



评述

生物三维打印的研究进展

顾奇^{①②}, 郝捷^①, 陆阳杰^①, 王柳^①, Gordon G. Wallace^②, 周琪^{①*}^① 中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101;^② ARC Centre of Excellence for Electromaterials Science (ACES), Intelligent Polymer Research Institute, AIIM Facility, Innovation Campus, University of Wollongong, NSW 2522, Australia

* 联系人, E-mail: zhouqi@ioz.ac.cn

收稿日期: 2015-01-08; 接受日期: 2015-02-17

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB965000)和中国科学院干细胞与再生医学研究战略性先导科技专项(批准号: XDA01030506)资助

摘要 三维(3D)打印具有灵活性和精密性的特点, 已在军工、航天等制造行业中发挥重要作用. 随之兴起的生物 3D 打印在再生医学领域同样具有广泛的应用前景. 生物 3D 打印是将打印的墨水改成含有活细胞的混合物, 从而构建活体组织器官. 目前生物 3D 打印更多的是应用于硬组织的仿生重建和新型给药装置的制备, 但具有生物活性、更复杂的组织器官的重建还处于探索阶段. 本文主要对 3D 打印在生物医学上的应用进行综述, 讨论生物 3D 打印目前面临的问题, 并探讨生物 3D 打印的未来发展方向.

关键词生物 3D 打印
细胞
功能
成型

伴随工业制品精度的提高和个性化的发展, 三维(3D)打印技术应运而生. 相对于传统的模型构造技术而言, 3D 打印可以通过逐层打印完成立体结构的成型. 因为单层的打印类似于二维的打印技术, 所以这个技术被称为三维打印. 3D 打印过程中, 通过软件设计确定打印出的性状, 通过改变材料来确定结构的组成, 通过挤压、激光或高温等物理条件的控制来确定最后的成型^[1]. 它不仅可以快速打印出复杂的三维结构也可以满足个性化的需求^[2]. 所以 3D 打印技术已经应用于众多领域, 其中包括本文关注的生物医学领域.

生物材料和细胞生物学的发展为仿生和再生医学提供了广阔的应用前景. 目前在仿生医学领域, 不仅可以利用生物活性材料进行骨骼修复^[3], 还开发出较复杂的助听器^[4], 仿生眼已进入临床^[5], 仿生心脏等器官也有新的突破^[6]. 3D 打印技术可以完成硬组织的打印, 尤其针对不同的病人, 其缺损和伤害的部位

大小等不同, 通过 3D 扫描得到其具体的参数, 从而 3D 打印出的组织可以很好地与原组织互补并最大限度保留原来健康的组织. 细胞移植在多种疾病的治疗上已有临床案例^[7]. 人体的每个部位都有特殊的构造, 传统培养方式无法将不同类型细胞组装构建成为复杂的组织, 而在理想状态下通过 3D 打印技术设计出正常的组织构造, 将生物材料与细胞作为“墨水”, 打印出复杂的人体器官.

本文将概述 3D 打印技术, 着重描述生物 3D 打印的类型及其在生物学和医学中的应用, 综述关于生物 3D 打印的最新研究进展, 分析目前生物 3D 打印所面临的问题, 提出将来生物 3D 打印的发展方向, 为相关领域的研究提供参考.

1 三维打印概述

三维(three-dimensional, 3D)打印又叫快速成型,

引用格式: 顾奇, 郝捷, 陆阳杰, 等. 生物三维打印的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 439–449

英文版见: Gu Q, Hao J, Lu Y J, et al. Three-dimensional bio-printing. Sci China Life Sci, 2015, 58: 411–419, doi: 10.1007/s11427-015-4850-3

是一种新型的快速喷墨打印技术, 通过逐层喷墨, 最终可以打印出具有三维形状的物体. 该技术可以用来快速构建个性化的模型, 包括精密的模型构建并将其转换成可输出的信号传递给 3D 打印机. 第一台 3D 打印机是通过光固化立体造型(stereolithography, SLA)^[8]的立体光刻技术来实现模型的构建, 该技术通过对特定的光敏材料进行激光分层扫描, 材料会固化形成薄层, 通过同样的逐层扫描, 就可得到相应的模型^[2]. 这不仅要求材料的光敏性、稳定性高, 还需要防止降解. 其他 3D 打印技术包括熔融沉积成型技术(fused deposition modeling, FDM)、选区激光烧结技术(selective laser sintering, SLS)、数字光处理技术(digital light processing, DLP)、三维印刷工艺(three dimensional printing, 3DP)、层片叠加制造(laminated object manufacturing, LOM), 以及一种新的 Polyjet 技术(表 1). 其中 FDM 是目前比较常用的打印技术. 无论哪种技术, 所依据的原理都是先进行单层的固化、凝结、雕刻或成型, 然后再进行另一层的制作, 层层之间逐渐组合^[16]. 完整的 3D 打印平台包括控制设备、图形建模的终端服务器和 3D 打印机的主体部分. 主体部分用来“喷墨”和成型, 例如, SLS, SLA 和 DLP 等技术的主体部分是用激光或紫外光与底物作用成型^[17-19]. 现在中国已有公司利用 3D 打印技术建造房屋, 这样不仅可以降低成本、提高资源再利用、节约时间, 也可以减少对环境的污染(<http://www.theguardian.com/>). 此外, 在能源领域 3D 打印技术已经用于打印电池, 精确控制电极形貌, 满足不同客户需求, 提高储能和充放电速率(<http://3dprint.com/>). 相对于传统的制造技术, 个性化和高精度是 3D 打印的最大优势, 目前 3D 打印技术已经在生活、游戏、电影及一些其他类型工作的建模过程中开始显现出其特有的优势^[20].

2 生物 3D 打印

2.1 生物 3D 打印概述及分类

在生物医学领域中的 3D 打印技术被称为生物 3D 打印, 理想的生物 3D 打印方案如图 1 所示, 通过对需要打印器官进行计算机辅助设计(computer aided design, CAD)建模, 编出相应的程序, 然后将信号转入打印机主体, 通过多个通道的结合打印出复杂的器官, 其中图 1 的模块 C 表示经过特殊处理的打印所需要的不同类型细胞^[21-23]. 目前已经可以用 3D 打印机和仿生材料来制造一些硬的无细胞组织^[24], 并且已经在临床上有所应用. 在未来, 理想的生物 3D 打印可以直接打印出组织和器官, 并用于疾病和损伤部位的治疗, 也可以用于特定部位的模拟, 从而更利于组织学、形态学的研究, 利于下一步的治疗和操作. 此外, 生物 3D 打印可以应用于个体化的治疗, 减少治疗成本, 未来更多的生物相容性(biocompatible)和生物可降解性(biodegradable)材料应用于打印过程中可以减少材料本身对人体的伤害^[22,25]. 所以生物 3D 打印必将引起生物医学领域的技术革命.

统计结果显示, 目前等待器官移植的患者大概只有 1/5 可以进行正常的器官移植, 其余者只能继续等待器官或者采取其他疗法. 随着等待器官移植的患者愈来愈多, 真正可应用的人体器官却愈来愈少(<http://www.unos.org/index.php>), 组织工程器官因而成为未来器官移植的潜在来源. 但是, 目前还没有成熟的体外人造器官方案. 虽然已有自体皮肤体外培养并移植的成功案例^[26], 体外构建的简单的膀胱、心肌膜和气管等组织也在临床上有所应用^[27-30], 但这些只是二维的细胞片, 并没有典型的真皮或表皮三维组织结构. 目前三维组织的体外构建是在特定形态构架的基础上进行特定类型细胞的填充和叠

表 1 3D 打印的种类

名称	简述	使用原料	参考文献
SLA	光固化立体造型, 通过对特定的光敏材料进行激光扫描, 材料会固化形成薄层, 然后进行逐层积累, 精度较高	光敏树脂	[9]
FDM	熔融沉积成型技术, 目前常用和基本的 3D 打印技术, 对原材料进行高温融化, 挤压出之后再低温成型	塑料、可融食物	[10]
SLS	选区激光烧结技术, 类似 SLA, 使用红外激光将薄层的粉末物质固化为整体, 然后逐层积累	塑料、蜡、陶瓷、金属等	[11]
DLP	数字光处理技术, 类似 SLA, 但每次成型一个面, 速度相对提高	树脂	[12]
3DP	三维印刷技术, 与 SLS 相同, 但是通过黏合剂整合, 不是激光熔融	石膏等	[13]
LOM	层片叠加制造, 通过热辊加热黏合	纸、陶瓷、金属等	[14]
Polyjet	多喷头和紫外光共同工作, 进行薄层固化, 喷墨和成型同时进行, 分辨率高	光敏树脂	[15]

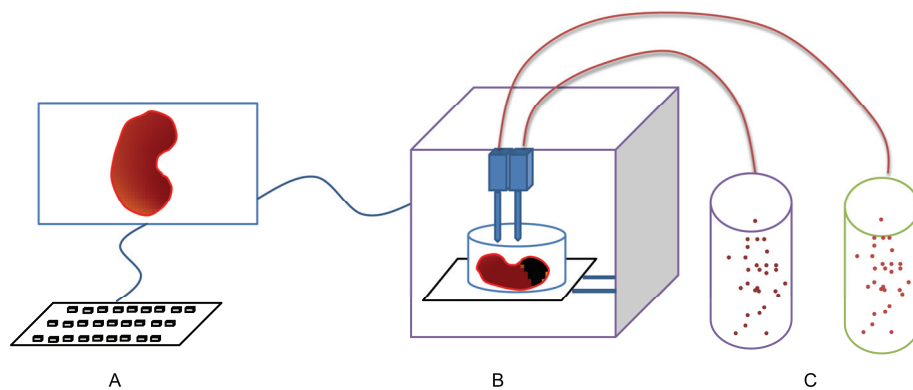


图 1 理想的生物三维打印模型

A: 通过 CAD 技术进行器官的模拟; B: 生物三维打印的主要设备, 包括喷墨头、载物台和维持打印组织活力的装置, 如温度、湿度和空气控制系统, 以及培养器官的装置; C: 不同类型细胞、材料和水凝胶的储存装置, 即“墨盒”

加^[31-34]. 通过组织材料和不同细胞的融合可以培养出类似真皮的简单三维组织, 但只是在动物模型上有所应用^[32]. 随着设备的进步和人们思维的开拓, 现在已可体外构建含有血管的三维结构^[35].

组织器官的体外培养与构建已有 30 余年的历史^[36]. Langer 和 Vacanti^[37]首次提出将材料和细胞结合的组织工程技术. 三维的支架为细胞提供了细胞外基质, 更好地促进细胞的生长和细胞间的相互作用. 可降解的、具有生物相容性的无模三维支架(solid freeform fabrication, SFF)在人的体外组织构建中起重要作用, 有些 SFF 可以用计算机模拟进行构建, 从而提高体外构建器官的准确性和特异性^[38]. 通过 3D 打印出的支架结构更能发挥此方面的优势, 可以完整地描绘出复杂的生物结构, 在支架构造完成之后可以进行细胞的填充, 并且可以将材料和细胞混合后同时进行打印. 生物 3D 打印是一门结合组织生物学、细胞生物学、计算机科学、材料学和医学的综合超级学科. 因此, 器官打印需要满足各个学科的要求, 具有精确的器官内外模型的设计, 满足组织结构的要求, 具有细胞活力, 能够发挥组织功能.

目前生物打印技术包括直接喷墨、激光、声波和阀门控制挤压等 4 种不同的介导方式(图 2). 这些技术在通过改进原有的 3D 打印技术来确保生物材料和细胞的活性.

应用于生物 3D 打印中的喷墨打印是一种非接触式图像重构技术, 可以将数字信号通过滴墨在移动的底物平台上进行重现, 目前这种技术已在电子材料和电路板整合方面有广泛的应用^[39]. 通过对微升

级到纳升级的墨滴进行操作可以提高打印样品的精确性和特异性. 这种技术已经用于组织支架和生物材料的打印, 从而利于细胞的生长和功能的特化^[40,41]. 喷墨技术的难点是如何控制墨滴的大小, 如何保证墨滴的连续性, 这就涉及对含有细胞的墨水的流体力学研究. 喷墨所用到的技术包括压电陶瓷法和热导法. 喷墨打印可以应用于高通量的生物打印, 但无法进行单个细胞的控制^[42].

激光生物打印是由激光介导进行细胞悬液或组织悬液的细胞定位技术, 是常用的 3D 打印方法, 可以分为激光引导直写(laser-guided bioprinting)、生物学激光加工(biological laser processing, BioLP)、激光诱发向前转移技术(laser-induced forward transfer, LIFT)、基材辅助脉冲激光蒸发直写技术(matrix-assisted pulsed laser evaporation direct writing, MAPLEDW). 其中, 激光引导直写的通量较低, 但分辨率最高, 并且可以对单个细胞进行控制; 激光诱发设计技术对单个细胞的控制力差, 通量比引导直写的高; 激光脉冲的热量传递到包被细胞的薄膜上, 从而切割出特定大小形状 of 细胞滴, 黏附在具有移动能力的基底上进行定型^[43].

声波控制的细胞打印技术没有喷嘴存在, 通过声波辐射的压力来喷射离散的细胞液, 通过脉冲、持续性和振幅的调整可以进行单个细胞的控制, 并且能量较少, 可以减少对细胞的伤害^[44]. 目前这种技术所涉及的细胞类型和细胞悬液都很多, 并且在其他非生物打印领域也有较为广泛的应用, 如单个细胞的 RNA 和 DNA 水平的操作^[45].

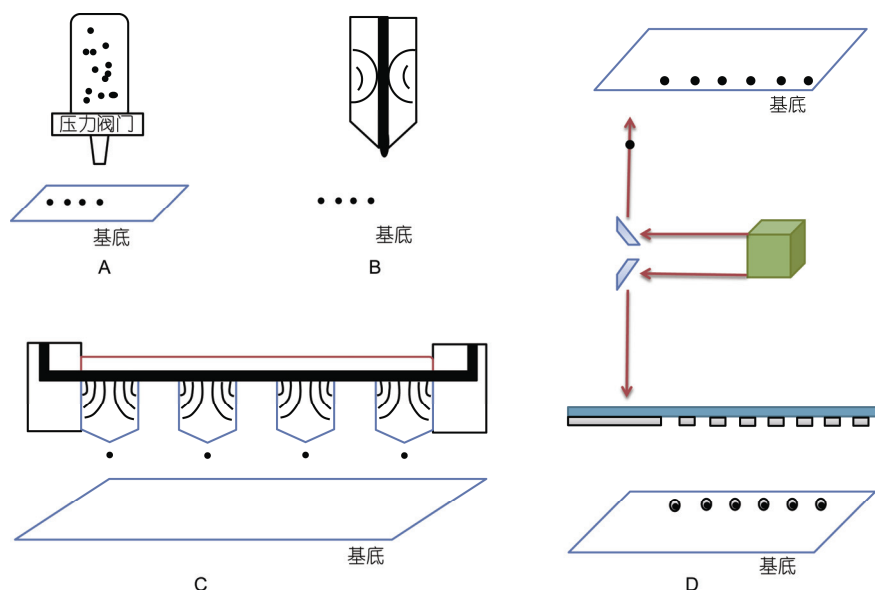


图2 生物三维打印的分类

A: 阀门控制挤压的生物三维打印技术; B: 直接喷墨三维打印技术; C: 声波控制的三维打印技术; D: 激光介导的生物三维打印技术

阀门控制挤压喷墨技术是指通过电脉冲控制细胞墨滴的吐出, 无论是从分辨率或单细胞控制方面来说这种技术都是属于中等水平, 这种技术已作为单细胞分离的手段用于生物学领域, 如单细胞测序或者单细胞和少量细胞的样品分析^[46]。

2.2 生物活性支架的 3D 打印

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)可以给予细胞物理结构的支持, 是细胞对外的联系通道, 由多种蛋白、糖类组成。ECM 的改变会影响细胞的生长状态、功能, 甚至会影响细胞的命运^[47,48]。3D 打印具有较高分辨率, 可以模拟体内的三维组织结构和微环境, 因此 3D 打印支架在药物运输、细胞活力检测和组织工程中都将有广泛应用^[21,22]。3D 打印首先开始于模型的制造, 通过对材料的改进, 可以打印出具有很好生物相容性和生物可降解性的仿生硬组织和非血管组织^[49]。2012 年, 荷兰一家医院实现世界首例 3D 打印的临床应用, 利用 3D 打印的金属下颌骨对患者进行移植(<http://www.bbc.com/news/technology169-07104>)。其后此项技术在波兰和日本都有所推广(<http://3dprint.com/19617/osteo3d-3d-print-mouth/>和 <http://www.3ders.org/>), 通过对患者已缺损的下颌骨进行模拟, 最后用 3D 打印机进行输出, 可以得到患者特异的骨骼。打印的骨骼可以保留一些间隙利于

周围细胞或神经的爬贴, 并且可以特异性地与发声器官相互作用, 不会影响听力和发音。在其他医学应用方面, 可以应用缺损骨骼区域的填充, 在最后的生长过程中, 三维组织材料会逐渐降解并被自身组织替代^[50]。

为了将来能够直接通过 3D 打印构造出组织器官, 很多 3D 打印的支架应用于细胞的培养, 这为细胞和材料的共同打印奠定了基础。细胞在支架上可以存活, 并且能够体现比正常二维培养更好的功能^[51,52]。多聚己内酯(poly caprolactone, PCL)作为生物打印支架已经用于多种细胞的培养^[53,54]。但是这也仅是细胞与支架的二维结合, 并没有将材料与细胞进行充分的结合和互作, 将来的组织打印也需要将细胞包埋于支架中, 这样才能防止细胞的非定向扩散, 因为细胞没有作为墨水, 所以支架的打印只能被称为非直接的细胞生物 3D 打印。严格意义上讲, 细胞与支架的这种作用还是一种二维的相互作用, 材料并没有在整个细胞外周与之相互作用。表 2 列出了具有代表性的应用于细胞培养的 3D 打印支架和直接的细胞打印。

2.3 细胞参与的生物 3D 打印

人体大概含有 200 多种细胞类型, 这些细胞构成复杂的组织和器官。这也是目前无法在体外构建复

杂三维组织器官的原因. 3D 打印技术的出现理论上可以解决该难题, 例如, 通过打印技术喷出含有活细胞的“墨水”, 逐层组装, 从而构建出组织器官. Forgacs 课题组^[65]在 2008 年打印出了短小的血管组织和可跳动的心脏薄片组织, 这为打印细胞提供了可能, 之后其创立了 Organovo 公司, 致力于生物打印机的改造和组织器官的打印, 并将之推广至市场. 现在已有更多的科研单位在进行三维生物组织的打印. 通过对 3D 打印机的改进, 已经可以进行皮肤细胞的打印^[66], 并且细胞类型可以进一步扩展到成体干细胞、内皮细胞和成纤维细胞等^[41,63], 打印之后可以看到细胞间的相互作用, 这些成果为复杂组织的打印奠定了基础^[67].

经典的组织工程技术是将细胞种植在已成型的三维材料上的非直接细胞生物 3D 打印^[68]. 直接的细胞打印需要将细胞包裹, 表 2 已列出一些例子. 细胞的活力是在细胞包埋于材料中时面临的主要问题. 起初的材料是非降解型的, 如用静电纺丝(electrospun)来替代血管^[69], 或是利用碳纳米管模拟肌纤维^[70]; 随后的材料包括胶原(collagen)、聚酸酐(polyanhydride)和纤维蛋白等可降解性的材料. 目前这种组织工程领域依然属于前沿技术, 备受人们关注^[71]. 水凝胶是一类聚合物材料, 亲水的性质使它们在三维结构中包含大量水, 水凝胶具有特定的合成方式, 具有可知的理化性质, 并且具有生物相容性或生物可降解性. 此外它也是重要的细胞外基质材料, 水凝胶的存在可以进行细胞的保护、细胞间的黏合扩展及器官的构型. 因此, 水凝胶成为包裹细胞的首选. 在细胞打印的过程中与细胞混合, 利用相应的三维打印技术(图 2), 以下材料在细胞平面构建成型中都有了成功的案例, 包括培养液(culture medium)^[72]、琼脂糖(agarose)^[73]、藻朊酸盐(alginate)^[74]、胶原(collagen)^[75]、基质胶(matrigel)^[76-78]、纤维蛋白(fibrin)^[79]、k-70 系列丙烯酸胶黏剂^[80]、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)^[81]等.

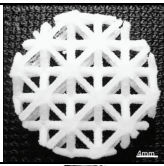
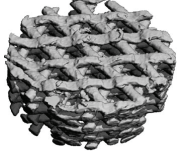
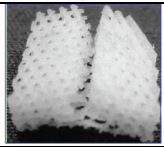
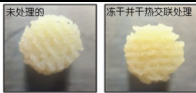
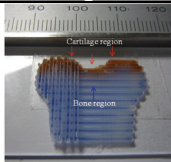
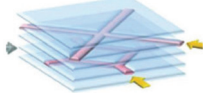
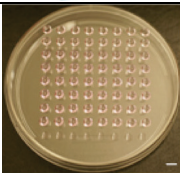
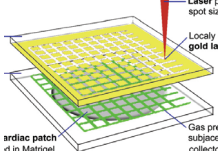
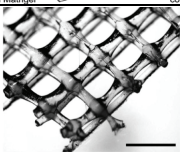
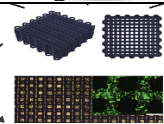
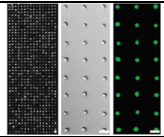
为了满足生物 3D 打印的需要, 水凝胶要具有可打印的特性. 这对水凝胶的特性提出了异于常用水凝胶的新的要求. 如表 2 所示, 通过调控水凝胶的机械性能, 组分将细胞与之混合, 从而同时确保打印时的分辨率及细胞在水凝胶中的活性维持, 此外在打印后要寻求合适的方法进行交联来维持打印出结构的形貌. 虽然此材料在打印和交联的过程中会对细

胞造成一些伤害, 但是不会导致大量细胞的死亡. 目前常用的水凝胶交联方法有物理交联和化学交联, 特定波长光刺激和温度改变引起的交联方法被称为物理交联法, 通过特定化合物或离子作用引起的交联称为化学交联法. 明胶具有很高的生物活性^[82], 用于多种细胞的培养, 经过甲基丙烯酰胺修饰之后可以通过紫外线进行交联^[83], 透明质酸的添加可以提高其强度, 从而利于打印^[62]. 藻朊酸盐(alginate)是一种可以用钙离子进行交联的水凝胶, 它可以作为支架维持细胞的生长, 通过与其他水凝胶的结合可以用于 3D 打印^[84,85]. 分辨率的提高使少量细胞和材料的控制成为可能, 并且可以对材料进行精确定位. 单细胞水平的操作也会造成细胞活力的下降, 目前的“Block-Cell-Printing”技术可以确保细胞的高效存活^[64].

3 生物 3D 打印的问题及未来方向

生物 3D 打印为未来的器官移植提供了美好的前景, 但是目前还未有成功的具有生物活性的 3D 打印器官的应用. 人类机体的各个组织和器官都有复杂的结构, 尤其是有不同类型细胞的组合, 不仅需要体外功能检测, 还需要在体内与其他器官相互作用. 细胞存活、组织再构建是目前生物 3D 打印正在克服的问题. 完成一个完整器官的打印不仅时间较长, 并且所需要很大的细胞量^[86], 在长时间的打印过程中如何保证打印的精度以及细胞的生命力成为打印器官面临的重要问题. 打印头可以包裹一层铝合金或以其他材料处理, 从而避免紫外线或其他激光的照射^[87]. 喷头的设计和原料的选择都影响长时间打印中喷头的打印精度^[88]. 为了维持细胞的活性及相互作用, 完成整个组织器官的功能, 打印的材料中不仅含有本身作用的细胞也含有维持细胞活力的培养液及细胞间相互作用的基质, 甚至含有起到支架成型作用的材料. 激光介导的 3D 打印技术已可以利用水凝胶打印出复杂的立体组织支架结构^[59,89-92], 但在立体结构凝结过程中所涉及的高温、高压或与乙醇等毒性溶剂的接触都会导致细胞死亡^[93]. 目前来说, 通过调节合适温度或者 pH 已经可以将细胞和水溶液混合物打印出简单三维结构的组织^[58,94], 但是这些只是形状上的突破或者仅是细胞和组织的黏合, 并没有真正的功能出现. 细胞之后的扩展、相互作用及

表 2 生物 3D 打印类型举例

类型	材料	细胞类型	支架形貌	参考文献
非直接	PCL	成肌细胞系 C2C12		[55]
非直接	经过纤维蛋白处理的磷酸钙 PCL(PCL-CaP)	间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)		[56]
非直接	PCL	MSCs		[53]
非直接	添加大豆蛋白的干油	MSCs		[57]
非直接	PCL 和 alginate	成骨细胞和软骨细胞		[58]
非直接	明胶和胶原	支架构建, 没有细胞参与		[59]
直接	培养液	小鼠(<i>Mus musculus</i>)胚胎 干细胞		[60]
直接	细胞打印在浸入 matrigel 的聚 酯型氨酯脲(polyester urethane urea, PEUU)上	人脐带血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVECs), MSCs		[61]
直接	HA 和甲基丙烯酸胺修饰的 明胶(gelMA)	软骨细胞		[62]
直接	gelMA	肝癌细胞系 HepG2		[63]
直接	单细胞阵列	多种乳腺癌细胞系		[64]

功能的实现仍是目前面临的主要问题, 尤其是针对较为大型结构的组装和打印, 应该保证在合适的外在条件下打印出的组织器官也可进行自我修复和组装^[95].

在确保细胞活力的基础上, 生物 3D 打印面临的重要问题就是如何实现打印后支架的功能, 如何在支架中看到细胞间的相互作用及特定功能基因的表达. 虽然目前有很多生物打印工作的报道, 但是所用到的细胞系基本是些永生化的纤维状细胞. 这些细胞在材料中所呈现的是球形而不是梭形^[96]. 形状是细胞功能的一个体现, 如果细胞在材料中仅是扩增并不能实现其价值. 不同细胞喜好不同硬度的材料^[97-99], 进一步说明了细胞要在一定的依附作用下才能进行定型. 材料选择至关重要, 为了更好创造类似体内的环境, 已有研究利用去细胞化的组织作为包裹细胞的打印材料^[100], 目前大家都在寻找同时保证物质自由交换、细胞活性和结构稳定的材料.

另外面临的主要问题是打印过程中的血管组织的布局和组装, 任何一个器官都需要毛细血管网络来进行氧气、细胞因子和能量的供应, 也需要进行废弃物的排放. 目前已有通过组织培养法将内皮细胞培养出具有血管样的心肌组织结构, 并具有一定功能, 但是体外维持较为复杂, 并且未成熟的管状组织较多, 功能受到影响^[35]. 所以功能性的、含有血管的三维组织构建, 是生物 3D 打印面临的另一大挑战^[101].

细胞来源是生物 3D 打印面临的首要问题, 这不仅涉及细胞的存活更涉及细胞的拓展、黏附和功能的发挥, 而干细胞则可能解决以上问题. 干细胞活力较高, 可塑性强, 并且在合适的环境下会分化为特定功能的细胞或发挥出相应的功能. 这样可以减少打印过程中细胞的应用, 节约打印时间, 并且为器官的功能发挥创造了条件. 也许在器官打印的过程中可以选择干细胞作为部分来源原料, 但具体的比例需要

进一步的实验摸索. 目前干细胞在生物 3D 打印中已经有了初步尝试, 例如, 打印单个多能性细胞进行拟胚体(embryoid bodies, EBs)的形成^[60], 利用人的骨髓间充质干细胞和人脐带血管内皮细胞打印出心肌修复的补丁^[61]等.

未来仍需要很长一段时间来摸索合适的细胞和适合的组织器官以及在构成器官中细胞如何更好地互作. 理想的生物 3D 打印是对损伤部位的原位打印, 尤其是创伤部位的补充, 这不仅要求打印机快速运转也要求模型的有效构建, 此想法的实现会完成生物学领域的一次革命. 对外部皮肤组织创伤来说, 如果能够快速完成创伤部位的补充修复, 将会提高修复的成功率和减少永久伤疤的残留. 目前众多研究人员都在摸索如何 3D 打印出组织器官, 也在考虑 3D 打印器官的功能评价和细胞的跟踪鉴定^[102]. 对打印后组织和器官的功能确定需要对其进行细胞水平的检测, 确保细胞的存活状态及功能标记的指示, 进一步的动物活体实验可以确定组织或器官的功能. 在部分组织的三维构建中已有相关的实验尝试. 3D 打印过程中的支架应用也成了目前受关注的问题之一. 完成较大立体组织的打印一般都需要首先存在硬的支架, 然后再进行打印, 或者需要加入一些非生物活性硬材料, 如多聚己内酯(poly caprolactone, PCL)^[53,55,56,58].

在面临一些技术难题的同时, 对于一个生物打印机装置和打印器官的应用需要完整的安全评价体系的建立^[103,104], 目前还未有生物 3D 打印材料的应用. 生物三维组织打印是一项复杂的新技术, 并且包含大量细胞扩增过程中的安全保证, 整个打印系统需要生物安全性的评估和相应法律法规的考核. 国内外的法律法规也需进一步完善. 总之, 生物 3D 打印在未来有广阔前景但同时这个新兴的领域需要众多技术的改革和支持.

参考文献

- 1 Sachs E, Cima M, Williams P, et al. Three dimensional printing: rapid tooling and prototypes directly from a CAD model. *J Manuf Sci E*, 1992, 114: 481-488
- 2 Sachs E M, Haggerty J S, Cima M J, et al. Three-dimensional printing techniques. US Patent, No. 5,204,055, 1993-4-20
- 3 Green D W. Tissue bionics: examples in biomimetic tissue engineering. *Biomed Mater*, 2008, 3: 034010
- 4 Wilson B S, Dorman M F. Cochlear implants: a remarkable past and a brilliant future. *Hearing Res*, 2008, 242: 3-21
- 5 Sifferlin A. FDA approves first bionic eye. *Health and Family*, 2013-2-15 http://wdev.2-sight.com/assets/pdfs/20130215_time_fda.pdf
- 6 Bionic heart breakthrough: scientists transplant device into sheep, hope for clinical trials. ABC NEWS, 2015 <http://www.>

- abc.net.au/news/2015-03-07/bionic-heart-breakthrough-scientists-transplant-device-in-sheep/6288126
- 7 Trounson A, Thakar R G, Lomax G, et al. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med*, 2011, 9: 52
- 8 Hull C W. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. US Patent, No. 4,575,330, 1986-3-11
- 9 Melchels F P, Feijen J, Grijpma D W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, 2010, 31: 6121–6130
- 10 Anitha R, Arunachalam S, Radhakrishnan P. Critical parameters influencing the quality of prototypes in fused deposition modelling. *J Mater Process Tech*, 2001, 118: 385–388
- 11 Tay B Y, Evans J R G, Edirisinghe M J. Solid freeform fabrication of ceramics. *Int Mater Rev*, 2003, 48: 341–370
- 12 Hornbeck L J. Digital light processing for high-brightness high-resolution applications. In: *Proceeding of SPIE 3013, Projection Displays III*. Bellingham: International Society for Optics and Photonics, 1997. 27–40
- 13 Utela B, Storti D, Anderson R, et al. A review of process development steps for new material systems in three dimensional printing (3DP). *J Manuf Process*, 2008, 10: 96–104
- 14 Mueller B, Kochan D. Laminated object manufacturing for rapid tooling and patternmaking in foundry industry. *Comput Ind*, 1999, 39: 47–53
- 15 Singh R. Process capability study of polyjet printing for plastic components. *J Mech Sci Technol*, 2011, 25: 1011–1015
- 16 Koch L, Gruene M, Unger C, et al. Laser assisted cell printing. *Curr Pharm Biotechnol*, 2013, 14: 91–97
- 17 Zuzak K, Cadeddu JA, Ufret-Vincenty R, et al. Digital light processing hyperspectral imaging apparatus. US Patent, 08406859
- 18 Sun C, Fang N, Wu D M, et al. Projection micro-stereolithography using digital micro-mirror dynamic mask. *Sensor Actuat A-Phys*, 2005, 121: 113–120
- 19 Bourell D L, Marcus H L, Barlow J W, et al. Selective laser sintering of metals and ceramics. *Int J Powder Metall*, 1992, 28: 369–381
- 20 Ulbrich C B L, Zavaglia C A C, Neto P I, et al. Comparison of five rapid prototype techniques (SLS/FDM/DLP/3DP/Polyjet). In: *Bártolo P J, de Lemos A C S, Tojeira A P O, et al, eds. Innovative Developments on Virtual and Physical Prototyping*. Raton: CRC Press, 2012. 573–580
- 21 Jakab K, Norotte C, Marga F, et al. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication*, 2010, 2: 022001
- 22 Mironov V, Visconti R P, Kasyanov V, et al. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 2009, 30: 2164–2174
- 23 Derby B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science*, 2012, 338: 921–926
- 24 Ricci J L, Clark E A, Murriky A, et al. Three-dimensional printing of bone repair and replacement materials: impact on craniofacial surgery. *J craniofac Surg*, 2012, 23: 304–308
- 25 Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, et al. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials*, 2012, 33: 6020–6041
- 26 Hernon C A, Dawson R A, Freedlander E, et al. Clinical experience using cultured epithelial autografts leads to an alternative methodology for transferring skin cells from the laboratory to the patient. *Regen Med*, 2006, 1: 809–821
- 27 Sekine H, Shimizu T, Yang J, et al. Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering. *Circulation*, 2006, 114: I87–I93
- 28 Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*, 2008, 372: 2023–2030
- 29 Delaere P R, Hermans R. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*, 2009, 373: 717–718
- 30 Atala A, Bauer S B, Soker S, et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*, 2006, 367: 1241–1246
- 31 Haraguchi Y, Shimizu T, Sasagawa T, et al. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets *in vitro*. *Nat Protoc*, 2012, 7: 850–858
- 32 Stanton R A, Billmire D A. Skin resurfacing for the burned patient. *Clin Plast Surg*, 2002, 29: 29–51
- 33 Muraoka M, Shimizu T, Itoga K, et al. Control of the formation of vascular networks in 3D tissue engineered constructs. *Biomaterials*, 2013, 34: 696–703
- 34 Groeber F, Holeiter M, Hampel M, et al. Skin tissue engineering—*in vivo* and *in vitro* applications. *Adv Drug Deliver Rev*, 2011, 63: 352–366
- 35 Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, et al. *In vitro* fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun*, 2013, 4: 1399
- 36 Vacanti C A. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*, 2006, 10: 569–576
- 37 Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering. *Science*, 1993, 260: 920–926
- 38 Shim J H, Kim J Y, Park J K, et al. Effect of thermal degradation of sff-based plga scaffolds fabricated using a multi-head deposition system followed by change of cell growth rate. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2010, 21: 1069–1080
- 39 Sirringhaus H, Kawase T, Friend R H, et al. High-resolution inkjet printing of all-polymer transistor circuits. *Science*, 2000, 290: 2123–2126

- 40 Yeong W Y, Chua C K, Leong K F, et al. Indirect fabrication of collagen scaffold based on inkjet printing technique. *Rapid Prototyping J*, 2006, 12: 229–237
- 41 Weng B, Liu X, Shepherd R, et al. Inkjet printed polypyrrole/collagen scaffold: a combination of spatial control and electrical stimulation of PC12 cells. *Synthetic Met*, 2012, 162: 1375–1380
- 42 Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, et al. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. *Tissue Eng*, 2005, 11: 1658–1666
- 43 Li W, Sun W, Zhang Y, et al. Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 8299–8304
- 44 Fang Y, Frampton J P, Raghavan S, et al. Rapid generation of multiplexed cell cocultures using acoustic droplet ejection followed by aqueous two-phase exclusion patterning. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18: 647–657
- 45 Demirci U, Montesano G. Single cell epitaxy by acoustic picolitre droplets. *Lab Chip*, 2007, 7: 1139–1145
- 46 Moon S, Kim Y G, Dong L, et al. Drop-on-demand single cell isolation and total rna analysis. *PLoS One*, 2011, 6: e17455
- 47 Trappmann B, Chen C S. How cells sense extracellular matrix stiffness: a material's perspective. *Curr Opin Biotech*, 2013, 24: 948–953
- 48 Tschumperlin D J, Liu F, Tager A M. Biomechanical regulation of mesenchymal cell function. *Curr Opin Rheumatol*, 2013, 25: 92–100
- 49 Lee M, Wu B M. Recent advances in 3D printing of tissue engineering scaffolds. *Methods Mol Biol*, 2012, 868: 257–267
- 50 Matsumoto K, Ishiduka T, Yamada H, et al. Clinical use of three-dimensional models of the temporomandibular joint established by rapid prototyping based on cone-beam computed tomography imaging data. *Oral Radiol*, 2014, 30: 98–104
- 51 Kawaguchi N, Hatta K, Nakanishi T. 3D-culture system for heart regeneration and cardiac medicine. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 895967
- 52 Page H, Flood P, Reynaud E G. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res*, 2013, 352: 123–131
- 53 Cao T, Ho K H, Teoh S H. Scaffold design and *in vitro* study of osteochondral coculture in a three-dimensional porous polycaprolactone scaffold fabricated by fused deposition modeling. *Tissue Eng*, 2003, 9: S103–S112
- 54 Temple J P, Hutton D L, Hung B P, et al. Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hascs and 3D-printed pcl scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102: 4317–4325
- 55 Yeong W Y, Sudarmadji N, Yu H Y, et al. Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering. *Acta Biomater*, 2010, 6: 2028–2034
- 56 Schantz J T, Brandwood A, Huttmacher D W, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymer-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modeling. *J Mater Sci Mater Med*, 2005, 16: 807–819
- 57 Chien K B, Makridakis E, Shah R N. Three-dimensional printing of soy protein scaffolds for tissue regeneration. *Tissue Eng Part C Methods*, 2013, 19: 417–426
- 58 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
- 59 Lee W, Lee V, Polio S, et al. On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105: 1178–1186
- 60 Xu F, Sridharan B, Wang S, et al. Embryonic stem cell bioprinting for uniform and controlled size embryoid body formation. *Biomicrofluidics*, 2011, 5: 022207
- 61 Gaebel R, Ma N, Liu J, et al. Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials*, 2011, 32: 9218–9230
- 62 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
- 63 Billiet T, Gevaert E, De Schryver T, et al. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials*, 2013, 35: 49–62
- 64 Zhang K, Chou C K, Xia X, et al. Block-cell-printing for live single-cell printing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 2948–2953
- 65 Jakab K, Norotte C, Damon B, et al. Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14: 413–421
- 66 Koch L, Kuhn S, Sorg H, et al. Laser printing of skin cells and human stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16: 847–854
- 67 Gruene M, Pflaum M, Hess C, et al. Laser printing of three-dimensional multicellular arrays for studies of cell-cell and cell-environment interactions. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17: 973–982
- 68 Mironov V, Trusk T, Kasyanov V, et al. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. *Biofabrication*, 2009, 1: 022001
- 69 De Cossart L, How T, Annis D. A two year study of the performance of a small diameter polyurethane (biomer) arterial prosthesis. *The Journal of cardiovascular surgery*, 1989, 30: 388–394
- 70 Foroughi J, Spinks G M, Wallace G G, et al. Torsional carbon nanotube artificial muscles. *Science*, 2011, 334: 494–497

- 71 Wu L Q, Payne G F. Biofabrication: using biological materials and biocatalysts to construct nanostructured assemblies. *Trends Biotechnol*, 2004, 22: 593–599
- 72 Odde D J, Renn M J. Laser-guided direct writing for applications in biotechnology. *Trends Biotechnol*, 1999, 17: 385–389
- 73 Choi W S, Ha D, Park S, et al. Synthetic multicellular cell-to-cell communication in inkjet printed bacterial cell systems. *Biomaterials*, 2011, 32: 2500–2507
- 74 Guillemot F, Souquet A, Catros S, et al. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomater*, 2010, 6: 2494–2500
- 75 Pepper M, Parzel C, Burg T, et al. Design and implementation of a two-dimensional inkjet bioprinter. In: *Annual International Conference of the IEEE*. Minneapolis: IEEE, 2009. 6001–6005
- 76 Ringeisen B R, Kim H, Barron J A, et al. Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells. *Tissue Eng*, 2004, 10: 483–491
- 77 Barron J, Spargo B, Ringeisen B. Biological laser printing of three dimensional cellular structures. *Appl Phys A-Mater*, 2004, 79: 1027–1030
- 78 Barron J A, Krizman D B, Ringeisen B R. Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress. *Ann Biomed Eng*, 2005, 33: 121–130
- 79 Guillotin B, Souquet A, Catros S, et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*, 2010, 31: 7250–7256
- 80 Wilson W C, Boland T. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. *Anat Rec Part A*, 2003, 272: 491–496
- 81 Nishiyama Y, Nakamura M, Henmi C, et al. Development of a three-dimensional bioprinter: construction of cell supporting structures using hydrogel and state-of-the-art inkjet technology. *J Biomech Eng*, 2009, 131: 035001
- 82 Ratcliffe J H, Hunneyball I M, Smith A, et al. Preparation and evaluation of biodegradable polymeric systems for the intra-articular delivery of drugs. *J Pharm Pharmacol*, 1984, 36: 431–436
- 83 Van Den Bulcke A I, Bogdanov B, De Rooze N, et al. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules*, 2000, 1: 31–38
- 84 Chung J H Y, Naficy S, Yue Z L, et al. Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomater Sci*, 2013, 1: 763–773
- 85 Detsch R, Sarker B, Grigore A, et al. Alginate and gelatine blending for bone cell printing and biofabrication. In: *IASTED International Conference Biomedical Engineering Innsbruck*. Innsbruck: ACTA Press, 2013. 451–455
- 86 Marcos R, Monteiro R A, Rocha E. Design-based stereological estimation of hepatocyte number, by combining the smooth optical fractionator and immunocytochemistry with anti-carcinoembryonic antigen polyclonal antibodies. *Liver Int*, 2006, 26: 116–124
- 87 Cui X, Breitenkamp K, Finn M G, et al. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18: 1304–1312
- 88 Derby B. Bioprinting: inkjet printing proteins and hybrid cell-containing materials and structures. *J Mater Chem*, 2008, 18: 5717–5721
- 89 Butscher A, Böhner M, Hofmann S, et al. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta Biomater*, 2011, 7: 907–920
- 90 Bartolo P J, Almeida H, Laoui T. Rapid prototyping and manufacturing for tissue engineering scaffolds. *Int J Comput Appl Technol*, 2009, 36: 1–9
- 91 Seitz H, Rieder W, Irsen S, et al. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B*, 2005, 74: 782–788
- 92 Yang S, Leong K F, Du Z, et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng*, 2002, 8: 1–11
- 93 Ang T, Sultana F, Hutmacher D, et al. Fabrication of 3D chitosan-hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system. *Mater Sci Eng C*, 2002, 20: 35–42
- 94 Liu Tsang V, Bhatia S N. Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliver Rev*, 2004, 56: 1635–1647
- 95 Mironov V, Prestwich G, Forgacs G. Bioprinting living structures. *J Mater Chem*, 2007, 17: 2054–2060
- 96 Hassan W, Dong Y, Wang W. Encapsulation and 3D culture of human adipose-derived stem cells in an *in-situ* crosslinked hybrid hydrogel composed of peg-based hyperbranched copolymer and hyaluronic acid. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4: 32
- 97 Engler A J, Sen S, Sweeney H L, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, 126: 677–689
- 98 Mei Y, Saha K, Bogatyrev S R, et al. Combinatorial development of biomaterials for clonal growth of human pluripotent stem cells. *Nat Mater*, 2010, 9: 768–778
- 99 Lee S, Kim J, Park T J, et al. The effects of the physical properties of culture substrates on the growth and differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials*, 2011, 32: 8816–8829

- 100 Pati F, Jang J, Ha D H, et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun*, 2014, 5: 3935
- 101 Mondy W L, Cameron D, Timmermans J P, et al. Computer-aided design of microvasculature systems for use in vascular scaffold production. *Biofabrication*, 2009, 1: 035002
- 102 Duan B, Hockaday L A, Kang K H, et al. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res Part A*, 2013, 101: 1255–1264
- 103 Chang C C, Boland E D, Williams S K, et al. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *J Biomed Mater Res Part B*, 2011, 98: 160–170
- 104 Murphy S V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 773–785