

明胶 / 氧化纳米纤维素高弹性模量高孔隙皮肤支架的 3D 打印工艺

许晓东^{1,2}, 周骥平³, 张琦³, 冯辰^{1,2}, 朱勉顺¹, 史宏灿⁴

<https://doi.org/10.12307/2023.977>

投稿日期: 2022-11-21

采用日期: 2023-01-18

修回日期: 2023-03-02

在线日期: 2023-03-14

中图分类号:

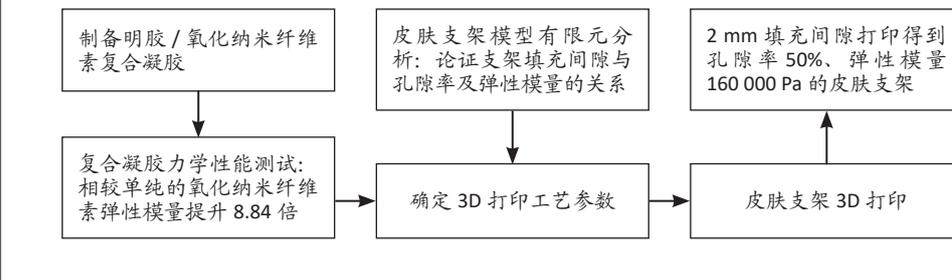
R459.9; R318; R622+.1

文章编号:

2095-4344(2024)03-00398-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 高弹性模量高孔隙皮肤支架的 3D 打印工艺



文题释义:

弹性模量: 是描述材料或结构在应力下发生形变的物理量, 应力与应变的比值称为弹性模量。弹性模量与材料本身和材料的形状有关, 比如将凝胶材料制备成实心结构或多孔结构其弹性模量会发生改变, 将试件作为整体测试弹性模量, 结果与材料本身的弹性模量是不一样的。在皮肤支架的临床应用中, 抗压性能是最重要的力学指标, 故通常认为弹性模量越大力学强度越好。

3D 打印工艺: 3D 打印是增材成型的一种, 明胶/氧化纳米纤维素复合凝胶采用冷挤压成形, 其 3D 打印工艺包括挤出时的温度与压力、喷嘴移动的速度及支架的分形方法等。分形方法是将给定的三维模型通过一定算法进行分层, 每层中再按照给定的间隙进行移动轨迹的规划, 最终按照规划的轨迹进行布丝成形。填充间隙就是喷嘴移动轨迹中两相邻平行直线的间距。

摘要

背景: 在采用主动修复治疗手段应对皮肤创伤时, 需要使用组织工程技术生成新的组织来代替坏死组织, 皮肤支架在创伤修复领域具有良好的应用前景。皮肤支架需要呈现具有一定力学强度的三维多孔结构, 以满足细胞增殖分裂的需求, 而目前使用的明胶基生物材料力学强度弱, 无法达到皮肤支架的使用要求。

目的: 针对明胶/氧化纳米纤维素复合材料制备组织工程皮肤支架时使用的 3D 打印工艺进行研究, 重点研究不同工艺参数下制备皮肤支架的孔隙率与其力学强度之间的关系。

方法: 从茛苳草中提取 10% 浓度的氧化纳米纤维素晶须, 再与 5% 的明胶复合得到明胶/氧化纳米纤维素复合材料, 检测明胶与明胶/氧化纳米纤维素复合材料的弹性模量。以明胶/氧化纳米纤维素复合材料为基材, 采用 3D 打印挤压成型方法制备皮肤支架, 通过对材料进行力学性能测试和流变特性测试确定挤压成型工艺参数(填充间隙 1.5–2.5 mm, 0.1 mm 均布; 气压 160–200 kPa), 并以此制备具有三维多孔结构的皮肤支架。对皮肤支架进行了抗压性能的测试并与有限元分析结果相对比, 论证了支架打印时的填充间隙与支架孔隙率及力学强度之间的关系。

结果与结论: ①通过实验得出, 加入 10% 浓度的氧化纳米纤维素晶须使 5% 明胶的弹性模量提升了 8.84 倍; 在气压 160 kPa 下挤出成型可以得到 1 mm 直径的丝状凝胶, 此时填充间隙从 1.5 mm 增大到 2.5 mm 会使支架的理论孔隙率从 33% 上升到 60%, 但抗压强度从 230 000 Pa 降低到 95 000 Pa; ②结果显示, 使用 2 mm 填充间隙制备得到了理论孔隙率为 50%、弹性模量 160 000 Pa 的皮肤支架, 该支架具有清晰的三维多孔结构。

关键词: 皮肤支架; 弹性模量; 孔隙率; 3D 打印; 填充间隙; 氧化纳米纤维素; 复合凝胶

3D printing process of gelatin/oxidized nanocellulose skin scaffold with high elastic modulus and high porosity

Xu Xiaodong^{1,2}, Zhou Jiping³, Zhang Qi³, Feng Chen^{1,2}, Zhu Mianshun¹, Shi Hongcan⁴

¹Yangzhou Polytechnic Institute, Yangzhou 225127, Jiangsu Province, China; ²Jiangsu Province Engineering Research Center of Intelligent Application for Advanced Plastic Forming, Yangzhou 225127, Jiangsu Province, China; ³College of Mechanical Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, Jiangsu Province, China; ⁴Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China
Xu Xiaodong, MD, Lecturer, Yangzhou Polytechnic Institute, Yangzhou 225127, Jiangsu Province, China; Jiangsu Province Engineering Research Center of Intelligent Application for Advanced Plastic Forming, Yangzhou 225127, Jiangsu Province, China

¹扬州工业职业技术学院, 江苏省扬州市 225127; ²江苏省新材料塑性成形智能化应用工程研究中心, 江苏省扬州市 225127; ³扬州大学机械工程学院, 江苏省扬州市 225127; ⁴扬州大学医学院, 江苏省扬州市 225009

第一作者: 许晓东, 男, 1988 年生, 江苏省扬州市人, 博士, 讲师, 主要从事 3D 打印技术和组织工程支架方向研究。

通讯作者: 周骥平, 博士, 教授, 博士生导师, 扬州大学机械工程学院, 江苏省扬州市 225127

<https://orcid.org/0000-0002-7148-4036> (许晓东)

基金资助: 国家自然科学基金(81770018), 项目负责人: 史宏灿; 扬州市-扬州大学科技合作项目(SCX2017020015), 项目负责人: 周骥平; 江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究面上项目(21KJD460010), 项目负责人: 许晓东; 2021 年度校级科研课题(自然科学)项目(2021xjzk003), 项目负责人: 许晓东

引用本文: 许晓东, 周骥平, 张琦, 冯辰, 朱勉顺, 史宏灿. 明胶 / 氧化纳米纤维素高弹性模量高孔隙皮肤支架的 3D 打印工艺 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(3):398-403.



Corresponding author: Zhou Jiping, MD, Professor, Doctoral supervisor, College of Mechanical Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: In the treatment of skin trauma with active repair, tissue engineering techniques are needed to generate new tissue to replace necrotic tissue. Skin scaffolds have a good application prospect in the field of wound repair. Skin scaffolds need to present three-dimensional porous structures with certain mechanical strength to meet the needs of cell proliferation and division. However, the mechanical strength of the currently used gelatin-based biomaterials is weak and cannot meet the requirements of the use of skin scaffolds.

OBJECTIVE: To study the 3D printing process used in the preparation of tissue engineering skin scaffolds by gelatin/oxidized nanocellulose composites, and focus on the relationship between the porosity and mechanical strength of the scaffolds prepared under different process parameters.

METHODS: Oxidized nanocellulose whiskers at 10% concentration were extracted from *Humulus scandens* and then compounded with 5% gelatin to obtain gelatin/oxidized nanocellulose composites. The elastic modulus of gelatin and gelatin/oxidized nanocellulose composite was determined. Skin scaffolds were prepared by 3D printing extrusion molding using gelatin/oxidized nanocellulose composite as the base material. Mechanical and rheological properties of the composite were tested to determine extrusion molding parameters (filling gap 1.5–2.5 mm, uniform distribution of 0.1 mm; air pressure of 160–200 kPa), and the skin scaffold with a three-dimensional porous structure was prepared. The compressive performance of the skin scaffold was tested and compared with the finite element analysis results. The relationship between the filling gap and the porosity and mechanical strength of the scaffold was demonstrated.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The elastic modulus of 5% gelatin was increased by 8.84 times by adding 10% oxidized nanocellulose whisker. A gel filament with a diameter of 1 mm was obtained by extrusion at the air pressure of 160 kPa. When the filling gap increased from 1.5 mm to 2.5 mm, the theoretical porosity of the scaffold increased from 33% to 60%, but the compressive strength decreased from 230 000 Pa to 95 000 Pa. (2) These findings showed that the skin scaffold with theoretical porosity of 50% and elastic modulus of 160 000 Pa was prepared by using 2 mm filling gap. The scaffold had a clear three-dimensional porous structure.

Key words: skin scaffold; elastic modulus; porosity; 3D printing; filling gap; oxidized nanocellulose; composite gel

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81770018 (to SHC); Yangzhou-Yangzhou University Science and Technology Cooperation Project, No. SCX2017020015 (to ZIP); Basic Science (Natural Science) Research Project of Institutions of Higher Learning in Jiangsu Province, No. 21KID460010 (to XXD); 2021 University-Level Scientific Research Topic (Natural Science) Project, No. 2021xjzk003 (to XXD)

How to cite this article: XU XD, ZHOU JP, ZHANG Q, FENG C, ZHU MS, SHI HC. 3D printing process of gelatin/oxidized nanocellulose skin scaffold with high elastic modulus and high porosity. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(3):398-403.

0 引言 Introduction

皮肤是人体最大的器官，它包裹在人体表面，发挥保护、排泄、调节体温和感受外界刺激等功能。皮肤组织易受外界的影响而出现各种形式的创伤，皮肤创伤修复需求大，中国每年慢愈创面 3 000 万人次以上^[1]。传统医学采用等待修复，即通过手术、器件等方法进行修复，更先进的创伤修复技术采用主动促进修复，即在手术、器件、敷料的基础上通过生物治疗的方法进行皮肤创伤的修复^[2-3]。

在创伤修复技术中，创新敷料在创面愈合过程中发挥重要的作用，包括保持创面湿润^[4]、促进坏死组织和纤维蛋白溶解、保持并促进多种生物活性因子释放^[5-6]、加速肉芽组织形成以及减轻疼痛和减少伤口感染风险等^[7]。理想的创新敷料需要保证不与新生肉芽组织粘连，避免在更换敷料时再次产生机械性损伤^[8-9]。

采用主动修复治疗手段时，若皮肤组织受到严重损伤，缺少再生必需的基础组织，就需要通过组织工程技术生成新的组织来代替原有组织，即利用工程学和细胞生物学的原理和方法，在创面或体外用皮肤支架和种子细胞共同建立与正常人体皮肤结构和功能相近的组织工程皮肤，以此修复、替代缺损的皮肤组织^[10]，这种组织工程技术具有良好的应用前景。使用的皮肤支架需要呈现具有一定力学强度的三维多孔结构，以满足细胞增殖分裂的需求，同时需要具备多孔毛细结构以便吸收浸出液，在保证创面湿润的同时控制浸出液的数量^[11-12]。

目前关于皮肤支架制造方法研究的一个主要问题在于天然组织结构的异质性难以模仿^[13]。普通的三维结构缺乏提供营养和排除废物的脉管系统，使得支架内部的细胞难以存活^[14]。另一个难题是用于 3D 打印制备皮肤支架的可降解生

物材料不能满足皮肤支架的高机械性能的要求^[15]。目前常见的凝胶材料如胶原蛋白、明胶等虽具有良好的生物相容性，但皆存在力学性能薄弱问题，不能满足临床应用，而在使用交联剂强化材料力学性能的同时也会提升材料的黏度，从而在支架物理性能和生物性能的权衡中产生关于材料黏度的矛盾，即在制造支架的过程中支架微观分辨率随黏度增加而提高，但在挤出时需要较大的压力和剪切应力，这会降低生物细胞的活性^[16]。对支架的 3D 打印工艺展开研究，是克服黏度矛盾、得到高强度组织支架的有效手段。

除了材料本身物理性能之外，3D 打印皮肤支架时使用的打印参数（如胶丝直径、分布间隙以及胶丝的分布方法）也会影响支架的结构强度。通常来说，打印支架时的胶丝分布越密集，则支架整体的力学强度越好，但支架的孔隙率则越低，细胞增殖分裂的空间越小，且支架代谢所需的时间越长^[17-18]；而胶丝分布得越分散，则支架的孔隙率越高，细胞生长空间越大，但支架的力学强度越低^[19]。因此，分析支架打印时形成的微观孔隙结构与力学强度之间的关系，构建孔隙率、力学强度之间的数学模型，对制备孔隙率和结构强度都满足临床使用需求的组织工程皮肤支架具有非常重要的意义^[20-21]。

针对以上问题，此次实验将针对明胶/氧化纳米纤维素制备组织工程皮肤支架时使用的 3D 打印工艺进行研究，重点研究不同工艺参数所制备皮肤支架的孔隙率与其力学强度之间的关系，以期获得力学性能较好且具有多孔三维结构的组织工程支架，为组织工程皮肤支架的制备提供数据参考。同时，支架的微观多孔结构对于细胞的生长、增殖和代谢都有非常重要的影响，孔隙率和孔径都是临床上衡量皮肤支架的重要参数，观察明胶/氧化纳米纤维素皮肤支架的微观结构也能为支架的临床应用提供技术支持。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 明胶/氧化纳米纤维素皮肤支架的制备、打印和测试。

1.2 时间及地点 实验于2022年3-9月在扬州大学草业机械实验室完成。

1.3 材料 使用的3D打印机是杭州捷诺飞生物技术有限公司生产的Bio-Architect-Pro。微小力学性能自动测量系统是扬州大学机械工程学院开发制作的^[22]。扬州大学动物科学与技术学院从葎草茎(Humulus Japonicus stem)提取纤维素^[23]。明胶购自上海阿拉丁生化科技有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 明胶/氧化纳米纤维素复合材料的制备 作为胶原蛋白水解的产物,明胶由于其亲水性和优异的生物相容性,是制备生物支架时最常见的基质材料,其通常与糖氨聚糖或氧化纳米纤维素复合使用,通过交联反应提升其力学强度使其能满足临床使用的需求。此次实验从葎草中提取氧化纳米纤维素,再与明胶复合得到皮肤支架所需的复合凝胶材料。

利用硫酸水解法和高温高压处理得到的纤维素纳米晶须,其制备过程详见之前的研究报道,且被证明具有良好的生物相容性^[23]。简单概述为:将烘干后的葎草粉末通过蜡脂萃取^[24](无水乙醇抽提12h去除蜡脂物质)、碱处理(4%浓度氢氧化钠溶液按1:15质量体积比80℃蒸煮2h)和漂白处理(pH=5的亚氯酸钠溶液按纤维干质量:亚氯酸钠溶质质量等于5:1的比例在80℃下搅拌1h,重复3次)得到pH中性的葎草纤维,再通过硫酸水解法^[25](纤维素干质量:硫酸体积=1:20的硫酸溶液45℃下搅拌1h)、离心透析得到pH为中性的纤维素纳米晶须,最终通过高温高压处理(含量2%的葎草纤维素悬浮液在钛合金高压釜140℃环境下处理2h)得到长径比约60的高温高压纤维素纳米晶须^[26]。按照每20g高温高压纤维素纳米晶须加入80g超纯水的比例加入超纯水制备20%浓度的氧化纳米纤维素悬浊液,并与10%浓度明胶悬浊液按体积比1:1混合、交联制备得到实验所需的明胶/氧化纳米纤维素复合材料。材料在进行3D打印前还经过了紫外线除菌处理。最终放置于桶状容器内并在4℃的冰柜中冷藏保存。

1.4.2 明胶/氧化纳米纤维素复合材料弹性模量检测 皮肤支架在临床使用上的力学性能指标主要是抗压性能和抗拉性能,材料的弹性模量是影响这些性能的重要指标。此次实验利用扬州大学机械工程学院开发制作的微小力学性能自动测量系统进行材料弹性模量的测量,测量原理见之前的研究报道,即用两组差动电桥分别测量材料样品的应力和应变^[22]。

取明胶/氧化纳米纤维素复合材料,通过浇筑的方法在聚四氟乙烯所做的模具中成型得到直径20mm、高度4mm的圆柱体试样,将试样放在测量系统的测试台上,用直径10mm的圆盘形压头进行测试,压头按下行速度0.5mm/s的速度施加单方向压应力,测量量程2mm,记录实验中的应力和应变,并以此为依据计算材料的弹性模量。同时用5%浓度明胶悬浊液制作相同体积样品作为参照,根据采购单位所提供数据,

5%明胶样品泊松比 P_m 为0.5,模量 E 为41000Pa。

1.4.3 制备明胶/氧化纳米纤维素皮肤支架 将明胶/氧化纳米纤维素复合材料在60℃下进行水浴加热,待材料完全液化后用磁力搅拌子进行搅拌,搅拌后装入打印机的料筒中,运用Solidworks建立20mm×20mm×5mm的长方体模型,按照不同填充间隙(1.5-2.5mm,0.1mm均布)生成3D打印的工艺文件,根据材料的流变特性(4℃下约为20Pa·s)设定打印机的各项参数^[27-28]:喷嘴温度为5℃,平台温度为0℃,针与载片(0.2mm厚,铝)之间的间隙为0.4mm,喷头内腔压力160-200kPa,喷头移动速度8mm/s。用0.41mm直径的喷头完成支架的挤压成型。

1.4.4 皮肤支架微观形态观测 使用扫描电子显微镜(SEM,S-4800)来观察支架的微观形态。首先对皮肤支架进行冻干处理,排除水分对扫描电镜结果的影响,在金喷镀处理(Sputter Coater SCD 500型离子溅射机)之后进行扫描电镜成像处理,成像参数包括:减速电压为0V,加速电压1500-15000V,校准速度为21,发射电流10000nA,最终得到分辨率为1280×960的皮肤支架微观图像。

1.4.5 皮肤支架力学性能测试 取皮肤支架样品,放在测量系统的测试台上,压头按下行速度0.2mm/s的速度施加单方向压应力,下压量程2mm,在完成下压量程后压头向上回到初始位置,上行速度0.2mm/s,记录试验中的应力和应变情况。

1.4.6 有限元分析验证

建立三维模型:运用三维建模软件Solidworks模仿皮肤支架的三维筒支梁结构构建微观多孔模型,用截面为1mm×1mm的长方体来对20mm×20mm×5mm的长方体支架模型进行填充,填充方法如图1所示,根据不同的填充间隙构建多个三维模型。

孔隙率计算:由于明胶/氧化纳米纤维素复合材料中含有大量水分,其制备的皮肤支架的孔隙率与支架所含水分的多少有关,支架中水分挥发的程度会与支架的微观三维结构共同影响最终的孔隙率。通过三维软件可以有效评估胶丝分布间隙对孔隙率的影响,在建模软件中通过测量功能测量支架的实际长度 L ,宽度 W 和高度 H ,输入材料密度后可以评估得到支架的实际质量,从而评估不同填充间隙三维支架的孔隙率。

压力模型有限元仿真:在Solidworks中在支架模型的上、下表面分别建立支撑板和圆形的压头,如图2A所示,通过ANSYS Workbench中建立由几何结构和静力学分析构成的项目系统,如图2B所示。在Mechanical模型中打开Solidworks所建立的支架模型,并对其物理参数进行设置,其中材料的泊松比被设置为0.5,弹性模量为360000Pa,在完成材料的设置之后对模型进行网格化划分,得到了如图2C所示的网格化模型,共计有170000个网格,920000个节点。在压头上设置垂直向下的作用力,大小为1N,设置支撑板为固定支撑,运行静力学仿真。计算不同填充间隙下各支架模型的变形情况。

模型优化: 在 Solidworks 中对支架的微观模型进行优化, 对微观模型进行填充间隙的调整, 建立一个上方密集分布, 下方稀松分布的三维模型, 具体为表面 3 层的填充间隙为 2 mm、下方 2 层的填充间隙为 2.5 mm, 测试支架孔隙率和支架抗压性能。

1.5 主要观察指标 明胶与明胶 / 氧化纳米纤维素复合材料的弹性模量; 明胶 / 氧化纳米纤维素皮肤支架的孔隙率与力学强度。

2 结果 Results

2.1 明胶 / 氧化纳米纤维素复合材料的弹性模量 在使用微小力学性能自动测量系统进行材料弹性模量的测定时首先对设备进行标定, 通过标准砝码和螺旋测微仪校正测量信号和真实信号之间的对应关系。通过螺旋测微仪调整压头至样品上方 2 mm 位置, 并启动下压, 压头经过 2 mm 的空载之后开始接触样品, 工作过程中通过两组电桥记录行程中明胶 / 氧化纳米纤维素复合材料所制作样品和 5% 浓度明胶样品的位移变化和应力变化, 平均压头每运动 0.02 mm 记录一次压头的受力和位移, 每个样品测试 3 次, 取平均值作为测试结果, 测试数据如表 1 所示。

表 1 | 明胶与明胶 / 氧化纳米纤维素复合材料弹性模量测试结果
Table 1 | Test results of elastic modulus of gelatin and gelatin/oxidized nanocellulose composites

序号	明胶 / 氧化纳米纤维素复合材料		明胶	
	位移 (mm)	力 (g)	位移 (mm)	力 (g)
1	0.021 82	56.478 297 01	0.031 12	51.001 597 20
2	0.283 15	129.498 516 3	0.264 73	58.964 586 67
3	0.513 27	198.360 870 6	0.543 17	67.481 871 11
4	0.712 03	253.020 035 2	0.735 57	74.567 382 22
5	1.116 75	383.027 463 7	1.153 73	87.077 115 56
6	1.371 58	451.132 814 9	1.435 97	95.743 617 78
7	1.593 64	500.213 794 1	1.653 31	103.656 226 7
8	1.798 15	556.452 040 3	1.823 14	109.268 875 6
9	2.010 39	621.825 943 1	2.034 17	115.890 493 3

根据测量结果, 可以根据弹性模量的计算公式计算明胶 / 氧化纳米纤维素样品和 5% 明胶样品的弹性模量, 计算得到 5% 明胶样品的弹性模量为 41 469 Pa, 与产品标定的弹性模量相差不到 1%, 而明胶 / 氧化纳米纤维素复合材料样品的弹性模量为 366 752 Pa, 相比较 5% 明胶样品提升了约 8.84 倍。

2.2 明胶 / 氧化纳米纤维素皮肤支架及扫描电镜观测 为了观察明胶 / 氧化纳米纤维素皮肤支架的成型过程及最终得到的微观多孔结构, 使用高分辨率的数码相机 Canon EOS 80D 记录了支架堆积成型的全过程, 打印过程中支架的打印分辨率受到单根胶丝打印精度和堆叠方法的影响。图 3 显示了不同气压下挤出得到的凝胶丝形态, 在使用明胶 / 氧化纳米纤维素复合凝胶进行支架 3D 打印的过程中, 挤出气压在 160–200 kPa 时都可得到连续的凝胶丝, 压强越小凝胶丝越细, 在气压 160 kPa 时凝胶丝直径约 1 mm, 压强越大凝胶丝越粗, 在气压 200 kPa 时凝胶丝直径约 2.4 mm。其中越细的凝胶丝直径可以得到打印分辨率更高的三维多孔支架, 但气压

过小会导致胶丝挤出不流畅, 从而出现欠搭接的现象, 如图 4A 所示, 气压选择 140 kPa 时挤出的胶丝无法顺利挤出, 凝胶在喷嘴处形成小型凝胶球, 导致制备的胶丝无法呈现直线状态; 而当气压过大会导致过堆积现象的出现, 如图 4B 所示, 当挤出气压 220 kPa 时打印得到的凝胶丝堆积在一起, 无法得到可靠的三维多孔结构。

针对制备的复合凝胶, 使用 1.4.3 中的打印参数, 可以在挤出气压 160 kPa 时得到打印分辨率相对较高的三维多孔支架, 图 5A 所示是在 160 kPa 下按照填充间隙 2 mm 打印得到的三维支架, 图中可以看出刚打印得到的支架在饱含水分的状态下具有清晰的三维多孔结构。在将支架冻干脱水, 得到如图 5B 所示的冻干支架, 在扫描电镜下观测支架的微观形态, 如图 6 所示, 在图中可以清晰地看到由相互垂直的凝胶丝组成的三维多孔结构, 其中冻干的凝胶丝上密集分布着大小不一的小孔, 这些小孔可以为皮肤细胞的黏附提供便利, 同时在凝胶丝之间存在边长约 1 mm 的方孔, 这些方孔在临床上可以为营养液的浸润和代谢物的排出提供三维支撑, 这与预期的三维结构一致。

2.3 皮肤支架力学性能测试 微小力学性能自动测量系统记录了压头在靠近支架、挤压支架和离开支架过程中的受力变化和位移变化, 力和位移之间的关系可以用来表征支架的力学性能。对使用不同填充间隙打印得到的皮肤支架进行力学性能的测试, 分别测试了填充间隙为 1.5, 2 和 2.5 mm 时制备的皮肤支架, 每种支架测试 3 次, 取其平均值拟合得到其力-位移曲线, 如图 7 所示。

从图 7 中可以看出, 打印支架时选择的填充间隙会影响支架的力学强度, 对于填充间隙 1.5 mm 的明胶 / 氧化纳米纤维素支架, 需要约 770 g (即 7.55 N) 的作用力可以使其变形 2 mm, 即相对 5 mm 的高度变形 40%; 对于填充间隙 2 mm 的支架, 相对变形 40% 需要 550 g (即 5.39 N) 的作用力; 填充间隙的增加使得支架的力学性能降低, 对于 2.5 mm 填充间隙的支架, 相对变形 40% 只需要平均 348 g (即 3.41 N) 的作用力。与明胶 / 氧化纳米纤维素浇筑实心样本相比较, 三维多孔结构会降低支架的抗压性能, 1.5, 2 和 2.5 mm 的填充间隙分别使支架抗压性能降低了约 30%, 51% 和 71%。

从图 7 中还可以看出压头在上行的过程中其应力同样存在变化, 原因是明胶 / 氧化纳米纤维素凝胶存在黏弹性, 在压头上行的过程中支架也在上行, 在此期间压头受到支架垂直向下作用力的影响, 图中可以看出各支架在受压后的回弹情况, 1.5 mm 填充间隙的支架大约可以回弹 1.4 mm 的高度, 相较 2 mm 的总变形回弹了约 70%, 2, 2.5 mm 填充间隙支架的回弹情况类似, 都可以实现大约 70% 的回弹。据此可以得到结论, 支架的抗压性能与支架的填充间隙密切相关, 而黏弹性与支架的材料有关, 与填充间隙关联不大。

2.4 皮肤支架孔隙率计算 从上面皮肤支架扫描电镜图片中可以看出, 支架上的孔具有不同的直径, 其孔径尺寸和孔形成的原因有关。由于材料中水的挥发, 在凝胶丝上会存在大

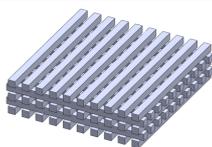


图1 | 三维支架微观模型
Figure 1 | Microscopic model of three-dimensional scaffold



图注: a 为支架、压头与支撑板模型; b 为项目系统; c 为网格化结果

图2 | 压力模型有限元仿真

Figure 2 | Finite element simulation of compression model

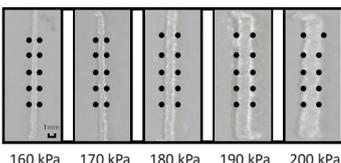
表2 | 不同填充间隙皮肤支架模型的理论孔隙

Table 2 | Theoretical pores of skin scaffold models of different filling gaps

填充间隙	理论质量 (g)	实际质量 (g)	理论孔隙率 (%)
1.5 mm	1.6	1.07	33.3
1.6 mm	1.6	1.00	37.5
1.7 mm	1.6	0.94	41.7
1.8 mm	1.6	0.88	44.4
1.9 mm	1.6	0.84	47.3
2.0 mm	1.6	0.80	50.0
2.1 mm	1.6	0.76	52.3
2.2 mm	1.6	0.72	54.5
2.3 mm	1.6	0.69	56.5
2.4 mm	1.6	0.67	58.3
2.5 mm	1.6	0.64	60.0

图注: 挤出气压在 160-200 kPa 时都可得到连续的凝胶丝, 压强越小凝胶丝越细

图3 | 不同气压下凝胶丝挤出实验
Figure 3 | Extrusion experiment of gel filament under different air pressures



160 kPa 170 kPa 180 kPa 190 kPa 200 kPa

图注: A 为气压 140 kPa 下挤出凝胶丝; B 为气压 220 kPa 下挤出凝胶丝

图4 | 气压 140 kPa 和 220 kPa 下凝胶丝挤出测试
Figure 4 | Filament extrusion test at 140 kPa and 220 kPa

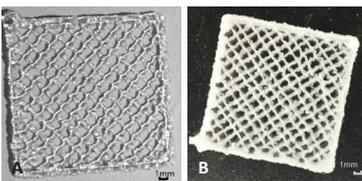
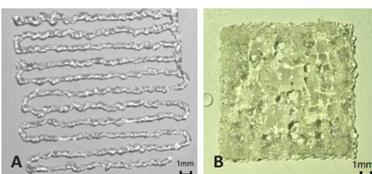


图5 | 明胶 / 氧化纳米纤维素皮肤支架

Figure 5 | Gelatin/oxidized nanocellulose skin scaffolds

图注: A 为气压 160 kPa 打印 2 mm 间隙制备的支架, 具有清晰的三维多孔结构; B 为气压 160 kPa 打印 2 mm 间隙制备的支架的冻干状态

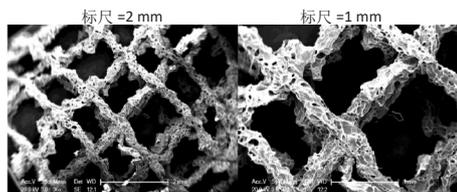


图6 | 冻干明胶 / 氧化纳米纤维素皮肤支架扫描电镜照片

Figure 6 | Scanning electron micrograph of freeze-dried gelatin/oxidized nanocellulose skin scaffold

图注: 由相互垂直的凝胶丝组成的三维多孔结构, 其中冻干的凝胶丝上密集分布着大小不一的小孔

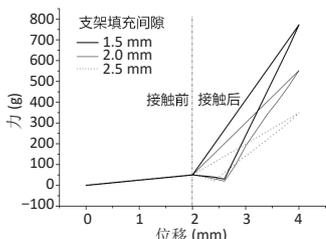


图7 | 明胶 / 氧化纳米纤维素皮肤支架力-位移曲线

Figure 7 | Force displacement curves of gelatin/oxidized nanocellulose skin scaffolds

量的小孔, 该孔仅与材料本身以及支架的含水量有关, 与支架的填充方式几乎没有关系; 另一种较大的孔是由打印中的填充间隙引起的, 并且直接由支架算法确定。根据 Solidworks 中对不同填充间隙支架模型的物理评估, 可以计算得到各支架的理论孔隙率, 具体评估结果如表 2 所示。

表 2 结果表明, 在凝胶丝直径不变的前提下, 填充间隙越大, 支架的理论孔隙率越大, 对于截面 1 mm×1 mm 的

凝胶丝, 支架的理论孔隙率从 1.5 mm 填充时的 33% 上升到 2.5 mm 填充时的 60%。需要说明的是, 在实际应用中由于支架含水量的不同, 支架的实际孔隙率会相较理论孔隙率有所增大, 增大幅度与支架的脱水程度有关。

2.5 压力模型有限元仿真 对三维模型进行压力仿真可以预测支架在外力作用下的变形情况, 支架最大变形量和所受外力之间的关系可以用来评价支架的抗压性能。图 8 所示是填充间隙 2.5 mm 的三维支架模型在压力 1 N 时的变形情况, 图中不同的颜色表示支架不同部位的变形量。从图中可以看出受力区域的变形最大为 0.669 mm, 相对于支架 5 mm 的高度, 相对变形量为 13.4%, 结合压力 1 N 和受力面积 78.5 mm², 可以计算模型的弹性模量约为 95 000 Pa。同样的方法可以计算得到填充间隙为 2 mm 的支架模型在 1 N 下的最大变形量为 0.403 mm, 模型的弹性模量约为 160 000 Pa, 填充间隙 1.5 mm 的支架模型在 1 N 下的最大变形量为 0.28 mm, 模型的弹性模量约 230 000 Pa, 这与结果 2.3 中所做的力学性能测试基本一致。

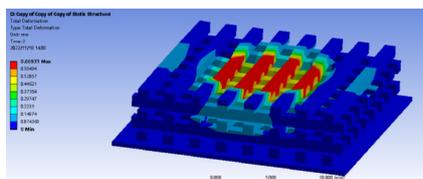


图8 | 压力模型有限元仿真结果

Figure 8 | Finite element simulation results of compression model

当对模型进行优化后得到复合模型, 预计支架的弹性模量可以按照混合定律进行计算, 即不同填充间隙模型的弹性模量乘以该模型所占的比例, 最终相加得到复合模型的弹性模量。对模型进行优化后, 模型共由 5 层凝胶丝构成, 其中 3 层按 2 mm 的填充间隙进行填充, 占总体积的 60%; 2 层按 2.5 mm 的填充间隙进行填充, 占总体积的 40%, 根据 2 mm 填充所得支架的弹性模量为 160 000 Pa, 2.5 mm 填充所得支架的弹性模量为 95 000 Pa, 可以计算得到该复合模型的弹性模量, 预计在 1 N 的外力作用下最大变形量为 0.495 8 mm。

图 9 中所示为该复合模型的有限元仿真结果, 仿真结果显示

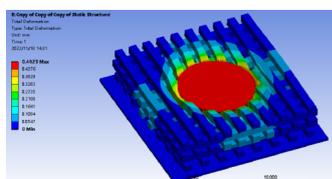


图9 | 复合模型有限元仿真结果

Figure 9 | Finite element simulation results of composite model

该模型在 1 N 的外力作用下最大变形量为 0.492 3 mm, 与预测结果误差范围小于 1%。通过对该模型进行物理性能的评价可以得到该模型的理论孔隙率为 54%, 同样与混合定律计算得到的理论孔隙率相一致。

3 讨论 Discussion

组织工程皮肤支架需要高孔隙率以满足细胞增殖分裂的需求, 同时需要较高的力学强度来提供细胞生长必要的支撑。针对这一问题, 此次实验对基于明胶 / 氧化纳米纤维素复合凝胶的 3D 打印组织工程皮肤制备过程展开研究, 从材料制备、胶丝挤出成型和支架堆叠成形 3 个维度讨论了 3D 打印工艺参数对支架微观形态及支架力学性能的影响。该文对使用不同填充间隙制备得到的皮肤支架进行了力学性能测试, 使用 2 mm 填充间隙制备得到了理论孔隙率为 50%、弹性模量 160 000 Pa 的皮肤支架。该文还对不同间隙的三维模型进行了有限元仿真, 仿真结果与测试结果对比误差小于 1%。有限元仿真结果同时论证了在同一个支架上使用不同填充间隙时, 可以利用混合定律预测支架孔隙率和力学性能, 这对多孔复合模型在皮肤支架上的应用提供了理论依据, 后续可根据临床应用中支架不同部位提出的孔隙率要求对支架模型进行进一步优化。

作者贡献: 许晓东进行实验设计, 实验实施为张琦、朱勉顺, 实验评估为周骥平, 资料收集为赵国琦, 许晓东成文, 史宏灿审核。

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。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 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。

4 参考文献 References

- GAO D, WANG Z, WU Z, et al. 3D-printing of solvent exchange deposition modeling (SEDM) for a bilayered flexible skin substitute of poly (lactide-co-glycolide) with bioorthogonally engineered EGF. *Mater Sci Eng C*. 2020;112:110942.
- 余海洋, 游德淑, 顾晓诚, 等. 基于生物 3D 打印技术的芍药苷 - 海藻酸钠 - 明胶皮肤支架体外生物相容性研究 [J]. *介入放射学杂志*, 2022,31(6):582-586.
- TORRES M, SINHA R, MOTA C, et al. Improving cell distribution on 3D additive manufactured scaffolds through engineered seeding media density and viscosity. *Acta Biomater*. 2020;101:183-195.
- EDMONDS M. Apligraf in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*. 2009;8(1):11-18.
- TASHAKORI M, RAKHSHAN K, RAMEZ M, et al. Conductive carbon nanofibers incorporated into collagen bio-scaffold assists myocardial injury repair. *Int J Biol Macromol*. 2020;163:1136-1146.

- INTINI C, EIVIN, CABRAL J, et al. 3D-printed chitosan-based scaffolds: An in vitro study of human skin cell growth and an in-vivo wound healing evaluation in experimental diabetes in rats. *Carbohydr Polym*. 2018;199:593-602.
- ORYAN A, SAHVEH S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *Int J Biol Macromol*. 2017;104:1003-1011.
- KOCH L, KUHN S, SORG H, et al. Laser printing of skin cells and human stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(5):847-854.
- YOON H, LEE J, YIM H, et al. Development of cell-laden 3D scaffolds for efficient engineered skin substitutes by collagen gelation. *Rsc Adv*. 2016;6(26):21439-21447.
- 刘煜凡, 黄沙, 姚斌, 等. 3D 生物打印的微结构促进小鼠表皮干细胞的增殖和活性 [J]. *南方医科大学学报*, 2017,37(6):761-766.
- 曹思玮, 安佰超, 乡世健, 等. 3D 打印隐丹参酮水凝胶面膜的抗痤疮作用及皮肤安全性评价 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2019,33(3):371-378.
- BILLIET T, GEVAERT E, SCHRYVER T, et al. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials*. 2014;35(1):49-62.
- CRABTREE RH. Hypervalency, secondary bonding and hydrogen bonding: siblings under the skin. *Chem Soc Rev*. 2017;46(6):1720-1729.
- YANG W, XU H, LAN Y, et al. Preparation and characterisation of a novel silk fibroin/hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair. *Int J Biol Macromol*. 2019;130:58-67.
- PAL P, SRIVAS P, DADHICH P, et al. Nano-/microfibrous cotton-wool-like 3D scaffold with core-shell architecture by emulsion electrospinning for skin tissue regeneration. *ACS Biomater Sci Eng*. 2017;3(12):3563-3575.
- WANG J, SUN X, CHENG N, et al. In vitro and in vivo studies of a collagen-based scaffold carrying PLGA microspheres for sustained release of epidermal growth factor in skin regeneration. *J Biomater Tissue Eng*. 2017;7(12):1336-1343.
- MIAO Z, S, EO J, HICKNER MA. Solvent-cast 3D printing of polysulfone and polyaniline composites. *Polymer*. 2018;152:18-24.
- ATOUIFI Z, ZARRINTAJ P, MOTLAGH GH, et al. A novel bio electro active alginate-aniline tetramer/agarose scaffold for tissue engineering: synthesis, characterization, drug release and cell culture study. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2017;28(15):1617-1638.
- HAN S, LEE JY, HEO EY, et al. Implantation of a Matrigel-loaded agarose scaffold promotes functional regeneration of axons after spinal cord injury in rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;496(3):785-791.
- HUANG Y, WANG J, YANG F, et al. Modification and evaluation of micro-nano structured porous bacterial cellulose scaffold for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;75:1034-1041.
- DANIELE M, ADAMS A, NACIRI J, et al. Interpenetrating networks based on gelatin methacrylamide and PEG formed using concurrent thiol click chemistries for hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2014;35(6):1845-1856.
- 冯辰, 周骥平, 许晓东, 等. 3D 打印生物材料微小力学性能自动测量系统的设计 [J]. *中国组织工程研究*, 2022,26(21):3306-3311.
- JIANG Y, ZHOU J, ZHANG Q, et al. Preparation of cellulose nanocrystals from *Humulus japonicus* stem and the influence of high temperature pretreatment. *Carbohydr Polym*. 2017;164:284-293.
- 鲍晶晶, 谢璠, 党婉斌, 等. TEMPO 氧化纳米纤维素增强芳纶云母纸基复合材料及其性能研究 [J]. *陕西科技大学学报*, 2019,37(5):1-7.
- 薛刚, 何易, 李小白, 等. 超声辅助硫酸水解法制备银杏果壳纳米纤维素及其特性表征 [J]. *食品工业科技*, 2021,42(14):204-211.
- 姜亚妮. 草源性纳米纤维素复合明胶的制备及生物 3D 打印皮肤支架成型工艺的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- XU X, ZHOU J, JIANG Y, et al. 3D printing process of oxidized nanocellulose and gelatin scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2018;29(12):1498-1513.
- 刘东方, 周骥平, 许晓东, 等. 基于 FLUENT3D 生物打印喷头内部流场的数值模拟分析 [J]. *中国组织工程研究*, 2018,22(2):274-280.

(责任编辑: GW, ZN, QY, YJ)