

网络出版时间:2024-04-12 07:17:30 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1007.001

◇基础医学研究◇

# 负载单宁酸的双层壳聚糖屏障膜的制备及其生物相容性的研究

杨肖念<sup>1</sup>, 邹多宏<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 制备负载单宁酸的双层壳聚糖膜(CS@TA), 测试其活性氧(ROS)清除能力、生物相容性及抗菌性能, 研究其作为引导骨再生屏障膜的可行性。方法 采用自蒸发技术先制备出致密的单层壳聚糖(CS)膜, 随后采用蒸发干燥、取向冷冻和冷冻干燥技术在单层CS膜上制备出多孔的CS层, 从而得到双层CS膜, 利用扫描电镜观察其微观结构。将制备好的CS双层膜先接枝4-羧基苯硼酸形成中间体, 按不同比例接枝单宁酸(TA), 使用傅里叶红外光谱仪(FITR)分析TA与CS双层膜的相互作用。通过1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)测试ROS清除能力, 选取负载TA后ROS清除效率在90%以上的双层膜进行后续体外细胞实验, 利用CCK-8及活死细胞染色测试其生物相容性, 利用扫描电镜观察MC3T3-E1细胞在双层膜多孔面上的黏附情况, 通过菌落计数测试其对金黄色葡萄球菌(*E. coli*)和大肠埃希菌(*S. aureus*)的抗菌性能。结果 CS@TA双层膜一面光滑致密, 另一面粗糙疏松多孔, 截面呈垂直薄膜方向的有序多孔结构, 随着TA的加入, 双层膜的ROS清除能力先迅速增加后缓慢稳定, CCK-8及活死细胞染色结果显示加入过多的TA会明显影响双层膜的生物相容性, 细菌稀释涂板计数结果显示加入适量TA的双层膜与未负载TA的双层膜相比, 对*E. coli*和*S. aureus*具有一定抗菌能力。结论 负载适量TA的双层膜具有较强的ROS清除能力, 良好的生物学性能, 且对*E. coli*和*S. aureus*均具有一定的抗菌能力。

**关键词** 单宁酸; 壳聚糖; 活性氧; 抗菌; 屏障膜; 取向冷冻  
**中图分类号** R 782

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0563-06  
**doi**:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.001

糖尿病、牙周炎和骨质疏松症等疾病患者, 其骨缺损常伴随着高活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平环境, 会损害口腔种植体植入后的骨整

合, 不利于口腔种植术后获得良好预后<sup>[1]</sup>。引导骨再生(guided bone regeneration, GBR)技术在临床实践中已被广泛用于治疗口腔颌面部骨缺损, 是实现成骨最有效、最可靠的方法之一。GBR膜充当机械屏障, 阻止快速生长的非成骨细胞(如上皮细胞和成纤维细胞)进入骨缺损, 并为缓慢生长的成骨细胞的增殖和分化提供空间, 从而促进骨再生<sup>[2]</sup>。在高ROS水平的环境中, 过量的ROS激活破骨细胞的形成, 并阻碍骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化, 从而不利于骨愈合<sup>[3]</sup>。该研究使用壳聚糖(chitosan, CS), 通过蒸发干燥和取向冷冻制备出具有光滑致密、粗糙疏松多孔的双层屏障膜, 同时负载单宁酸(tannic acid, TA), 使其兼备可降解性、生物相容性、抗菌性和ROS清除作用, 探究其作为GBR膜使用的可行性。

## 1 材料与方法

**1.1 合成材料** 中粘度壳聚糖(200~400 mPa·s, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 冰醋酸(上海国药集团化学试剂有限公司), 单宁酸(上海麦克林生化科技股份有限公司)。

**1.2 主要试剂和仪器** 氨水(上海国药集团化学试剂有限公司), 吗啉乙磺酸一水合物(MES)、4-羧基苯硼酸(上海麦克林生化科技股份有限公司), 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NSH)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)(北京索莱宝科技有限公司),  $\alpha$ -MEM、胰酶消化液、青霉素-链霉素溶液(上海碧云天生物技术有限公司); 活死细胞染色试剂盒(美国Proteintech公司); 胎牛血清(美国Gibco公司); CCK-8试剂(日本同仁公司)。酶标仪、二氧化碳孵育箱(美国Thermo公司); 扫描电子显微镜(Supra 40, 德国蔡司公司); 高温高压灭菌锅[致微(厦门)仪器有限公司]; 傅里叶红外光谱仪(Nicolet 8700, 美国热电尼高力仪器公司); 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技有限公司)。

## 1.3 方法

2024-02-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 32171347)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究重点实验室, 合肥 230032<sup>2</sup> 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海交通大学口腔医学院, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011

作者简介: 杨肖念, 女, 硕士研究生;

邹多宏, 男, 教授, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zdhyy@ahmu.edu.cn

**1.3.1 CS 双层膜制备** 称取 2 g 壳聚糖放入 100 ml 0.2 mol/L 冰醋酸水溶液中,磁子搅拌至溶解,离心除泡,倒入方形培养皿中,放在 40 °C 加热台上 24 h 后自蒸发成膜,取出后放入氨水中浸泡除酸,去离子水冲洗几遍后置于 40 °C 加热台上,干燥后备用。将干燥后的 CS 膜平铺在铜板上,滴加 2% 的 CS 溶液,刮刀刮平,放入液氮中,10 s 后取出,放入冷冻干燥机中冷冻干燥 48 h 以获得 CS 双层膜。

**1.3.2 CS@TA 双层膜的制备** CS 双层膜接枝 TA 前预处理:配制 0.1 mol/L 的 MES 溶液 100 ml, pH = 6, 分别加入 1 g 4-羧基苯硼酸、100 mg NSH 和 200 mg EDC 后调节 pH 至 7.5, 30 min 后加入 1 g CS 双层膜,磁子搅拌 6 h,结束后用去离子水冲洗薄膜以去除表面未反应的 4-羧基苯硼酸。

CS 双层膜接枝 TA: 取出分别放入浓度为 0.02%、0.04%、0.08%、0.16% 50 ml 水溶液中,放入 37 °C 摇床 6 h,结束后用去离子水冲洗薄膜以去除表面未反应的 TA,最终以获得负载不同含量 TA 的双层壳聚糖屏障膜,根据负载 TA 含量分别记为 CS@TA1、CS@TA2、CS@TA3、CS@TA4, CS 双层膜接枝 TA 前预处理、未接枝 TA 的 CS 双层膜记为 CS@TA0),结束后将各组双层膜临界点干燥后真空储存以备后续使用。其中,根据各组实验结果,挑选出 CS 双层膜上最佳 TA 负载量组的双层膜记为 CS@TA。

**1.3.3 结构表征** 低真空下喷金后使用扫描电镜在 15.0 kV 的加速电压下拍摄样品的光滑面、粗糙面与截面,取 CS、TA 粉末和 CS@TA0、CS@TA1、CS@TA2、CS@TA3、CS@TA4 各组双层膜采用傅立叶变换红外光谱仪分析各成分。

**1.3.4 DPPH·自由基清除实验** 按照试剂盒使用说明配制 DPPH 工作液,将 CS@TA0、CS@TA1、CS@TA2、CS@TA3、CS@TA4 双层膜制备成直径 5 mm 的圆形样品,分别放置于 48 孔板中,每孔加入 200  $\mu$ l DPPH 工作液,Blank 组只加 200  $\mu$ l DPPH 工作液,37 °C 避光孵育 30 min 后取出,将 48 孔板内的液体转移至 96 孔板中,使用酶标仪读取在 517 nm 处的吸光度值。吸光度值记为 A,根据公式 DPPH 清除率 =  $[A_{\text{空白}} - A_{(\text{CS@TA0, CS@TA1, CS@TA2, CS@TA3, CS@TA4})}] / A_{\text{空白}} \times 100$  计算各组双层膜的 DPPH·自由基清除效率。

**1.3.5 细胞生物相容性实验** 将 CS@TA0、CS@TA3、CS@TA4 双层膜制备成直径 5 mm 的圆形样品,经高温高压消毒灭菌。

**CCK-8 细胞毒性检测:**在 48 孔板内接种细胞,每组每个时间点 3 个复孔,每孔接种  $5 \times 10^3$  个 MC3T3-E1 细胞。接种 24 h 后加入各组双层膜,Blank 组不加双层膜材料仅使用培养基培养,此后每 3 d 换液 1 次。在 1、4、7 d 时分别取出各组双层膜,弃去培养基,使用 PBS 清洗 2 次,每孔加入 CCK-8 溶液(CCK-8 :  $\alpha$ -MEM = 1 : 9) 200  $\mu$ l, 37 °C 孵 2 h 后将 48 孔板内孵育后的液体转移至 96 孔板,每孔 100  $\mu$ l,使用酶标仪读取每孔在 450 nm 处的吸光度值。

**细胞活力检测:**在 48 孔板内每孔接种  $1 \times 10^4$  个 MC3T3-E1 细胞,每组 3 个复孔,接种 24 h 后加入各组双层膜,Blank 组不加双层膜材料仅使用培养基培养,此后每 3 d 换液 1 次。在 1、4、7 d 时分别取出各组双层膜,弃去培养基,PBS 清洗 2 次,后按照活死细胞染色试剂盒使用说明进行染色操作,使用荧光显微镜进行观察。

**细胞黏附实验:**将 CS@TA3 双层膜制备成直径 10 mm 的圆形样品。在每个样品的粗糙面上接种  $2 \times 10^4$  个 MC3T3-E1,24 h 后,PBS 清洗 3 次,用 4% 多聚甲醛固定样品 30 min 后 PBS 清洗 3 次,使用扫描电镜拍摄样品。

**1.3.6 抗菌实验** 分别将 CS@TA0、CS@TA3、CS@TA4 双层膜制备成直径 10 mm 的圆形样品,经高温高压消毒灭菌。金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)菌液浓度为  $1.777 \times 10^8$  CFU/ml,大肠埃希菌(*E. coli*)菌液浓度为  $2.55 \times 10^8$  CFU/ml,分别将菌液稀释 1 000 倍后取 10  $\mu$ l 加入放有双层膜的 24 孔板中,每组 3 个复孔,Blank 组直接加入孔板内,每组加入 500  $\mu$ l 肉汤吹打均匀后,取出后孔加入 500  $\mu$ l PBS,超声 3 min,每孔取出 100  $\mu$ l 分别涂抹均于琼脂板上,放入 37 °C 细菌培养箱 24 h 后观察和计数每个琼脂板中的菌落数。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS Statistics 进行统计学分析,所有实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析对 DPPH、CCK-8、抗菌结果进行分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 样品表征** 扫描电镜可见 CS 双层膜光滑面表面致密光滑(图 1A、1B),粗糙面疏松多孔(图 1C、1D),截面可见粗糙面呈纵向有序多孔(图 1E、1F);从 FTIR 光谱中,CS@TA0 是未负载单宁酸的纯壳聚糖双层膜,其酰胺 I 基团位于  $1650 \text{ cm}^{-1}$  处,

酰胺 II 基团位于  $1\ 590\ \text{cm}^{-1}$  处,TA 中的羧基吸收峰位于  $1\ 707\ \text{cm}^{-1}$ ,苯环中的 C=C 吸收峰位于  $1\ 613\ \text{cm}^{-1}$ ,当 TA 通过 4-羧基苯硼酸接枝到 CS 双层膜后,TA 中的羧基由原来的  $1\ 707\ \text{cm}^{-1}$  向左偏移至  $1\ 725\ \text{cm}^{-1}$ ,峰强度减弱。苯环中 C=C 由原来的  $1\ 613\ \text{cm}^{-1}$  向右偏移至  $1\ 555\ \text{cm}^{-1}$ ,且形成的峰强度与 CS 酰胺 II 基团处的峰相延续,形成较宽且弱的峰形,CS 中的酰胺 I 基团由原来的  $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$  位移至  $1\ 654\ \text{cm}^{-1}$ ,酰胺 II 基团特征峰被 TA 中苯环中 C=C 拉伸振动掩盖,由此证明 TA 成功负载到 CS 上(图 1G、1H,其中 1H 为 1G 图中部分放大图)。

**2.2 DPPH·自由基清除率** 未负载 TA 的 CS@TA0 组, DPPH·自由基清除率仅为 13.93,其中负载 TA 的各组 CS@TA1、CS@TA2、CS@TA3、CS@TA4 各组清除率分别可达到 84.80%、87.44%、91.31%、91.30%,与 CS@TA0 组相比差异有统计学意义( $F=832.6, P<0.000\ 1$ )(图 2A); DPPH 溶液在浸泡各组双层膜 30 min 后,颜色由紫色变为淡黄色,表明 DPPH 溶液中的电子与 TA 的氢原子完

全配对,并形成还原的 DPPH(图 2B)。根据 DPPH·自由基清除率结果,选取清除效率较高的 CS@TA3、CS@TA4 两组负载 TA 的双层膜继续后续实验。

**2.3 CS@TA 双层膜体外生物相容性** CCK-8 法检测结果显示,双层膜与细胞共培养 1、4、7 d 后 CS@TA0、CS@TA3 与 Blank 组吸光度值无明显差异,CS@TA4 组 1、4、7 d 时与 Blank 组相比吸光度值差异有统计学意义( $F=16.84, P=0.001\ 9; F=589.8, P<0.000\ 1; F=839.3, P<0.000\ 1$ ),但在 4、7 d 时的细胞存活率明显低于 80%,不具有良好的生物相容性,不适宜作为双层膜的备选材料(图 3A);MC3T3-E1 细胞接种到 CS@TA3 双层膜的粗糙面上 24 h,扫描电镜结果表明细胞可以较好地黏附在 CS@TA3 双层膜的粗糙面上(图 3B、3C);活死细胞染色结果如图 3 显示,活细胞为绿色荧光,死细胞为红色荧光,CS@TA0、CS@TA3 组与 Blank 组的活死细胞比例无明显差异,CS@TA4 组显示与 Blank 组相比有较多的死细胞存在,且活细胞数量明显较少(图 3D)。

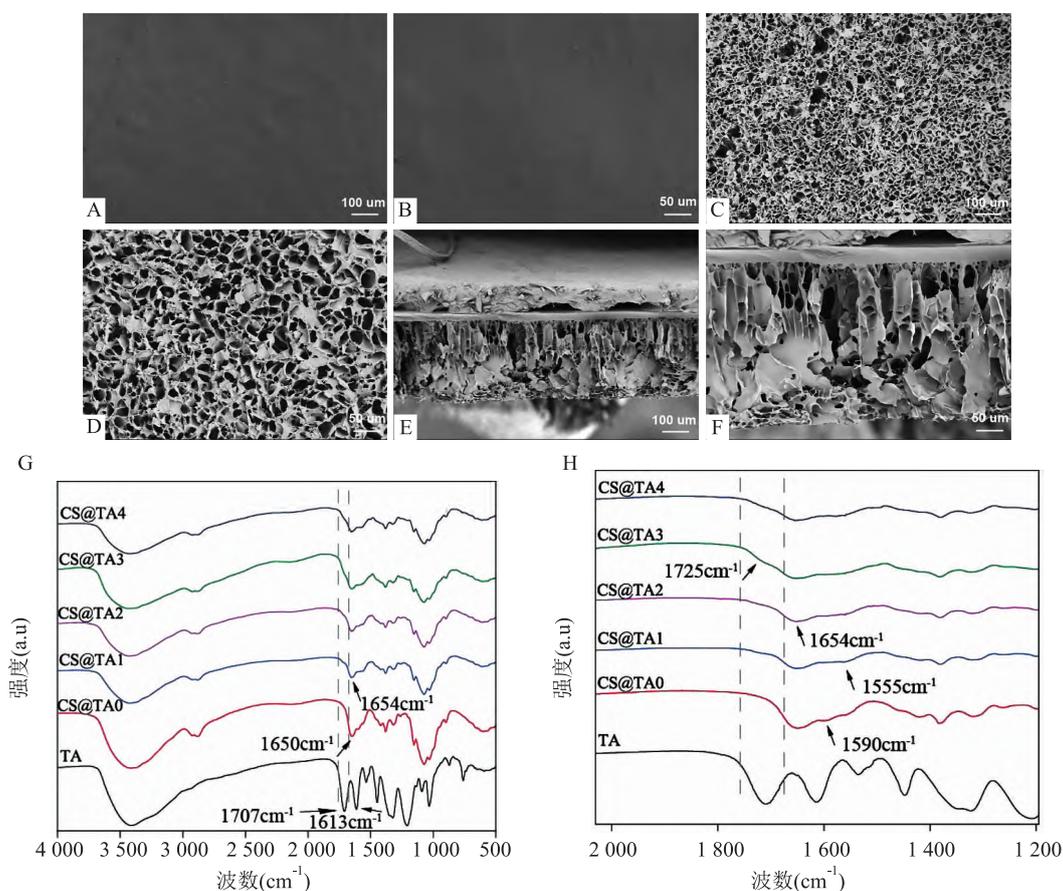


图 1 扫描电镜下 CS@TA 双层膜的微观结构

A、B:光滑面;C、D:粗糙面;E、F:截面;A、C、E:  $\times 100$ ;B、D、F:  $\times 200$ ;G、H:FTIR 结果

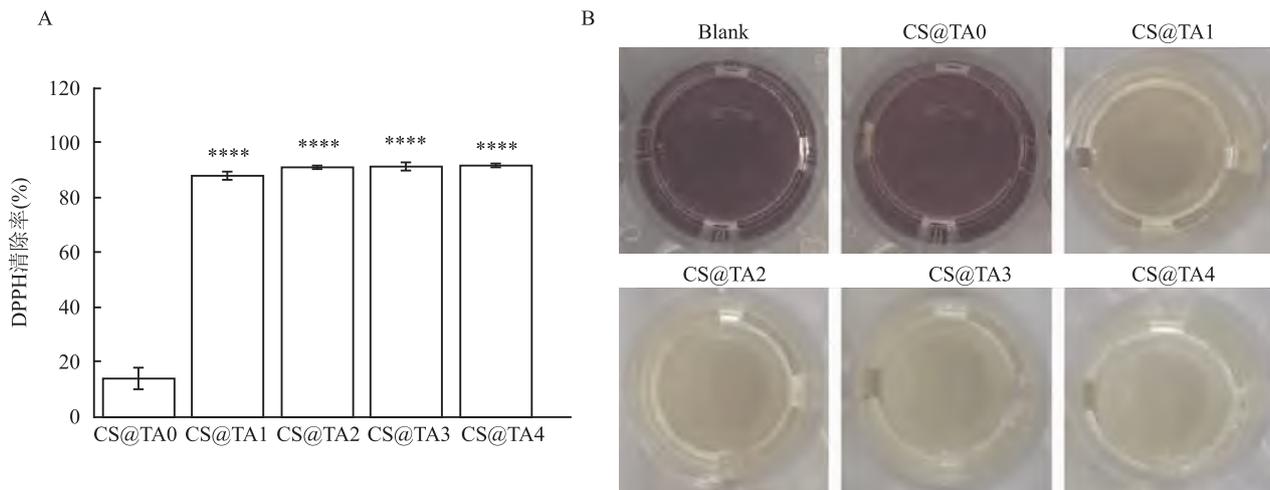


图2 不同TA负载量的CS@TA双层膜的DPPH自由基清除率

A: DPPH清除效率;与CS@TA0组比较:\*\*\*\* $P < 0.0001$ ; B: 各组双层膜在DPPH溶液中浸泡30 min后颜色变化

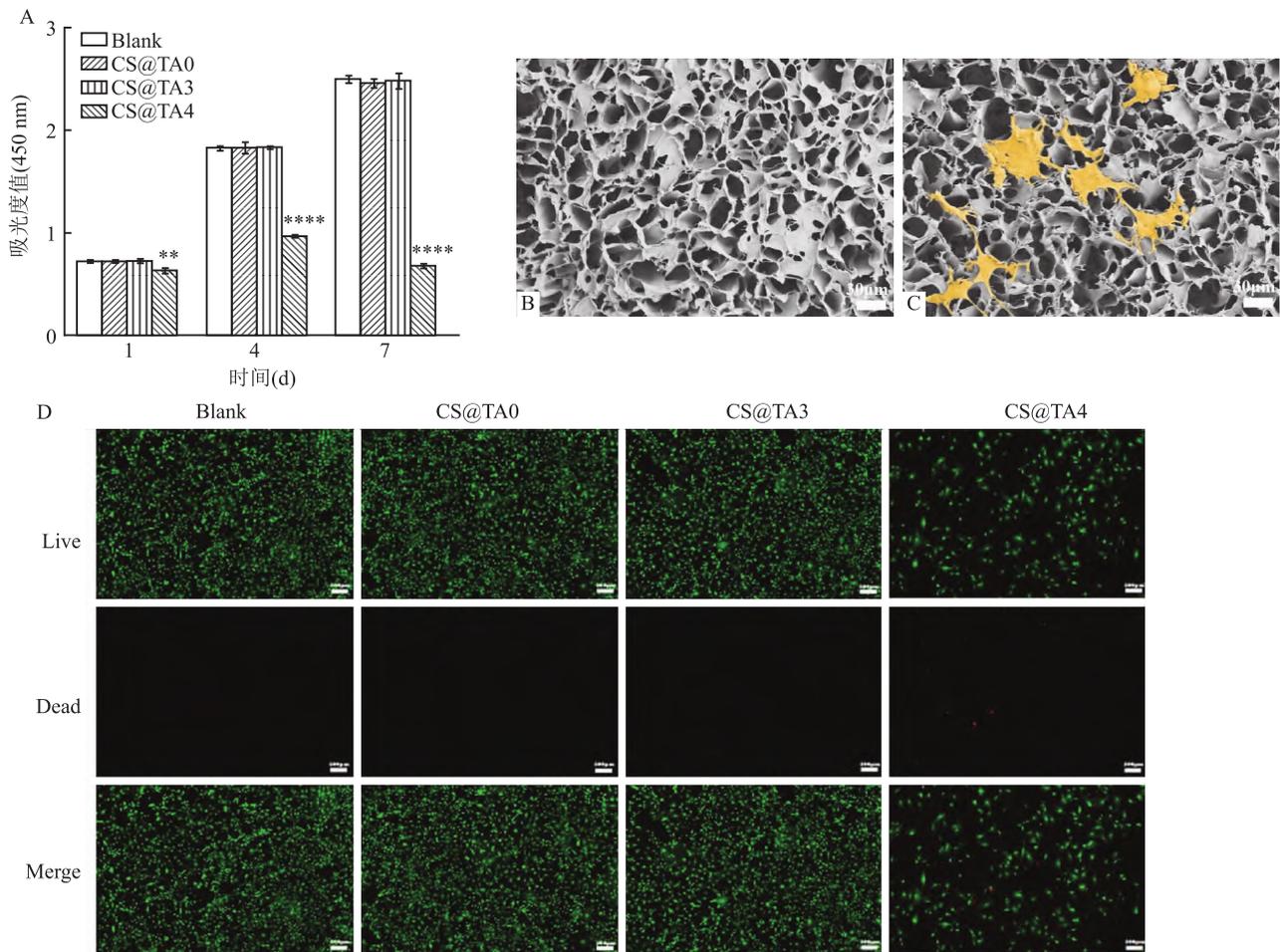


图3 CS@TA双层膜的生物相容性

A: 双层膜与细胞共培养1、4、7 d后CCK-8结果;与Blank组比较: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; B: 未接种细胞的粗糙面  $\times 300$ ; C: 接种细胞共培养24 h后的粗糙面  $\times 300$ ; D: 细胞与双层膜共培养4 d后活死细胞染色结果  $\times 100$

**2.4 CS@TA 双层膜体外抗菌性能** 与Blank、CS@TA0组相比,CS@TA3组的*E. coli*和*S. aureus*细菌稀释涂板结果显示细菌菌落数明显减少(图4A),菌落计数统计结果显示与Blank组菌落数相比,CS@

TA0(*E. coli*:  $F = 166.3$ ,  $P = 0.0002$ ; *S. aureus*:  $F = 61.82$ ,  $P = 0.0018$ )和CS@TA3组(*E. coli*:  $F = 166.3$ ,  $P < 0.0001$ ; *S. aureus*:  $F = 61.82$ ,  $P < 0.0001$ )的菌落数显著减少,差异有统计学意义(图4B、4C)。

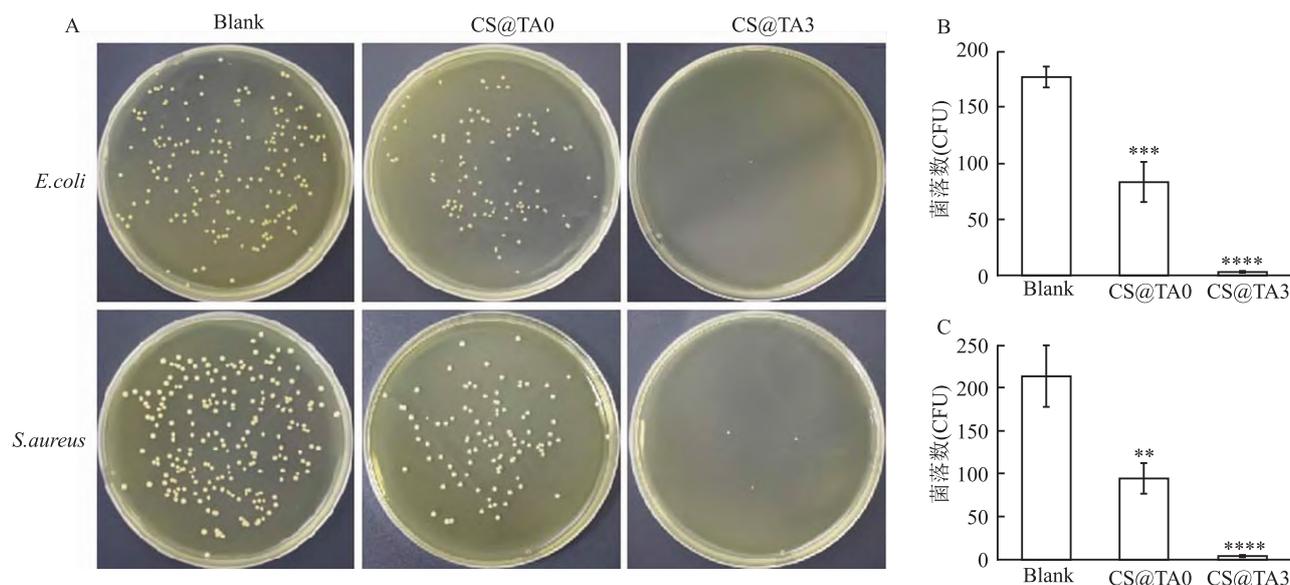


图4 CS@TA 双层膜对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抗菌性能

A: *E. coli* 和 *S. aureus* 菌落涂板代表性结果展示; B: *E. coli* 菌落计数统计图; C: *S. aureus* 菌落计数统计图; 与 Blank 组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$

### 3 讨论

GBR 技术已在临床广泛使用,它是利用在骨缺损部位植入屏障膜,阻碍上皮细胞及结缔组织长入缺损区,达到屏障作用,以促进缺损部位骨组织的修复与再生。目前临床上使用的屏障膜分为可吸收和不可吸收两种,不可吸收性屏障膜需要二次手术取出,给患者带来二次创伤,同时术后增加了感染风险;而可吸收性屏障膜术后无需取出,术后可在体内缓慢吸收降解,但其机械强度低,缺乏抗菌能力,使其使用仍受到限制<sup>[4-6]</sup>。此外临床使用的商用 GBR 屏障膜缺乏一定的抗菌和 ROS 清除能力<sup>[6]</sup>。

葡糖胺聚糖是胞外基质的重要成分,具有维持细胞结构稳定、调节细胞活性的功能。壳聚糖作为胞外基质成分葡糖胺聚糖的结构类似物,不仅具有良好的生物活性、生物可降解性和亲水性,还具有一定的抗菌性能,可以抑制某些细菌的生长,这种特性使得壳聚糖可以应用于制备抗菌材料、药物缓释系统等领域。据报道壳聚糖可增强细胞黏附、增殖、成骨细胞分化和矿化,这些特性使得壳聚糖在组织工程、再生医学等领域具有广泛的应用前景<sup>[7]</sup>。骨缺损常伴有 ROS 水平升高的问题,这意味着在受损骨组织中存在过多的 ROS 物质,如超氧阴离子、过氧化氢和羟自由基等,这些 ROS 物质会引发氧化应激反应,导致细胞内氧化还原平衡失调,诱导成骨细胞和骨细胞凋亡和坏死。这些损伤会导致骨细胞数量

减少和功能下降,抑制间充质细胞的成骨分化,从而延迟骨重建。间充质细胞是一种具有多重分化潜能的干细胞,可以分化为骨细胞、软骨细胞或脂肪细胞等<sup>[8-9]</sup>。TA 是一种具有丰富酚羟基的植物衍生多酚,由于存在多个具有还原性的酚羟基被广泛认为是一种抗炎、抗菌和抗氧化剂<sup>[10]</sup>。

本实验通过蒸发干燥、取向冷冻及冷冻干燥技术制备出具有光滑致密层和疏松多孔的双层 CS 屏障膜。光滑致密层朝向软组织方向,可有效阻止上皮和结缔组织长入骨缺损区,为骨再生和修复提供空间;疏松多孔层朝向骨缺损方向,为成骨相关细胞提供黏附位点。在此基础,在 CS 双层膜上先接枝 4-羧基苯硼酸后使其具有硼酯键,通过硼酯键与 TA 结合得到 CS@TA 双层膜并形成 ROS 响应性药物桥连接体。在遇到高水平 ROS 时,硼酯键发生断裂,TA 从 CS 双层膜中解离缓慢释放 TA 清除过多 ROS。DPPH· 自由基清除率结果表明 CS@TA 双层膜具有较高的 ROS 清除效率。体外细胞实验结果表明,具有一定 TA 负载量的 CS@TA 双层膜具有良好的生物相容性;抗菌实验结果表明,CS@TA 双层膜对 *E. coli* 和 *S. aureus* 均有一定的抑制效果。以上实验结果表明,CS 双层膜通过双层结构设计兼具了屏障和促细胞黏附迁移功能,具有良好的生物安全性,同时通过修饰 TA 不仅赋予了 CS@TA 双层膜的良好 ROS 清除功能,还增强了其抗菌作用。

## 参考文献

- [1] Yu Y L, Li X L, Li J R, et al. Dopamine-assisted co-deposition of hydroxyapatite-functionalised nanoparticles of polydopamine on implant surfaces to promote osteogenesis in environments with high ROS levels [J]. *Mater Sci C Mater Biol Appl*, 2021, 131: 112473.
- [2] Lian M, Han Y, Sun B, et al. A multifunctional electrowritten bilayered scaffold for guided bone regeneration [J]. *Acta Biomater*, 2020, 118: 83–99.
- [3] Wu Y, Li X, Sun Y, et al. Multiscale design of stiffening and ROS scavenging hydrogels for the augmentation of mandibular bone regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2022, 20: 111–25.
- [4] 赵正宜, 肖剑虹, 刘重远, 等. 聚乙烯醇-细菌纤维素复合可吸收生物屏障膜的制备及理化性能研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(10): 1513–7.
- [5] 张开润, 许瑞, 邹多宏. 氧化石墨烯-壳聚糖复合膜的抗拉强度及其对人牙龈成纤维细胞增殖的影响 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2019, 54(5): 322–7.
- [6] Zhang K R, Gao H L, Pan X F, et al. Multifunctional bilayer nanocomposite guided bone regeneration membrane [J]. *MATERIALS*, 2019, 1(3): 770–81.
- [7] LogithKumar R, KeshavNarayan A, Dhivya S, et al. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 151: 172–88.
- [8] Zhao Y, Li J, Liu L, et al. Zinc-based tannin-modified composite microparticulate scaffolds with balanced antimicrobial activity and osteogenesis for infected bone defect repair [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12: 2300303.
- [9] Jafari H, Ghaffari-Bohlouli P, Podstawczyk D, et al. Tannic acid post-treatment of enzymatically crosslinked chitosan-alginate hydrogels for biomedical applications [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 295: 119844.
- [10] Ni Z, Yu H, Wang L, et al. Multistage ROS-responsive and natural polyphenol-driven prodrug hydrogels for diabetic wound healing [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(47): 52643–58.

## Preparation and biocompatibility of a bilayer chitosan barrier membrane loaded with tannic acid

Yang Xiaonian<sup>1</sup>, Zou Duohong<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032; <sup>2</sup>Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai JiaoTong University School of Stomatology, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011)

**Abstract Objective** To explore the feasibility of the bilayer chitosan barrier membrane loaded with tannic acid (CS@TA) for guided bone regeneration by exploring the reactive oxygen species (ROS) scavenging ability, biocompatibility, and antibacterial properties. **Methods** The single-layer chitosan (CS) film was prepared by self-evaporation, and the double-layer CS film was prepared by directional freezing and freeze-drying, and its microstructure was observed by scanning electron microscope. The prepared CS bilayer membrane was grafted with tannic acid (TA) in different proportions, and the interaction between TA and CS bilayer membrane was analyzed by Fourier infrared spectrometer (FITR). The ROS scavenging ability was tested by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and the double-layer membrane of loading TA scavenging efficiency of more than 90% was selected to continue the follow-up experiment. CCK-8 assay and lived dead staining were used to evaluate the survival rate of cell in each groups. MC3T3-E1 cells was adhesion the CS@TA barrier film for studying by SEM. Colony counting was performed to test its antibacterial performance against *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). **Results** One side was the smooth, dense while other side was rough, loose and porous, with a longitudinal ordered porous structure in cross-section of the double-layer membrane of CS@TA. With the addition of TA, the ROS scavenging ability of the double-layer membrane first increased rapidly and then stabilized slowly. The results of CCK-8 and lived and dead cells staining showed that excessive TA addition significantly affected the biocompatibility of the double-layer membrane. The counting results of bacterial dilution coating showed that compared with the double-layer membrane without TA loading, the double-layer membrane had certain antibacterial ability against *E. coli* and *S. aureus* when the appropriate amount of TA was added. **Conclusion** Thus the double-layer with appropriate TA loading has strong ROS scavenging ability, good biological performance, and certain antibacterial ability for *E. coli* and *S. aureus*.

**Key words** tannic acid; chitosan; reactive oxygen species; antibacterial; barrier membrane; directional freezing