

3D 打印中空管道双交联水凝胶组织工程支架

王仁智, 陈远汾, 李金玮

<https://doi.org/10.12307/2025.424>

投稿日期: 2024-01-16

采用日期: 2024-04-03

修回日期: 2024-06-05

在线日期: 2024-06-25

中图分类号:

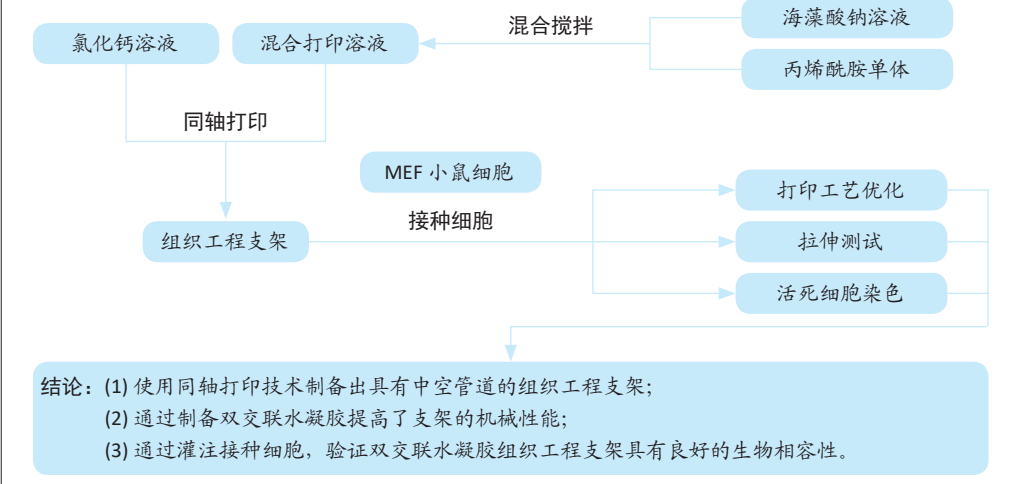
R459.9; R318.08; R-331

文章编号:

2095-4344(2025)16-03432-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 同轴打印海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶支架



文题释义:

海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶: 海藻酸钠是从海藻或马尾藻中提取碘和甘露醇之后的副产物, 因具有良好的稳定性、生物性和安全性在食品工业和医药领域得到了广泛应用。聚丙烯酰胺是丙烯酰胺均聚物或与其他单体共聚而得聚合物的统称。海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶是通过将两种材料混合, 再分别进行离子交联和共聚反应, 制备出的具有双交联网络的水凝胶, 这种水凝胶相较于传统单交联水凝胶具有更好的性能, 并且能够结合两种材料的优点。

同轴打印: 是3D打印中一种简便制备具有中空管道结构的常见技术。在同轴打印过程中, 使用同轴针头打印出具有同心结构的打印丝线, 此时打印丝线分为2层, 分别为外层打印层和内层牺牲层, 而后通过其他处理手段将内层牺牲层去除而不影响外层打印层, 从而获得中空管道。

摘要

背景: 在培养对结构、氧需求度较高的细胞时, 需要构建一个具有中空管道结构的立体生物支架来保证细胞得到足够的营养与氧气。近年来, 具有中空管道结构的水凝胶组织工程支架受到广泛关注。

目的: 以海藻酸钠为基础的生物支架材料结合同轴打印技术制备具有中空管道结构的组织工程支架, 通过灌注方式接种细胞验证其生物相容性。

方法: 制备海藻酸钠-聚丙烯酰胺混合打印溶液, 控制同轴打印过程中的内外层打印速度、海藻酸钠浓度、接收皿中氯化钙浓度等参数实现打印具有中空管道组织工程支架——海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶, 表征支架的微观形貌与弹性模量; 将小鼠成纤维细胞灌注至组织工程支架中空管道内, 利用活死细胞染色观察支架的细胞相容性。

结果与结论: ①通过探究打印过程中的打印参数, 当内层打印速度不变时, 中空管道的外径随着外层打印溶液的流速提升而提升, 内径有略微提升; 当外层打印溶液流速不变、内层溶液流速提升时, 中空管道支架的外径基本不变, 内径有明显提升; ②实验结果显示海藻酸钠的最佳浓度为2.5%, 过高的浓度不利于多层结构层与层之间的融合, 过低的浓度制备出的水凝胶机械性能不足; ③海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶的弹性模量较高, 普遍高于200 kPa, 并且随着氯化钙浓度的提升而增大, 在内层氯化钙浓度为2%、接收皿氯化钙浓度为0.3%时双交联水凝胶的弹性模量达到最大值(375 kPa); ④组织工程支架灌注细胞体外培养后的活死细胞染色显示, 细胞沿着中空管道轴向分布且具有较高的存活率, 但细胞浓度小于灌注时的细胞浓度; ⑤结果表明, 海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶具有较强的机械性能与良好的生物相容性, 可应用在构建具有中空管道的组织工程支架中, 并且“先制备支架、后接种细胞”的方式也避免了传统“细胞与打印溶液混合再进行制备”方式对支架材料及加工方式的限制。

关键词: 同轴打印; 组织工程; 双交联水凝胶; 海藻酸钠; 聚丙烯酰胺; 离子交联; 支架

3D printed hollow pipe double-crosslinked hydrogel tissue engineering scaffold

Wang Renzhi, Chen Yuanfen, Li Jinwei

School of Mechanical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Wang Renzhi, Master candidate, School of Mechanical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

广西大学机械工程学院, 广西壮族自治区南宁市 530004

第一作者: 王仁智, 男, 1998年生, 广西壮族自治区南宁市人, 汉族, 广西大学机械工程学院在读硕士, 主要从事同轴打印组织工程支架研究。

通讯作者: 陈远汾, 工学博士, 副教授, 广西大学机械工程学院, 广西壮族自治区南宁市 530004

<https://orcid.org/0009-0009-5559-0195> (王仁智)

基金资助: 广西百人计划项目(T3010097923), 项目负责人: 陈远汾

引用本文: 王仁智, 陈远汾, 李金玮. 3D 打印中空管道双交联水凝胶组织工程支架 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(16):

3432-3439.



Corresponding author: Chen Yuanfen, PhD, Associate professor, School of Mechanical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: When cultivating cells with high demand for structure and oxygen, it is necessary to construct a three-dimensional biological scaffold with hollow pipe structure to make sure the cells get enough nutrients and oxygen. In recent years, hydrogel tissue engineering scaffolds with hollow pipe structure have been paid more and more attention.

OBJECTIVE: The biological scaffold material based on sodium alginate was combined with coaxial printing technology to prepare a tissue engineering scaffold with a hollow pipe structure, and the cells were inoculated by perfusion to verify its biological properties.

METHODS: The sodium alginate-acrylamide mixed printing solution was prepared, and the parameters such as the printing speed of the inner and outer layers in the coaxial printing process, sodium alginate concentration, and calcium chloride concentration in the receiving dish were controlled to realize the printing of the tissue engineering scaffold with a hollow pipe — sodium alginate-polyacrylamide double-crosslinked hydrogel. The microstructure and elastic modulus of the scaffold were characterized. Mouse fibroblasts were injected into hollow pipes of tissue engineering scaffolds. Cell compatibility was observed by living/dead cell staining.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) By exploring the printing parameters in the printing process, when the inner printing speed was constant, the outer diameter of the hollow pipe increased with the increase of the flow rate of the outer printing solution, and the inner diameter increased slightly. When the flow rate of the outer layer printing solution was constant, and the flow rate of the inner layer solution was increased, the outer diameter of the hollow pipe was basically unchanged, and the inner diameter was significantly improved. (2) Experimental results showed that the concentration of sodium alginate was 2.5%. Excessive concentration was not conducive to the fusion of multi-layer structure layers, and the mechanical properties of hydrogels prepared at too low concentration were insufficient. (3) The elastic modulus of the double-crosslinked hydrogel was higher, generally higher than 200 kPa, and increased with the increase of the concentration of calcium chloride, and reached the maximum value of 375 kPa when the concentration of calcium chloride in the inner layer was 2% and the concentration of calcium chloride in the receiving dish was 0.3%. (4) The staining of live and dead cells after the tissue engineering scaffold perfusion cells *in vitro* showed that the cells were distributed along the axis of the hollow pipe and had a higher survival rate, but the cell concentration was lower than that during perfusion. (5) The results show that the sodium alginate-polyacrylamide double-crosslinked hydrogel has strong mechanical properties while retaining good biocompatibility, and can be used in the construction of tissue engineering scaffolds with hollow pipes, and the method of "first preparing the scaffold, then inoculating the cells" also avoids the traditional "cells and printing solution are mixed and then prepared" method to limit the scaffold material and processing method.

Key words: coaxial printing; tissue engineering; double-crosslinked hydrogel; sodium alginate; acrylamide; ion crosslinking; scaffold

Funding: Guangxi Hundred Talent Program, No. T3010097923 (to CYF)

How to cite this article: WANG RZ, CHEN YF, LI JW. 3D printed hollow pipe double-crosslinked hydrogel tissue engineering scaffold. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(16):3432-3439.

0 引言 Introduction

组织工程是一个横跨生物、物理、化学等学科的综合领域，其目的是通过构建生物支架为种子细胞提供三维的生长环境，培养细胞组织，用于修复人体损伤或老化部位^[1]。组织工程支架作为组织工程技术中至关重要的一环，其制造技术与性能对组织工程影响深远。在培养对结构、氧需求度较高的细胞时，需要构建一个具有中空管道结构的立体生物支架以满足其需求，保证细胞得到足够的营养与氧气^[2-4]。近年来，随着3D制造技术被应用于组织工程领域^[5-11]，使得原本难以实现的结构有了更简单、高效的制造方式^[12-16]。在3D打印技术中，基于挤压打印的同轴打印是制造立体中空管道结构最简便的方式^[17]。ATTALLA等^[18]设计了一种能够多轴挤出打印的微流控喷嘴，实现了图案化双层和三层空心通道结构，这种方式制备出来的中空管道能够在不影响结构完整性的情况下保证细胞活力和生长。SHAO等^[19]以甲基丙烯酸酐化明胶为生物墨水，在打印过程中由核心的明胶提供自支撑性，明胶在培养过程中被溶解产生中空管道，从而构建出具有中空管道的组织工程支架。DOLATI等^[20]将碳纳米管添加到打印墨水中，这种混合打印墨水不仅增强了打印中空管道的机械性能，还对细胞的生长具有一定的促进作用。但目前的水凝胶支架还存在机械性能差、构建复杂结构困难的问题。近年来，构建双交联水凝胶以解决传统水凝胶机械性能差等问题成为了组织工程水凝胶支架的常用方法。

此次实验提出了一种制备具有中空管道双交联水凝

胶组织工程支架的方法，将同轴打印技术与海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶相结合，在同轴打印过程中实现双交联水凝胶的2次交联，制备不含细胞的双交联水凝胶组织工程支架，同时通过控制打印过程中工艺参数、交联浓度实现控制中空管道的尺寸与机械性能，通过灌注方式向中空管道内壁接种细胞验证中空管道支架的生物相容性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 双交联水凝胶组织工程支架制备原理如图1所示，海藻酸钠-丙烯酰胺混合打印溶液与高浓度氯化钙溶液一起从同轴针头挤出，两种溶液发生接触后内径氯化钙溶液中的钙离子开始与外层打印溶液中的海藻酸钠发生离子反应^[21-22]，完成内层海藻酸盐第1次交联^[23-25]。形成的凝胶可以起到自支撑作用，维持中空管道结构，而凝胶会阻碍钙离子继续向外扩散，导致管道内壁形成凝胶而管道外壁仍然未凝胶化，所以在接收打印丝线的玻璃皿中添加低浓度的氯化钙溶液，辅助中空管道外壁凝胶化。XY移动平台按照设定的路线逐层进行打印，将打印所获得的中空管道结构取出进行2h的紫外光照，使得水凝胶中的丙烯酰胺单体在引发剂过硫酸铵的引发下发生共聚反应形成聚丙烯酰胺网络^[26-27]，完成水凝胶2次交联。将完成2次交联后的海藻酸盐-聚丙烯酰胺双交联水凝胶中空丝线用超纯水进行冲洗，去除未反应的材料。将细胞悬液使用注射器向支架中空管道中直接灌注，

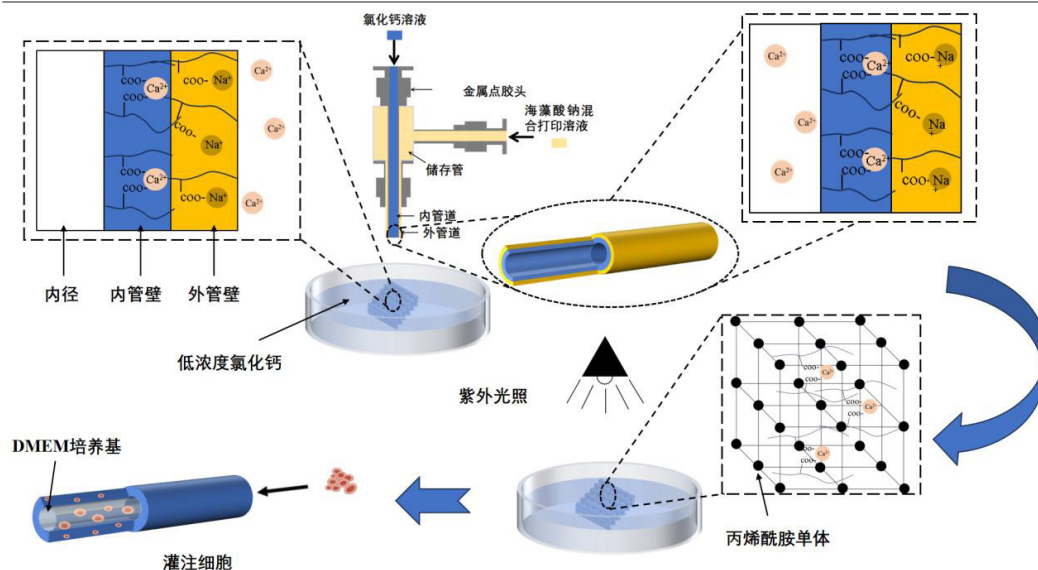


图1 | 双交联水凝胶组织工程支架制备原理

Figure 1 | Principle of preparation of scaffolds for tissue engineering of double-crosslinked hydrogels

利用细胞膜带负电的特性与中空管道带有正电的钙离子相结合，达到黏附细胞的目的。

1.2 时间及地点 实验于2022年6月至2023年6月在广西大学机械工程学院与动物科学技术学院完成。

1.3 材料 海藻酸钠、丙烯酰胺(科密欧化学试剂有限公司, 中国); N, N-亚甲基双丙烯酰胺(大茂化学试剂厂, 中国); 过硫酸铵(光华科技股份有限公司, 中国); 无水氯化钙(CaCl_2 , 国药集团化学试剂有限公司, 中国); 小鼠成纤维细胞(广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室提供); 成纤维细胞培养基(WISENT, 目录号086-150); 胰蛋白酶(Gibco, Cat.#2520-0072); 多通道注射泵(TS-1A, 兰格); 自组装同轴针头(内针G20、外针G14); 万能试验机(UTM2502, 三思纵横); 冷冻干燥机(FD-2B-80, 舜制仪器); 扫描电镜(EVO 10, 蔡司); 细胞成像多功能微孔板检测仪(Cytation5, BioTek)。

1.4 实验方法

1.4.1 海藻酸钠-丙烯酰胺混合打印溶液的制备 通常浓度超过5%的藻酸盐不能保证细胞活力, 浓度低于1%的藻酸盐不能提供良好的机械完整性^[28], 而浓度高于3%的藻酸盐打印压力过高, 所以混合打印溶液中海藻酸钠的浓度选择1.5%~3%。

使用电子天平按照表1称取对应质量的海藻酸钠粉末与丙烯酰胺晶体, 将2种材料混合后置入烧杯中, 再称取适量N, N-亚甲基双丙烯酰胺粉末与过硫酸铵, 将两种粉末加入海藻酸钠与丙烯酰胺的混合粉末中, 使用适量的超纯水溶解成混合溶液, 而后使用磁力搅拌器以500 r/min的速度搅拌混合溶液4 h, 搅拌过程中保持室温并避免强光, 防止丙烯酰胺由于温度或光照的影响提前发生共聚反应, 影响打印实验, 搅拌完成后将混合溶液常温避光静置4 h除气泡。配置出4种不同浓度混合打印溶

表1 | 双交联水凝胶组织工程支架制作中混合打印溶液组分

Table 1 | Composition of mixed printing solution in the preparation of double-crosslinked hydrogel tissue engineering scaffolds

材料	质量比	质量(g)			
海藻酸钠	1.5%~3%	1.5	2.0	2.5	3.0
丙烯酰胺	丙烯酰胺:海藻酸钠=6:1	9	12	15	18
N, N-亚甲基双丙烯酰胺	N, N-亚甲基双丙烯酰胺:丙烯酰胺=0.006:1	0.054	0.072	0.09	0.108
过硫酸铵	过硫酸铵:丙烯酰胺=0.01:1	0.09	0.12	0.15	0.18
超纯水		89.356	85.808	82.26	78.712

液将用于同轴打印实验, 在同轴打印实验过程中对4种浓度的混合打印溶液进行筛选, 选出最优打印浓度。

1.4.2 单层同轴打印 同轴打印实验使用自组装同轴针头, 打印动力采用多通道注射泵, 移动平台为自组装XY移动平台。以配置的4种浓度混合打印溶液作为外层打印溶液、2%氯化钙溶液作为内层打印溶液, 固定外层打印溶液流速为0.2 mL/min、内层打印溶液流速为0.5 mL/min, 进行单层同轴打印。将打印所获得的中空管道使用手持显微镜测量内外径尺寸, 通过探究混合打印溶液浓度对中空管道尺寸的影响, 筛选不适宜同轴打印的浓度。选取2%~3%的海藻酸钠-丙烯酰胺混合打印溶液作为外层打印溶液、2%氯化钙溶液作为内层打印溶液, 固定内层氯化钙溶液的流速为0.5 mL/min, 改变外层海藻酸钠-丙烯酰胺混合打印溶液流速(0.2~0.5 mL/min), 测试不同外层打印溶液流速对中空丝线尺寸的影响, 再固定外层海藻酸钠-丙烯酰胺混合打印溶液的流速为0.2 mL/min, 改变内层氯化钙溶液流速(0.5~2 mL/min), 测试不同内层打印溶液流速对中空丝线尺寸的影响。

1.4.3 多层同轴打印 使用2%~3%的海藻酸钠-丙烯酰胺混合打印溶液作为外层打印溶液、2%氯化钙溶液作为内层打印溶液, 固定外层打印溶液流速为0.2 mL/min、内层打印溶液流速为0.5 mL/min, 进行多层同轴打印, 同时设

置玻璃皿内的氯化钙溶液浓度为 0.1%–0.4%，测试 2%–3% 海藻酸钠溶液与 0.1%–0.4% 玻璃皿内氯化钙溶液够完成丝线融合 的浓度组合，筛出难以实现多层融合的打印溶液浓度。

1.4.4 双交联水凝胶的机械性能测试 使用浓度 2% 和 2.5% 的海藻酸钠–丙烯酸酯混合打印溶液与 2% 氯化钙溶液内层打印溶液进行单层同轴打印，固定外层打印溶液流速为 0.2 mL/min、内层打印溶液流速为 0.5 mL/min，玻璃皿内氯化钙浓度选择为 0.1%–0.3%。将打印而成的中空管道各截取 6 段 15 mm 长的小段，使用万用拉伸机进行拉伸实验，定量拉伸力设置为 50 N，不施加预载荷，拉伸速度 10 mm/min。因为海藻酸盐–聚丙烯酰胺双交联水凝胶中空管道属于超弹体，选取弹性阶段进行曲线拟合，计算获得的拉伸弹性模量，筛选最优打印浓度。

1.4.5 双交联水凝胶的形貌观察 使用 2.5% 海藻酸钠–丙烯酸酯混合打印溶液与 2% 氯化钙溶液内层打印溶液进行单层同轴打印，固定玻璃皿内氯化钙浓度为 0.3%、外层打印溶液流速为 0.2 mL/min、内层打印溶液流速为 0.5 mL/min。使用手持显微镜观察支架中空管道的内外径结构，再将中空管道放入冷冻箱内冷冻 (–18 °C) 处理。完全结冰后，启动冷冻干燥机，–80 °C 预冷 30 min 后放入样品，冷冻干燥 36 h。将中空管道支架取出，进行喷金处理，使用扫描电镜观察其微观结构，扫描电镜的电压为 20 kV，放大倍率为 141 倍。

1.4.6 双交联水凝胶的生物性能测试 将小鼠成纤维细胞在含体积分数 10% 胎牛血清的成纤维细胞培养基中培养，置于 37 °C、体积分数 5%CO₂ 培养箱中。观察细胞融合达到约 85% 时，用 PBS 洗涤细胞 3 次，室温下加入胰蛋白酶消化 1 min，加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化。以 1 : 3 的比例每三四天传代。细胞传代 3 次后，使用 0.25% 胰蛋白酶–EDTA 消化细胞，使用 PBS 制成浓度 1×10^7 L⁻¹ 的细胞悬液。使用 PBS 冲洗 10 mm 中空管道 (支架制备条件：2.5% 海藻酸钠–丙烯酸酯混合打印溶液，2% 氯化钙溶液内层打印溶液，玻璃皿内 0.3% 氯化钙、外层打印溶液流速为 0.2 mL/min，内层打印溶液流速为 0.5 mL/min)，使用注射器向中空管道内灌注小鼠成纤维细胞悬液 0.1 mL，将灌注完成的支架放入培养皿内并添加 1 mL 培养基，将培养皿放入 37 °C、体积分数 5%CO₂ 培养箱中。培养 3, 5, 7 d 后，分别滴加 500 μL 二乙酸荧光素和 10 μL 碘化丙啶染色剂至培养皿中，将培养皿放回细胞培养箱中保温培养 15–30 min，吸取培养皿中的液体并使用 PBS 多次洗涤去除残留染色剂，使用细胞成像多功能微孔板检测仪观察细胞并获得荧光图片样本，使用 Image J 软件 (NIH) 进行图像处理，计算细胞存活率。

1.5 主要观察指标 海藻酸钠–聚丙烯酰胺双交联水凝胶

的宏观结构与微观形貌、拉伸弹性模量与生物相容性。

1.6 统计学分析 采用 Origin 2021 软件进行数据处理，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达。该文生物统计已经由广西医学院 (区人民医院) 黄奔专家审核。

2 结果 Results

2.1 单层同轴打印工艺参数优化 以 1.5%–3% 海藻酸钠–丙烯酸酯混合打印溶液作为外层打印溶液、2% 氯化钙溶液作为内层打印溶液，单层同轴打印的中空管道内外径尺寸如图 2A 所示，1.5% 海藻酸钠–丙烯酸酯混合打印溶液所打印的中空管道外径明显小于其他浓度所打印的中空管道外径。同轴打印过程中针头如图 2B–E 所示，通过对比可知当海藻酸钠浓度为 1.5% 时，由于浓度较低，较强的流动性导致打印中空管道的外径降低，不适配此次实验所使用的同轴针头，应当予以排除。

为了确定同轴打印过程中外层、内层打印溶液流速对支架中空管道尺寸的影响，固定内层氯化钙溶液的流速为 0.5 mL/min，改变外层海藻酸钠–丙烯酸酯混合打印溶液流速 (0.2–0.5 mL/min)；固定外层海藻酸钠–丙烯酸酯混合打印溶液的流速为 0.2 mL/min，改变内层氯化钙溶液流速 (0.5–2 mL/min)，测试 2%–3% 海藻酸钠–丙烯酸酯混合打印溶液与 2% 氯化钙溶液所打印的中空管道尺寸，结果如图 3 所示。当内层打印溶液流速不变时，中空管道的外径随着外层打印溶液流速的提升而提升，内径有略微提升，这是由于外层打印溶液流速提升导致流量提升，从而增大了中空管道的外径；而外层打印溶液与内层溶液的流速差减小，内层打印溶液对外层打印溶液的压力增大，所以内径呈现出略微增大。当外层打印溶液流速不变、内层溶液流速提升时，中空管道的外径基本不变，内径有明显提升，这是由于内层溶液流速提升提高了内层溶液的流量，增大了中空管道的内径。结果证明，2%–3% 海藻酸钠–丙烯酸酯混合打印溶液适配此次实验所使用的同轴针头，其中空管道的变化规律与 SUN 等^[29] 的研究结果一致。

2.2 多层同轴打印工艺参数优化 3D 海藻酸钠–聚丙烯酰胺双交联水凝胶立体结构由单根中空管道按“蛇形线”排布，并且相邻两层呈 90° 交错叠加而成。为了稳定可靠地获得由中空丝线构成的 3D 海藻酸盐水凝胶立体结构，需要对玻璃皿内的低浓度氯化钙溶液进行测试。针对不同浓度海藻酸钠–丙烯酸酯混合打印溶液，分别在含有不同浓度氯化钙溶液的玻璃皿内进行打印实验，判断打印所获得的多层结构是否有层与层之间的连接，实验结果如图 4A 示。实验结果显示，2% 与 2.5% 海藻酸钠混合打印溶液在不影响中空管道成形的前提下能实现层与层之间的丝线融合，并且所需氯化钙溶度选择范围较广。3D 海

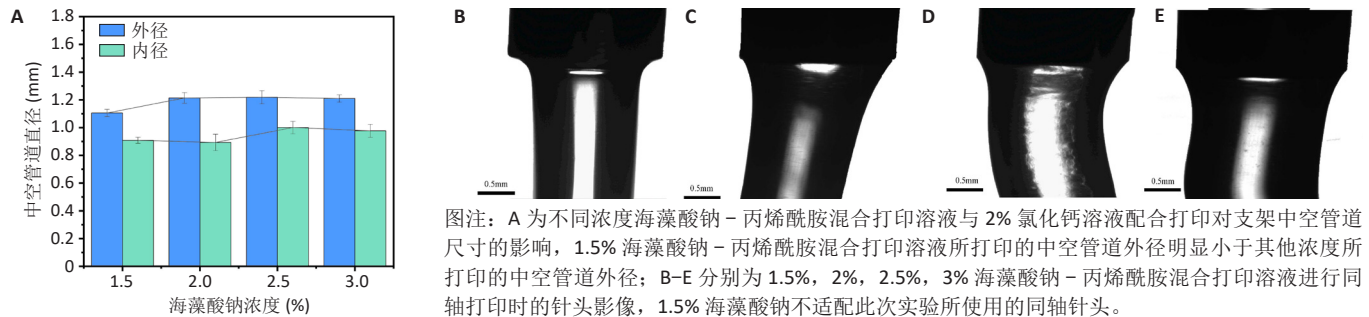


图2 | 不同浓度海藻酸钠-丙烯酰胺混合溶液打印中空管道支架的尺寸与同轴针头影像
Figure 2 | Dimensions and coaxial needle images of hollow pipe supports printed with different concentrations of sodium alginate acrylamide mixed solution

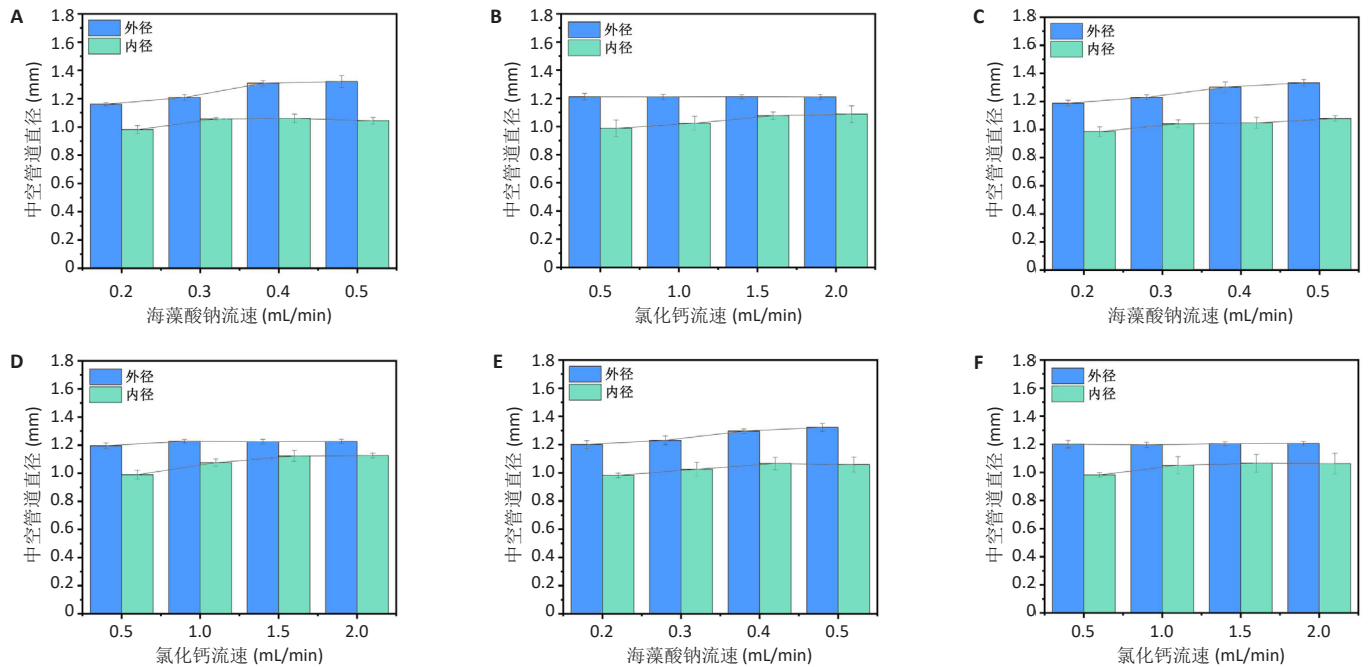


图3 | 内外层溶液流速对海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶中空丝线尺寸的影响
Figure 3 | Effect of the flow rate of the inner and outer layers of the solution on the size of the hollow filament of the sodium alginate-polyacrylamide double-crosslinked hydrogel

藻酸盐-聚丙烯酰胺双交联水凝胶的立体结构如图4B，立体结构由单条中空丝线构建而成，相邻两层交错排布，通过海藻酸盐离子交联特性形成凝胶连接，形成一个整体。将在2.5%海藻酸钠-丙烯酰胺混合溶液、2%氯化钙溶液、外层打印溶液流速为0.2 mL/min、内层打印溶液流速为0.5 mL/min下所制备的立体水凝胶结构放入超纯水中，使用显微镜对其结构进行观察，如图4C所示，相邻两层呈现交错排列。

为了获得更好的立体结构，需要对打印平台的移动速度进行测试，以匹配打印过程中的海藻酸钠溶液流速。该项测试使用的海藻酸钠浓度为2.5%、内层氯化钙浓度为2%、玻璃皿内氯化钙浓度为0.3%。在不同的海藻酸钠溶液流速下逐步提升平台移动速度，使打印针头按照设定

的路线移动，通过观察丝线的成形效果确定平台移动速度的适用范围。如图4D所示，当平台移动速度小于海藻酸钠溶液流速数值的8倍时，丝线无法按照设定的路线成形，丝线的形态扭曲、变形；当平台移动速度为海藻酸钠溶液流速数值的8-18倍时，丝线能够按照设定的路线成形，丝线形态笔直，结构良好；当平台移动速度大于海藻酸钠溶液流速数值的18倍时，丝线无法按照设定的路线成形，由于打印平台移动速度较快，丝线发生拖拽，影响立体支架的成形。

由以上实验获得打印参数可选择范围，确定打印实验参数：2%及2.5%海藻酸钠-丙烯酰胺混合溶液，玻璃皿内0.1%-0.3%氯化钙溶液，海藻酸钠-丙烯酰胺混合溶液打印速率0.2-0.5 mL/min，内层氯化钙溶液打印速率0.5-

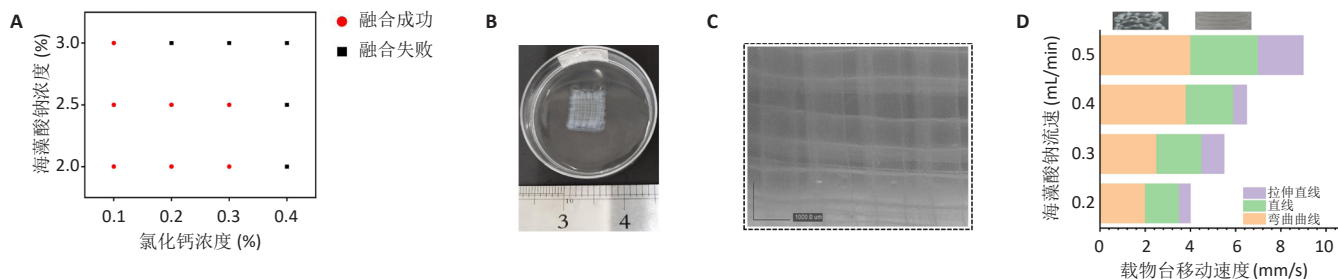
2 mL/min, XY 移动平台速度 2-7 mm/s。

2.3 双交联水凝胶的机械性能 中空丝线的弹性模量是其重要的机械性能指标, 根据前面参数优化的结果, 使用 2% 和 2.5% 海藻酸钠-丙烯酸混合打印溶液与 2% 氯化钙内层溶液打印同轴丝线, 玻璃皿内的氯化钙溶液浓度为 0.1%-0.3%, 将制备完成的打印丝线使用拉伸仪进行拉伸测试, 丝线的拉伸应力应变曲线与弹性模量见图 5。根据测试结果可知, 丝线具有高拉伸弹性模量, 并且弹性模量随着海藻酸钠浓度的升高而升高; 在同一浓度海藻酸钠混合打印溶液内, 丝线的弹性模量随着玻璃皿中氯化钙浓度的升高而升高, 并且在玻璃皿内氯化钙溶液浓度达到 0.3% 时, 2% 和 2.5% 海藻酸钠-丙烯酸混合打印溶液打印出的丝线具有相近的弹性模量 (375 kPa), 而单交联海藻酸钠水凝胶的弹性模量普遍不超过 300 kPa, 实验中混合打印溶液中海藻酸钠: 丙烯酸的质量比为 1 : 6, 该比例制备的海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶已被证明具有更

加优异的机械性能^[30]。

由此得出, 混合打印溶液中海藻酸钠的浓度应为 2.5%, 该浓度下混合打印溶液具有良好的可打印性能, 能够稳定可靠地打印出由单根中空管道构成的组织工程支架, 内层氯化钙浓度为 2%、玻璃皿内氯化钙浓度为 0.3%, 这种氯化钙浓度下所打印出来的同轴丝线具有最高的拉伸弹性模量。

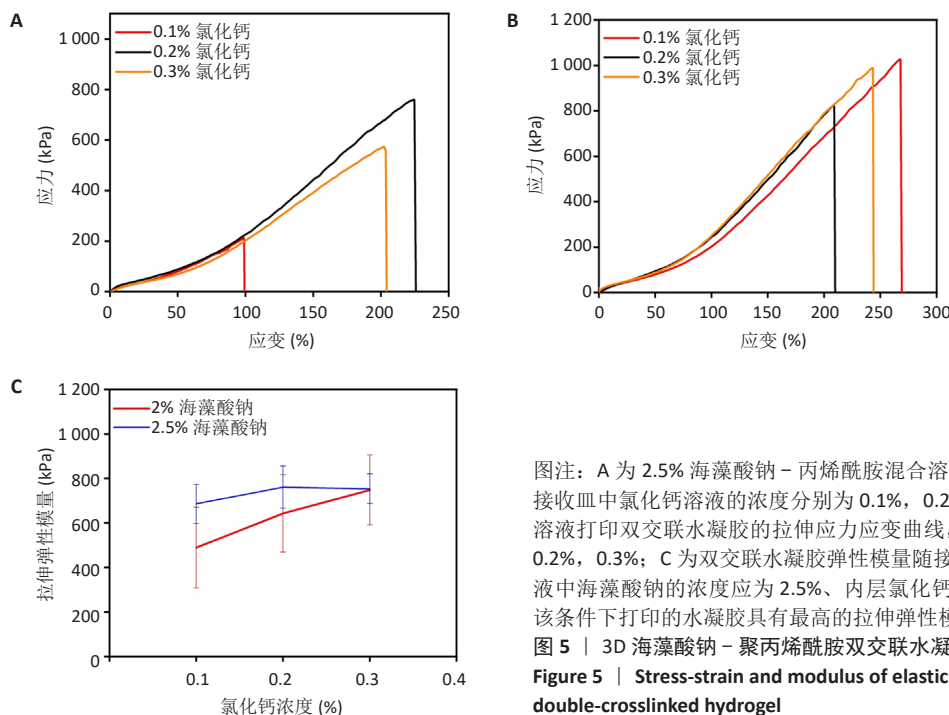
2.4 双交联水凝胶的形貌观察 使用 2.5% 海藻酸钠-丙烯酸混合溶液作为外层打印溶液、2% 氯化钙溶液作为内层打印溶液, 打印出的中空管道结构如图 6A 所示, 向中空管道中注入品红染色溶液, 品红染色溶液无外漏, 证明其具有完整的结构。手持显微镜观察中空管道, 如图 6B 所示, 打印丝线具有均匀连续的中空结构。截取部分管道进行冷冻干燥处理, 使用扫描电镜观察微观结构, 发现双交联水凝胶具有多孔结构, 孔径约 100 μm, 见图 6C, 这种多孔结构为细胞依附及营养物质的扩散提供了可能性。



图注: A 为海藻酸钠浓度与氯化钙浓度对多层结构融合的影响, 2% 与 2.5% 海藻酸钠溶液在不影响中空管道成形的前提下能实现层与层之间的丝线融合; B 为由多层中空丝线组成的印刷长方体结构宏观视图, 由单条中空丝线构建而成, 相邻两层交错排布; C 为显微镜下拍摄的水凝胶立体结构纵向剖面图, 相邻两层呈现交错排列。标尺为 1 000 μm; D 为平台移动速度对单层结构成形的影响, 当平台移动速度为海藻酸钠溶液流速数值的 8-18 倍时, 丝线能够按照设定的路线成形, 丝线形态笔直, 结构良好。

图 4 | 3D 海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶的立体结构

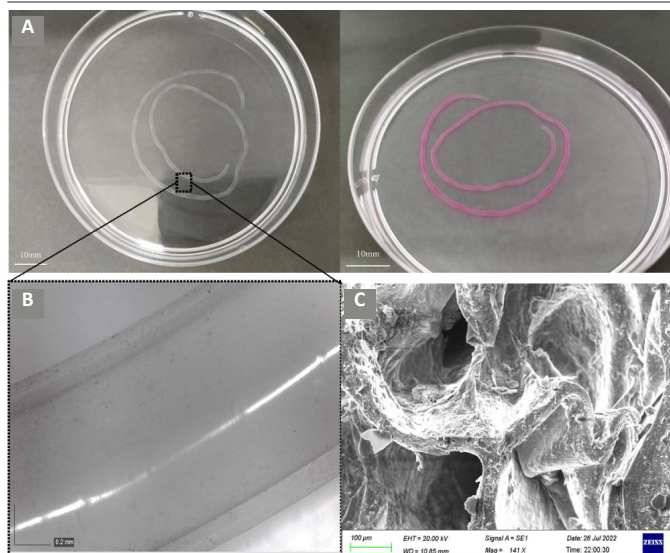
Figure 4 | Three-dimensional structure of 3D sodium alginate-polyacrylamide double-crosslinked hydrogel



图注: A 为 2.5% 海藻酸钠-丙烯酸混合溶液打印双交联水凝胶的拉伸应力应变曲线, 接收皿中氯化钙溶液的浓度分别为 0.1%, 0.2%, 0.3%; B 为 2% 海藻酸钠-丙烯酸混合溶液打印双交联水凝胶的拉伸应力应变曲线, 接收皿中氯化钙溶液的浓度分别为 0.1%, 0.2%, 0.3%; C 为双交联水凝胶弹性模量随接收皿中氯化钙溶液浓度的变化。混合打印溶液中海藻酸钠的浓度应为 2.5%、内层氯化钙浓度为 2%、接收皿内氯化钙浓度为 0.3%, 该条件下打印的水凝胶具有最高的拉伸弹性模量。

图 5 | 3D 海藻酸钠-聚丙烯酰胺双交联水凝胶的应力应变曲线与弹性模量

Figure 5 | Stress-strain and modulus of elasticity of 3D sodium alginate-polyacrylamide double-crosslinked hydrogel



图注：A 为打印丝线实物以及品红色染色灌注证明打印丝线的完整性；B 为显微镜下观察打印丝线具有连续完整的管道结构，标尺为 0.2 mm；C 为丝线表面扫描电镜图像，具有多孔结构，孔径约 100 μm ，标尺为 100 μm 。

图 6 | 3D 海藻酸钠 - 聚丙烯酰胺双交联水凝胶的中空管道结构
Figure 6 | Hollow pipe structure of 3D sodium alginate-polyacrylamide double-crosslinked hydrogel

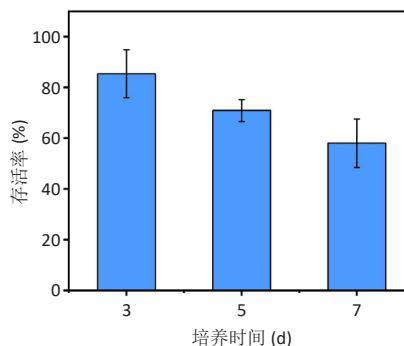
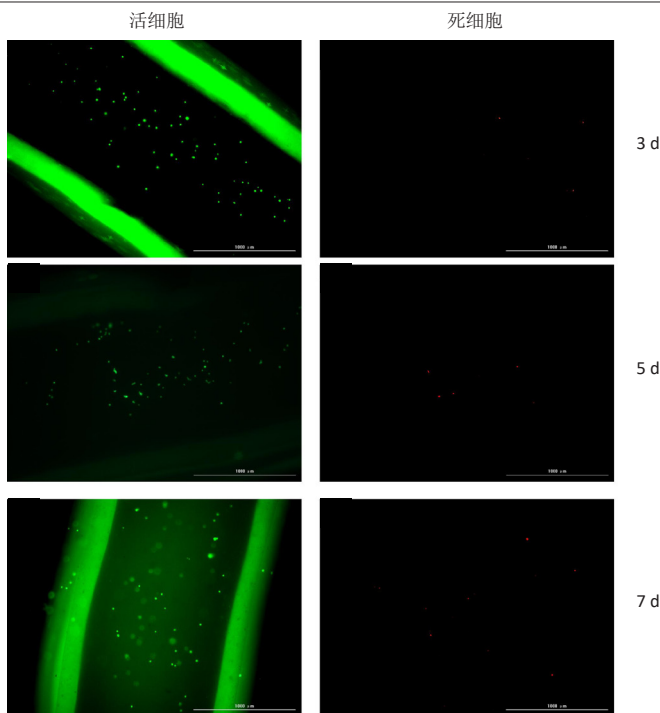
2.5 双交联水凝胶的生物相容性 向中空管道内灌注成纤维细胞后的死活细胞染色如图 7 所示，荧光显微镜下可见细胞在中空管道内沿着中空管道轴向分布，培养 3 d 后的细胞存活率为 (85.4 \pm 9.4)%，5 d 后的细胞存活率为 (70.9 \pm 4.3)%，7 d 后的细胞存活率为 (58.0 \pm 9.5)%。

3 讨论 Discussion

水凝胶材料由于具备类细胞外基质的仿生特性，一直以来就被视为组织工程的优秀材料。海藻酸钠因良好的生物相容性及快速离子交联凝胶化的特性，被视为 3D 打印水凝胶支架的理想材料之一。水凝胶支架长久以来的一项问题就是机械性能较差，以往的解决方法着重改良制备工艺或添加碳纳米管等增强剂来提高水凝胶支架的机械性能，而近年来通过制备双交联水凝胶来增强水凝胶支架的性能越来越被认可。

实验采用海藻酸钠 - 丙烯酰胺混合溶液进行 3D 打印，通常海藻酸钠的浓度超过 5% 不能保证细胞活力，浓度低于 1% 不能提供良好的机械完整性，实验配置了浓度为 1.5% - 3% 的海藻酸钠 - 丙烯酰胺混合溶液，通过同轴打印中空管道判断适合打印浓度，结果显示 1.5% 海藻酸钠打印的中空管道外径明显小于其他浓度打印的中空管道外径，由于海藻酸钠浓度较低，较强的流动性导致打印中空管道的外径降低，不匹配此次实验所使用的同轴针头。

在多层融合实验中，由于海藻酸盐凝胶化速度取决



图注：活死染色图像标尺为 1 000 μm 。

图 7 | 小鼠成纤维细胞灌注到 3D 海藻酸钠 - 聚丙烯酰胺双交联水凝胶中空管道后的活死染色

Figure 7 | Live/dead staining after mouse fibroblasts perfused in hollow pipe of 3D sodium alginate-polyacrylamide double-crosslinked hydrogel

于海藻酸钠和钙离子的浓度，当接收皿中的氯化钙浓度较高时，外表面反应速度过快，导致立体结构相邻的两层之间无法融合，这种情况下所获得的立体结构松散，层与层之间没有连接；当接收皿中的氯化钙浓度较低时，外表面反应速度较为适宜，立体结构相邻两层的外表面可以互相融合，使得形成凝胶后层与层之间存在连接，保证了立体结构的稳定；但当氯化钙浓度过低时，外表面反应速度较慢，容易引起中空管道的塌陷，因此，2% 和 2.5% 海藻酸钠 - 丙烯酰胺混合溶液打印多层均能与接收皿中 0.1% - 0.3% 氯化钙溶液完成多层融合。

通过拉伸实验测试双交联水凝胶管道的拉伸弹性模量，结果显示 2% 与 2.5% 海藻酸钠 - 丙烯酰胺混合打印溶液所制备出的中空管道均具有最高 375 kPa 的弹性模量，远高于单海藻酸钠水凝胶的弹性模量，增强了水凝胶支架的弹性模量。

荧光活死染色图像可观察到各组支架中的细胞均具有较高的存活率,但管道中的细胞浓度小于灌注时的细胞浓度,原因在于灌注细胞后,转移培养皿时部分细胞悬液发生了流动,从管道中流出导致细胞数量减少。从时间上看,第7天时细胞出现了分层,并且部分细胞发生了展开。

综上所述,实验通过海藻酸钠-丙烯酰胺混合溶液进行3D打印制备了具有中空管道的水凝胶支架,并且通过拉伸测试验证了双交联水凝胶具有比单交联水凝胶更高的拉伸弹性模量,通过活死细胞染色证实了支架的生物安全性,为后续制备载药、3D打印多孔水凝胶支架提供了支撑。

结论:实验提出了一种海藻酸盐-聚丙烯酰胺双交联水凝胶的双交联原理,结合3D同轴打印,制备出具有高弹性模量的中空管道丝线,并且对海藻酸钠、氯化钙的浓度和流速进行研究,探究这些参数对打印工艺及水凝胶弹性模量的影响。结果显示双交联水凝胶支架具有比单交联水凝胶更好的拉伸弹性模量,并且证明了双交联水凝胶支架具有良好的生物相容性。在今后的研究中可以对细胞接种方式做更进一步的研究,探究如何将细胞接种得更加均匀,最终实现制备出可长期保存的具有良好机械性能的组织工程支架。

作者贡献:王仁智进行实验设计、实验实施与成文,陈远汾进行实验评估与审核,李金玮进行资料收集。

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:该文章撰写遵守了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

- [1] KHADEMHOSEINI A, LANGER R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc*. 2016;11(10):1775-1781.
- [2] ROUWKEMA J, RIVRON NC, VAN BLITTERSWIJK CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2008;26(8):434-441.
- [3] NTEGE EH, SUNAMI H, SHIMIZU Y. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. *Regen Ther*. 2020;14:136-153.
- [4] KOLESKY DB, HOMAN KA, SKYLAR-SCOTT MA, et al. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(12):3179-3184.
- [5] ZHU W, QU X, ZHU J, et al. Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture. *Biomaterials*. 2017;124: 106-115.
- [6] PRIYA SG, JUNGVID H, KUMAR A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(1):105-118.
- [7] RATCLIFFE A. Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biol*. 2000; 19(4):353-357.
- [8] MOLLICA PA, BOOTH-CREECH EN, REID JA, et al. 3D bioprinted mammary organoids and tumoroids in human mammary derived ECM hydrogels. *Acta Biomater*. 2019;95:201-213.
- [9] XUE L, GREISLER HP. Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *J Vasc Surg*. 2003;37(2):472-480.
- [10] DATTA P, AYAN B, OZBOLAT IT. Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. *Acta Biomater*. 2017;51:1-20.
- [11] JAIN RK, AU P, TAM J, et al. Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol*. 2005;23(7):821-823.
- [12] BOLAND T, XU T, DAMON B, et al. Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol J*. 2006;1(9):910-917.
- [13] BOLAND T, MIRONOV V, GUTOWSKA A, et al. Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;272(2):497-502.
- [14] GU BK, CHOI DJ, PARK SJ, et al. 3D Bioprinting Technologies for Tissue Engineering Applications. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1078:15-28.
- [15] DUAN B, HOCKADAY LA, KANG KH, et al. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(5):1255-1264.
- [16] ALBRECHT DR, UNDERHILL GH, WASSERMANN TB, et al. Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. *Nat Methods*. 2006;3(5):369-375.
- [17] KHALIL S, SUN W. Bioprinting endothelial cells with alginate for 3D tissue constructs. *J Biomech Eng*. 2009;131(11):111002.
- [18] ATTALLA R, PUERSTEN E, JAIN N, et al. 3D bioprinting of heterogeneous bi- and tri-layered hollow channels within gel scaffolds using scalable multi-axial microfluidic extrusion nozzle. *Biofabrication*. 2018;11(1):015012.
- [19] SHAO L, GAO Q, XIE C, et al. Directly coaxial 3D bioprinting of large-scale vascularized tissue constructs. *Biofabrication*. 2020;12(3):035014.
- [20] DOLATI F, YU Y, ZHANG Y, et al. In vitro evaluation of carbon-nanotube-reinforced bioprintable vascular conduits. *Nanotechnology*. 2014;25(14):145101.
- [21] HECHT H, SREBNIK S. Structural Characterization of Sodium Alginate and Calcium Alginate. *Biomacromolecules*. 2016;17(6):2160-2167.
- [22] SMIDSRØD O, SKJÅK-BRAEK G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol*. 1990;8(3):71-78.
- [23] LI L, FANG Y, VREEKER R, et al. Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with X-ray diffraction. *Biomacromolecules*. 2007;8(2):464-468.
- [24] BOATENG JS, MATTHEWS KH, STEVENS HN, et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci*. 2008; 97(8):2892-2923.
- [25] FANG Y, AL-ASSAF S, PHILLIPS GO, et al. Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. *J Phys Chem B*. 2007; 111(10):2456-2462.
- [26] ROSIAK J, BUROZAK K, PKALA W, et al. Polyacrylamide hydrogels as sustained release drug delivery dressing materials. *Radiat Phys Chem*. 1983;22(3-5):907-915.
- [27] FERNANDEZ ED, LOPEZ-CABARCOS LE, MIJANGOS CA, et al. Viscoelastic and swelling properties of glucose oxidase loaded polyacrylamide hydrogels and the evaluation of their properties as glucose sensors. *Polymer*. 2005;46(7): 2211-2217.
- [28] ZHANG Y, YU Y, CHEN H, et al. Characterization of printable cellular microfluidic channels for tissue engineering. *Biofabrication*. 2013;5(2):025004.
- [29] SUN JY, ZHAO X, ILLEPERUMA WR, et al. Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature*. 2012;489(7414):133-136.
- [30] YANG X, LU Z, WU H, et al. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018;83:195-201.

(责任编辑: GW, ZN, QY, LWJ)