

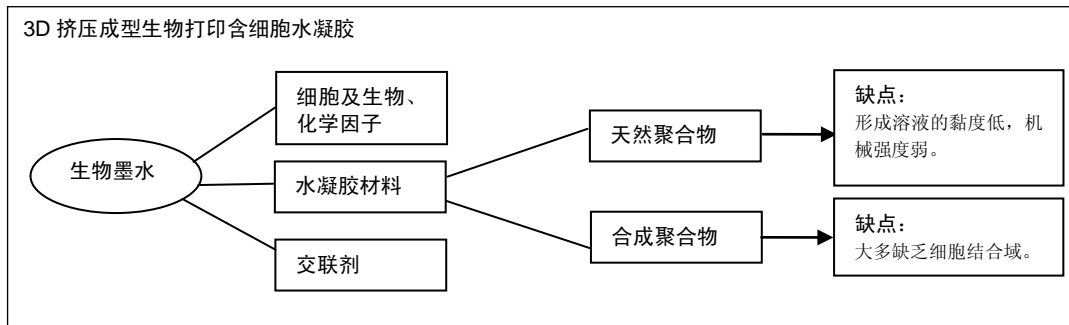
3D挤压成型生物打印含细胞水凝胶的理化性能

顾亚伟, 李 牧, 范子文, 王 龙, 李泽遥, 陈 昶(同济大学附属上海市肺科医院胸外科, 上海市 200433)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0746

ORCID: 0000-0002-4908-1433(顾亚伟)

文章快速阅读:



顾亚伟, 男, 1992年生, 江苏省丹阳市人, 汉族, 硕士, 主要从事气管修复、组织工程研究。

通讯作者: 陈昶, 教授, 同济大学附属上海市肺科医院胸外科, 上海市 200433

中图分类号: R318

文献标识码: A

稿件接受: 2017-12-03



文题释义:

3D生物打印: 其核心观念为直接打印负载细胞的生物材料构成支架, 这一新概念的优点在于: 细胞的浓度和空间分布及其他物理因素可控制; 有助于细胞的迁移, 可实现较大较厚组织的构建; 在打印的材料中可以添加其他生物、化学因子。

摘要

背景: 目前 3D 生物打印技术可用于打印无细胞材料和含细胞材料, 在解决器官、补片短缺的问题上开辟了新方法。

目的: 综述近年国内外有关 3D 挤压成型生物打印的研究, 总结该打印方法的原理、所用水凝胶种类、水凝胶的生物理化性能等最新进展。

方法: 以“3D bioprinting/three-dimensional bioprinting; extrusion/extrusive; cell-laden/cells/cellular; hydrogel”为检索词, 应用计算机搜索 PubMed 数据库 2006 至 2016 年的相关文献。

结果与结论: 3D 挤压成型生物打印技术生产原理简单, 过程可控, 产能较少, 不仅可通过快速成型个性化地制造器官支架, 而且可使细胞可控地分布于支架中, 更加精确地构建符合生理空间的含细胞组织。然而, 细胞在水凝胶内的生物学行为、水凝胶与细胞之间的相互作用、打印精度微纳米级别的提升目前仍在探索和研究阶段。随着这些问题的深入探讨和逐步解决, 3D 生物打印有望在未来成为组织工程学中的新的构建方法。

关键词:

生物材料; 水凝胶; 3D 生物打印; 挤压成型; 组织工程

主题词:

水凝胶; 墨水; 组织工程

基金资助:

上海市科学技术委员会科研计划项目(15JC1490900)

Physical and chemical properties of 3D extrusive bioprinting cell-encapsulated hydrogel

Gu Ya-wei, Li Mu, Fan Zi-wen, Wang Long, Li Ze-yao, Chen Chang (Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China)

Abstract

BACKGROUND: 3D bioprinting technology can be used to print non-cell and cell-laden materials, which provides a new pathway to solve the lack of transplanted organs or bio-patches.

OBJECTIVE: To conclude the printing mechanisms, kinds, biological and mechanical characteristics of hydrogels based on the development and advance in 3D extrusive bioprinting hydrogel.

METHODS: A computer-based search of PubMed database was performed to retrieve relevant articles published between 2006 and 2016, with the keywords of “3D bioprinting/three-dimensional bioprinting; extrusion/extrusive; cell-laden/cells/cellular; hydrogel”.

RESULTS AND CONCLUSION: 3D bioprinting is characterized as simple principle, controlled process, and less energy production, which can manufacture personalized organs or scaffolds by rapid prototyping technology, and precisely construct tissues with controllably distributed cells to mimics the physiological circumstance. However, the following aspects are still at an initial stage, including the biological behaviors of cells in hydrogel, the interactions between cells and hydrogels and the elevation of micro-nano precision of printing. With solutions to these problems, 3D bioprinting may become another novel construction method in the tissue engineering.

Gu Ya-wei, Master, Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Chen Chang, Professor, Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China

Subject headings: Hydrogels; Ink; Tissue Engineering

Funding: the Scientific Plan Program of Shanghai Science and Technology Committee, No. 15JC1490900

0 引言 Introduction

在临床医学中,一些患者器官的衰竭或缺损往往只能通过器官移植达到治疗效果,而目前器官的短缺是临床医生和患者面临的很大的问题。生物组织工程学就是为解决这一问题而诞生的学科,由Langer和Vacanti^[1]于20世纪90年代提出,其基本思想为先构建一个具有外形的可降解的多孔支架,然后将细胞附在支架表面^[2],这也就是传统的基于支架的生物制造方法。通过这种方法,虽然有一部分细胞可通过孔隙进入支架,但大部分细胞仍分布于支架的表面^[3],无法更好地深入支架内部,造成细胞分布不均、生长因子不可控及分泌的细胞外基质不均质结果。早期的3D打印技术应用在组织工程上,只解决了支架快速成型问题,其在本质上与传统组织工程的方法一致,并没有在生物学功能构建上取得更进一步的成果。近年,随着3D培养技术的发展,很多学者证明,与2D培育环境相比,在3D培育环境中,无论是细胞的形态还是细胞的生长方式都更接近于天然细胞^[4-5]。日本学者Nakamura^[6]首先提出3D生物打印的概念,其核心观念为直接打印负载细胞的生物材料构成支架。这一新概念的优点在于:细胞的浓度和空间分布及其他物理因素可控制;有助于细胞的迁移,可实现较大较厚组织的构建;在打印材料中可添加其他生物、化学因子^[7-8]。

在3D生物打印中,统称被打印的材料为负载细胞材料,这种形式也提示在打印的过程中及打印之后,材料中所包含的细胞必须保证在一定存活率之上,而且其中的生物、化学因子必须仍然有效。因此选择一种合适的3D打印类型也十分重要。如今被广泛运用的3D打印技术比如立体光固化成型、选择性激光烧结、熔融沉积成型,都因为打印过程中产生大量的热力或高能而无法打印负载细胞材料。另一种喷墨式打印虽然可用,但其在空间结构塑型的能力上较弱^[9]。因此,挤压成型式打印被视为打印负载细胞材料的较好选择。成型式打印方法原理简单,可在生理条件下通过力学的推进可控制地将材料从喷口或针头挤压出来^[10]。此外,挤压成型可将材料以不同的形式进行打印,比如细胞球、材料细丝等。在3D生物打印制造中另外一个核心因素是维持材料内部细胞的生物活性。每种细胞都需要一种特定的微环境来维持细胞骨架和正常的生物学行为^[11],比如迁移、增殖、分泌、分化等。因此在基于3D挤压成型的生物制造这一领域中,研究者在不断探索如何优化打印形式、材料及配方、交联方式,以求达到最高的生物制造效率。

文章将综述近年发表在国内外各期刊的有关3D挤压成型生物打印的研究,总结3D挤压成型生物打印在生物材料、打印与交联和细胞的交互作用及细胞微环境的最新进展。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

1.1.1 检索数据库 PubMed数据。

1.1.2 检索途径、检索词及检索词逻辑关系 ①检索途径: 主题词检索、关键词检索、标题检索、摘要检索、引文检索; ②检索词: 3D bioprinting/three dimensional bioprinting; extrusion/extrusive; cell-laden; hydrogel; ③检索逻辑组配: #1(3D bioprinting OR three dimensional bioprinting) AND (extrusion OR extrusive) AND (cell laden OR cells OR cellular) AND(hydrogel); ④检索的时间范围: 2006至2016年。

1.2 文献筛选标准

文献筛选标准: ①看标题,是否与3D生物打印水凝胶相关; ②看摘要,检查打印对象是否为含细胞水凝胶; ③被引次数与杂志影响因子,引用次数越多、影响因子越高参考价值越大。

文献筛选标准的制定: ①文献选题是否新颖,发表时间不宜久远; ②文献内容具有可靠性和科学性; ③文献来源可靠,与选题相关。

1.3 文献质量评价 初步检索得到英文文献424篇,排除与研究相关性低、研究内容陈旧及重复性文献,最终纳入46篇符合标准的文献。

2 结果 Results

2.1 生物墨水 所有被打印的物料统称为生物墨水,包括以下几个方面: 支架材料,通常是由天然聚合物或合成聚合物形成的水凝胶; 细胞及生物、化学因子; 交联剂。在挤压成型式打印中,由于生物墨水是通过打印机的喷头被挤压出来的,所以生物墨水的可打印性是首先需要被考虑的因素。生物墨水应该满足以下的条件: 类流体的形态,可通过很小口径的打印喷头; 在打印过程中不会堵塞喷头。衡量这2个条件的是生物墨水的黏度。首先需要确定能打印成型的生物墨水的黏度,其次还需要对内在细胞兼容性的平衡,才能确定最佳的墨水配比^[12]。其他影响生物墨水配制的因素包括合理的机械性能、生物墨水微环境等。

2.1.1 水凝胶 水凝胶是在水溶性高分子中引入一部分疏水基团和亲水基团,亲水残基与水分子结合,将水分子连接在网状内部,而疏水残基遇水膨胀的交联聚合物。由于这种特性,水凝胶被用于3D生物打印的支架材料,其主要作用是维持三维空间结构及组成细胞外基质。作为生物墨水中的主要组成部分,水凝胶很大程度上影响了生物墨水的生物和机械性能。选择一种合适的水凝胶是3D生物制造的基础和关键。理想的水凝胶应当具备以下几个特征: 可快速、可控的交联,交联后能维持形状,避免形变; 含有细胞结合序列,增强细胞的结合和分化; 在内在细胞产生自己的细胞外基质,形成组

织前能够稳定地维持支架结构^[13];允许营养物质和氧气进入,同时可让代谢产物排出^[14]。

在选择水凝胶时,亲水的、吸水性强的聚合物比较受青睐^[15-17],吸水的聚合物在交联后形成有微小孔隙、透水的水凝胶,允许培养液的渗入及代谢产物的排出。不同的聚合物交联后形成的孔隙和透水性各有差异。聚合物分为天然来源的聚合物和人工合成聚合物。天然来源聚合物形成的水凝胶,由于和细胞外基质存在一定的相似性,再通过适量加入其他成分,可一定程度地复制细胞外基质,给细胞提供结构、物理和生物学行为上的支持,成为近年来研究的热点材料^[14, 18]。但天然来源聚合物常见的不足是形成溶液的黏度低,机械强度弱,因此组成的生物墨水打印性较差,交联后的水凝胶柔韧性不足。相较之下,人工合成聚合物的机械性能都更加可控^[19]。与天然来源聚合物不同的是,这类合成聚合物大多缺乏细胞结合域^[20],所以在生物制造中的应用受限。各类水凝胶性能的比较见表1^[21]。

2.1.2 新型水凝胶与混合配方策略 上述提到,无论是天然聚合物还是人工合成聚合物形成的水凝胶,都有各自的优缺点。如何利用好两种材料的优点,弥补各自的不足也成为很多研究的主题。一方面可通过对聚合物的改性实现更好的性能,例如对于明胶的改性。明胶是天然胶原部分降解的产物,其含有细胞结合域RGD(Arg-Gly-Asp)序列及基质金属蛋白酶作用部位^[22]。明胶是一种对温度敏感的材料,当其溶液温度低于上临界溶解温度时,明胶分子相互交联形成凝胶;而当温度上升超过上临界溶解温度时,分子简单交联作用失效,复成水溶液。这种交联方式受温度影响大,且难以控制。甲基丙烯酸酯明胶(gelatin methacrylate, GelMA)是通过在明胶的RGD序列上引入甲基丙烯酸酯分子侧基。在加入光引发剂后,经过紫外光照射,光引发剂释放活性碎片,进而引发溶液中单体明胶分子上的甲基丙烯酸酯侧基相互交联,形成水凝胶^[22]。该交联过程受到溶质浓度、引发剂的浓度及光照时间影响,因此更容易控制。另外像硫酸化的壳聚糖^[23],最早应用于药物递释,相比于未改性的壳聚糖,其有很好的黏膜黏附性、促进渗透作用,因此也被应用于3D生物打印中作为支架材料。其他用于改性的功能基团还有如丙烯酸酯、酪酸等^[24-25]。另一方面,可通过材料的混合各取所长,尽可能实现多样的生物功能和物理性质。在这种策略中,仍然以天然聚合物为主要成分,合成的聚合物为辅助材料;或作为牺牲材料起临时作用而在后期被移除。Kang等^[26]的研究中使用甲基丙烯酸酯明胶/聚乙二醇二丙烯酸酯/海藻酸钠打印心脏瓣膜细胞,其中聚乙二醇二丙烯酸酯作用是获得可调的机械性能,而海藻酸钠是用于增加黏度。Schuurmann等^[27]用透明质酸增加黏度。透明质酸广泛存在于人类和动物组织中,目前在美容和再生医学上已得到较多应用。在3D生物打印中也被视为可模拟细胞外基质的一种理想材料。此外,胶原/海藻酸钠、琼脂/聚乙二醇、海藻酸钠/聚丙烯酰胺、海藻酸钠/甲基纤维素

等配方也都被用于3D生物打印的研究。

除了对一些传统材料进行改进外,也有一些研究致力于新材料的开发。Cheng等^[28]的研究展示了一种对pH值敏感的全DNA水凝胶。这种水凝胶是通过单一类型的DNA“Y”型结构在一定pH值下相互交联形成,当pH值改变时,水凝胶又可快速转化成水溶液。此后一种通过DNA交联的多肽-DNA结合物被用于原位多层3D生物打印^[29]。这种DNA水凝胶不仅具有不溶胀、不收缩、可降解等优势,还可协同纳米粒子、蛋白、多聚物发挥更多元的生物功能。

2.2 打印与交联对水凝胶内部细胞的影响

2.2.1 可打印性和打印损伤 挤压式3D生物打印机通常由生物墨水分配系统、全自动打印系统及打印平台组成。打印时,由电脑控制墨水分配系统根据设计的结构精确地将墨水仓中的生物墨水通过压力被挤出成型。一般打印的形状和结构可通过计算机辅助设计(Computer Aided Design, CAD)来完成,也可直接采用CT或MRI影像中的数据,这也是3D生物打印高度个性化和精确化的因素之一。

生物墨水分配系统中的压力可通过气体、机械或螺线管等方式实现^[30](图1)。其中气压式分为阀门式和无阀门式。无阀门式原理简单,应用更加广泛,而在打印精度上则略逊于阀门式。机械式可通过活塞或螺旋来施加压力。在控制方面,活塞式更加直接简单,而螺旋式则在空间上有更好地把控,并且适合打印一些黏度较高的生物墨水。螺线管式通过电磁场的产生,抬起墨水仓中的磁铁,生物墨水填充于间隙中时,电磁场消失,磁铁被下方的磁铁吸引落下将间隙中的生物墨水挤出成型。虽然挤压的原理不同,但打印的大致流程较为类似。生物墨水从墨水仓被挤压至喷嘴,最后被挤出至平台。相比于其他打印类型,比如喷墨式生物打印,挤压生物可打印更高黏度的生物墨水,这也使打印高密度细胞生物墨水成为可能。与此同时,流体通过管道时,管道内壁会对流体产生摩擦力,即剪切力。剪切力的存在会作用于生物墨水内部的细胞,产生相应的损伤,这也是打印过程中影响细胞存活及其生物学性能的主要因素。在一般情况下,剪切力与距管道内壁的距离呈负相关。而在打印过程中生物墨水的黏度、挤压力大小、喷嘴内径也都会影响剪切力。因此如何减小剪切力避免造成细胞的损伤同时,又不降低生物墨水的打印性^[27],也是3D生物打印中值得研究的一部分。

Blaeser等^[31]对于剪切力的研究发现,随着剪切力的增加,打印后的细胞存活率下降,不仅如此,在后期培育中,受到高剪切力的细胞生长和数量也明显低于对照组。当打印过程中剪切力小于5 kPa时,其对细胞几乎不产生短期和长期损伤。该研究采用的材料为海藻酸钠,打印对象为小鼠成纤维细胞和骨髓间充质干细胞,结果虽然存在一定的局限性,但对其他种类的生物墨水和细胞仍有参考价值。此外,对于一些温度敏感性材料,如明胶,在打印的时候受到温度的影响较大。Zhao等^[12]

表 1 水凝胶的种类及优缺点

来源	生物墨水	交联机制	塑形性	打印精度	细胞支持能力	缺点
天然来源	海藻酸钠	离子交联	一般	400-600 μm	低	缺乏细胞结合域
	明胶	共价交联; 酶交联; 物理交联(温度)	一般	350-450 μm	高	黏度低, 器械完整性低
	I 型胶原	物理交联	差	1 000 μm	高	黏度低, 器械性能差
	纤维蛋白	酶交联	好	-*	一般	生物降解速度快, 不可逆的凝胶化
	透明质酸	物理交联; 共价交联	好	(730±28) μm	高	不稳定
	去细胞细胞外基质	物理交联	差	-*	高	黏度低, 机械强度差
合成生物墨水	壳聚糖	离子交联	差	400 μm	一般	机械强度低, 细胞存活率低
	聚乙二醇	共价交联	-*	-*	一般	缺乏细胞结合域
自组生物墨水	普朗尼克酸	共价交联	好	150 μm	低	缺乏细胞结合域, 细胞存活率低, 机械强度差
	Cd-Ad 透明质酸	非共价交联	一般	(222.6±29.7) μm	一般	机械强度低
	DNA-肽	非共价交联	一般	500 μm	一般	机械完整性低, 黏度低

表注: *表示无数据支持。

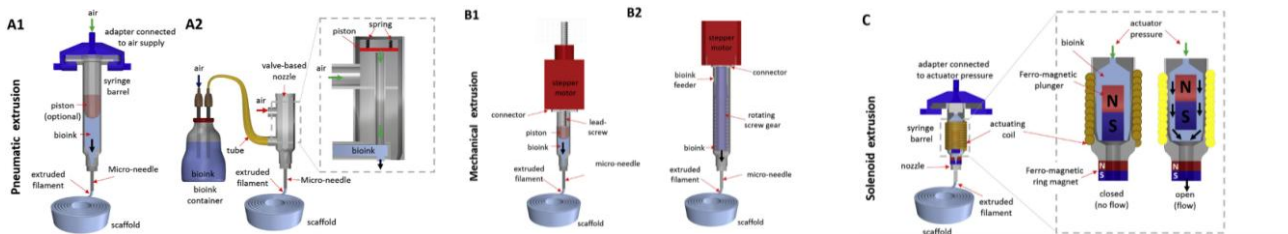


图 1 挤压成型 3D 打印系统^[30]

图注: 图中 A 为气压制挤压打印, A1 为无阀型, A2 为带阀型; B 为机械式挤压打印, B1 为活塞推动式, B2 为螺旋推动式; C 为螺线管式。

对不同浓度的明胶、明胶海藻酸钠混合物在不同温度下及不同料持仓时间进行流变性能测试, 通过此方法可找到最合适的打印温度, 并且确保在一定时间内打印能够维持细胞高存活率。

2.2.2 交联过程 水凝胶前体在打印后需要经过交联固化, 成型后维持结构外形。根据原理交联一般分为物理交联和化学交联两大类, 具体的交联方式因聚合物的种类各有不同。通常交联剂的浓度、交联时间影响了最终打印后水凝胶的硬度和机械强度。打印的水凝胶在不变形的基础上也必须确保内部细胞的存活, 因此交联的强度不宜过大。选择一种对细胞损伤最小的交联剂和交联方式是生物制造前期构建中的关键。Kang 等^[26]的研究对比了两种光引发剂, 即 Irgacure2959 和 VA086 对于细胞存活率的影响。相比于 VA086, Irgacure2959 在提高水凝胶硬度的情况下降低了对细胞的损伤。另外该研究还证明了过氧化氢酶可减少紫外光对细胞的损伤。

此外, 也有学者研究交联方式对于打印的改善。天然聚合物海藻酸钠可被钙离子交联, 然而纯海藻酸钠的浓度会影响内部细胞的存活, 4% 的浓度是一个分水岭, 当海藻酸钠浓度低于 4% 时, 打印后细胞存活率在 90% 左右, 但 4% 浓度以下的海藻酸钠溶液由于流动性较大, 因此成型性不很理想; 而当海藻酸钠浓度高于 4% 时, 细胞存活率随浓度升高明显下降。基于此, Tabriz 等^[32]使用多次交联方法打印海藻酸钠细胞混合液。将海藻酸钠预先与浓度较低的钙离子溶液混合, 形成部分交联海藻酸钠溶液, 打印时再逐层用较高浓度钙离子溶液交联, 待打印结束, 整个结构浸没于钡离子溶液中加强交

联。此方法解决了低浓度海藻酸钠打印性差的问题同时, 保证了细胞的存活率。类似的方法也用于其他材料的打印中, 比如 Bertassoni 等^[33]用紫外短时间交联 GelMA 溶液形成部分交联状态, 而后挤压成型。

2.3 水凝胶模拟细胞微环境 传统的贴壁细胞培养为 2D 单层培养, 无法提供类似细胞在体内立体的微环境。在 3D 结构中, 细胞在空间上分布于水凝胶中, 水凝胶不仅起到了支撑作用, 也起到类似于细胞外基质的作用。一方面 3D 生物打印可构建具有一定孔隙的结构, 另一方面, 水凝胶本身也具有更微小的孔隙, 二者都能使营养物质能够渗入到立体结构内部。除此之外, 细胞在水凝胶内还可感受到能够决定细胞命运的生物和机械信号^[4], 这两种信号来自于细胞和细胞之间及细胞与细胞外基质之间的交互作用。细胞通过对这些信号的反应产生相应的下游生物学活动。因此, 在这种立体结构中, 细胞在汲取营养物质、生长、繁殖、分化和分泌上都区别于传统单层培养^[4]。

2.3.1 机械信号 细胞在水凝胶中能够感受到的机械信号分为两种, 即水凝胶的硬度和结构中的应力及表面张力。

通常正常人类组织的硬度在 0.1-40 kPa 之间。Discher 等^[34]的研究表明, 细胞外基质的硬度能够调控细胞的生长、形态和分化, 对干细胞的影响尤其明显。Engler 等^[35]用不同硬度覆盖胶原的聚丙烯酰胺水凝胶培养人类间充质干细胞, 发现当水凝胶硬度接近某种天然组织时, 间充质干细胞会往该种组织中的细胞分化。

此外, 细胞在正常组织中也受到不同的应力, 如张

力(韧带)、压力(软骨)、剪切力(血管内皮)等。细胞在感受到这些应力后,内部的机械信号通路被激活,从而改变某些基因的表达,最终影响细胞的行为。例如在胶原中被周期拉伸的心肌细胞倾向于形成沿长轴排列的相互连接的心肌束^[36]。平滑肌细胞在胶原中展现出沿着拉伸方向的排列方式和定向的迁移行为,成骨相关的基因表达及钙沉着也沿此方向有所下降^[37]。

通常水凝胶的硬度由多聚物的浓度和交联剂密度决定^[38]。对于一些微小的组织补片,均质的水凝胶可满足制造要求,其中的聚合作用可广泛单一地进行,无需太多选择性。比如用离子溶液交联时,仅一种离子浓度或者在光固化过程中,紫外线的剂量和照射时间固定^[39]。然而一些天然组织并非机械性能均质的,如肌腱、心脏瓣膜等^[40-41]。这种情况下,单一的交联方法无法最大程度地复制天然组织的机械性能,导致无法真实地获取细胞在真实情况下的生物学行为。因此研究者开发了一些模式化的、有梯度变化的水凝胶系统,用于研究机械性能不均质性对细胞行为的影响。这些由水凝胶系统通过可变的交联过程或多重交联实现。一些研究结果也表明,相比于单一交联的水凝胶,选择化交联的水凝胶或者逐步交联的水凝胶更有利于细胞的生长或控制细胞的铺展^[24]。

2.3.2 生物信号 细胞外微环境的另一重要因素为生物学因素。为了能够最大程度地保持打印后的细胞生物学功能,仿生细胞外生物环境是一种解决方案,也被称为材料仿生学。水凝胶系统本身即是一种很有前景的细胞传递系统,原因如下:其亲水表面与体液接触时有较低的界面张力,可减少蛋白的吸收和多余的细胞黏附^[42];具有高度渗透性,可提高营养物质和代谢产物的转运^[43]。在天然的细胞外基质中,有至少30种分子组成其多态的结构(例如胶原、糖蛋白、弹力蛋白、蛋白多醣等),形成了支撑细胞和维持组织形态的网络。基于此前对于细胞学的研究和知识,确定每种细胞对应细胞外基质中的成分并不困难,为仿制提供了依据。一般而言,蛋白质和细胞因子是两个用于提升细胞性能的重要成分^[34]。

Jones等^[44]用添加了粘连蛋白聚乙二醇水凝胶培养人类牙髓干细胞,相比于没有添加粘连蛋白的水凝胶,其存活率和铺展能力都更佳。在Cui等^[45]的研究中,软骨细胞在成纤维因子2和转化生长因子 β 1的作用下具有最好的成软骨特性,因为两种的协同刺激促进软骨细胞的增殖和成软骨表型的形成。该研究还指出,生长和分化因子应当配伍低密度的细胞,效果更好。为了能够高度模拟细胞外基质,Skardal等^[46]对组织内的细胞外基质进行脱细胞处理,混合于生物墨水中,可给每种细胞提供特定的细胞外基质成分。

在模拟细胞外基质和细胞关系的过程中,同样存在失真和平衡问题。一方面,在生物体内的细胞外基质是一个动态过程,无论是组织的机械性能还是生物成分,都会随着发育、衰老和病理过程而变化,这给水凝胶仿生细胞外基质带来了很大挑战;另一方面,水凝胶和细

胞的组合也是一个动态过程,细胞在分泌细胞外基质、细胞因子等的同时,原来作为细胞外基质的水凝胶也在不断降解,如何确保两者速率保持一致,保证制作的组织结构维持形状不塌陷,一直以来也是难以控制的因素。目前大多研究注意到了细胞和水凝胶在体外培育和体内培育的动态变化,但还不能十分精确地掌控这一动态变化的发生。

3 讨论 Discussion

目前3D挤压生物打印技术不仅可通过快速成型个性化地制造器官支架,而且可使细胞可控地分布于支架中。这种技术的特点在于生产原理简单,过程可控,产能较少,因此对细胞的控制更佳,且对活细胞的损害较小。尽管如此,成熟的制造方案到目前为止仍未见系统的报道,其根本原因在于对于生物墨水研究仍处于探索阶段,生物墨水的配方和组成形式多样,各有优劣;已发表或报道的研究大多止步于体外研究,形成的组织、器官雏形在生物学功能上仍不完善。由此也可看出,在未来基于3D挤压打印的生物制造领域,生物材料研究依旧是焦点。对原有材料的优化,新材料的发掘及不同材料之间的整合为生物支架材料开辟了各种路径。此外,经典的细胞学、组织学知识仍旧不能忽视,其在构建细胞微环境设计中将得以重用。从近年的研究中也并不难发现,生物制造今后将不只是在空间上高度模拟,还将涉及动态变化过程,比如高度模拟细胞生长、发育、分化,细胞形成组织,组织构成器官一系列过程,而不是简单地模拟某一组织一个时间点的成熟形态。这种动态的制造一方面可以利用生物小单位以及构成的微型生态系统的自主性,另一方面这种制造产物更符合器官的发育变化,也更有可能形成完整的系统。

作者贡献: 构思并设计综述为顾亚伟,资料收集为顾亚伟、范子文、王龙和李泽遥。分析和解析数据为顾亚伟和李牧,顾亚伟成文,陈昶审核。

经费支持: 该文章接受了“上海市科学技术委员会科研计划项目(15JC1490900)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA指南)。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。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。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-926.

- [2] Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12(1):107-124.
- [3] Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, et al. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res.* 2001; 55(2):203-216.
- [4] Colacino JA. 3D human tissue culture: modeling environmental effects on the stem cell epigenome. *Epigenomics.* 2016;8(11):1453-1457.
- [5] Caiazzo M, Okawa Y, Ranga A, et al. Defined three-dimensional microenvironments boost induction of pluripotency. *Nat Mater.* 2016; 15(3):344-352.
- [6] Nakamura M, Iwanaga S, Henmi C, et al. Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. *Biofabrication.* 2010;2(1):014110.
- [7] Fedorovich NE, Schuurman W, Wijnberg HM, et al. Biofabrication of osteochondral tissue equivalents by printing topologically defined, cell-laden hydrogel scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(1): 33-44.
- [8] Derby B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science.* 2012; 338(6109):921-926.
- [9] Nakamura M, Nishiyama Y, Henmi C, et al. Inkjet bioprinting as an effective tool for tissue fabrication[C]. proceedings of the NIP & Digital Fabrication Conference, F, 2006.
- [10] Kirchmayer DM, Iii RG, Panhuis MIH. An overview of the suitability of hydrogel-forming polymers for extrusion-based 3D-printing. *J Mater Chem B.* 2015;3(20):4105-4117.
- [11] Kilpatrick JI, Revenko I, Rodriguez BJ. Nanomechanics of Cells and Biomaterials Studied by Atomic Force Microscopy. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(16):2456-2474.
- [12] Zhao Y, Li Y, Mao S, et al. The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology. *Biofabrication.* 2015;7(4): 045002.
- [13] Poveda-Reyes S, Moulisova V, Sanmartin-Masia E, et al. Gelatin-Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterbalance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation. *Macromol Biosci.* 2016;16(9):1311-1324.
- [14] Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, et al. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater.* 2009; 21(32-33):3307-3329.
- [15] Jungst T, Smolan W, Schacht K, et al. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. *Chem Rev.* 2016;116(3):1496-1539.
- [16] Kang HW, Lee SJ, Ko IK, et al. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):312-319.
- [17] Pescosolido L, Vermonden T, Malda J, et al. In situ forming IPN hydrogels of calcium alginate and dextran-HEMA for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2011;7(4):1627-1633.
- [18] Seliktar D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. *Science.* 2012;336(6085):1124-1128.
- [19] Gasperini L, Mano JF, Reis RL. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J R Soc Interface.* 2014;11(100): 20140817.
- [20] Wolf MT, Daly KA, Brennan-Pierce EP, et al. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials.* 2012;33(29): 7028-7038.
- [21] Panwar A, Tan LP. Current Status of Bioinks for Micro-Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Molecules(Basel, Switzerland).* 2016;21(6).pii: E685.doi: 10.3390/molecules21060685.
- [22] Nichol JW, Koshy ST, Bae H, et al. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials.* 2010;31(21):5536-5544.
- [23] Sakloetsakun D, Bernkop-Schnürch A. Thiolated chitosans. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2010;20(1):63-69.
- [24] Khetan S, Burdick JA. Patterning network structure to spatially control cellular remodeling and stem cell fate within 3-dimensional hydrogels. *Biomaterials.* 2010;31(32):8228-8234.
- [25] Toh WS, Lim TC, Kurisawa M, et al. Modulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis in a tunable hyaluronic acid hydrogel microenvironment. *Biomaterials.* 2012;33(15):3835-3845.
- [26] Kang LH, Armstrong PA, Lee LJ, et al. Optimizing Photo-Encapsulation Viability of Heart Valve Cell Types in 3D Printable Composite Hydrogels. *Ann Biomed Eng.* 2017;45(2):360-377.
- [27] Schuurman W, Levett PA, Pot MW, et al. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromol Biosci.* 2013; 13(5):551-561.
- [28] Cheng E, Xing Y, Chen P, et al. A pH-triggered, fast-responding DNA hydrogel. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(41):7660-7663.
- [29] Li C, Faulkner-Jones A, Dun AR, et al. Rapid formation of a supramolecular polypeptide-DNA hydrogel for in situ three-dimensional multilayer bioprinting. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015;54(13): 3957-3961.
- [30] Ozbolat IT, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials.* 2016;76:321-343.
- [31] Blaeser A, Duarte Campos DF, Puster U, et al. Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Adv Healthc Mater.* 2016;5(3): 326-333.
- [32] Tabriz AG, Hermida MA, Leslie NR, et al. Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. *Biofabrication.* 2015;7(4):045012.
- [33] Bertassoni LE, Cardoso JC, Manoharan V, et al. Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels. *Biofabrication.* 2014;6(2): 024105.
- [34] Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.* 2009;324(5935):1673-1677.
- [35] Engler AJ, Caragkrieger C, Johnson CP, et al. Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *J Cell Sci.* 2008;121(22): 3794-3802.
- [36] Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, et al. Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct. *Circ Res.* 2002;90(2):223-230.
- [37] Pang Y, Wang X, Lee D, et al. Dynamic quantitative visualization of single cell alignment and migration and matrix remodeling in 3-D collagen hydrogels under mechanical force. *Biomaterials.* 2011;32(15): 3776-3783.
- [38] Diederich VE, Studer P, Kern A, et al. Bioactive polyacrylamide hydrogels with gradients in mechanical stiffness. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(5): 1508-1519.
- [39] Hockaday LA, Kang KH, Colangelo NW, et al. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication.* 2012;4(3):035005.
- [40] Patwari P, Lee RT. Mechanical Control of Tissue Morphogenesis. *Circ Res.* 2008;103(3): 234-243.
- [41] Ulrich TA, De Juan Pardo EM, Kumar S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res.* 2009;69(10):4167-4174.
- [42] Abraham S, Brahim S, Ishihara K, et al. Molecularly engineered p(HEMA)-based hydrogels for implant biochip biocompatibility. *Biomaterials.* 2005;26(23):4767-4778.
- [43] Tse M, Uludag H, Sefton MV, et al. Secretion of recombinant proteins from hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate capsules. *Biotechnol Bioeng.* 1996;51(3):271-280.
- [44] Jones TD, Kefi A, Sun S, et al. An Optimized Injectable Hydrogel Scaffold Supports Human Dental Pulp Stem Cell Viability and Spreading. *Adv Med.* 2016;2016:7363579.
- [45] Cui X, Breitenkamp K, Lotz M, et al. Synergistic action of fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor-beta1 enhances bioprinted human neocartilage formation. *Biotechnol Bioeng.* 2012; 109(9):2357-2368.
- [46] Skardal A, Devarasetty M, Kang HW, et al. A hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and mechanical properties in bioprinted tissue constructs. *Acta Biomater.* 2015; 25:24-34.