

## 京尼平交联 3D 打印胶原 / 壳聚糖支架的表征

<https://doi.org/10.12307/2022.301>张佳颖<sup>1</sup>, 索海瑞<sup>1,2</sup>, 徐铭恩<sup>1,2</sup>, 王玲<sup>1,2</sup>

投稿日期: 2021-01-19

采用日期: 2021-03-06

修回日期: 2021-06-17

在线日期: 2021-06-30

中图分类号:

R459.9; R318.08; TQ316.6+4

文章编号:

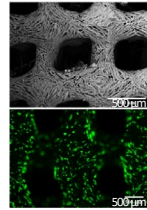
2095-4344(2022)28-04477-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

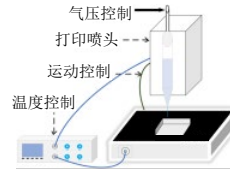
## 文章特点一

△ 通过低温 3D 打印技术制备了形状保真度高的胶原 / 壳聚糖支架。  
△ 壳聚糖的引入使得胶原支架的力学性能明显提升, 不同浓度京尼平交联的 3D 打印胶原 / 壳聚糖支架具备可调节的理化性能。



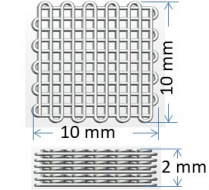
3 mmol/L 京尼平交联胶原 / 壳聚糖支架的扫描电镜图和细胞死活染色图

**材料组成:**  
40 g/L 胶原蛋白 (体积分数 3% 弱酸中 37 °C 溶解)+40 g/L 壳聚糖 (体积分数 3% 弱酸中 60 °C 溶解) 1:1 共混



**研究结果:**  
3 mmol/L 京尼平交联的胶原 / 壳聚糖支架具备高度多孔结构, 力学性能好, 且其细胞相容性优异, 非常适合作为组织工程支架。

**支架制备:**  
低温 3D 打印技术 + 冷冻干燥技术



**性能优化:**  
京尼平交联 (探究交联浓度) 实验组  
1 mmol/L  
3 mmol/L  
5 mmol/L

## 文题释义:

**京尼平:** 是一种天然的交联剂, 在碱性环境下, 京尼平受到 OH<sup>-</sup> 攻击开环形成单个醛基中间体, 开环的京尼平单分子发生自聚合反应后形成稳定的长链结构, 聚合物末端的醛基结合胶原和壳聚糖中的 -NH<sub>2</sub> 生成 Schiff 键, 形成一种可靠的交联网状结构。

**壳聚糖:** 是一种天然活性多糖, 结构和糖胺聚糖相似, 具备良好的生物相容性, 在体内会被溶菌酶缓慢降解, 形成能被人体吸收的单糖或寡糖, 与胶原蛋白复合可改善其力学性能和降解性能, 因此被广泛应用于组织工程支架研究。

## 摘要

**背景:** 胶原/壳聚糖支架需交联才能达到相应力学性能, 有研究表示调节交联剂浓度可以在一定范围内调控支架的理化性能。

**目的:** 探究京尼平浓度对胶原/壳聚糖支架理化性能的影响, 制备理化性能可调节的组织工程支架。

**方法:** 将胶原和壳聚糖粉末分别溶于弱酸后混合均匀, 作为打印墨水, 利用生物 3D 打印机低温打印胶原支架与胶原/壳聚糖支架, 经冻干、中和处理后分别以 1, 3, 5 mmol/L 的京尼平进行交联。检测各组支架的表观结构稳定性、抗拉能力、溶胀性能、降解性能与生物相容性。

**结果与结论:** ① 将支架在 PBS 中浸泡 3 d 后, 对比未交联的冻干支架, 交联后胶原支架表面维持规则的孔结构, 但是支架出现明显变形; 交联后胶原/壳聚糖支架表面结构规则, 仅 1 mmol/L 京尼平交联的胶原/壳聚糖支架存在轻微变形。② 随着京尼平浓度的增加, 各组支架的力学性能增加, 并且对应交联浓度下的胶原/壳聚糖支架力学性能好于胶原支架。③ 随着京尼平浓度的增加, 胶原支架的溶胀率下降, 胶原/壳聚糖支架的溶胀率无明显变化。④ 浸泡于胶原酶溶液中后, 不同浓度京尼平交联的胶原支架在 1 h 内被完全降解, 胶原/壳聚糖支架的降解速率随京尼平浓度的增加而降低, 均呈现先快速后平缓的趋势。⑤ 将骨髓间充质干细胞接种于各组交联支架 3 d 后, 1, 3 mmol/L 京尼平交联的胶原/壳聚糖支架(或胶原支架)上的细胞数量明显多于 5 mmol/L 京尼平交联的胶原/壳聚糖支架 ( $P < 0.05$ )。⑥ 结果表明, 京尼平可在一定范围调节胶原/壳聚糖支架理化性能, 其中 3 mmol/L 京尼平交联的胶原/壳聚糖支架具有较好的力学性能、抗酶解能力与生物相容性。

**关键词:** 交联; 胶原; 壳聚糖; 低温 3D 打印; 京尼平; 组织工程; 支架; 细胞活性

## 3D printed collagen/chitosan scaffolds crosslinked by genipin

Zhang Jiaying<sup>1</sup>, Suo Hairui<sup>1,2</sup>, Xu Ming'en<sup>1,2</sup>, Wang Ling<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Automation, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Medical Information and 3D Bioprinting of Zhejiang Province, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

Zhang Jiaying, Master candidate, School of Automation, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

**Corresponding author:** Wang Ling, Professor, School of Automation, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China; Key Laboratory of Medical Information and 3D Bioprinting of Zhejiang Province, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

<sup>1</sup>杭州电子科技大学自动化学院, 浙江省杭州市 310018; <sup>2</sup>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

**第一作者:** 张佳颖, 女, 1996 年生, 江西省丰城市人, 汉族, 杭州电子科技大学在读硕士, 主要从事生物 3D 打印方面研究。

**通讯作者:** 王玲, 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

<https://orcid.org/0000-0001-6122-3724> (张佳颖)

**基金资助:** 国家重点研发计划 (2017YFC1103400), 项目负责人: 徐铭恩; 国家自然科学基金 (61675059), 项目负责人: 王玲

**引用本文:** 张佳颖, 索海瑞, 徐铭恩, 王玲. 京尼平交联 3D 打印胶原 / 壳聚糖支架的表征 [J]. 中国组织工程研究, 2022,

26(28):4477-4482.



## Abstract

**BACKGROUND:** Collagen/chitosan scaffolds need to be cross-linked to achieve corresponding mechanical properties. Studies have shown that the regulation of crosslinking agent concentration can control the physical and chemical properties of collagen/chitosan scaffolds.

**OBJECTIVE:** To explore the effect of genipin concentration on physical and chemical properties of collagen/chitosan scaffolds, and manufacture tissue engineering scaffolds with adjustable physical and chemical properties.

**METHODS:** Collagen and chitosan were separately dissolved in weak acid and then mixed as printing ink. The collagen/chitosan scaffolds were printed using biological 3D printer at low-temperature, then lyophilized and neutralized, and crosslinked with 1, 3 and 5 mmol/L genipin. The apparent structural stability, tensile strength, swelling performance, degradation performance and biocompatibility of scaffolds of each group were detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) After the scaffold was soaked in PBS for 3 days, compared with the uncrosslinked freeze-dried scaffold, the surface of the collagen scaffold maintained regular pore structure after crosslinking, but the scaffold showed obvious deformation. The surface structure of the collagen/chitosan scaffold was regular after crosslinking. The collagen/chitosan scaffold cross-linked with only 1 mmol/L genipin had slight deformation. (2) With the increased concentration of genipin, the mechanical properties of scaffolds of each group increased, and the mechanical properties of collagen/chitosan scaffolds at the corresponding crosslinking concentration were better than those of collagen scaffolds. (3) With the increased concentration of genipin, the swelling rate of the collagen scaffold decreased, and the swelling rate of the collagen/chitosan scaffold did not remarkably change. (4) After soaking in collagenase solution, the collagen scaffolds crosslinked with different concentrations of genipin were totally degraded within 1 hour. The degradation rate of collagen/chitosan scaffold decreased with the increased concentration of genipin, showing a trend of rapid first and then smooth. (5) After inoculating bone marrow mesenchymal stem cells on the crosslinked scaffolds for 3 days, the number of cells on the 1 and 3 mmol/L genipin crosslinked collagen/chitosan scaffold (or collagen scaffold) was significantly more than that on the 5 mmol/L genipin crosslinked collagen/chitosan scaffold ( $P < 0.05$ ). (6) Results have suggested that genipin can adjust the physical and chemical properties of collagen/chitosan scaffolds within a certain extent. Among them, collagen/chitosan scaffold crosslinked with 3 mmol/L genipin has good mechanical properties, resistance to enzymatic hydrolysis and biocompatibility.

**Key words:** crosslinking; collagen; chitosan; low-temperature 3D printing; genipin; tissue engineering; scaffold; cell viability

**Funding:** the National Key Research & Development Program of China, Grant No. 2017YFC1103400 (to XME); the National Natural Science Foundation of China, No. 61675059 (to WL)

**How to cite this article:** ZHANG JY, SUO HR, XU ME, WANG L. 3D printed collagen/chitosan scaffolds crosslinked by genipin. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(28):4477-4482.

## 0 引言 Introduction

组织工程利用支架、细胞和生长因子引导组织和器官再生<sup>[1]</sup>。支架为组织的生长提供临时的空间结构，并可引导细胞生长、分化和增殖，因此支架材料的选择对制备功能性组织替代物至关重要<sup>[2]</sup>。胶原蛋白是细胞外基质的主要成分，可为细胞提供良好的生长环境，降解后可被人体吸收，是常见生物医用材料<sup>[3-4]</sup>。然而，胶原蛋白力学性能差、降解速度快限制了其在组织工程的应用，通常需要与其他材料复合<sup>[5-6]</sup>。壳聚糖是一种天然活性多糖，结构和糖胺聚糖相似，具备良好的生物相容性，在体内会被溶菌酶缓慢降解，形成能被人体吸收的单糖或寡糖，与胶原蛋白复合可改善其力学性能和降解性能，因此被广泛应用于组织工程支架研究<sup>[7-8]</sup>。

支架作为适合细胞生长的基质环境，要具备优良的生物活性、高度连通的多孔结构和仿生的力学性能<sup>[9-10]</sup>。常用的胶原/壳聚糖支架制备技术有静电纺丝、冷冻干燥、模具成型等，尽管这些技术可以控制支架的孔径和形状，但支架内部的连通性和空间分布受到严重限制<sup>[3, 11-12]</sup>。3D打印技术可以克服这些问题，该技术采用层层叠加的方式可以制备出高精度的定制化支架<sup>[13]</sup>。与此同时，3D打印技术结合低温平台对打印温度进行控制，不仅可以实现难打印水凝胶的打印，还可以有效防止打印过程中材料发生热相变，保障其生物活性<sup>[14]</sup>。SUN等<sup>[7]</sup>发现低温3D打印支架要比冻干支架具有更高的孔隙率和更好的力学性能。李东<sup>[8]</sup>发现低温3D打印技术不会对材料的分子结构和蛋白活性产生破坏，且可以有效控制支架孔径，为细胞黏附提供更大的面积，因此细胞生长、增殖情况更优。

3D打印胶原/壳聚糖支架往往需要交联才能保持结构稳定并达到一定的力学性能<sup>[15-17]</sup>。常用的交联剂有戊二醛、京尼平和碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺。符峰等<sup>[18]</sup>通过戊二醛制备的3D打印胶原/壳聚糖支架具有良好的生物相

容性。封占增<sup>[19]</sup>通过冷冻干燥制备了胶原/壳聚糖支架，对比了3种常用交联剂对支架的影响，结果显示京尼平能够维持支架的稳定性，提升抗酶解能力最强，并且细胞毒性较弱。因此京尼平被频繁用作胶原/壳聚糖支架的交联剂<sup>[20-22]</sup>。有研究表明，调节交联剂浓度可以在一定范围内调控支架的理化性能<sup>[23]</sup>。目前国内外关于京尼平交联3D打印胶原/壳聚糖支架的研究较少，因此探究京尼平浓度的影响有利于3D打印胶原/壳聚糖支架在组织工程应用领域的进一步拓展。

实验采用不同浓度的京尼平对3D打印胶原/壳聚糖支架进行交联，研究京尼平浓度对支架力学性能、溶胀性能、降解性能以及生物相容性的影响，为其在组织工程中的进一步应用奠定基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 支架理化性能及细胞生物学实验，组间比较采用单因素方差分析。

**1.2 时间及地点** 实验于2019年10月至2020年11月在杭州捷诺飞生物科技股份有限公司完成。

**1.3 材料** 墨水的主要材料为胶原蛋白(成都科乐,中国)和壳聚糖(阿拉丁,中国),中和材料为NaOH(杭州高晶,中国),交联剂为京尼平(酷尔生物,中国)。

冰醋酸(杭州高晶,中国);去离子水(杭州铭众,中国);乙醇(杭州高晶,中国);PBS(WISENT INC.,加拿大);二甲基亚砜(天津科密,中国);I型胶原酶(赛国生物,中国);胎牛血清、DMEM(WISENT INC.,加拿大);活、死细胞活力/毒性检测试剂盒(南京凯基,中国);生物3D打印机、深井低温平台(Regenovo,中国);电子分析天平(Sartorius,德国);搅拌机(巩义予华,中国);涡旋仪(IKA,德国);真空冻干机(Christ,德国);力学测试仪(TA Instruments,美国);双

功能气浴恒温振荡器(上海坤诚,中国);移液枪(力成科技,中国)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 交联剂的配制** 取 1 mL 二甲基亚砷溶液溶解 0.226 23 g 京尼平粉末(分子质量为 226.23 g/mol),配制 1 mol/L 的京尼平母液。用体积分数 75% 乙醇稀释京尼平母液,配制浓度为 1, 3, 5 mmol/L 的京尼平溶液,4 °C 密封保存。

胶原/壳聚糖复合墨水的制备流程见图 1。37 °C 水浴锅预热冷藏的胶原溶液和壳聚糖溶液,混匀制备出总质量浓度为 40 g/L 的胶原/壳聚糖复合墨水。

**1.4.2 交联剂的配制** 取 1 mL 二甲基亚砷溶液溶解 0.226 23 g 京尼平粉末(分子质量为 226.23 g/mol),配制 1 mol/L 的京尼平母液。用体积分数 75% 乙醇稀释京尼平母液,配制浓度为 1, 3, 5 mmol/L 的京尼平溶液,4 °C 密封保存。

**1.4.3 低温打印准备** 以 5 mL 透明料筒装打印墨水备用。深井低温平台连接温度控制器,平台温度控制在 -10 °C。打印喷头装入料筒,挂载到打印机上,打印喷头温度设为 8 °C,等待 30 min 直到温度稳定。将打印路径导入打印机控制软件,打印参数见表 1。

表 1 | 打印参数

Table 1 | Printing parameters

参数	胶原支架	胶原/壳聚糖支架
打印喷头气压 (mPa)	0.2	0.48
打印喷头移动速度 (mm/s)	18	13
打印针头直径 (mm)	0.26	0.26

胶原/壳聚糖支架打印成形后,将深井低温平台温度降至 -20 °C,维持 30 min。然后转移至 -80 °C 冷冻箱中过夜。低温 3D 打印系统及支架模型见图 2。

**1.4.4 冷冻干燥处理** 从 -80 °C 超低温冷冻箱中取出支架,快速转移到真空干燥机中。切换为主要干燥模式后,拧紧排气阀。10 h 后切换为终结干燥模式,维持 2 h 后关闭真空干燥机,取出冻干支架,4 °C 密封保存。

**1.4.5 交联处理** 用体积分数 0.1% 的 NaOH 溶液中和胶原支架与胶原/壳聚糖支架,1 h 后分别放入 24 孔板,用 1, 3, 5 mmol/L 的京尼平溶液于 37 °C 恒温交联 1.5 h,随后移除京尼平溶液,PBS 浸泡并冲洗支架 3 次,每次 15 min。文中将 n mmol/L 京尼平交联的支架称为 n mmol/L 支架。

#### 1.4.6 支架的表征

**表观结构观察:** 将京尼平交联后支架浸没于 PBS 中,3 d 后观察支架的表观结构稳定性。

**扫描电镜观察:** 对支架喷金处理,扫描电镜下观察京尼平交联前后支架的微观结构。

**拉伸测试:** 3D 打印厚 2 mm、长 20 mm、宽 10 mm 的支架样品。所有样品经不同浓度京尼平交联,PBS 浸泡 24 h,达到溶胀平衡后进行拉伸实验。样品两端通过初始距离为 6 mm 的夹钳固定,以 1 mm/min 的速度进行单轴拉伸,直到样品断裂,记录拉伸过程的应力应变曲线和支架的杨氏模量。

**溶胀性能测试:** 取冻干后交联支架称质量,记为  $m_0$ 。

在 37 °C 将支架浸泡于 2 mL PBS 中 24 h,达到溶胀平衡后移除 PBS,将支架静置于 45° 斜平面 1 min 后称质量,记为  $m_s$ 。支架溶胀率计算公式:  $S=(m_s-m_0)/m_0 \times 100\%$ 。

**降解性能测试:** 取冻干后的交联支架称质量,记为  $m_0$ 。将支架放入 12 孔板中,每孔加 3 mL 质量浓度为 0.2 g/L 的胶原酶溶液,在 37 °C 的双功能气浴恒温振荡器中 100 r/min 分别降解 1, 2, 8, 24 h 后,移除胶原酶溶液,将支架冻干处理,记录支架质量  $m_d$ 。支架降解率计算公式:  $D=(m_0-m_d)/m_0 \times 100\%$ 。

**生物相容性测试:** 从 1 只 4-6 周龄 SD 大鼠[购自浙江省医学科学院,许可证号 SCXK(浙)2019-0002]股骨中分离出骨髓间充质干细胞。将股骨的两端从骨髓上剪开,使用含有 DMEM 培养基和体积分数 10% 胎牛血清的注射器将骨髓从骨干中冲洗出,收集骨髓,在体积分数 95% 空气和 5% 二氧化碳的恒温(37 °C)环境中培养 3 d。4 d 后首次更换培养基,此后每 3 d 更换一次,细胞密度达到 80%-90% 进行传代。将第 4 代和第 9 代之间的骨髓间充质干细胞用于实验。利用流式细胞仪检测第 3 代细胞的表面标志物,其中 CD29 和 CD90 强阳性表达,CD34 和 CD45 阴性表达,证明该细胞为骨髓间充质干细胞。所有支架经过打印、冻干、中和、交联后用于细胞存活率测试。细胞接种前对支架进行紫外线灭菌及 PBS 洗涤中和数次,直到 pH 值达到 7。将密度为  $1 \times 10^6/\text{cm}^2$  的细胞悬液接种到支架的上表面,培养基每 2 d 更换一次,3 d 后用 PBS 轻轻冲洗孔板,并加入 1 mg/L 的 Calcein-AM 和 5 mg/L 的 propidium iodide(PI) 培养 30 min 以染色活细胞和死细胞,最后用荧光显微镜对支架进行成像。

**1.5 主要观察指标** 交联后各组支架的表观结构稳定性、抗拉能力、溶胀性能、降解性能与生物相容性。

**1.6 统计学分析** 所有实验组均选择 3 个样品,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  来表示。各组间差异采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  代表差异有显著性意义,  $P < 0.01$  代表差异有非常显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 交联前后各组支架的表观结构** 图 3 可见支架在 PBS 中浸泡 3 d 后的表观结构图,随着京尼平浓度的提高,支架颜色加深。对比未交联的冻干支架,交联后胶原支架表面维持规则的孔结构,侧面发生明显塌陷,层层堆积的结构消失。交联后胶原/壳聚糖支架表面结构规则,且侧面层层堆积的结构被保留,仅 1 mmol/L 胶原/壳聚糖支架存在轻微变形。图 4 可见交联前后各支架上均具有丰富的孔结构。结果表明,壳聚糖的加入有效提升了支架的稳定性,京尼平可以优化胶原/壳聚糖支架在湿态环境下的稳定性。

**2.2 交联后各组支架的力学性能** 图 5 为交联后各组支架的应力应变曲线和杨氏模量。胶原/壳聚糖支架的杨氏模量几乎是胶原支架杨氏模量的 30 倍,且随着京尼平浓度增加,各组支架的力学性能均显著增加,见表 2。



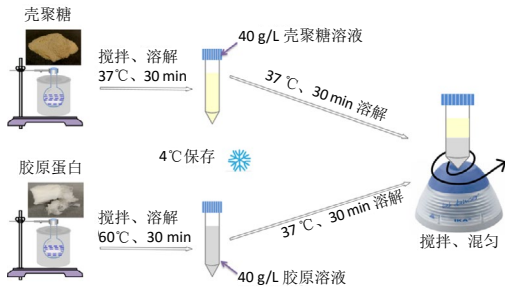


图1 | 胶原/壳聚糖复合墨水制备流程图  
Figure 1 | Schematic diagram of collagen/chitosan hybrid ink preparation process

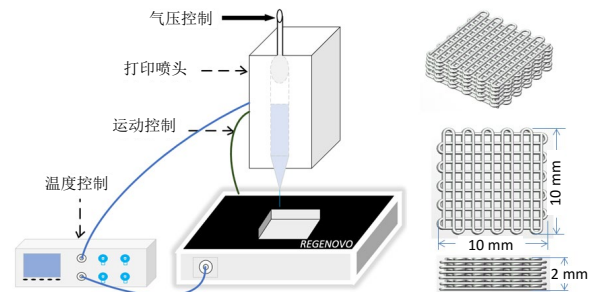


图2 | 低温3D打印系统及支架示意图  
Figure 2 | Schematic diagram of low-temperature 3D printing system and scaffold

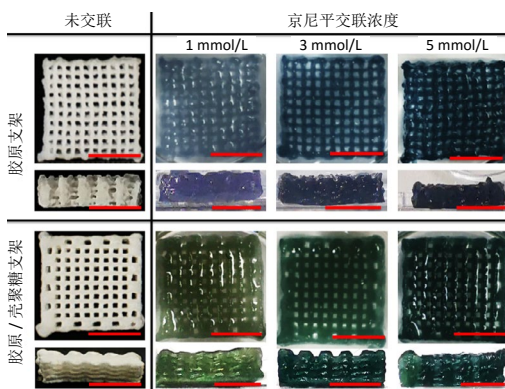


图3 | 不同浓度京尼平交联支架置于PBS中浸泡3 d后的表现结构对比 (标尺=5 mm)  
Figure 3 | Comparison of the apparent structure of the scaffolds crosslinked with different concentrations of genipin after immersion in PBS for 3 days (scale bars=5 mm)

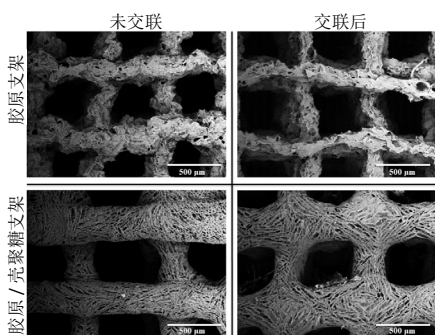


图4 | 3 mmol/L 京尼平交联前后支架的微观结构图  
Figure 4 | Microstructure of the scaffold before and after crosslinking with 3 mmol/L genipin

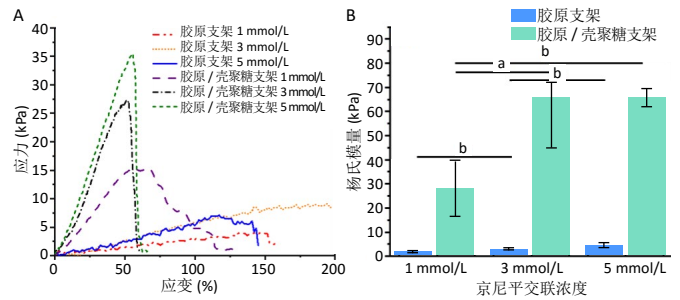


图5 | 不同浓度京尼平交联支架的应力应变曲线(A)与杨氏模量(B)  
Figure 5 | Stress-strain curve (A) and Young's modulus (B) of different concentrations of genipin crosslinked scaffold

表2 | 不同浓度京尼平交联后各组支架的杨氏模量 (x̄±s, kPa)  
Table 2 | Young's modulus of each scaffold after crosslinking with different concentrations of genipin

组别	杨氏模量
1 mmol/L 京尼平交联胶原支架	1.393±0.361
3 mmol/L 京尼平交联胶原支架	2.795±0.276
5 mmol/L 京尼平交联胶原支架	4.297±1.045
1 mmol/L 京尼平交联胶原/壳聚糖支架	27.837±11.459
3 mmol/L 京尼平交联胶原/壳聚糖支架	58.463±13.542
5 mmol/L 京尼平交联胶原/壳聚糖支架	65.870±3.666

结果表明, 加入壳聚糖可以有效提升支架的力学性能, 改变京尼平浓度可以调节胶原/壳聚糖支架的力学性能。

2.3 交联后各组支架的溶胀性能 图6表征各组支架的溶胀情况。如图6A所示, 浸没在PBS中24 h后, 未交联的胶原支架结构被完全破坏, 未交联的胶原/壳聚糖支架吸水胀大, 形状发生明显变化; 交联后各组支架表面维持清晰的网络结构, 但1 mmol/L 胶原支架力学性能极差, 溶胀率测量过程中误差较大, 视为无效值。如图6B所示, 5 mmol/L 胶原支架的溶胀率为13.74±0.71, 较3 mmol/L 胶原支架(22.71±2.36)显著下降, 其余各组溶胀率未见明显差异。结果表明, 京尼平浓度对胶原/壳聚糖支架的溶胀性能无显著影响。

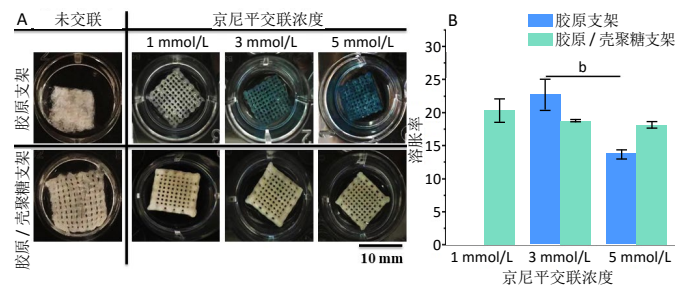
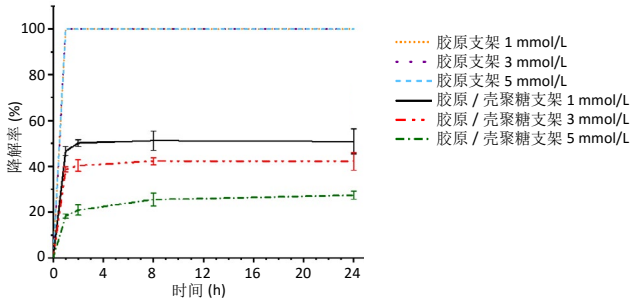


图6 | 不同浓度京尼平交联支架的溶胀性能  
Figure 6 | Swelling performance of the scaffold after crosslinking with different concentrations of genipin

2.4 交联后各组支架的降解性能 图7表征交联后各组支架的降解曲线。从图中可以看出, 不同浓度京尼平交联的胶原支架在1 h内被完全降解, 而胶原/壳聚糖支架的降解速率

则随京尼平浓度增加而降低，均呈现先快速后平缓的趋势。随着京尼平浓度的增加，支架前期的降解速率减慢，降解达到最大值的时间延长。在降解 24 h 后，胶原 / 壳聚糖支架的剩余量随京尼平浓度增加而增加。结果表明，壳聚糖的加入可以使支架不被完全降解，提高京尼平浓度可显著提升胶原 / 壳聚糖支架的抗酶解能力。

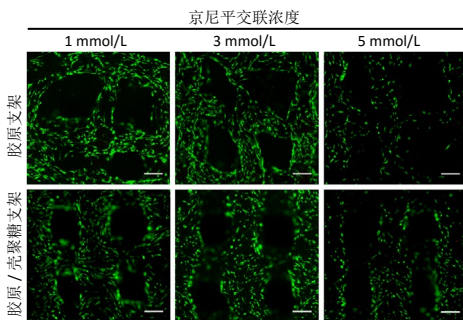


图注：不同浓度京尼平交联的胶原支架在 1 h 内被完全降解，而胶原 / 壳聚糖支架的降解速率随京尼平浓度的增加而降低，均呈现先快速后平缓的趋势

图 7 | 不同浓度京尼平交联支架的降解性能

Figure 7 | Degradation properties of genipin crosslinked scaffolds with different concentrations

2.5 交联后各组支架的细胞活性 图 8 为骨髓间充质干细胞在交联后各组支架上的存活情况。1, 3 mmol/L 支架中的细胞数量较 5 mmol/L 支架显著增多，5 mmol/L 支架上细胞数量少且分布不均。

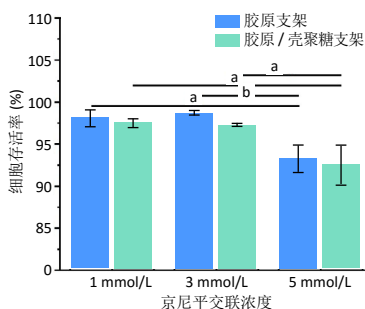


图注：与 5 mmol/L 京尼平交联的同种支架相比，1, 3 mmol/L 京尼平交联支架中的细胞数量多且分布均匀

图 8 | 不同浓度京尼平交联支架的细胞相容性 (标尺 = 500 μm)

Figure 8 | Cytocompatibility of genipin crosslinked scaffolds with different concentrations (scale bars=500 μm)

观察图 9 发现，1, 3 mmol/L 支架上的细胞存活率高达 97%，与 5 mmol/L 支架 (细胞存活率约 93%) 存在明显差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结果表明，壳聚糖的加入未对细胞的生长产生明显影响，而高浓度的京尼平会降低细胞的存活率。



图注：<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 9 | 不同浓度京尼平交联支架的细胞存活率

Figure 9 | Cell viability of genipin crosslinked scaffolds with different concentrations

2.6 交联后支架的生物相容性 由细胞活死染色可知，京尼平交联的胶原 / 壳聚糖支架具有良好的生物相容性。

### 3 讨论 Discussion

实验通过深井低温 3D 打印技术和冷冻干燥技术实现了多孔胶原支架和胶原 / 壳聚糖支架的制备。胶原成形性差，目前少数研究对中性胶原溶液进行 3D 打印，但胶原本身不溶于中性环境，这种打印方法需要对胶原改性，操作较复杂<sup>[9, 24]</sup>。胶原蛋白具有温度敏感性，当温度改变时其黏度会发生变化，打印过程中控制墨水温度在凝胶化温度以下墨水会变成凝胶状态，因此可以通过对支架所处的深井空间进行温度控制来保障其结构稳定性<sup>[25]</sup>。胶原蛋白还具有剪切变稀的能力，随着剪切率的增强其黏度会降低，变成流动的状态，撤去剪切力后又会恢复原来的黏性<sup>[26]</sup>。这两种特性的结合使其利于通过 3D 打印成形。实验采用深井低温平台对打印过程中环境温度进行控制，可以直接实现酸性环境下胶原支架的打印，同时有效防止支架塌陷，构建形状保真度高的支架。

胶原的三维螺旋链中含有大量的 -COO- 基团，会与壳聚糖中大量 -NH<sub>2</sub> 基团产生静电作用，在壳聚糖浓度高的条件下还会形成分子内和分子间氢键，这种相互作用力可以优化墨水的稳定性<sup>[27]</sup>。对比胶原支架和胶原 / 壳聚糖支架发现，壳聚糖的加入显著提升了支架湿态环境下的稳定性和支架的力学性能，且并没有对支架上细胞产生影响。这是因为壳聚糖具有良好的生物相容性，且在动物体内降解缓慢，其可以克服胶原支架降解速率过快的缺点，在人体内起到支撑的作用<sup>[28]</sup>。

3D 打印的胶原 / 壳聚糖支架具备优异的生物相容性，但力学性能不足使其应用受限。京尼平和戊二醛是优化胶原 / 壳聚糖支架力学性能较常用的交联剂，有研究指出京尼平和戊二醛的交联效果相似，但京尼平的毒性更低<sup>[19, 29]</sup>。京尼平是一种天然的交联剂，在碱性环境下，京尼平受到 OH<sup>-</sup> 攻击开环形成单个醛基中间体，开环的京尼平单分子发生自聚合反应后形成稳定的长链结构，聚合物末端的醛基结合胶原和壳聚糖中的 -NH<sub>2</sub> 生成 Schiff 键，形成一种可靠的交联网状结构<sup>[30]</sup>。实验结果显示，京尼平交联后的 3D 打印胶原 / 壳聚糖支架可以在 PBS 中较长时间维持稳定的三维空间形态，3D 打印胶原 / 壳聚糖支架的力学性能会随京尼平浓度的增加而提升，通过调节京尼平浓度可以实现不同力学性能组织工程支架的制备。采用 Calcein-AM 和 PI 对接种细胞的 3D 打印胶原 / 壳聚糖支架进行染色处理，对比不同浓度京尼平交联支架的细胞实验结果，发现 3 mmol/L 以下京尼平交联所得支架细胞存活率高，且细胞在支架上均匀分布，因此这种制备技术可以获得生物相容性较好、理化性能可调的组织工程支架。

结论：实验利用京尼平对 3D 打印的胶原 / 壳聚糖支架进行交联，制备出兼具良好力学性能和细胞活性的组织工程支架。结果表明，3 mmol/L 京尼平交联的胶原 / 壳聚糖支架具有较好的力学性能和抗酶解能力，能够保证骨髓间充质干



细胞的生长,且细胞存活率高达97%。实验通过改变京尼平的浓度实现对支架理化性能的调节,为3D打印胶原/壳聚糖支架在组织工程领域的进一步应用提供借鉴。

**作者贡献:** 索海瑞和张佳颖设计实验,张佳颖负责实验实施、数据分析及论文的撰写,徐铭恩、王玲负责论文的评估和审校。

**经费支持:** 该文章接受了“国家重点研发计划(2017YFC1103400)及国家自然科学基金(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] 葛振,邹刚,刘毅,等.组织工程支架材料:特征及在组织工程中的应用[J].中国组织工程研究,2018,22(26):4222-4228.

[2] FREED LE, ENGELMAYR GC, BORENSTEIN JT, et al. Advanced material strategies for tissue engineering scaffolds. *Adv Mater.* 2010;21(32-33):3410-3418.

[3] RIEU C, PARISI C, MOSSER G, et al. Topotactic fibrillogenesis of freeze-cast microridged collagen scaffolds for 3D cell culture. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(16):14672-14683.

[4] 郑路,张慧杰.新型胶原基原位水凝胶的制备及其性能研究[J].广东化工,2018,45(14):34-36.

[5] PAL P, DADHICH P, SRIVAS PK, et al. Bilayered nanofibrous 3D hierarchy as skin rudiment by emulsion electrospinning for burn wound management. *Biomater Sci.* 2017;5(9):1786-1799.

[6] TAN Y J, TAN X, YEONG WY, et al. Hybrid microscaffold-based 3D bioprinting of multi-cellular constructs with high compressive strength: A new biofabrication strategy. *Sci Rep.* 2016;6(1):39140.

[7] SUN Y, YANG C, ZHU X, et al. 3D printing collagen/chitosan scaffold ameliorated axon regeneration and neurological recovery after spinal cord injury. *J Biomed Mater Res A.* 2019;107(9):1898-1908.

[8] 李东.低温3D打印技术联合冷冻干燥法制备SF/COL/nHA仿生骨组织工程支架及其性能的研究[D].天津:天津医科大学,2016.

[9] KIM Y, LEE H, KIN GH. A strategy to achieve highly porous/biocompatible macroscale cell blocks, using a collagen/genipin-bioink and an optimal 3D printing process. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(47):32230-32240.

[10] WEI LN, MIN HG, YEONG WY, et al. Applying macromolecular crowding to 3D bioprinting: fabrication of 3D hierarchical porous collagen-based hydrogel constructs. *Biomater Sci.* 2018;6(3):562-574.

[11] JITHENDR P, RAJAM AM, KALAIVANI T, et al. Preparation and characterization of aloe vera blended collagen-chitosan composite scaffold for tissue engineering applications. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(15):7291-7298.

[12] AHN SH, LEE SY, CHO Y, et al. Fabrication of three-dimensional collagen scaffold using an inverse mould-leaching process. *Bioproc Biosyst Eng.* 2011;34(7):903-911.

[13] RICHARDS D, JIA J, YOST M, et al. 3D Bioprinting for vascularized tissue fabrication. *Ann Biomed Eng.* 2017;45(1):132-147.

[14] KIM GH, AHN SH, YOON H, et al. A cryogenic direct-plotting system for fabrication of 3D collagen scaffolds for tissue engineering. *J Mater Chem.* 2009;19(46):8817-8823.

[15] ZHONG SP, ZHANG YZ, LIM CT. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010;2(5):510-525.

[16] MAZZOCCHI A, DEVARASETTY M, HUNTWORCK RC, et al. Optimization of collagen type I-hyaluronan hybrid bioink for 3D bioprinted liver microenvironments. *Biofabrication.* 2019;11(1):015003.

[17] 倪添雨,张雅洁,刘敏,等.基于胶原蛋白的干细胞3D打印研究进展[J].中国材料进展,2019(6):551-558.

[18] 符锋,赵明亮,李晓红,等.三维打印胶原蛋白-壳聚糖复合支架中大鼠神经干细胞的生长和分化情况[J].中国医药,2017,12(3):442-446.

[19] 封占增.京尼平、戊二醛或EDC/NHS的交联对构建胶原/壳聚糖真皮支架的作用[D].杭州:浙江大学,2014.

[20] 孙春彦,韩冰.京尼平交联的胶原-壳聚糖支架材料的构建及其性能研究[J].科学技术创新,2016(16):80.

[21] GORCZYCA G, TYLINGO R, SZWEDA P, et al. Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO<sub>2</sub> solution. *Carbohydr Polym.* 2014; 102:901-911.

[22] SHAH R, STODULKA P, SKOPALOVA K, et al. Dual crosslinked collagen/chitosan film for potential biomedical applications. *Polymers.* 2019; 11(12):2094.

[23] OZBOLAT IT, HOSPODIUK M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials.* 2016;76(37):321-343.

[24] OSIDAK EO, KARALKIN PA, OSIDAK MS, et al. Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D bioprinting. *J Mater Sci Mater Med.* 2019; 30(31):31.

[25] ZHANG YS, KHADEMHOSEINI A. Advances in engineering hydrogels. *Science.* 2017;356(6337):eaaf3627.

[26] MACHADO AAS, MARTINS VCA, PLEPIS AMG. Thermal and Rheological behavior of collagen. chitosan blends. *J Therm Anal Calorim.* 2002; 67(2):491-498.

[27] CHICATUN F, REZABEIGI E, MUJA N, et al. A bilayered dense collagen/chitosan hydrogel to model the osteochondral interface. *Emerg Mater.* 2019;2(2):245-262.

[28] 邓倩莹,李立华,李毅群,等.溶菌酶、过氧化氢对壳聚糖降解性能的影响[J].化学世界,2005(6):18-20.

[29] 张芳崧.姜黄素可控释生物活性脊髓支架的构建[D].滨州:滨州医学院,2018.

[30] 李珂.新型生物交联剂京尼平的性质与应用[J].中国化工贸易,2011, 3(6):92-93.

(责任编辑:GW, ZN, ZJP)