3D打印复合墨水体系在软骨组织工程领域研究进展

程德林^{1,2*}, 陈必秀¹, 吴明明¹, 芮昊³, 潘浩波^{1,2}, 阮长顺^{1,2*}

1. 中国科学院深圳先进技术研究院人体组织与器官退化性研究中心, 深圳 518055;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632

* E-mail: dl.cheng@siat.ac.cn; cs.ruan@siat.ac.cn

收稿日期: 2020-06-25; 接受日期: 2020-08-21; 网络版发表日期: 2021-04-30

国家重点研发计划(编号: 2018YFA0703100)、国家自然科学基金(批准号: 31900959)和深圳市知识创新计划(编号: JCYJ20190812162809131)资助项目

摘要 软骨是人体非常重要的结缔组织. 由于自愈合能力有限, 软骨损伤一直是临床治疗难点. 软骨组织工程的发展, 为解决软骨修复难题带来新的契机. 增材制造(3D打印)技术能够精准、快速、个性化地构建功能修复体, 在软骨组织工程领域具备极大的应用价值. 以生物材料为基础的打印墨水是3D打印软骨组织工程的核心. 当前复合墨水体系凭借综合性能优势成为3D打印软骨组织工程的关注重点. 本文首先从软骨修复需求出发, 介绍了3D打印软骨组织工程研究常用的生物材料的类型和特点, 论述了国内外利用复合墨水体系构建软骨支架和骨/软骨分层支架的研究现状. 之后着重论述了软骨生物打印采用的复合生物墨水体系的发展前沿, 包括各类不同成型机理和性能特点的复合生物墨水体系、多针头生物打印、同轴生物打印、多技术集成打印等. 最后阐述了软骨生物打印实现临床应用需要克服的挑战, 为今后生物墨水研发提供一定指引.

关键词 软骨, 3D打印, 复合, 生物打印, 生物墨水

1 引言

1.1 软骨与软骨损伤

软骨是人体非常重要的结缔组织, 主要由软骨细胞、II型胶原、蛋白多糖及水构成. 根据分布和功能的不同, 软骨可细分为弹性软骨、纤维软骨和透明软骨^[1,2]. 弹性软骨具备较大弹性, 主要分布在耳朵、喉咙等部位. 纤维软骨较坚韧, 主要分布于椎间盘、半月

板、韧带等部位. 透明软骨在胚胎时期起到临时骨架作用, 之后逐渐被骨取代. 成人透明软骨主要包括关节软骨、肋软骨等. 当前研究最多的关节软骨根据微观细胞形态和基质组成的差异, 由上至下可分为四个区域(图1): 表层、中间层、深层和钙化层^[3]. 软骨深层与钙化层之间存在一条潮线. 钙化层以下则是骨组织.

关节软骨作为人体重要的承重组织, 暴力挤压或

引用格式: 程德林, 陈必秀, 吴明明, 等. 3D打印复合墨水体系在软骨组织工程领域研究进展. 中国科学: 技术科学, 2021, 51: 981–997
Cheng D L, Chen B X, Wu M M, et al. Research progress of 3D printing composite inks for cartilage tissue engineering (in Chinese). Sci Sin Tech, 2021, 51: 981–997, doi: 10.1360/SST-2020-0259

图1 (网络版彩图)健康关节软骨分层结构示意图^[3]

Figure 1 (Color online) Zonal structure of normal articular cartilage^[3].

撕裂造成的急性损伤、长期高负荷运动积累的慢性损伤以及骨关节炎(osteoarthritis, OA)等均会导致其受损^[4]。据《2015年中国骨关节炎防治认知白皮书》报道,我国60岁以上老人中,有一半以上患有骨关节炎,年轻人运动不当导致的骨关节炎也越来越常见。基于我国人口基数以及老龄化趋势,每年因关节软骨损伤治疗需要花费大量人力和财力,已成为不可忽视的社会负担。

软骨由于缺乏血管和神经等组织,自我修复能力十分有限^[5]。通常3 mm以上关节软骨损伤即难以自我完整修复,损伤处容易形成纤维化软骨;6 mm以上关节软骨损伤则可能导致损伤蔓延至骨组织^[6]。不完整修复的关节软骨表面摩擦力增加,很可能导致骨关节炎发生,这也是软骨损伤患者骨关节炎高发的重要原因。目前关节软骨损伤的治疗方法主要包括药物治疗和手术治疗^[4]。药物治疗通常只能缓解患者疼痛症状,对损伤本身治疗效果有限,而且可能伴随副作用。手术治疗方法主要包括关节镜手术、软骨移植、软骨细胞移植等。自体软骨移植是软骨修复的“金标准”,但由于取材限制无法大规模使用。其他手术方法也只能部分修复软骨损伤,难以实现完整修复。

1.2 软骨修复3D打印墨水材料

组织工程涵盖材料学、细胞生物学、工程学等多学科领域,主要研究可以改善、修复或替代组织或器官生理功能的人造体^[7]。快速发展的组织工程技术有望作为传统治疗方法的重要补充,甚至取代传统治疗方法。软骨组织工程的发展,也为解决软骨修复难题带来曙光^[5,8]。软骨组织工程经典要素包括支架(主要由生物材料组成)、细胞和生长因子,其中支架占据关键位置。传统组织工程支架制备方法包括成孔剂法(或模板法)、相分离法、气体发泡法、冷冻干燥法等^[9]。随着临床需求和科学研究的不断发展,这些成型方法的局限性也愈发明显,包括难以灵活设计和精确调控支架的微观结构、难以制造与损伤部位高度契合的支架外形、难以构建非均匀特征的支架等。增材制造(3D打印)技术是一种计算机辅助成型技术,其优势在于能够精准、快速地实现支架宏观外形与微观结构的精确构建,并实现个性化的组织修复与再生^[10]。因此在软骨组织工程领域,3D打印技术的应用不断普及和深入。

在软骨修复领域,3D打印技术研究的重点是开发生物材料、细胞、功能因子等组成的打印墨水。除了传统的生物相容性、力学强度、降解性等要求外,3D打印墨水还应具备打印适配性(包括结构保真度、结构分辨率、细胞存活率等)^[11]。目前制备软骨修复3D打印墨水的生物材料主要包括天然生物材料和合成生物材料^[12~14]。天然生物材料包括海藻酸(alginate, Alg)、壳聚糖(chitosan, Chi)、胶原(collagen, Col)、明胶(gelatin, Gel)、透明质酸(hyaluronic acid, HA)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)、结冷胶(gellan gum, GG)等,多属于水凝胶类型,通常具备良好的生物相容性,但力学性能普遍较弱(压缩模量多数小于50 kPa)。其中II型胶原(collagen II, Col-II)、HA、CS等是软骨基质中重要成分,具有显著的促软骨修复潜力。软骨的脱细胞外基质(dECM)本质是一种复合型的天然材料,保留了软骨组织的组分特征,因此也经常用于3D打印软骨组织工程。合成生物材料包括聚乳酸(PLA)、聚乙丙交酯(PLGA)、聚己内酯(PCL)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙二醇(PEG)、普朗尼克(F127)等,具备较好的性能调控性和稳定性,其中PLA、PLGA、PCL等热塑性材料具备较好的力学性能(压缩模量MPa级)。此外一些热固性合成材料,如非降解聚氨酯、聚癸二酸甘油酯(PGS)

等也具备软骨修复潜力. 合成生物材料的生物相容性或生物活性通常不及天然生物材料. 从打印墨水材料是否负载细胞出发, 本文将软骨修复3D打印研究分为软骨支架打印(不含细胞)和软骨生物打印(含细胞).

2 3D打印软骨支架

2.1 软骨支架的打印方法

根据成型原理的不同, 目前3D打印技术实施方式包括熔融沉积制造(FDM)、选择性激光烧结(SLS)、立体光刻成型(SLA或DLP)、低温沉积制造(LDM)以及喷墨打印技术(3DP)等(部分研究采用墨水直写即DIW技术实施打印, 其基本原理与FDM或LDM十分类似), 不同方法有其优缺点和适用的材料范围(图2)^[2,10]. 例如, FDM通常适用于PCL, PLA, PLGA等热塑性高分子的成型以及少数温敏材料的打印, 打印的结构精度、支架力学强度较为理想, 可构建多种软骨支架; 但FDM的材料处于受热状态, 不适用于生物打印. SLS主要适用于金属粉末和陶瓷粉末的打印, 打印过程的高温状态可能对高分子材料产生不利影响, 更不

适用于水凝胶成型. SLA或DLP基于光敏聚合物原料, 可以获得较高的结构精度和稳定性, 适用于光敏水凝胶(如双键改性的Gel和HA)构建软骨支架和生物打印. LDM适用于高分子浆料的打印, 可以在材料表面形成微孔, 但是存在有机溶剂残留风险; DIW更多是在室温下进行, 适用于水凝胶材料构建软骨支架. 3DP适用于粉体原料的成型, 可以构建复杂孔隙结构和大尺寸支架, 但是打印效率偏低、后续处理相对繁琐, 因此在软骨修复方面应用有限.

2.2 软骨支架的3D打印复合墨水

如1.2节中所述, 不同类型的材料有着各自的优缺点, 如水凝胶材料通常生物相容性较好、力学性能不足, 而热塑性高分子材料反之. 实际上, 即便属于同一类型材料, 不同组分的性质也各不相同. 例如对于软骨修复水凝胶, Alg很容易通过离子交联打印成型, 但是生物活性欠佳、交联结构不稳定; Col生物活性较好, 但是打印成型性欠佳, 交联操作相对复杂; Gel易于通过化学改性改善交联方式, 但组成上不如Col与人体基质接近; 未改性HA的降解速率过快, 结构不稳定, 通过

图 2 (网络版彩图) 不同类型3D打印技术的成型方式示意图^[2]

Figure 2 (Color online) Types of three-dimensional printing technologies [2].

化学改性改善交联方式和稳定性后, 其生物活性又可能受影响。鉴于单一材料的性能缺陷, 复合体系成为制备打印墨水的重要选择。

目前常见的软骨支架复合墨水包括水凝胶+热塑性高分子体系和水凝胶+水凝胶体系。水凝胶+热塑性高分子体系中, 前者主要提供生物活性, 后者提供力学强度。例如, Guo等人^[15]首先通过FDM打印含氨基的PLCL/PLGA支架, 之后在支架表面共价接枝蛋白聚糖。支架湿态下的压缩模量可达2 MPa, 蛋白聚糖则可以促进干细胞的生长。兔子关节软骨损伤实验证明, 该复合支架新生软骨厚度与微骨折手术效果相当。将该复合支架与微骨折手术结合使用, 可进一步提升软骨再生效果。由于水凝胶材料是水溶的, 而热塑性高分子通常需要使用有毒性的有机溶剂溶解, 因此往往难以将水凝胶与热塑性高分子在同一溶剂中混合并进行打印。Hung等人^[16]报道了一种水基可降解聚氨酯(PU)软骨修复支架的打印方法。首先合成了长径37 nm左右的PU自组装弹性纳米颗粒, 以聚氧化乙烯(PEO)作为增稠剂, 混合得到PU/PEO水基墨水, 再通过LDM打印以及冻干处理获得多孔支架。由于该墨水避免了有机溶剂的使用, 因此利于负载水溶性的功能因子。该团队进一步以HA替换PEO, 并在墨水中复合了可以促成软骨的Y27632(ROCK抑制剂)和TGFβ3等(图3)^[17]。构

建的复合支架具备很好的应变恢复性能(弹性模量0.33 MPa)和功能因子缓释性能, 能显著诱导MSCs成软骨分化和糖胺聚糖合成, 比PLGA和未载药支架更显著促进体内软骨再生(兔子股骨踝软骨缺损模型)。这种先将非水溶性高分子制备成超细颗粒、再与水凝胶混合共打印的方式, 对研发天然材料+热塑性高分子的复合墨水具有很好的借鉴意义。

水凝胶+水凝胶体系中, 通常涉及对水凝胶的化学改性(如接枝丙烯酸基团获得光交联特性)。有研究在明胶(Gel)和透明质酸(HA)上接枝甲基丙烯酸(MA)获得GelMA和HAMA, 二者形成的复合墨水(5%GelMA/2%HAMA)具备很好的剪切变稀特性, 可构建3D打印多孔支架(图4)^[18]。进一步通过冻干处理可以提升支架的力学强度(湿态下30 kPa)和延长降解周期。在支架上接种软骨细胞后植入到动物皮下, 8周后能有成熟的软骨生成。Chen等人^[19]报道了将软骨细胞外基质(dECM, 1%~3%)与GelMA(10%)混合, 并负载从BMSCs提取的外泌体, 通过SLA打印获得复合支架(图5)。dECM可以改善GelMA的软骨再生效果; 外泌体则可以吸引和促进软骨细胞迁移, 并引发促再生的免疫响应。水凝胶基复合墨水的优点是方便整合多种利于成软骨的材料和活性因子(尤其是水溶性大分子), 提高墨水的功能活性, 缺点是材料的整体力学性能不佳

图3 (网络版彩图) 聚氨酯/HA水相墨水打印构建弹性支架示意图^[17]

Figure 3 (Color online) 3D printing of elastic PU/HA scaffold from an aqueous ink ^[17].

图 4 (网络版彩图)GelMA/HAMA复合墨水光交联和支架构建过程示意图^[18]

Figure 4 (Color online) 3D printing of GelMA/HAMA scaffold via photocrosslinking [18].

图 5 (网络版彩图)GelMA/软骨细胞外基质/外泌体复合墨水SLA打印构建软骨支架示意图^[19]

Figure 5 (Color online) Constructing GelMA/dECM/exosome scaffold for cartilage repair via SLA printing [19].

(压缩模量通常小于50 kPa). 互穿网络水凝胶(如聚乙二醇双丙烯酸酯(PEGDA)/琼脂糖双互穿网络^[20]、聚丙烯酰胺/Gel/Alg三互穿网络^[21])、高强度水凝胶(如丙烯酰基甘氨酸^[22])等新体系有望提升水凝胶墨水的力学性能。

相比于易成型的热塑性高分子和水凝胶, 热固性高分子交联前无法维持形态, 交联过程往往严苛、耗时, 因此研发3D打印热固性软骨修复支架需要面临更多的技术挑战。Lei等人^[23]开发了一种基于聚癸二酸甘油酯(PGS)预聚物+盐颗粒(氯化钠)的复合墨水。具备热塑性特征的PGS预聚物与氯化钠共混可获得较好黏

度特性的墨水, 借助挤出打印可以获得结构稳定的多孔支架, 对支架进行热交联后再沥滤氯化钠颗粒, 最终获得具有分级孔特征的支架。该方法中, 氯化钠组分在打印以及交联环节发挥力学支撑作用, 保障了体系的打印性和结构稳定性。该团队进一步采用四轴挤出打印+静电纺丝获得了PGS内衬/明胶纳米纤维表层的气管支架。接种软骨细胞后, 无论是体外长期培养(8周)还是裸鼠皮下植入(2周体外培养+12周植入), 均能形成管状的成熟软骨组织。这种复合墨水的设计思路可以启发更多类型3D打印热固性软骨修复支架的研发。

2.3 骨/软骨分层支架的3D打印构建

关节软骨与软骨下骨结合紧密, 关节损伤经常伴随软骨下骨同时受损. 因此许多研究尝试构建骨/软骨一体修复的分层支架. 3D打印技术的发展, 使分层支架的构建更上台阶^[24].

构建3D打印骨/软骨分层支架时, 骨修复层材料通常为热塑性高分子和无机组分(如羟基磷灰石HAp、磷酸三钙TCP)构成的复合物. Sherwood等人^[25]在2002年就打印了PLGA-TCP/PLGA-PLA骨/软骨分层修复支架. 近些年3D打印骨/软骨支架的设计更加精细和多元. Du等人^[26]首先制备了PCL/HAp微球(成骨部分)和PCL微球(成软骨部分), 再通过SLS打印获得分层支架, 支架压缩模量为8.7 MPa, 并展现出很好的骨/软骨一体修复潜力(图6). Bittner等人^[27]则采用FDM打印了兼具结构梯度以及组分梯度(孔径: 0.2~0.9 mm; HAp: 0~30%)的PCL/HAp复合支架, 该支架展现了灵活可控的力学特征(压缩模量86~220 MPa). Lee等人^[28]首先打印了关节形态的PCL/HAp支架, 之后将负载TGFβ3的Col-I凝胶灌注到支架中(深度约500 μm). 将兔子近端肱骨髁切除, 植入所制备支架, 3~4周后兔子即恢复移动及承重功能. 组织分析表明支架表面完全覆盖新生透明软骨, 软骨细胞均匀分布在Col-II和蛋白多糖的基质中. 新生软骨的压缩模量(>5 MPa)和剪切模量(>3 MPa)达到天然软骨水平, 且软骨与血管化的新生软骨下骨形成很好的结合. Zhang等人^[29]分别采用LDM打印PLGA/TCP支架作为骨修复部分、利用冷冻干燥法构建Chi/软骨基质的软骨修复部分, 再通过表

面处理将二者粘接, 形成骨/软骨分层支架. 在支架上接种MSCs后植入到山羊的股骨髁全层缺损部位, 24周后可以显著观察到软骨再生和新骨生成.

由于传统水凝胶强度较弱, 通常只适合构建骨/软骨分层支架的成软骨部分. 伴随高强度水凝胶的研究发展, 利用高强度水凝胶复合墨水构建骨/软骨分层支架的研究也逐渐兴起. 例如, Gao等人^[22]合成了一种基于丙烯酸基甘氨酸酰胺、具备溶胶-凝胶热转变性质的高强度水凝胶(PNT), 其压缩模量和压缩强度可达137 kPa和8.4 MPa(图7). 采用该水凝胶分别复合TCP以及TGFβ1, 利用FDM打印骨/软骨分层支架. MSCs在支架不同部位分别倾向于成骨和成软骨分化, 动物实验也证实该分层支架具备较好的骨/软骨一体修复效果. 该团队还开发了含GelMA的可光交联高强度水凝胶(PAGG-GelMA), 并基于该凝胶打印了含生物玻璃骨修复层和含Mn软骨修复层的复合支架^[30].

当前研究的3D打印软骨支架, 由于材料特性和成型条件限制, 需要在支架成型后再接种细胞. 虽然通过合理的材料和结构设计、负载促成软骨的生长因子(如TGFβ)等可以在体内实现一定水平的软骨再生, 但是成型后接种细胞难以对细胞的空间分步进行精准调控, 细胞所处的微环境也与体内状态差异较大. 生物打印的发展, 为3D打印软骨组织工程打开了新的窗口.

3 生物打印软骨

生物打印可以实现活细胞与材料的同时打印, 在3D打印成型优势基础上, 进一步实现细胞种类和分布

图6 (网络版彩图)PCL/HAp微球和PCL微球SLS打印制备骨/软骨分层支架示意图^[26]

Figure 6 (Color online) Constructing osteochondral layered scaffold from PCL/HAp and PCL microspheres via SLS printing ^[26].

的精确调控, 构建类组织/器官的生物“活”支架^[12,31]. 目前常用的生物打印技术包括喷墨生物打印、微挤出生物打印以及激光辅助生物打印等(图8)^[31]. 基于立体光刻生物打印的研究也逐渐增多^[32]. 这些生物打印技术中, 微挤出生物打印具备易操作、低成本以及材料适用范围广的优点, 是目前使用最广的生物打印方式.

与支架打印类似, 生物打印研究的焦点在于生物墨水的设计. 对于软骨支架打印而言, 由于没有细胞存在, 可以选择较为苛刻的打印条件(如冷冻、加热、高强度光交联等), 水凝胶的水相溶液、热塑性高分子的有机溶液或熔融浆料都可以作为打印墨水. 为了追求结构成型效果, 可以将墨水浓度和黏度尽可能提高, 因此软骨支架打印墨水的材料选择和参数控制自由度较大. 由于打印过程涉及易受损的活细胞, 生物墨水的制备和打印需要避免苛刻的环境, 墨水的黏度通常低

于支架打印墨水. 整体而言, 生物墨水组成和参数的可调控自由度显著弱于支架打印墨水. 由于水凝胶十分接近天然细胞外基质, 细胞可以在水凝胶内部存活, 因此水凝胶是目前制备生物墨水的最主要材料. 生物打印过程中, 成型性能(与结构相关)和细胞活性(与功能相关)对于生物墨水的特性(如黏度、强度等)有着相反的要求, 前者希望生物墨水有较高的浓度、交联密度等, 后者正好相反. 由于单种水凝胶存在各自的缺陷, 复合生物墨水体系已成为软骨生物打印的主流(表1).

3.1 软骨生物打印常见复合生物墨水

GelMA具备良好的生物活性和可光交联特性, 是许多复合生物墨水的基础材料. Mouser等人^[33]采用结冷胶(GG)来调控GelMA生物墨水的成型性能, 详细评

图 7 (网络版彩图) 基于高强度水凝胶(PNT)打印制备骨/软骨分层支架示意图^[22]

Figure 7 (Color online) Constructing osteochondral layered scaffold from high-strength hydrogel (PNT) [22].

图 8 (网络版彩图) 生物打印常见技术类型^[31]

Figure 8 (Color online) Generally studied technologies for bioprinting [31].

表 1 软骨生物打印研究采用的复合生物墨水体系

Table 1 Composite bioinks for cartilage bioprinting

墨水材料	主要交联机理	成型方式	目标组织	负载细胞	文献
GelMA/GG	紫外光交联	微挤出	软骨	软骨细胞; MSCs	[33] [34]
GelMA/PEGDA	紫外光交联	微挤出	软骨	MSCs	[35]
GelMA/HA	紫外光交联	微挤出	软骨	软骨细胞	[36]
GelMA/pHMGCL/PCL	紫外光交联	微挤出+灌注	软骨	软骨细胞	[37]
GelMA/HAMA	紫外光交联	同轴微挤出	软骨	MSCs	[38,39]
Alg/GG	离子交联	微挤出	软骨	软骨细胞	[40]
Alg/NFC	离子交联	微挤出	软骨	软骨细胞 iPS+软骨细胞	[41] [42]
Alg/Col-I	离子交联	微挤出	软骨	软骨细胞	[43]
HA/Alg+PLA	离子交联	微挤出+灌注	软骨	软骨细胞	[44]
Alg+PCL	离子交联	多针头微挤出	软骨 软骨 骨/软骨	软骨细胞, 软骨前体细胞; 软骨细胞; 成骨细胞+软骨细胞	[45] [46] [47]
Alg/Gel/HAp+Alg/Gel	离子交联	多针头微挤出	骨/软骨	成骨化MSCs+成软骨诱导 MSCs	[48]
Alg/GelMA/CS	离子交联+紫外光交联	同轴微挤出	软骨	MSCs	[49]
Alg/GelMA/ β TCP	离子交联+紫外光交联	同轴微挤出	钙化软骨	MSCs	[50]
Alg/GelMA/CS+Alg/GelMA/ CS/HAMA/TCP	离子交联+紫外光交联	微流控+微挤出	梯度软骨	MSCs+软骨细胞	[51]
HAMA/HA-pNIPAAm	温敏凝胶化+紫外光交联	微挤出	软骨	软骨细胞	[52]
F127DA/F127/HAMA	温敏凝胶化+紫外光交联	微挤出	软骨	软骨细胞	[53]
Col-I+HA/Alg	温敏凝胶化+离子交联	多针头微挤出	骨/软骨	成骨细胞+软骨细胞	[54]
蚕丝蛋白/Gel	酶交联	微挤出	软骨	MSCs, 软骨细胞	[55]
纤维蛋白/Col-I+PCL	酶交联	喷墨	软骨	软骨细胞	[56]
Gel/纤维蛋白原/HA+PCL	酶交联	多针头微挤出	软骨	MSCs	[57]
蚕丝蛋白/PEG	链结构转变	微挤出	软骨	软骨细胞	[58]
软骨基质+PCL	温敏凝胶化	多针头微挤出	软骨	MSCs	[59]
HA+Col+PCL	主客体反应	多针头微挤出	骨/软骨	MSCs	[60]

估了不同生物墨水配方的黏度特征、力学特征、软骨细胞生长以及软骨基质(Col-II, GAG等)合成情况,发现当GelMA/GG比例为10%/0.5%时打印效果最好. Zhu等人^[35]则采用聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA, 5%)来改进SLA打印方式下GelMA(10%)的打印精度(从1000 μm 提升至400 μm), 同时保障MSCs的存活率(24 h存活率75%)(图9). 进一步添加TGF β 1递送载体可以促进MSCs成软骨基因表达(Col-II, SOX-9, aggrecan)以及软骨基质生成. Schuurman等人^[36]则使用HA(2.4%)改性GelMA(10%)生物打印的成型效果, 软骨细胞3 d的存活率超过80%.

在部分打印的生物支架中, 细胞处于一个相对致密的微环境中, 营养环境可能不是最优状态. Kesti等人^[52]合成了两种HA: 温敏型(HA-pNIPAAm)和可光交联型(HAMA)(图10). 将4 $^{\circ}\text{C}$ 可流动生物墨水打印在35 $^{\circ}\text{C}$ ~38 $^{\circ}\text{C}$ 区间基底上, HA-pNIPAAm(15%)在打印过程中升温成胶从而让支架保持较好的结构. 待HAMA(2%)光交联后, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下将HA-pNIPAAm洗脱除去, 获得载软骨细胞的HAMA生物支架. 未除去HA-pNIPAAm时, 由于生物墨水基质较为致密, 7 d后细胞存活水平较低(34%, 与1%Alg生物墨水相比); 除去HA-pNIPAAm后, 凝胶网络更为疏松, 细胞存活水平显著

图 9 (网络版彩图) GelMA/PEGDA/MSCs 生物墨水 SLA 打印制备生物支架^[33]

Figure 9 (Color online) Constructing bioscaffold from GelMA/PEGDA/MSCs bioink via SLA bioprinting^[33].

提升至91%。F127同样具备升温成胶的特性,但是打印成型需要较高的浓度(通常>5%),因此内部细胞的存活率不佳。有研究制备了可光交联F127DA(3%)/F127(17%)复合生物墨水。打印完成后先光交联F127DA,之后将F127洗脱除去,在墨水内部形成改良的孔隙网络,利于营养物质扩散。内部软骨细胞培养14 d后的存活率可达86%(纯F127DA为62%)^[53]。这种通过洗脱生物墨水某个组分来改善内部微观结构的思路,对于改善内部细胞的营养环境具有积极意义。

生物打印对于细胞(尤其是干细胞)数量有着较大的需求(细胞浓度通常为 10^7 cells/mL量级),传统的二

维扩增方式存在效率瓶颈。针对该问题, Levato等人^[34]采用PLA微球预先进行MSCs动态培养扩增,之后将载细胞微球(微球悬浮浓度30 mg/mL)与GelMA/GG(10%/1%)复合墨水结合进行生物打印(细胞密度 8×10^6 cells/mL),培养3 d后细胞存活率超过90%。Tan等人^[61]进一步采用PLGA多孔微球进行细胞扩增后的生物打印。对于增殖能力相对较弱的干细胞而言,采用高比表面积(相比二维培养)微球进行预扩增并打印,不仅可以保障细胞供给数量,也有利于维持干细胞的分化潜力。

光交联机理的生物墨水涉及的引发剂和紫外线对负载的细胞有潜在伤害,基于Alg离子交联的生物墨水则无该顾虑。Kesti等人^[40]报道了一种Alg/GG(2%/3%)复合生物墨水,借助支撑材料F127打印后进行氯化锶交联可以获得复杂外形(图11)。在单层的生物支架中软骨细胞可以保持较高的存活率(>80%, 3 h; >95%, 4和7 d)。但在较大尺寸(3.1 cm×2.6 cm×1.5 cm)鼻子模型的中央部位,由于物质扩散困难,软骨细胞存活率显著降低(60%, 7 d)。进一步在生物墨水中添加软骨颗粒以及TGFβ3可以促进软骨细胞增殖以及GAG, Col-II等软骨基质合成。纳米纤维化纤维素(NFC)具有适合生物打印的剪切变稀特性和生物相容性,可以同时改善生物墨水的打印性和力学特性。采用NFC/Alg(2%/0.5%)复合墨水打印软骨细胞,培养1和7 d的存活率分别可达73%和86%^[41]。Nguyen等人^[42]报道NFC/Alg(1.8%/1.2%)复合墨水打印诱导多能干细胞(iPS)和辐照软骨

图 10 (网络版彩图)利用HAMA/HA-pNIPAAm/软骨细胞生物墨水打印软骨修复生物支架示意图^[52]

Figure 10 (Color online) Constructing bioscaffold of cartilage repair via HAMA/HA-pNIPAAm/chondrocytes bioink^[52].

图 11 (网络版彩图)Alg/GG/软骨基质/软骨细胞组成的复合生物墨水^[40]

Figure 11 (Color online) Composite bioink composed of Alg/GG/cartilage particle/chondrocytes^[40].

细胞(抑制增殖). iPS打印后可以维持较好的干性,与软骨细胞共打印可以促进iPS的成软骨分化,共打印体系培养5周后可以观察到透明软骨组织的生成. 针对Alg缺少生物活性的问题, Yang等人^[43]开发了Alg/Col-I (4:1)生物墨水. 与纯Alg相比, 加入Col-I改善了墨水压缩模量(1.87倍)和拉伸强度(1.62倍), 而且软骨细胞增殖效果也更好, 3, 7, 14 d的软骨基因(Acan, Sox9, Col-II)表达更显著. 培养14 d后, Alg/Col-I细胞存活率超过90%, 而纯Alg只有约70%. 除了光交联和离子交联, 研究人员还开发了其他交联机理的复合生物墨水, 比如酪氨酸酶交联的蚕丝蛋白/Gel生物墨水^[55]、链结构转变凝胶化的蚕丝蛋白/PEG生物墨水^[58]等.

水凝胶基生物墨水虽然可以保持较高的细胞存活率和成软骨潜力, 但是力学性能显著不足, 难以匹配软骨的力学要求, 需要进一步引入增强力学的元素. 有研究首先打印PLA支架, 之后在支架中注入HA(1%)/Alg (2%)/软骨细胞生物墨水, 获得具备较好力学强度(湿态压缩模量>13 kPa)的生物支架^[44]. 又有报道将静电纺丝技术与喷墨生物打印交替结合, 通过静电纺丝PCL增强力学性能, 通过纤维蛋白/Col-I复合墨水打印软骨细胞^[56]. 这些报道中, 增强相与水凝胶之间缺乏有力的界面结合, 在受力变形条件下, 水凝胶与增强相容易发生剥离. Boere等人^[37]利用FDM打印了表面修饰可光交联基团的热塑性高分子(pHMGCL)支架,

可与载软骨细胞的GelMA形成共价结合的界面, 其结合力是非共价结合的5倍. 因此该复合体系具备更好的抗拉伸、抗扭曲性能, 细胞与动物实验也证实其较好的成软骨潜力.

3.2 多针头软骨生物打印

3.1节末段中论述的增强方法, 增强结构与生物墨水往往难以同步构建, 二者之间也缺乏深度融合、互穿的空间分布. 多针头、多材料的打印方式(简称多针头打印)可以实现多种墨水的同步打印, 赋予生物支架更灵活多样的材料设计. 因此通过多针头同步打印含水凝胶结构以及不含细胞的增强结构, 有望实现更精细水平的力学增强生物打印. 此外, 增强结构往往对水凝胶成型具有辅助作用, 有利于单一组分水凝胶生物墨水的应用. 由于PCL具备较好的热挤出性能和一定的生物相容性, 是目前多针头软骨生物打印的主要增强材料, 可以显著提升生物支架的力学性能至天然软骨水平(杨氏模量4.1 MPa以上)(图12)^[62]. Izadifar等人^[45]将负载不同细胞(软骨细胞和软骨前体细胞)的Alg(2.5%, 10°C)生物墨水与PCL(75°C)共打印, 14 d后两种细胞的存活率都超过80%, GAG和Col-II合成量也随培养时间延长不断提高. Olubamiji等人^[46]将PCL和Alg/软骨细胞生物墨水共打印的生物支架植入到裸鼠皮下, 7, 14, 21 d后软骨细胞存活率都在70%以上, 新生软骨基质也不断增加. 还有研究采用dECM/干细胞生物墨水与PCL共打印, 干细胞软骨分化效果要优于Col-I基生物墨水^[59]. Sun等人^[57]则采用酶交联、载MSC和功能因子的生物墨水与PCL共打印用于软骨修复. 这种多针头打印体系, 其优点是结合了生物打印和支架打印的各自优势, 缺点是增强材料的打印可能影响细胞活性以及增加打印的复杂性, 而且墨水中细胞所受外力刺激可能被增强材料屏蔽.

多针头打印也是构建骨/软骨分层支架以及实现多细胞打印的有效方式. Shim等人^[47]通过Alg基生物墨水与PCL共打印构建了骨/软骨活性分层支架, 载成骨细胞Alg和载软骨细胞Alg在PCL框架中分别充当成骨和成软骨的功能区, 两种细胞在支架中7 d内的存活率都在80%以上. 基于不同细胞对不同基质的偏好不同, 该团队分别用Col-I负载成骨细胞、HA/Alg负载软骨细胞, 多针头打印骨/软骨复合体. 两种细胞在不同的墨水中都能保持较高的存活率(90%)以及较好的生

图 12 (网络版彩图)利用多针头打印系统实现水凝胶生物墨水与热塑性聚合物共打印^[62]

Figure 12 (Color online) Co-printing of hydrogel bioink and thermoplastic polymer via multi-nozzle printing system ^[62].

理功能特征^[54]. 还有研究报道了类似思路构建的Alg/Gel/HAp/成骨诱导MSCs+Alg/Gel/成软骨诱导MSCs的活性分层支架^[48]. Shim等人^[60]进一步实现PCL与载MSCs+BMP-2的Col-I成骨墨水以及载MSCs+TGF β 的HA成软骨墨水共打印(图13), MSCs在不同生物墨水中表现出不同的成骨和成软骨分化倾向, 该精细设计的生物打印体系相比其他类型的打印方案更能促进兔子股骨关节全层缺损的修复.

3.3 同轴软骨生物打印

对于微挤出生物打印, 除了单通道针头和多针头打印外, 同轴多通道打印的应用也越来越普遍. 例如, Costantini等人^[49]采用同轴打印方式在内通道挤出Alg/GelMA/CS/MSCs构成的复合生物墨水, 外通道同时挤出氯化钙溶液对墨水进行交联, 待打印完成后再进行光交联以获得结构稳定的支架(图14). 该方式可以实现较高纤维精度(100 μ m)和细胞存活率(80%, 7 d)的生物打印. Kosik-Kozioł等人^[50]则采用Alg/GelMA/ β TCP/MSCs复合生物墨水同轴打印构建钙化软骨层.

β TCP可以在不影响细胞存活率情况下促进MSCs表达及合成更多的钙化软骨层细胞外基质(aggrecan, Col-II, Col-X等). 不仅如此, 与不含 β TCP的生物墨水相比, 含 β TCP墨水中的MSCs同时保留了更高的生物矿化潜力(ALP表达更高).

目前研究的软骨生物打印体系绝大多数采用尺寸较大的制造设备, 难以实现缺损部位的原位生物打印, 临床适用性有待提升. Duchi等人^[38]开发了一种手持式、可双通道同轴微挤出的3D打印装置“生物笔”(biopen), 外壳挤出含引发剂的GelMA/HAMA复合凝胶, 内核挤出载脂肪干细胞的GelMA/HAMA复合墨水, 通过组分和交联参数的优化调控, 可以实现90%以上细胞存活率并支持细胞长期生长. 该团队进一步使用生物笔直接在羊的股骨关节缺损处进行原位打印修复(图15)^[39]. 8周后的组织分析表明, 原位打印相比打印后再移植以及微骨折手术治疗更能促进早期软骨再生. 相信随着墨水体系和打印设备的共同发展, 原位生物打印将成为软骨组织工程一种重要的临床应用方式.

图 13 (网络版彩图)多针头打印构建骨/软骨一体生物支架^[60]

Figure 13 (Color online) Printing osteochondral bioscaffold via multi-nozzle printing [60].

图 14 (网络版彩图)利用Alg快速离子交联特性进行同轴生物打印示意图^[49]

Figure 14 (Color online) Coaxial bioprinting based on rapidly ion-crosslinking Alg [49].

3.4 多技术集成软骨打印

随着3D打印技术在再生医学领域研究的不断深入,经典打印技术的局限性也开始显现。例如,微挤出多针头打印需要在不同材料的针头之间进行切换,影响打印效率,且在材料梯度控制方面存在限制。又如传统打印方式获得的结构精度通常 $>100\ \mu\text{m}$,难以探究更精细结构的生物学效应。微流控技术能够精确控制流体组分,利用微流控系统作为针头,可以实现多种组分的实时混合,构建更为精细多样的生物支架^[63]。Idaszek等人^[51]将微流控系统与3D打印相结合(图16),以Alg(4%)/GelMA(6%)/CS(4%)/干细胞及/或软骨细胞构建上层透明软骨组织,以Alg(4%)/GelMA(6%)/

CS(4%)/HAMA(0.5%)/TCP(0.5%)/干细胞构建下层钙化软骨,二者之间可以形成良好的过渡界面。体外培养后可以获得分层特征的软骨基质。静电纺丝技术可以有效获得微米、亚微米的纤维结构。贺勇团队^[64]将静电纺丝技术与打印结合,可以实现超细PCL纤维($3\sim 22\ \mu\text{m}$)的可控打印。由于纤维尺寸与细胞尺寸接近,可以通过纤维直径以及纤维间距显著调控细胞的黏附和生长状态(包括细胞的分布、取向、增殖等)。Liashenko等人^[65]进一步通过电场偏转方法实现了亚微米纤维的超快速打印,水平打印速率可达 $0.5\ \text{m/s}$ 、垂直打印速率可达 $0.4\ \text{mm/s}$,整体效率比一般静电直写打印方式高3~4个数量级。整体而言,3D打印技术与其他工程技术的不断集成,可以促进打印墨水更多特

图 15 (网络版彩图)手持式“生物笔”原位生物打印修复软骨损伤示意图^[39]

Figure 15 (Color online) Using hand-held biopopen to repair cartilage damage via *in situ* bioprinting [39].

图 16 (网络版彩图)微流控体系与生物打印相结合构建梯度软骨示意图^[51]

Figure 16 (Color online) Constructing gradient cartilage bioscaffold via combining microfluidic system and bioprinting [51].

性的发挥。

4 总结与应用展望

本文主要归纳目前3D打印复合墨水体系在软骨组织工程应用方面的研究进展,从支架打印和生物打印两方面系统阐述各类打印墨水的组成、特性、打印方式、修复效果等,期望为新型软骨修复打印墨水的设计与开发提供借鉴。

3D打印技术在骨修复领域的研究和应用较为成熟^[66,67],已有多款3D打印骨修复产品上市。相比之下,

3D打印在软骨修复领域发展略显滞后。虽然3D打印技术尤其是生物打印为实现软骨完整修复提供了新契机,但是3D打印软骨组织工程要真正实现临床应用,仍有一些重要挑战需要克服。例如,目前3D打印技术可以构建骨/软骨分层结构。但是软骨内部细胞分布和基质成分都呈现精细梯度变化,目前的打印技术还难以精确复制这种微观梯度。对于软骨生物打印,如何实现细胞活性、结构成型性以及力学强度的综合平衡也需要进一步探索。此外,为了提升修复效果,有必要在打印体系中结合各种功能因子(如生长因子等),并

实现功能因子时空上的可控释放. 应对这些挑战, 需要持续探索综合性能更优的打印墨水.

软骨生物打印符合经典组织工程的理念, 生物墨水不应当只是满足细胞的空间分布和形状仿生的需求, 更应当为细胞功能发挥提供有利的微环境, 甚至主动激发和引导细胞的组织再生功能. 同时, 组织工程产品必须通过安全性、有效性验证后方能进入临床应用, 这要求软骨生物打印墨水除了追求功能创新外, 还应当考虑质量稳定性、方法易操作性、评价标准化等实际要求, 需要关注监管部门新政策、新标准、新方法

的发展. 目前临床应用的软骨组织工程方法主要基于Col(Chondro-Gide[®])、HA(Hyalograft[®])、PVA(CAR-TIVA[®])、纤维蛋白/HA(Biocart[™])、琼脂糖/Alg(Carti-patch[®])等水凝胶体系, 也是目前生物墨水研究常用的组分, 可为软骨生物打印墨水产品的开发提供有益的配方参考和其他技术指导.

总体而言, 以墨水为引领的3D打印软骨组织工程已经处于快速发展的阶段. 相信随着打印墨水的不断创新成熟以及打印技术的同步发展, 3D打印软骨修复产品的临床应用之日将很快到来.

参考文献

- 1 Ambrosio L. Biomedical Composites. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017
- 2 Shen S, Chen M, Guo W, et al. Three dimensional printing-based strategies for functional cartilage regeneration. *Tissue Eng Part B-Rev*, 2019, 25: 187–201
- 3 Heinegård D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7: 50–56
- 4 Xu J, Zhao J N, Xu H D, et al. Progress of researches in the treatment of articular cartilage injury (in Chinese). *Inter J Pathol Clinic Med*, 2015, 35: 455–461 [徐敬, 赵建宁, 徐海栋, 等. 关节软骨损伤修复研究进展. *临床与病理杂志*, 2015, 35: 455–461]
- 5 Daly A C, Freeman F E, Gonzalez-Fernandez T, et al. 3D bioprinting for cartilage and osteochondral tissue engineering. *Adv Healthcare Mater*, 2017, 6: 1700298
- 6 Mithoefer K, Acuna M. Clinical outcomes assessment for articular cartilage restoration. *J Knee Surg*, 2013, 26: 031–040
- 7 Griffith L G, Naughton G. Tissue engineering—current challenges and expanding opportunities. *Science*, 2002, 295: 1009–1014
- 8 Temenoff J S, Mikos A G. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 2000, 21: 431–440
- 9 Loh Q L, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B-Rev*, 2013, 19: 485–502
- 10 Ngo T D, Kashani A, Imbalzano G, et al. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Compos Part B-Eng*, 2018, 143: 172–196
- 11 Ma G, Xiao Y F, Liu X M, et al. Application progress of tissue engineering scaffold in osteochondral repair (in Chinese). *Medical Recapitulate*, 2019, 25: 453–458 [马钢, 肖云峰, 刘晓民, 等. 组织工程支架在骨软骨修复中的应用进展. *医学综述*, 2019, 25: 453–458]
- 12 You F, Eames B F, Chen X. Application of extrusion-based hydrogel bioprinting for cartilage tissue engineering. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1597
- 13 Deng C, Chang J, Wu C. Bioactive scaffolds for osteochondral regeneration. *J Orthopaedic Trans*, 2019, 17: 15–25
- 14 Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, et al. Cartilage engineering: A crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotech*, 2009, 27: 307–314
- 15 Guo T, Noshin M, Baker H B, et al. 3D printed biofunctionalized scaffolds for microfracture repair of cartilage defects. *Biomaterials*, 2018, 185: 219–231
- 16 Hung K C, Tseng C S, Hsu S H. Synthesis and 3D printing of biodegradable polyurethane elastomer by a water-based process for cartilage tissue engineering applications. *Adv Healthcare Mater*, 2014, 3: 1578–1587
- 17 Hung K C, Tseng C S, Dai L G, et al. Water-based polyurethane 3D printed scaffolds with controlled release function for customized cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 2016, 83: 156–168
- 18 Xia H, Zhao D, Zhu H, et al. Lyophilized scaffolds fabricated from 3D-printed photocurable natural hydrogel for cartilage regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 31704–31715
- 19 Chen P, Zheng L, Wang Y, et al. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration. *Theranostics*, 2019, 9: 2439–2459
- 20 Ingavle G C, Frei A W, Gehrke S H, et al. Incorporation of aggrecan in interpenetrating network hydrogels to improve cellular performance for

- cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19: 1349–1359
- 21 Dinescu S, Galateanu B, Radu E, et al. A 3D porous gelatin-alginate-based-IPN acts as an efficient promoter of chondrogenesis from human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 1–17
 - 22 Gao F, Xu Z, Liang Q, et al. Direct 3D printing of high strength biohybrid gradient hydrogel scaffolds for efficient repair of osteochondral defect. *Adv Funct Mater*, 2018, 28: 1706644
 - 23 Lei D, Yang Y, Liu Z, et al. A general strategy of 3D printing thermosets for diverse applications. *Mater Horiz*, 2019, 6: 394–404
 - 24 Yousefi A M, Hoque M E, Prasad R G S V, et al. Current strategies in multiphasic scaffold design for osteochondral tissue engineering: A review. *J Biomed Mater Res*, 2015, 103: 2460–2481
 - 25 Sherwood J K, Riley S L, Palazzolo R, et al. A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials*, 2002, 23: 4739–4751
 - 26 Du Y, Liu H, Yang Q, et al. Selective laser sintering scaffold with hierarchical architecture and gradient composition for osteochondral repair in rabbits. *Biomaterials*, 2017, 137: 37–48
 - 27 Bittner S M, Smith B T, Diaz-Gomez L, et al. Fabrication and mechanical characterization of 3D printed vertical uniform and gradient scaffolds for bone and osteochondral tissue engineering. *Acta Biomater*, 2019, 90: 37–48
 - 28 Lee C H, Cook J L, Mendelson A, et al. Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: A proof of concept study. *Lancet*, 2010, 376: 440–448
 - 29 Zhang T, Zhang H, Zhang L, et al. Biomimetic design and fabrication of multilayered osteochondral scaffolds by low-temperature deposition manufacturing and thermal-induced phase-separation techniques. *Biofabrication*, 2017, 9: 025021
 - 30 Gao F, Xu Z, Liang Q, et al. Osteochondral regeneration with 3D-printed biodegradable high-strength supramolecular polymer reinforced-gelatin hydrogel scaffolds. *Adv Sci*, 2019, 6: 1900867
 - 31 Murphy S V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 773–785
 - 32 Hong H, Seo Y B, Kim D Y, et al. Digital light processing 3D printed silk fibroin hydrogel for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 2020, 232: 119679
 - 33 Mouser V H M, Melchels F P W, Visser J, et al. Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. *Biofabrication*, 2016, 8: 035003
 - 34 Levato R, Visser J, Planell J A, et al. Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication*, 2014, 6: 035020
 - 35 Zhu W, Cui H, Boualam B, et al. 3D bioprinting mesenchymal stem cell-laden construct with core-shell nanospheres for cartilage tissue engineering. *Nanotechnology*, 2018, 29: 185101
 - 36 Schuurman W, Levett P A, Pot M W, et al. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromol Biosci*, 2013, 13: 551–561
 - 37 Boere K W M, Visser J, Seyednejad H, et al. Covalent attachment of a three-dimensionally printed thermoplast to a gelatin hydrogel for mechanically enhanced cartilage constructs. *Acta Biomater*, 2014, 10: 2602–2611
 - 38 Duchi S, Onofrillo C, O’Connell C D, et al. Handheld Co-axial bioprinting: Application to *in situ* surgical cartilage repair. *Sci Rep*, 2017, 7: 5837
 - 39 Di Bella C, Duchi S, O’Connell C D, et al. *In situ* handheld three-dimensional bioprinting for cartilage regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12: 611–621
 - 40 Kesti M, Eberhardt C, Pagliccia G, et al. Bioprinting complex cartilaginous structures with clinically compliant biomaterials. *Adv Funct Mater*, 2015, 25: 7406–7417
 - 41 Markstedt K, Mantas A, Tournier I, et al. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 2015, 16: 1489–1496
 - 42 Nguyen D, Hägg D A, Forsman A, et al. Cartilage tissue engineering by the 3D bioprinting of iPS cells in a nanocellulose/alginate bioink. *Sci Rep*, 2017, 7: 658
 - 43 Yang X, Lu Z, Wu H, et al. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng-C*, 2018, 83: 195–201
 - 44 Antich C, de Vicente J, Jiménez G, et al. Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs. *Acta Biomater*, 2020, 106: 114–123

- 45 Izadifar Z, Chang T, Kulyk W, et al. Analyzing biological performance of 3D-printed, cell-impregnated hybrid constructs for cartilage tissue engineering. [Tissue Eng Part C-Methods](#), 2016, 22: 173–188
- 46 Olubamiji A D, Zhu N, Chang T, et al. Traditional invasive and synchrotron-based noninvasive assessments of three-dimensional-printed hybrid cartilage constructs *in situ*. [Tissue Eng Part C-Methods](#), 2017, 23: 156–168
- 47 Shim J H, Lee J S, Kim J Y, et al. Bioprinting of a mechanically enhanced three-dimensional dual cell-laden construct for osteochondral tissue engineering using a multi-head tissue/organ building system. [J Micromech Microeng](#), 2012, 22: 085014
- 48 Yang Y, Yang G, Song Y, et al. 3D bioprinted integrated osteochondral scaffold-mediated repair of articular cartilage defects in the rabbit knee. [J Med Biol Eng](#), 2020, 40: 71–81
- 49 Costantini M, Idaszek J, Szöke K, et al. 3D bioprinting of BM-MSCs-loaded ECM biomimetic hydrogels for *in vitro* neocartilage formation. [Biofabrication](#), 2016, 8: 035002
- 50 Kosik-Kozioł A, Costantini M, Mróz A, et al. 3D bioprinted hydrogel model incorporating β -tricalcium phosphate for calcified cartilage tissue engineering. [Biofabrication](#), 2019, 11: 035016
- 51 Idaszek J, Costantini M, Karlsen T A, et al. 3D bioprinting of hydrogel constructs with cell and material gradients for the regeneration of full-thickness chondral defect using a microfluidic printing head. [Biofabrication](#), 2019, 11: 044101
- 52 Kesti M, Müller M, Becher J, et al. A versatile bioink for three-dimensional printing of cellular scaffolds based on thermally and photo-triggered tandem gelation. [Acta Biomater](#), 2015, 11: 162–172
- 53 Müller M, Becher J, Schnabelrauch M, et al. Nanostructured pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting. [Biofabrication](#), 2015, 7: 035006
- 54 Park J Y, Choi J C, Shim J H, et al. A comparative study on collagen type I and hyaluronic acid dependent cell behavior for osteochondral tissue bioprinting. [Biofabrication](#), 2014, 6: 035004
- 55 Chameettachal S, Midha S, Ghosh S. Regulation of chondrogenesis and hypertrophy in silk fibroin-gelatin-based 3D bioprinted constructs. [ACS Biomater Sci Eng](#), 2016, 2: 1450–1463
- 56 Xu T, Binder K W, Albanna M Z, et al. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. [Biofabrication](#), 2013, 5: 015001
- 57 Sun Y, You Y, Jiang W, et al. 3D-bioprinting a genetically inspired cartilage scaffold with GDF5-conjugated BMSC-laden hydrogel and polymer for cartilage repair. [Theranostics](#), 2019, 9: 6949–6961
- 58 Li Z, Zhang X, Yuan T, et al. Addition of platelet-rich plasma to silk fibroin hydrogel bioprinting for cartilage regeneration. [Tissue Eng Part A](#), 2020, 26: 886–895
- 59 Pati F, Jang J, Ha D H, et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. [Nat Commun](#), 2014, 5: 3935
- 60 Shim J H, Jang K M, Hahn S K, et al. Three-dimensional bioprinting of multilayered constructs containing human mesenchymal stromal cells for osteochondral tissue regeneration in the rabbit knee joint. [Biofabrication](#), 2016, 8: 014102
- 61 Tan Y J, Tan X, Yeong W Y, et al. Hybrid microscaffold-based 3D bioprinting of multi-cellular constructs with high compressive strength: A new biofabrication strategy. [Sci Rep](#), 2016, 6: 39140
- 62 Schuurman W, Khristov V, Pot M W, et al. Bioprinting of hybrid tissue constructs with tailorable mechanical properties. [Biofabrication](#), 2011, 3: 021001
- 63 Colosi C, Shin S R, Manoharan V, et al. Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3D tissue constructs using low-viscosity bioink. [Adv Mater](#), 2016, 28: 677–684
- 64 Xie C, Gao Q, Wang P, et al. Structure-induced cell growth by 3D printing of heterogeneous scaffolds with ultrafine fibers. [Mater Des](#), 2019, 181: 108092
- 65 Liashenko I, Rosell-Llompart J, Cabot A. Ultrafast 3D printing with submicrometer features using electrostatic jet deflection. [Nat Commun](#), 2020, 11: 753
- 66 Lin Z, Wu M, He H, et al. 3D printing of mechanically stable calcium-free alginate-based scaffolds with tunable surface charge to enable cell adhesion and facile biofunctionalization. [Adv Funct Mater](#), 2019, 29: 1808439
- 67 Zhai X, Ruan C, Ma Y, et al. 3D-bioprinted osteoblast-laden nanocomposite hydrogel constructs with induced microenvironments promote cell viability, differentiation, and osteogenesis both *in vitro* and *in vivo*. [Adv Sci](#), 2018, 5: 1700550

Research progress of 3D printing composite inks for cartilage tissue engineering

CHENG DeLin^{1,2}, CHEN BiXiu¹, WU MingMing¹, RUI Hao³, PAN HaoBo^{1,2} & RUAN ChangShun^{1,2}

¹ Human Tissue and Organ Degeneration Research Center, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³ College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Cartilage is a very important connective tissue in the human body. However, because of the limited ability of this tissue to self-heal, its repair following injury presents a significant clinical challenge. The development of cartilage tissue engineering provides new opportunities to solve the problem of cartilage repair. Additive manufacturing (3D printing), which can be used to construct functional devices in an accurate, efficient, and personalized manner, has great application value in cartilage tissue engineering. Printing ink based on biomaterials is an important breakthrough in efforts to advance the applications of 3D printing in cartilage tissue engineering. The development of composite inks with excellent comprehensive properties has become an important trend in 3D printing-based cartilage tissue engineering. In the present paper, we first introduce the categories and properties of biomaterials used for cartilage tissue engineering. Then, we review the composite printing inks used to construct cartilage and osteochondral repair scaffolds. We also discuss the development frontiers of composite bioinks used to bioprint cartilage, including those with different cross-linking mechanisms and features, bioinks for multi-nozzle bioprinting, bioinks for coaxial bioprinting, and the integration of different technologies to realize cartilage bioprinting. Finally, we summarize the main challenges faced by cartilage bioprinting to provide guidance for future research and application of bioinks.

cartilage, 3D printing, composite, bioprinting, bioink

doi: [10.1360/SST-2020-0259](https://doi.org/10.1360/SST-2020-0259)