

· 研究论文 ·

硫辛酸增强的双网络丝素蛋白水凝胶敷料的制备及性能研究

方路航 梁晓扬 申子怡 许晨 李杨* 徐福建*

(北京化工大学 化学资源工程国家重点实验室 天然高分子基医用材料教育部重点实验室(北京化工大学)
生物医用材料北京市实验室 北京 100029)

摘要 单一网络的丝素蛋白水凝胶缺少力学强度及其他生物活性. 本工作通过光聚合制备甲基丙烯酸酯改性的丝素蛋白(SFMA)水凝胶, 再与硫辛酸(LA)、精氨酸(Arg)共混一步浸泡法热聚合制备双网络复合水凝胶(SFLA). 首先通过扫描电子显微镜、流变学等方法对不同浓度 SFMA 的微观结构和力学性能进行表征, 随后通过成胶筛选出 LA 和 Arg 的适宜浓度, 从而制备出 SFLA 水凝胶并通过紫外测定水凝胶的药物释放情况, 最后对水凝胶的生物安全性、抗氧化性和抗菌能力进行测定. 结果表明在丝素蛋白单网络水凝胶中引入 LA 交联的次级网络可以增强水凝胶的力学强度和黏附性能, 同时通过 LA 和 Arg 的协同作用赋予了水凝胶优异的抗氧化及抗菌能力.

关键词 丝素蛋白; 硫辛酸; 精氨酸; 抗菌

引用: 方路航, 梁晓扬, 申子怡, 许晨, 李杨, 徐福建. 硫辛酸增强的双网络丝素蛋白水凝胶敷料的制备及性能研究. 高分子学报, doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2026.25311.

Citation: Fang, L. H.; Liang, X. Y.; Shen, Z. Y.; Xu, C.; Li, Y.; Xu, F. J. Preparation and performance study of lipoic acid-enhanced double-network silk fibroin hydrogel dressing. *Acta Polymerica Sinica* (in Chinese), doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2026.25311.

丝素蛋白水凝胶因其优异的生物相容性与生物活性, 已成为生物医学、组织工程及再生医学领域的研究热点^[1-5]. 然而, 丝素蛋白水凝胶的实际应用与临床转化仍面临诸多不可忽视的瓶颈. 力学性能不足是其核心缺陷之一, 单一丝素蛋白水凝胶的强度与弹性模量难以匹配人体组织(如皮肤、肌肉、骨组织)的力学需求^[6].

硫辛酸(LA)是一种天然辅酶因子^[7-10], 具有优异的抗氧化性能和抗菌性能^[11-13]. 硫辛酸中二硫键还可以打开交联形成聚硫辛酸(PolyLA)网络, 这使其非常适合于治疗放射性皮肤损伤和伤口感染^[14,15]. 然而, 尽管 LA 具备优异的生物活性^[16-18], 但其较强的疏水性导致其难以在水中溶解并释放, 阻碍了其生物活性的充分发挥^[19]. 同

时, PolyLA 中的二硫键易引发闭环脱聚反应使其稳定性较差^[20]. 目前虽可通过引入多重双键单体或多价金属离子的方式提升 PolyLA 的稳定性, 但这类方法会显著降低材料的生物相容性^[20-22]. Arg 作为天然碱性氨基酸分子, 其碱性特征可促使 LA 在水溶液中发生部分去质子化反应, 使 LA 转化为 LA 盐, 这一过程不仅显著提升了 LA 的溶解度, 还增强了其分子的释放潜力. Arg 还具有一定的抗菌、抗炎和促血管功能, 有助于加速伤口愈合^[23,24]. 此外, LA 中未解离的羧基可与 LA 盐的羧酸根和 Arg 分子中的胍基形成强氢键, 提升了 PolyLA 的稳定性^[25-29].

在本工作中, 我们设计并制备了一种 LA 增强的双网络丝素蛋白水凝胶敷料(如图 1 所示). 通过

高分子优秀青年学者专题; 2025-12-22 收稿, 2026-02-09 录用,

网络出版.

基金项目: 国家自然科学基金(基金号 52221006, 52522316 和 52273115).

* 通信联系人, E-mail: ly@mail.buct.edu.cn; xufj@mail.buct.edu.cn

doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2026.25311; CSTR: 32057.14.GFZXB.2026.7556

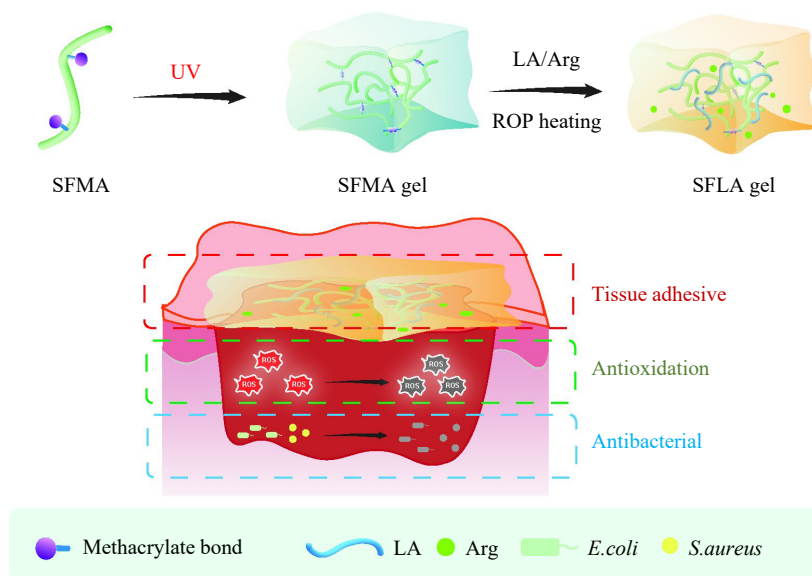


Fig. 1 Schematic illustration of SFLA synthesis. The as-synthesized SFLA shows favorable tissue adhesion, excellent antioxidant activity, and efficient antibacterial activity.

光聚合制备甲基丙烯酰化改性的丝素蛋白(SFMA)水凝胶, 再与硫辛酸(LA)、精氨酸(Arg)简单地一步共混浸泡法热聚合制备出兼具良好稳定性与生物活性的SFLA水凝胶. 硫辛酸网络的引入极大地增强了SFMA的力学性能, 由于未引入任何外源性非天然分子, 也有效规避了传统方法对生物相容性的负面影响. 通过添加Arg使得LA发生部分去质子化提升了后者的溶解度, 并通过形成强氢键提升了次级网络的稳定性, 同时Arg和LA的引入也赋予了SFLA水凝胶优异的抗氧化性能和抗菌性能, 拓展了单一丝素蛋白水凝胶的使用范围.

1 实验部分

1.1 主要原料

无水碳酸钠购自北京化工厂; 溴化锂、硫辛酸(LA)购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 氘水和精氨酸(Arg)购自安耐吉安徽泽升科技有限公司; 胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)、酵母浸粉、胰蛋白酶购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 乙二醇和水合茚三酮购自安耐吉安徽泽升科技有限公司; 曲拉通 X-100 (Triton X-100)、磷酸盐缓冲液(PBS)、羟自由基清除能力检测试剂盒、ABTS 自由基清除能力检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; Calcein/PI 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; L929 小鼠成纤维细胞购自上海 ACTT 细胞库.

1.2 实验方法

1.2.1 SFMA 的水凝胶制备

配置 2 L (0.02 mol/L) 碳酸钠溶液, 煮沸后加入 10 g 剪碎的桑蚕茧, 煮丝 30 min, 每间隔 10 min 搅拌一次, 过程重复 3 次. 取脱胶后的蚕丝 1 g 溶解于 10 mL (9.3 mol/L) 的溴化锂溶液, 在水浴锅中 60 °C 搅拌 4 h 后, 向其中滴加 0.6 mL 甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)溶液后继续反应 3 h. 将得到的溶液装入透析袋(MWCO 3500 Da)中透析 3 天, 离心除杂后将上清液冻干得到甲基丙烯酰化丝素蛋白(SFMA), 产物避光保存于 4 °C 冰箱.

分别称取不同质量(80、100、150 mg) SFMA, 溶解于 1 mL 去离子水中, 振荡溶解后加入光引发剂 I₁₁₇₃ (添加量为 0.5 mg/mL), 混合均匀后倒入模具中, 在紫外光(365 nm)下光照 20 min 成胶. 分别命名为 SFMA8、SFMA10 和 SFMA15.

1.2.2 SFMA 水凝胶核磁氢谱

采用核磁共振氢谱(¹H-NMR)对水凝胶的化学结构进行表征, 使用德国 Bruker 公司的 ARX400 核磁共振波谱仪. 用氘水分别溶解 10 mg 的丝素蛋白(SF)和 SFMA 在离心管中, 均匀溶解后, 使用核磁共振波谱仪进行测试, 记录化学位移 $\delta=0\sim 10$ 的氢谱信号, 通过分析特征峰的位置与强度, 确认水凝胶的化学结构与官能团信息.

1.2.3 SFLA 双网络水凝胶的合成

SFLA 的制备: 称量 1 g 的 LA 和 500 mg 的 Arg 一起溶解于 10 mL 去离子水中, 在水浴锅中

加热到LA完全溶解,溶解后迅速倒出,并将制备好的SFMA 15完全浸没在LA/Arg混合溶液中,30 min后取出水凝胶,在鼓风干燥箱中80 °C加热2 h,取出后在室温下风干12 h.

1.2.4 水凝胶有机元素分析

将SFMA和SFLA水凝胶冷冻干燥至恒重并研磨成粒径 $<100\ \mu\text{m}$ 的粉末,精准称取1.0~1.5 mg样品(精度0.0001 mg),分别用锡箔杯(C、H、N)或银箔杯(S)包裹,以空箔杯为空白对照,采用乙酰苯胺、苯磺酸为标准物质校准元素分析仪(燃烧炉950 °C、还原炉500 °C)后,将样品在氧气氛围中高温燃烧,产物经还原炉转化为 CO_2 、 H_2O 、 N_2 、 SO_2 ,混合气体经色谱柱分离后通过热导检测器定量检测各元素含量,每个样品平行测试3次,取平均值($\text{RSD}\leq 0.3\%$)用于后续LA负载量计算.

1.3 性能表征

1.3.1 不同浓度SFMA水凝胶的性能表征

制备不同浓度SFMA水凝胶80、100、150 mg/mL,通过SEM微观形貌观察筛选水凝胶不同固含量对于物理性能的影响.将达到溶胀平衡的水凝胶冻干后液氮脆断,截面置于导电胶上,在真空离子溅射仪中镀金后,所有样品均使用日本电子株式会社JSM-7500F型号扫描电子显微镜在电压5 kV下成像.

1.3.2 水凝胶的流变性能表征

使用美国TA公司DHR-1旋转流变仪对水凝胶进行频率扫描测试.使用20 mm的模板制备水凝胶使尺寸刚好匹配平行板夹具,调整夹具高度,测试间距以水凝胶厚度为准,温度25 °C,恒定应变1%,频率范围1~100 rad/s,记录SFMA水凝胶的储能模量(G')和损耗模量(G'')的变化.保持恒温25 °C,将100 g砝码轻轻压放在1 mL的水凝胶上面5 min后,对水凝胶的外部形貌进行观察表征.

1.3.3 水凝胶的拉伸性能测试

使用模具制备尺寸为20 mm × 5 mm × 2 mm的SFMA水凝胶样条,后续浸泡制备SFLA水凝胶样条.将制备好的样条粘在PU片上,间距为10 mm.使用日本岛津公司的EZ-LX万能力学试验机,拉伸速率为5 mm/min.断裂伸长率为断裂行程除以间距,最大拉伸强度为最大载荷除以具体的截面积.

1.3.4 水凝胶的黏附性能测试

将猪皮切成20 mm × 100 mm的样条,用70%的异丙醇擦拭表面的脂肪层,再用手术刀切去一端的脂肪层直到露出真皮层,面积大约为20 mm × 20 mm.将制备好的水凝胶(18 mm × 18 mm)夹在2片猪皮处理好的区域,用500 g的砝码按压2 h后再进行拉伸测试.

1.3.5 药物释放曲线测定

LA负载量测定.浸泡工艺难以准确估量LA的负载量,因此通过有机元素分析测定浸泡前后硫元素的变化来计算负载量.将SFMA和SFLA水凝胶冻干,在研钵中研磨成粉末,测试前将粉末在烘箱中彻底烘干,避免水分的干扰.称取1.8~2.0 mg的样品分别放置在开口锡纸中,随后加入称量样品的1.5~3倍标准品,包好后烧样测试.

LA和Arg标准曲线的测定.精确称量LA粉末,配置成50~500 mg/mL的梯度溶液,使用酶标仪测量330 nm波长下的吸光度,绘制标准曲线,通过线性回归计算出LA浓度与吸光度的方程式.使用茚三酮法检测Arg的含量.首先配置乙酸-乙酸钠缓冲溶液,将100 g三水合乙酸钠溶解在300 mL去离子水中,再加入5 mL冰醋酸,在500 mL容量瓶中定容后使用.用乙二醇制备3%的茚三酮-乙二醇溶液,精准称量Arg粉末配置成0~300 $\mu\text{g/mL}$ 的梯度溶液,取2 mL Arg溶液加入5 mL乙酸-乙酸钠缓冲溶液,再加入5 mL茚三酮-乙二醇溶液,混合均匀后在沸水浴中加热,从显色开始计时20 min,取出后冷却至室温.以Arg含量为0的标准液为基准,使用酶标仪读取566 nm波长处的吸光度,绘制标准曲线.

LA和Arg的释放曲线.将200 mg的SFLA水凝胶浸泡在5 mL磷酸盐缓冲液(PBS)溶液中,在37 °C摇床中以100 r/min振荡孵育,在预定时间内取出一定量样品溶液,并补充相同体积PBS,保证溶液总体积不变.LA可以直接读取吸光度,Arg要按照测定标准曲线的方法配置检测溶液后再读取吸光度,通过标准曲线方程计算每个时间段内的释放量,累计后为释放总量.

1.3.6 体外抗氧化性

OH·自由基清除实验:使用试剂盒进行检测,按照说明书上的步骤配置检测液后加入水凝胶进行检测,37 °C下孵育1 h后离心取上清液,测定536 nm处的吸光度.

ABTS 自由基清除实验: 使用试剂盒进行检测, 按照说明书操作, 将水凝胶加入检测液后在 37 °C 下孵育 30 min 后在室温继续反应, 4 h 后离心吸取上清液用酶标仪读取波长 405 nm 处的吸光度. 清除率按公式(1)计算:

$$\text{自由基清除率}(\%) = \frac{\text{OD}_0 - \text{OD}_s}{\text{OD}_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中, OD_0 是空白对照组的吸光度, OD_s 是水凝胶组的吸光度.

1.3.7 体外抗菌实验

通过使用革兰氏阴性大肠杆菌(*E. coli*)和革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)检验水凝胶的抗菌性能. 通过设立不同浓度的水凝胶进行抗菌测试.

1.3.8 生物相容性测试

通过设立空白组、SFMA 组、SFLA 组、纯水组, 进行体外细胞活性测试. 细胞实验选用小鼠成纤维细胞(L929)进行测试. 首先将制备好的水凝胶在紫外下灭菌 24 h, 再将其浸泡于配置好的 DMEM 细胞培养基(含 1% 双抗、10% 牛血清蛋白)中浸提 24 h, 将浸提液用细胞培养基分别稀释至 0.25、0.5、1.2 mg/mL. 为防止染菌, 使用浸提液前用滤膜进行过滤. 将提前培养好的细胞用胰酶消化后离心计数, 以每孔 100 μL , $1 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板中, 孔板在孵箱(37 °C, 5% CO_2)中培养 24 h, 使细胞贴壁生长. 24 h 后吸走培养基, 分别加入不同浓度的水凝胶浸提液以及无菌超纯水和细胞培养基分别作为全死阴性组和全活阳性组进行对照, 将换液后的孔板置于孵箱中继续培养 24 h. 以 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法评估水凝胶细胞毒性, 用细胞培养基配置 10% 的 CCK-8 溶液, 使用配置好的 CCK-8 溶液替换孔板中的液体, 避光条件下在孵箱中反应 4 h. 使用美国 Bio-Rad 公司的 Cytation 3 酶标仪在 450 nm 波长处测量吸光度, 细胞活性计算如式(2)所示. 细胞活死荧光染色使用浓度为 2 mg/mL 的浸提液作为材料组, 在 6 孔板中进行细胞培养, 每孔加入 500 μL 细胞悬浮液(细胞密度为 $1 \times 10^4/\text{mL}$). 细胞培养过程同细胞活性实验一致, 吸走孔板中的培养液, 用 PBS 溶液洗涤一遍后每孔加入 1 mL 配置好的 Calcein AM/PI 检测液(绿色荧光为钙黄绿素 AM, $E_x = 495 \text{ nm}/E_m = 517 \text{ nm}$; 红色荧光为碘化丙啶 PI, $E_x = 535 \text{ nm}/E_m = 617 \text{ nm}$), 37 °C 避光

孵育 30 min, 在荧光显微镜(德国 Leica DMI3000B)下进行拍照, 按照公式(2)计算细胞活性.

$$\text{细胞活性}(\%) = \frac{\text{OD}_H - \text{OD}_n}{\text{OD}_p - \text{OD}_n} \times 100\% \quad (2)$$

式中, OD_H 、 OD_p 、 OD_n 分别为水凝胶组、阳性对照组和阴性对照组的吸光度.

2 结果与讨论

2.1 SFMA 水凝胶的表征

在中性和碱性条件下, 甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)溶液主要和 SF 上的氨基(赖氨酸为主)发生开环反应, 从而在聚合物分子上接枝双键. 如图 2 所示, 通过核磁氢谱分析, 在甲基丙烯酸酯乙烯基上氢原子的峰位置 $\delta = 5.50 \sim 6.30$ (紫色区域内)出现新的质子峰, 证明在 SF 上成功接枝双键. $\delta = 6.65 \sim 7.50$ 代表酪氨酸苯环上质子峰(4H), 用于标准化, $\delta = 2.82 \sim 2.99$ 代表赖氨酸的质子峰.

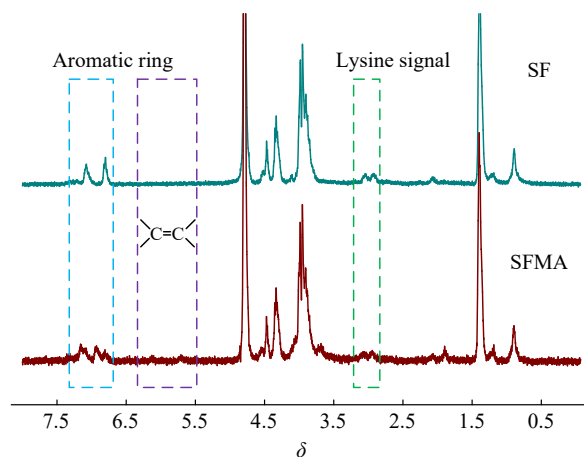


Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectra of SF and SFMA.

通过扫描电子显微镜(SEM)对不同固含量的 SFMA 水凝胶进行观察. 将水凝胶样品切割为均匀小块, 经去离子水充分浸泡去除未反应单体与杂质后, 通过冷冻干燥获得干燥的多孔凝胶样品; 为观察内部孔结构, 将干燥样品置于液氮中进行脆断处理, 随后将样品断面朝上固定于样品台, 经离子溅射仪喷金提高导电性后, 采用扫描电子显微镜在高真空模式下观察其微观形貌, 并对孔径、孔隙结构等进行表征与分析, 观察水凝胶固含量改变对孔径大小的影响, 结果如图 3(a)所示. SFMA 水凝胶整体呈现均匀的蜂窝状孔洞结构, 且随着 SFMA 固含量的提高, 水凝胶交联密度增加, 其孔径随之逐渐缩小.

图3(b)的孔径统计结果进一步验证了这一规律：SFMA8的孔径波动大，主要集中在100~175 μm ，SFMA10的孔径同样波动较大，主要集中在50~

150 μm ，SFMA15的孔径较集中，主要分布在50~75 μm ，表明SFMA水凝胶的固含量与孔径呈负相关关系。

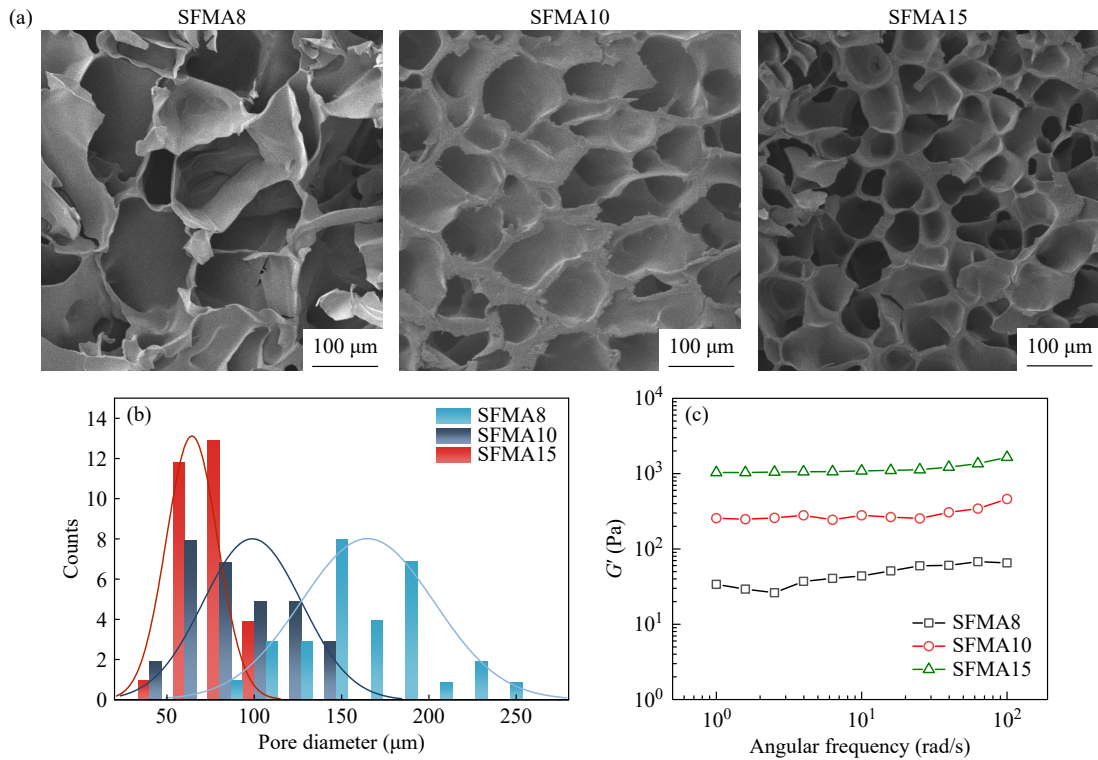


Fig. 3 Investigation of SFMA hydrogels: (a) SEM images of the hydrogels; (b) pore size statistics; (c) frequency sweep curves ($n=3$).

采用流变仪对不同固含量水凝胶的模量进行测试，结果如图3(c)所示：模量随频率变化，SFMA 8的模量稳定在67 Pa附近，SFMA 10的模量稳定在460 Pa附近，SFMA 15的模量稳定在1649 Pa附近。结合SEM表征与流变测试数据可证实：SFMA水凝胶的固含量与其力学性能呈正相关关系：随着固含量提高，水凝胶交联密度增大，三维网络结构的平均孔径减小，力学性能显著提升。综合以上结果，最终选择固含量15%的SFMA水凝胶作为配方基底。

2.2 SFMA水凝胶的制备与表征

为制备双层网络结构，本研究探索了LA与Arg的溶解比例及成胶状态，结果如图4(a)所示。实验中，将不同浓度比例的Arg与LA混合溶解。基于Arg的天然碱性，其氨基可对LA的羧基产生去质子化效应，使水溶液中 $-\text{COO}^-$ 离子基团增多，从而提升LA的水溶性。从溶解效果来看，Arg与LA比例为3:8和4:8时，仅部分LA羧基发生去质子化，溶液出现浑浊；而比例为5:8和6:8时，

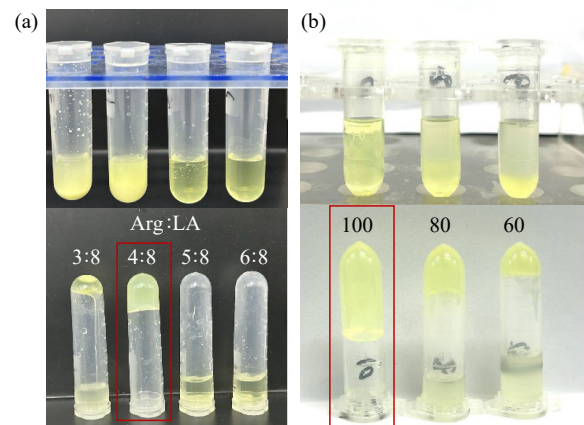


Fig. 4 (a) Comparison of gel-forming ability at different Arg:LA ratios. A uniform and intact hydrogel was formed at the ratio of 4:8; (b) Exploration of the minimum gelation solid content, stable hydrogel formed at 100 mg/mL.

LA实现完全溶解，溶液呈澄清状态。将上述混合溶液加热成胶后倒置观察，发现Arg与LA比例为4:8时可形成完整均一的淡黄色水凝胶；比例为3:8时仅部分形成水凝胶，且凝胶强度不均一。推

测该现象的原因是: Arg用量较少时, LA溶解不充分, 不足以支撑形成完整的水凝胶网络结构.

对溶液浓度与成胶能力的关系进一步测试如图4(b), 结果显示: 当溶液浓度低于100 mg/mL时, 无法形成稳定的水凝胶. 基于此选择100 mg/mL作为使用浓度.

依据上述结果, 进行成胶. 如图5所示, 首先使用150 mg/mL的SFMA在紫外光(365 nm)下光照20 min, 以保证双键完全反应. 将SFMA水凝胶完全浸没在100 mg/mL的LA混合溶液中30 min, 水凝胶由澄清透明变为淡黄色, 证明了LA的浸润. 再将水凝胶放入烘箱80 °C下加热2 h, 使LA开环自聚, 最终得到均一的淡黄色SFLA水凝胶敷料.

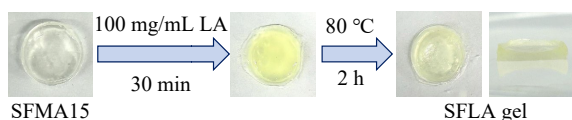


Fig. 5 Preparation process of SFLA hydrogels.

通过有机元素分析测定SFLA中负载的LA含量, 如表1所示; 通过SFMA与SFLA中S元素含量的差值计算LA负载量. SFLA水凝胶中LA的负载量为367.5 mg/mL.

Table 1 List of hydrogel elemental analysis.

Sample	ω_N (%)	ω_C (%)	ω_H (%)	ω_S (%)
SFLA	14.82	45.95	6.44	4.83
SFMA	17.53	47.74	6.45	0.04

2.3 水凝胶的溶胀性能

水凝胶在使用环境中会发生吸水膨胀, 从而降低使用性能. 因此水凝胶应当尽可能确保较低的溶胀率. 对水凝胶溶胀率进行测定, 结果如图6所示, 单一组分的SFMA水凝胶在PBS溶液中浸泡24 h后, 溶胀率高达300%, 而SFLA水凝胶的溶胀仅在200%左右, 这表明LA网络的引入能够限制丝素蛋白水凝胶网络结构, 同时这可能与LA的疏水性也有一定的关系.

2.4 水凝胶的力学性能

对于关节、四肢等需频繁活动的身体部位, 伤口敷料需具备较强的杨氏模量, 从而一方面确保紧密贴合创面, 另一方面能随皮肤伸展或收缩同步形变, 避免产生额外机械应力损伤创面. 如图7所示, 万能拉力机测试结果显示与单网络水凝

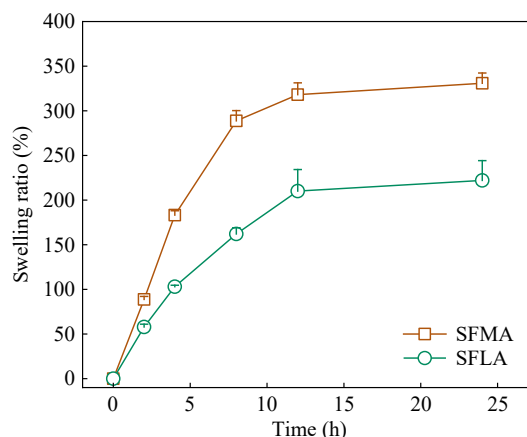


Fig. 6 Swelling ratio curves of hydrogels ($n=3$).

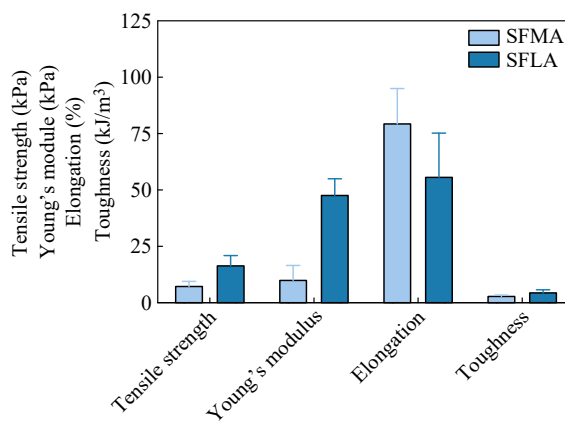


Fig. 7 Mechanical tests of hydrogels ($n=3$).

胶相比, SFLA水凝胶的杨氏模量与拉伸强度均实现显著提升. SFMA的拉伸强度约为7.18 kPa, 杨氏模量约为9.88 kPa; SFLA拉伸强度约为16.31 kPa, 杨氏模量约为47.56 kPa, 增幅超过一倍, 且断裂伸长率与韧性维持在良好水平. 这一性能优势源于双网络赋予的更高内聚能: 当水凝胶受外力作用时, 相互缠结的大分子链可通过链间滑移与能量耗散有效抵抗形变, 同时在循环拉伸过程中保持优异的弹性恢复能力. 这种“高强度-高弹性”协同的力学特征, 完美契合了动态环境下伤口敷料对耐用性与顺应性的双重要求.

此外, 对水凝胶的压缩力学性能也进行了测定. 如图8所示, SFMA水凝胶经砝码压缩后, 形态发生明显改变, 且部分区域出现不可恢复的塑性形变, 表明其结构在受力过程中已超出弹性极限, 耐压缩性能较弱; 相比之下, SFLA水凝胶在相同压缩条件下, 仍能基本恢复原始形状, 展现出显著提升的弹性恢复能力.

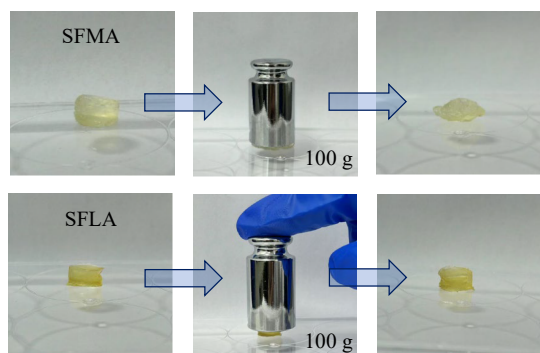


Fig. 8 Macroscopic compression performance tests of hydrogels ($n=3$).

采用猪皮作为模拟组织，对水凝胶的拉断应力进行测试，结果如图9(a)所示。其中，SFMA水凝胶的黏附性能较弱，未能检测出有效拉断应力数值；而SFLA水凝胶的拉断应力可达4.4 kPa，黏附性能显著提升。进一步对代表性拉伸曲线进行分析，可以发现SFLA在黏附过程中同样展现出良好的韧性(图9(b))。这一性能差异的核心原因在于SFLA水凝胶中LA的引入：LA的加入增加了水凝胶中黏附基团的含量，其分子表面的羧基可与猪皮组织表面的羟基、醛基形成氢键作用，从而大幅增强了水凝胶与组织界面的黏附力。

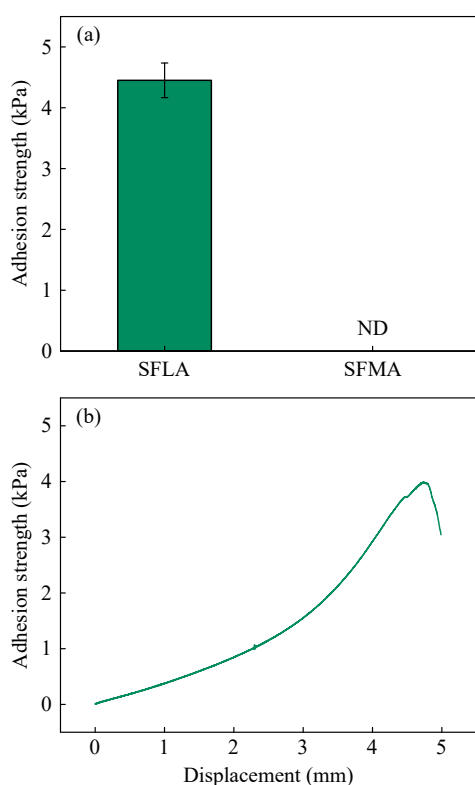


Fig. 9 (a) Hydrogel adhesion strength; (b) Lap shear curve ($n=3$).

2.5 水凝胶的药物释放

LA通过与Arg复合，其分子中的 $-COOH$ 可发生去质子化反应生成 $-COO^-$ ，该过程能显著提升LA在水溶液中的溶解性。为探究LA与Arg在水凝胶中的释放特性，首先通过实验测定LA与Arg的标准标定曲线如图10(a)和10(b)所示；随后基于此曲线，结合水凝胶样品中Arg与LA对应特征波长的吸光度数据，计算得到二者的释放曲线如图10(c)和10(d)所示。结果显示，LA与Arg在水凝胶中呈现持续释放趋势，且在释放9 h后达到释放平衡状态，表明该水凝胶可实现二者的长效、稳定释放。

2.6 体外抗氧化性

LA中的二硫键使其具备优异的还原性，从而赋予了SFLA一定的抗氧化性。羟基自由基清除实验如图11(a)和11(b)所示，可见SFMA水凝胶体系仍保持明显橙红色，而SFLA水凝胶体系仅呈淡黄色，二者吸光度存在显著差异。定量结果显示，SFLA水凝胶对羟基自由基的清除率约达70%，抗氧化活性突出。在ABTS自由基清除实验中，SFMA水凝胶体系呈浅绿色(图11(c))，SFLA水凝胶体系近乎无色(图11(d))，数据表明SFLA的ABTS自由基清除能力较SFMA提升近一倍。上述结果证实，硫辛酸网络和精氨酸药物的引入极大地增强了丝素蛋白水凝胶网络的抗氧化和自由基清除能力。

2.7 体外抗菌性能

皮肤伤口受损后，表皮保护屏障缺失，极易引发细菌感染，因此高效的抗菌功能是保障伤口正常愈合的关键。为验证针对PolyLA的抗菌特性，分别以大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)为测试菌株，在Luria-Bertani (LB)液体培养基中进行24 h共培养实验。如图12所示，当PolyLA浓度为100 mg/mL时，对2种致病菌的抗菌率均达到90%以上，证实其对常见创面感染菌具有优异的抑制效果，可满足伤口愈合过程中的抗菌需求。

通过菌液共培养结合琼脂铺板实验，对水凝胶的杀菌性能进行可视化验证，结果如图13所示。实验中，将与水凝胶共培养后的菌液进行琼脂铺板培养，观察到材料组对应的琼脂板上无细菌菌落生长，表明其杀菌率可达100%。该共培养-铺板实验结果直接证实，所制备的水凝胶对目标细菌

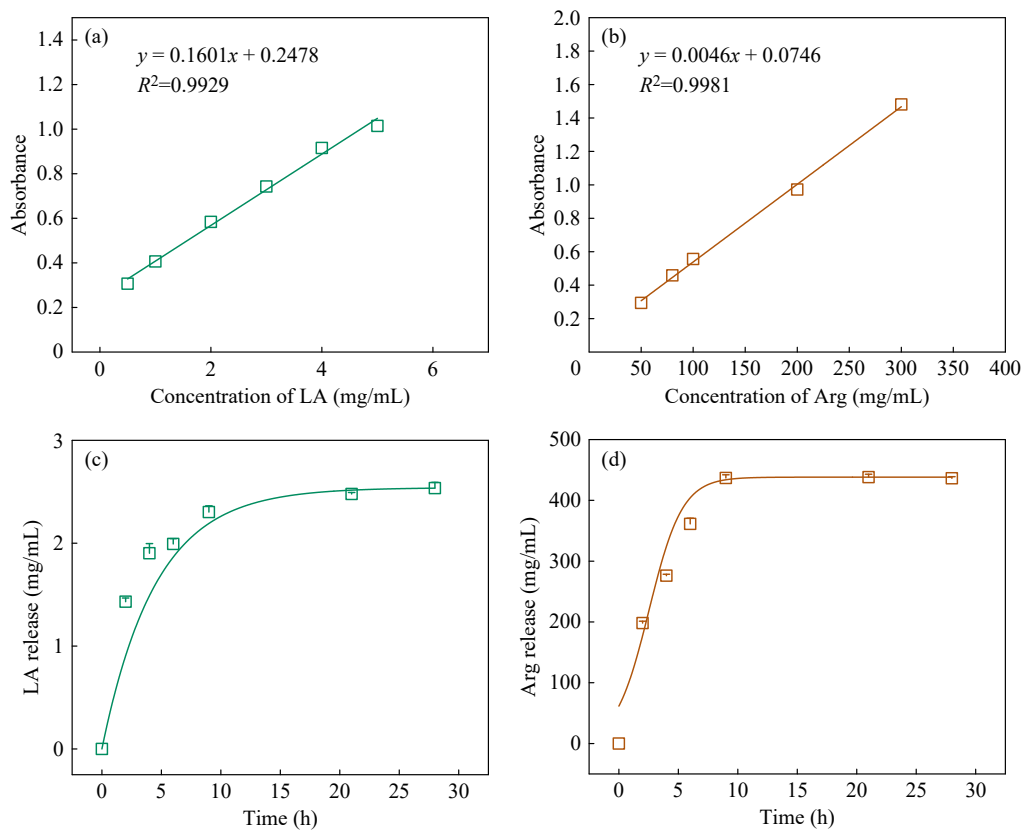


Fig. 10 (a) Calibration curve of LA; (b) Calibration curve of Arg; (c) Drug release curve of LA; (d) Drug release curve of Arg. ($n=3$).

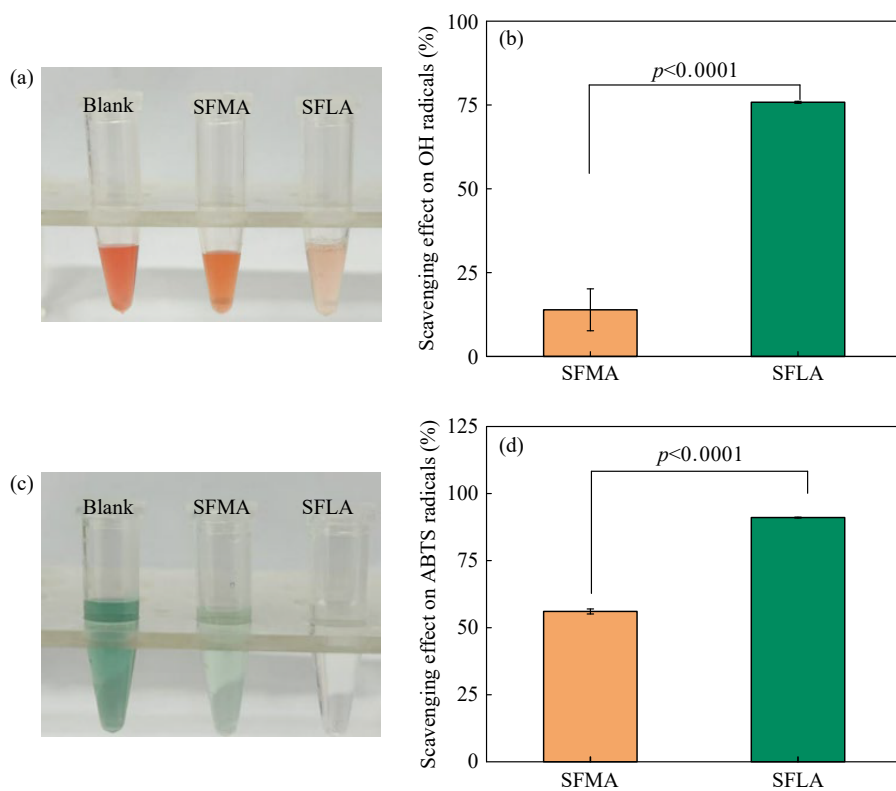


Fig. 11 (a) Diagram showing the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) scavenging effect of the hydrogel; (b) Scavenging efficiency ($n=3$); (c) Diagram showing the ABTS radical scavenging effect of the hydrogel; (d) Scavenging efficiency ($n=3$).

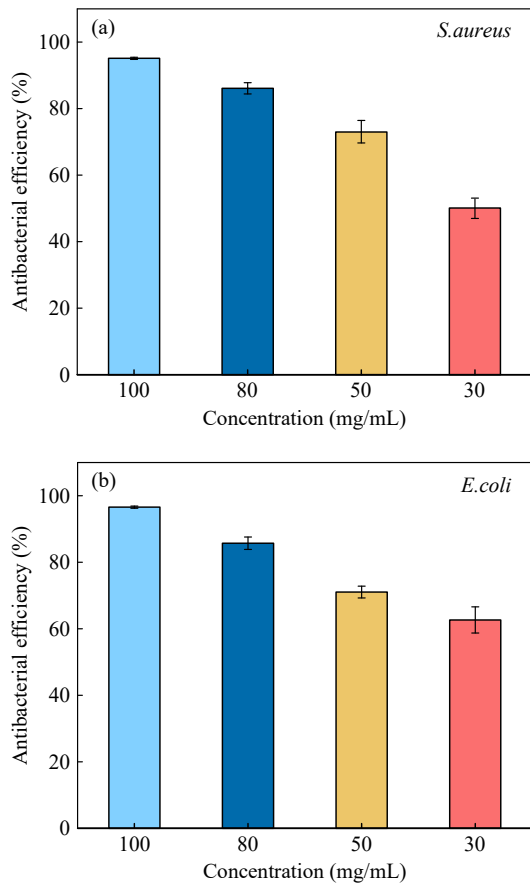


Fig. 12 Minimal inhibitory concentration of hydrogels. (a) The minimum inhibitory concentration in *S. aureus*; (b) The minimum inhibitory concentration of hydrogel in *E. coli* ($n=3$).

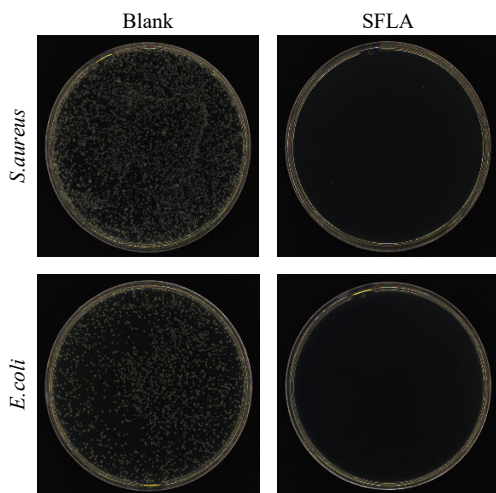


Fig. 13 Colony growth of *S. aureus* and *E. coli* ($n=3$).

具有高效的杀菌能力，可有效抑制细菌增殖。

为进一步探究抗菌机制，通过扫描电子显微镜(SEM)观察共培养后细菌的形态变化，结果如图14所示。*E. coli*呈杆状，*S. aureus*呈球状。空白对照组细菌经共培养后仍保持完整的固有形态，

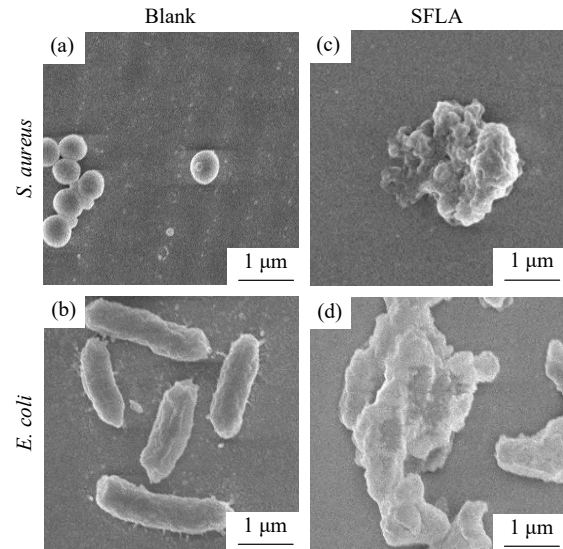


Fig. 14 SEM images of (a) *S. aureus* and (b) *E. coli* samples from the control group; SEM images of (c) *S. aureus* and (d) *E. coli* samples from the SFLA group.

细胞膜完整且边界清晰；而经水凝胶处理后，细菌形态发生显著褶皱与塌陷，细胞膜结构完整性被破坏。这一现象直接证实，水凝胶中的活性成分可通过破坏细菌细胞膜导致其死亡。结果表明其抗菌机制可能源于双重协同作用，一方面，PolyLA释放的LA小分子能破坏细菌细胞膜并提高其通透性；另一方面，Arg分子中的胍基可通过静电作用与带负电的细菌细胞膜结合，进一步破坏膜结构。2种作用方式协同起效，最终使水凝胶展现出极佳的抗菌性能。

2.8 生物安全性能验证

针对SFLA水凝胶材料的生物安全性展开探讨，通过细胞毒性实验与细胞形态观察进行综合评估。细胞毒性测试中，将L929小鼠成纤维细胞与不同水凝胶材料共培养，结果如图15所示。

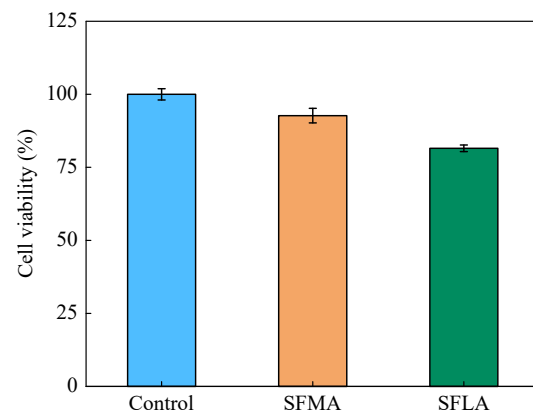


Fig. 15 Cytotoxicity of hydrogels ($n=3$).

SFMA 水凝胶组的细胞活性下降幅度不足 20%，表明其对细胞活性的影响极小；SFLA 水凝胶组的细胞活性则进一步验证了安全性。在 48 孔板中与细胞共培养 24 h 后，通过荧光显微镜观察细胞形态与生长繁殖情况如图 16 所示，可见 SFLA 水凝胶组的细胞形态正常、繁殖状态良好，与空白对照组无显著差异。上述实验结果表明，SFLA 水凝胶不会对细胞活性、形态及增殖产生不良影响，其生物安全性得到有效保障，为后续创面修复应用奠定了基础。

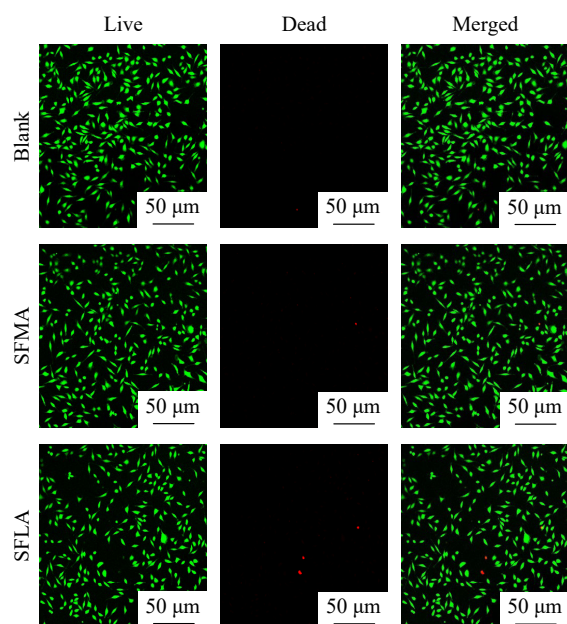


Fig. 16 Cell Live/Dead staining pictures of hydrogels.

3 结论

丝素蛋白作为天然高分子材料，是构建水凝胶敷料的理想基体，在慢性伤口修复领域具有良好应用潜力，然而其力学性能和生物活性的不足限制了其使用。本工作中 LA 网络的引入可弥补单一丝素蛋白网络水凝胶的不足，同时 Arg 的加入在解决 LA 溶解性不足的同时，可与 LA 协同作用赋予材料抗菌抗氧化等生物学功能。具体地，本工作首先通过力学强度筛选出最佳的 SFMA 的使用浓度，并通过对成胶可行性筛选出 LA 和 Arg 的最佳添加范围，进而通过一步法制备出 SFLA 水凝胶。随后，对单一网络的 SFMA 水凝胶和 LA 增强的 SFLA 水凝胶的力学强度、黏附强度、清除自由基能力和抗菌性能的对比，表明 LA 次级网络的引入可以极大地增强丝素蛋白水凝胶的力学强度，抗压缩性能以及黏附强度，满足其在动态复杂环境中的使用。同时，LA 与 Arg 的引入使得 SFLA 相较于 SFMA 的抗氧化性能和抗菌性能得到极大的提升。最后，该水凝胶的所有组分均源自天然成分，不仅赋予材料优异的生物安全性，还使其具备显著的抗氧化与抗菌活性，可有效清除羟基自由基和 ABTS 自由基，同时对 *E. coli* 和 *S. aureus* 展现出良好的杀灭效果。综上，本研究通过引入硫辛酸次级网络，显著增强并丰富了丝素蛋白水凝胶的综合性能，为天然基丝素蛋白水凝胶的功能化开发提供了参考与借鉴。

REFERENCES

- 1 Qian, K. Y.; Song, Y. H.; Yan, X.; Dong, L.; Xue, J. Z.; Xu, Y. J.; Wang, B.; Cao, B. Q.; Hou, Q. B.; Peng, W.; Hu, J. L.; Jiang, K.; Chen, S.; Wang, H. Q.; Lu, Y. Injectable ferrimagnetic silk fibroin hydrogel for magnetic hyperthermia ablation of deep tumor. *Biomaterials*, **2020**, 259, 120299.
- 2 Yao, Q.; Lan, Q. H.; Jiang, X. Y.; Du, C. C.; Zhai, Y. Y.; Shen, X. H.; Xu, H. L.; Xiao, J.; Kou, L. F.; Zhao, Y. Z. Bioinspired biliverdin/silk fibroin hydrogel for antiglioma photothermal therapy and wound healing. *Theranostics*, **2020**, 10(25), 11719–11736.
- 3 Liu, Q.; Luo, J. Y.; Wang, H.; Cui, S. Q. Bioactive silk fibroin hydrogel harnesses BMSCs-EVs to modulate inflammatory microenvironment in intervertebral disc degeneration. *J. Extracell. Vesicles*, **2025**, 14(9), e70159.
- 4 Fan, L. P.; Cai, Z. X.; Zhao, J.; Mahmoudi, N.; Wang, Y.; Cheeseman, S.; Aguilar, L. C.; Reis, R. L.; Kundu, S. C.; Kaplan, D. L.; Li, J. L. Gelation dynamics, formation mechanism, functionalization, and 3D bioprinting of silk fibroin hydrogel materials for biomedical applications. *ACS Nano*, **2025**, 19(19), 17979–18002.
- 5 Chen, Z. Y.; Cheng, J. L.; Wang, M.; Jiang, Y.; Jiang, D. B.; Yang, Y. F.; Bai, Y. J.; Wang, L. S.; Ma, C. L.; Ye, J.; Wang, H. L.; Liu, Y. L. *In situ* forming silk fibroin hydrogel dressing accelerates acute wound healing via immunomodulation and extracellular matrix regeneration. *J. Control. Rel.*, **2025**, 387, 114228.

- 6 Kim, S. H.; Hong, H.; Ajiteru, O.; Sultan, M. T.; Lee, Y. J.; Lee, J. S.; Lee, O. J.; Lee, H.; Park, H. S.; Choi, K. Y.; Lee, J. S.; Ju, H. W.; Hong, I. S.; Park, C. H. 3D bioprinted silk fibroin hydrogels for tissue engineering. *Nat. Protoc.*, **2021**, 16(12), 5484–5532.
- 7 Tu, Y. S.; Zheng, W. X.; Ding, Z. C.; Xiang, J.; Yang, Q. F.; Liu, Y. C.; Cao, J.; Shen, Y. L.; Tang, Z. N.; Lin, S.; Fan, L.; Xu, Y. W.; Chen, B. Exosome-loaded tannic acid-thioctic acid hydrogel enhances wound healing in coagulation disorders. *Mater. Today Bio.*, **2025**, 31, 101496.
- 8 Chen, J. Y.; Qiao, L. P.; Cheng, D. Y.; Yang, Y. T.; Li, M.; Zhao, X.; Guo, B. L. Poly(thioctic acid)-based supramolecular hydrogels with UV-triggered on-demand H₂S release for burn wound healing. *J. Control. Rel.*, **2025**, 385, 113983.
- 9 Lin, J. S.; Cui, X.; Liu, Z. H.; Jiang, Y. D.; Huang, L. H. A four-in-one multifunctional self-assembly hydrogel composed of natural drugs for repairing myocardial infarction. *Chem. Eng. J.*, **2024**, 491, 151996.
- 10 Cui, C. Y.; Sun, Y. G.; Nie, X. F.; Yang, X. X.; Wang, F. S.; Liu, W. G. A coenzyme-based deep eutectic supramolecular polymer bioadhesive. *Adv. Funct. Mater.*, **2023**, 33(49), 2307543.
- 11 Shen, F.; Zhong, H. Q.; Ge, W. J.; Ren, J. L.; Wang, X. H. Quercetin/chitosan-graft-alpha lipoic acid micelles: a versatile antioxidant water dispersion with high stability. *Carbohydr. Polym.*, **2020**, 234, 115927.
- 12 Zhu, Y. F.; Xiao, Y.; Dou, S. X.; Chou, S. L. Dynamic structural evolution and controllable redox potential for abnormal high-voltage sodium layered oxide cathodes. *Cell Rep. Phys. Sci.*, **2021**, 2(11), 100631.
- 13 Chai, C. X.; Zhang, P. F.; Ma, L.; Fan, Q.; Liu, Z. C.; Cheng, X.; Zhao, Y. P.; Li, W. W.; Hao, J. C. Regenerative antibacterial hydrogels from medicinal molecule for diabetic wound repair. *Bioact. Mater.*, **2023**, 25, 541–554.
- 14 Zhang, Z. Q.; Tong, P. D.; Wang, L.; Qiu, Z. H.; Li, J. A.; Li, H.; Guan, S. K.; Lin, C. G.; Wang, H. Y. One-step fabrication of self-healing poly(thioctic acid) coatings on ZE21B Mg alloys for enhancing corrosion resistance, anti-bacterial/oxidation, hemocompatibility and promoting re-endothelialization. *Chem. Eng. J.*, **2023**, 451, 139096.
- 15 Xie, J. N.; Zhao, M. R.; Wang, C. Y.; Zhu, S.; Niu, W. C.; Yong, Y.; Zhao, L. N.; Gu, Z. J. External use of nano-graphdiyne hydrogel for skin radioprotection *via* both physically shielding of low-energy X-ray and chemically scavenging of broad-spectrum free radicals. *Chem. Eng. J.*, **2022**, 430, 132866.
- 16 Lu, C. Y.; Qiu, J. H.; Sun, M. X.; Liu, Q. F.; Sakai, E.; Zhang, G. H. Simple preparation of carboxymethyl cellulose-based ionic conductive hydrogels for highly sensitive, stable and durable sensors. *Cellulose*, **2021**, 28(7), 4253–4265.
- 17 Wang, Y. J.; Sun, S. T.; Wu, P. Y. Adaptive ionogel paint from room-temperature autonomous polymerization of α -thioctic acid for stretchable and healable electronics. *Adv. Funct. Mater.*, **2021**, 31(24), 2101494.
- 18 Pal, S.; Salzman, E. E.; Ramirez, D.; Chen, H.; Perez, C. A.; Dale, K.; Ghosh, S. K.; Lin, L. W.; Messersmith, P. B. Versatile solid-state medical superglue precursors of α -lipoic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **2025**, 147(16), 13377–13384.
- 19 Cui, J. W.; Su, X. S.; Jiao, B. N.; Liao, Y. T.; Xiang, W.; Fang, Y. Y. Preparation and application of recyclable multifunctional self-healing thioctic acid-based materials. *Eur. Polym. J.*, **2022**, 181, 111695.
- 20 Qi, Y.; Xu, C. Y.; Zhang, Z. D.; Zhang, Q.; Xu, Z. Y.; Zhao, X. R.; Zhao, Y. H.; Cui, C. Y.; Liu, W. G. Wet environment-induced adhesion and softening of coenzyme-based polymer elastic patch for treating periodontitis. *Bioact. Mater.*, **2024**, 35, 259–273.
- 21 Zhou, Y. T.; Liu, M. H.; He, C. D.; Lin, J. Y.; Chen, Y. L.; Yu, M. Y.; Jiang, Y. H.; Peng, X. Innovative liquid embolic agents based on deep eutectic solvent: rapid gelation *in situ* *via* solvent exchange with water for endovascular embolization. *Bioact. Mater.*, **2025**, 48, 550–563.
- 22 Cheung, E. C.; Vousden, K. H. The role of ROS in tumour development and progression. *Nat. Rev. Cancer*, **2022**, 22(5), 280–297.
- 23 Chen, S. H.; Chen, J. L.; Wang, X. L.; Yang, Z. F.; Lan, J. X.; Wang, L. D.; Ji, B. J.; Yuan, Y. Glucose-activated self-cascade antibacterial and pro-angiogenesis nanozyme-functionalized chitosan-arginine thermosensitive hydrogel for chronic diabetic wounds healing. *Carbohydr. Polym.*, **2025**, 348, 122894.
- 24 Liu, T.; Liu, G. T.; Zhang, J. H.; Ding, Z. F.; Li, Y. K.; Sigdel, K.; Wang, X. Y.; Xie, H. X. L-Arginine based polyester amide/hyaluronic acid hybrid hydrogel with dual anti-inflammation and antioxidant functions for accelerated wound healing. *Chin. Chem. Lett.*, **2022**, 33(4), 1880–1884.
- 25 Chen, C.; Yang, X.; Li, S. J.; Zhang, C.; Ma, Y. N.; Ma, Y. X.; Gao, P.; Gao, S. Z.; Huang, X. J. Tannic acid-thioctic acid hydrogel: a novel injectable supramolecular adhesive gel for wound healing. *Green Chem.*, **2021**, 23(4), 1794–1804.
- 26 Wang, Q. Y.; Ran, X. Y.; Wang, J.; Wang, S. N.; Zhang, P. L.; Gao, E. J.; Bai, B. S.; Zhang, J. F.; Zhou, G. D.; Lei, D. Elastic fiber-reinforced silk fibroin scaffold with a double-crosslinking network for human ear-shaped cartilage regeneration. *Adv. Fiber Mater.*, **2023**, 5(3), 1008–1024.
- 27 Cui, C. Y.; Mei, L.; Wang, D. Y.; Jia, P. F.; Zhou, Q. H.; Liu, W. G. A self-stabilized and water-responsive deliverable coenzyme-based polymer binary elastomer adhesive patch for treating oral ulcer. *Nat. Commun.*, **2023**, 14, 7707.

- 28 Liu, K.; Wang, Y.; Dong, X. Z.; Xu, C.; Yuan, M.; Wei, W. Y.; Pang, Z. X.; Wu, X. P.; Dai, H. L. Injectable hydrogel system incorporating black phosphorus nanosheets and tazarotene drug for enhanced vascular and nerve regeneration in spinal cord injury repair. *Small*, **2024**, 20(26), 2310194.
- 29 张宝萍, 许戈文, 黄毅萍. 丝素蛋白-聚氨酯复合水凝胶的制备及性能研究. *高分子学报*, **2012**(9), 965–971.

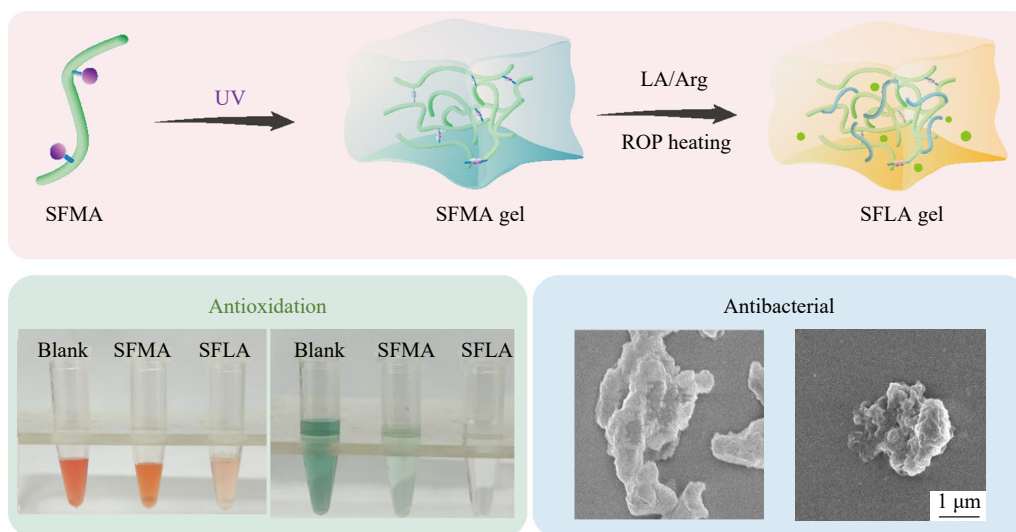
Research Article

Preparation and Performance Study of Lipoic Acid-enhanced Double-network Silk Fibroin Hydrogel Dressing

Lu-hang Fang, Xiao-yang Liang, Zi-yi Shen, Chen Xu, Yang Li*, Fu-jian Xu*

(State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, Key Laboratory of Natural Polymer-Based Medical Materials of the Ministry of Education (Beijing University of Chemical Technology), Beijing Biomedical Materials Laboratory, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

Abstract Silk fibroin hydrogels with a single network lack mechanical strength and other bioactivities. To address this issue, methacrylated silk fibroin (SFMA) hydrogels were first prepared *via* photopolymerization. Subsequently, double-network composite hydrogels (SFLA) were fabricated through one-step immersion thermal polymerization by blending SFMA with lipoic acid (LA) and arginine (Arg). First, the microstructure and mechanical properties of SFMA hydrogels with different concentrations were determined using scanning electron microscopy and rheology. The appropriate concentrations of LA and Arg were screened through gelation tests, and SFLA hydrogels were prepared. The drug release behavior of the hydrogels was measured using ultraviolet (UV) spectroscopy. Finally, the biosafety, antioxidant activity, and antibacterial properties of the hydrogels were determined. The results showed that introducing a secondary network cross-linked by LA into the silk fibroin single-network hydrogels enhanced the mechanical strength and adhesion performance of the hydrogels. The synergistic effect of LA and Arg endowed the hydrogels with excellent antioxidant and antibacterial capabilities.



Keywords Silk fibroin; Lipoic acid; Arginine; Antibacterial

* Corresponding authors: Yang Li, E-mail: ly@mail.buct.edu.cn

Fu-jian Xu, E-mail: xufj@mail.buct.edu.cn