

三维打印组织工程牙计算机辅助设计建模技术的应用

张嘉宇, 米雪, 刘毅, 何惠宇(新疆医科大学第一附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054)

文章亮点:

1 现阶段组织工程牙构建的难题之一, 在于难以构建出与缺失牙形状和大小一致的组织工程牙支架。近年来, 随着快速成型技术的发展, 使得采用三维打印技术制备出与正常牙齿形状一致的支架材料成为可能, 并有望以此支架材料控制组织工程牙发育为合适的形态及大小。其关键在于, 需要向三维打印系统提供一套完整适合的计算机辅助设计格式三维实体模型数据。

2 实验采用 MICRO CT 对离体大鼠第二磨牙进行连续扫描, 利用 MIMICS 软件读取所得的 DICOM 格式数据, 结合 CT 的灰度原理, 三维重建第二磨牙模型, 获得完整的 SD 大鼠第二磨牙外部轮廓, 所建立的模型与实体牙解剖外形一致。

关键词:

生物材料; 口腔生物材料; 三维打印; 组织工程牙; 组织工程牙支架; 国家自然科学基金

主题词:

组织工程; 计算机辅助设计

基金资助:

国家自然科学基金项目—三维打印构建组织工程化牙槽骨实验研究(81060088); 新疆维吾尔自治区科技支疆项目—三维打印构建复合信号诱导的组织工程牙(201291173)

摘要

背景: 国内外关于如何成功构建组织工程牙支架材料内部空间构型的文献报道较少。

目的: 建立适用于组织工程牙需求的支架材料 CAD 空间构型及支架结构实体微观模型 STL 格式文件。

方法: 采用 MICRO CT 对离体大鼠第二磨牙进行连续扫描, 将 MICRO CT 获得的 DICOM 格式文件导入 MIMICS 软件, 将生成的三维模型导入 GEOMAGIC12 软件, 提取外层轮廓, 利用偏移功能模拟得到大鼠磨牙外层轮廓数据。利用 CATIA V5R17 软件构建支架材料空间内部多孔微观模型单体, 在空间合适坐标上阵列得到组织工程牙内部支架整体模型, 通过变更单体构型还可快速建立多种整体支架构型。装配大鼠磨牙外层轮廓数据与内部空间支架得到三维打印组织工程牙 CAD 模型 STL 文件。

结果与结论: 成功建立了牙体组织支架微观结构 CAD 模型, 该 CAD STL 模型可直接用于三维打印系统快速成型组织工程牙支架。说明基于结合计算机逆向与正向工程建模技术, 可快速建立多种符合组织工程牙要求的支架材料空间构型。

张嘉宇, 米雪, 刘毅, 何惠宇: 三维打印组织工程牙计算机辅助设计建模技术的应用[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(38):6195-6199.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.38.023

CAD model design for three-dimensional printing of tissue-engineered tooth scaffold

Zhang Jia-yu, Mi Xue, Liu Yi, He Hui-yu (First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: There are less reports on how to successfully build the internal spatial configuration of tissue-engineered tooth scaffolds.

OBJECTIVE: To find a way to establish a series of three-dimensional digital modes for tissue-engineered tooth scaffold, such as CAD spatial configuration and Standard Template Library (STL) files.

METHODS: In order to get three-dimensional printing format of STL files, MICRO CT data of DICOM format were input into MIMICS and GEOMAGIC softwares, creating the outline of STL files. Then CATIA V5R17 software was used to create the three-dimensional digital mode of tissue-engineered tooth. Then, the overall model of the internal scaffold was obtained by arraying at the proper coordinates. Various overall scaffold configurations could be built rapidly by varying monomer configuration. The STL files of CAD model of three-dimensional printing tissue-engineered tooth were obtained by assembling the tooth outline mode and the internal scaffold.

RESULTS AND CONCLUSION: The CAD model was constructed successfully, and this model could be directly used for three-dimensional printing rapid prototyping system to produce tissue-engineered tooth scaffolds. These findings indicate that the three-dimensional digital mode based on reverse engineering and positive engineering can be established, which can be used to quickly build a variety of internal spatial configurations of scaffold materials required for tissue-engineered teeth.

张嘉宇, 男, 1986年生, 2013年新疆医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事三维打印及计算生物学研究。

通讯作者: 何惠宇, 教授, 博士生导师, 新疆医科大学第一附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2015)38-06195-05

稿件接受: 2015-06-26

http://www.crter.org

Zhang Jia-yu, Master, Physician, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: He Hui-yu, Professor, Doctoral supervisor, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2015-06-26

Subject headings: Tissue Engineering; Computer-Aided Design

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81060088; the Scientific Project for Supporting the Development of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 201291173

Zhang JY, Mi X, Liu Y, He HY. CAD model design for three-dimensional printing of tissue-engineered tooth scaffold. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(38):6195-6199.

0 引言 Introduction

龋病、牙周病、创伤、肿瘤等因素可引起牙列缺损、缺失,通过目前口腔修复方案虽能较大程度地恢复患者绝大部分的咀嚼功能,但修复体与牙体组织间仍存在着较大的弹性模量差异,同时因修复体缺少本体感受器官,因而在实际咀嚼运动中无法做到与天然牙较为接近的功能与效能。目前针对牙列缺损、缺失的临床修复方案主要为固定、可摘义齿等治疗手段。固定修复虽然在咀嚼效能上较为接近天然牙,但存在磨除临近健康牙体组织这一弊病,以此利用牙周潜力来恢复缺失牙位的功能;可摘义齿则存在咀嚼效能较为低下、需定时摘下清洁、容易滞留食物残渣等问题,由此可见两种修复方式均有弊病。通过三维打印技术在体外构建组织工程牙,将有望解决上述问题。三维打印技术已被普遍认为是快速成型领域中最具开发前景的新技术之一,最早由麻省理工学院Sachs等提出,现已被广泛应用于生物医学工程研究领域^[1]。虽然近些年以来,有关三维打印技术的研究及应用层出不穷,但国内外对于如何成功构建组织工程牙支架材料内部空间构型的文献报道较少。本实验利用三维计算机辅助设计软件构建出适用于通用三维打印系统的CAD STL格式组织工程牙支架空间微观模型,对三维打印组织工程牙的研究有着重要意义。

关于组织工程牙的构建,现阶段的实验手段主要是采用胚层重组方法复合或不复合支架材料进行体内移植,构建组织工程牙。Ikeda等^[2]采用牙源性上皮和间充质细胞混合培养(鼠胚胎发育14.5 d时)复合胶原凝胶培养构建组织工程牙,植入裸鼠上颌磨牙拔牙窝,使其继续生长发育。实验结果表明,该组织工程牙具备釉质、牙本质、牙髓、牙骨质等正常牙结构,甚至还形成了牙周组织,并与对颌牙形成了咬合接触;但组织工程牙的体积比正常牙略小。Honda等^[3-4]以聚乙醇酸网和胶原海绵作为支架,体外复合牙源性上皮和间充质细胞共培养(取自产后剥离的猪或犬磨牙牙胚),实验结果发现该方法构建的组织工程牙齿形成了类似正常牙齿的组织结构。以上研究表明应用胚层细胞重组的方法,结合支架材料,可以在体外或实验动物体内构建出类似正常牙齿的组织工程牙。

然而,目前这些实验方法均存在重复率较低、难以控制组织工程牙形状和大小等缺点。因而现阶段组织工程牙构建的难题之一,在于如何控制组织工程牙的形状和大小。随着三维打印快速成型技术和材料的不断改进与完善,三维打印技术在复杂立体结构产品制造方面的优势日益凸显,使得采用三维打印技术制备出与正常牙齿形状一致的

支架材料成为可能,并有望以此支架材料控制组织工程牙发育为合适的形态及大小。Ryan等^[5]利用三维打印成型金属钛支架材料,用于整形外科移植手术,该金属钛支架可以有效模拟多孔性骨骼的生物性能和机械性能,其孔径范围从200-400 nm,孔隙率为(66.8±3.6)%。Wili等^[6]以羟基磷灰石为原料,采用三维打印技术制备成形支架材料,该材料孔隙率为30%-64%,可用于静脉血管移植,将50%孔隙率的支架材料移植到大鼠体内血管中,该支架材料可成功为周围组织供血。Suan Prateeb等^[7]通过三维打印技术制作了羟基磷灰石/双酚A双甲基丙烯酸缩水甘油酯复合材料支架,将成骨细胞结合在这种支架材料表面,细胞形态正常,证明此种支架材料无毒。

针对组织工程牙构建技术存在的两个难题,一为重复率较低,二是难以控制组织工程牙的形状和大小,本项实验采用计算机辅助设计软件Mimics 10.01、Geomagic studio 12、CATIA V5 R17及Magics 12.01,构建课题所需要的支架计算机辅助设计模型STL打印格式文件,通过对该模型的构建,结合三维打印系统及适合的打印材料成型出组织工程牙所需的支架系统,以此来解决组织工程牙构建技术存在的难点。后期将以骨髓间充质干细胞和牙胚细胞作为种子细胞,以适合的生物材料作为支架材料,采用三维打印技术制备组织工程牙模型(藉此控制组织工程牙的形状和大小),并将此组织工程牙模型回植动物模型,通过细胞学、组织学方法探究组织工程牙发育的分子及细胞学机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 三维打印计算机辅助建模。

1.2 时间及地点 于2013年7月至2014年9月在新疆医科大学第一附属医院完成。

1.3 材料 6月龄健康雌性SD大鼠1只,由新疆医科大学动物实验基地提供,审批号: IACUC-20120917004,无牙列缺失,口内牙齿未见明显龋坏、磨耗,处死后分离完整下颌骨,消毒,采用微创器械及探针拔出完整第二磨牙,待用。

实验设备: ①MICRO CT扫描系统:采用德国YXLON公司的Y.Cheetah MICRO CT扫描仪对离体的大鼠第二磨牙进行连续扫描。②计算机工作站硬件配置: Intel CORE I7处理器, NVIDIA GeForce 630 M显卡, 4 G内存, 500 G硬盘。③计算机操作系统: Windows 7。④实验用软件: Mimics 10.01(Materialise's Interactive Medical Image

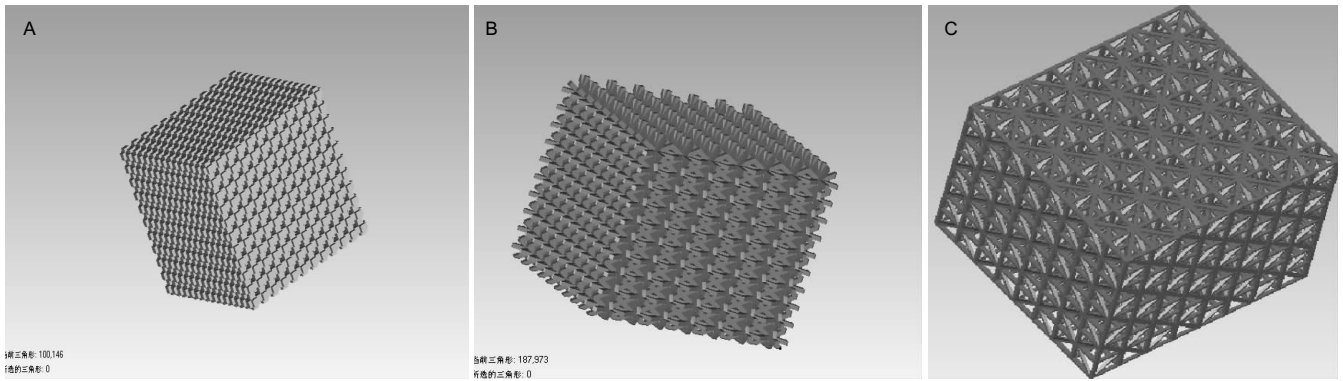


图1 组织工程牙内部三维空间构架

Figure 1 Three-dimensional structure of of tissue-engineered bone scaffolds

图注: 图中 A 为组织工程牙内部三维立方空间构架; B 为组织工程牙内部三维非正四面体加强构架; C 为组织工程牙内部三维含正四面体构架。

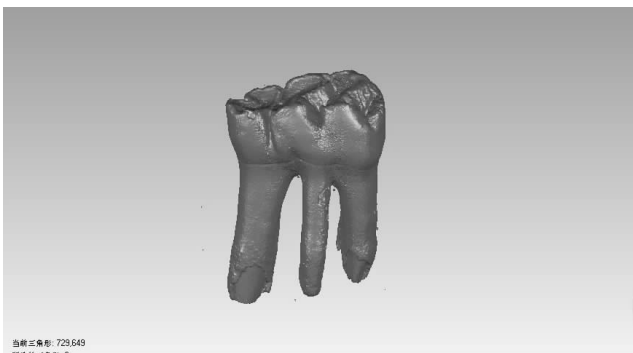


图2 三维重建大鼠第二磨牙

Figure 2 Three-dimensional reconstruction of the rat second molar

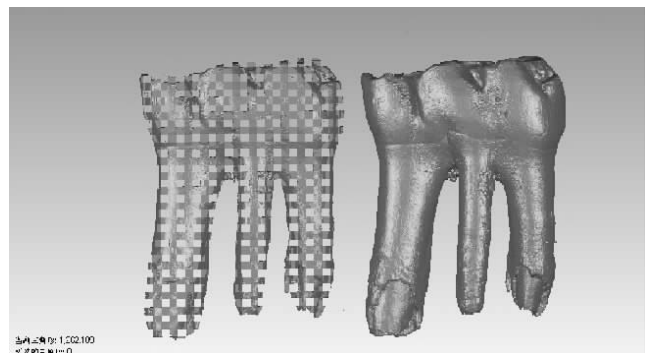


图3 装配后的组织工程牙 STL 文件

Figure 3 STL files of tissue-engineered tooth after GEOMAGIC software assembly

Control System), Geomagic studio 12, CATIA V5 R17, Magics 12.01。

1.4 实验方法

组织工程牙外部轮廓数据的获取: 采用MICRO CT对离体大鼠第二磨牙进行连续扫描, 扫描层厚为10 μm , 标本垂直放置于标本台上, 保持磨牙的长轴与扫描平面垂直。球管电压为120 kV, 球管电流为140 μA 。X射线光源与标本距离(SOD)60 mm, X射线光源与探测器距离(SID)600 mm, 放大率为10倍, 保存为DICOM格式文件^[8]。

读取DICOM格式文件并提取目标组织: 利用MIMICS软件读取所得的DICOM格式数据, 结合CT的灰度原理, 通过阈值调整, 调节影像对比度, 使目标组织清晰可辨, 区域增长分离, 去除多余噪点及三角面片, 优化第二磨牙轮廓, 通过阈值调整, 三维重建第二磨牙模型并完成封装, 保存为STL文件。将该模型文件导入GEOMAGIC12软件, 采用网格优化进行三角面片优化, 局部调整, 去除多余边界线, 获得完整的SD大鼠第二磨牙外部轮廓, 待用。

组织工程牙微观支架材料空间模型的构建: 利用CATIA的计算机辅助设计模块, 生成组织工程牙所要求的具有引导细胞、提供附着、满足支撑等功能的空间微观支架计算机辅助设计模型。通过200–500 μm 这一广大学者普

遍认可的合适孔径来设定初始单位及精度^[9]。在CATIA V5R17软件中, 进入机械设计零部件设计, 在三维空间中设计支架材料所需的单体结构。进入阵列模块, 阵列该单体, 使之在空间坐标中拓展, 至此得到组织工程牙支架材料微观结构。设计3种结构不同的空间支架系统, 一种孔隙为立方结构空间构架, 一种为非正四面体加强构架, 一种为内含正四面体加强构架。

装配组织工程牙外层轮廓与内部支架材料: 在GEOMAGIC12中分别导入组织工程牙及支架空间模型, 利用布尔运算功能获得组织工程牙外表轮廓与内部支架材料的装配模型, 将模型导入Magics12.01, 经过Stitching及Overlaps功能优化后, 检查有无空洞, 有无缺陷, 优化后保存STL文件。

2 结果 Results

2.1 成功构建3种不同结构的空问支架构型 见图1。

2.2 成功装配外层皮质骨与内部支架材料 逆向工程提取组织工程牙外部三维空间结构, 见图2; 采用GEOMAGIC软件装配组织工程牙外部三维空间结构与内部多孔支架, 见图3。经软件测量, 支架孔隙率约为74%, 孔隙连通率为100%, 孔隙大小约200 μm 。

3 讨论 Discussion

3.1 组织工程牙支架的重要性及快速成型技术的应用

牙齿缺失是人类口腔的常见病、多发病之一,可直接影响患者咀嚼、吞咽等功能,严重影响患者的生活质量。现阶段临床修复体种类虽多,仍难以恢复患者牙齿的“感觉”功能。近年来应用组织工程技术修复缺牙区牙体组织缺损已成为该领域的研究热点及难点。预先在体外环境中使正常组织种子细胞黏附于一种仿生器官结构的支架中,并使其在支架中生长,同时支架应具有良好的生物相容性,并且能够在适宜的时间内被机体所降解,之后将这种细胞-支架复合物回植入体内环境,以达到修复缺牙区牙体组织的目的。然而对于如何在体外构建个性化、精细化、满足组织工程要求的牙体组织支架系统,对恢复患者缺牙区组织、面部容貌外形、口颌系统功能的行使及后续修复体制作等至关重要^[10-11]。组织构建技术一直是组织工程研究领域的核心,由于牙体组织的非均质空间结构及其组成成分的复杂性,故目前尚没有可供参考的统一构建方法。国外学者Wu等^[12]通过三维打印组织工程骨支架研究发现,利用生物活性玻璃制成的支架,具有良好的机械力学性能及促进骨组织再矿化的能力。Mironov等^[13-14]研究发现,细胞只有在三维空间中处于相对的位置,才有助于细胞间物质及信号的传递和表达。由此可见支架材料的空间构型在组织工程研究领域的重要性。

现阶段组织工程牙构建的难题之一,在于难以构建出与缺失牙形状和大小一致的组织工程牙支架。近年来,随着快速成型技术(rapid prototyping, RP)的发展,使得采用三维打印技术制备出与正常牙齿形状一致的支架材料成为可能,并有望以此支架材料控制组织工程牙发育为合适的形态及大小。其关键在于,需要向三维打印系统提供一套完整适合的计算机辅助设计格式三维实体模型数据。目前该模型标准格式为STL(Standard Template Library),是由惠普实验研究所开发的一系列软件标准的统称。本实验采用MICRO CT对离体大鼠第二磨牙进行连续扫描,利用MIMICS软件读取所得的DICOM格式数据,结合CT的灰度原理,三维重建第二磨牙模型,获得完整的SD大鼠第二磨牙外部轮廓,所建立的模型与实体牙解剖外形一致,借助该逆向工程软件这一优势,可以完整恢复缺失牙的原有解剖生理外形,达到个性化定制缺牙区组织工程牙支架的这一目的。因而本实验采用计算机辅助设计技术,构建出满足三维打印系统需要的、具有个性化定制外形的组织工程牙支架计算机辅助设计模型。基于结合计算机逆向与正向工程建模技术,可快速建立多种符合组织工程牙要求的支架材料空间构型STL实体模型,同时利用该构建技术具有传统支架成型技术所无法比拟的优越性:可根据需求迅速制造出任意形态和空间内部支架结构,可重复性好,制作模型打印精度高。

3.2 组织工程牙支架材料空间构型的依据 目前组织工

程牙内部支架所面临的问题,主要集中在三维多孔结构的孔隙大小、比率及孔隙连通率方面。孔隙要有良好的通透性,从而利于细胞、血管等组织的生长,同时具备物质代谢所必须的通道。支架材料的孔径必须符合细胞生长、分化、融合等需求,大小应为300-500 μm ^[15]。Stoppato等^[16]的研究发现采用PDLLA为材料的组织工程骨支架,孔径大小在325-420 μm 的范围内较为适宜,利于种子细胞的生长、分化、繁殖;而当孔径小于275 μm 时,将会影响种子细胞的增殖、分化及细胞外基质功能的行使。孔隙率方面应界于50%-90%这一范围内,并且应尽可能的大,孔与孔之间应保证相互贯通,同时需兼备一定的力学性能^[17-19]。只有满足以上几个方面,细胞在植入支架材料后才能良好的生长、繁殖。而传统骨组织支架的成型大多采用熔融铸造、纤维编织、发泡等方法制造支架系统,难以做到孔径大小均匀一致,也难以达到较高的孔隙率、联通率^[20-23]。鉴于以上问题,采用三维打印技术研制符合具有特定需要的、具备精确三维空间构型的组织工程牙支架成为了目前研究的热点及难点。本实验所得计算机辅助设计支架模型系统首先在建立支架空间构型方面,采用计算机正向建模技术先建立单个空间结构,再利用阵列拓增法建立三维空间内支架材料的内部多孔隙组织结构。该方法的应用有效确保了每个孔隙的大小,统一了孔隙在模型各个部位出现的频率,孔隙率和连通率均达到细胞黏附、生长、繁殖等要求。在外部轮廓三维数据方面,因为采用由MICRO CT逆向重建技术生成模型,故生成的组织工程牙支架在外形轮廓上符合缺牙区个性化定制的需求。

3.3 与以往建模方法的对比 目前国内外关于支架材料建模的文章较为少见,一些学者采用Micro-CT结合逆向工程建立的组织工程骨支架模型,虽能较好建立含多孔结构的支架模型,但仍存在着一些问题。因为该方法采用的生物体内部支架系统,多为随机且不规则,对于如何去支内部支撑材料这一问题上并未给出完善的解决方案。同时Rao等^[24-25]研究发现支架形态上的一致性、孔隙的均匀性,在支架机械性能的提升上显得尤为重要。相较而言,本实验得到的支架模型,在X、Y、Z空间坐标中孔隙分布均匀一致,故支撑粉材较为容易去除并具有良好的力学性能。同时在本实验中通过变更支架空间单体结构的方式,便可方便快捷地得到多种支架构型,最后以三维打印通用STL格式保存、待用。这种格式适用于目前主流三维打印系统,采用所建立的三维组织工程牙计算机辅助设计模型,结合三维打印系统便可快速打印出符合需要的三维打印组织工程牙支架。本实验结合三维MICRO CT逆向重建技术、CATIA正向工程建模技术及三维打印技术,构建了计算机工业技术与口腔临床医学研究的平台,可为后续多种组织缺损患者提供个性化定制组织工程支架,使手术更为精确,愈后可获得更为可靠的修复效果,为构件组织工程支架系统打下了坚实的基础。

基于结合计算机逆向与正向工程建模技术, 可快速建立多种符合组织工程骨要求的支架材料STL格式计算机辅助设计空间构型, 利用三维打印机及合适的生物可降解材料便可快速成形出所需植入骨组织的形状和结构, 其仿生三维微观结构对于三维打印组织工程牙有着重要的研究价值。

致谢: 感谢导师何惠宇教授在本实验中的悉心指导与审校, 感谢米雪及刘毅在本实验中作出的贡献。

作者贡献: 实验设计为何惠宇, 实验实施为张嘉宇, 实验评估为何惠宇, 资料收集为米雪、刘毅, 张嘉宇成文, 何惠宇审校。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及与伦理冲突的内容。

学术术语: 组织工程牙-是指以天然或人工合成的可降解的、有一定空间结构的生物材料为载体, 将从成牙组织中分离、培养的一定量的生物活性细胞“种植”到载体支架上, 并提供细胞增殖和分化, 在体外或植入体内形成有活性的牙齿样的结构和牙齿。其目的是模拟体内细胞生长微环境, 再造人工组织或器官。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

4 参考文献 References

- [1] Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, et al. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomed Microdevices*. 2004;6(2):139-147.
- [2] Ikeda E, Morita R, Nakao K, et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13475-13480.
- [3] Honda MJ, Ohara T, Sumita Y, et al. Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006;64(2):283-289.
- [4] Honda MJ, Tsuchiya S, Sumita Y, et al. The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regeneration. *Biomaterials*. 2007; 28(4):680-689.
- [5] Ryan GE, Pandit A S, APatsidis DP. Porous titanium scaffolds fabricated using a Rapid Prototyping and Powder metallurgy technique. *Biomaterials*. 2008;29(27):3625-3635.
- [6] Will J, Meleher R, Treul C, et al. Porous ceramic bones scaffolds for vascularized Bone tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(8):2781-2790.
- [7] Suwan Prateeb J, Sanngam R, Suwanpreuk W. Fabrication of bioactive hydroxyapatite/bis-GMA based composite via three dimensional printing. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(7):2637-2645.
- [8] Ausiello P, Apicella A, Davidson CI. Effect of adhesive layer properties on stress-distribution in composite restoration—a 3D finite element analysis. *Dent Mat*. 2002;18(4):295-303.
- [9] Ciocca L, De Crescenzo F, Fantini M, et al. CAD/CAM and rapid prototyped scaffold construction for bone regenerative medicine and surgical transfer of virtual planning: a pilot study. *Comput Med Imaging Graph*. 2009;33(1):58-62.
- [10] Sohmura T, Kusumoto N, Otani T, et al. CAD/CAM fabrication and clinical application of surgical template and bone model in oral implant surgery. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(1):87-93.
- [11] Ouyang HW, Cao T, Zou XH, et al. Mesenchymal stem cell sheets revitalize nonviable dense grafts: implications for repair of large-bone and tendon defects. *Transplantation*. 2006; 82(2):170-174.
- [12] Wu C, Luo Y, Cuniberti G, et al. Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability. *Acta Biomater*. 2011;7(6):2644-2650.
- [13] Mironov V, Boland T, Trusk T, et al. Organ printing computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2003;21(4):157-161.
- [14] Kastrav WE, Palazzolo RD, Rowe CW, et al. Oral dosage forms fabricated by three dimensional printing. *J Control Release*. 2000;66:1.
- [15] Franco J, Hunger P, Launey ME, et al. Direct write assembly of calcium phosphate scaffolds using a water-based hydrogel. *Acta Biomater*. 2010;6(1):218-228.
- [16] Stoppato M, Carletti E, Sidarovich V, et al. Influence of scaffold pore size on collagen I development: A new in vitro evaluation perspective. *J Bioact Compat Pol*. 2013;28:16-32.
- [17] Sohmura T, Kusumoto N, Otani T, et al. CAD/CAM fabrication and clinical application of surgical template and bone model in oral implant surgery. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(1):87-93.
- [18] Charlton DC, Peterson MG, Spiller K, et al. Semi-degradable scaffold for articular cartilage replacement. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(1):207-213.
- [19] Mitsak AG, Kempainen JM, Harris MT, et al. Effect of polycaprolactone scaffold permeability on bone regeneration in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(13-14):1831-1839.
- [20] 张富强, 王运赣. 快速成形技术在生物医学领域中的应用[M]. 北京: 人民军医出版社, 2009.
- [21] Hench LL, Thompson I. Twenty-first century challenges for biomaterials. *J R Soc Interface*. 2010;7 Suppl 4:S379391.
- [22] Cao H, Kuboyama N: A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering. *Bone*. 2010;46:386-395.
- [23] Sultana N, Wang M. Fabrication of HA/PHBV composite scaffolds through the emulsion freezing/freeze-drying process and characterisation of the scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(7):2555-2561.
- [24] Rao RB, Krafcik KL, Morales AM, et al. Microfabricated deposition nozzles for direct-write assembly of three-dimensional periodic structures. *Adv Mater* 2005; (17):289-282.
- [25] Ghosh S, Parker ST, Wang XY, et al. Direct-write assembly of microperiodic silk fibroin scaffolds for tissue engineering applications. *Adv Funct Mater*. 2008;(18):1883-1889.