

水凝胶在三维生物打印中的应用研究进展

杨景 赵洋 李海航 朱世辉

Advances in the research of application of hydrogels in three-dimensional bioprinting Yang Jing, Zhao Yang, Li Haihang, Zhu Shihui. Medical Team, No. 92187 Troop of PLA, Changzhi 046011, China

Corresponding author: Zhu Shihui, 200433, Email: doctorzhushihui@163.com

【Abstract】 Hydrogels are three-dimensional networks made of hydrophilic polymer crosslinked through covalent bonds or physical intermolecular attractions, which can contain growth media and growth factors to support cell growth. In bioprinting, hydrogels are used to provide accurate control over cellular microenvironment and to dramatically reduce experimental repetition times, meanwhile we can obtain three-dimensional cell images of high quality. Hydrogels in three-dimensional bioprinting have received a considerable interest due to their structural similarities to the natural extracellular matrix and polyporous frameworks which can support the cellular proliferation and survival. Meanwhile, they are accompanied by many challenges.

【Key words】 Hydrogel; Tissue engineering; Three-dimensional bioprinting

【关键词】 水凝胶; 组织工程; 三维生物打印

水凝胶因其三维网络结构能模拟自然组织,在三维生物打印中能满足形态学要求并较好地支持细胞增殖,引起了广泛关注。近年来,通过控制水凝胶形状、多孔性、表面形态、大小等参数,水凝胶在三维生物打印领域取得了一系列进展,但在实际打印中仍然存在诸多难题。笔者就各类水凝胶应用于三维生物打印的具体实践展开综述。

1 水凝胶

水凝胶由天然聚合物或人工合成聚合物形成,天然水凝胶由自然来源的高分子合成,人工合成水凝胶多由乙烯基或具有乙烯基活性的单体聚合成^[1-2]。天然水凝胶的成分包括藻酸盐、纤维蛋白、胶原蛋白、透明质酸、基质胶、琼脂糖及明胶等。人工合成水凝胶的成分包括聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇、聚丙烯酸酯、聚氨基甲酸乙酯、凝胶肽等。水凝胶因具有良好的生物相容性而被广泛应用于生物打印。天然和人工合成水凝胶在生物、物理、化学性质方面及成本的差异,使其各具优势和局限性。

1.1 天然水凝胶

天然水凝胶具有生物亲和力高、胶凝作用温和及化学修

饰灵活、制备成本相对较低等优势;加之其无毒性、能较好地模拟细胞微环境,故能很好地支持细胞生长。

由于天然水凝胶材料来源于自然生物体,材料批次之间的差异比较明显,性能重复性相对不稳定,使其实际应用时存在一定的局限性。如藻酸盐可能引起免疫细胞炎症反应^[3],纤维蛋白凝胶的透明度取决于所用纤维蛋白原和凝血酶的浓度^[4],胶原蛋白对温度敏感^[5],高黏滞性的透明质酸会堵塞打印滴管^[1]等。基质胶是从EHS(Engelbreth-Holm Swarm)小鼠肉瘤细胞中提取出来的基底膜蛋白混合物,由于各批次肉瘤组织存在差异,每次提取物的成分比例相对不稳定,因而不同批次的基质胶的胶凝速度不同^[5]。此外当提取的基质胶纯度不高时,其中混杂的生长因子可能会影响细胞分化。

天然水凝胶有共同的不足,主要表现为结构与性能可调范围窄、力学性能较差,但这些不足可以通过灵活化学修饰得以改进。Jeon等^[6]利用藻酸盐经甲基丙烯酸酯化学修饰后不被降解的特性,使藻酸盐既能与光交联反应又保持弱细胞毒性,由此制备出一种性能可靠能封装细胞的水凝胶。有研究表明基质胶的力学性能可通过与戊二醛交联加强^[7]。此外,可将抑肽酶等蛋白酶抑制剂添加到培养基中防止纤维蛋白凝胶被蛋白水解酶降解^[4,8],或通过添加钙离子提高纤维蛋白凝胶的物理稳定性。为改进透明质酸力学性能,防止被透明质酸酶酶解,可在其胶凝过程中进行化学基团交联。

1.2 人工合成水凝胶

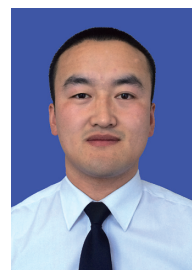
人工合成水凝胶能进行大规模量产,具有结构和性能可精细调控且重复性好、易于加工、力学性能较强等优点;主要不足是其对细胞的亲和力较差。

PEG具有水溶性极强、无免疫应答性、低毒性、生物降解速度缓慢甚至基本不降解的特性。紫外线照射或普通的氧化还原反应均可诱导PEG胶凝^[9]。PEG类聚合物有非常卓越的力学强度,但常缺乏必要的生物相容性来支持细胞的增殖与分化^[10]。

凝胶肽能模拟自然的ECM环境以维持细胞增殖,在温度和pH值波动较大时仍能保持稳定;其最主要的不足是材料本身的低pH值,不利于多种细胞生长,使得封装后细胞活性较低。因此将凝胶肽混合物与细胞快速打印后必须用培养介质冲洗至中性pH值,但这种复杂的操作和介质的更换会增加细胞被污染的风险。

1.3 水凝胶在细胞培养与传统组织工程中的应用

传统的96孔板单层细胞培养作为高批量处理细胞的典型已被广泛用于体外细胞实验,然而其作为二维平面单层细胞培养并不能恰当地模拟体内组织的生理特征,因此单层细胞的实验结果并不能准确地代表完整生物体的反应性。逐渐兴起的水凝胶小型三维立体细胞培养技术能更好地模拟组织细胞微环境,目前主要被用作临床前候选药物评估、细



DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.08.016

作者单位:046011 山西省长治市解放军92187部队卫生队(杨景、赵洋);第二军医大学长海医院烧伤外科,全军烧伤研究所(李海航、朱世辉)

通信作者:朱世辉,200433,Email:doctorzhushihui@163.com

胞含量测定等。相较传统的二维平面单层细胞培养,可模拟人体细胞形态学特征,实现细胞-细胞、细胞-ECM 相互作用,模拟生理条件下基因、蛋白质表达^[11-12]。

传统组织工程学领域已有诸多体内外实验研究水凝胶的用途。水凝胶用作生物支架时能模拟自然的 ECM,既能提供足够空间确保组织形态形成又能较完整地保持单元组织结构,可封装和递送细胞,可作为组织墙和生物黏附剂,能长期储存药物,输送生物活性物质到受损组织以加快损伤自然修复过程。有研究人员曾将猪胰岛朗格汉斯细胞经光聚合凝胶后的 PEG 封装,然后移植到鼠腹腔腔中,实验结果证明 PEG 在异位移植模型中具有良好的免疫隔离保护作用,因而有望作为体外保护人造胰腺组织的材料^[13]。

2 水凝胶在三维生物打印中的应用

2.1 三维生物打印技术

三维打印原为工业应用中的增材制造技术,因具有精度高、可操控性强的制造特性,现在医疗临床和科研领域迅速发展。结合生物材料实现的三维生物打印,指利用如微阵列芯片点样仪等的自动点胶系统,以三维空间定位的方式进行水凝胶和细胞的立体空间结构成型。具体使用的打印技术包括微型电磁阀打印技术、压电式喷墨打印技术、激光诱导转移印刷技术以及声学生物打印技术^[14]。三维生物打印机能利用电脑控制进行高效率细胞点样,可精确打印包含生物样本如细胞、生长培养基、生长因子、重组病毒、蛋白质和 DNA 等的微小体积水凝胶。

2.2 选择应用于生物打印的水凝胶的考虑因素

在进行三维生物打印时,选择水凝胶的主要考虑因素包括胶凝机制、与打印器具表面的兼容性、生物相容性、长期物理化学稳定性等,其中最主要的影响因素是水凝胶的胶凝机制。Liu 等^[15]利用可自我组装的多肽类水凝胶 RAD-16 体外培养软骨细胞,RAD-16 肽由离子交联介导胶凝,可在盐溶液或生理介质中快速凝缩,最终形成整齐的基质并成功封装软骨细胞。Seidlits 等^[16]把纤连蛋白加入具有三维网络结构的透明质酸水凝胶中进行光交联,此种方式交联后的内皮细胞活性较物理交联的有所增加,制作的混合成分水凝胶有望作为生物支架促进伤口愈合和血管再生,且生物材料支架性能更好。Altunbas 等^[17]利用 MAX8 肽水凝胶封装姜黄素作为给药工具进行体外药物释放实验。MAX8 肽水凝胶通过分子间作用力进行自我组装发生胶凝同时封装姜黄素,二者可发生分子间额外交联反应,增强胶凝后固体属性,因而可较好地控制姜黄素释放速率。因此基于离子交联、光致聚合、生物催化、共价结合或 pH 值诱导相变(pH-induced phase transition)所致胶凝的水凝胶,可能更适用于三维生物打印中的细胞封装。除此之外,为了避免细胞从表面脱落,用于细胞封装的水凝胶与细胞团附着面之间的相互作用也显得至关重要。例如用聚苯乙烯制作的微柱薄片是疏水的,与表面亲水的水凝胶片相互排斥。因此需要在聚苯乙烯微柱薄片上涂布中性功能高分子如聚苯乙烯-马来酸酐共聚体,以使水凝胶片通过疏水相互作用牢固地吸附在聚苯乙烯表面。另外如果需要对样本进行荧光标记抗体染色并获得较好的细胞影像,常需要考虑水凝胶自身透明度。另因三维生物打

印所用水凝胶体积相对较小,溶胀程度有限,可忽略其胶凝后的塑形问题^[7]。

2.3 水凝胶应用于三维生物打印

自 2005 年至今,三维生物打印作为组织工程学一项新兴技术已在可移植组织的再生领域取得了显著成果。现已成功打印出较为成熟的骨组织;皮肤、肝组织由于结构复杂,虽也已成功打印,但功能尚不完善^[18-21]。三维生物打印面临的主要挑战是,如何既保持细胞高活性又能制作出坚固的水凝胶生物支架,以满足临床应用要求。利用小尺寸的打印喷嘴和高黏滞性的水凝胶材料能制作出具有良好力学强度的三维水凝胶材料,然而该种材料产生的高应力会损伤细胞活性。为了解决这个问题,先后产生了许多新的三维生物打印技术。如有研究者运用紫外线阀门打印技术(ultraviolet bioextrusion printing technique)打印出较为复杂的三维心脏瓣膜结构^[22]。该实验在低黏滞性 PEG 水凝胶介质上利用治疗剂量紫外线逐层原位照射,以凝缩所打印的水凝胶。当细胞从喷口打印出来后,控制水凝胶发生光交联凝缩,从而明显减轻了打印高黏度水凝胶时产生的应力损伤,使打印出的人工心脏瓣膜符合临床要求。这项技术的缺憾之处在于不仅需要优质光敏水凝胶材料,还需要活细胞暴露于有潜在伤害的紫外照射和毒性光引发剂中。Lee 等^[23]联合使用聚己内酯(PCL)塑料和水凝胶支架成功打印出人耳结构。PCL 支架具有高力学强度,在打印时可使用黏稠度高的液态油支持富含细胞的水凝胶结构,但是 PCL 打印需要高温条件加之其在酸性条件下易降解的特性使其使用受到了一定的限制。三维生物打印中需改善水凝胶力学强度,有学者在藻酸盐凝胶交联之前降低其温度,最终增强了力学强度并形成结构高度均一的三维胚胎干细胞培养体系^[24]。

三维生物打印领域已有许多打印技术能打印载满细胞的水凝胶支架,但大部分所打印的结构较简单。为打印更为复杂的结构,有研究者将水凝胶交联过程分为 3 步,首先利用钙离子交联使凝胶符合打印要求,打印后利用钙离子再次交联增加力学强度,最后用钡离子交联以维持其在培养基中的长期稳定性。这种方法明显提高了细胞存活率,并能打印出血管叉等复杂结构,从而为将来打印更为复杂的符合临床要求的组织器官提供了宝贵经验^[25]。

3 总结及展望

三维生物打印是一种充满前景的技术,因其可节约样本用量,并在短时间内高效率打印数百份生物样本,被广泛用于各种细胞实验。水凝胶应用于三维生物打印时,需要考虑生物相容性,也要考虑在打印过程中的交联凝缩,因此限制了其选择范围。找到并应用合适的水凝胶成分作为细胞载体形成三维生物打印“墨水”是解决目前三维生物打印的关键环节。通过进一步的材料学研究探索寻求更优良的水凝胶体系,结合高精度、可操控性强的三维生物打印技术,有望体外精准构建人体组织器官。

参考文献

- [1] Gasperini L, Mano JF, Reis RL. Natural polymers for the microencapsulation of cells [J]. J R Soc Interface, 2014, 11 (100):

20140817. DOI:10.1098/rsif.2014.0817.
- [2] Jonker AM, Löwik DWPM, van Hest JCM. Peptide- and protein-based hydrogels [J]. *Chem Mater*, 2012, 24 (5): 759-773. DOI:10.1021/cm202640w.
- [3] Orive G, Tam SK, Pedraz JL, et al. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy [J]. *Biomaterials*, 2006, 27 (20): 3691-3700. DOI:10.1016/j.biomaterials.2006.02.048.
- [4] Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J, et al. First step in developing a 3D biodegradable fibrin scaffold for an artificial ovary [J]. *J Ovarian Res*, 2013, 6 (1): 83. DOI: 10.1186/1757-2215-6-83.
- [5] Benton G, Arnaoutova I, George J, et al. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 79/80: 3-18. DOI:10.1016/j.addr.2014.06.005.
- [6] Jeon O, Bouhadir KH, Mansour JM, et al. Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties [J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (14): 2724-2734. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.034.
- [7] Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds [J]. *Expert Rev Med Devices*, 2011, 8 (5): 607-626. DOI: 10.1586/erd.11.27.
- [8] Allen P, Melero-Martin J, Bischoff J. Type I collagen, fibrin and PuraMatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011, 5 (4): e74-86. DOI: 10.1002/term.389.
- [9] Park MH, Moon HJ, Park JH, et al. PEG-Poly (L-alanine) thermogel as a 3D scaffold of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Macromol Biosci*, 2015, 15 (4): 464-472. DOI: 10.1002/mabi.201400426.
- [10] Lee BH, Kim MH, Lee JH, et al. Modulation of Huh7.5 spheroid formation and functionality using modified PEG-based hydrogels of different stiffness [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (2): e0118123. DOI: 10.1371/journal.pone.0118123.
- [11] Leung BM, Moraes C, Cavnar SP, et al. Microscale 3D collagen cell culture assays in conventional flat-bottom 384-well plates [J]. *J Lab Autom*, 2015, 20 (2): 138-145. DOI: 10.1177/2211068214563793.
- [12] Ruedinger F, Lavrentieva A, Blume C, et al. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99 (2): 623-636. DOI: 10.1007/s00253-014-6253-y.
- [13] Cruise GM, Hegre OD, Lamberti FV, et al. In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes [J]. *Cell Transplant*, 1999, 8 (3): 293-306.
- [14] Tasoqlu S, Demirci U. Bioprinting for stem cell research [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31 (1): 10-19. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.10.005.
- [15] Liu J, Song H, Zhang L, et al. Self-assembly-peptide hydrogels as tissue-engineering scaffolds for three-dimensional culture of chondrocytes in vitro [J]. *Macromol Biosci*, 2010, 10 (10): 1164-1170. DOI: 10.1002/mabi.200900450.
- [16] Seidlits SK, Drinnan CT, Petersen RR, et al. Fibronectin-hyaluronic acid composite hydrogels for three-dimensional endothelial cell culture [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7 (6): 2401-2409. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.03.024.
- [17] Altunbas A, Lee SJ, Rajasekaran SA, et al. Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable drug delivery vehicles [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (25): 5906-5914. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.069.
- [18] Catros S, Guillemot F, Nandakumar A, et al. Layer-by-layer tissue microfabrication supports cell proliferation in vitro and in vivo [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18 (1): 62-70. DOI: 10.1089/ten.TEC.2011.0382.
- [19] Li Z, Kawashita M. Current progress in inorganic artificial biomaterials [J]. *J Artif Organs*, 2011, 14 (3): 163-170. DOI: 10.1007/s10047-011-0585-5.
- [20] Hoch E, Tovar GE, Borchers K. Bioprinting of artificial blood vessels: current approaches towards a demanding goal [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014, 46 (5): 767-778. DOI: 10.1093/ejcts/ezu242.
- [21] Ikegami T, Maehara Y. Transplantation: 3D printing of the liver in living donor liver transplantation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10 (12): 697-698. DOI: 10.1038/nrgastro.2013.195.
- [22] Hockaday LA, Kang KH, Colangelo NW, et al. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds [J]. *Biofabrication*, 2012, 4 (3): 035005. DOI: 10.1088/1758-5082/4/3/035005.
- [23] 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. DOI: 10.1088/1758-5082/6/2/024103.
- [24] Ouyang L, Yao R, Mao S, et al. Three-dimensional bioprinting of embryonic stem cells directs highly uniform embryoid body formation [J]. *Biofabrication*, 2015, 7 (4): 044101. DOI: 10.1088/1758-5090/7/4/044101.
- [25] Tabriz AG, Hermida MA, Leslie NR, et al. Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures [J]. *Biofabrication*, 2015, 7 (4): 045012. DOI: 10.1088/1758-5090/7/4/045012.

(收稿日期:2016-03-03)

(本文编辑:贾津津)

本文引用格式

杨景, 赵洋, 李海航, 等. 水凝胶在三生物打印中的应用研究进展 [J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32 (8): 505-507. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.08.016.

Yang J, Zhao Y, Li HH, et al. Advances in the research of application of hydrogels in three-dimensional bioprinting [J]. *Chin J Burns*, 2016, 32 (8): 505-507. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.08.016.