

· 综述 ·

3D生物打印技术的分类评价及其应用于组织工程血管构建的研究进展

李霞飞¹, 闫欢欢², 杨托², 张雪薇², 张锦锦², 陆晓生³, 陈俊杰⁴,
井长勤^{2*}, 赵亮^{1,2*}

1 新乡医学院 医学工程学院, 河南 新乡 453003

2 新乡医学院 生命科学技术学院, 河南 新乡 453003

3 新乡医学院第三附属医院, 河南 新乡 453003

4 Advanced Medical and Dental Institute, University Sains Malaysia, Bertam 13200, Kepala Batas, Penang, Malaysia

李霞飞, 闫欢欢, 杨托, 张雪薇, 张锦锦, 陆晓生, 陈俊杰, 井长勤, 赵亮. 3D生物打印技术的分类评价及其应用于组织工程血管构建的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2934-2947.

LI Xiafei, YAN Huanhuan, YANG Tuo, ZHANG Xuewei, ZHANG Jinjin, LU Xiaosheng, CHEN Junjie, JING Changqin, ZHAO Liang. 3D bioprinting: classification, evaluation, and application in vascular tissue engineering[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2934-2947.

摘要: 心血管疾病是一种常见的疾病, 目前尚缺乏能够应用于冠脉搭桥手术的小口径人工血管。传统的组织工程血管支架制备技术在调节支架的孔径、几何形态和互连性方面存在不足。3D生物打印技术能够模拟血管组织的天然结构, 精确打印活细胞和生物材料, 在纳米尺度上对支架的微观结构和孔隙率进行调控, 为研发新型的组织工程血管提供了新思路。本文系统评价了3D生物打印技术的分类特点, 深入探讨了3D生物打印技术在组织工程血管领域的最新研究进展, 分析总结了其优点, 同时指出此技术还存在较多问题需要解决, 如血管材料的免疫排斥等, 为其进一步的研究提供参考和借鉴。

关键词: 3D生物打印; 组织工程血管; 生物墨水; 分类评价; 复合材料

资助项目: 2024年河南省科技攻关项目(242102230121); 河南省医用防护用品重点实验室开放课题(YDFH-2023-KF-05)
This work was supported by the Science and Technology Research Project of Henan Province in 2024 (242102230121) and the Supported Project from the Key Laboratory of Medical Protective Equipment in Henan Province (YDFH-2023-KF-05).

*Corresponding authors. E-mail: JING Changqin, jingchangqin@126.com; ZHAO Liang, zhaoliang4321@163.com

Received: 2023-12-13; Accepted: 2024-04-29; Published online: 2024-05-07

3D bioprinting: classification, evaluation, and application in vascular tissue engineering

LI Xiafei¹, YAN Huanhuan², YANG Tuo², ZHANG Xuwei², ZHANG Jinjin²,
LU Xiaosheng³, CHEN Junjie⁴, JING Changqin^{2*}, ZHAO Liang^{1,2*}

1 School of Medical Engineering, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

2 School of Life Sciences and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

3 The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

4 Advanced Medical and Dental Institute, University Sains Malaysia, Bertam 13200, Kepala Batas, Penang, Malaysia

Abstract: Cardiovascular diseases are major diseases, and there is lack of artificial blood vessels with small diameters which can be applied in coronary artery bypass surgery. The conventional vascular scaffold preparation techniques in tissue engineering have shortcomings in regulating the diameter, geometric shape, and interconnectivity of the scaffold. 3D bioprinting can simulate the natural structure of the vascular tissue, accurately print live cells and biomaterials, and regulate the microstructure and porosity of scaffolds on the nanoscale, providing new ideas for vascular tissue engineering. This article systematically evaluates the classification of 3D bioprinting technologies and reviews the latest research progress of 3D bioprinting in vascular tissue engineering. It summarizes the advantages of 3D bioprinting and points out the problems that need to be solved, such as the immune rejection of blood vessel materials, providing reference for the further research.

Keywords: 3D bioprinting; tissue-engineered blood vessel; bio-ink; classification and evaluation; composite material

心血管疾病是导致人类死亡的主要原因之一,尤其是冠状动脉疾病,其致死率占心血管疾病死亡总数的 53%。单纯的药物溶栓治疗在血管堵塞严重的情况下治疗效果有限,支架介入或心脏搭桥手术是目前治疗冠状动脉等疾病的主要手段^[1]。自体血管是临床上常用于搭桥手术的血管移植物,但其来源有限,在取材过程中有可能引起供体部位的感染或造成二次损伤,难以满足临床需求;而同种异体或异种血管存在一定的免疫排斥反应,因此人工血管的研发十分重要。随着组织工程学的发展,基于组织工程技术构建新型人工血管受到了研究者的广泛关注^[2]。

组织工程血管的构建主要涉及支架材料、

种子细胞和生长因子。血管支架材料的制备方法和技术有多种,如凝聚法、溶剂浇铸技术、冷冻干燥技术、静电纺丝技术、气体发泡成型技术和 3D 打印技术等^[3],其中静电纺丝技术是制造血管支架的经典技术之一,并已有较多的研究成果。本课题组长期从事组织工程血管的研究工作,在基于动态培养构建双层小口径人工血管^[4]、纤维蛋白基血管支架制备^[5-7]与抗凝小口径血管构建^[8]等领域取得了一系列成果。3D 打印技术作为近年一种新兴技术,能精细地调控支架的微观结构,在调控支架的孔径大小、几何形态及互连性等方面具有显著的优势。传统 3D 打印技术有制造精度高、可产生复杂的

3D 结构等优点,但存在工作温度高、无法打印细胞等不足;而 3D 生物打印技术可使用细胞和材料共混形成的生物墨水进行打印,且打印精确度和分辨率更高。目前用于 3D 生物打印的生物墨水材料主要有生物衍生材料、高分子材料和复合材料等^[9]。为系统总结评价 3D 生物打印技术在组织工程血管领域的研究进展,本文介绍了 3D 打印技术的概念原理和分类,总结了 3D 生物打印技术中用到的生物墨水及其研究进展,探讨了 3D 生物打印技术应用于组织工程血管的优缺点,以期为进一步研究提供参考。

1 3D 打印技术的现状和进展

3D 打印技术作为一种新型材料加工技术,在组织工程血管支架材料制备方面存在很多优势,例如能在微米级别的空间结构上调控材料的微观结构,可打印出具有复杂结构的个性化支架,在心血管疾病领域具有较大的应用潜力^[10]。目前,3D 打印技术从发展趋势上分为传统 3D 打印、3D 生物打印和 4D 生物打印三类。

1.1 传统 3D 打印

传统 3D 打印技术主要包括立体光刻造型(stereo lithography appearance, SLA)技术、熔融沉积建模(fused deposition modeling, FDM)技术、选择性激光烧结(selective laser sintering, SLS)技术和数字光处理(digital light processing, DLP)技术(图 1)。SLA 技术是将激光汇聚到光固化质料的外表面,使之采用由点到线、由线到面的顺序进行凝固,循环往复层叠构建三维实体。SLA 的制造精度极高,可达微米甚至纳米尺度,可用于制备形态复杂、分辨率高及有内部结构的材料,是最早用于骨组织工程的 3D 打印技术之一^[11]。FDM 技术是一种以丝材为原料的 3D 打印工艺,其工作原理是将原料自原料

轴中传至加热器,原料加热后以熔融的热塑性塑料的形式从喷嘴中挤出,然后经 3D 打印后使其固化^[12]。目前已将聚己内酯(polycaprolactone, PCL)、聚乳酸(poly(lactic acid, PLA)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]等生物材料与 FDM 技术相结合,用于制备熔点较低的组织工程支架。SLS 技术以红外激光器作为能源发射激光来烧结粉末,在把粉末预热至略小于其熔点的温度后,激光束在计算机的控制下按分层切面信息将铺平的粉末选择性地层层烧结,全部烧结完成后再把剩余的粉末除去,就可得到烧结好的成型材料。SLS 技术可用于打印有承重性能和促进骨再生能力的金属质支架,已被用于制备机械性能与小梁骨相似的有生物活性的复合支架^[13]。DLP 技术是一种利用数字光处理原理进行三维打印的方法,其基本原理是首先用 3D 打印软件将模型水平切割成层,然后投影第一层树脂模型的形状,最后光固化成型。DLP 打印技术成型速度更快,打印精度更高,目前在包括构建人工血管在内的生物医学领域有着广泛的应用。

1.2 3D 生物打印

3D 生物打印的定义是通过计算机辅助的逐层沉积方法,将活细胞和其他生物材料定位、堆叠和组装成三维结构,以制造用于组织工程、再生医学、药代动力学、癌症研究和其他生物医学研究的活体组织和类器官^[14]。对于组织工程血管来说,3D 生物打印技术具有能打印出细胞分布受控制的血管支架的优点,能将具有生物活性的细胞与生物材料同时沉积下来,按照患者的情况制备出能满足个性化需求的人工血管^[15],从而用于替代堵塞的血管(图 2)。3D 生物打印技术主要包括喷墨生物打印技术、挤压生物打印技术和激光辅助生物打印技术^[16]。表 1 系统总结了这几种 3D 生物打印技术的特点。

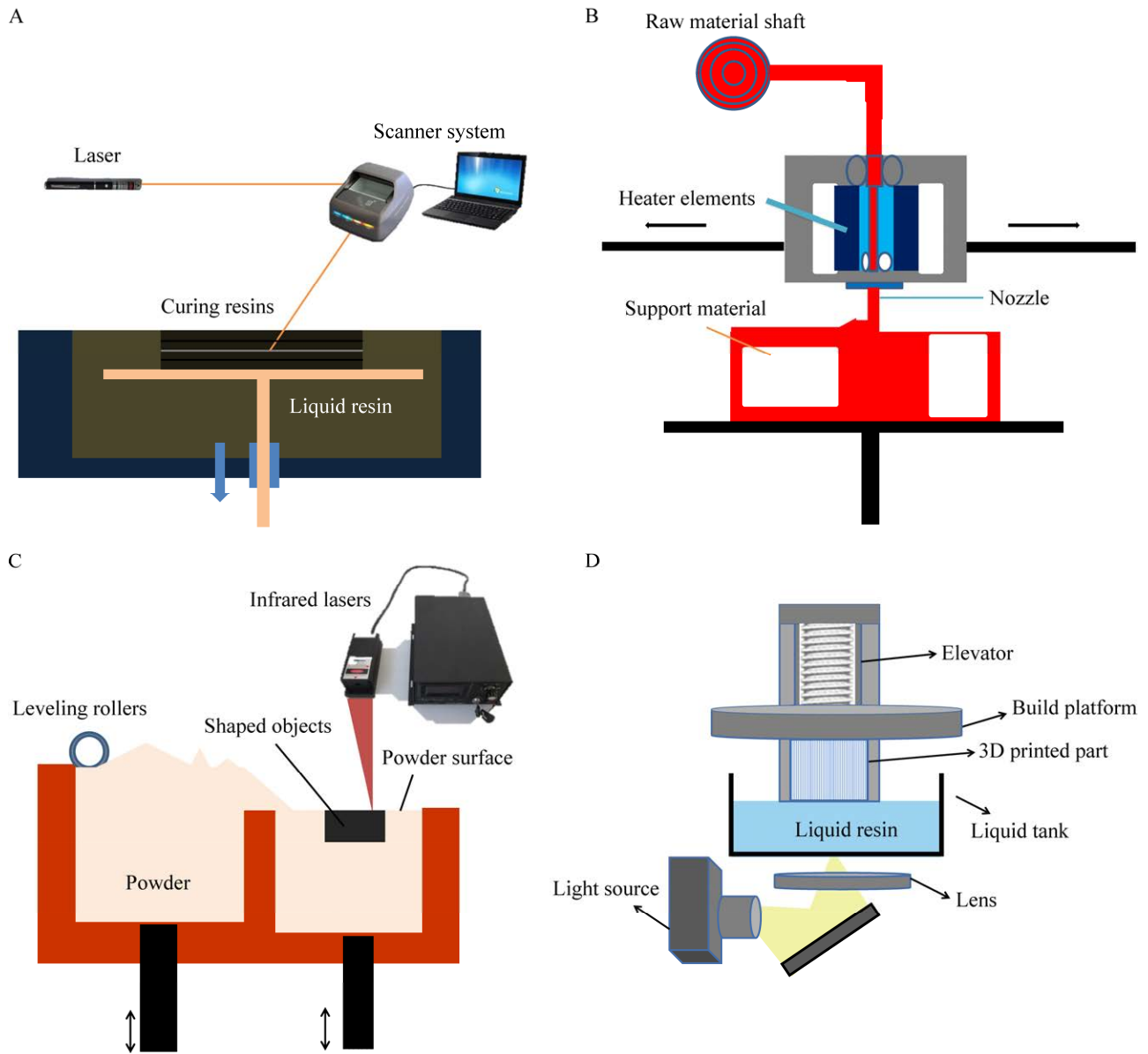


图 1 四种传统 3D 打印技术的工作原理示意图 A: SLA 技术. B: FDM 技术. C: SLS 技术. D: DLP 技术

Figure 1 Schematic diagram of the working principles of four traditional 3D printing technologies. A: SLA technology. B: FDM technology. C: SLS technology. D: DLP technology.

1.2.1 喷墨生物打印

喷墨生物打印技术是在传统二维喷墨打印技术基础上的延伸，优化其以适应三维打印需求，采用的打印设备为台式喷墨三维打印机。此工艺不需接触液滴，它是在计算机的控制下

用热能或压力及电力将生物墨水原料液滴从打印头的喷嘴中喷射到基质上，基质起支撑作用或成为打印物质的一部分^[17]。喷墨生物打印技术具有耗材消耗少和分辨率高的特点，其在临床前的研究及临床实践中应用广泛。但它也存

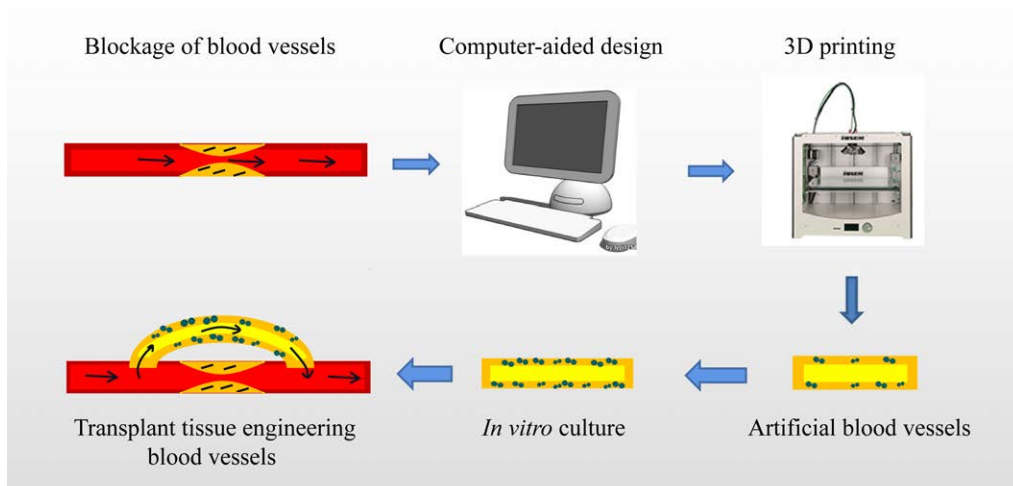


图 2 3D 生物打印技术制备组织工程血管替代受堵血管的示意图

Figure 2 Schematic diagram of 3D bioprinting technology for tissue engineering blood vessels to replace blocked blood vessels.

表 1 三种 3D 生物打印技术的特点比较

Table 1 Characteristics comparison of three 3D bioprinting technologies

	Inkjet bioprinting	Extrusion bioprinting	Laser-assisted bioprinting
Consume	Small	Middle	Big
Viscosity	Middle	High	Medium to high
Print time	Middle	Short	Long
Cell viability	On the high side	Medium to high	High
Merit	High throughput, low consumption, easy to prepare, and easily compatible with biomaterials with low viscosity	High cell density, strong cell viability, and a wide selection of bioinks	Nozzle-free, high resolution, high precision and high cell density
Shortcoming	The selection of bioink is narrow, the nozzle is easy to clog, the cell density is small, and the potential heat-induced damage to the cells	The resolution is low, and the shear stress has effect on the cells inside the printing nozzle	It takes a lot of money, the speed is slow, and the 3D construction ability is poor

在一定不足，如原料必须为液体、液滴的大小不一致且定向性低、打印机喷嘴易堵塞等^[18]。Zheng 等^[19]采用了一种基于喷墨生物打印的方法，使用可变材料来创建细胞嵌入的微血管结构，其空间分辨率明显高于基于挤压的生物打印，人类真皮成纤维细胞和脐静脉内皮细胞在微血管结构中增殖，可形成新生细胞外基质和功能性内皮层(图 3)。

1.2.2 挤压生物打印

目前，3D 生物打印机最常采用的打印工艺

是挤压生物打印技术。这是一种连续挤压、让打印耗材能连续不断地从微喷嘴中被挤压出去的工艺。挤压生物打印技术的打印速率快，扩展性能佳、无需加热，能将细胞非常方便地与生物活性材料相结合^[20]。此工艺具有所需材料来源广、可形成多孔结构的优势，但也存在分辨率低、剪切力对细胞结构完整性有影响等不足。Colosi 等^[21]基于挤压 3D 生物打印技术构建了一种载有人脐静脉内皮细胞的管状人工血管。

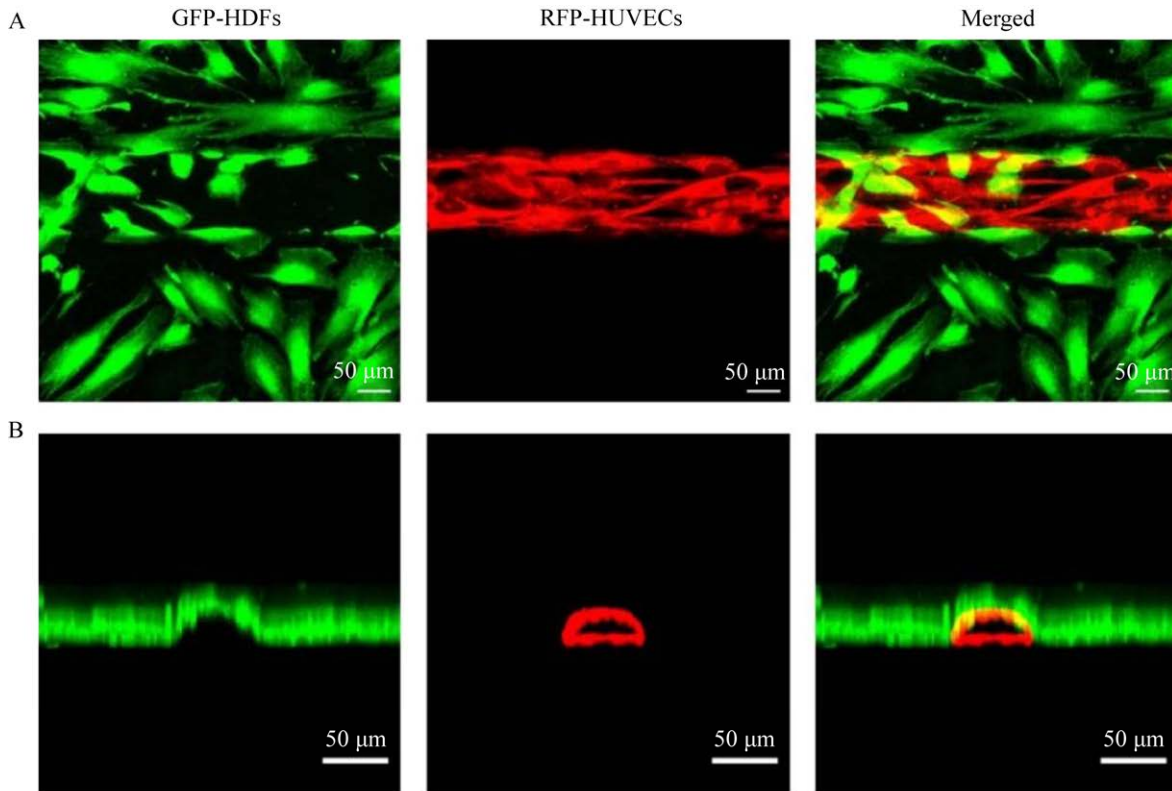


图 3 在微血管组织结构中培养绿色荧光蛋白标记的人类真皮成纤维细胞和红色荧光蛋白标记的脐静脉内皮细胞 7 d 后的荧光照片^[19]

Figure 3 Fluorescence photos of human dermal fibroblasts labeled with green fluorescent protein (GFP-HDFs) and umbilical vein endothelial cells labeled with red fluorescent protein (RFP-HUVECs) cultured in microvascular tissue structure for 7 days^[19].

1.2.3 激光辅助生物打印

激光辅助生物打印技术的制备过程是在脉冲激光束作用下生成高压的气泡，再将含细胞的质料从原始的打印材料“色带”上运送至接收基板的过程。激光辅助生物打印技术不含喷嘴，所以它不仅没有一系列由喷嘴导致的麻烦，还规避了在喷墨生物打印技艺和挤压生物打印技艺中因为剪切应力而出现的细胞伤亡问题。激光辅助生物打印的优点是分辨率高、可容纳较高的细胞密度^[22]。Kérourédan 等^[23]使用激光辅助生物打印对 I 型胶原水凝胶进行图案化结构打印，并在胶原图案化结构上培养内皮细胞，细胞可以在胶原图案化结构上形成毛细管网。

这表明激光辅助生物打印不影响内皮细胞的增殖，并在图案化结构中形成微血管网。但激光辅助生物打印也存在较复杂、速度慢、花费高和难以打印有扩展能力的异质组织结构等缺点。

1.3 4D 生物打印

4D 生物打印指的是打印形成的支架材料在外界的刺激下(如温度、电、细胞牵引力、湿度和 pH 值等)能够改变其形态和功能，从而提供附加功能和性能驱动的应用，其原料主要是有形态“记忆”能力的高分子材料。在 4D 生物打印中，“时间”因素被整合为第四维，允许打印材料改变其功能和形状以响应外界刺激^[17]。4D 打印与 3D 打印的工艺相似，其主要区别是材

料的不同。这些 4D 生物打印用的材料通常是刺激响应型的,能与环境中的一些因素相互作用,进而影响打印物质的形态变化^[24]。Kirillova 等^[25]制备的基于生物打印形成的水凝胶材料能在可见绿光的刺激下进行交联,自动折叠形成空心管状组织结构,但其受光照的影响相对较大。Wen 等^[26]基于生物打印构建了明胶/壳聚糖人工血管,能同时响应温度和 pH 两个因素,使其性能接近于人体血管的生物应激特性。

2 3D 生物打印技术在组织工程血管制备的应用

目前,通过 3D 生物打印技术制造组织工程血管的主流趋势是以材料加细胞为墨水直接打印出管状人工血管,然后在体外培养一段时间形成成熟的组织工程血管;也有研究人员采用先打印出细胞培养所需的 3D 血管支架结构,然后将细胞种植于此支架生长形成组织工程血管;然而,无论采用何种构建路径,作为血管移植物的标准是一致的:具有优良的生物相容性和力学性能等^[27]。

目前可用于 3D 生物打印的生物墨水材料可分为生物衍生材料、高分子材料和复合材料。许多生物衍生材料已被应用于 3D 打印血管支架,如藻酸盐、胶原、壳聚糖、透明质酸等,这些生物衍生材料由于其固有的生物源特性,通常在促进细胞增殖和生物相容性方面比高分子材料有更好的特性。高分子材料具有机械强度优良、可加工性高、降解速率可控等优点,但是高分子材料表现出相对较低的生物活性和较高的疏水性,对细胞黏附和增殖不利。为了克服生物衍生材料和高分子材料的不足,将两者进行混合,充分发挥每种材料的优点,才有可能制造出满足生物活性、机械强度、易于制造和

可控降解等多种要求的新型组织工程血管。

2.1 单纯以细胞为生物打印墨水

用作生物打印墨水的细胞主要有干细胞、内皮细胞和平滑肌细胞等,部分研究者采用 3D 生物打印技术,尝试单纯使用细胞作为墨水用于制备组织工程血管。Reid 等^[28]研发了一种人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)打印技术,这一技术是用 Felix3.0 3D 打印机来完成的,其优点是能较好地保留干细胞的多能性,成本较低。森田茂树教授的团队用 Bio3D 打印机,以 hiPSCs 为原料,在由多排细针组成的微型基座上把细胞一层一层串接起来,打印出长约 2 cm、直径约 5 mm 的血管,并将其成功应用于以猪为模型的体内试验中;这种方法的优点是耗时短,血管的多层次结构可通过分别在时空上沉积不同的细胞和成分来一次完成打印;缺点是造价高、技术不完全成熟^[29]。目前单纯以细胞作为原材料的 3D 打印技术面临的挑战主要是准备时间长和细胞消耗量高。

2.2 生物衍生材料墨水

生物衍生材料是将原始生物组织特异处理后制成的生物医用材料。生物衍生材料由于其固有的细胞外基质结构,具有生物活性强和细胞黏附性高等优点,通常在细胞增殖和分化方面表现出比高分子材料更佳生物学性能。

胶原是使用最广泛的组织来源的天然聚合物,由识别细胞的特定氨基酸序列组成^[30]。明胶是胶原蛋白的水解衍生物,由于其具有很好的热可逆特性,在低温下能够形成凝胶,但在 37 °C 时会变成液体,因此它成为了一种可用于 3D 生物打印的常用生物材料。纤维蛋白原是天然细胞外基质的一种主要成分,可使用凝血酶对其进行交联,使其成为制造血管等软组织的理想生物材料。然而,由于其在打印过程中缺

乏足够的黏度和刚度以抵抗重力, 维持在心轴上的形状, 导致其难以独立应用于生物打印^[31]。Freeman 等^[32]将明胶与热处理后的纤维蛋白原混合在一起, 获得了一种具有良好流变性能和可打印性的生物墨水, 用于制造个性化的血管移植体, 其生物力学性能相对优良。还有研究者基于 3D 生物打印技术构建了藻酸盐/明胶/纤维蛋白人工血管, 实验结果显示脂肪来源的基质细胞(adipose derived stromal cells, ADSCs)能在血管表面黏附并生长良好^[33]。

海藻酸钠是从海带中提取的天然多糖化合物, 有很好的结构完整性及良好的可打印性, 是一种制造组织工程血管移植体的良好生物材料。但是, 因其本身生物惰性, 需要与其他生物材料混合或进行化学修饰以改善细胞黏附。Attalla 等^[34]应用 3D 打印机, 通过将具有不同生物友好性的材料(例如胶原蛋白和纤维蛋白)与具有高机械强度的藻酸盐联合使用, 构建多层结构的人工血管, 能够在不损害结构完整性的情况下增强细胞长期活力和增殖能力。Pataky 等^[35]提出了一种优化的 3D 喷墨打印工艺, 将海藻酸钠与明胶结合形成生物墨水, 用 3D 生物打印工艺打印出直径约 200 μm 的支持生理流速的组织样微血管。Xu 等^[36]将海藻酸钠、3T3 成纤维细胞和细胞培养基混合制成生物墨水应用于 3D 生物打印制成人工血管, 培养 72 h 后的细胞活性可超过 82%。

脱细胞基质(decellularized extracellular matrices, dECM)也是一种常用的 3D 打印材料, 其特性接近于天然组织。为解决脱细胞基质的可打印性低和物理特性调控性差的问题, Yu 等^[11]发明了一种制备具有可光交联的组织特异性 dECM 生物墨水的方法, 该生物墨水可用于制造患者特异性组织, 对复杂的微结构和机械性能具有高度调控性; 实验结果表明, 组织匹配

的 dECM 生物墨水为细胞的高活力和增殖提供了有利的环境。Pati 等^[37]以负载细胞的脱细胞细胞外基质凝胶为原料, 采用 3D 生物打印工艺制备人工血管, 其将多型细胞和仿生细胞外基质材料进行混合打印, 是一种很有前途的制造体外组织器官的方法。

2.3 高分子材料墨水

高分子材料是经过加聚、缩聚的方式合成的高分子聚合物。它是最常见的 3D 打印材料之一, 主要有聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、PLA、聚乙二醇二丙烯酸酯(polyethylene glycol diacrylate, PEGDA)、聚 L-丙交酯(poly-L-lactide, PLLA)、PCL、聚苯砜[poly(phenylene sulfone), PPSU]、聚氨酯(polyurethane, PU)、聚醚醚酮(poly-ether-ether-ketone, PEEK)等。高分子材料具有机械强度高、可加工性强和降解速率可控等优点, 但它们的生物活性低、疏水性高、细胞黏附性相对差。

Centola 等^[38]提出了一种制造混合型血管移植体的技术, 他们通过将静电纺丝工艺和 3D 打印技术结合, 开发了一种可释放肝素的 PLLA/PCL 支架; 内层 PLLA/肝素支架是通过管状静电纺丝技术制成的, 随后在支架的外层打印 PCL 以提高机械性能; 然后将人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)植入支架中, 并评价支架的形态、机械强度和细胞活力等指标; 这种特殊的 PLLA/PCL 血管支架既克服血栓形成问题, 又能诱导 hMSCs 向内皮分化, 同时其力学性能良好。

由某些高分子材料通过一定的化学交联或物理交联形成的水凝胶材料也常用于 3D 生物打印。有研究者使用熔融静电纺丝技术与 3D 打印相结合的方法来优化水凝胶, 以此得到高度组织化、高孔隙率的微纤 PCL 支架; 结果表明, 与优化前的水凝胶或微纤维支架相比, 凝

胶/支架复合材料的力学强度增加^[39]。目前基于 3D 打印的微纤维增强水凝胶的方法为制造具有生物相容性的人工组织结构奠定了基础。尽管进行了大量的研究,然而目前可用于血管组织修复的水凝胶仍无法满足临床所需的生物学性能要求。

目前一些研究集中于优化 3D 打印的技术工艺,以使制备的血管支架更能满足多方面的性能要求。Miller 等^[40]开发了一种挤压打印技术,研究人员打印了碳水化合物玻璃的刚性 3D 纤维网络,并将其用作制备包含活细胞的工程组织中的人工血管网络通道,促进内皮细胞的黏附和血液的流动;这种简单的人工血管铸型工艺可以调节人工血管的形状,能与多种类型的细胞相容;此技术的优点是应力性强,细胞能在比较接近生理环境的条件下增殖和新陈代谢,克服了当前可灌注血管网络的制备方法分辨率有限、对材料和加工条件限制高的不足,但也存在周期长和造价高等缺点。Rabionet 等^[41]优化了开源 3D 挤压机 RepRap 的打印工艺,并用其以 PCL 为原料制备用于细胞培养应用的管形支架;实验结果表明制造的 PCL 支架可用于 3D 细胞培养,细胞增殖良好;其设计和制造参数首先由 SolidWorks 和 Slic3r 软件确定,然后根据新的顺序流程图进行优化;在描述的流程图中,通过考虑最终支架的几个变量来逐步优化参数,以保证高质量的打印;此技术的设计和应用可能引领生物可降解支架制造的未来,从而在组织工程血管支架的制备方面实现精确化个性化设计。

2.4 复合材料墨水

复合材料是将生物衍生材料与高分子材料相互结合,发挥两者优点,用于制备满足生物活性、机械强度、降解可控等多种要求的新型血管组织工程支架材料。单纯使用生物衍生材

料或者高分子材料作为生物墨水时,虽然有一定效果,但还存在多种问题。基于细胞外基质的生物衍生材料,包括明胶、胶原和透明质酸,它们的机械强度有限,影响血管支架的形状变化。另一方面,高分子材料虽然机械性能较好,但并不具有促进细胞迁移和增殖所需的细胞黏附成分。因此,将生物衍生材料和高分子材料混合制作生物墨水用于血管支架的生物打印,其生物和力学性能可以根据不同的要求调控,以满足不同需求。

目前已经研发了多种基于复合材料生物墨水来构建血管移植物的挤出式 3D 生物打印方法。Gold 等^[42]使用挤出式生物打印系统构建由甲基丙烯酸酐化明胶 (gelatin methacryloyl, GelMA)、PEGDA、纳米硅酸盐和血管平滑肌细胞组成的人工血管,然后将内皮细胞接种在血管结构内层以模拟血管的天然结构和功能;人工血管中的两种细胞随着时间的推移都显示出高的活细胞率和表型维持率。Li 等^[43]通过挤压打印机,以明胶/海藻酸钠/碳纳米管杂化的水凝胶作为生物墨水,制备出管形支架,然后将成纤维细胞接种于支架的内/外壁,实现了生物活性组织工程血管的体外构建;结果表明,适当掺杂碳纳米管能有效地提高工程血管的力学特性,促进细胞增殖,并克服了传统血管支架材料的机械强度和生物相容性差等问题。为改善血管移植物的促内皮化和抗菌功能, Kabirian 等^[44]将能释放 NO 的 S-亚硝基-N-乙酰-DL-青霉素包裹于多层碳纳米管,进而用于修饰 3D 打印 PCL 人工血管;研究结果表明,释放 NO 的 3D 打印 PCL 人工血管具有良好的细胞相容性,能促进内皮细胞的增殖和迁移,降低细菌活力。Wu 等^[45]将明胶/藻酸盐/蒙脱石组成的生物墨水应用于 3D 生物打印制备人工血管,结果表明蒙脱石可显著改善生物墨水的可打印性,该人

工血管拥有相互连接的微孔结构,能促进营养物质的传递和细胞的浸润,其断裂强度和弹性模量类似天然血管,且具有良好的细胞相容性,可作为一种促进血管再生的血管移植植物。

同轴双喷头 3D 生物打印是一种广泛应用于打印复合材料生物墨水的方法。Zhou 等^[17]设计了一种由载有平滑肌细胞的 GelMA/PEGDA/海藻酸盐/裂解酶的生物墨水用于打印人工血管,20%的 Pluronic F-127 溶液置于内针注射器中,然后置于洗脱液,滤去 Pluronic F-127 形成人工血管(图 4)。血管平滑肌细胞随着海藻

酸盐逐渐降解而稳定增殖。在不同流速、流动黏度和温度条件下,该人工血管表现出良好的血液相容性和力学性能。此外,支架基质中的血管平滑肌细胞和管腔中的血管内皮细胞随着时间的推移不断增殖,形成明显的双层血管结构。Millik 等^[46]使用同轴打印技术将未改性的 Pluronic F-127 和 F-127 甲基丙烯酸二脲烷水凝胶制备成管状结构,通过改变打印参数,能产生具有不同横截面几何形状的管或同轴细丝。Liang 等^[47]将丙烯酰甘氨酸单体和纳米黏土引入 GelMA 水凝胶中,使用同轴生物打印技术,

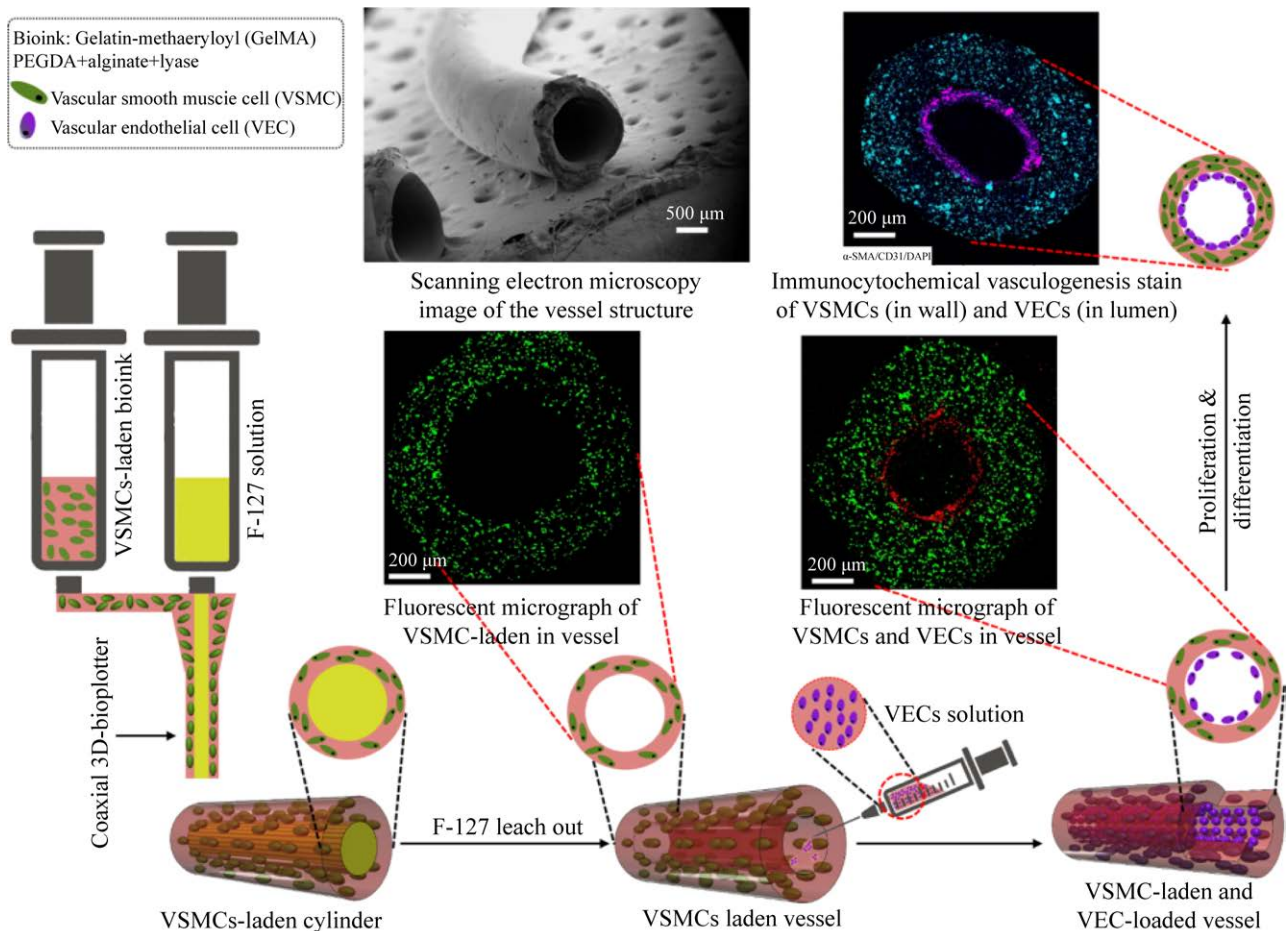


图 4 基于同轴双喷头 3D 生物打印的仿生双层人工血管示意图^[17]

Figure 4 Schematic diagram of biomimetic double-layer artificial blood vessel based on coaxial dual nozzle 3D bioprinting^[17].

制备了拉伸强度为 22 MPa、拉伸性为 500%和 杨氏模量为 21 MPa 的高性能血管支架。加入人 脐静脉内皮细胞后,也具有良好的生物相容性。

在使用细胞和复合材料作为生物墨水方面,生物打印能有效地使细胞和生物材料沉积, 形成能反映生理相关几何形状和复杂性的血管 组织结构。Skardal 等^[48]以四面体季戊四醇衍生 物为原料,合成了两种不同四臂聚乙二醇衍生 物 TetraPEG8 和 TetraPEG13,并将其转化为四 丙烯酸酯衍生物(TetraPACs),再将其与巯基化 透明质酸和明胶衍生物共交联成可挤压水凝 胶,用于生物打印;基于 TetraPACs 水凝胶将 NIH 3T3 细胞包埋,使用 3D 生物打印技术逐 层打印成人工血管移植物,研究结果表明人工血 管移植物中的细胞在培养中可存活长达 4 周;本 研究证明了包含细胞的 TetraPACs 水凝胶可通 过生物打印形成生物人工血管移植物。

有研究者将 3D 生物打印技术应用于 100–1 000 μm 尺寸微血管网络的构建,为器官培 养提供氧气、营养成分和废物的运输。Jia 等^[49] 设计了一种基于 GelMA、海藻酸钠和 4-臂聚乙

二醇-四丙烯酸酯形成的生物墨水,将其与细胞 混合应用多层同轴喷嘴 3D 生物打印技术来创 建高度有组织的可灌注血管结构。这种独特的 生物墨水具有良好的生物化学特性,有利于细 胞的增殖,并可调节可灌注血管结构的机械性 能,从而诱导形成高度组织化的完整微血管网。 Lee 等^[50]针对组织器官的供血问题,采用 3D 生物打印工艺,以内皮细胞、胶原和水凝胶为 生物墨汁,制备长度为 5 mm、直径为 1 mm 的 功能性体外血管通道,其能阻止血浆蛋白分子 等大分子的渗出,具有血管动力学的特点;且 内皮细胞可以在支架上自然增殖,生成微血管 分支从而形成比较完善的毛细血管网,有助于 靶器官的供血。

3 总结与展望

迄今为止,3D 打印技术已由传统打印发展 至 3D 生物打印乃至 4D 生物打印。打印用的生 物墨水材料也由生物衍生材料和高分子材料发 展至复合材料(图 5)。3D 生物打印技术作为目 前最有前景的组织工程血管材料制备技术,能

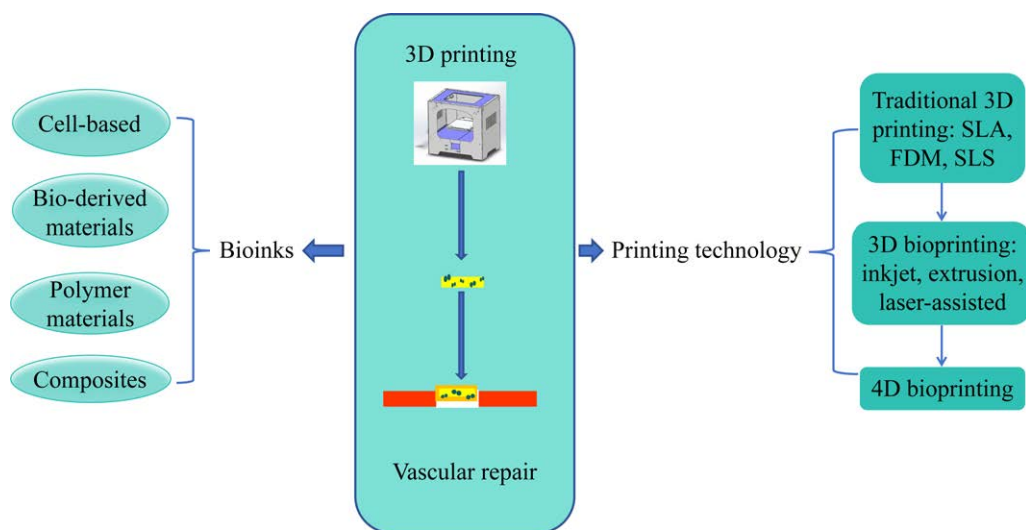


图 5 3D 打印技术的类别以及生物墨水种类

Figure 5 Categories of 3D printing technology and types of bio-ink.

充分模拟天然血管的多层结构和精细微观纤维结构,解决种子细胞增殖迁入材料内部的难题,且能个性化地调控人工血管的长度、内径和分支结构,满足病人的个性化需求。但 3D 生物打印技术目前还存在一些难点需要克服,主要集中在以下方面:生物墨水应该保护细胞免受喷嘴内部的剪切应力,并提供适当的环境来引导细胞;3D 生物打印的人工血管的力学强度与天然血管不匹配;3D 生物打印技术的精细化操作、细胞和材料的性能、组织成熟和功能完善等问题;血管中存在多种不同类型的细胞,包括内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞,如何解决多种细胞在 3D 打印的血管支架材料中的共生长;3D 打印的人工血管作为一种外来植入性材料,其移植入体内后的免疫排斥情况;商业级生产时需要良好的生产规范设施标准和储存方法。当然组织工程血管面临的可能不仅仅是这些问题,可能还有更多的问题需要探讨解决,只有解决这些问题才能实现组织工程血管的临床应用。随着 3D 生物打印设备技术和生物墨水的发展,人工血管打印的精度和仿生度将会进一步提高,为研发新型的人工血管奠定基础。随着科学技术的迅速发展,可以预见在不久的将来,基于 3D 生物打印技术制备的组织工程血管逐步成熟,能应用于临床,造福人类。

REFERENCES

- [1] YAO Y, ZAW AM, ANDERSON DEJ, JEONG Y, KUNIHIRO J, HINDS MT, YIM EKF. Fucoidan and topography modification improved *in situ* endothelialization on acellular synthetic vascular grafts[J]. *Bioactive Materials*, 2022, 22: 535-550.
- [2] KAWECKI F, L'HEUREUX N. Current biofabrication methods for vascular tissue engineering and an introduction to biological textiles[J]. *Biofabrication*, 2023. DOI: 10.1088/1758-5090/acbf7a.
- [3] ZIZHOU R, WANG X, HOUSHYAR S. Review of polymeric biomimetic small-diameter vascular grafts to tackle intimal hyperplasia[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(26): 22125-22148.
- [4] SUN LL, LI XF, YANG T, LU T, DU PC, JING CQ, CHEN ZG, LIN F, ZHAO GA, ZHAO L. Construction of spider silk protein small-caliber tissue engineering vascular grafts based on dynamic culture and its performance evaluation[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2023, 111(1): 71-87.
- [5] ZHAO L, LI XF, YANG L, SUN LL, MU SF, ZONG HB, LI Q, WANG FY, SONG S, YANG CQ, ZHAO CH, CHEN HL, ZHANG R, WANG SC, DONG YZ, ZHANG QQ. Evaluation of remodeling and regeneration of electrospun PCL/fibrin vascular grafts *in vivo*[J]. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*, 2021, 118: 111441.
- [6] YANG L, LI XF, WU YT, DU PC, SUN LL, YU ZY, SONG S, YIN JS, MA XF, JING CQ, ZHAO JQ, CHEN HL, DONG YZ, ZHANG QQ, ZHAO L. Preparation of PU/fibrin vascular scaffold with good biomechanical properties and evaluation of its performance *in vitro* and *in vivo*[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 8697-8715.
- [7] YANG L, LI XF, WANG DM, MU SF, LV WH, HAO YW, LU XS, ZHANG GJ, NAN WB, CHEN HL, XIE LQ, ZHANG YJ, DONG YZ, ZHANG QQ, ZHAO L. Improved mechanical properties by modifying fibrin scaffold with PCL and its biocompatibility evaluation[J]. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 2020, 31(5): 658-678.
- [8] DU PC, LI XF, SUN LL, PAN YX, ZHU HC, LI YY, YANG YJ, WEI XZ, JING CQ, CHEN HL, SHI QZ, LI WB, ZHAO L. Improved hemocompatibility by modifying acellular blood vessels with bivalirudin and its biocompatibility evaluation[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2022, 110(3): 635-651.
- [9] WEEKES A, BARTNIKOWSKI N, PINTO N, JENKINS J, MEINERT C, KLEIN TJ. Biofabrication of small diameter tissue-engineered vascular grafts[J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 138: 92-111.
- [10] DO AV, KHORSAND B, GEARY SM, SALEM AK. 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2015, 4(12): 1742-1762.
- [11] YU C, MA XY, ZHU W, WANG PR, MILLER KL, STUPIN J, KOROLEVA-MAHARAJH A, HAIRABEDIAN A, CHEN SC. Scanningless and continuous 3D bioprinting of human tissues with decellularized extracellular matrix[J]. *Biomaterials*, 2019, 194: 1-13.

- [12] WU WZ, GENG P, LI GW, ZHAO D, ZHANG HB, ZHAO J. Influence of layer thickness and raster angle on the mechanical properties of 3D-printed PEEK and a comparative mechanical study between PEEK and ABS[J]. *Materials*, 2015, 8(9): 5834-5846.
- [13] BAE EJ, KIM JH, KIM WC, KIM HY. Bond and fracture strength of metal-ceramic restorations formed by selective laser sintering[J]. *The Journal of Advanced Prosthodontics*, 2014, 6(4): 266-271.
- [14] YANG GH, KANG DG, AN S, RYU JY, LEE K, KIM JS, SONG MY, KIM YS, KWON SM, JUNG WK, JEONG W, JEON H. Advances in the development of tubular structures using extrusion-based 3D cell-printing technology for vascular tissue regenerative applications[J]. *Biomaterials Research*, 2022, 26(1): 73.
- [15] KONG ZY, WANG XH. Bioprinting technologies and bioinks for vascular model establishment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(1): 891.
- [16] MARTI P, LAMPUS F, BENEVENTO D, SETACCI C. Trends in use of 3D printing in vascular surgery: a survey[J]. *International Angiology: a Journal of the International Union of Angiology*, 2019, 38(5): 418-424.
- [17] ZHOU X, NOWICKI M, SUN H, HANN SY, CUI HT, ESWORTHY T, LEE JD, PLESNIAK M, ZHANG LG. 3D bioprinting-tunable small-diameter blood vessels with biomimetic biphasic cell layers[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(41): 45904-45915.
- [18] LI JP, CHEN MJ, FAN XQ, ZHOU HF. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2016, 14(1): 271.
- [19] ZHENG F, DERBY B, WONG J. Fabrication of microvascular constructs using high resolution electrohydrodynamic inkjet printing[J]. *Biofabrication*, 2021. DOI: 10.1088/1758-5090/abd158.
- [20] DATTA P, AYAN B, OZBOLAT IT. Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication[J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 51: 1-20.
- [21] COLOSI C, SHIN SR, MANOHARAN V, MASSA S, COSTANTINI M, BARBETTA A, DOKMECI MR, DENTINI M, KHADEMOSSEINI A. Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3D tissue constructs using low-viscosity bioink[J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(4): 677-684.
- [22] WANG PJ, SUN YZ, SHI XQ, SHEN HX, NING HH, LIU HT. 3D printing of tissue engineering scaffolds: a focus on vascular regeneration[J]. *Bio-Design and Manufacturing*, 2021, 4(2): 344-378.
- [23] KÉROURÉDAN O, BOURGET JM, RÉMY M, CRAUSTE-MANCIET S, KALISKY J, CATROS S, THÉBAUD NB, DEVILLARD R. Micropatterning of endothelial cells to create a capillary-like network with defined architecture by laser-assisted bioprinting[J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2019, 30(2): 28.
- [24] SHAKIBANIA S, GHAZANFARI L, RAEEZADEH-SARMAZDEH M, KHAKBIZ M. Medical application of biomimetic 4D printing[J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2021, 47(4): 521-534.
- [25] KIRILLOVA A, MAXSON R, STOYCHEV G, GOMILLION CT, IONOV L. 4D biofabrication using shape-morphing hydrogels[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(46): 1703443.
- [26] WEN HJ, LI JY, PAYNE GF, FENG Q, LIANG MH, CHEN JX, DONG H, CAO XD. Hierarchical patterning *via* dynamic sacrificial printing of stimuli-responsive hydrogels[J]. *Biofabrication*, 2020, 12(3): 035007.
- [27] YUAN HY, CHEN CY, LIU YH, LU T, WU ZS. Strategies in cell-free tissue-engineered vascular grafts[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2020, 108(3): 426-445.
- [28] REID JA, MOLLICA PA, JOHNSON GD, OGLE RC, BRUNO RD, SACHS PC. Accessible bioprinting: adaptation of a low-cost 3D-printer for precise cell placement and stem cell differentiation[J]. *Biofabrication*, 2016, 8(2): 025017.
- [29] ARAI K, MURATA D, VERISSIMO AR, MUKAE Y, ITOH M, NAKAMURA A, MORITA S, NAKAYAMA K. Fabrication of scaffold-free tubular cardiac constructs using a Bio-3D printer[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0209162.
- [30] JIA WB, LIU LL, LI M, ZHOU YM, ZHOU H, WENG HJ, GU GF, XIAO M, CHEN ZG. Construction of enzyme-laden vascular scaffolds based on hyaluronic acid oligosaccharides-modified collagen nanofibers for antithrombosis and *in situ* endothelialization of tissue-engineered blood vessels[J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 153: 287-298.
- [31] ERKOC P, UVAK I, NAZEER MA, BATOOL SR, ODEH YN, AKDOGAN O, KIZILEL S. 3D printing of cytocompatible gelatin-cellulose-alginate blend hydrogels[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2020,

- 20(10): e2000106.
- [32] FREEMAN S, RAMOS R, ALEXIS CHANDO P, ZHOU LX, REESER K, JIN S, SOMAN P, YE KM. A bioink blend for rotary 3D bioprinting tissue engineered small-diameter vascular constructs[J]. *Acta Biomaterialia*, 2019, 95: 152-164.
- [33] XU YF, WANG XH. Fluid and cell behaviors along a 3D printed alginate/gelatin/fibrin channel[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(8): 1683-1695.
- [34] ATTALLA R, PUERSTEN E, JAIN N, SELVAGANAPATHY PR. 3D bioprinting of heterogeneous bi- and tri-layered hollow channels within gel scaffolds using scalable multi-axial microfluidic extrusion nozzle[J]. *Biofabrication*, 2018, 11(1): 015012.
- [35] PATAKY K, BRASCHLER T, NEGRO A, RENAUD P, LUTOLF MP, BRUGGER J. Microdrop printing of hydrogel bioinks into 3D tissue-like geometries[J]. *Advanced Materials*, 2012, 24(3): 391-396.
- [36] XU CX, CHAI WX, HUANG Y, MARKWALD RR. Scaffold-free inkjet printing of three-dimensional zigzag cellular tubes[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(12): 3152-3160.
- [37] PATI F, JANG J, HA DH, KIM SW, RHIE JW, SHIM JH, KIM DH, CHO DW. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3935.
- [38] CENTOLA M, RAINER A, SPADACCIO C, de PORCELLINIS S, GENOVESE JA, TROMBETTA M. Combining electrospinning and fused deposition modeling for the fabrication of a hybrid vascular graft[J]. *Biofabrication*, 2010, 2(1): 014102.
- [39] LEE SJ, NOWICKI M, HARRIS B, ZHANG LG. Fabrication of a highly aligned neural scaffold *via* a table top stereolithography 3D printing and electrospinning[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2017, 23(11/12): 491-502.
- [40] MILLER JS, STEVENS KR, YANG MT, BAKER BM, NGUYEN DH T, COHEN DM, TORO E, CHEN AA, GALIE PA, YU X, CHATURVEDI R, BHATIA SN, CHEN CS. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues[J]. *Nature Materials*, 2012, 11: 768-774.
- [41] RABIONET M, POLONIO E, GUERRA AJ, MARTIN J, PUIG T, CIURANA J. Design of a scaffold parameter selection system with additive manufacturing for a biomedical cell culture[J]. *Materials*, 2018, 11(8): 1427.
- [42] GOLD KA, SAHA B, RAJEEVA PANDIAN NK, WALTHER BK, PALMA JA, JO J, COOKE JP, JAIN A, GAHARWAR AK. 3D bioprinted multicellular vascular models[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10(21): e2101141.
- [43] LI LY, QIN S, PENG J, CHEN A, NIE Y, LIU TQ, SONG KD. Engineering gelatin-based alginate/carbon nanotubes blend bioink for direct 3D printing of vessel constructs[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 262-271.
- [44] KABIRIAN F, BAATSEN P, SMET M, SHAVANDI A, MELA P, HEYING R. Carbon nanotubes as a nitric oxide nano-reservoir improved the controlled release profile in 3D printed biodegradable vascular grafts[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 4662.
- [45] WU XF, CHEN K, CHAI Q, LIU SY, FENG CN, XU LM, ZHANG DK. Freestanding vascular scaffolds engineered by direct 3D printing with Gt-Alg-MMT bioinks[J]. *Biomaterials Advances*, 2022, 133: 112658.
- [46] MILLIK SC, DOSTIE AM, KARIS DG, SMITH PT, McKENNA M, CHAN N, CURTIS CD, NANCE E, THEBERGE AB, NELSON A. 3D printed coaxial nozzles for the extrusion of hydrogel tubes toward modeling vascular endothelium[J]. *Biofabrication*, 2019, 11(4): 045009.
- [47] LIANG QF, GAO F, ZENG ZW, YANG JR, WU MM, GAO CJ, CHENG DL, PAN HB, LIU WG, RUAN CS. Coaxial scale-up printing of diameter-tunable biohybrid hydrogel microtubes with high strength, perfusability, and endothelialization[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(43): 2001485.
- [48] SKARDAL A, ZHANG JX, PRESTWICH GD. Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracylates[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(24): 6173-6181.
- [49] JIA WT, GUNGOR-OZKERIM PS, ZHANG YS, YUE K, ZHU K, LIU WJ, PI Q, BYAMBAA B, DOKMECI MR, SHIN SR, KHADEMHOSEINI A. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink[J]. *Biomaterials*, 2016, 106: 58-68.
- [50] LEE VK, KIM DY, NGO H, LEE Y, SEO L, YOO SS, VINCENT PA, DAI GH. Creating perfused functional vascular channels using 3D bio-printing technology[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(28): 8092-8102.

(本文责编 陈宏宇)