

· 综述 ·

3D 打印技术制备生物医用高分子材料的研究进展*

贺超良 汤朝晖 田华雨 陈学思**

(中国科学院长春应用化学研究所 中科院生态环境高分子材料重点实验室 长春 130022)

摘要 3D 打印技术能够根据不同患者需要,快速精确制备适合不同患者的个性化生物医用高分子材料,并能同时对材料的微观结构进行精确控制.因此,这种新兴的医用高分子材料制备技术在未来生物医学应用(尤其是组织工程应用)中具有独特的优势.近年来,对于3D打印技术制备生物医用高分子材料的研究开发受到了越来越多的关注.不同的生物相容高分子原料被应用于3D打印技术,而这些3D成型高分子材料被用于体外细胞培养,或动物模型的软组织或硬组织修复中.本文主要介绍了近年来3D打印技术在生物医用高分子材料制备中的研究进展,并对该领域的未来应用和挑战进行了展望.

关键词 3D 打印技术, 个性化, 医用高分子, 组织工程

3D 打印技术(又称3D快速成型技术或增材制造技术)是20世纪80年代后期开始逐渐兴起的一项新兴制造技术,它是指在计算机控制下,根据物体的计算机辅助设计(CAD)模型或计算机断层扫描(CT)等数据,通过材料的精确3D堆积,快速制造任意复杂形状3D物体的新型数字化成型技术^[1-3].3D打印技术的基本制造过程是按照“分层制造、逐层叠加”的原理.例如,可以根据

CT等成像数据,经计算机3D建模转换后,再以STL格式文件输入到计算机系统中,并分层成二维切片数据,通过计算机控制的3D打印系统进行逐层打印,叠加后最终获得三维产品.目前应用较多的3D打印技术主要包括光固化立体印刷(SLA)、熔融沉积成型(FDM)、选择性激光烧结(SLS)和三维喷印(3DP)等(图1)^[3].

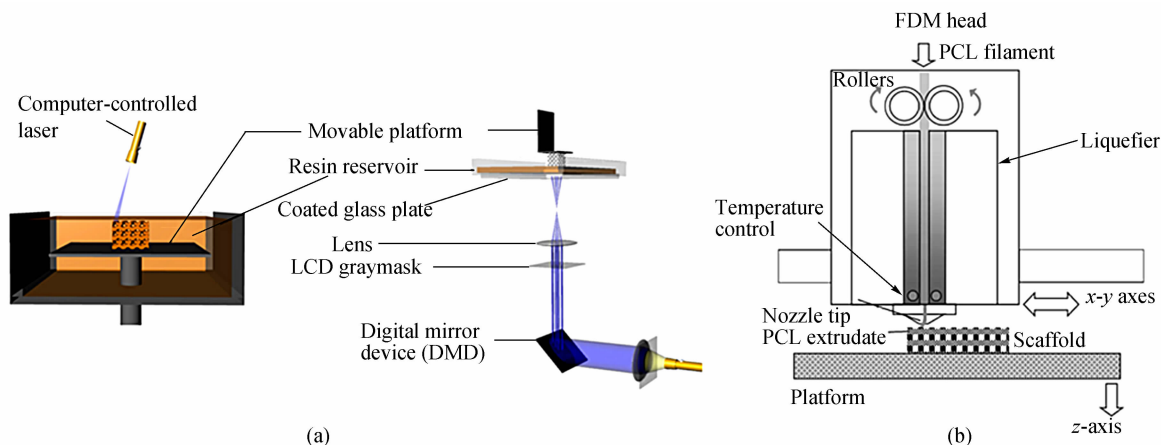


Fig. 1 Schematic illustrations of typical 3D printing technologies: (a) stereolithography (Reprinted from Ref. [4]; Copyright (2010), with permission from Elsevier) and (b) fused deposition modeling (Reprinted from Ref. [5]; Copyright (2002), with permission from Elsevier)

* 庆祝王佛松院士 80 华诞专稿;2012-12-27 收稿,2013-01-21 修稿;国家自然科学基金(基金号 51003103,21174142,51173184,21074129,51021003,51233004)和科技部国际合作与交流专项(项目号 2011DFR51090)资助项目.

** 通讯联系人,E-mail:xschen@ciac.jl.cn

3D 打印技术的应用领域也在随着技术的进步而不断扩展,包括生活用品、机械设备、生物医用材料,甚至是活体器官^[6]. 在生物医学领域,目前 3D 打印技术在国际上已开始被应用于器官模型的制造与手术分析策划、个性化组织工程支架材料和假体植入物的制造、以及细胞或组织打印等方面^[6-8]. 例如,在骨科、口腔颌面外科等外科疾病中通常需要植入假体代替损坏、切除的组织,以恢复相应的功能以及外观,然而,目前临床所使用的替代材料都是按照固定模式制造,难以与患者的缺损部位完美匹配,无法获得十分满意的效果. 而利用 3D 打印技术则可以根据不同患者的 CT、磁共振成像 (MRI) 等成像数据,快速制造个性化的组织工程支架材料,甚至可以携带细胞对组织缺损部位进行原位细胞打印,该技术不仅能实现材料与患者病变部位的完美匹配,而且能在微观结构上调控材料的结构,以及细胞的排列,更有利于促进细胞的生长与分化,获得理想的组织修复效果. 因此,在近年来,3D 打印技术被越来越多的应用于生物医用材料的制备. 另外,生物相容与生物可降解高分子在生物医学应用,尤其是组织工程应用中具有独特的优势,因此,3D 打印技术应用于制备生物医用高分子材料的研究在近年来取得了显著的进展. 本综述着重总结了近年来利用不同的 3D 打印技术在制备生物医用高分子材料,包括生物可降解组织工程支架材料、水凝胶,以及携带细胞的生物打印系统方面的研究进展.

1 光固化立体印刷

1.1 生物可降解组织工程支架

光固化立体印刷技术 (SLA) 使用的原料为液态光敏树脂,也可在其中加入其他材料形成复合材料. 它是采用计算机控制下的紫外激光束以计算机模型的各分层截面为路径逐点扫描,使被扫描区内的树脂薄层产生光聚合或光交联反应后固化,当一层固化完成后,在垂直方向移动工作台,使先前固化的树脂表面覆盖一层新的液态树脂,逐层扫描、固化,最终获得三维原型 (图 1(a)). SLA 技术具有高精度、性能稳定、产品力学强度高优点,其缺点是成型产品需要清洗除去杂质,可能造成产品变形. SLA 技术是目前技术最成熟和应用最广的 3D 打印技术.

目前常用于 SLA 技术制备生物可降解支架材料的高分子原料包括光敏分子修饰的聚富马酸二羟丙酯 (PPF)、聚 (D, L-丙交酯) (PLA)、聚 (ϵ -己内酯) (PCL)、聚碳酸酯,以及蛋白质、多糖等天然高分子. 为了降低液态树脂原料的黏度,还需要加入小分子的溶剂或稀释剂,常用的如可参与光聚合反应的富马酸二乙酯 (DEF) 和 *N*-乙烯基吡咯烷酮 (NVP),以及不参与聚合反应的乳酸乙酯^[9,10]. 该技术获得的 3D 成型材料具有可调控的孔尺寸、孔隙率、贯通性和孔分布^[11]. 韩国浦项科技大学 Cho 等以 PPF 为原料,通过利用 SLA 技术制备的多孔支架具有与人松质骨相似的力学性质,并发现支架能促进成纤维细胞的黏附与分

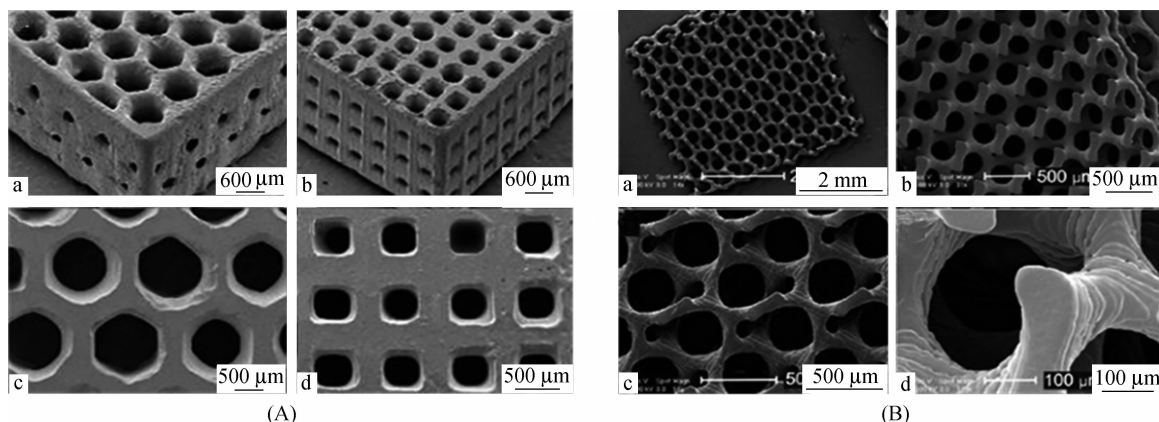


Fig. 2 (A) SEM images of PPF scaffolds with (a, c) hexagon and (b, d) square pores fabricated by SLA (Reprinted with permission from Ref. [11]; Copyright (2007) American Chemical Society) and (B) SEM images of porous (PLA-FA)₃ gyroid structures built by SLA (Reprinted with permission from Ref. [13]; Copyright (2009) American Chemical Society)

化^[12]. 通过将 PPF 支架移植到兔皮下或颅骨缺损部位的实验表明, PPF 支架会在动物体内引起温和的软组织和硬组织响应^[12]. 移植 2 周后会出现炎性细胞、血管生成和结缔组织形成, 然而, 到第 8 周, 炎性细胞密度降低并形成更规则的结缔组织.

脂肪族聚酯(如聚(D, L-丙交酯)(PLA)和聚(ϵ -己内酯)(PCL))由于具有良好的生物相容性和可调节的生物降解性能, 因此目前被广泛应用于生物医用领域. 以脂肪族聚酯为原料的 3D 打印成型技术也受到了越来越多的关注. 荷兰屯特大学 Grijpma 等以富马酸封端的 3 臂聚(D, L-丙交酯)((PLA-FA)₃)为原料, N-乙基基吡咯烷酮(NVP)为稀释剂和共聚单体, 通过立体印刷技术制备了具有规整螺旋孔结构的可降解组织工程支架(图 2(B))^[13]. 支架材料的亲水性可以根据 NVP 共聚单体的含量调节. 支架材料的杨氏模量则受到材料的含水量的影响. 经水中浸泡后的支架, 杨氏模量随着 NVP 含量的增加而降低, 而干燥状态下的材料的杨氏模量则随着 NVP 含量的增加而升高. 研究发现该支架材料能促进鼠前成骨细胞的黏附与增殖. 另外, 同一课题组还以甲基丙烯酸酯封端的线性或多臂 PLA 为原料, 以乳酸乙酯为非反应稀释剂, 制备了可降解的多孔支架^[10]. 支架材料的力学性质受到原料分子量的影响, 如以较高分子量的线性 PLA 为原料的产品具有较高的力学强度, 而多臂 PLA 原料臂长只有高于 600 g/mol 时才具有较好的力学性质. 聚(ϵ -己内酯)(PCL)由于具有较低的熔点, 因此以双键修饰的 PCL 为原料, 可以不需要添加溶剂, 这样能避免支架材料中残留溶剂^[14]. 研究发现, 获得的支架与 CAD 模型能精确匹配, 没有发生明显的收缩. 材料的平均孔径和孔隙率分别为 465 μm 和 70.5%. 以双键修饰的脂肪族聚酯, 如 PLA 或聚(D, L-乳酸- ϵ -己内酯)(PLACL)为原料, 根据模型设计, 可制成具有不同内部孔结构的生物可降

解支架材料, 如立方形、菱形、螺旋形等孔结构^[15]. 获得 3D 成型产品的整体结构对应于 CAD 模型的精确度达到 95%.

聚碳酸酯也是一类应用广泛的生物降解高分子材料. 因此, 聚碳酸酯也被用于立体印刷的树脂原料. 日本九州大学的 Matsuda 等以丙烯酸酯修饰的聚(三亚甲基碳酸酯)(PTMC)为原料, 通过微立体印刷技术, 制备了三维微柱、微条、微锥和多微通道结构^[16]. 在材料中引入聚乙二醇(PEG)组分会降低材料的细胞黏附性. 通过在老鼠皮下的移植实验, 发现 PEG 的含量与分子量会对材料的溶胀率、降解速率, 以及药物负载和释放能力产生明显的影响. 此外, 支架的几何形态(如孔径)对于材料的细胞黏附性产生明显的影响^[17-19].

支架材料的物理参数(如力学硬度、孔径、通道几何形状等)能对细胞的信号表达和分化产生显著影响. 研究发现, 对于具有螺旋孔结构的支架, 具有较大孔径的材料能获得较高的细胞密度^[20]. 具有高渗透性、多孔通道和力学硬度的支架能明显促进成骨细胞的信号表达^[21]. 此外, 3D 成型支架材料的生物相容性和细胞/组织响应性可以通过引入生物活性分子来调节. 通过使用生物活性短肽(如 RGD、生物素等)对材料进行表面修饰, 可以调节材料与细胞的相互作用, 能促进细胞在材料表面的黏附、增值与分化^[22-24]. 另外, 考虑到(甲基)丙烯酸酯的残留可能会造成对皮肤的刺激及其他毒性, 具有较低细胞毒性的乙烯酯也被用于立体印刷的原料单体^[25]. 乙烯酯具有与(甲基)丙烯酸酯相当的转化率和产品压痕模量. 通过细胞实验对比, 乙烯酯具有比(甲基)丙烯酸酯更低的细胞毒性. 将材料移植入成年新西兰白兔的股骨远端缺损部位后, 组织学分析显示材料具有良好的动物体内相容性.

由于羟基磷灰石(HA)具有优良的骨诱导性能, 因此 HA 与光敏高分子一起作为原料, 可用于制备具有生物活性的骨组织工程支架材料. 韩国

Table 1 Examples of scaffolds fabricated by 3D printing

Material	3D printing technology	Application	Ref.
OCM-2/HA	SLA	Mandibular scaffold	[28]
Hyaluronic acid derivative	SLA	Auricle scaffold	[39]
PECT/PBT	3D fiber deposition	Femoral and tibial scaffolds	[50]
PCL	SLS	Mandibular condyle scaffold	[57]
PLGA(95/5)/HA	SLS	Model of a human fourth middle phalanx	[64]
Ca-P	SLS	Proximal femoral condyle scaffold	[65]

浦项科技大学 Cho 等使用 PPF/HA 为原料,制备了 3D 复合支架材料^[26]. 获得的支架材料的孔和骨架结构均一,且孔间相互贯通,使用 HA 粉末能有效地产生纳米/微米尺度形态. 加入 HA 能进一步促进胚胎成骨细胞前体细胞在支架上的黏附和增殖. 日本东京医科大学的 Matsuo 等以聚(L-乳酸/HA)(PLLA/HA)为原料,制备了可吸收多孔托架,辅助牙齿移植材料一起,用于下颌骨肿瘤切除后的下颌骨重建,获得了比金属钛支架更好的修复效果^[27]. 另外,以碳酸酯寡聚体-双甲基丙烯酸酯(OCM-2)/HA 为原料,利用立体印刷技术制成的复合材料能促进骨形成,以及材料与骨的结合^[28,29]. 尤其是,材料经过超临界 CO₂ 处理后,增加了材料与骨组织的接触面积,显著提高了材料的生物相容性.

1.2 生物可降解水凝胶

水凝胶是一种具有高水含量的亲水性或双亲性聚合物三维网络^[30,31]. 由于水凝胶具有良好的生物相容性,以及与人体软组织相似的力学性质,因此被广泛应用于组织工程支架材料与药物的可控释放中. 目前,传统的水凝胶制备方法主要是通过高分子链间的化学反应或物理相互作用,难以实现对水凝胶外部和内部结构的精确调控. 而 3D 打印技术则能实现对材料外部形态和内部微结构的精确调控,有利于调控细胞的分布,以及材料与

生物体的匹配,因此具有独特的优势. 适用于立体印刷技术制备水凝胶的常用原料包括(甲基)丙烯酸酯封端的 PEG,并可通过引入细胞黏附肽 RGD、肝素等生物分子,实现在微观结构上调控细胞的黏附或生长因子的释放^[32]. 材料的性质受到紫外光照时间和原料浓度的影响^[33]. 美国德克萨斯大学埃尔帕索分校的 Arcaute 等以 PEG 双丙烯酸酯(PEG-DA)为原料,利用立体印刷技术制备了具有多内腔结构的水凝胶神经导管支架^[34]. 该支架材料经冻干/溶胀后,能较好的维持材料的初始形态,适合于体内移植. 具有较高 PEG 含量的水凝胶具有较好的抗缝合线拔出强度,而具有多内腔的导管比只含有单内腔的导管表现出更高的抗压强度,与市售的神经导管的抗压能力相当. 美国康奈尔大学的 Butcher 等以 PEG-DA/藻酸盐复合原料制备了主动脉瓣水凝胶支架(图 3(a))^[35]. 该水凝胶的弹性模量可在 5.3 ~ 74.6 kPa 范围内变化. 制备较大的瓣膜可获得更高的精确度. 种植于水凝胶支架上的猪主动脉瓣间质细胞在培养 21 天后具有接近 100% 的存活率. 另外,通过立体印刷技术,以甲基丙烯酸修饰的 PLA-PEG-PLA 三嵌段共聚物为原料,可以制备出多孔或非多孔水凝胶,材料具有较窄的孔径分布、良好的贯通性和力学性质^[36]. 所得的水凝胶能促进人间充质干细胞的黏附和生长.

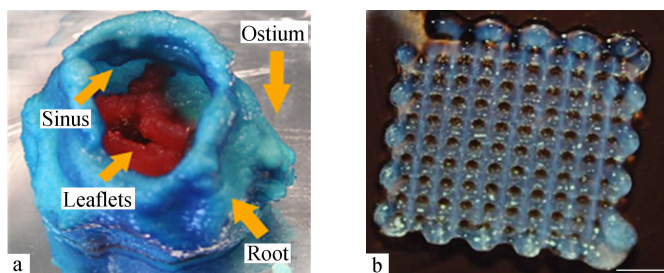


Fig. 3 (a) Printed heterogeneous valve, where root was formed with 700 MW PEG-DA hydrogel while the leaflets were formed with 700/8000 MW PEG-DA hydrogels. Key features such as the coronary ostium and sinuses were presented (Reproduced with permission from Ref. [35]; Copyright 2012 IOP Publishing). (b) Photograph of 3D printed hyaluronic acid/dextran hydrogel (Scale bar indicates 25 mm; Reprinted with permission from Ref. [37]; Copyright (2011) American Chemical Society)

天然高分子也可作为立体印刷技术的原料制备水凝胶. 例如,以甲基丙烯酸酯修饰的明胶为原料,制备了微结构可控的水凝胶^[38]. 水凝胶的力学性质可以通过改变原料结构和高分子浓度来调节. 材料孔结构的贯通性能促进人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的均一分布和分化,并能维持细胞的

表型和生物功能(图 4). 另外,以苜蓿酯修饰的透明质酸衍生物或甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)修饰的葡聚糖/透明质酸(Dex-HEMA/HAc)为原料制备的 3D 水凝胶,具有良好的细胞相容性^[37,39]. 通过以苜蓿酯修饰的透明质酸衍生物为原料,成功制备了耳廓支架^[39].

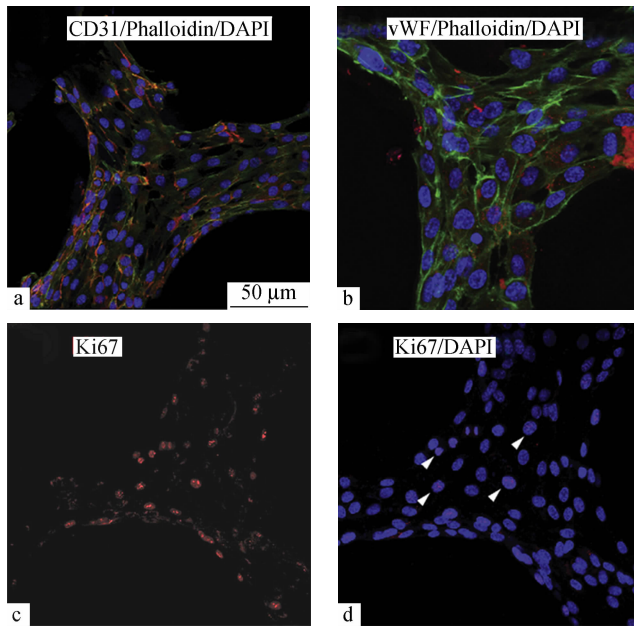


Fig. 4 Immunofluorescence images showing the biological functionality of the HUVEC seeded scaffolds

The presence of endothelial cell specific markers CD31 (a) and vonWillebrand factor (vWF; b) showed that the confluent endothelial cells retained their phenotype during the culture period. Moreover, Ki67 labeling (c) showed HUVEC adhered on the scaffolds and expressing this marker (arrows, d), indicating a proliferative state after 4 days in culture (Reprinted from Ref. [38]; Copyright (2012), with permission from Elsevier)

2 熔融沉积成型

熔融沉积成型 (FDM) 是采用热熔喷头, 使得熔融状态的材料按计算机控制的路径挤出、沉积, 并凝固成型, 经过逐层沉积、凝固, 最后除去支撑材料, 得到所需的三维产品 (图 1(b)). FDM 技术所使用的原料通常为热缩性高分子, 包括 ABS、聚酰胺、聚酯、聚碳酸酯、聚乙烯、聚丙烯等. 该技术特点是成型产品精度高、表面质量好、成型机结构简单、无环境污染等, 但是其缺点是操作温度较高. 近年来, 利用 FDM 技术制备生物医用高分子材料也受到越来越多的重视, 尤其是以脂肪族聚酯为原料制备生物可降解支架材料, 取得了相当大的进展. 材料的性质受到压力梯度、熔体流速、温度梯度等影响^[40]. 新加坡南洋理工大学的 Hutmater 等使用 PCL 为原料, 通过 FDM 技术制备了蜂窝状、内部完全贯通的可降解 3D 组织工程支架^[5,41]. 材料的通道尺寸为 160 ~ 700 μm , 孔隙率为 48% ~ 77%. 材料的压缩硬度可从 4 ~ 77 MPa 范围内变化, 而屈服强度为 0.4 ~ 3.6 MPa, 屈服应变为 4% ~ 28%. 材料的孔隙率与压缩性质具有高度的相关性. 人初级成纤维细胞与材料共培养后, 3 ~ 4 周后发现细胞完全充满支架的空

隙. 当将表面含有骨髓间充质细胞的 3D 支架移植到猪眼眶的创口后, 获得比没有支架材料或没有种植细胞的支架更好的新骨形成效果^[42]. 南洋理工大学的 Teoh 等以 PCL 为原料, 利用 FDM 技术制备了骨软骨复合支架, 并将成骨细胞与软骨细胞分别种植于支架的两部分^[43]. 2 种细胞在支架中分泌出不同的细胞外基质, 在成骨细胞种植区出现了较高的骨钙, 而软骨细胞种植区测得了较高的碱性磷酸酶. 该结果表明, 这种 3D 打印的 PCL 支架可望应用于骨软骨修复方面.

荷兰乌特勒支药理学研究所 Hennink 等使用苄基保护的羟甲基乙交酯 (BMG) 与己内酯 (ϵ -CL) 共聚, 然后再进行苄基脱保护, 获得了羟甲基乙交酯 (HMG) 与 ϵ -CL 的共聚物 (PHMGCL), 并通过纤维熔体沉积技术制备了 3D 支架 (图 5)^[44,45]. 侧链羟基的引入增加了材料的亲水性和降解速率, 并增强了细胞对材料的黏附, 促进了人间充质干细胞的存活和增值, 以及成骨分化. PHMGCL (HMG: CL = 8: 92) 3D 支架经皮下移植到 Balb/c 鼠体内后, PHMGCL 支架在 3 个月内重量损失达到 60%, PHMGCL 的分子量也出现了明显的降低, 而 PCL 支架则没有出现明显的重量损失. 另外, 材料移植到鼠体内后引起了温和的炎症反应, 局部出现了巨噬

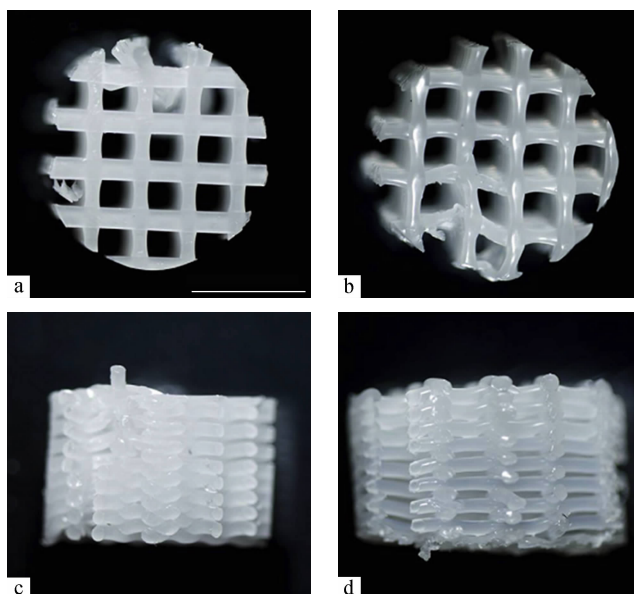


Fig. 5 Macroscopic images of 3D-printed scaffolds before implantation: top view of (a) PCL and (b) PHMGCL scaffolds and side view of (c) PCL and (d) PHMGCL scaffolds (Scale bar is 2.5 mm; Reprinted from Ref. [45]; Copyright (2012), with permission from Elsevier)

细胞、淋巴细胞和纤维化. 在动物皮下, PHMGCL 支架比 PCL 支架具有较高的血管生成效果.

韩国浦项科技大学的 Cho 等以 PCL/PLGA 为原料, 使用一种多头沉积技术, 制备了复合 3D 支架^[46]. 材料具有 600 μm 的孔径和 69.6% 的孔隙率, 压缩强度和模量分别为 0.8 和 12.9 MPa, 材料在细胞实验过程中能够维持初始结构. 另外, 多头沉积技术还能有效地在 3D 支架中填充入水凝胶, 而水凝胶可以作为生长因子或细胞的理想载体载入 3D 支架中^[47]. 经过贻贝黏附肽(尤其是结合 RGD 后)修饰的 PCL/PLGA 三维支架能提高人脂肪衍生干细胞的黏附、增值和成骨分化, 并促进动物体内颅骨缺损部位的骨再生^[48]. 另外, 聚(L-丙交酯- ϵ -己内酯)(PLLACL)无规共聚物也被用于 3D 纤维沉积技术制备生物降解支架^[49].

其他聚酯材料也被用于 FDM 技术制备可降解支架材料. 荷兰屯特大学的 Woodfield 等以生物可降解的聚乙二醇-对苯二甲酸酯/聚对苯二甲酸丁二醇酯(PEGT/PBT)嵌段共聚物为原料, 以 6 月大的新西兰白兔股骨远端和胫骨近端关节的三维 CT 成像数据为模型, 利用 3D 纤维沉积技术分别制备了兔股骨和胫骨修复支架, 并将从兔自身提取的软骨在支架上培养一段时间后, 移植到兔的关节缺损部位进行原位关节修复^[50]. 移植 6 周后, 支架分别与股骨和胫骨结合, 然而, 形成的纤维软骨状组织, 还没有达到移植软骨的效果.

聚酯与无机粒子的复合物也能用于熔融沉积成型制备 3D 支架材料. 在原料中加入 20% 的磷酸三钙(TCP)后, 能促进人间充质干细胞(hMSCs)的增殖与成骨分化^[51]. 当载有 hMSCs 细胞的 PCL-TCP 支架移植到裸鼠股骨缺损部位后, hMSCs 能在移植 3 周后保持存活, 然而, 只有 50% 的股骨缺损部位有新骨生成. 在 PCL-TCP 三维支架中载入 15% 的庆大霉素(PT15)后, 能有效地在 2 h 内消除细菌, 而且没有出现明显毒性^[52]. 当使用 PT15 来处理感染的鼠全层伤口时, 也能有效地消除创口的细菌. 另外, PT15 处理的实验组没有出现明显的整体感染, 能有效地促进伤口愈合. PLGA/TCP 复合 3D 支架移植到兔股骨缺损部位 12 周后, 表现了良好的骨诱导性能, 并且材料逐渐降解^[53]. 然而, 进一步在支架表面添加羟基磷灰石组分并没有对材料的降解与骨形成产生显著影响. 另外, 同时载有成骨细胞与人脐静脉内皮细胞的 PCL/PLGA/TCP 复合 3D 支架在移植到鼠颅骨缺损 12 周后, 同时载有两种细胞的 3D 支架比只载有一种细胞的支架具有更好的促新骨形成效果^[54].

3 选择性激光烧结

选择性激光烧结(SLS)是采用激光束按照计算机指定路径扫描, 使工作台上的粉末原料熔融、粘结固化. 当一层扫描完毕, 移动工作台, 使固化层表面铺上新的粉末原料, 经过逐层扫描粘结, 获

得三维材料. 与 SLA 技术通过紫外光逐层引发液态树脂原料发生聚合或交联反应不同, SLS 技术是通过激光产生高温使粉末原料表面熔融、相互粘结来形成三维材料. SLS 技术常用的原料包括塑料、陶瓷、金属粉末等. 其优点是加工速度快, 且无需使用支撑材料, 但缺点是成型产品表面较粗糙, 需后处理, 加工过程中会产生粉尘和有毒气体, 而且持续高温可能造成高分子材料的降解, 以及生物活性分子的变形或细胞的凋亡, 该技术不能用于制备水凝胶支架. 以生物可降解高分子为原料, 利用 SLS 技术, 也是制备外部形态和内部结构可控 3D 医用高分子材料的有效途径. 对支架性能产生影响的主要参数包括颗粒尺寸、激光能量、激光扫描速率、部分床层温度等^[55,56].

美国密歇根大学的 Das 等使用 PCL 为原料, 通过 SLS 技术制备了 3D 可降解多孔支架, 支架材料的压缩模量和屈服强度分别为 52 ~ 67 MPa 和 2.0 ~ 3.2 MPa, 该结果达到或接近了人松质骨力学性质范围^[57]. 获得的 3D 支架材料能与动物骨组织良好的结合, 具有良好的生物相容性. 按照猪的下颌髁突原型, 制备了 PCL 下颌髁突支架. 使用 NaCl 等致孔剂, 可获得具有高孔隙率的 3D 支架材料^[58]. 通过在原料中加入 80 wt% 的 NaCl, 可以获得孔隙率高达 90% 的 3D 支架材料, 并形成了约 1 mm 的内部通道结构. 经过实验后处理, 99.99% 的致孔剂可以被浸提出来. 降低激光源能量, 可获得具有较低压缩硬度的成型材料^[59]. 较低力学强度的支架材料可以用于某些软组织工程修复(如心脏组织工程等). 将 C2C12 成肌细胞与压缩硬度为 345 kPa 的 PCL 三维支架共同培养 21 天后, 发现细胞分布于支架的整个区域, 培养 11 天后, 观察到 C2C12 的融合和分化. SLS 技术制备的 PCL 三维支架也可以用于药物控制释放的载体^[60]. 以亚甲基蓝为模型药物, 与 PCL 制备成含有多层同心环结构的圆柱型药物控制释放器件, 聚合物和亚甲基蓝均一分布于基质中, 且初期突释行为可以通过增加同心环的数目而降低, 模型药物从该器件中主要以扩散机理释放. 另外, 由于 SLS 技术操作过程中会产生高温, 因此为了减少可降解高分子原料(如 PCL、PLA 等)在加工过程中发生降解, 或造成原料中的生物活性分子变性, 开发了一种表面 SLS 技术^[61]. 该技术可以控制烧结过程中只融化颗粒的表层原料.

通过制备聚酯与纳米羟基磷灰石(HA)的复

合微球, 或直接将聚酯粉末与 HA 粉末共混, 通过 SLS 技术烧结, 可以获得聚酯/HA 的 3D 复合材料^[62,63]. 南洋理工大学的 Wiria 等利用 SLS 技术, 将尺寸为 125 ~ 250 μm 的 PLGA(95/5) 和 HA 或 HA/TCP 混合粉末烧结, 制备了人第四中节指骨支架模型^[64]. 香港大学 Wang 等以聚(羟基丁酸酯-羟基戊酸酯)(PHBV)/磷酸钙(Ca-P)纳米复合微球为原料, 制备了人近端股骨髁 3D 多孔支架^[65]. 并通过对支架材料使用明胶/肝素进行表面修饰, 并载入重组人骨形成蛋白-2(rhBMP-2), 显著促进了细胞的碱性磷酸酶活性和成骨分化.

除了以生物可降解聚酯为原料, 也可以使用生物相容的非生物降解高分子为原料(例如聚醚醚酮(PEEK)、聚乙烯醇、高分子量聚乙烯、尼龙-6 等)^[66-68], 以及它们与 HA 的复合材料^[69-71], 通过 SLS 技术, 制备可以适合于临床使用的个性化假肢等骨修复或骨替代材料.

4 3D 喷印

3D 喷印(3DP)技术是在基底表面铺上薄层粉末原料, 然后通过计算机 CAD 模型控制喷头按照指定路径将液态粘结剂喷在粉末的设定区域, 该层粉末粘结后上下移动操作台, 并在粘结层表面铺上新的薄层粉末, 通过逐层粘结, 最后除去未粘结的粉末原料, 获得三维原型材料. 3DP 技术操作简便、产品具有高孔隙率、原料应用范围广, 其缺点是产品力学强度较低, 产品需进行后处理、只能使用粉末原料等. 美国 Therics 公司的 Sherwood 等通过 3DP 技术, 制备了上层组分为 PLGA/PLLA, 下层为 PLGA/TCP 的软骨-骨复合支架^[72]. 上层软骨支架区的孔隙率为 90%, 而下层成骨区孔隙率控制在 55%. 研究发现软骨细胞更倾向于黏附于支架的软骨支架区, 培养 6 周后可以看到软骨组织的形成. 支架的成骨区力学强度可以达到与人新生松质骨同一数量级. 该研究为完全关节重建技术提供了一种新的方案.

5 直接携带细胞打印的生物打印技术

直接通过 3D 打印技术控制细胞在微观尺度的排列分布, 对于调节细胞行为、细胞间的相互作用、细胞与材料间的相互作用, 以及促进细胞最终形成功能组织具有十分重要的意义. 另外, 相比于

在已成型的支架中种植细胞,直接携带细胞打印可以获得更高的细胞密度.因此,近年来通过直接携带细胞进行 3D 打印的细胞或组织打印技术受到了广泛的关注.由于水凝胶与天然软组织细胞外基质在结构、组成和力学性质上的相似性,目前的细胞和组织打印技术主要是基于携带细胞的水凝胶的 3D 沉积技术^[73].对于 3D 打印成型的携带细胞水凝胶支架的基本要求包括:(1)水凝胶在工作台沉积后能快速原位成型,并维持初始沉积的形状;(2)保持细胞活性和功能;(3)打印成型的支架容易进行后处理.

目前一种常用的细胞打印技术是以双键封端的 PEG(如 PEG-DA 或甲基丙烯酸酯封端的 PEG(PEG-DMA))水溶液与含有细胞的培养液混合,形成可光固化高分子/细胞混合溶液,然后通过立体印刷技术,打印成型包覆细胞的 3D 水凝胶^[74,75].为了提高水凝胶骨架与细胞间的相互作用,可以在原料中引入等生物活性分子修饰的共聚单体^[75,76].例如,引入 RGD 修饰的共聚单体后,可以明显促进水凝胶内细胞的存活和生长^[76].美国斯克里普斯研究所的 D' Lima 等以天然牛股骨髌制成体外软骨缺损模型,以 PEG-DMA/软骨细胞混合溶液为生物墨水,在紫外光照下,在软骨缺损部位进行原位打印^[77].该方法打印成型的 PEG 水凝胶的压缩模量与天然关节软骨接近.打印后软骨细胞能在水凝胶支架内均匀分布,而且细胞存活率要比生物墨水先沉积后再进行光照聚合的成型方法高 26%.值得注意的是,打印后支架能与周围的天然组织紧密结合,该性质对于未来体内组织缺损的原位修复非常重要.该方法为开发能直接应用于体内的原位生物打印技术,进行组织缺损原位修复提供了一个重要的手段.

除了通过上述光聚合反应,其他生物相容的原位凝胶成型技术也被用于 3D 细胞打印.例如,可以将藻酸盐与细胞的混合溶液打印成型后,再在 CaCl_2 溶液中浸泡,使得藻酸盐与 Ca^{2+} 形成稳定的离子交联网络^[78,79].研究发现,携带人心肌祖细胞(hCMPCs)的 3D 生物打印成型的支架,在体外培养 1 天和 7 天时,支架内的细胞存活率达 92% 和 89%,hCMPCs 能维持原有的功能,而且通过 3D 支架培养提高了早期心脏转录因子的表达.前期实验结果表明,该技术可望在心脏组织工程中获得应用.另外,利用凝血的原理,可将含有

细胞的凝血酶溶液作为生物墨水,喷入以纤维蛋白原溶液为生物纸的基质中,通过原位凝固形成包裹细胞的纤维蛋白支架^[80].而且,纤维蛋白本身具有促进血管生成的性质,也是骨骼/平滑肌细胞和软骨细胞的理想支架材料.实验证明,该技术打印成型的细胞支架能促进人微血管内皮细胞的增殖和微血管形成.此外,胶原也是一种应用广泛的组织工程支架材料.将含有细胞的胶原在较低 pH 下进行打印后,再在支架表面喷洒碳酸氢钠溶液使体系的 pH 升高至中性,促使胶原发生自身物理凝胶化,形成稳定的 3D 细胞支架.哈佛医学院的 Yoo 等利用该技术制备了分别含有内部纤维原细胞和外部角质细胞的双层细胞支架,发现两层细胞都维持了高的细胞活性^[81].这种多层细胞打印技术为将来直接进行更为复杂的组织打印技术奠定良好的基础.

6 结论

本文主要总结了近年来 3D 打印技术应用于生物医用高分子材料制备方面的研究进展,比较了不同 3D 打印技术各自的优势和局限性,并对 3D 成型高分子支架材料在细胞培养或动物模型的组织修复方面的应用进行了讨论.目前常用的几种 3D 打印技术都具有各自的优势和局限性.光固化立体印刷技术制备的 3D 材料精度高、力学强度较高,但在后处理除去有机溶剂等杂质过程中需要避免成型产品发生变形.熔融沉积成型技术制备的成型产品精度高、表面质量好,但是需要高温将原料熔融.选择性激光烧结技术的优势则是加工速度快、无需使用支撑材料,其缺点是高加工温度、成型产品表面粗糙等.另外,3D 喷印技术操作简单、快速成型、制备条件温和,然而,其成型产品的力学强度较低.因此,在选择不同方法制备三维高分子支架材料时,还需结合原料的特点以及对成型产品的性能要求.

目前,3D 打印技术在硬组织工程支架材料的制备方面获得了较多的关注和研究进展.然而,总的来说,3D 打印技术在生物医用高分子材料的制备领域仍处于初始阶段.要实现 3D 打印技术在临床的应用还面临很多挑战.首先对于高分子原料的选择是影响 3D 成型材料应用的重要因素,其中主要包括高分子的生物相容性、生物响应性、降解性能、力学性质等.此外,在 3D 打印及后处理过程中需要保持成型材料的生物相容性,以及

表面或内部细胞的存活率。最后,需要阐明细胞在 3D 支架材料内部的黏附、生长和分化的机制,尤其是材料与细胞相互作用的机制。

REFERENCES

- 1 Leong K F, Cheah C M, Chua C K. *Biomaterials*, 2003, 24: 2363 ~ 2378
- 2 Yeong W Y, Chua C K, Leong K F. *Changfrasekaran, Trends in Biotechnology*, 2004, 22: 643 ~ 652
- 3 Seol Y J, Jang, T Y, Cho D W. *Soft Matter*, 2012, 8: 1730 ~ 1735
- 4 Melchels F P W, Feijen J, Grijpma D W. *Biomaterials*, 2010, 31: 6121 ~ 6130
- 5 Zein I, Hutmacher D W, Tan K C, Teoh S H. *Biomaterials*, 2002, 23: 1169 ~ 1185
- 6 Derby B. *Science*, 2012, 338: 921 ~ 926
- 7 Minns R J, Bibb R, Banks R, Sutton R A. *Medical Engineering & Physics*, 2003, 25: 523 ~ 526
- 8 Mahaisavariya B, Sithseripratip K, Oris, Tongdee T. *Injury Extra* 2006, 37: 176 ~ 180
- 9 Cooke M N, Fisher J P, Dean D, Rinnac C, Mikos A G. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2002, 64B: 65 ~ 69
- 10 Melchels F P W, Feijen J, Grijpma D W. *Biomaterials*, 2009, 30: 3801 ~ 3809
- 11 Lee K W, Wang S, Fox B C, Ritman E L, Yaszemski M J, Lu L. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 1077 ~ 1084
- 12 Shin JH, Lee JW, Jung JH, Cho DW, Lim G. *J Mater Sci*, 2011, 46: 5282 ~ 5287
- 13 Jansen J, Melchel F P W, Grijpma D W, Feijen J. *Biomacromolecules*, 2009, 10: 214 ~ 220
- 14 Elomaa L, Teixeira S, Hakala R, Korhonen H, Grijpma D W, Seppala J U. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7: 3850 ~ 3856
- 15 Melchels F P W, Bertoldi K, Gabbriellini R, Velders A H, Feijen J, Grijpma D W. *Biomaterials*, 2010, 31: 6909 ~ 6916
- 16 Kwon I K, Matsuda T. *Biomaterials*, 2005, 26: 1675 ~ 1684
- 17 Lee S J, Kang H W, Park J K, Rhie J W, Hahn S K, Cho D W. *Biomed Microdevices*, 2008, 10: 233 ~ 241
- 18 Mizutani M, Arnold S C, Matsuda T. *Biomacromolecules*, 2002, 3: 668 ~ 675
- 19 Matsuda T, Mizutani M. *J Biomed Mater Res*, 2002, 62: 395 ~ 403
- 20 Melchels F P W, Tonnarelli B, Olivares A L, Martin I, Lacroix D, Feijen J, Wendt D J, Grijpma D W. *Biomaterials*, 2011, 32: 2878 ~ 2884
- 21 Kim K, Dean J, Breithaupt R, Mikos A G, Fisher J P. *Biomaterials*, 2011, 32: 3750 ~ 3763
- 22 Lan P X, Lee J W, Seol Y J, Cho D W. *J Mater Sci Mater Med*, 2009, 20: 271 ~ 279
- 23 Northen T R, Brune D C, Woodbury N W. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 750 ~ 754
- 24 Farsari M, Filippidis G, Drakakis T S, Sambani K, Geogiou S, Papadakis G, Gizeli E, Fotakis C. *App Surf Sci*, 2007, 253: 8115 ~ 8118
- 25 Heller C, Schwentenwein M, Russmueller G, Varga F, Stampfl J, Liska R. *J Polym Sci Part A; Polym Chem*, 2009, 47: 6941 ~ 6954
- 26 Lee J W, Ahn G S, Kim D S, Cho D W. *Microelectronic Engineering*, 2009, 86: 1465 ~ 1467
- 27 Matsuo A, Chiba H, Takahashi H, Toyoda J, Abukawa H. *Odontology*, 2010, 98: 85 ~ 88
- 28 Popov V K, Evseev A V, Ivanov A L, Roginski V V, Volozhin A I, Howdle S M. *J Mater Sci Mater Med*, 2004, 15: 123 ~ 128
- 29 Barry J J A, Evseev A V, Markov M A, Upton C E, Scotchford C A, Popov V K, Howdle S M. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4: 1603 ~ 1610
- 30 Hoffman A S. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 43: 3 ~ 12
- 31 He C, Kim S W, Lee D S. *Journal of Controlled Release*, 2008, 127: 189 ~ 207
- 32 Mapili G, Lu Y, Chen S, Roy K. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 2005, 75B: 414 ~ 424
- 33 Hahn M S, Taite L J, Moon J J, Rowland M C, Ruffino K A, West J L. *Biomaterials*, 2006, 27: 2519 ~ 2524
- 34 Arcaute K, Mann B K, Wicker R B. *Tissue Engineering, Part C*, 2011, 17: 27 ~ 38
- 35 Hockaday L A, Colangelo N W, Cheung P Y C, Duan B, Malone E, Giradi L N, Bonassar L J, Lipson H, Chu C C, Butcher J T. *Biofabrication*, 2012, 4: 035005
- 36 Seck T M, Melchels F P W, Feijen J, Grijpma D W. *J Controlled Release*, 2010, 148: 34 ~ 41
- 37 Pescosolido L, Schuurman W, Malda J, Matricardi P, Alhaique F, Coviello T, van Weeren P R, Dhert W. J A, Hennink W E, Vermonden T. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 1831 ~ 1838
- 38 Gauvin R, Chen Y C, Lee J W, Soman P, Zorlutuna P, Nichol J W, Bae H, Chen S, Khademhosseini A. *Biomaterials*, 2012, 33: 3824 ~ 3838
- 39 Naumann A, Aigner J, Staudenmaier R, Seemann M, Bruening R, Englmeier K H, Kadegge G, Pavesio A, Kastenbauer E, Berghaus A. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2003, 260: 568 ~ 575
- 40 Ramanath H S, Chua C K, Leong K F, Shah K D. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19: 2541 ~ 2550
- 41 Hutmacher D E, Schantz T, Zein I, Ng K W, Teoh S H, Tan K C. *J Biomed Mater Res*, 2001, 55: 203 ~ 216
- 42 Rohner D, Hutmacher D W, Cheng T K, Oberholzer M, Hammer B. *J Biomed Mater Res Part B, Appl Biomater*, 2003, 66B: 574 ~ 580
- 43 Cao T, Ho K H, Teoh S H. *Tissue Engineering*, 2003, 9: S-103 ~ S-112

- 44 Seyednejad H, Gawlitta D, Dhert W J A, van Nostrum C F, Vermonden T, Hennink W E. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7:1999 ~ 2006
- 45 Seyednejad H, Gawlitta D, Kuiper R V, de Bruin A, van Nostrum C F, Vermonden T, Dhert W J A, Hennink W E. *Biomaterials*, 2012, 33:4309 ~ 4318
- 46 Kim J Y, Cho D W. *Microelectron Eng*, 2009, 86:1447 ~ 1450
- 47 Shim J H, Kim J Y, Park M, Park J, Cho D W. *Biofabrication*, 2011, 3:034102
- 48 Hong M J, Kim B J, Shim J H, Kang K S, Kim K J, Rhie J W, Cha H J, Cho D W. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8:2578 ~ 2586
- 49 Sun Y, Finne-Wistrand A, Albertsson A C, Xing Z, Mustafa K, Hendrikson W J, Gijpma D W, Moroni L. *J Biomed Mater Res Part A*, 2012, 100A:2739 ~ 2749
- 50 Woodfield T B F, Guggenheim M, von Rechenberg B, Riesle J, van Blitterswijk C A, Wedler V. *Cell Proliferation*, 2009, 42:485 ~ 497
- 51 Rai B, Lin J L, Lim Z X H, Guldberg R E, Hutmacher D E, Cool S M. *Biomaterials*, 2010, 31:7960 ~ 7970
- 52 Teo E Y, Ong S Y, Chong M S K, Zhang Z, Lu J, Moochhala S, Ho B, Teoh S H. *Biomaterials*, 2011, 32:279 ~ 287
- 53 Kim J, McBride S, Tellis B, Alvarez-Urena P, Song Y H, Dean D D, Sylvia V L, Elgendy H, Ong J, Hollinger J O. *Biofabrication*, 2012, 4:025003
- 54 Kim J Y, Jin G Z, Park I S, Kim J N, Chun S Y, Park E K, Kim S Y, Yoo J, Kim S H, Rhie J W, Cho D W. *Tissue Engineering; Part A*, 2010, 16:2229 ~ 2236
- 55 Zhang Y, Han L, Savalani M M, Harris R A, Tanner K E. *J Biomed Mater Res*, 2008, 86A:607 ~ 616
- 56 Leong K F, Chua C K, Gui Verani W S. *Int J Adv Manuf Technol*, 2006, 31:483 ~ 489
- 57 Williams J M, Adewunmi A, Schek R M, Flanagan C L, Krebsbach P H, Feinberg S E, Hollister S J, Das S. *Biomaterials*, 2005, 26:4817 ~ 4827
- 58 Niino T, Hamajima D, Montagne K, Oizumi S, Naruke H, Huang H, Sakai Y, Kinoshita H, Fujii T. *Biofabrication*, 2011, 3:034104
- 59 Yeong W Y, Sudarmadji N, Yu H Y, Chua C K, Leong K F, Venkatraman S S, Boey Y C F, Tan L P. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6:2028 ~ 2034
- 60 Leong K F, Wiria F E, Chua C K, Li S H. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2007, 17:147 ~ 157
- 61 Antonov E N, Bagratashvili V N, Howdle S M, Konovalov A N, Popov V K, Panchenkov V Y. *Laser Physics*, 2006, 16:774 ~ 787
- 62 Zhou W Y, Lee S H, Wang M, Cheung W L, Ip W Y. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19:2535 ~ 2540
- 63 Wiria F E, Leong K F, Chua C K, Liu Y. *Acta Biomaterialia*, 2007, 3:1 ~ 12
- 64 Simpson R L, Wiria F E, Amis A A, Chua C K, Leong K F, Hansen U N, Chandrasekaran M, Lee M W. *J Biomed Mater Res Part B, Appl Biomater*, 2008, 84B:17 ~ 25
- 65 Duan B, Wang M. *J R Soc Interface*, 2010, 7:S615 ~ S629
- 66 Tan K H, Chua C K, Leong K F, Cheah C M, Gui W S, Wiria F E. *Bio-Med Mater Eng*, 2005, 15:113 ~ 124
- 67 Rimell J T, Marquis P M. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)*, 2000, 53:414 ~ 420
- 68 Das S, Hollister S J, Flanagan C, Adewunmi A, Bark K, Chen C, Ramaswamy K, Rose D, Widjaja E. *Mat Res Soc Sym Proc*, 2003, 758:LL5. 7. 1 ~ LL5. 7. 6
- 69 Tan K H, Chua C K, Leong K F, Cheah C M, Cheang P, Bakar M S A, Wiria F E. *Biomaterials*, 2003, 24:3115 ~ 3123
- 70 Zhang Y, Gao L, Savalani M M, Harris R A, Di Silvio L, Tanner K E. *J Biomed Mater Res*, 2009, 91A:1018 ~ 1027
- 71 Wiria F E, Chua C K, Leong K F, Quah Z Y, Chandrasekaran M, Lee M W. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19:989 ~ 996
- 72 Sherwood J K, Riley S L, Palazzplo R, Brown S C, Monkhouse D C, Coates M, Griffith L G, Landeen L K, Ratcliffe A. *Biomaterials*, 2002, 23:4739 ~ 4751
- 73 Fedorovich N E, Swennen I, Girones J, Moroni L, van Blitterswijk C A, Schacht E, Alblas J, Dhert W J A. *Biomacromolecules*, 2009, 10:1689 ~ 1696
- 74 Dhariwala B, Hunt E, Boland T. *Tissue Engineering*, 2004, 10:1316 ~ 1322
- 75 Arcaute K, Mann B K, Wicker R B. *Annals of Biomedical Engineering*, 2006, 34:1429 ~ 1441
- 76 Chan V, Zorlutuna P, Jeong J H, Kong H, Bashir R. *Lab on a chip*, 2010, 10:2062 ~ 2070
- 77 Cui X, Breitenkamp K, Finn M G, Lotz M, D' Lima D D. *Tissue Engineering; Part A*, 2012, 18:1304 ~ 1312
- 78 Gaetani R, Doevendans P A, Metz C H G, Alblas J, Messina E, Giacomello A, Sluijter J PG. *Biomaterials*, 2012, 31:1782 ~ 1790
- 79 Fedorovich N E, Schuurman W, Wijnberg H M, Prins H J, van Weeren P R, Malda J, Alblas J, Dhert W J A. *Tissue Engineering, Part C*, 2012, 18:33 ~ 44
- 80 Cui X, Boland T. *Biomaterials*, 2009, 30:6221 ~ 6227
- 81 Lee W, Debastitis J C, Lee V K, Lee J H, Fishcher K, Edminster K, Park J K, Yoo S S. *Biomaterials*, 2009, 30:1587 ~ 1595

PROGRESS IN THE DEVELOPMENT OF BIOMEDICAL POLYMER MATERIALS FABRICATED BY 3-DIMENSIONAL PRINTING TECHNOLOGY

Chao-liang He, Zhao-hui Tang, Hua-yu Tian, Xue-si Chen

(Key Laboratory of Polymer Ecomaterials, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

Abstract Custom-designed biomedical polymer materials can be fabricated rapidly and precisely by 3-dimensional (3D) printing technology according to the requirements of patients with various diseases. In addition, the microscopic structure of the materials can be controlled during the printing process. Therefore, this novel type of technology has unique advantages in the preparation of next generation of biomedical polymer scaffolds. In recent years, the development of biomedical polymer materials by using 3D printing technology has received increasing attention. Various biocompatible polymers have been used to construct 3D scaffolds *via* 3D printing, and the printed polymeric scaffolds have been tested for *in vitro* cell culture, soft tissues repair or hard tissue repair in animal models. This review emphasizes recent advances in the development of biomedical polymer materials made by 3D printing technology, and some future applications and challenges of the technology are discussed.

Keywords 3D printing technology, Custom-designed, Biomedical polymers, Tissue engineering