−C=C−及−CO−NH−等特征吸收带。红外结果证实，改性后的羧甲基壳聚糖与 HAMA 成功复合，且双响应动态化学键（亚胺键、二硫键）及光交联双键均稳定存在于最终的复合水凝胶体系中。

修改说明：补充了核磁共振氢谱（^{1}H NMR）和傅里叶变换红外光谱（FT-IR）的结果分析与讨论，并新增了图 2.3 与图 2.4。本次修改通过 ^{1}H NMR 图谱中特征质子峰（如丙酮醛片段甲基峰、胱胺亚甲基峰、甲基丙烯酰基烯烃质子峰等）的出现，以及 FT-IR 图谱中特征官能团（如亚胺键 C=N、酯键羰基、双键 C=C 等）

2026 Sichuan University School Science Award 仅用于2026年度四川大学科学奖公示

吸收峰的增强与叠加，从分子结构层面确凿地证实了 pH/ROS 双响应侧链（亚胺键、二硫键）的成功引入、光敏基团的成功接枝以及复合水凝胶网络的成功构建。这一补充使论文关于材料成功合成的结论更加严谨、具有说服力，为后续的响应性释药和生物学评价奠定了坚实的化学基础。

修改处 9

修改内容：修改了论文 **2.4.4 Cur@GL/HAMA-CS 的姜黄素释放性能**，修改后如下（Page 15-17）：

为了进一步考察复合体系在中枢神经损伤漫长修复周期内的药物递送潜力，本课题将释药监测周期延长至 16 天。长期释放曲线（图 2.8）显示，在 pH 7.4 的普通 PBS 环境中，体系表现出明显的“防突释”特性，16 天后的累计释放浓度仅为约 48±1.1μg/L；而在模拟病理微环境（pH 5.0 + 100 μM H_2O_2）下，体系在早期 24 h 内快速响应后，在随后的 16 天内依然保持着平稳且持续的释放趋势，最终浓度达到约 89±2.2 μg/L；弱酸性及低水平 ROS 条件（pH 6.5 + 10 μM H_2O_2）下的释放量则介于两者之间。这表明 Cur@GL/HAMA-CS 不仅能在损伤急性期对病理信号做出快速响应，还能在后续长达半个月的修复期内作为药物持续发挥作用，实现了长效的按需给药。

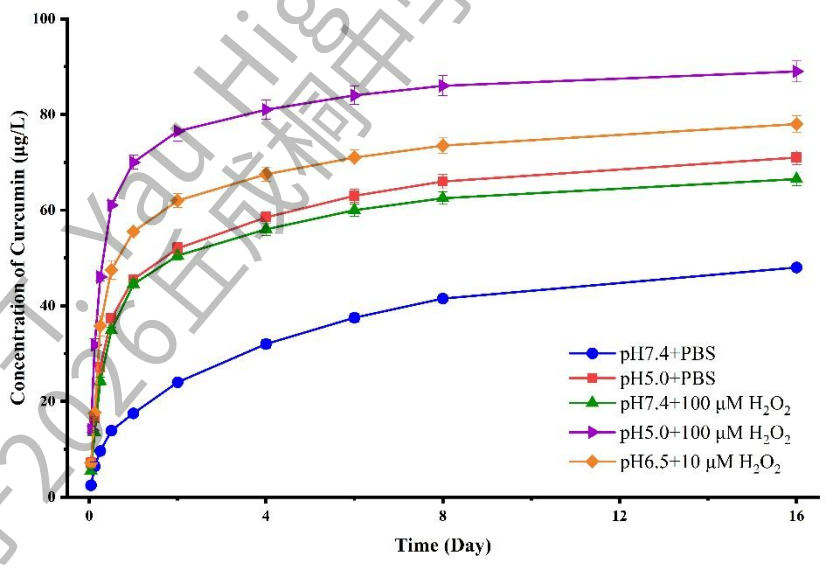


图 2.8 姜黄素在不同环境下的长时间-释放浓度曲线

修改说明：补充了 16 天长效释药的结果分析与讨论，并新增了长时间-释放浓度曲线（图 2.8）。原稿仅分析了 24 小时内的短期释放数据，虽然能证明双响应特

2026 S.T. Yau High School Science Award
仅用于2026丘成桐中学科学奖公示

性，但无法体现材料在中枢神经损伤漫长修复周期中的持续治疗潜力。本次修改增加了 16 天的长期释放监测结果，数据显示该体系在正常生理条件（pH 7.4）下表现出优异的“防突释”特性（累计释放仅约 48±1.1 μg/L），而在模拟病理微环境（pH 5.0 + 100 μM H_2O_2）中，在早期快速响应后仍能保持长达 16 天的平稳持续释放（最终约 89±2.2 μg/L）。这一修改完善了药物递送动力学的评价维度，有力地证明了该复合体系兼具急性期快速响应与长效缓释的能力，高度契合神经损伤修复的实际临床需求。

修改处 10

修改内容：修改了论文 **2.5 本章小结**，修改后如下（Page 17）：

本章首先通过丙酮醛与羧甲基壳聚糖分子链上部分氨基发生反应，并进一步通过 EDC/NHS 活化体系与胱胺二盐酸盐进行偶联，对羧甲基壳聚糖进行分步化学改性。利用 ^{1}H NMR 与 FT-IR 测试证实了含亚胺键与二硫键的侧链以及光敏双键的成功接枝，从分子层面确证了改性材料的成功合成。将改性羧甲基壳聚糖与 HAMA 混合，并加入 Cur@GL 微球，经光交联制得 Cur@GL/HAMA-CS。在进行了 Cur@GL/HAMA-CS 的微观结构表征，流变学测试及 pH/ROS 响应性释药性能测试后，SEM 结果显示 Cur@GL/HAMA-CS 在冻干状态下具有连续的三维多孔结构，并可观察到微球分布。流变学测试表明，Cur@GL/HAMA-CS 固化后储能模量约为 1740 Pa，属于较低刚度水凝胶范围，与已报道的部分中枢神经修复水凝胶力学水平接近，具有一定的神经组织力学适配潜力，可为神经细胞提供力学支撑[14]。pH/ROS 响应性释药测试中，中性组织药物 24 h 后浓度仅 17.34±0.65μg/L，处于酸性环境或高水平 ROS 环境时，溶液中 24 h 药物浓度增加分别至 46.41±0.86 μg/L 及 44.55±2.53 μg/L，在弱酸性及低水平 ROS 条件下 24h 药物浓度达到 56.36±3.10 μg/L，较强酸性及高水平 ROS 微环境中 24 h 后药物浓度达到 70.17±1.14 μg/L，说明 Cur@GL/HAMA-CS 具备良好的 pH/ROS 双响应能力。进一步将释药监测周期延长至 16 天的长期释放实验表明，该体系在正常生理环境下 16 天后累计释放浓度仅为约 48±1.1 μg/L，展现出优异的“防突释”特性；而在模拟病理微环境中，早期快速响应后依然能保持 16 天平稳持续的释放（最终达约 89±2.2 μg/L）。在双重刺激的微环境下表现出较好的姜黄素响应性释放效果。该体系依托高分子常温修饰工艺，具有制备简便性及 pH/ROS 信号同步响应能力，从微观结构，力学，分子响应机制三个角度完成材料的理化性能验证，为后续细胞功能评价筛选出较优性能的材料配方。

2026 S. Tyan High School Science Award 仅用于2026年成都中学科学奖论文公示

修改说明：对本章小结进行了补充完善，以呼应正文中新增的实验内容与数据。首先，补充了“利用 ^{1}H NMR 与 FT-IR 测试证实了含亚胺键与二硫键的侧链以及光敏双键的成功接枝，从分子层面确证了改性材料的成功合成”，使小结部分完整涵盖了新增的化学结构表征结果；其次，补充了 16 天长周期释放实验的结论（正常生理环境“防突释”与病理环境“平稳持续释放”），使小结内容与 2.4.4 节新增的长期释放数据保持一致；最后，将理化性能验证的总结词由原先修改为“分子响应机制”，以更准确地概括本章新增的分子结构表征工作，使本章小结逻辑更加严密、内容更加全面。

修改处 11

修改内容：修改了论文 **4.1.3 总结**，修改后如下（Page 31）：

本课题完成了 pH/ROS 双响应改性羧甲基壳聚糖、光交联 HAMA、姜黄素微球三类核心材料的标准化常温制备。通过 SEM 表征证实样品具有多孔结构，利用 ^{1}H NMR 与 FT-IR 测试证实了含亚胺键与二硫键的侧链以及光敏双键的成功接枝，流变测试证明材料储能模量具有一定软组织工程应用潜力，体外多环境释药实验验证体系具有 pH/ROS 相关双响应性，中性组织药物 24 h 后浓度仅 17.34±0.65μg/L，处于酸性环境或高水平 ROS 环境时，溶液中 24 h 药物浓度增加分别至 46.41±0.86 μg/L 及 44.55±2.53 μg/L，在弱酸性及低水平 ROS 条件下 24h 药物浓度达到 56.36±3.10 μg/L，较强酸性及高水平 ROS 微环境中 24 h 后药物浓度达到 70.17±1.14 μg/L，表现出 24 h 内病灶刺激依赖性释药。进一步的长效释药评价证实，体系在正常生理条件下 16 天内几乎无突释（累计约 48±1.1 μg/L），而在病理微环境中能够维持长达 16 天的平稳持续释放（最终约 89±2.2 μg/L），展现出契合神经损伤修复周期的长效按需给药能力。此外，材料表现出良好的生物相容性。LPS 诱导巨噬细胞模型表明载药微球可下调 M1 促炎基因与细胞因子，上调 M2 抗炎基因与细胞因子，从免疫源头缓解持续的炎症。巨噬细胞、神经干细胞共培养证明材料可有效抑制胶质瘢痕形成。此外，材料具有促进神经元相关表型及细胞增殖的潜力。本课题可为中枢神经损伤修复材料提供新的设计思路与体外实验依据。

修改说明：对全文总结部分进行了补充与完善，以涵盖新增的实验内容与核心结论。首先，在制备与表征部分补充了“利用 ^{1}H NMR 与 FT-IR 测试证实了含亚胺键与二硫键的侧链以及光敏双键的成功接枝”，将分子层面的化学结构确证纳入总结，使材料合成的论证链条更加完整；其次，补充了 16 天长效释药评价的核

2026 Sichuan High School Science Award 仅用于2026四川省中学生科学奖公示

心结论（正常生理条件防突释、病理条件长效平稳释放），明确提出了“神经损伤修复周期的长效按需给药能力”，突出了本课题材料在长效治疗方面的优势与创新性，使全文总结更加全面、准确地反映本研究的完整工作与核心价值。

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