

3D 打印技术构建支架修复软骨缺损的研究进展

杨亚冬 张文元

摘 要 3D 打印技术是近年来兴起的一种数字化快速成型技术。本文就 3D 打印技术在软骨修复中研究较多的“生物打印墨水”、种子细胞的控制性打印以及牺牲层工艺打印技术等方面进行综述,总结其在软骨缺损治疗中的研究进展,并提出了当前该技术在研究和应用中遇到的问题及其发展趋势。

关键词 3D 打印技术 软骨缺损 细胞控制性打印 牺牲层技术

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.047

3D 打印技术是近年来随着计算机辅助设计、数控技术、高分子材料学等多种学科交叉发展出现的一种数字化快速成型技术,其基本原理是“分层制造,逐层叠加”^[1]。根据成型方式不同,3D 打印技术可以分为以下几种:光固化成型技术,熔融挤出成型技术,选择性激光烧结,3D 喷印技术等^[2,3]。3D 打印作为一种新兴制造技术,已经应用于多种领域,包括机械设备、生物医药、生活用品等,并且随着该技术的不断成熟和完善,其应用领域会更加广泛。

近年来 3D 打印技术在组织工程支架材料的制备中有了较多应用研究,并逐渐凸显出它的优势:通过该技术制备的支架材料具有与缺损组织相匹配的解剖外形,也具有满足细胞黏附、增殖的内部三维多孔结构,还可通过选择不同的打印材料使组织工程支架符合实际需要的机械强度^[4~6]。本文就软骨修复中研究较多的 3D 打印“墨水”、复杂形状软骨组织的打印等方面进行综述,总结其在软骨缺损治疗中的研究进展。

一、软骨修复中研究较多的 3D 打印“墨水”

3D 生物打印的“生物墨水”必须具有合适的流变性和细胞相容性,配制时要考虑其黏滞性、密度、表面张力,且要求其在打印前及打印中保持液态,打印后立即凝固,使其固化,从而保证设计的支架结构能保持原状不至塌陷。而在软骨组织工程中不仅要具备以上条件,还要考虑其力学性能,故选用单一的材料几乎很难满足上述多种条件,研究人员将两种或两

种以上的高分子材料混合来构建软骨组织的支架。这些高分子材料主要有两种类型:天然生物衍生材料,如藻酸盐凝胶、I 型胶原、壳聚糖、脱钙骨基质等;人工合成的生物高分子材料,如聚乳酸及共聚物、羟基磷灰石、磷酸三钙、生物活性玻璃等。下面就其中几种常用的材料及研究中常用的组合做一介绍。

1. 海藻酸钠(sodium alginate,SA):是一种天然多糖,具有吸水,形成凝胶和成膜的特点。在水中能形成非常黏稠的均匀的溶液,在溶液中加入铝、钡、钙、铜、铁、铅、锌、镍等金属盐,就会生成不溶性的藻酸盐,使凝胶固化。利用这个特性就能实现其从 3D 打印时的液态到打印后成固态的转变。该凝胶具有良好的弹性和生物可降解性能,已有较多报道将其用于软骨修复,如 Hong 等^[7]将聚乙二醇和海藻酸钠结合,形成的水凝胶韧性比天然的软骨还好,且具有高弹性,细胞在支架内能存活良好。提示该混合水凝胶在软骨组织修复中具有很大的应用前景。Markstedt 等^[8]将藻酸盐和纳米纤维素按比例混合形成“打印墨水”与软骨细胞一起进行 3D 生物打印,以组织的计算机断层扫描图数据(CT)为模板,打印出人耳或半月板。培养后,细胞活性良好,证实该混合水凝胶具有很好的细胞相容性,是一种良好的 3D 生物打印的“墨水”,可用于打印活组织或器官。Bakarich 等^[9]通过有选择的打印藻酸盐/丙烯酸胺凝胶复合物与环氧树脂黏合剂(Emax 904 Gel-SC)并通过紫外光照来处理这两种“墨水”成为复合材料,成功制备人半月板软骨。这些研究结果提示将海藻酸盐与其他材料混合后,能改善或增强其某些特性,使该材料更加符合需要打印的组织特征,打印出符合预期的组织器官。

2. I 型胶原:存在于皮肤、骨和肌腱中,具有较好

基金项目:浙江省医药卫生科学研究计划项目(2015KYB092, 2014KYA040);浙江省医药卫生平台计划(2015ZDA011);浙江省中医药科学研究基金项目(2015ZA045)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院生物工程研究所

通讯作者:张文元,研究员,电子信箱:zhangwy61@163.com

的细胞亲和力,故多用于手术缝合线、抗凝材料等,在人造皮肤、人工血管、骨软骨修复中也有十分广泛的应用。I型胶原属于温敏性材料,在4℃以下时呈液态,在室温中呈凝固状,不同的酸碱度也会影响其呈液态或固态。这个特性正好符合作为3D打印“墨水”的要求。Duarte Campos等^[10]研究发现将I型胶原和琼脂糖不同比例混合后形成的“打印墨水”,可适用于多种3D生物基质的打印。可以利用这点通过不同配比构建双相支架用于软骨及软骨下骨的修复再生。

3. 脱细胞的细胞外基质:目前大部分使用的生物打印的“墨水”不能完美模拟复杂的天然细胞外基质,很难实现内在的细胞形态学和功能的重建。Pati等^[11]研发了一种生物打印方法,用新鲜的去细胞的细胞外基质作为生物墨水,装载细胞后打印,能为细胞生长提供一个最佳的微环境,细胞在脱细胞细胞外基质中活性和功能都良好。提示利用生物自身基质作为打印支架的材料,更适合种子细胞的生长和发挥功能。

4. 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG):具有良好的水溶性,与许多有机物组分有良好的相容性,在多个行业中有极广泛的应用。作为软骨组织工程的支架材料,良好的机械性能必不可少,而PEG正好具有极好的抗压性能。Soman等^[12]研究发现由PEG构建的3D生物材料的泊松比几乎接近0,就是说支架在承受轴向拉力时横向几乎不发生变形,这与天然软骨泊松比几乎就是0的力学特性完美符合。很多研究者利用这个特性将其用于软骨组织的支架材料或通过混合使用以改善其他材料的力学性能。Gao等^[13]研究将人骨髓间充质干细胞与材料混合后3D打印构建骨软骨组织,比较细胞在PEG组和PEG-GelMA(聚乙二醇二甲基丙烯酸,明胶甲基丙烯酸酯)组的成骨分化和软骨分化的能力,通过特殊的基因和蛋白表达分析结果发现PEG-GelMA组明显高于单独使用PEG组。提示有些高分子材料通过适当修饰或与其他材料混合使用可以达到改善和优化的效果。

5. 羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA):具有优良的生物相容性和生物活性,可作为骨骼和牙齿的诱导因子。HA是人体骨骼组织的主要无机盐组成成分,故植入体内后,钙和磷会被身体组织吸收,并有新组织替代长入,是目前应用较多的骨组织替代材料。有越来越多研究显示软骨下骨在修复和改善软骨损伤中起一个相当重要的作用,软骨修复观念从单纯的软骨

修复转变为更为综合的骨软骨一体化修复。在骨软骨缺损修复中采用双相复合材料构建支架修复软骨缺损是一个可行的办法^[14]。羟基磷灰石被较多的用于软骨修复中软骨下骨的支架材料,HA的脆性和缓慢的降解速率限制了其应用,人们通过将其与其他材料联合使用来改善其性能,达到优势互补。且HA很难溶于水,在溶液中呈分散状态,故不能直接作为“打印墨水”用于3D打印,需与其他凝胶状的材料混合来打印骨支架。如Lee等^[15]将聚富马酸二羟丙酯(PPF)与HA联合使用,构建3D复合支架,获得了孔径均一,孔间相互贯通的支架。Yao等^[16]将聚己内酯(PCL)与羟基磷灰石通过3D打印制成复合支架,具有良好的力学性能,可塑性和生物可降解性,是良好的软骨再生的候选支架。这些研究结果证实用羟基磷灰石和其他材料混合打印制备的支架材料可用于骨软骨组织的修复。

二、复杂形状软骨组织的打印

软骨组织中不同区域不同部位细胞分布不同,且有些软骨形状复杂如耳、气管等。为实现组织器官的仿生打印,科学家们研究用细胞的控制性打印、牺牲层工艺的打印技术来解决上述问题。

1. 种子细胞的控制性打印:3D打印技术虽然模拟了原组织的结构和特性,但在体内应用时仍旧缺乏结构完整性和机械性能。打印组织时仅采用一个浓度,一种细胞没法满足组织的复杂特性,故有研究人员提出除了要有双相或者多相支架,还要对细胞进行控制性打印,让不同细胞或相同细胞分布在预先设定的部位,符合组织原有的解剖学特性。生物打印是一种新兴技术,打印3D组织时能使细胞精确的沉积在层层叠加的“墨水”中,实现细胞的控制性打印。

关节软骨的结构特征从关节面向深部可分为浅表区、中间区(或过渡区)、深区(或辐射区)和钙化软骨区4个区带。要实现仿生3D打印,必须模拟这些结构特点,数控打印细胞、支架和生长因子,将它们精确定位在预期的二维和三维部位,使设计的软骨具有自然的带状分区,这是一种理想的生物组织器官的制造方法。Cui等^[17]研制出一种生物打印平台,他们将人软骨细胞悬浮在聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)复合支架中,通过3D打印形成软骨结构,当周围的支架通过光聚合作用固化后,细胞被固定在他们最初堆积部位,结果发现这样打印的细胞活性显著提高,并且新生的软骨有较多的黏多糖和Ⅱ型胶原产生,他们设计的平台打印的软骨可为软骨修复提供高保真的

仿生软骨组织替代物。该研究结果提示将细胞精确定点分布构建软骨组织是有效且可行的。Schuurman等^[18]也在他们的文章里对分区构建关节软骨的策略进行了深入剖析,并对进行过的研究数据进行综合分析和概括,认为区带性关节软骨细胞群的重建在治疗软骨缺损中具有潜在的重要意义,并且对细胞打印技术精确复制结构复杂的区带性3D细胞外基质结构的可行性进行了简要论证。

利用细胞的控制性打印还可以构建具有不同成分的器官,如Lee等^[19]将脂肪间充质干细胞分别向软骨细胞和脂肪细胞分化后装载在聚己内酯(PCL)水凝胶中,通过3D打印技术分别分配在耳朵的软骨和脂肪区域,得到的人造耳朵与正常耳朵比较无论是几何结构还是解剖学结构都非常令人满意。

2. 牺牲层工艺打印技术:耳、气管等复杂形状的软骨组织用简单的3D打印法不能完美呈现其结构和功能,科学家们就研发出牺牲层工艺的3D打印制造方法来实现。作为牺牲层材料必须具有以下特点:①打印结束后,牺牲层材料容易除去;②无毒、具有良好的生物相容性;③具有良好的表面张力,使打印出的结构表面光滑,可实现管状结构的制造。牺牲层去除方法主要根据材料性质,水溶性材料用水溶解除去、温敏性材料利用其温度变化时状态不同来除去。Lee等^[19]在耳重建中就采用水溶性聚乙二醇(PEG)作为牺牲层来支持主要结构,完成制作且主体材料固化后,放入水中,PEG在水中很容易就被除去,且不影响细胞活性。还有研究人员用熔融的糖作为牺牲层材料来打印。Müller等^[20]用温敏性材料聚羧亚烃407为牺牲层材料,该聚合物在4℃时为液体,约20℃时呈固态,在冰水中即可洗脱聚羧亚烃。

三、当前存在的问题及前景

随着3D打印技术的发展,打印的支架材料在软骨组织工程中已有较多研究及初步应用,但是还是存在一些较难解决的问题。如材料的力学性能上,如果加大了材料的硬度,则其韧性就会下降,尚没有理想的材料打印出的软骨能完全替代天然的软骨组织。打印支架即时固化和成型也是一个较难解决的问题,如海藻酸钠在打印时滴加氯化钙溶液虽然能使其即时固化,但却影响后续打印的材料没法继续叠加黏附在其上面,使材料脱节;如果打完后再加氯化钙溶液,则打印的支架就会出现流动塌陷现象,破坏了预期设计的结构。另外就是打印过程的无菌问题,材料和细胞同时打印复合物时必须保证无菌的工作环境,这样

打印好的组织能继续在体外培养,使细胞充分扩增并与支架材料基本融合后再植入体内,提高移植成功率。

目前3D打印组织多用于外科手术前准备和手术方案的研究,如对年轻及手术经验少的医生进行直观的三维解剖实物的培训,与患者家属进行术前谈话时可以让他们更详细的了解病情,正确认识手术风险,建立良好的医患关系,减少医患纠纷。已经有3D打印的组织如下颌骨、器官支架、颅骨、骨盆等进入临床,待器官的3D打印技术成熟并产业化后,可用于临床上患者坏死或老化的组织器官的替换,为整形美容人员提供改善容貌的条件。

参考文献

- 1 Rengier F, Mehndiratta A, von Tengg - Kobligk H, *et al.* 3D printing based on imaging data: review of medical applications[J]. *Int J Comput Assist Radiol Surg*, 2010, 5(4): 335 - 341
- 2 王富友, 任翔, 杨柳. 3 - D打印技术在关节外科的应用[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2014, 28(3): 272 - 275
- 3 贺超良, 汤朝晖, 田华雨, 等. 3D打印技术制备生物医用高分子材料的研究进展[J]. *高分子学报*, 2013, 6: 722 - 732
- 4 Pang L, Hao W, Jiang M, *et al.* Bony defect repair in rabbit using hybrid rapid prototyping polylactic - co - glycolic acid/ β - tricalciumphosphate collagen I/apatite scaffold and bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Indian J Orthop*, 2013, 47(4): 388 - 394
- 5 Park SH, Park DS, Shin JW, *et al.* Scaffolds for bone tissue engineering fabricated from two different materials by the rapid prototyping technique; PCL versus PLGA[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23(11): 2671 - 2678
- 6 Jiang CP, Chen YY, Hsieh MF. Biofabrication and in vitro study of hydroxyapatite/mPEG - PCL - mPEG scaffolds for bone tissue engineering using air pressure - aided deposition technology[J]. *Mater Sci Eng C*, 2013, 33(2): 680 - 690
- 7 Hong S, Sycks D, Chan HF, *et al.* 3D printing of highly stretchable and tough hydrogels into complex, cellularized structures[J]. *Adv Mater*, 2015, 27(27): 4035 - 4040
- 8 Markstedt K, Mantas A, Tournier I, *et al.* 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose - alginate bioink for cartilage tissue engineering applications[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(5): 1489 - 1496
- 9 Bakarich SE, Gorkin R 3rd, in het Panhuis M, *et al.* Three - dimensional printing fiber reinforced hydrogel composites[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6(18): 15998 - 16006
- 10 Duarte Campos DF, Blaeser A, Korsten A, *et al.* The stiffness and structure of three - dimensional printed hydrogels direct the differentiation of mesenchymal stromal cells toward adipogenic and osteogenic lineages[J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(3 - 4): 740 - 756
- 11 Pati F, Jang J, Ha DH, *et al.* Printing three - dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3935

(下转第193页)

- 2 Noguchi K, Okubo M. Leukotrienes in nociceptive pathway and neuropathic/inflammatory pain[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(8): 1163 – 1169
- 3 严晓娣, 陈前波, 周双琼, 等. 鞘内注射 p38 MAPK 抑制剂对神经病理性疼痛大鼠脊髓背角脑源性神经营养因子表达的影响[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(8): 883 – 886
- 4 许力, 虞雪融, 黄宇光. P38 MAPK 抑制剂对神经病理性疼痛大鼠脊髓 TNF- α 合成的影响[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(10): 1126 – 1131
- 5 Wen YR, Tan PH, Cheng JK, *et al.* Microglia: a promising target for treating neuropathic and postoperative pain, and morphine tolerance[J]. J Formosan Med Assoc, 2011, 110(8): 487 – 494
- 6 Zhang H, Liu L, Lu G, *et al.* Chemical irritation of the prostate sensitizes P(2)X(3) receptor – mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons[J]. Neurourol Urodynam, 2011, 30(4): 612 – 618
- 7 宋波. 前列腺炎 SB203580 镇痛模型大鼠脊髓 p38MAPK 的表达变化及意义[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(6): 759 – 761
- 8 王强. p38mapk 与脊髓星形胶质细胞活化的关系及参与慢性前列腺炎的实验研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2009: 1 – 108
- 9 刘迎嘉, 宋国宏, 张晨. P 物质、c-fos 在慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征大鼠脊髓中的表达[J]. 中华男科学杂志, 2015 年, 21(8): 681 – 686
- 10 张恒, 周占松, 刘丽梅, 等. P 物质刺激下脊髓星形胶质细胞活化中磷酸化 P38 丝裂素活化蛋白激酶和 c-fos 的表达及作用[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(21): 2163 – 2166
- 11 Cao LH, Yang XL. Natriuretic peptides and their receptors in the central nervous system[J]. Prog Neurobiol, 2008, 84(3): 234 – 248
- 12 陈志武, 方明, 马传庚, 等. 脑钠肽镇痛作用及机制的研究[J]. 中国药理学通报, 1997, 13(6): 538 – 540
- 13 Zhang FX, Li XJ, Gao LQ, *et al.* Inhibition of inflammatory pain by activating B – type natriuretic peptide signal pathway in nociceptive sensory neurons. [J]. Neurosci, 2010, 30(32): 10927 – 10938
- 14 Xie WJ, Sun T, Yang XR. Expressions of BNP and NPR – A in rat

- models of chronic nonbacterial prostatitis and their significance[J]. Natl Androl, 2012, 18(3): 204 – 207
- 15 Chen SR, Cai YH. Plasticity and emerging role of BKCa channels in nociceptive control in neuropathic pain. [J]. JNeurochem, 2009, 110(1): 352 – 362
- 16 Wieland T, Ruth P, Zhou XB, *et al.* Dual role of protein kinase C on BK channel regulation. [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(17): 8005 – 8010
- 17 Wiebke KG, Achim S. A novel signaling pathway that modulates inflammatory pain[J]. J Neurosci, 2011, 31(3): 798 – 800
- 18 张晓英, 杨国栋, 余永华, 等. 疼痛模型大鼠下丘脑和脊髓 CGRP 的含量变化[J]. 川北医学院学报, 2008, 23(2): 109 – 111
- 19 Takahashi N, Wada Y, Ohtori S, *et al.* Application of shock waves to rat skin decreases calcitonin gene – related peptide immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons[J]. Auton Neurosc Basic Clin, 2003, 107(2): 81 – 84
- 20 邱新毓, 鲁亚成, 李金莲. CGRP 样阳性终末在脊神经结扎模型大鼠脊髓背角浅层内的表达变化[J]. 神经解剖学杂志, 2013, 29(5): 498 – 502
- 21 Schmidt A, Tegeder I, Geisslinger G. No No, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing[J]. Trends Neurosci, 2009, 32(6): 339 – 346
- 22 陈瑾歆, 李云祥, 王安果, 等. 慢性前列腺炎模型大鼠脊髓背角降钙素基因相关肽表达的测定[J]. 中国疼痛医学杂志, 2011, 17(8): 498 – 500
- 23 Huang BX, Cao WL, Huang X, *et al.* Expressions of transient receptor potential A1 and related inflammatory factors in the rat model of prostatic inflammation. [J]. Natl J Androl, 2015, 21(1): 23 – 30
- 24 Pontari MA, Ruggieri MR. Mechanisms in prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. J Urol, 2008, 179(5): 839 – 845

(收稿日期: 2015 – 10 – 28)

(修回日期: 2015 – 11 – 06)

(上接第 189 页)

- 12 Soman P, Fozdar DY, Lee JW, *et al.* A Three – dimensional polymer scaffolding material exhibiting a zero poisson's Ratio[J]. Soft Matter, 2012, 8(18): 4946 – 4951
- 13 Gao G, Schilling AF, Hubbell K, *et al.* Improved properties of bone and cartilage tissue from 3D inkjet – bioprinted human mesenchymal stem cells by simultaneous deposition and photocrosslinking in PEG – GelMA[J]. Biotechnol Lett, 2015, Epub ahead of print
- 14 Zhang W, Lian Q, Li D, *et al.* Cartilage repair and subchondral bone migration using 3D printing osteochondral composites: a one – year – period study in rabbit trochlea[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 746138
- 15 Lee JW, Ahn GS, Kim DS, *et al.* Microelectronic Engineering, 2009, 86: 1465 – 1467
- 16 Yao Q, Wei B, Liu N, *et al.* Chondrogenic regeneration using bone marrow clots and a porous polycaprolactone – hydroxyapatite scaffold by three – dimensional printing[J]. Tissue Eng Part A, 2015, 21(7

- 8): 1388 – 1397
- 17 Cui X, Gao G, Yonezawa T, *et al.* Human cartilage tissue fabrication using three – dimensional inkjet printing technology[J]. J Vis Exp, 2014, 10(88). doi: 10.3791/51294
- 18 Schuurman W, Klein TJ, Dhert WJ, *et al.* Cartilage regeneration using zonal chondrocyte subpopulations: a promising approach or an overcomplicated strategy? [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2015, 9(6): 669 – 678
- 19 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
- 20 Müller M, Becher J, Schnabelrauch M, *et al.* Printing thermoresponsive reverse molds for the creation of patterned two – component hydrogels for 3D cell culture[J]. J Vis Exp, 2013, 10(77): e50632

(收稿日期: 2015 – 10 – 12)

(修回日期: 2015 – 11 – 03)