

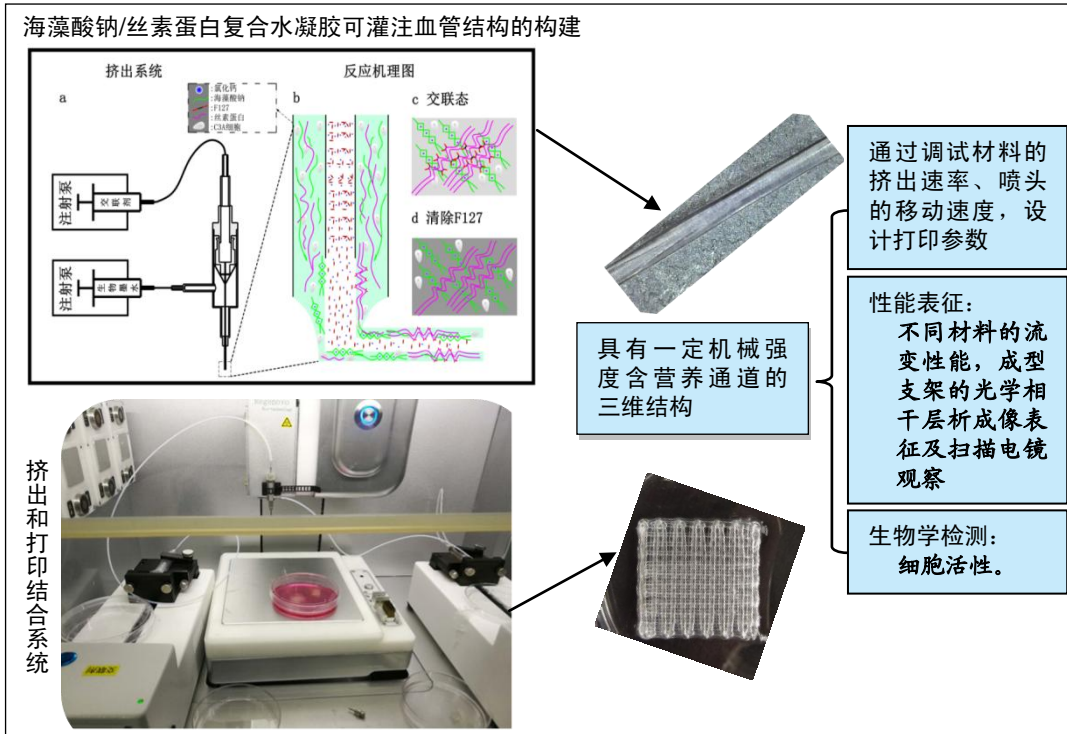
同轴打印双交联海藻酸钠/丝素蛋白血管网络支架

李宁宁¹, 徐铭恩^{2,3}, 索海瑞^{2,3}, 王玲^{2,3} (¹杭州电子科技大学生命信息与仪器工程学院, 浙江省杭州市 310018; ²杭州电子科技大学自动化学院, 浙江省杭州市 310018; ³浙江省医学信息与生物三维打印重点实验室, 浙江省杭州市 310018)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1733

ORCID: 0000-0003-1882-1109(李宁宁)

文章快速阅读:



李宁宁, 女, 1993年生, 河南省商丘市人, 汉族, 杭州电子科技大学在读硕士, 主要从事生物3D打印方面的研究。

通讯作者: 徐铭恩, 博士后, 教授, 杭州电子科技大学自动化学院, 浙江省杭州市 310018; 浙江省医学信息与生物三维打印重点实验室, 浙江省杭州市 310018

文献标识码:A

稿件接受: 2019-02-12



文题释义:

生物3D打印和同轴挤出系统: 生物3D打印为组织工程领域中人工组织和器官的构建提供全新的技术可能, 构建类血管结构用于大块细胞组织体的营养及废物的运输, 是生物3D打印面临的一个关键问题。同轴挤出系统可制造封装细胞的中空通道, 结合生物3D打印系统, 叠层制造含营养通道网络的组织。

丝素蛋白: 在生物领域, 除去丝胶的丝纤维称为丝素蛋白, 其天然氨基酸成分保证丝素蛋白在体内降解后能被人体无害吸收, 成型丝素蛋白材料的分子结构中含有 β -折叠结构, 这种结构决定了丝素蛋白体内分子的晶体含量和强度, 通过控制材料内的晶体含量即可控制材料的各种属性, 提供更优异的机械性能、更长的降解时间及可控的药物释放速率等。

摘要

背景: 构建组织工程类血管结构是复杂组织和器官再生的关键, 利用3D打印技术构建类血管结构成为目前研究的热点。

目的: 利用生物3D打印和同轴挤出系统, 采用海藻酸钠和丝素蛋白组成的生物墨水, 同轴打印具有高度有序排列的可灌注血管结构。

方法: 以含5%海藻酸钠与5%丝素蛋白的混合溶液作为生物墨水, 以含5%氯化钙与13%F127的混合溶液作为交联剂, 采用生物打印机打印海藻酸钠/丝素蛋白凝胶, 进行光学相干层析成像与扫描电镜观察。将含5%海藻酸钠与5%丝素蛋白的混合溶液与人肝癌细胞C3A悬液混合, 作为生物墨水, 以含5%氯化钙与13%F127的混合溶液作为交联剂, 采用生物打印机打印含细胞的海藻酸钠/丝素蛋白凝胶, 置入培养基中培养24 h后进行Calcein-AM染色, 荧光显微镜下观察。

结果与结论: ①光学相干层析成像: 支架结构为多层复合的中空管道, 凝胶丝具有完整的中空结构, 且各通道之间互相贯通, 这种结构类似血管的中空通道, 有利于营养物质和代谢废物的运输; ②扫描电镜: 可见并行排列的中空管道结构, 管道边界清晰, 直径在400 μm 左右, 且边界之间形成了由F127去除导致的微孔结构; ③荧光显微镜: 细胞均匀分散在通道两侧的材料中, 细胞在支架中的生长情况良好, 细胞存活率高于95%; ④结果表明: 基于同轴喷头的生物3D打印技术和海藻酸钠/丝素蛋白生物墨水, 可用于进一步构建血管化功能组织。

关键词:

海藻酸钠; 丝素蛋白; 生物3D打印; 同轴喷头; 中空管道结构; 生物墨水; 双交联网络; 可灌注血管结构

Li Ningning, Master candidate, College of Life Information and Instrument Engineering, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

Corresponding author: Xu Ming'en, PhD, Professor, College of Automation, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China; Zhejiang Provincial Key Lab of Medical Information and Three-Dimensional Bio-Printing, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

中图分类号: R459.9; R318.08

基金资助:

国家重点研发计划(2018YFB1105600), 项目负责人: 王玲; 国家自然科学基金(61675059), 项目负责人: 王玲

Coaxial printed double crosslinked alginate/silk fibroin vascular network scaffold

Li Ningning¹, Xu Mingen^{2,3}, Suo Hairui^{2,3}, Wang Ling^{2,3} (¹College of Life Information and Instrument Engineering, ²College of Automation, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China; ³Zhejiang Provincial Key Lab of Medical Information and Three-Dimensional Bio-Printing, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Construction of tissue engineering vascular structures is a key to the regeneration of complex tissues and organs. The use of three-dimensional printing technology to construct vascular structures has become a hotspot.

OBJECTIVE: A highly connected and perfusable vascular network was rapidly deposited by a three-dimensional bioprinter with a coaxial nozzle using alginate/silk fibroin bioink.

METHODS: A mixed solution containing 5% sodium alginate and 5% silk fibroin as the bio-ink, and a mixed solution containing 5% calcium chloride and 13% F127 as the crosslinker, alginate/silk fibroin gel was printed using a bio-printer and subjected to optical coherence tomography and scanning electron microscopy. The solution containing 5% sodium alginate and 5% silk fibroin mixed with the suspension of human liver cancer cells (C3A) as the bio-ink, and a mixed solution containing 5% calcium chloride and 13% F127 as the crosslinker, the cell-containing sodium alginate/silk fibroin gel was printed on a bio-printer. Then, the printed scaffold was placed in the medium for 24 hours, and then stained by Calcein-AM and observed under a fluorescence microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Optical coherence tomography: a multi-layer composite hollow tube network formed the structure of the scaffold. The gel filament had a complete hollow structure, and the channels were interconnected. The structure was similar to the hollow passage of the blood vessel, which was beneficial to the transportation of nutrients and metabolic waste. (2) Scanning electron microscope: the hollow pipe structure with the diameter of about 400 μm arranged in parallel, and the pipe boundaries were clear. The microporous structure caused by the removal of F127 was formed between the boundaries. (3) Fluorescence microscope: the cells were evenly dispersed in the material on both sides of the channel, and the cells grew well in the scaffold with the survival rate of above 95%. (4) These results suggest that three-dimensional bioprinting technology based on coaxial nozzles and sodium alginate/silk fibroin bio-ink can be used to construct vascularized functional tissues in the future.

Key words: alginate; silk fibroin; three-dimensional bioprinting; coaxial nozzle; hollow channel structure; bio-ink; double crosslinked network; perfusable vascular network

Funding: the National Key Research & Development Program of China, No. 2018YFB1105600 (to WL); the National Natural Science Foundation of China, No. 61675059 (to WL)

0 引言 Introduction

3D生物打印技术通过层层堆积生物活性材料自动化制作出形状特异、内部孔状结构和大小可控的三维功能结构体^[1], 在组织工程的研究中得到了广泛应用, 目前在皮肤^[2-3]、角膜等方面已取得成功^[4], 这些组织具有简单的几何形状、较低的细胞耗氧, 所以对血管化的要求较低。但是, 制造厚的、复杂的组织或器官, 例如心、肝、肾等, 需要供应营养和氧气的血管系统, 如何构建类血管结构, 用于大块细胞组织体的营养及废物运输, 就成为生物3D打印的一个关键问题。Lee等^[5]通过培养是否含有类血管微流体通道的水凝胶支架发现, 微流体通道的存在显著提高了细胞存活性。

最近, 主要有3种3D打印技术可直接构建类血管结构, 分别是激光辅助式^[6]、喷墨式^[7-9]、挤出式^[11-14]。有学者介绍了1种动态光学投影立体光刻平台, 通过紫外线或其他光源激活光敏液体预聚物的固化, 他们使用该项技术来制造复杂血管结构。有研究使用Z形平台辅助喷墨打印系统来制造具有分叉的3D锯齿形细胞管和血管状结构。激光辅助式打印和基于微滴融合的方式, 都会对细胞造成一定的损伤, 导致细胞存活率低下^[6, 8]。基于挤出的打印, 是一种快速发展的生物打印技术, 可制造更复杂的水凝胶结构^[10]。挤出式构建类血管结构分为间接牺牲材料构建、灌流构建和直

接同轴打印类血管结构3种方式^[11-12], 相比间接方式需要去除牺牲材料的后处理过程, 同轴打印能打印可灌注的均匀导管, 无需后处理过程, 并且能够直接生物打印复杂的通道交换网络, 为细胞间相互作用提供足够的三维空间。Ozolat等^[10]和Luo等^[14]使用同轴喷嘴辅助挤出平台制造海藻酸钠微通道; 也有其他研究者使用微流体芯片制造多室和多尺度空心细丝^[15]。

构建具有生物相容性和一定机械性能类血管结构, 不仅需要打印系统的支持, 所选用的材料更是关键。由于海藻酸钠具备快速离子交联特性, 常在同轴打印技术中用于构建中空纤维结构, 研究不同微环境下的细胞行为^[16-17], 但由于海藻酸钠分子链上没有能使细胞锚定的位点, 表现出细胞黏附性和蛋白质吸收差^[18]。丝素蛋白是源自家蚕的一种蛋白质聚合物, 具有优异的生物相容性和降解性, 良好的透气透湿性, 无毒、无刺激性和良好的力学性能^[19-20]。丝素蛋白基生物墨水具有全水相室温操作条件、细胞相容的交联方式及较强的机械性能^[21-22], 被广泛研究。有研究表明, 细胞在丝素蛋白支架上的生长、黏附、形态和增殖效果良好^[23-25]。因此, 将丝素溶液加入海藻酸钠中, 可能更有利于细胞的生长, 并提升所打印支架的机械性能。此外, F127可诱导丝素蛋白形成 β 折叠结构, 形成稳定的交联网络^[26]。

此次研究中, 将海藻酸钠和丝素蛋白作为生物墨水, 钙离子和F127溶液作为交联剂, 通过同轴生物3D打印技术打印出具有类血管的中空管道网络支架, 研究了2种材料的浓度配比及打印过程中所适用的打印参数, 此外, 通过海藻酸钠/丝素蛋白混合肝细胞, 打印出具有中空通道的高活性含细胞支架, 验证该生物墨水的可打印性和生物相容性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察, 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年10月至2018年11月在杭州捷诺飞生物科技有限公司完成。

1.3 材料 人肝癌细胞C3A(购自美国模式菌种收集中心(ATCC)); DMEM培养基(GIBCO); Calcein-AM(Sigma); 荧光显微镜(Nikon Ti-U, 日本); MCR301型流变仪(Anton-Paar, 奥地利); 生物3D打印机(Regenovo, 中国); 扫描电子显微镜(日立SU8020, 日本)。复合支架材料原料介绍见表1。

表1 复合支架材料的原料

Table 1 Introduction of composite scaffold materials

| 项目 | 丝素蛋白 | 海藻酸钠 |
|------|-----------------------------------|---|
| 来源 | 丝美特, 中国 | DuPont, 美国 |
| 组成成分 | 丝素蛋白 | β -D-甘露糖醛酸(简称M单元), α -L-古罗糖醛酸(简称G单元) |
| 材料外形 | 纤维 | 粉末 |
| 制备方法 | 家蚕丝脱胶制备 | 从海藻中提取 |
| 理化性质 | 该材料为丝素蛋白制备原料, 未测试理化性质, 应与家蚕丝一致或相近 | 淡黄色粉末, 几乎无臭无味, 溶于水, 不溶于乙醇、乙醚、氯仿等有机溶剂 |

1.4 实验方法

1.4.1 材料制备与流变性能测试 在60 °C下, 将丝素蛋白溶于9.3 mol/L溴化锂溶液中, 透析(截留相对分子质量为3 500)出其中的溴化锂, 然后将该丝素蛋白溶液进行高温高压灭菌和冷冻干燥, 制成无菌的丝素蛋白粉。实验前, 配制含50 g/L海藻酸钠和50 g/L丝素蛋白的无菌混合溶液, 作为生物墨水; 配制含5%氯化钙和13%F127的无菌混合溶液, 作为交联剂。

使用MCR301型流变仪进行材料的流变学表征, 测试均采用直径为50 mm的转子, 转子和样品台之间的距离为1 mm。在黏度测试中, 测试温度为25 °C, 剪切速率设定为0.1-100 1/s。在储能模量G'和损耗模量G''测试中, 角速度设定为0.1-100 r/s, 测试温度为37 °C, 频率为1 Hz, 应变为1%。

1.4.2 打印设备及原理 设备包括生物3D打印机、微量注射泵和同轴喷头, 其中2台微量注射泵分别与同轴喷头的内管和外管连接, 同轴喷头外管的外径为1.47 mm, 内径为1.07 mm; 内管外径为0.63 mm, 内径为0.34 mm; 2台注射泵分别将生物墨水送入外管、将交联剂送入内管, 二者

在针尖处融合并发生交联反应, 从而形成壁厚均匀的中空凝胶管, 见图1所示。

1.5 主要观察指标

1.5.1 光学相干层析成像(OCT)检测 基于自主搭建的OCT系统进行成像测试, 该系统的中心波长为1 310 nm, 在空气中的成像深度为3.5 mm, 轴向分辨率3.5 μ m, 扫描范围9.5 mm \times 9.5 mm \times 3.58 mm(1 024 \times 1 024 \times 1 024 dpi), 扫描频率为48 kHz。

1.5.2 扫描电镜观察 打印的海藻酸钠/丝素蛋白支架经冷冻干燥后, 通过表面镀碳处理, 进行扫描电镜观察, 设置扫描电压为10 kV, 观测 \times 55倍的大孔结构和 \times 1 000倍的微观结构, 并利用Image J软件统计微孔大小。

1.5.3 细胞活性检测 将人肝癌细胞C3A转移到装有DMEM培养基的离心管内, 1 000 r/min离心5 min; 在提取的细胞中加入一定量的DMEM培养基, 置于二氧化碳培养箱中培养; 待细胞贴壁后, 每48 h换一次培养基, 细胞生长至汇合后, 加入适量0.25%胰蛋白酶溶液, 显微镜下观察细胞边界变得清晰时, 从培养皿上分离细胞, 室温下1 000 r/min离心5 min并舍弃上层清液, 随后加入适量完全培养基, 用移液器轻轻吹打成单细胞悬液。

将制备好的水凝胶前体溶液与人肝癌细胞C3A悬液均匀混合, 制备海藻酸钠和丝素蛋白浓度各为50 g/L、细胞浓度为 10^9 L⁻¹的生物墨水。将该生物墨水按照上述路径进行打印, 制造出含细胞的中空海藻酸钠/丝素蛋白血管网络支架, 在其中加入培养基, 置于恒温37 °C的CO₂培养箱中进行培养, 24 h后取出支架, 使用1 mmol/L的Calcein-AM染色, 通过荧光显微镜观察, 得到支架中活死细胞的染色图片, 并使用Image J软件统计细胞存活率。

1.6 统计学分析 所有实验独立重复至少3次, 采用SPSS 19.0统计学软件(IBM公司, 美国)进行t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 材料流变性能 3D细胞打印是将细胞与生物材料混合成的生物墨水打印成预先设计的3D结构, 因此材料自身的流变性能及混合细胞后的流变性能对生物墨水的可打印性至关重要。图2A为材料的黏度曲线, 发现对比单纯海藻酸钠材料, 海藻酸钠/丝素蛋白复合材料具有明显的剪切变稀特性, 更有利于从喷头中挤出, 从而在挤出过程中减少对细胞的损伤; 而加入细胞后2种材料的黏度并无明显变化, 说明细胞的加入对打印参数影响不大。海藻酸钠/丝素蛋白复合材料的黏度范围为3.07-22 Pa \cdot s, 与脱细胞外基质的黏度(2.8-23.6 Pa \cdot s)相似^[27], 有利于保持细胞活性。血管壁属于生物软组织, 其最大的特点就是具有黏弹性。图2B, C中, 有无细胞材料的黏弹性测量曲线显示出相似的趋势, 将细胞与材料混合后, 其储能模量(G')和损耗模量(G'')有轻微降低, 这是因为与水凝胶相比, 细胞可被认为

是软颗粒, 因此嵌入细胞会使水凝胶的网络结构发生轻微的变化^[28]。在角速度为100 r/s的流变测试中, 交联后海藻酸钠水凝胶支架的储存模量为19.7 kPa, 损耗模量为3.36 kPa; 而交联后海藻酸钠/丝素蛋白水凝胶支架的储能模量为199.0 kPa, 损耗模量为29.9 kPa, 较交联后海藻酸钠水凝胶支架的测试结果有显著提高($P < 0.05$)。

复合剪切模量由剪切储存模量(G')和剪切损耗模量(G'')决定, 复合剪切模量的绝对值能够表示在动态条件下水凝胶的硬度。支架需要具有的机械性能, 除适宜细胞生长外, 也要保证三维结构在处理、体外培养过程中维持结构的稳定性^[29]。相比单纯海藻酸钠水凝胶支架, 复合水凝胶支架的储存和损耗模量都有所增加, 其复合剪切模量绝对值也相应增加, 表明复合水凝胶的硬度大于纯海藻酸钠水凝胶; 相对于纯海藻酸钠支架, 复合水凝胶支架更足以承受内部和外部机械载荷的强度, 来确保生物打印结构体的稳定性, 这源于复合凝胶中钙离子螯合交联海藻酸钠和丝素蛋白形成的 β 折叠结构, 形成的双交联网络。

2.2 支架的打印及工艺参数优化 利用同轴喷头进行3D打印的工艺参数, 包括材料的挤出速率、喷头的移动速度等。打印前, 将同轴喷头固定在生物3D打印机的移动轴上, 设置合适的注射泵流速和打印速度, 生物墨水在针尖处和交联剂接触反应(图1b), 形成具有一定机械强度的凝胶中空丝^[30], 打印机移动轴带动同轴喷头按照预先规划好的打印路径运动, 实现3D结构的叠层制造。同轴喷头外管中的水凝胶溶液被交联, 形成管壁, 交联剂通过内管在生物墨水中流通形成中空通道。交联剂的离子完全渗透进水凝胶需要一定的时间, 取决于交联剂离子浓度、海藻酸钠溶液浓度、管壁厚度等。因此, 刚挤出的中空纤维内层先被交联, 而外层未交联, 利用未交联的外层实现丝之间的黏合, 以保证支架结构的稳定性。

生物墨水与交联剂挤出速率不匹配时会导致材料堆积, 使打印的管道出现内外壁不光滑的现象, 如图3A所示; 在出丝速度过快而喷头移动速度过慢时, 会出现管道弯曲的现象, 如图3B所示; 当前2种情况同时存在时, 打印结果如图3C所示, 通道弯曲且内外壁都有材料堆积。经调试, 设定生物墨水的挤出速率为7 $\mu\text{L/s}$ 、交联剂溶液挤出速率为5 $\mu\text{L/s}$ 时, 通过测试单位时间丝的垂直挤出长度, 得到出丝速度为11 mm/s, 于是设定打印速度与出丝速度同为11 mm/s, 与之匹配的打印层高设为0.65 mm, 间距设为2 mm。合适的层高可避免破坏已打印的结构, 并能够维持通道结构的形状和完整性; 而合适的打印间距能够保证支架具有高的孔隙率, 利于氧气和营养物质的运输及代谢废物的排出。参数调试后打印出的2层通道如图3D所示, 管壁光滑且孔隙均匀。通过图3E的4层通道图可看出, 采用间隔层错位打印的方法, 使同向的路径相互交错, 达到了提高孔隙精度的目的。

2.3 支架的OCT表征结果 OCT利用弱相干光干涉仪的

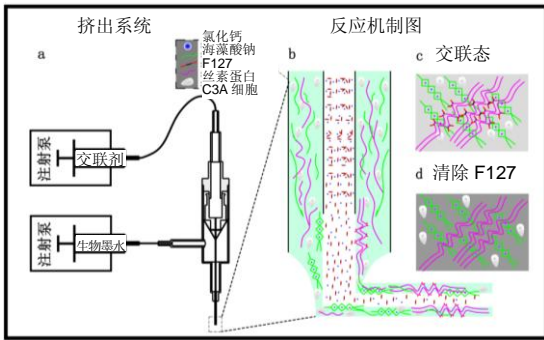
基本原理, 可非侵入性地对3D打印支架内部进行任意截面的断层扫描, 比普通光学显微镜更能反映支架内部的真实情况^[31-32]。如图4A支架上表面图所示, 可清晰看到不同层凝胶丝交叉排列, 血管结构为多层复合, 中空的管道; 图4B, C为不同角度的三维支架图, 由图可观测到凝胶丝具有完整的中空结构, 且各通道之间互相贯通, 这种结构类似血管的中空通道, 有利于营养物质和代谢废物的运输。由于3D打印的特性和交联剂F127的去除, 打印出的海藻酸钠/丝素蛋白支架具有3个维度的孔隙结构: 一为打印凝胶丝之间的孔隙结构; 二为同轴打印出来的中空管道结构; 三为管道壁上由于F127去除而导致的微孔结构。

2.4 海藻酸钠/丝素蛋白支架的微观结构 支架内部的中空管道的扫描电镜图像如图5所示, 图5A中可见并行排列的中空管道结构, 管道边界清晰, 直径在400 μm 左右, 且边界之间形成了由F127的去除导致的微孔结构, 如图5B所示。因此, F127在管道结构成型过程中, 不仅具有交联丝素蛋白、使结构更加稳定的作用, 还具有制孔剂的作用。管壁的微孔结构增加了材料的比表面积, 更有利于细胞的生长与黏附^[33], 在一定程度上解决了交联后海藻酸钠内部孔隙小影响细胞迁移生长的问题^[34]。支架的中空管道结构及管壁的微孔结构可为毛细血管的长入提供更多的空间和通道, 毛细血管是血液与周围组织进行物质交换的主要部位, 它直接给细胞供血、供氧、供给能量及有关营养物质, 同时还将带走对有害的代谢产物。多项研究表明, 支架的粗糙度和微观孔隙能够提高细胞在材料上的黏附, 促进细胞的增殖及功能表达^[35-37]。

2.5 海藻酸钠/丝素蛋白支架的细胞活性 将海藻酸钠/丝素蛋白复合材料和人肝癌细胞C3A混合后, 同轴打印出具有中空管道结构的含细胞支架, 培养后的支架在明场条件下可清晰观测出支架横纵的通道结构, 见图6A, 纵向通道是支架的第1层, 横向通道是支架的第2层。图6B为支架的荧光染色图片, 可见细胞均匀分散在通道两侧的材料中, 细胞在支架中的生长情况良好(绿色为活细胞, 红色为死细胞), 细胞存活率高于95%, 说明海藻酸钠/丝素蛋白生物墨水的细胞相容性良好, 且打印过程未对细胞造成明显损伤。对比Gao等^[38]使用海藻酸钠获得的92%细胞存活率及Jia等^[29]使用海藻酸钠/GelMA混合材料获得的75%细胞存活率, 证明海藻酸钠/丝素蛋白生物墨水及其温和的交联方式和打印方法, 使得细胞在管壁中有较佳的生存环境。虽然实验中使用人肝癌细胞C3A来测试所打印结构的生物学相关性, 但所提出的生物打印系统可用于打印其他活细胞, 例如内皮细胞和平滑肌细胞, 用于中空管道的仿生发展。

3 结论 Conclusions

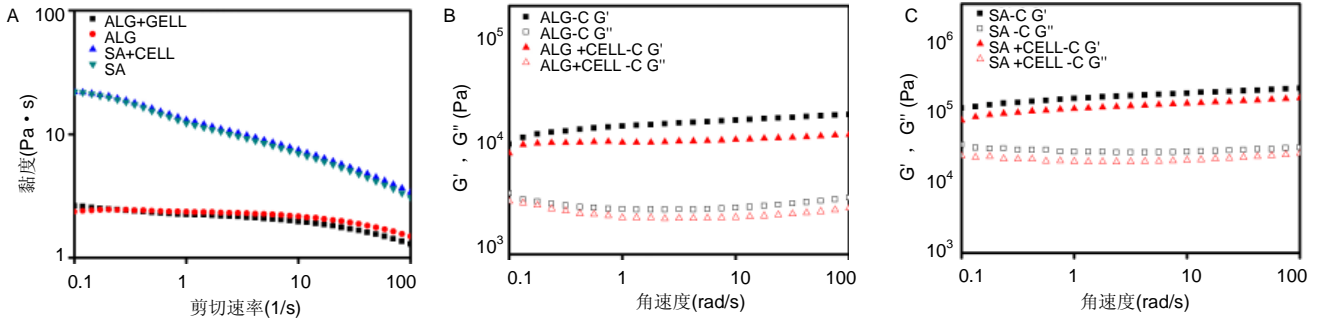
研究使用一种由海藻酸钠和丝素蛋白组成的新型混合生物墨水用于同轴生物3D打印, 研究了2种材料的合适配比, 优化了打印工艺参数。研究结果表明与纯海藻酸钠比



图注：图中 a 为注射泵、料筒和同轴喷头组成的挤出系统；b 为同轴喷头中生物墨水与交联剂反应机制图；c 为生物墨水和交联剂完全反应后机制图；d 为 F127 析出后机制图。

图 1 挤出系统和同轴生物 3D 打印机制图

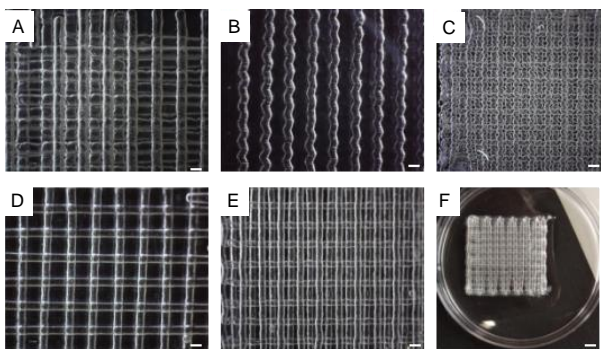
Figure 1 Schematic diagram of principle of extrusion system and coaxial three-dimensional bioprinting



图注：图中 A 为 25 °C 下海藻酸钠(ALG)和海藻酸钠/丝素蛋白(SA)加细胞(CELL)与不加细胞的黏度测试；B 为海藻酸钠加入细胞或不加细胞后，与交联剂交联(ALG-C)随角速度变化下的 G' 和 G'' 测试；C 为海藻酸钠/丝素蛋白复合材料加入细胞或不加细胞后，与交联剂交联(SA-C)随角速度变化下的 G' 和 G'' 测试。

图 2 不同材料的流变性能

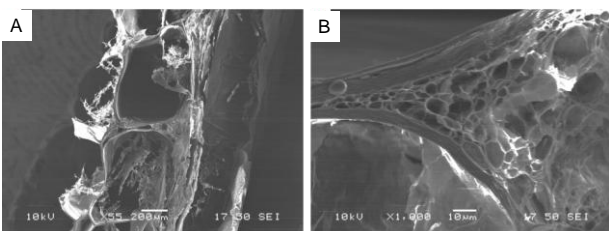
Figure 2 Rheological properties of different materials



图注：图中 A 为材料挤出速率相对稍高时的中空管道效果图(标尺为 1 mm)；B 为出丝速度大于打印速度时的中空管道效果图(标尺为 1 mm)；C 为材料挤出速率相对过高、打印速度相对较低时的中空管道效果图(标尺为 1 mm)；D 为参数调试后的 2 层通道图；E 为参数调试后包含错位结构的 4 层通道图(标尺为 1 mm)；F 为整体效果图(标尺为 500 μm)。

图 3 数码显微镜下的中空管道

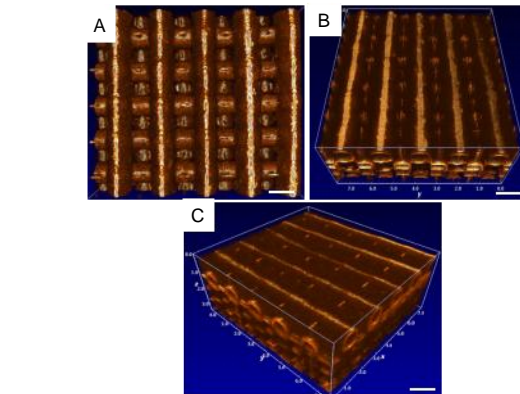
Figure 3 Hollow piping diagram under digital microscope



图注：图中 A 显示并行排列的中空管道结构，管道边界清晰，直径在 400 μm 左右；B 显示边界之间形成了由 F127 的去除导致的微孔结构。

图 5 海藻酸钠/丝素蛋白复合支架的扫描电镜图片

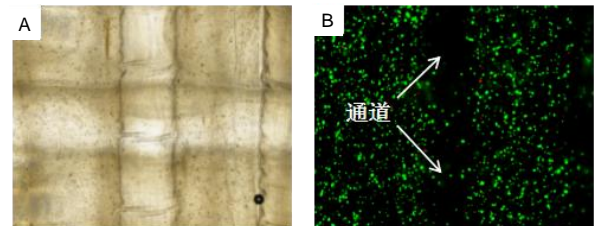
Figure 5 Scanning electron microscope results of alginate/silk fibroin composite scaffold



图注：图中 A 为俯视图；B、C 为三维图。

图 4 光学相干断层扫描获取的海藻酸钠/丝素蛋白复合支架不同角度三维图(标尺为 1 mm)

Figure 4 Three-dimensional view of different angles of alginate/silk fibroin composite scaffold obtained by optical coherence tomography (scale bar: 1 mm)



图注：图中 A 为显微镜明场观察结果，可见支架横纵的通道结构；B 为荧光显微镜观察结果，可见细胞均匀分散在通道两侧的材料中，细胞在支架中的生长情况良好(×10)。

图 6 含人肝癌细胞 C3A 的海藻酸钠/丝素蛋白复合支架

Figure 6 Alginate/silk fibroin composite scaffold containing human liver cancer cells (C3A)

较, 由海藻酸钠和丝素蛋白组成的新型混合生物墨水更利于打印, 打印出的血管支架具有完全贯通的管道结构、利于细胞黏附和生长的微观孔隙结构, 复合支架的细胞存活率可达到95%。因此, 基于同轴喷头的生物3D打印技术和海藻酸钠/丝素蛋白生物墨水, 可用于进一步构建血管化功能组织, 对于复杂组织和器官的再生具有一定意义。

作者贡献: 徐铭恩和李宁宁设计实验, 李宁宁负责实验实施、数据采集和分析及论文的撰写, 徐铭恩、索海瑞和王玲负责论文评估和审核。

经费支持: 该文章接受了“国家重点研发计划(2018YFB1105600)、国家自然科学基金(61675059)”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: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经杭州电子科技大学生物统计学专家审核。

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4.0”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] Battistella E, Varoni E, Cochis A, et al. Degradable polymers may improve dental practice. *J Appl Biomater Biomech*. 2011;9(3):223-231.
- [2] Lee W, Debasitis JC, Lee VK, et al. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. *Biomaterials*. 2009;30(8):1587-1595.
- [3] Yang EK, Seo YK, Youn HH, et al. Tissue engineered artificial skin composed of dermis and epidermis. *Artif Organs*. 2000;24(1):7-17.
- [4] 陈红. 英国研究出3D打印人类眼角膜新材料[J]. 计算机与网络, 2018, 44(12): 10.
- [5] Lee W, Lee V, Polio S, et al. On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels. *Biotechnol Bioeng*. 2010;105(6):1178-1186.
- [6] Hribar KC, Soman P, Warner J, et al. Light-assisted direct-write of 3D functional biomaterials. *Lab Chip*. 2013;14(2):268-275.
- [7] Yuichi N, Makoto N, Chizuka H, et al. Development of a three-dimensional bioprinter: construction of cell supporting structures using hydrogel and state-of-the-art inkjet technology. *J Biomech Eng*. 2009;131(3):35001.
- [8] Christensen K, Xu C, Chai W, et al. Freeform inkjet printing of cellular structures with bifurcations. *Biotechnol Bioeng*. 2015;112(5):1047-1055.
- [9] Xu C, Chai W, Huang Y, et al. Scaffold-free inkjet printing of three-dimensional zigzag cellular tubes. *Biotechnol Bioeng*. 2015; 109(12):3152-3160.
- [10] Ozbolat IT, Monika H. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*. 2016;76(37):321-343.
- [11] Zhang Y, Yu Y, Ozbolat IT. Direct Bioprinting of Vessel-Like Tubular Microfluidic Channels. *J Nanotechnol Eng Med*. 2013;4(2):21001.
- [12] Massa S, Sakr MA, Seo J, et al. Bioprinted 3D vascularized tissue model for drug toxicity analysis. *Biomicrofluidics*. 2017;11(4):44109.
- [13] Zhang Y, Yu Y, Chen H, et al. Characterization of printable cellular micro-fluidic channels for tissue engineering. *Biofabrication*. 2013;5(2): 25004.
- [14] Luo Y, Lode A, Gelinsky M. Direct Plotting of Three - Dimensional Hollow Fiber Scaffolds Based on Concentrated Alginate Pastes for Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*. 2013;2(6):777-783.
- [15] Cheng Y, Zheng F, Lu J, et al. Bioinspired multicompartmental microfibers from microfluidics. *Adv Mater*. 2014;26(30):5184-5190.
- [16] Gao Q, Liu Z, Lin Z, et al. 3D Bioprinting of Vessel-like Structures with Multi-level Fluidic Channels. *ACS Biomater Sci Eng*. 2017;3(3). DOI: 10.1021/acsbmaterials.6b00643
- [17] Onoe H, Okitsu T, Itou A, et al. Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions. *Nat Mater*. 2013;12(6):584.
- [18] Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*. 1999;20(1):45-53.
- [19] Wang S, Zhang Y, Yin G, et al. Electrospun polylactide/silk fibroin and gelatin composite tubular scaffolds for small - diameter tissue engineering blood vessels. *J Appl Polym Sci*. 2010;113(4): 2675-2682.
- [20] Wang SD, Zhang YZ, Yin GB, et al. Fabrication of a composite vascular scaffold using electrospinning technology. *Mater Sci Eng C*. 2010;30(5): 670-676.
- [21] Rodriguez MJ, Brown J, Giordano J, et al. Silk based bioinks for soft tissue reconstruction using 3-dimensional (3D) printing with in vitro and in vivo assessments. *Biomaterials*. 2017;117:105-115.
- [22] Chawla S, Midha S, Sharma A, et al. Silk - Based Bioinks for 3D Bioprinting. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(8):e17102104.
- [23] Unger RE, Wolf M, Peters K, et al. Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering. *Biomaterials*. 2004;25(6):1069-1075.
- [24] Liu H, Xu GW, Wang YF, et al. Composite scaffolds of nano-hydroxyapatite and silk fibroin enhance mesenchymal stem cell-based bone regeneration via the interleukin 1 alpha autocrine/paracrine signaling loop. *Biomaterials*. 2015;49:103-112.
- [25] Zhou J, Cao C, Ma X, et al. In vitro and in vivo degradation behavior of aqueous-derived electrospun silk fibroin scaffolds. *Polym Degrad Stabil*. 2010;95(9):1679-1685.
- [26] Kweon HY, Yeo JH, Lee KG, et al. Effects of poloxamer on the gelation of silk sericin. *Macromol Rapid Commun*. 2000;21(18):1302-1305
- [27] Kimsey RB, Spielman A. Motility of Lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix. *J Infect Dis*. 1990;162(5):1205-1208.
- [28] 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):45002.
- [29] Jia W, Gungor-Ozkerim PS, Zhang YS, et al. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials*. 2016; 106:58-68.
- [30] 王秀娟, 张坤生, 任云霞, 等. 海藻酸钠凝胶特性的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(2):259-262.
- [31] Wang L, Xu M, Zhang L, et al. Automated quantitative assessment of three-dimensional bioprinted hydrogel scaffolds using optical coherence tomography. *Biomed Opt Express*. 2016;7(3):894-910.
- [32] Wang L, Xu ME, Luo L, et al. Iterative feedback bio-printing-derived cell-laden hydrogel scaffolds with optimal geometrical fidelity and cellular controllability. *Sci Rep*. 2018;8(1):2802.
- [33] 罗会涛, 赵婧, 范兴平, 等. 不同类型多孔结构生物材料支架制备及其性能优化 [J]. 中国材料进展, 2012, 31(5):30-39.
- [34] Armstrong JP, Burke M, Carter BM, et al. 3D Bioprinting Using a Templated Porous Bioink. *Adv Healthc Mater*. 2016;5(14):1724-1730.
- [35] Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, et al. Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as well as Bone Formation. *Chembiochem*. 2015;1(2):107-114.
- [36] Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, et al. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*. 1998;19(15):1405.
- [37] Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, et al. Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials*. 1994;15(1):55-58.
- [38] Gao Q, He Y, Fu JZ, et al. Coaxial nozzle-assisted 3D bioprinting with built-in microchannels for nutrients delivery. *Biomaterials*. 2015;61: 203-215.