# *L*-半胱氨酸修饰氧化石墨烯负载没食子酸水凝胶的制备与研究

杨 晨[1],于香君[2],李 丽[3],刘 宇[3*]
(1.江苏省徐州医药高等职业学校,江苏 徐州 221116; 2.鞍山市妇儿医院,辽宁 鞍山 114013;
3.辽宁大学药学院,辽宁 沈阳 110036)

**摘要**:通过物理交联法制备了一种新型*L*-半胱氨酸修饰氧化石墨烯负载没食子酸复合水凝胶(SA-AG-GA/GFC-GA),以海藻酸钠(SA)和琼脂糖(AG)为基质,没食子酸(GA)为交联剂,并负载功能化氧化石墨烯-没食子酸复合材料(GFC-GA)于水凝胶网络中。通过扫描电子显微镜(SEM)、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、流变学测试等手段对水凝胶进行了系统表征,并评估了其力学性能、保湿性、粘附性等。体外实验表明,该水凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有显著抑菌效果(抑菌率分别为65.72%和70.04%),细胞毒性低。动物实验进一步证实,SA-AG-GA/GFC-GA水凝胶能显著促进小鼠全层皮肤缺损模型的伤口愈合(12 d愈合率达94.31%),其机制与促进胶原沉积、血管生成及减少炎症反应相关。

**关键词**:SA-AG-GA/GFC-GA复合水凝胶;没食子酸;伤口愈合;抗菌性能
**中图分类号**:TQ427.26;R318 **文献标志码**:A **文章编号**:0253-4320(2026)10-0186-09
**DOI**:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2026.10.031

## Preparation and study of gallic acid-loaded hydrogel with *L*-cysteine-modified graphene oxide

*YANG Chen*[1], *YU Xiang-jun*[2], *LI Li*[3], *LIU Yu*[3*]
(1.Jiangsu Provincial Xuzhou Pharmaceutical Vocational College, Xuzhou 221116, China;
2.Anshan Women and Children's Hospital, Anshan 114013, China;
3.School of Pharmaceutical Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

**Abstract**: In this study, a novel *L*-cysteine-modified graphene oxide loaded gallic acid hydrogel (SA-AG-GA/GFC-GA) was synthesized via a physical crosslinking method. Sodium alginate (SA) and agarose (AG) served as the matrix materials, while gallic acid (GA) acted as the crosslinking agent. Additionally, a functionalized graphene oxide-gallic acid composite (GFC-GA) was incorporated into the hydrogel network. The hydrogel was thoroughly characterized using scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), rheological testing, and other analytical techniques. Its mechanical properties, moisture retention capacity, and adhesive properties were also evaluated. In vitro experiments demonstrated that the hydrogel exhibited significant antibacterial activity against Escherichia coli and Staphylococcus aureus, with inhibition rates of 65.72% and 70.04%, respectively. Furthermore, the hydrogel displayed low cytotoxicity. Animal experiments further confirmed that the SA-AG-GA/GFC-GA hydrogel significantly accelerated wound healing in a full-thickness skin defect mouse model, achieving a healing rate of 94.31% at 12 days. The underlying mechanism was associated with enhanced collagen deposition, angiogenesis, and reduced inflammatory responses. This study provides novel insights for the development of multifunctional wound dressings.

**Key words**: SA-AG-GA/GFC-GA composite hydrogel; gallic acid; wound healing; antibacterial properties

皮肤作为人体最大的器官,其损伤后的修复过程涉及复杂的生理机制[1-3]。传统敷料如纱布虽能提供物理保护,但存在保湿性差、易粘连伤口等问题。近年来,水凝胶因其高含水量、生物相容性及可负载药物等特性,成为伤口敷料研究的热点[4-5]。然而,单一功能的水凝胶难以满足伤口愈合过程中抗菌、促修复等多重需求。因此,开发兼具抗菌、促愈合和缓释功能的多功能水凝胶具有重要临床意义[6-7]。

氧化石墨烯(GO)是石墨烯通过化学氧化和剥离处理制得的新型二维纳米材料。GO具有二维平面结构和高比表面积,且表面富含羟基、羧基和环氧基等含氧官能团,这些官能团赋予GO优异的水分散性和化学活性[8-11]。不仅可以实现药物和基因分子的高负载,还可以通过化学修饰或功能优化来增加它的结构和化学多样性,在组织工程、靶向治疗和生物传感等领域展现出广阔的应用前景[12-14]。研究者们将氨基酸以共价或非共价的形式结合在GO上,对GO的表面进行功能化修饰以提高其生物相

**收稿日期**:2025-12-08;**修回日期**:2026-07-30
**基金项目**:2025辽宁省高校基本科研项目创新发展项目(科技成果转化专项)(LJ242510140019)
**作者简介**:杨晨(1994-),女,硕士,讲师,研究方向为皮肤外用制剂的开发,ycviolet@126.com;刘宇(1980-),男,博士,教授,研究方向为皮肤外用制剂的开发,通讯联系人,lnuliuyu@163.com。

容性并降低毒性[15]。例如:Abdelhalim 等[16]成功通过 *L*-半胱氨酸对 GO 进行功能化,制备了具有良好生物相容性的功能化氧化石墨烯(GFC)。

本研究采用 GFC 与天然多酚协同策略,成功开发了一种具有抗菌及促愈合双重功能的新型水凝胶敷料。以 GO 为核心载体,通过 *L*-半胱氨酸进行生物相容性修饰以降低 GO 的细胞毒性得到 GFC,将没食子酸(GA)负载于 GFC 表面,构建了具有药物缓释功能的 GFC-GA 复合物,并与海藻酸钠(SA)-琼脂糖(AG)水凝胶复合,构建了 *L*-半胱氨酸修饰氧化石墨烯负载没食子酸水凝胶系统(SA-AG-GA/GFC-GA)。该系统不仅解决了 GA 的稳定性问题,还通过缓释作用延长了 GA 的药效,具有抑菌性能、缓释性能及促进伤口愈合效果的多功能。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验材料

主要试剂:*L*-半胱氨酸购自北京奥拓达试剂有限公司;1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)购自上海嘉兴化学试剂有限公司;*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、琼脂糖购自天津大茂化学试剂厂;海藻酸钠购自上海麦克林生化科技股份有限公司;没食子酸购自上海源叶有限公司;青霉素-链霉素双抗溶液、AO/EB 荧光染料购自 SIGMA(美国);无血清细胞冻存液、DMEM 培养基购自赛默飞公司(美国);RPMI-1640 培养液购自 Hyclone 公司;MTT 试剂购自福州飞净生物科技有限公司;H&E 染色套装、Masson 染色套装、VEGF 抗体、抗胶原蛋白Ⅰ抗体、5%胎牛血清(FBS)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;4%甲醛购自天津莱博化工有限公司。

主要仪器:扫描电子显微镜(EM-7610F,日本电子公司);流变仪(MCR302,奥地利 Anton Paar);傅里叶红外光谱仪(IRAffinity-1,日本岛津);冷冻干燥机(CTFD-10S 青岛永合创信电子科技有限公司);高速台式冷冻离心机(TFL-20M 上海实维实验仪器技术有限公司);多功能酶标仪(HM-SY96 山东恒美电子科技有限公司);霉菌培养箱(BPMJ-150F 上海一恒科学仪器有限公司);二氧化碳细胞培养箱(3111 美国赛默飞公司);倒置荧光显微镜(IX71 日本 Olympus 公司)。

菌种:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,*S.aureus*),ATCC 6538、大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E.coli*),ATCC 25922。

细胞:L929 细胞由 RSBM 公益细胞库提供。

小鼠:雄性 KM 小鼠 24 只,18~21 g,购买自辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号:SCXK(辽)2020-0001。所有实验均遵守有关动物伦理的法律和制度准则,并经辽宁大学动物伦理委员会批准进行。

### 1.2　SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶的制备

#### 1.2.1　*L*-半胱氨酸修饰的氧化石墨烯(GFC)的制备

取 10 mL 的 1 mg/mL GO 分散液与 40 mg 的 *L*-半胱氨酸粉末混合,在室温下搅拌 1 h,用 NaOH 调节 pH 至 4.5,加入 200 mg 的 EDC 搅拌 1 h 使羧基活化,随后加入 200 mg 的 NHS。混合物超声 20 min,磁力搅拌 3 h,离心收集产物,用去离子水/乙醇洗涤 3 次,冷冻干燥 24 h,得到最终产物。

#### 1.2.2　SA-AG-GA 水凝胶的制备

首先分别配制 0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.25%和 1.5%(质量体积比,w/v)的 GA 溶液。再将 3 g SA 和 1 g AG 加入 100 mL 去离子水中,95℃下搅拌至完全溶解,得到 SA 与 AG 质量比为 3∶1的前体溶液。取 1 mL 的 SA-AG 混合溶液,分别与 1 mL 不同浓度 GA 溶液混合,充分搅拌直至溶液变得黏稠后静置冷却,使其完全凝胶化。

#### 1.2.3　SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶的制备

将 15 mg GFC-GA 加入到 SA-AG 混合溶液中,磁力搅拌 30 min。随后,加入 GA 溶液作为交联剂,持续搅拌直至溶液变黏稠,静置冷却使其完全凝胶化。

### 1.3　测试与表征

#### 1.3.1　SEM 分析

将冷冻干燥后的样品经液氮脆断处理后,喷涂导电金属膜后固定于样品台上,置于扫描电镜的真空腔中,扫描获取清晰的微观形貌。

#### 1.3.2　FT-IR 分析

使用 IR Affinity-1 傅里叶变换红外光谱仪,在波数范围 400~4 000 $cm^{-1}$下进行扫描。

#### 1.3.3　流变学分析

使用 MCR302 流变仪在室温下测试 SA-AG-GA/GFC-GA-0.75(0.75% w/v)、SA-AG-GA/GFC-GA-1(1% w/v)、SA-AG-GA/GFC-GA-1.25(1.25% w/v)水凝胶的流变性能,设置频率为 1 Hz,应变范围为 0.1%至 1 000%。通过储能模量($G'$)与损耗模量($G''$)曲线的交点确定水凝胶的坍塌应力临界点,并在小应变范围内利用储能模量计算杨氏模量,分析不同 GA 含量对水凝胶力学性能的影响。

#### 1.3.4　保湿性分析

记录水凝胶初始重量,分别存放在 4、25℃和

37℃下,在特定时间间隔取出称重,根据公式(1)计算保湿率。

$$保湿率(\%) = (M_1/M_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中,$M_0$ 为初始重量,$M_1$ 为失水后重量。

1.3.5 粘附性能的测定

通过将水凝胶粘附在不同材料表面以及手指关节处,观察翻转倒置和弯曲手指时水凝胶是否发生脱落或移位,验证水凝胶的普适性粘附能力。

1.3.6 GA 的体外释放

将 SA-AG-GA 和 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶分别装入透析袋,将透析袋置于装有 10 mL、pH=7.4 的 PBS 溶液的离心管中。离心管放置在 37℃、50 r/min 的恒温摇床中进行实验。在不同的时间间隔取样,每次移取 1 mL 释放液,并立即补充以维持体积恒定。取出的样品通过高效液相色谱(HPLC)测定 GA 的吸光度,并根据 GA 的标准曲线计算其累积释放量。

1.3.7 抑菌实验

制备浓度为 $1\times10^7$ CFU/mL 的菌液,取 100 μL 均匀涂布于预先凝固的固体培养基表面,用无菌打孔器在琼脂平板上打孔。将灭菌后的各组水凝胶分别加入孔中,设置空白对照组进行对比,37℃培养箱中培养 18 h,通过测量抑菌圈面积来评估抑菌效果。

平板计数实验中,首先制备水凝胶的提取液,将各组水凝胶切成小块,浸入 10 mL 的 0.9%氯化钠溶液的离心管中,并置于 37℃、25 r/min 恒温振荡器中提取提取液 8 h。将稀释后的 *E.coli* 和 *S.aureus* 菌液与水凝胶提取液按比例混合均匀后涂布于营养琼脂平板上,放入培养箱中培养。18 h 后计算水凝胶的抑菌率,如式(2)所示。

$$抑菌率(\%) = [(C_{p0} - C_{p1})/C_{p0}] \times 100\% \quad (2)$$

式中,$C_{p0}$为对照组的菌落计数,$C_{p1}$为实验组的菌落计数。

1.3.8 细胞毒性实验

通过 MTT 实验研究水凝胶各组分对 L929 细胞生物存活率的影响。具体步骤如下。

(1)细胞接种:向 96 孔板的实验孔中加入 100 μL 约含有 $1\times10^4$ 个 L929 细胞的细胞悬液,96 孔板周围加入无菌 PBS 溶液,将板置于 37℃、5% $CO_2$ 的细胞培养箱中,培养 24 h。

(2)药物添加:将水凝胶提取液与完全培养基(90% DMEM 高糖基础培养基、9% FBS 和 1%青霉素/链霉素双抗溶液)按 1∶9的比例混合,向孔中加入含各组水凝胶提取液的完全培养基,对照组仅使用完全培养基,每孔 150 μL。

(3)MTT 试剂处理:在不同时间取出培养板,去除培养液,向每个孔中加入 20 μL、5 mg/mL 的 MTT 试剂,孵育 4 h,最后去除孔中的 MTT 试剂并加入 150 μL 的二甲基亚砜(DMSO)。

(4)吸光度测定:使用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度,根据公式(3)计算细胞存活率。

$$细胞存活率(\%) = (OD_0/OD_1) \times 100\% \quad (3)$$

式中,$OD_0$ 水凝胶组吸光度,$OD_1$ 为空白组吸光度。

1.3.9 细胞划痕实验

细胞接种培养 24 h,贴壁后移除培养基。用 200 μL 的枪头垂直于孔板画一条直线,用 PBS 润洗 2~3 次,每个孔分别加入含有 SA-AG、SA-AG-GA、SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶提取液的培养基,在 0、12、24 h,于显微镜下观察划痕,用 Image J 测量划痕面积。根据公式(4)计算细胞迁移率。

$$细胞迁移率(\%) = [(S_0 - S_1)/S_0] \times 100\% \quad (4)$$

式中,$S_0$ 为初始的划痕面积,$S_1$ 为特定时间点的面积。

1.3.10 荧光染色

将细胞以 $2\times10^4$ 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板中,加入水凝胶提取液、GO 溶液和 GFC 溶液,培养 24 h。随后,移除培养基,并向每个培养孔中加入 140 μL 的 AO/EB 荧光染色液(70 μg/mL AO 和 70 μg/mL EB,现用现配),室温条件下避光孵育 10 min。去除染色液,用 PBS 洗涤细胞 3 次,在荧光显微镜下观察。其中,活细胞保持完整的形态,细胞核呈现绿色荧光;死细胞则因细胞膜破裂而显示红色荧光;处于凋亡阶段的细胞既表现出绿色荧光,又伴随红色荧光,且细胞体积缩小,形态收缩。

1.3.11 小鼠体内愈合实验

取 24 只 KM 小鼠分成 4 组:纱布组(空白对照)、康乐保水凝胶组(Commercial gel 对照组)、SA-AG 组(空白凝胶组)、SA-AG-GA/GFC-GA 组。建立小鼠全层皮肤缺损模型:对小鼠进行麻醉,用宠物剃毛刀脱去其背部的毛发,随后用手术刀在小鼠背部切开全层皮肤,创建一个大约 8 mm 的全层皮肤伤口。接着,将纱布和水凝胶贴于小鼠背部全层皮肤缺损创面,并用弹力绷带固定。每 2 d 更换敷料并拍照记录伤口愈合情况,持续观察 12 d,用 Image J 软件测量小鼠伤口面积,伤口愈合率根据公式(5)计算。

$$愈合率(\%) = [(S_0 - S_n)/S_0] \times 100\% \quad (5)$$

式中,$S_0$ 为初始伤口面积,$S_n$ 为第 $n$ 天时小鼠伤口面积。

1.3.12　组织学分析

染色前取直径 1 cm 的小鼠愈后全层皮肤组织,使用 4%福尔马林固定和石蜡包埋切片。

H&E 染色:依次进行苏木精染色和伊红染色,随后经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后封片。在光学显微镜下可观察到细胞核呈蓝紫色,细胞质和细胞外基质呈粉红色。

Masson 染色:依次用 Weigert 铁苏木精、酸性品红、磷钼酸和苯胺蓝进行染色,最后脱水透明封片。染色后可见胶原纤维呈蓝色,肌肉纤维呈红色,细胞核呈深蓝色。

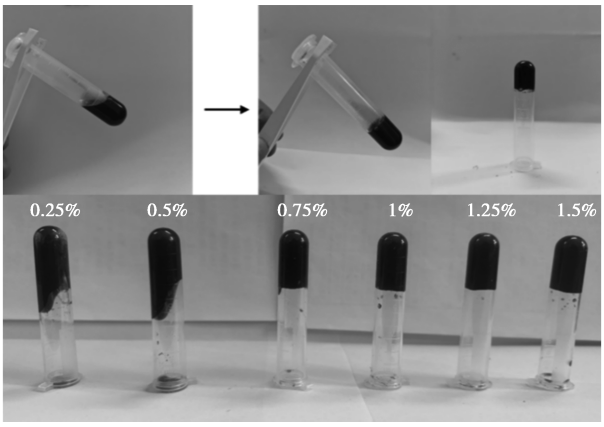
免疫荧光染色:采用抗 Collagen I 和抗 VEGF 抗体进行双重免疫荧光染色,最后 DAPI 染核,用 Image J 对第 12 天的皮肤伤口组织中的荧光因子进行定量分析。

## 2　结果与讨论

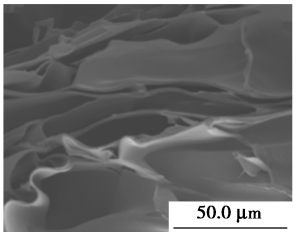
### 2.1　SA-AG-GA-GFC-GA 水凝胶的表征

2.1.1　水凝胶的性状

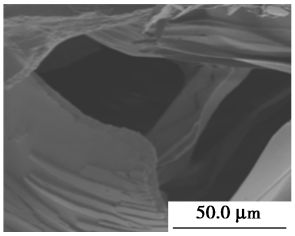
含不同浓度 GA 的水凝胶性状如图 1(a)所示,当 GA 浓度为 0.25%~0.5%时,水凝胶无法成型;浓度为 1.5%时,SEM 显示 GA 晶体析出[图 1(c)];而 1% GA 浓度下水凝胶结构均匀无析出[图 1(b)]。表 1 所示为水凝胶中各成分含量对水凝胶的成型性




(a)水凝胶成胶形态




(b)1%(w/v)GA 的水凝胶 SEM 图




(c)1.5%(w/v)GA 的水凝胶 SEM 图

图 1　SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶形貌

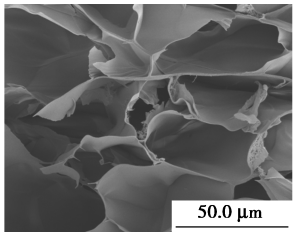
**表 1　水凝胶中各成分含量**

| SA/%(w/v) | AG/%(w/v) | GA/%(w/v) | 性状 |
|---|---|---|---|
| 3 | 1 | 0.25 | 不成胶 |
| 3 | 1 | 0.50 | 不成胶 |
| 3 | 1 | 0.75 | 成胶 |
| 3 | 1 | 1.00 | 成胶 |
| 3 | 1 | 1.25 | 成胶 |
| 3 | 1 | 1.50 | 成胶、GA 析出 |

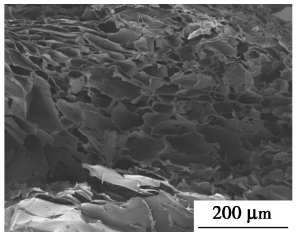
的影响。因此,选择 0.75%~1.25% GA 浓度用于后续实验。

2.1.2　SEM 分析

SA-AG-GA/GFC-GA-1 水凝胶展现出典型的微米级多孔结构,这些孔洞相互连通,为水凝胶提供了优异的渗透性和机械性能支持,有利于营养物质传输和细胞迁移(图 2)。




(a)比例尺 50.0 μm

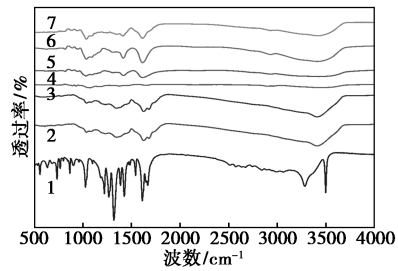



(b)比例尺 200 μm

图 2　水凝胶的 SEM 图

2.1.3　FT-IR 分析

如图 3 所示,GA 的—OH 峰(3 280 $cm^{-1}$)在凝胶化后红移至 3 297 $cm^{-1}$,且峰宽增加,同时 C═O 伸缩振动峰从 1 678 $cm^{-1}$ 红移至 1 695 $cm^{-1}$,表明 GA 与 SA/AG 通过氢键交联[17]。GFC-GA 中保留 GA 的特征峰(1 678 $cm^{-1}$),证实 GA 成功于 GFC 上[18-19]。



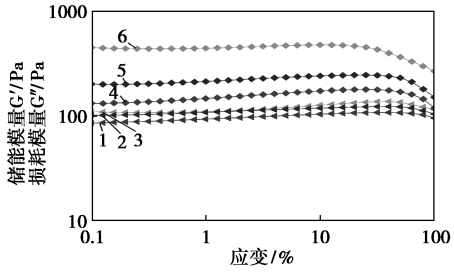

1—GA;2—GFC;3—GFC-GA;4—AG;5—SA;
6—SA-AG-GA;7—SA-AG-GA/GFC-GA

图 3　水凝胶的 FT-IR 图

2.1.4　流变学分析

如图 4 所示,所有水凝胶的 $G'$ 均高于 $G''$,证实了凝胶结构的形成。随着 GA 浓度增加,$G'$ 和 $G''$ 显

著提高,在 1%应变下,3 种水凝胶的 $G'$ 值呈现出,SA-AG-GA/GFC-GA-1.25>SA-AG-GA/GFC-GA-1>SA-AG-GA/GFC-GA-0.75,表明 GA 通过增加交联密度增强了水凝胶的机械强度。

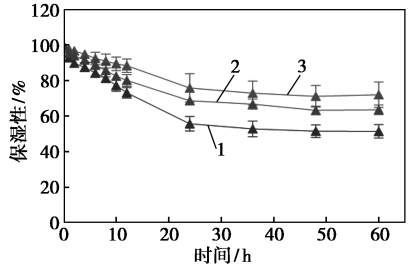



1—$G'$(SA-AG-GA/GFC-GA-1.25);2—$G''$(SA-AG-GA/GFC-GA-1.25);3—$G'$(SA-AG-GA/GFC-GA-1);4—$G''$(SA-AG-GA/GFC-GA-1);5—$G'$(SA-AG-GA/GFC-GA-0.75);6—$G''$(SA-AG-GA/GFC-GA-0.75)

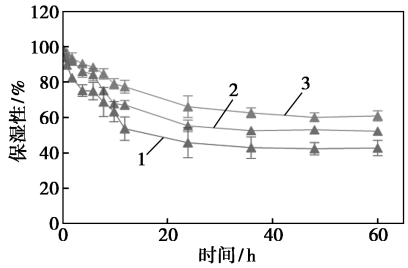
图 4　水凝胶的流变性能图

2.1.5　保湿性分析

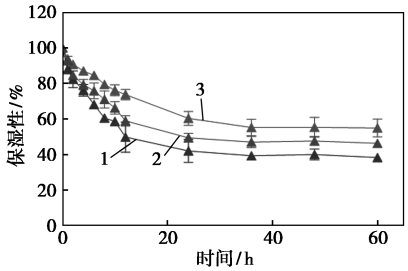
水凝胶的保湿性能如图 5 所示,SA-AG-GA/GFC-GA-0.75、SA-AG-GA/GFC-GA-1、SA-AG-GA/GFC-GA-1.25 水凝胶在 4、25℃和 37℃条件下表现出不同的保湿特性,SA-AG-GA/GFC-GA-1.25 水凝胶在 3 种温度下的保湿性能最好。这一现象可归因于高浓度 GA 与 SA 和 AG 之间高交联密度形成的致密网络结构限制了水分流失。在需要维持湿润环境的伤口愈合过程中,能够为细胞迁移和组织再生提供理想条件。




(a)4℃下水凝胶的保湿性能




(b)25℃下水凝胶的保湿性能




(c)37℃下水凝胶的保湿性能

1—SA-AG-GA/GFC-GA-0.75;2—SA-AG-GA/GFC-GA-1;3—SA-AG-GA/GFC-GA-1.25

图 5　不同温度下水凝胶的保湿性能($n$=3)

2.1.6　粘附性能的测定

如图 6 所示,其在纸、玻璃、塑料、橡胶和乳胶表面及翻转倒置实验中 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶均未发生脱落或移位,表现出优异的粘附性能,主要归因于水凝胶与基质表面之间的多重相互作用,包括物理吸附、机械互锁及界面扩散等。因此,制备的水凝胶在应用于伤口敷料时,能够有效抵抗因运动或外部摩擦引起的脱落或移位,从而为伤口提供持久的物理保护和湿润环境。

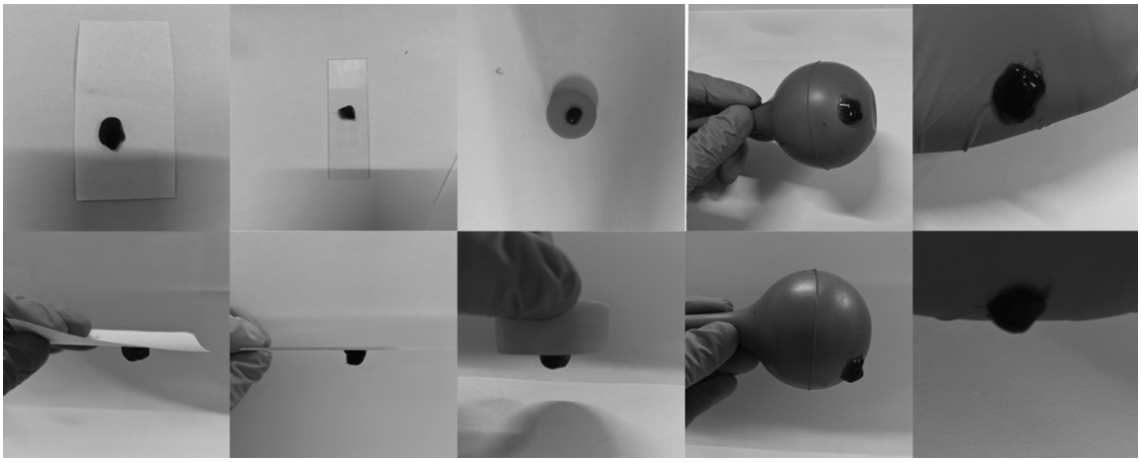
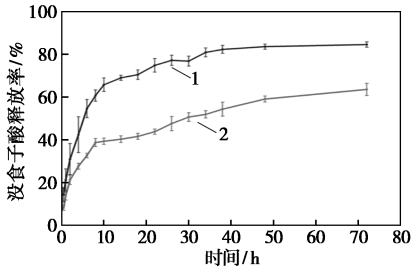


图 6　水凝胶的粘附性能测试

2.1.7　GA 的体外释放

释放曲线如图 7 所示,SA-AG-GA 水凝胶在 72 h 内达到释药平衡,72 h 内累积释放量达到 83%。然而,SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶的释放速率显著减缓,72 h 内累积释放量为 65%。这种释放行为的差异可能归因于 GA 负载在 GFC 上,GFC 与 GA 之间通过 π-π 共轭作用和氢键相互作用形成了稳定的复合结构,从而有效延缓了 GA 的释放速率,制备的 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶具有良好的缓释效果。



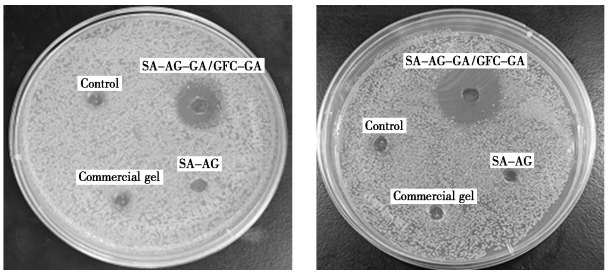

1—SA-AG-GA;2—SA-AG-GA/GFC-GA

图 7　水凝胶中 GA 的释放曲线

## 2.2　SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶的体外实验结果

2.2.1　抑菌实验

如图 8 所示,SA-AG 组和阳性对照组无明显抑菌作用。相比之下,SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶对 *S.aureus* 和 *E.coli* 的抑菌圈面积分别为(15.72±2.16)$cm^2$ 和(10.20±1.13)$cm^2$(表 2),表明该水凝胶对两种细菌均具有显著的抑菌效果。



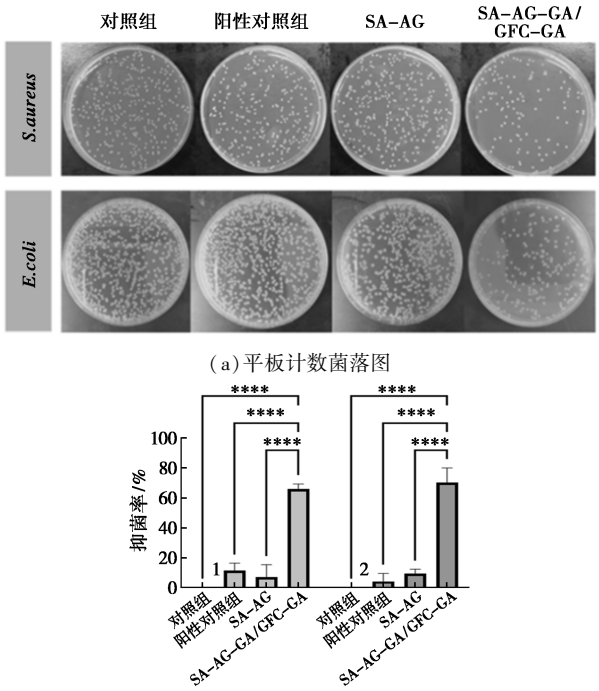

(a)*E.coli*　(b)*S.aureus*

图 8　水凝胶的抑菌圈大小直观图

**表 2　水凝胶的抑菌圈面积**

| | 对照组/$cm^2$ | 阳性对照组/$cm^2$ | SA-AG/$cm^2$ | SA-AG/GFC-GA/$cm^2$ |
|---|---|---|---|---|
| *E.coli* | 0.30±0.03 | 0.34±0.06 | 0.31±0.04 | 10.20±1.13 |
| *S.aureus* | 0.29±0.01 | 0.33±0.04 | 0.30±0.03 | 15.72±2.16 |

图 9(a)为平板计数菌落图,SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶组相对于其他组菌落明显减少。抑菌率结果如图 9(b)所示,可以看出 SA-AG 组和阳性对照组无明显抑菌作用,而 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶对 *S.aureus* 和 *E.coli* 的抑菌率分别为(70.04±9.84)%和(65.72±3.53)%,具有显著的抑菌效果,与抑菌圈实验一致,进一步证实了 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶的抗菌性能。




(a)平板计数菌落图

1—*E.coli*;2—*S.aureus*

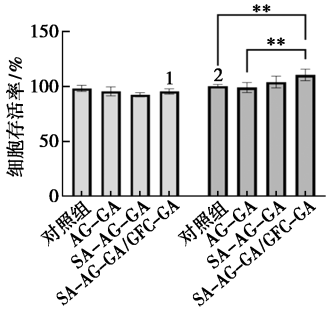
注:**** 表示 $P<0.0001$。

(b)抑菌率($n=3$)

图 9　水凝胶的平板计数抑菌结果

2.2.2　细胞毒性实验

MTT 实验结果如图 10 显示,4 种水凝胶浸提液与 L929 细胞分别孵育 12 h 和 24 h 后,细胞存活率均在 90%以上。这一结果表明,水凝胶各组分对 L929 细胞的生存与增殖能力不会造成影响,无明显的细胞毒性作用。此外,随着孵育时间从 12 h 延长至 24 h,各组细胞存活率均未出现显著下降,证明水凝胶各组分不会随着时间增加对细胞存活率造成影响。



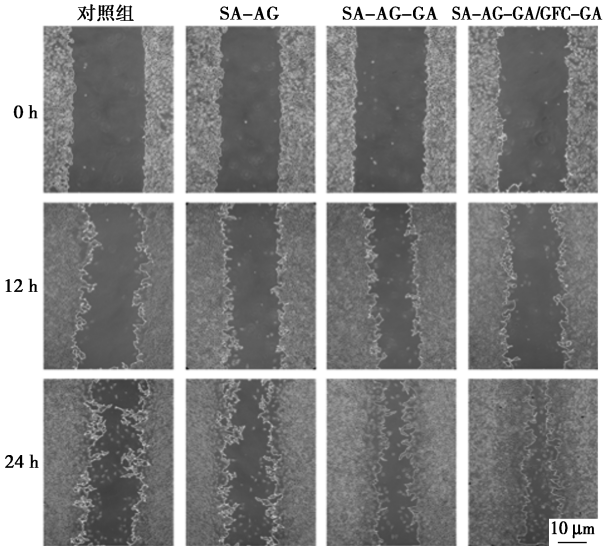

1—12 h;2—24 h

注:** 表示 $P<0.01$。

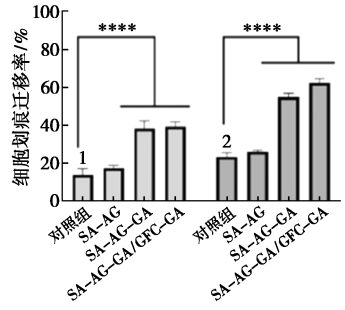
图 10　水凝胶对 L929 细胞存活率的影响($n=4$)

2.2.3 细胞划痕实验

从图 11(a)细胞划痕结果可以看出 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶处理组细胞迁移最快。迁移率如图 11(b)所示,12 h 与 24 h 时 SA-AG-GA/GFC-GA 组细胞迁移率分别为(39.51±2.37)%与(62.35±2.25)%。SA-AG-GA/GFC-GA 组与 SA-AG-GA 组相对迁移率较高,是因为 GA 会激活粘着斑激酶与细胞外信号调节激酶、c-Jun *N*-末端激酶等信号通路来促进细胞迁移。SA-AG-GA/GFC-GA 组比 SA-AG-GA 组迁移率高的原因可能是,GFC-GA 系统通过 π-π 共轭和氢键作用实现 GA 的缓释,确保细胞周围一直维持在有利于细胞迁移的浓度,进一步促进细胞迁移。




(a)水凝胶的体外划痕显微镜图像(比例尺=10 μm)




1—12 h;2—24 h

注:**** 表示 $P<0.0001$。

(b)细胞划痕迁移率($n=3$)

图 11 细胞划痕结果

2.2.4 AO/EB 荧光染色

如图 12 所示,GO 组死细胞多于 GFC 组,表明修饰后的 GO 细胞毒性降低。SA-AG 组、SA-AG-GA 组和 SA-AG-GA/GFC-GA 组细胞的细胞膜完整,且均具有良好的生存状态,证明水凝胶各组分无明显细胞毒性。

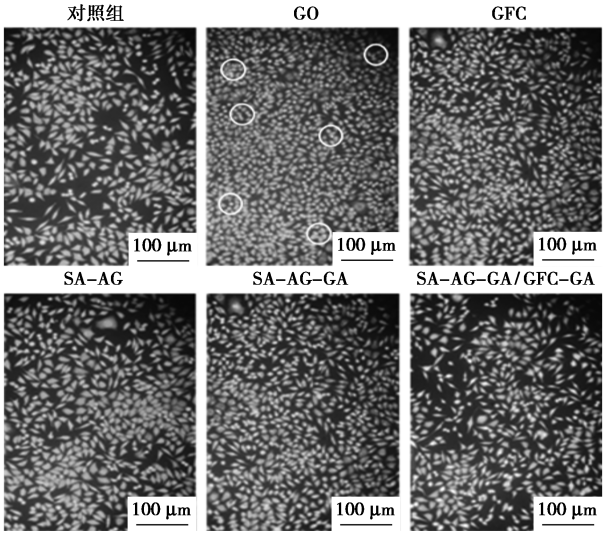
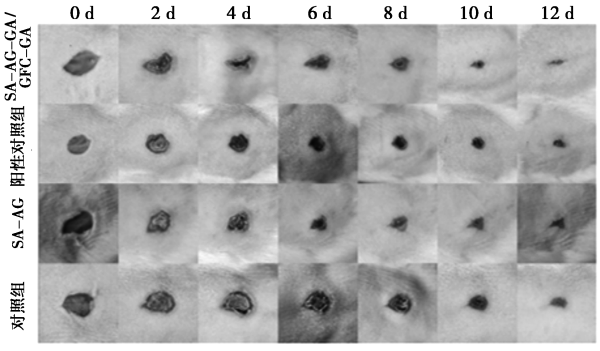



图 12 活/死细胞染色(比例尺=100 μm)

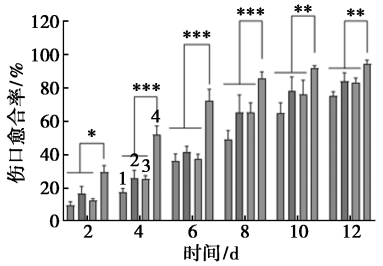
## 2.3 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶动物实验结果

2.3.1 小鼠伤口愈合效果分析

如图 13(a)所示,SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶组从第 4 天开始创面收缩速度明显快于其他组。伤口面积定量分析结果如图 13(b)所示,SA-AG-GA/GFC-GA 组为(94.31±2.47)%,愈合效果最好,其促进伤口愈合的作用机制可能为:首先,GA 作为生物活性成分不仅具有促进细胞迁移的作用,还通过




(a)小鼠伤口愈合图像




1—对照组;2—阳性对照组;3—SA-AG;4—SA-AG-GA/GFC-GA

注:* 表示 $P<0.05$;** 表示 $P<0.01$;*** 表示 $P<0.001$。

(b)各组水凝胶对小鼠的伤口愈合率柱状图($n=4$)

图 13 小鼠伤口愈合结果

其抗菌和抗炎等特性抑制伤口感染,调节伤口微环境,为细胞的增殖与迁移创造了有利条件。其次,水凝胶系统能够实现 GA 的缓释作用,维持有效治疗浓度。此外,水凝胶的三维网络结构为伤口提供了理想的湿润环境,有利于创面修复,同时为伤口提供了物理保护,阻止细菌、灰尘等接触创面。

2.3.2　组织学分析

(1)H&E 染色

如图 14 所示,阴性对照组中仍可见皮肤缺损有痂皮、炎性细胞与淋巴细胞浸润;SA-AG 组水凝胶与阳性对照组水凝胶中,可见有皮下出血点,表皮增厚,炎性细胞浸润;SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶组中创面没有明显缺损,表皮细胞排列整齐连续,新生毛囊数量较多,表明 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶具有良好的促进伤口愈合的作用。

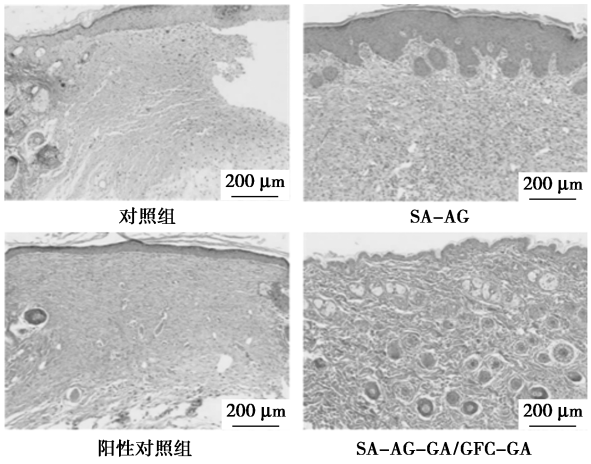



图 14　小鼠伤口组织的 H&E 染色图

(2)Masson 染色

Masson 染色如图 15 所示,胶原纤维在组织切片中呈现特征性蓝色。在伤口愈合的第 12 天,SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶组与其他组相比,展现出显著的组织重构优势,胶原纤维不仅染色强度更高,且呈现出更为规则的排列方式和更高的致密度,表明 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶能有效促进胶原蛋白的合成与有序沉积,从而加速创面愈合进程。

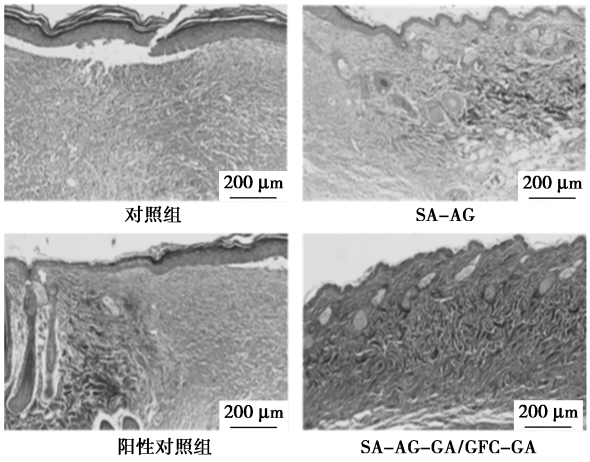
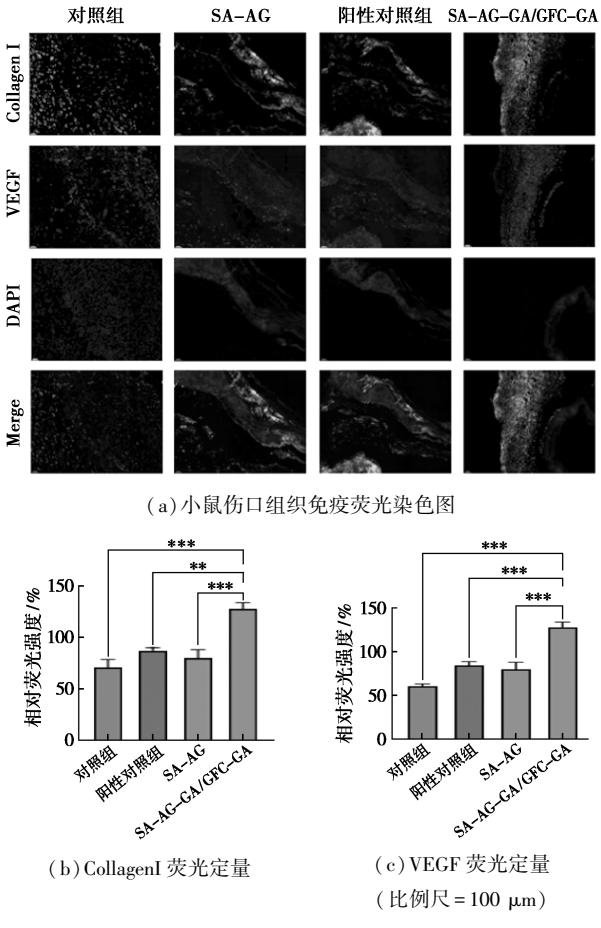



图 15　小鼠伤口组织的 Masson 染色图

(3)免疫荧光染色分析

图 16(a)为免疫荧光染色结果图。图 16(b)、(c)为 Collagen I 和 VEGF 的荧光强度定量分析,在第 12 天时 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶组小鼠创面的 Collagen I 与 VEGF 的表达明显高于对照组、SA-AG 组、阳性对照组($P$<0.01)。这表明 SA-AG-GA/GFC-GA 水凝胶具有促进创面愈合的效果。




(a)小鼠伤口组织免疫荧光染色图

(b)CollagenI 荧光定量　(c)VEGF 荧光定量

(比例尺=100 μm)

注:** 表示 $P$<0.01;*** 表示 $P$<0.001。

图 16　小鼠伤口组织免疫荧光染色结果

## 3　结论

没食子酸(Gallic Acid,GA)是一种广泛存在于植物界的低分子量多酚类化合物[20-21]。GA 的生物活性包括抗氧化、抑菌、抗炎、抗病毒和促进伤口愈合等作用[22-23]。GA 上的羟基、羧基可与 GFC 上的羟基形成氢键,同时苯环之间可产生 π-π 共轭效

应,通过这种多重相互作用将 GA 稳定负载在 GFC 上,实现 GA 的缓慢释放,延长作用时间。此外,作为交联剂的 GA,其上的羟基与羧基也可与琼脂糖(AG)和海藻酸钠(SA)上的羟基形成氢键,使 GA 同时交联 AG 和 SA,形成水凝胶的三维网状结构,能够显著提升水凝胶的生物活性和物理性能,还能赋予其多功能性,解决传统水凝胶的局限性。水凝胶的三维网络结构不仅能够有效保护 GA 免受氧化降解,还能实现其缓慢释放,从而延长药物作用时间并减少给药频率[24]。综上所述,本研究成功开发了一种多功能水凝胶伤口敷料,该材料结合了功能化氧化石墨烯的优异性能、GA 的生物活性以及水凝胶的理想物理特性。该敷料不仅具备缓慢释放 GA 的能力,还展现出优异的抗菌性能和促进伤口愈合的效果,为皮肤创伤治疗提供了一种高效且经济的解决方案。

## 参考文献


[1] Jakovija A, Chtanova T. Skin immunity in wound healing and cancer [J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1060258.

[2] Lima T P L, Passos M F. Skin wounds, the healing process, and hydrogel-based wound dressings: A short review [J]. Journal of Biomaterials Science, 2021, 32(14): 1910-1925.

[3] Maarouf M, Maarouf C L, Yosipovitch G, *et al*. The impact of stress on epidermal barrier function: An evidence-based review [J]. British Journal of Dermatology, 2019, 181(6): 1129-1137.

[4] Gun'ko V M, Savina I N, Mikhalovsky S V. Properties of water bound in hydrogels [J]. Gels, 2017, 3(4): 37.

[5] Mukras S M S, Omar H M, al-Mufadi F A. Experimental-based multi-objective optimization of injection molding process parameters [J]. Arabian Journal for Science and Engineering, 2019, 44(9): 7653-7665.

[6] Tian M, Gong X, Yin L, *et al*. Multi-objective optimization of injection molding process parameters in two stages for multiple quality characteristics and energy efficiency using Taguchi method and NSGA-Ⅱ [J]. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 2017, 89: 241-254.

[7] Li Z H, Xu W L, Wang X H, *et al*. Fabrication of PVA/PAAm IPN hydrogel with high adhesion and enhanced mechanical properties for body sensors and antibacterial activity [J]. European Polymer Journal, 2021, 146: 110253.

[8] Li C G, Chen S R, Ding X X, *et al*. Application of polydopamine and graphene oxide combination in poly (*N*-isopropylacrylamide)/poly (acrylamide-co-acrylic acid) bilayer hydrogels [J]. Colloid and Polymer Science, 2025, 303(3): 1-13.

[9] Jain V P, Jaiswar G. Performance of graphene oxide hydrogel functionalized with chitosan and polyvinyl alcohol for enhanced antibacterial activities [J]. Chemistry Africa, 2025, 8(2): 1-10.

[10] Hosseini S N, Jalaly M, Heydari M, *et al*. Evaluation of a chitosan-based hydrogel containing graphene oxide and Scrophularia striata extract as an antimicrobial wound dressing [J]. South African Journal of Botany, 2024, 171: 199-208.

[11] Punnoy P, Siripongpreda T, Henry C S, *et al*. Novel theranostic wounds dressing based on pH responsive alginate hydrogel/graphene oxide/levofloxacin modified silk [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2024, 661: 124406.

[12] Khan M U A, Stojanovic G M, Hassan R, *et al*. Role of graphene oxide in bacterial cellulose-gelatin hydrogels for wound dressing applications [J]. ACS Omega, 2023, 8(18): 15909-15919.

[13] Kan Y L, Bondareva J V, Statnik E S, *et al*. Hydrogel-inducing graphene-oxide-derived core-shell fiber composite for antibacterial wound dressing [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(7): 6255.

[14] Khodaee Z, Mazinani S, Sharif F. Reduced graphene oxide-modified polyvinyl alcohol hydrogel with potential application as skin wound dressings [J]. Journal of Polymer Research, 2023, 30(1): 5.

[15] Gethami A W. Graphene oxide functionalized with calcium-alginate hydrogel loaded with camptothecin as a feasible anticancer agent [J]. Journal of Molecular Structure, 2024, 1303: 137535.

[16] Abdelhalim A O E, Sharoyko V V, Meshcheriakov A A, *et al*. Reduction and functionalization of graphene oxide with *L*-cysteine: Synthesis, characterization and biocompatibility [J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2020, 29: 102284.

[17] Gong W, Wang R, Huang H B, *et al*. Construction of double network hydrogels using agarose and gallic acid with antibacterial and anti-inflammatory properties for wound healing [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 227: 698-710.

[18] Shamsi S, Elias N, Sarchio S N E, *et al*. Gallic acid loaded graphene oxide based nanoformulation (GAGO) as potential anti-bacterial agent against Staphylococcus aureus [J]. Materials Today: Proceedings, 2018, 5: S160-S165.

[19] Shamsi S, Ghafor A A H, Norjoshukrudin N H, *et al*. Stability, toxicity, and antibacterial potential of gallic acid-loaded graphene oxide (GAGO) against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains [J]. International Journal of Nanomedicine, 2022, 17: 5781-5807.

[20] Bandyopadhyay P, Ghosh A K, Ghosh C. Recent developments on polyphenol-protein interactions: Effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system [J]. Food & Function, 2012, 3(6): 592-605.

[21] Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications [J]. RSC Advances, 2015, 5(35): 27540-27557.

[22] Thanyacharoen T, Chuysinuan P, Techasakul S, *et al*. Development of a gallic acid-loaded chitosan and polyvinyl alcohol hydrogel composite: Release characteristics and antioxidant activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 363-370.

[23] Seo H S, Bae J Y, Kwon K, *et al*. Synthesis and assessment of amps-based copolymers prepared via electron-beam irradiation for ionic conductive hydrogels [J]. Polymers, 2022, 14(13): 2547.

[24] Wu W, Ye Y, Wang Z, *et al*. Gallic acid: Design of a pyrogallol-containing hydrogel and its biomedical applications [J]. Biomaterials Science, 2024, 12(6): 1405-1424. ■