

## 胶原蛋白在三维生物打印中的应用研究进展

李海航 罗鹏飞 盛嘉隽 刘功成 朱世辉

**Advances in the research of application of collagen in three-dimensional bioprinting** Li Haihang, Luo Pengfei, Sheng Jiajun, Liu Gongcheng, Zhu Shihui. Department of Burn Surgery, Institute of Burns, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

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

**【Abstract】** As a new industrial technology with characteristics of high precision and accuracy, the application of three-dimensional bioprinting technology is increasingly wide in the field of medical research. Collagen is one of the most common ingredients in tissue, and it has good biological material properties. There are many reports of using collagen as main composition of "ink" of three-dimensional bioprinting technology. However, the applied collagen is mainly from heterogeneous sources, which may cause some problems in application. Recombinant human source collagen can be obtained from microorganism fermentation by transgenic technology, but more research should be done to confirm its property. This article reviews the advances in the research of collagen and its biological application in three-dimensional bioprinting.

**【Key words】** Collagen; Tissue engineering; Three-dimensional bioprinting

**【关键词】** 胶原; 组织工程; 三维生物打印

三维生物打印技术具有精度高、可控性强的特性,在医疗临床和实验领域更是发展迅速。而胶原蛋白广泛存在于动物的皮肤、骨、肌腱等组织中,是具有良好生物学特性的材料,尤其在组织工程领域中应用广泛。目前,三维生物打印研究常常需要应用胶原蛋白作为其生物“墨水”主要成分,为此,笔者做一综述阐述目前胶原蛋白在三维生物打印中的应用研究进展。

### 1 胶原蛋白

#### 1.1 胶原蛋白分型与功能

大部分的胶原蛋白是由 3 条  $\alpha$  链螺旋结合形成的蛋白,分型较多,各种分型功能并不相同,且尚未完全研究明确。目前从基因水平进行分型达 26 种以上,不同结构类型和来源的胶原蛋白可能对实验研究及产品应用产生影响。以下简述常见的胶原蛋白及其功能<sup>[1]</sup>。I、II、III、V、XI 型胶原蛋白为纤维构成胶原蛋白,其分子排列具有高度方向性,是骨、皮肤、肌腱、韧带等结缔组织的主要成分。IX、XII、X、IV

型胶原蛋白为纤维辅助胶原蛋白,具有中断的三螺旋结构,常与纤维组成胶原,构成人体组织如软骨、玻璃体、软骨膜、皮肤等。VI 型胶原蛋白为微纤维胶原蛋白,为由各 1 条  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$  链组成的短链胶原蛋白,该型胶原蛋白在全身广泛分布。X 型和 VIII 型胶原蛋白为短链胶原蛋白,在胎儿发育过程中不同阶段不同组织中可见,目前尚未明确其功能。IV 型胶原蛋白为基底膜胶原蛋白,是基底膜最重要的成分,该蛋白的基因变异将导致胎儿死亡或者 Alport 综合征<sup>[2]</sup>。生物组织较少仅含单一类型胶原蛋白,多为多种分型胶原蛋白混合而成<sup>[1]</sup>。

#### 1.2 胶原蛋白的来源

胶原蛋白的来源对其实际应用影响不亚于胶原蛋白分型。从实验室目前常用的胶原蛋白来源进行分类,可分为天然胶原蛋白(哺乳动物来源,主要为猪、牛、鼠等;非哺乳动物来源,为部分海洋生物)和非天然胶原蛋白。哺乳动物源性胶原蛋白水溶性差,并且存在动物疫病(如疯牛病、口蹄疫、鼠疫等)的隐患<sup>[3]</sup>。从非哺乳动物提取胶原蛋白可以避免以上部分问题,近年可见海洋生物胶原蛋白的提取与应用的报道。无论是从哺乳动物还是海洋生物提取得到的胶原蛋白,其物种、免疫、生物相容性、降解代谢问题都是需关注的。

转入人源基因的工程微生物发酵后可以得到类人源非天然胶原蛋白,如酵母菌、大肠杆菌<sup>[3-5]</sup>经过培养发酵,将发酵产物提纯后可以得到较高纯度的类人源胶原蛋白。此外,可以加入基因片段,修饰胶原蛋白结构,改良胶原蛋白的性状,如加入水溶性基团,提高胶原蛋白的水溶性等<sup>[6]</sup>。转基因得到的人源或类人源胶原蛋白的分子结构和性能与人体自身的胶原蛋白更加接近,并且避免了疫病传播、物种、免疫、生物相容性、降解等问题,但胶原蛋白的纯度与微生物发酵过程的产物是否对其实际应用产生影响尚有待进一步研究探讨。

### 2 胶原蛋白在传统组织工程中的应用

胶原蛋白具有优良的生物学特性——低抗原性、低免疫反应、低毒性反应、高物理强度,以胶原蛋白为原料,通过传统组织工程学技术方法,可以得到具有优良生物学特性的产品,且多以无细胞支架为主。目前市面已有的产品包括:以牛 I 型胶原蛋白复合鲨鱼软骨素和硫酸黏多糖的人工真皮替代物<sup>[7]</sup>,猪腱胶原蛋白复合壳聚糖的双层人工真皮替代物<sup>[8]</sup>,从牛跟腱提取胶原蛋白复合壳聚糖的国产人工真皮替代物<sup>[9]</sup>,在临床应用中均取得良好的效果。但这些已经应用的皮肤支架产品均不含细胞成分,尚未见含细胞成分的组织工程产品的实际应用。

除了皮肤组织工程支架,胶原蛋白在其他组织工程构建中同样重要。有研究者制作了 3 层骨支架,底层为 I 型牛胶原蛋白和羟基磷灰石,中层为 I 型牛胶原蛋白、II 型猪胶原



DOI:10.3760/ema.j.issn.1009-2587.2016.10.016

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院烧伤外科,全军烧伤研究所

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

蛋白和羟基磷灰石,表层为 I、II 型猪胶原蛋白和透明质酸,该支架在兔股骨中端大块骨缺损替代治疗实验中展现出明显的成骨作用和骨诱导作用,证明胶原蛋白支架可用于研制骨缺损替代物<sup>[10]</sup>。有学者应用鲑鱼胶原蛋白作为支架材料用于骨髓间充质干细胞的组织工程培养,结果显示骨髓间充质干细胞与支架黏附良好并在培养期间增殖明显<sup>[11]</sup>。有学者研制出鲑鱼白 DNA/鲑鱼胶原蛋白复合物海绵,并将其移植于兔背全层皮肤损伤创面,观察到其能明显促进毛细血管再生,表现作为皮肤替代物的良好特点<sup>[12]</sup>。Meghezi 等<sup>[13]</sup>以胶原蛋白和平滑肌细胞为主要成分,采用特殊组织工程成型技术成功制作了一段含有细胞的高弹性人工血管,但其实际应用效果尚有待观察。

### 3 三维生物打印技术

三维打印原为工业应用中的一大类增材制造技术,其包含的多种打印技术具体原理不尽相同,用于三维打印的制造材料可以称为“墨水”<sup>[14]</sup>。喷墨式三维打印和普通喷墨打印机工作原理类似,可以将“墨水”呈微滴喷射。由于打印头结构原因,对“墨水”要求较高,黏稠的材料容易堵塞喷嘴。挤压式打印是基于物理挤压或者气动挤压的方式,将“墨水”从打印头挤出。喷墨式打印的打印头精度高,通常为每滴 1~300 pL;微挤压式打印精度则较低,挤压头直径通常在 50~1 000 μm,但微挤压式打印可以处理黏度更大的生物材料,更适合细胞打印。激光辅助三维打印机包含脉冲式激光探头和材料承载板及基底板,通过激光使材料从承载板向基底板转移成型<sup>[15-16]</sup>。

应用计算机三维建模软件或者在临床上使用的三维重建模型可以得到人体相关组织器官的三维结构数据,再经过软件分析与处理即可应用到三维生物打印机,同时应用生物“墨水”材料,如胶原蛋白、明胶、壳聚糖等,可以将活体细胞精确定位于所打印的组织器官中<sup>[17]</sup>。传统组织工程技术则相对定位不准,并且很多细节无法人为控制。应用活细胞进行模拟的组织器官打印,如皮肤组织、心肌组织、肝脏组织、血管组织等已见报道<sup>[17-20]</sup>。

进行三维生物打印时,需要应用相应的生物“墨水”,三维生物打印技术常应用的生物“墨水”材料可分为细胞成分和非细胞成分。细胞成分需要根据实验目标进行选择,如 Fb、表皮细胞等。用于三维生物打印的非细胞成分,与传统组织工程应用的材料相近,通常为与人体 ECM 成分相近的材料。这些材料具有良好生物相容性、优良物理性状,能够形成特定形状和孔隙结构,维持细胞存活,主要为天然的生物成分,如胶原蛋白、明胶、壳聚糖、藻酸盐、透明质酸,或者人工合成的高分子聚合物,如聚乳酸、聚乙二醇等,以达到模拟生物组织天然的细胞外结构与环境的目的,并使打印得到的样品与天然组织的物理性状相近<sup>[21-22]</sup>。

## 4 胶原蛋白在三维生物打印中的应用

### 4.1 皮肤

正常皮肤组织中胶原蛋白含量极高,传统组织工程研究皮肤构建均以胶原蛋白作为主要支架成分或 ECM 成分,而胶原蛋白在三维生物打印技术构建皮肤组织中也具有重要

作用。Lee 等<sup>[23]</sup>以表皮细胞和 Fb 作为细胞成分,使用了从鼠尾提取的 I 型胶原蛋白作为 ECM 成分,模拟打印了具有不规则形状立体结构的皮肤组织,并进行培养,结果显示经过三维打印构建的皮肤组织,表皮细胞存活率达 $(85.5 \pm 5.7)\%$ ,Fb 存活率达 $(95.0 \pm 2.3)\%$ ,形态学特点无变化,表明三维生物打印技术对皮肤细胞存活无明显影响。Lee 等<sup>[21]</sup>以鼠尾 I 型胶原蛋白作为 ECM 成分,表皮细胞和 Fb 作为细胞成分构建了 13 层的三维打印皮肤,培养 14 d 后染色测定细胞存活率达 80% 以上,同时细胞增殖良好。Michael 等<sup>[24]</sup>以鼠尾 I 型胶原、NIH3T3 Fb、HaCaT 表皮细胞构建了三维打印的皮肤,后将构建的皮肤移植到裸鼠背部全厚皮肤缺损创面并观察 11 d,结果显示构建的皮肤不仅能够良好覆盖创面共同生长,并且有微血管形成,证明含细胞的三维打印皮肤具有皮肤修复功能,但仍存在一些问题,如所构建的皮肤较正常皮肤薄,没有皮肤纹理。

### 4.2 骨组织

骨组织的有机成分主要为胶原蛋白,有学者将胶原蛋白和骨形成蛋白 2 (BMP-2) 结合,形成 BMP-2 胶原蛋白纤维,与骨间充质干细胞共打印形成骨支架并培养,观察到该种骨支架可在 14 d 内明显诱导骨间充质干细胞向骨细胞分化,比无胶原蛋白或无生长因子培养的支架早,证明含有胶原蛋白的三维打印支架模拟的细胞外环境对骨间充质干细胞分化具有促进作用<sup>[25]</sup>。有学者以复杂工艺使用羟基磷灰石、α 磷酸三钙、失水山梨醇单油酸酯聚氧乙烯醚、冻干牛皮 I 型胶原蛋白形成了可经三维打印机打印成型的“骨墨水”,并成功打印出骨支架,体外细胞实验证实其生物相容性良好,将其应用在活体鼠股骨大块缺损移植实验中,股骨平均 9 周愈合<sup>[26]</sup>。

### 4.3 其他组织

由于胶原蛋白的优良生物学特性,除了在胶原蛋白大量存在的皮肤和骨组织外,其也在其他组织的三维生物打印构建中同样重要。有学者以鼠尾 I 型胶原蛋白作为外层,内皮细胞作为内层通过三维打印构建了类血管的管状结构,并通过灌流实验初步验证以三维打印技术构建具有细胞活性血管的可能性<sup>[27]</sup>。Goldstein 等<sup>[28]</sup>以牛胶原蛋白混合新西兰白兔的软骨细胞共打印气管支架,以 9 只部分气管切除新西兰白兔作为模型,将打印出的气管支架作为替代物缝合后观察,12 周后兔存活率为 100%,组织学染色显示胶原蛋白软骨支架的糖蛋白明显增加,周围组织无明显炎症反应。

## 5 总结

三维打印技术经过多年发展已经达到了精度高、可控性强的水平,并向更高精度的微型打印发展。其在个性化打印方面的效果,是其他技术不可比拟的,该技术在医疗领域和其他研究中的优势尤为突出。胶原蛋白是生物体重要的构成成分,以其作为三维生物打印的“墨水”可以个性化定制并构建出传统组织工程不能构建的立体结构,如模拟真实组织、构建生物支架等,是生物特性极其优良的材料。

## 参考文献

[1] 顾其胜,蒋丽霞. 胶原蛋白与临床医学[M]. 上海:第二军医

- 大学出版社, 2003:1-52.
- [2] Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55 (12): 1531-1546. DOI:10.1016/j.addr.2003.08.002.
- [3] Phanat K, Soottawat B, Wonnop V, et al. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2010, 43(5):792-800. DOI:10.1016/j.lwt.2010.01.006.
- [4] Li SW, Sun Y, Donelan W, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant human pancreatic duodenal homeobox-1 protein in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2010, 72(2):157-161. DOI: 10.1016/j.pep.2010.04.004.
- [5] Tang Y, Yang X, Hang B, et al. Efficient production of hydroxylated human-like collagen via the co-expression of three key genes in *Escherichia coli* origami (DE3) [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 178(7):1458-1470. DOI: 10.1007/s12010-015-1959-6.
- [6] Zhang J, Deng A, Zhou A, et al. Comparison of two proanthocyanidin cross-linked recombinant human collagen-peptide (RHC)-chitosan scaffolds [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2015, 26(10): 585-599. DOI:10.1080/09205063.2015.1047667.
- [7] Shahrokhi S, Arno A, Jeschke MG. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase [J]. *Wound Repair Regen*, 2014, 22(1):14-22. DOI: 10.1111/wrr.12119.
- [8] Suzuki S, Morimoto N, Yamawaki S, et al. A case of giant naevus followed up for 22 years after treatment with artificial dermis [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2013, 66(8): e229-233. DOI: 10.1016/j.bjps.2013.03.018.
- [9] 夏照帆. 首个国产人工合成真皮的转化医学研究 [G]//中华医学学会烧伤外科学分会 2015 年学术年会论文集. 深圳, 2015 [2016-01-13].
- [10] Levingstone TJ, Thompson E, Matsiko A, et al. Multi-layered collagen-based scaffolds for osteochondral defect repair in rabbits [J]. *Acta Biomater*, 2016, 32:149-160. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.12.034.
- [11] Hoyer B, Bernhardt A, Heinemann S, et al. Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(4): 1059-1066. DOI: 10.1021/bm201776r.
- [12] Shen X, Nagai N, Murata M, et al. Development of salmon milt DNA/salmon collagen composite for wound dressing [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19(12): 3473-3479. DOI: 10.1007/s10856-008-3512-4.
- [13] Meghezi S, Seifu DG, Bono N, et al. Engineering 3D cellularized collagen gels for vascular tissue regeneration [J]. *J Vis Exp*, 2015(100): e52812. DOI: 10.3791/52812.
- [14] 王运赣, 王宣. 3D 打印技术 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2014:2-5.
- [15] Khalil S, Nam J, Sun W. Multi-nozzle deposition for construction of 3D biopolymer tissue scaffolds [J]. *Rapid Prototyping J*, 1995, 11(1):9-17. DOI:10.1108/13552540510573347.
- [16] Xu T, Kincaid H, Atala A, et al. High-throughput production of single-cell microparticles using an inkjet printing technology [J]. *J Manuf Sci E-T ASME*, 2008, 130(2): 137-139. DOI: 10.1115/1.2903064.
- [17] 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.
- [18] Li Z, Kawashita M. Current progress in inorganic artificial biomaterials [J]. *J Artif Organs*, 2011, 4(3):163-170. DOI: 10.1007/s10047-011-0585-5.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Lee V, Singh G, Trasatti JP, et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014, 20(6):473-484. DOI: 10.1089/ten.TEC.2013.0335.
- [22] Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(8): 773-785. DOI: 10.1038/nbt.2958.
- [23] Lee W, Debasitis JC, Lee VK, et al. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(8): 1587-1595. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.009.
- [24] Michael S, Sorg H, Peck CT, et al. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57741. DOI: 10.1371/journal.pone.0057741.
- [25] Du M, Chen B, Meng Q, et al. 3D bioprinting of BMSC-laden methacrylamide gelatin scaffolds with CBD-BMP2-collagen microfibers. *Biofabrication*, 2015, 7(4):044104. DOI: 10.1088/1758-5090/7/4/044104.
- [26] Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(13):4026-4034. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.064.
- [27] Zhao L, Lee VK, Yoo SS, et al. The integration of 3-D cell printing and mesoscopic fluorescence molecular tomography of vascular constructs within thick hydrogel scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(21):5325-5332. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.004.
- [28] Goldstein TA, Smith BD, Zeltsman D. Introducing a 3-dimensionally printed, tissue-engineered graft for airway reconstruction: a pilot study [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 153(6):1001-1006. DOI: 10.1177/0194599815605492.

(收稿日期:2016-01-13)

(本文编辑:贾津津)

**本文引用格式**

李海航, 罗鹏飞, 盛嘉隽, 等. 胶原蛋白在三维生物打印中的应用研究进展 [J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(10):638-640. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.10.016.

Li HH, Luo PF, Sheng JJ, et al. Advances in the research of application of collagen in three-dimensional bioprinting [J]. *Chin J Burns*, 2016, 32(10):638-640. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.10.016.