

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.030

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.030>

3D生物打印技术及其在组织工程中的应用

张小翠¹, 陈鹏² 综述 汪健² 审校

(1. 武汉工程大学邮电与信息工程学院, 武汉 430071; 2. 第四军医大学唐都医院胸腔外科, 西安 710038)

[摘要] 3D生物打印是在3D打印(three-dimensional printing, 3DP)和组织工程等多学科融合的基础上发展出来的一种新兴应用技术, 该技术能够根据数字化的模型设计将生物材料和/或细胞打印成三维生物功能体, 被广泛应用于血管、骨骼等组织的再生与重建领域。

[关键词] 3D生物打印; 组织工程; 应用

3D bioprinting technology and its application in tissue engineering

ZHANG Xiaocui¹, CHEN Peng², WANG Jian²

(1. College of Posts and Telecommunications, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430071; 2. Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract Three-dimensional (3D) bioprinting is a new applied technology based on the integration of 3D printing and tissue engineering, which can print biological materials and /or cells into 3D biological architectures according to the model of digital design. Thus, it has been widely used in the regeneration and reconstruction of blood vessel, bone and other tissues.

Keywords 3D bioprinting; tissue engineering; application

3D打印(three-dimensional printing, 3DP)是起源于20世纪80年代的一种快速成型(rapid prototyping, RP)技术, 其利用计算机辅助设计三维的数字化模型, 并对模型进行分层和数控编程, 进而运用粉末状的可粘合材料通过逐层打印的方式来构造物体^[1]。近年来, 3DP技术发展迅速, 新的打印方法被不断开发出来, 但都是基于离散堆积原理的分层制造、逐层叠加的增材制造过程。3DP释放了巨大的数字设计空间, 可以根据设计制造出传统方法无法完成的结构, 在以组织工程为代表的医学领域中应用日益广泛。

组织工程是一门综合运用细胞学、工程学和材料学的方法, 在科学认识机体正常及病理状态下的组织结构与功能关系的基础上, 使用细胞、支架材料和生物活性因子促进组织修复和再生的新兴学科^[2]。通过3DP技术和组织工程技术的结合, 人们可以将生物材料和(或)细胞作为打印材料, 按照仿生形态、生物学功能及细胞微环境等要求, 用增材制造的方法打印出具有复杂生理结构和功能的体外三维生物功能体, 并由此产生了3DP技术的一个分支——3D生物打印, 也是目前3DP技术研究的最前沿领域^[3]。本文将从3D生物打

收稿日期 (Date of reception): 2017-04-04

通信作者 (Corresponding author): 汪健, Email: 13402988668@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (31570997)。This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31570997).

印的常用方法及运用等方面展开简要综述。

1 3D 生物打印常用技术简介

以往构建组织工程材料的方法有静电纺丝、真空冷冻干燥、气体发泡法、粒子沥率法等^[4-7], 3DP较这些方法有着突出的优势: 1)构建的组织或器官精度高。细胞作为机体的基本单元, 大小为微米级, 而3DP材料的尺寸已经突破纳米级, 能够实现细胞层面的构建和组装; 2)能够实现材料和细胞的有机组合, 3DP技术可以将组织器官中不同的细胞和组分进行一体化成型; 3)能够针对具体需求实现个性化的设计, 3DP可以根据实际缺损情况进行即时的计算机三维模型再现, 制造出完全符合患者需要的产品。

目前的3D生物打印根据其工作原理可以分为3种, 即喷墨生物打印、挤压成型生物打印和激光辅助生物打印。

1.1 喷墨式 3D 生物打印

喷墨式3D生物打印原理非常类似于传统的二维喷墨打印, 是最早运用于组织工程的3DP技术。该技术通常使用水凝胶作为“生物墨水”, 混合封装过的细胞后储存在墨盒中, 连接墨盒的打印喷头在计算机的控制下实现三维立体结构的打印。喷墨打印依据喷头工作的方式通常被分为连续打印和按需滴化打印。连续喷墨打印机喷头持续喷出底物, 打印速度快, 适合大尺寸部件的打印, 多用于工业。按需滴化打印机则在喷头装有温控或压电传动装置, 能够产生可控尺寸的液滴, 具有打印精度高和成本相对较低的优点, 3D生物打印多采用该类型喷头。目前的喷墨生物打印存在以下不足: 1)打印喷头都是运用微机电系统(microelectromechanical system, MEMS)进行工作, 不能挤出高黏度材料(>15 mPa/s)和高密度的细胞($>1 \times 10^6$ cells/mL)^[8-9]; 2)喷墨生物打印的另一个缺点为沉淀效应, 即生物墨水中的细胞会在打印的过程中发生沉降, 附着在墨盒中, 导致生物墨水的黏度增加堵塞喷头^[9]; 3)打印过程中会使得细胞和生物材料承受热和机械应力; 4)喷墨生物打印的工作原理要求打印材料必须以液态形式存在, 在一定程度上限制了使用范围。

1.2 微挤压式 3D 生物打印

为了解决喷墨式生物打印机不能打印高黏度材料的问题, 研究者们设计出了微挤压式的3D生

物打印方法。该方法运用气动或者机械(活塞或螺旋)驱动系统连续挤出含有材料和细胞的拉丝, 几乎各种黏度的水凝胶和高密度的细胞都能通过这种方法进行生物打印。在扩大了适用范围的同时, 微挤压打印的方法也会对细胞施加较大的压力, 在一定程度上影响细胞的活性^[3]。现有的大多数商用3D生物打印机都是基于微挤压原理工作的, 如德国的Envisiontec Bioplotter系统, 美国的NovoGen 3D Bioprinting系统等。微挤压生物打印系统根据构造原理的不同在性能上也有所差异: 气动喷嘴的打印系统更能适应不同黏度的底物, 但是在精确控制沉积量上相对不足; 螺旋机械驱动的打印系统成本较低, 但是难以胜任高黏度材料的打印^[10]。

1.3 激光辅助式 3D 生物打印

激光辅助3D生物打印的技术起源于激光直写^[11]和激光诱导转移^[12]技术, 其基本原理涉及一个响应激光刺激的供体层。该供体层由上下两层构成, 上层是能够吸收能量的带状结构, 下层由悬浮的“bioink”构成。在打印的过程中, 激光脉冲聚焦在供体层的上层后会在界面处产生一个高压液泡, 推动下层的“bioink”下落, 落下的bioink被接收器接受并发生交联反应。与其他的打印方式相比, 激光辅助3D生物打印避免了bioink与分配器之间的直接接触, 不会对细胞造成机械损伤, 因此可以保持细胞的高存活率(通常在95%以上)。此外, 激光辅助3D生物打印不存在喷头堵塞的问题, 对材料的黏度要求不高, 可以打印多种类型的bioink, 具有广阔的运用空间。但是激光3D生物打印也存在一些不足: 激光照射对细胞是否有影响目前还不清楚; 相对于其他打印技术成本高昂^[13]。

除了以上3种方法, 学者们还在积极探索其他的3D生物打印模式。如Gou等^[14]将光固化快速成型技术运用到3D生物打印中, 使用光来选择性地固化目标层的bioink, 通过类似激光辅助3D生物打印的模式逐层叠加构建物体; 刘媛媛等^[15]将3D生物打印技术和静电纺丝技术相结合制备组织工程支架。这些新技术的发展将为组织工程提供更多的解决方案。

2 3D 生物打印在组织工程中的运用

随着3D生物打印技术的不断完善, 目前已经广泛运用在组织工程领域中, 并且在骨及软骨重建、人造血管、人工肝等多个方面取得了很多令

人振奋的成果, 展现出良好的前景。

2.1 3D 生物打印与组织工程血管化

血管化是组织工程面临的一个最基本的挑战, 是维持组织活性的关键。以往促进血管化的方法有对生物材料进行化学改性、调整孔隙大小以促进血管长入, 加入血管生长因子促进血管生长等, 但是血管的自然长入需要较长的时间, 不能满足移植初期组织对血供的需求^[16]。预先设置血管网络可以实现移植与宿主循环的快速对接, 因此3DP血管成为组织工程领域的一个研究热点。

较早的血管化策略是先用牺牲材料构建三维的网状结构, 当周围结构构建完成后去除牺牲材料得到三维的管网空隙为组织提供灌注^[17]。3D生物打印技术的发展为血管化开辟了新的途径: 1) 构建精准、可控的微流道结构, 如Kolesky等^[18]利用多喷头的3DP机, 将可以在温和条件下降解组织相容性好的材料和细胞一起进行打印, 当降解材料分解后形成孔道结构; 2) 联合打印生物材料与血管种子细胞, 构建血管样组织, 如Zhang等^[19]利用同轴喷嘴将水凝胶直接打印成空心的管状结构, Yu等^[20]将该方法与细胞直写技术结合打印, 用成纤维细胞打印出了血管样组织。这些技术的出现有望实现组织工程中血管网络的生物打印, 但是目前尚存在一些瓶颈: 受扩散距离的限制, 组织厚度超过200~300 μm 时就需要单独的血流灌注, 目前的打印技术尚无法构建满足组织生长需要的毛细血管网络; 如何在多种组织构成的器官中构建血管网络, 并保证血管种子细胞的分化、增殖等方面有待深入研究。

2.2 3D 生物打印骨及软骨

骨科是医学领域中较早运用3DP技术的学科, 3DP的金属假体、手术规划模型等在临床中已广泛应用^[21]。

3D生物打印技术的出现, 为骨及软骨重建提供了生物相容性更好的选择: Wang等^[22]用聚丙烯酯打印出的多孔假体具有较好的组织相容性和力学特性, 在体内的降解时间超过224 d; Yao等^[23]通过兔的CT扫描图像进行数学建模, 利用聚己内酯羟基磷灰石打印的假体可以很好地适应兔的生理负荷; Kundu等^[24]将聚己内酯和海藻酸钙水凝胶包被的软骨细胞通过多头沉积系统进行一体化打印, 体内实验证实软骨细胞分化良好。这些新型组织工程骨及软骨在特定方面具有突出优势, 但是如何系统评价它们的综合性能及临床应用前景

尚需进一步的探讨。

2.3 3D 生物打印神经

神经组织的再生和修复是困扰医学界的难题之一, 学者们运用3D生物打印技术进行了一些有意义的尝试。Owens等^[25]运用小鼠骨髓干细胞和施旺细胞打印出管状的神经组织进行动物学实验; Lorber等^[26]的研究证实大鼠的视网膜神经节细胞和神经胶质细胞可用于喷墨模式3D生物打印; Pateman等^[27]打印出PEG化的神经导管用于神经修复研究; Hsieh等^[28]利用聚氨酯水凝胶包裹打印神经干细胞, 使其不仅保持良好的体外增殖与分化能力, 更在斑马鱼神经损伤体内模型中表现出神经修复功能。上述报道证明了利用3D生物打印技术构建组织工程神经的可行性。

此外, 3D生物打印技术还在口腔修复^[29]、人造器官^[30]等领域取得了令人瞩目的成绩。

3 结语

种子细胞、支架材料、细胞因子是组织工程的3大基本要素, 3D生物打印技术为三者时间和空间上的精准组合提供了有力工具^[31-32]。有学者^[33]预测: 3D生物打印技术或将引发医学新革命。但是我们也应该清醒地认识到, 3D生物打印技术的发展还处在比较初级的阶段, 仍有诸多挑战横亘在我们面前: 生物材料的选择优化, 种子细胞的诱导和成熟, 适宜的血管化及神经化等。

参考文献

1. Park S, Kim J, Lee H, et al. Methodology of technological evolution for three-dimensional printing[J]. *Industrial Management & Data Systems*, 2016, 116(1): 122-146.
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering[J]. *Science*, 2000, 260(5110): 920-926.
3. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(8): 773-785.
4. Fong EL, Lamhamedi-Cherradi SE, Burdett E, et al. Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(16): 6500-6505.
5. Lee MK, Rich MH, Lee J, et al. A bio-inspired, microchanneled hydrogel with controlled spacing of cell adhesion ligands regulates 3D spatial organization of cells and tissue[J]. *Biomaterials*, 2015, 58: 26-34.

6. Poursamar SA, Hatami J, Lehner AN, et al. Gelatin porous scaffolds fabricated using a modified gas foaming technique: Characterisation and cytotoxicity assessment[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 48: 63-70.
7. Park HJ, Lee OJ, Lee MC, et al. Fabrication of 3D porous silk scaffolds by particulate (salt/sucrose) leaching for bone tissue reconstruction[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 78: 215-223.
8. Pepper ME, Seshadri V, Burg TC, et al. Characterizing the effects of cell settling on bioprinter output[J]. *Biofabrication*, 2012, 4(1): 011001.
9. Pepper ME, Seshadri V, Burg T, et al. Cell settling effects on a thermal inkjet bioprinter[J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2011, 2011: 3609-3612.
10. Lee JS, Hong JM, Jung JW, et al. 3D printing of composite tissue with complex shape applied to ear regeneration[J]. *Biofabrication*, 2014, 6(2): 024103.
11. Chia HN, Wu BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials[J]. *J Biol Eng*, 2015, 9: 4.
12. Duocastella M, Colina M, Fernández-Pradas JM, et al. Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting[J]. *Appl Surf Sci*, 2007, 253(19): 7855-7859.
13. Duarte Campos DE, Blaeser A, Weber M, et al. Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid[J]. *Biofabrication*, 2013, 5(1): 015003.
14. Gou M, Qu X, Zhu W, et al. Bio-inspired detoxification using 3D-printed hydrogel nanocomposites[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3774.
15. 刘媛媛, 向科, 李瑜, 等. 结合生物3D打印和静电纺丝制备复合生物可吸收血管支架用于血管狭窄治疗[J]. *东南大学学报(英文版)*, 2015, 31(2): 254-258.
LIU Yuanyuan, XIANG Ke, LI Yu, et al. Composite bioabsorbable vascular stents via 3D bio-printing and electrospinning for treating stenotic vessels[J]. *Journal of Southeast University. English Edition*, 2015, 31(2): 254-258.
16. Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T. Cardiac tissue engineering: state of the art[J]. *Circ Res*, 2014, 114(2): 354-367.
17. Miller JS, Stevens KR, Yang MT, et al. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered 3D tissues[J]. *Nat Mater*, 2012, 11(9): 768-774.
18. Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, et al. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs[J]. *Adv Mater*, 2014, 26(19): 3124-3130.
19. Zhang Y, Yu Y, Ozbolat IT. Direct Bioprinting of Vessel-Like Tubular Microfluidic Channels[J]. *J Nanotechnol Eng Med*, 2013, 4(2): 0210011-0210017.
20. Yu Y, Zhang Y, Ozbolat IT. A hybrid bioprinting approach for scale-up tissue fabrication[J]. *J Manuf Sci Eng*, 2014, 136(6): 61013.
21. Cohen J, Reyes SA. Creation of a 3D printed temporal bone model from clinical CT data[J]. *Am J Otolaryngol*, 2015, 36(5): 619-624.
22. Wang MO, Piard CM, Melchiorri A, et al. Evaluating changes in structure and cytotoxicity during in vitro degradation of 3D printed scaffolds[J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(9/10): 1642-1653.
23. Yao Q, Wei B, Guo Y, et al. Design, construction and mechanical testing of digital 3D anatomical data-based PCL-HA bone tissue engineering scaffold[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2015, 26(1): 5360.
24. Kundu J, Shim JH, Jang J, et al. An additive manufacturing-based PCL-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 9(11): 1286-1297.
25. Owens CM, Marga F, Forgacs G, et al. Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft[J]. *Biofabrication*, 2013, 5(4): 045007.
26. Lorber B, Hsiao WK, Hutchings IM, et al. Adult rat retinal ganglion cells and glia can be printed by piezoelectric inkjet printing[J]. *Biofabrication*, 2014, 6(1): 015001.
27. Pateman CJ, Harding AJ, Glen A, et al. Nerve guides manufactured from photocurable polymers to aid peripheral nerve repair[J]. *Biomaterials*, 2015, 49: 77-89.
28. Hsieh FY, Lin HH, Hsu SH. 3D bioprinting of neural stem cell-laden thermoresponsive biodegradable polyurethane hydrogel and potential in central nervous system repair[J]. *Biomaterials*, 2015, 71: 48-57.
29. Joo HS, Park SW, Yun KD, et al. Complete-mouth rehabilitation using a 3D printing technique and the CAD/CAM double scanning method: A clinical report[J]. *J Prosthet Dent*, 2016, 116(1): 3-7.
30. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, et al. 3D Bioprinting for Engineering Complex Tissues[J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(4): 422-434.
31. Fricain JC, De Olivera H, Devillard R, et al. 3D bioprinting in regenerative medicine and tissue engineering[J]. *Med Sci (Paris)*, 2017, 33(1): 52-59.
32. Chen C, Bang S, Cho Y, et al. Research trends in biomimetic medical materials for tissue engineering: 3D bioprinting, surface modification, nano/micro-technology and clinical aspects in tissue engineering of cartilage and bone[J]. *Biomater Res*, 2016, 20: 10.
33. Arslan-Yildiz A, El Assal R, Chen P, et al. Towards artificial tissue models: past, present, and future of 3D bioprinting[J]. *Biofabrication* 2016, 8(1): 014103.

本文引用: 张小翠, 陈鹏, 汪健. 3D生物打印技术及其在组织工程中的应用[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(7): 1496-1499. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.030

Cite this article as: ZHANG Xiaocui, CHEN Peng, WANG Jian. 3D bioprinting technology and its application in tissue engineering[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(7): 1496-1499. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.07.030