第 38 卷 第 12 期
2025 年 12 月

高 分 子 通 报
POLYMER BULLETIN

Vol. 38, No. 12
December, 2025

·综述·

水凝胶 3D 生物打印：打印技术与水凝胶适配性设计

冯琦[1,2,3] 黄跃[3*] 曹晓东[1,2*]

(华南理工大学 1. 材料科学与工程学院生物医学工程系，2. 国家人体组织功能重建工程技术研究中心，广州 510006；3. 暨南大学口腔医学院，广州 510641)

摘要：3D生物打印能够将由计算机辅助设计生成的三维虚拟模型转化为实体类组织/器官。水凝胶是3D打印中应用最广泛的墨水材料。快速发展的3D打印技术与有限的可打印水凝胶体系之间的矛盾，使得水凝胶墨水的设计与开发成为研究热点。本综述重点介绍3D生物打印技术以及水凝胶适配性设计，涵盖了挤出式生物打印(extrusion bioprinting)、光刻基生物打印(lithography-based bioprinting)、喷墨生物打印(inkjet bioprinting)和4D打印(4D printing)在内的3D生物打印技术及其水凝胶墨水针对性设计策略，并对墨水材料的物理/化学性能的可定制性设计进行了全面讨论。此外，简要概述了水凝胶3D生物打印在组织工程、类器官、软体机器人和柔性可穿戴电子设备等方面的应用，还对水凝胶3D生物打印的未来发展方向进行了展望。本综述以系统总结水凝胶3D打印技术及其墨水材料适配性设计为核心目标，将为水凝胶墨水设计提供理论指导，推动新型墨水材料研发。

关键词：3D生物打印；水凝胶墨水；打印技术

3D Bioprinting Hydrogel: From Printing Technology to Hydrogel Adaptability Design

FENG Qi[1,2,3], HUANG Yue[3*], CAO Xiao-dong[1,2*]

(*1. Department of Biomedical Engineering, School of Materials Science and Engineering, 2. National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction* (*NERC-TRR*)*, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 3. School of Stomatology, Jinan University, Guangzhou 510641, China*)

Abstract: 3D bioprinting has the ability to convert a three-dimensional virtual model into a tissue/organ-like structure. Hydrogels are the most prevalently used ink materials in 3D printing. The disparity between the rapidly advancing 3D printing technology and the restricted printable hydrogel systems has rendered the development of hydrogel inks a focal point of research. This review centers on 3D bioprinting technology and the compatibility design of hydrogels. It encompasses various 3D bioprinting techniques, such as extrusion bioprinting, lithography-based bioprinting, inkjet bioprinting, and 4D printing, along with the targeted design strategies for their respective hydrogel inks. A comprehensive exploration of the customizable design of the physical and chemical properties of ink materials is presented. Furthermore, this review briefly delineates the applications of 3D bioprinting hydrogel in tissue engineering, organoids, soft robots, and flexible wearable electronic devices. It also offers insights into the future development trajectories of 3D bioprinting hydrogel. With the primary aim of systematically summarizing 3D printing hydrogel technology and the compatibility design of its ink materials, this review aims to provide theoretical guidance for the design of hydrogel inks and facilitate the research and development of novel ink materials.

Keywords: 3D bioprinting; Hydrogel ink; Printing technology

高分子水凝胶专题；2025-08-05 收稿，2025-09-12 录用，2025-11-19 网络出版
基金项目：国家自然科学基金(基金号 52203164, 52272276, 82370995)
* 通信联系人：黄跃，E-mail: yue-huang@hotmail.com；曹晓东，E-mail: caoxd@scut.edu.cn
doi: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2025.25.220

引用：冯琦，黄跃，曹晓东. 水凝胶3D生物打印：打印技术与水凝胶适配性设计. 高分子通报，**2025**, 38(12), 1721–1753.
Citation: Feng, Q.; Huang, Y.; Cao, X. D. 3D Bioprinting hydrogel: from printing technology to hydrogel adaptability design. *Polym. Bull.* (in Chinese), **2025**, 38(12), 1721–1753.

3D打印，又称增材制造，是一种通过计算机辅助设计/计算机辅助制造(CAD/CAM)的技术；其依据预先设定的数字模型，逐层沉积材料(墨水)来制造3D物体[1]。3D打印能够通过CAD/CAM技术直接生产出个性化定制的复杂金属、陶瓷、玻璃、聚合物和多材料部件[2~6]。与通常需要模具和机械加工的传统成型和减材制造技术相比，3D打印更具灵活性，材料和工艺上的浪费更少，因此在时间成本和经济成本方面更具优势。由于这些原因，3D打印被视为下一场全球性的工业和制造业革命，在航空航天、汽车、机器人技术、能源、教育、食品、化工、制药、生物医学等多个工业领域得到了广泛应用[7]。

随着人口老龄化趋势的加快以及人类寿命的延长，对于替代或再生修复受损、受伤及患病组织和器官的生物材料的需求日益增加[8]。用于组织和器官再生的新一代生物材料应具备生物可降解性、生物活性、适宜的机械强度以及形状结构可塑性[9]。3D生物打印技术为制造具有特定性能的患者专用支架提供了可能，在生物医学领域取得了显著进展[10]。在3D生物打印的设计和应用中，选择合适的材料作为生物墨水至关重要。聚合物水凝胶，即高度水合的三维聚合物网络，是用于制造3D多孔支架的最常用的墨水材料之一[11]。水凝胶能够模拟细胞外基质(ECM)并调节细胞命运[12]。此外，细胞在这些打印支架上的行为可以通过改变水凝胶的组成、物理和化学性质来调节[13]。

快速发展的3D打印技术与有限的可打印水凝胶体系之间的矛盾，在一定程度上限制了生物3D打印的发展，因此新型水凝胶墨水的设计与开发亟需突破，已成为一个活跃的研究方向。选择水凝胶或可形成水凝胶的聚合物溶液作为3D打印墨水，需要对其物理、化学和生物特性(如降解性、加工性、生物相容性、机械强度、凝胶化机制、化学改性的难易程度、成分、结构和动态特性)，以及电学、光学、热学或刺激响应性等其他功能特性进行控制。本综述以“水凝胶墨水在不同打印技术中的适配性设计”为核心(图1)。首先，详细阐述了各种3D打印技术，包括挤出式打印、光刻基打印、喷墨打印和4D打印，及其对水凝胶墨水性能的要求，这些要求涵盖了触变性、透光率、墨水与基底材料的互作以及响应性等方面。在此基础上，提出了水凝胶墨水的基本设计要素，包括聚合物组成与改性、添加剂、交联机制等。最后，概述了水凝胶墨水在生物医学领域的前沿应用和未来发展趋势。本综述旨在系统总结水凝胶墨水适配性设计方面的理论原则，为水凝胶墨水的研究与开发提供理论指导。

1 挤出式生物打印及其墨水材料设计

挤出式生物打印策略是最早出现的生物打印模式之一[14]。在挤出生物打印过程中，生物墨水被装入打印头，从喷嘴挤出形成细丝，这些细丝通常以逐层的方式沉积，从而构建出所需的结构[15]。由于其成本效益高且操作简便，与诸如液滴和基于光交联的生物打印等其他方式相比，挤出生物打印是最常用的生物打印方式。

1.1 分类

1.1.1 传统挤出式打印

传统挤出式生物打印技术可分为两类：气动挤出和机械挤出[16](图2a)。气动挤出利用压缩气体(如空气或氮气)将生物墨水从喷嘴挤出，挤出生物墨水的流量(体积)由压力控制。机械挤出则通过活塞或螺杆施加机械力来挤出生物墨水。气动挤出式生物打印机的喷头组件比机械挤出式的简单，但其控制精度较差。机械挤出方法允许生物墨水被回抽或者挤出；这种回抽功能有利于打印丝束末端实现更干净的切割以及在必要时进行错误修正来提高形状保真度。

1.1.2 嵌入式生物打印

嵌入式生物打印，即采用支撑基质实现软性生物材料在三维空间中的自由沉积(图2b)。这一概念最早出现在2011年，研究者将Pluronic F127墨水打印到Pluronic F127-二丙烯酸酯(F127-DA)支撑浴中[17]。在F127-DA支撑浴中通过光交联

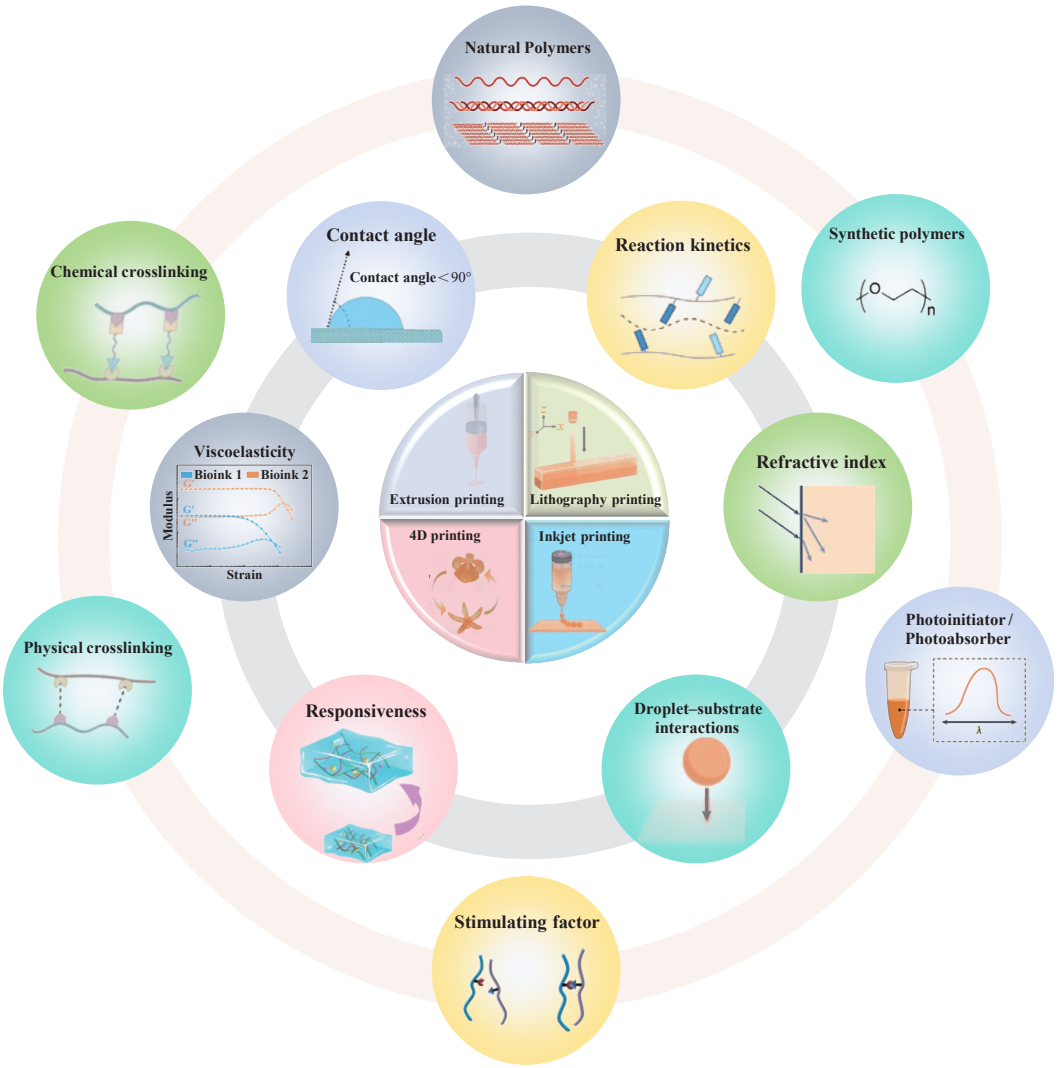


图 1　水凝胶墨水的适配性设计。最内层展示了 4 种常见的 3D 打印类型；中间层为不同打印方式对墨水性能的要求；最外层表示墨水材料的设计要素

Figure 1　The adaptability design of hydrogel inks. The innermost layer presents four common types of 3D printing; the middle layer depicts the performance requirements for inks under different printing methods; the outermost layer illustrates the design elements of ink materials

形成稳定水凝胶后，将温度降至Pluronic F127的相变点以下，使其溶胶，从而形成类似微血管网络的图案。通过嵌入式打印技术，既可以将组织细胞嵌入水凝胶墨水中，也可以在去除模板后，在生成的通道表面接种细胞。嵌入式生物打印的关键在于支撑浴：支撑浴须具有较高的剪切弹性模量，以支撑挤出的生物墨水细丝，并且其屈服应力应较低，以便喷嘴移动。通过在生物打印后选择性地去除支撑浴，可以获得生物打印的个性化3D结构[18]。相反，如果需要在生物打印后保留支撑浴结构，可以将支撑浴成分交联，将沉积的生物墨水图案通过溶胶方式清除[19]。

1.1.3　共轴生物打印

共轴生物打印基于湿纺技术原理，即将墨水材料挤出到凝固浴中以生成纤维结构(图2c)。共轴生物打印通常使用海藻酸钠溶液作为墨水材料，其在接触诸如来自氯化钙溶液的Ca^{2+}等二价离子时能迅速发生物理交联[20]。共轴生物打印避免了需要使用具有严格流变学要求的墨水材料。此外，共轴生物打印技术能够挤出中空纤维。生物墨水中的海藻酸盐成分会立即与氯化钙溶液物理交联，从而稳定地生成小管状组织结构[21]。使用其他挤出式生物打印方法很难实现这一功能。

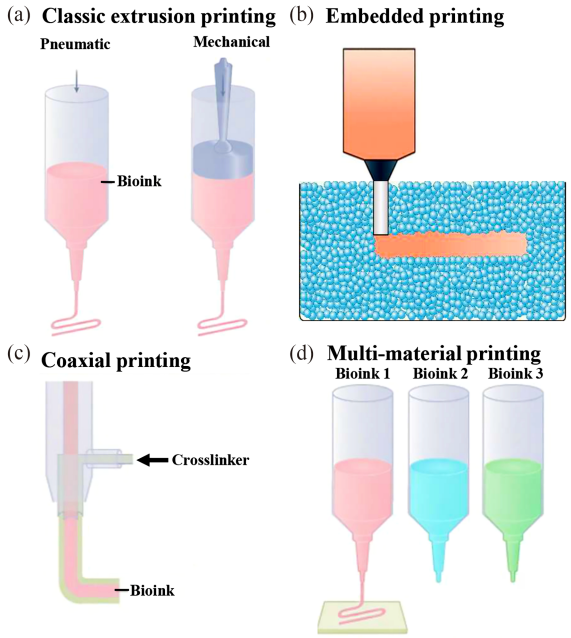


图 2 挤出式打印分类:(a)传统挤出式打印,包括气动挤出和机械挤出;(b)嵌入式打印;(c)共轴打印;(d)多材料打印

Figure 2 Classification of extrusion printing: (a) traditional extrusion printing, encompassing pneumatic extrusion and mechanical extrusion; (b) embedded printing; (c) coaxial printing; (d) multi-material printing

1.1.4 多材料生物打印

多材料生物打印能够生成复杂的组织结构,以模拟体内由多种成分构成且空间异质性的组织结构(图2d)。在传统的挤出式生物打印中,最简单的多材料打印方法是使用多个喷头,这些喷头在三维空间中挤出所需的生物墨水[22]。最近的研究表明,多个出口可以组合成一个喷嘴,从而实现多通道、单喷嘴的多材料生物打印[23]。这种设置在交替挤出生物墨水时无需物理切换喷嘴,相比使用多个喷头可显著提高打印速度。这种技术的一个局限在于通道间的紧密接触会导致生物墨水发生一定程度的“污染”。将微流控芯片集成到喷头上,可以进一步增强生物墨水的切换能力,实现并行或串行生物墨水沉积,或者在挤出过程中混合生物墨水[24]。

1.2 墨水性能要求

1.2.1 物理性能

生物墨水的表面张力和润湿性是挤出式生物打印的重要物理参数[25,26]。生物墨水的表面张力是指作用于生物墨水表面单位长度轮廓上的内力;它在生物墨水微丝的形成过程中起着关键作用。较大的表面张力会导致在打印过程中墨水形成液滴或附着在喷嘴尖端;表面张力过小,会导致沉积在平台上的微丝结构塌陷,难以维持原有形状和轮廓。生物墨水的润湿性是指其与包括喷嘴和收集平台在内的固体表面保持接触(在一定接触角下)的能力,这是影响打印平台上沉积的第一层生物墨水的重要参数(图3a)。生物墨水与打印平台的接触角越大,在垂直方向上打印结构的保真度越高;生物墨水与打印平台的接触角越小,打印结构在打印平台上越牢固,从而避免打印结构在逐层打印过程中出现滑移,有助于保持结构的完整性。

1.2.2 流变性能

生物墨水的流变学特性与其流动阻力相关,通常通过生物墨水内部的剪切应力与剪切速率之间的关系来表征,其中剪切应力与剪切速率的比值称为表观黏度或简称为黏度。生物墨水的流变特性可通过生物材料浓度、细胞密度、温度等来调节[27]。

生物墨水的流变特性会对生物打印过程产生显著影响[28](图3a)。一方面,较高的黏度能够提高可打印性。因为黏度较高的生物墨水在打印后更难流动和扩散,从而有助于保持打印出的细丝和三维结构。此外,具有足够黏度的生物墨水能够将封装的细胞固定在原位,防止细胞沉降。但是,较高的黏度需要较大的压力来进行生物打印,这会增加打印过程中对细胞的作用力,从而损伤细胞活性。在挤出式生物打印中,通常希望生物墨水具有剪切稀化特性(即黏度随剪切应力增加而降低),并且当生物墨水从打印喷嘴中流出后,剪切应力消失,其黏度会迅速恢复,从而保证细丝的高保真度[29]。

1.2.3 机械性能

生物墨水的机械性能在组织工程应用中起着重要作用。用生物墨水打印的支架需为细胞提供三维结构和机械支撑,以促进细胞迁移、增殖和/或分化等过程,从而生长出功能性的组织工程支架或有活力的组织[30]。在许多组织工程应用中,弹性和屈服应力是重要的机械性能[31]。鉴于许多组织,如神经、皮肤、肺、骨和肌腱,都表现出黏弹性特征,近期的研究多着眼于生物墨水中的黏弹性表征[32]。黏弹性通过储能模量和损耗模量来表征(图3a)。储能模量反映了黏弹性材料以弹性

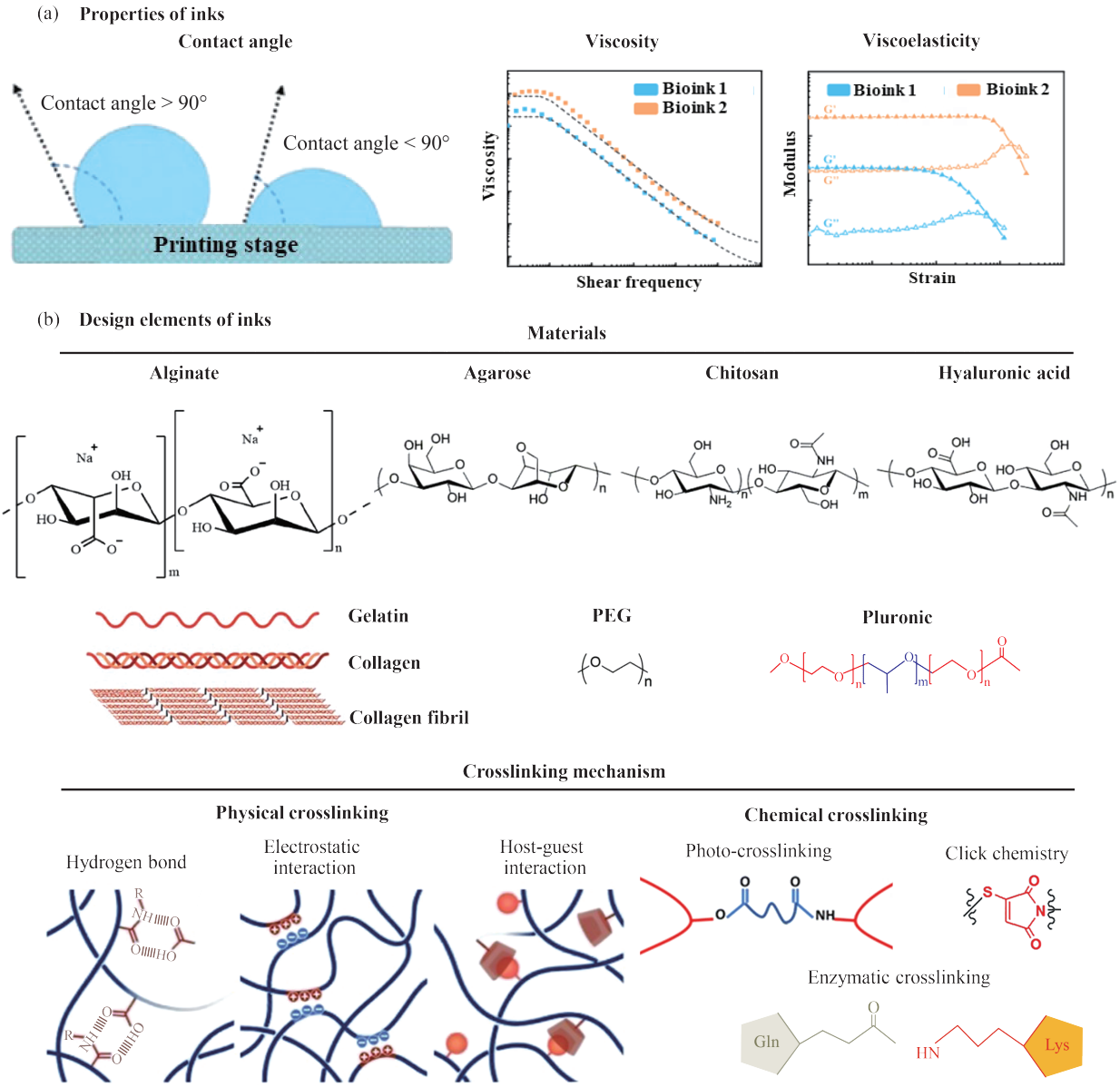


图 3　适配挤出式打印的水凝胶墨水设计：(a)墨水性能；(b)墨水设计要素

Figure 3　Adaptability design of hydrogel inks for extrusion printing: (a) ink properties; (b) design elements of inks

方式储存能量的能力，而损耗模量则代表了材料黏性成分耗散的能量。值得注意的是，对于给定的材料或溶液，通过振荡流变仪表征的储能模量和损耗模量并非恒定不变，而是取决于所施加正弦应变的频率和振幅。因此，需先进行频率扫描测试(如在恒定应变条件下从 0.01 到 100 Hz)和应变扫描测试(如在 1 Hz 的恒定频率下从 0.01% 到 100%)，以测量和表征储能模量和损耗模量，以及损耗角(或应力与应变之间的相位角)。借助蠕变和松弛测试，也可以量化墨水材料的黏弹性。蠕变测试用于分析材料在恒定应力下的应变行为，而应力松弛测试则是在恒定应变条件下测试材料的应力变化。

1.3　墨水材料设计要素

1.3.1　材料组成

用于生物打印的生物材料大多由聚合物组成。聚合物具有长链结构，能够提供类似组织的水合环境，支持细胞表型(如细胞黏附、增殖和分化)以及组织再生。聚合物分为天然聚合物和合成聚合物；天然聚合物具有内在生物活性，而合成聚合物通常为生物惰性，但具有良好的机械性能。

1.3.1.1　天然聚合物

海藻酸盐主要从褐藻中提取。这一类天然聚合物由*β*-*D*-甘露糖醛酸(M)和*α*-*L*-古洛糖醛酸(G)

组成(图3b)。海藻酸盐中G单元和M单元的比例不同，其分子量可在50~10×10^4 kDa之间变化。由于易发生离子交联、吸水性好以及成本低廉，海藻酸盐在挤出生物打印中得到了广泛应用[33]。然而，海藻酸盐缺乏黏附分子或跨膜糖蛋白，使得其缺乏与细胞的相互作用。

壳聚糖是一种常见的天然聚合物，存在于甲壳类动物的外壳和真菌细胞壁中，它是通过碱性脱乙酰化作用从几丁质中提取得到的。壳聚糖是一种线性多糖，由随机分布的*N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺(乙酰化单元)和*β*-(1-4)连接的*D*-葡萄糖胺(脱乙酰化单元)组成(图3b)。壳聚糖在低于其p*K*a (pH=6.5)的稀酸性介质中易溶，而几丁质在有机溶剂和常规溶剂中均不溶。壳聚糖具有价格低廉、无毒、可生物降解、抗菌等优势。由于酸性环境不利于细胞存活，无法使用传统的壳聚糖溶液和活细胞进行生物打印。为解决这一问题，需对壳聚糖进行化学改性，使其能在水中溶解且呈中性[34]。壳聚糖能够通过离子交联与多种化合物形成交联网络，如柠檬酸盐和磷酸盐等；与其他聚阴离子，如海藻酸盐、透明质酸等，也可以交联[35]。

琼脂糖是一种从海藻(红藻)中提取的天然水溶性多糖，可通过温度控制实现溶胶—凝胶转变(图3b)。通常，琼脂糖溶液在温度降至26~30 ℃时会迅速凝胶化，使其具有可打印性。然而，由于琼脂糖缺乏细胞黏附位点，其对细胞生长的支持有限，并且会随时间降解。由于其生物惰性，琼脂糖常用于形成细胞聚集体[36]。此外，由于其温敏性，琼脂糖还被用作构建血管化结构的“牺牲材料”[37]。首先，打印出预先设定的琼脂糖纤维结构，然后将功能性生物材料和细胞浇铸在纤维上并进行交联。通过温度控制，琼脂糖纤维会发生溶胶并被去除，从而留下图案化的通道。

透明质酸是细胞外基质(ECM)中最为常见的糖胺聚糖(图3b)。它遍布人体，主要存在于结缔组织、上皮组织和神经组织中。透明质酸具有抗炎作用，在临床上被广泛用作伤口愈合的皮肤填充剂，其润滑特性也使其可被用作关节滑液[38]。透明质酸可溶于水，黏度高，因此常被用作生物打印中调整墨水黏度的辅助材料[39]。透明质酸具有可调的物理特性和生物活性，是细胞打印的理想材料。

胶原蛋白是人体内一种丰富的天然蛋白质，由通过氢键和共价键结合在一起的自聚集多肽链组成(图3b)。因具有细胞黏附位点和良好的生物活性，胶原蛋白可直接影响细胞黏附和其他细胞行为。其中，I型胶原蛋白在生物打印中应用最为广泛。它可溶于弱酸性水溶液中，并能在37 ℃和中性条件下交联[40]。

明胶是通过胶原蛋白部分水解得到的天然蛋白，具有良好的生物相容性、无免疫原性、细胞亲和性以及在体内可完全降解等优点(图3b)。与胶原蛋白类似，明胶对温度敏感，在低温下会发生交联。当温度升高到生理范围或更高时，会发生凝胶-溶胶转变。因此，在挤出式生物打印中，研究人员使用了包括戊二醛、京尼平等化学物质来提高明胶的可打印性和稳定性；或者，通过化学修饰形成甲基丙烯酸化明胶(GelMA)来改善明胶基3D打印结构的机械强度和稳定性[41,42]。

1.3.1.2 合成聚合物

聚乙二醇(PEG)是生物打印中应用最广泛的合成水凝胶，这主要归因于其易于调节的理化特性。它通过环氧乙烷的缩聚反应制得，能够结合水分子，从而增加内部水的保留量[43](图3b)。PEG可溶于水，具有代谢惰性、生物相容性、低免疫原性。其溶液可通过物理、离子或共价键合方法交联成水凝胶[44]。PEG水凝胶具有高渗透性，有利于营养物质和代谢废物的交换，以支持细胞代谢；因此，它们常被用于封装细胞，以实现细胞递送[45]。

普朗尼克是一种基于聚环氧乙烷的三嵌段共聚物，由聚乙二醇和疏水性的聚丙二醇以A-B-A三嵌段结构排列而成(图3b)。由于其具有热敏性，在22~37 ℃ (取决于聚合物浓度)的阈值温度以上，丙二醇侧链的溶解度降低，从而发生凝胶化。普朗尼克还可用作嵌入式打印的牺牲材料，用于制造生物打印的模具、通道或血管系统，或者作为临时支撑结构[46]。

1.3.1.3 复合聚合物

天然聚合物具有良好的生物相容性，合成聚合物具有较高的机械强度。然而，单一材料的机械/生物性能往往有限，这就需要构建复合材料。此外，单一材料的性能可能不易控制或不够稳定，从而降低其在某些应用中的适用性。通常，水凝胶复合材料由以下2种类型制成：(1)2种或2种以上可形成水凝胶的聚合物；(2)聚合物与填料的组

合。例如，由I型胶原蛋白和脱细胞基质合成的复合水凝胶，其机械性能和生物性能均优于仅由一种材料制成的水凝胶[47]；由海藻酸盐和I型胶原蛋白合成的复合水凝胶，其流变性能和压缩性能也有所改善[48]。羟基磷灰石、硅酸盐纳米颗粒和磷酸钙等生物活性陶瓷纳米颗粒已被用于合成生物活性复合水凝胶[49]。碳基材料可用于增强墨水材料的导电性，以及支架的机械性能和生物活性[50](图4)。

1.3.2　交联机制

1.3.2.1　物理交联

大分子通过非共价键组装成水凝胶的物理过程通常是可逆的。它们可在溶胶后可快速凝胶化，生物相容性好，反应过程不产生副产物，不需要任何额外的化学试剂(如光引发剂、偶联试剂等)。物理交联水凝胶缺点是降解速度比化学交联水凝胶快，机械性能相对较弱。不过，物理交联水凝胶具有良好的自愈合特性，打印后无挤压痕迹、无界面区等，且剪切应力低。物理交联包含分子间和分子内的弱相互作用，如自组装(self-assembly)、聚集(aggregation)、凝聚(coacervate gelation)、主客体(host-guest)以及离子交联(ionotropic gelation)[51](图3b)。

聚合物通过氢键、π-π堆积、疏水作用力和范德华力进行物理交联，可形成具有足够黏度的墨水材料[52]。当存在特异性识别时，我们称之为自组装；当只是通过弱结合组装，没有特异性时，我们称之为聚集。凝聚是通过聚合物链之间的吸引力形成的，这种吸引力主要是疏水作用力。能够以上述方式交联的墨水材料包括脱细胞基质材料、胶原蛋白、透明质酸、丝素蛋白、琼脂糖、多肽、DNA基材料以及温敏性材料(如PNIPAM、普朗尼克等)。

主–客体相互作用是2个化学基团(主体分子和客体分子)之间的自我识别和非共价相互作用[53]。主体分子(如葫芦脲、环糊精等)通常是由多个糖醛酸单元组成的中间为疏水空腔的多环分子，其疏水空腔可与疏水客体分子(如疏水烷基链、金刚烷等)形成疏水相互作用。

离子交联是由2条或多条聚合物链中的阴离子分子与阳离子络合引发的，结合力较强。以海藻酸和结冷胶为例，二价阳离子(如Ca^{2+})需要与至少2个糖单元上的羧酸根离子(COO^-)形成离子键，以形成三维网络[54]。

1.3.2.2　共价交联

聚合物共价交联可形成化学交联水凝胶。由此产生的水凝胶通过自发或响应性水解(如pH值、酶、紫外线等)以时间依赖性方式降解；生物墨水中的细胞会产生细胞外基质，在水凝胶降解后取代水凝胶。支架在此期间将起到支撑作用，因此需要根据目标应用的不同，对降解速度进行控制。相较于以非共价相互作用形成的物理交联水凝胶，以共价键形成的化学交联水凝胶更加稳定。共价交联主要是光交联和酶交联，以及点击化学交联(如thiol-Michael加成反应、席夫碱反应、叠氮–炔反应等)(图3b)。

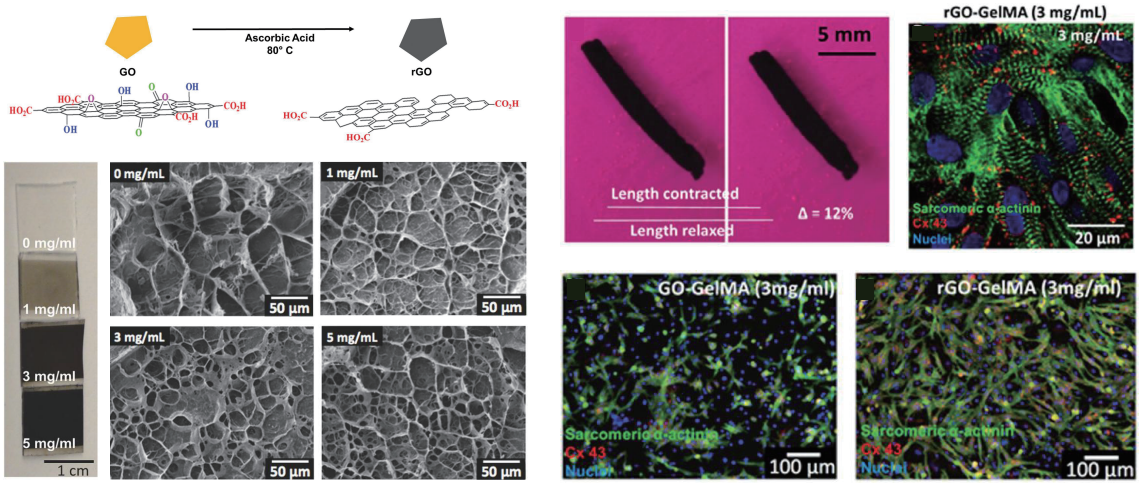


图 4　复合还原氧化石墨烯的水凝胶墨水[50] (2016 John Wiley and Sons 版权许可)

Figure 4　Hydrogel ink incorporated with reduced graphene oxide (Reprinted with permission from Ref. [50]; Copyright 2016 John Wiley and Sons)

光交联：当生物墨水中存在光敏基团(碳碳双键、巯基、苯酚等)和光引发剂时，在光(紫外光、蓝光、绿光等)照射下可引发交联反应[55]。生物墨水的光交联速度一般非常快(几秒钟)，含有细胞的液态生物墨水可以在打印后立即凝胶化。光交联反应的主要缺点是光引发剂的毒性。只有少数光引发剂可以在水中低浓度使用，因此用于生物打印的光引发剂种类有限，使用最多的是Irgacure 2959 (I2959) (其吸收波长为257 nm)，苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)膦酸锂(LAP)，其吸收波长为375 nm，毒性低于Irgacure，以及曙红Y，其吸收波长为 514 nm，对细胞的氧化应激作用较小[56]。

酶交联：酶是一种极具吸引力的辅助剂，可在细胞相容性条件下催化化学交联，目前应用较多的是转谷氨酰胺酶、单胺氧化酶B和凝血酶[57]。然而，酶价格昂贵，而且从动物提取物和重组细菌中提取的酶不易与人体相容，这些问题阻碍了酶交联技术在3D打印中的广泛应用。转谷氨酰胺酶催化赖氨酸和谷氨酰胺侧链之间发生反酰胺化反应，产生链间酰胺键。单胺氧化酶B通过苯并咪唑中间体将苄胺转化为苯甲醛，苯甲醛可进一步与伯胺发生席夫碱反应。单胺氧化酶B催化反应会产生过氧化氢，对细胞有毒。纤维蛋白原是一种六聚体糖蛋白，凝血酶可裂解其α和β链的N端，导致其D和E结构域之间的自组装，从而交联形成纤维蛋白纤维。

点击化学交联：点击反应也被用于生物墨水交联，这些反应都是在水中以生物正交的方式进行的，具有高度选择性。与丙烯酸酯的光交联反应不同，这种反应是在2种不同类型的反应基团(如醛和酰肼、马来酰亚胺和硫醇)之间进行的[58]。这意味着必须使用2种(或2种以上)不同聚合物来形成交联网络，且每种聚合物需带有不同的反应基团。以巯基–烯间的迈克尔加成反应为例，该反应不会产生副产物，而且具有高选择性[59]。需要注意的是，反应发生通常需要几分钟的时间，如果黏度不够，生物墨水需要增稠到足够程度才能进行打印。醛和酰肼可发生席夫碱反应形成腙键。这种反应是可逆的，且凝胶—溶胶转变与溶液pH值有关[60]。

2 光刻基打印及其墨水材料设计

光刻基3D生物打印包括立体光刻、数字光处理(DLP)和体积三维打印(VAM)，是一种极有前景的技术[61]。它们通过计算机辅助设计(CAD)定义图案，依靠光反应性液体树脂的交联，采用自上而下或自下而上的光投影模式形成高精度复杂结构。与挤出或喷墨打印等传统的增材制造方法不同，光刻基3D生物打印能够达到更精细的分辨率(≤50 μm)和更快的打印速度(数秒)[62]。

2.1 分类

2.1.1 立体光刻和双光子聚合

立体光刻(SLA)和双光子聚合均采用连续或脉冲激光在料槽表面或料槽内部进行扫描，以逐点线性方式将光反应性树脂交联成三维物体(图5a)。大多数立体光刻系统由高功率激光源、高数值孔径聚焦物镜和可移动工作台组成[63]。受控激光束按照预定路径对聚合物进行交联，达到所需的深度。光固化墨水，包括合成树脂、胶原蛋白、明胶和透明质酸，可用于有细胞或无细胞的打印[64-66]。双光子聚合需要使用专门的光引发剂来产生自由基，从而在墨水内引发交联反应。然而，立体光刻和双光子聚合的高分辨率往往是以较长的制造时间(数小时)为代价的。此外，因用于将激光脉冲聚焦到墨水中的显微镜物镜的工作距离有限，该类打印方式难以制造大尺寸的结构(厘米级)[67]。

2.1.2 数字光处理

数字光处理(DLP)是水凝胶中应用最广泛的光刻基打印方法之一。它通过自上而下或自下而上的光投影实现三维物体的逐步制造(图5a)[68]。通过在墨水上逐层投影连续的二维切片图像而逐层构建出三维结构。这种逐层投影方式是通过使用可在z方向移动的电动构建平台实现的。每个图层都是由方形像素组成的二维阵列，投影后形成单层矩形单元，称为体素。打印时间取决于每层的深度和曝光时间，而非x-y方向的尺寸。DLP的一个局限性是阶梯效应：由于逐层堆叠的制造特性，3D打印物体的表面会形成肉眼可见的阶梯状纹路[69]。

2.1.3 体积增材制造

体积增材制造(VAM)，也称为轴向光刻，是一

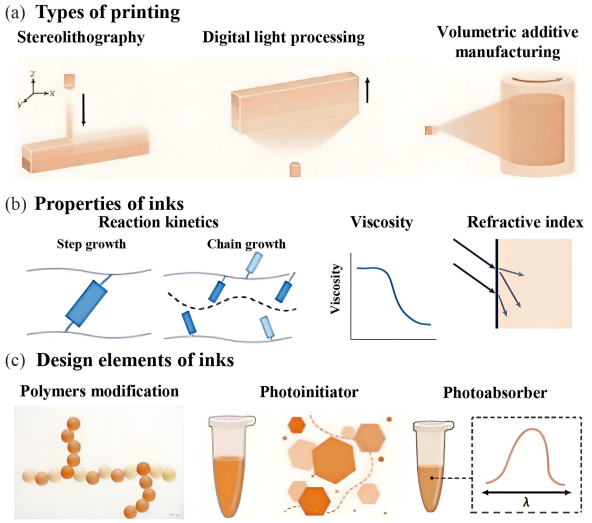


图 5　喷墨打印类型及其墨水设配性设计：(a)打印分类；(b)墨水性能；(c)墨水设计要素

Figure 5　Types of inkjet printing and the adaptability design of ink: (a) classification of inkjet printing; (b) ink performance; (c) design elements of ink

种新型光刻基打印技术，它依靠光投影实现体积光聚合，类似于3D共焦层析成像(图5a)。装有光敏墨水容器的旋转与分层图像的投影同步，使得来自各个角度投影的图案所形成的三维光剂量得以累积，从而实现体素的固化，而非逐层固化[70]。与DLP不同，在VAM中，CAD 模型在z轴方向上构建，与打印物体的旋转轴平行。为了在容器内获得适当的光剂量，墨水溶液应具有高光学透明度，以防止光在墨水溶液内散射或衰减，并且交联后墨水不会出现明显的浊度变化。理想情况下，打印的所有部分应同时聚合；然而，事实并非总是如此，对于小于氧扩散长度的精细结构，它们往往固化不足[71]。此外，在旋转液槽期间，必须尽量减少打印物体的相对运动，以避免对打印分辨率和形状保真度产生不利影响。因此，需要使用黏度高于10000 Pa·s的墨水，也可以向墨水中添加诸如明胶和琼脂糖之类的牺牲型热可逆聚合物来提高其黏度，从而实现VAM打印；打印后可以通过改变温度来去除这些聚合物[72]。由于VAM采用的是体积光投影，因此与平面光投影或点线性光投影相比，打印相同尺寸的物体通常要快得多。

2.2　墨水性能要求

2.2.1　反应动力学

光引发反应的反应动力学对于光刻基打印工艺至关重要。链式增长聚合和逐步增长聚合这2种反应类型均可用于实现墨水的凝胶化(图5b)。所选择的反应类型取决于所用单体或大分子的化学性质。单体和大分子含有的反应活性功能基团会影响墨水的聚合速率，其中，丙烯酸酯>丙烯酰胺>乙烯酯≈碳酸乙烯酯>甲基丙烯酸酯>甲基丙烯酰胺[73]。自由基链式增长聚合反应始于光引发剂受光照射形成自由基，然后进行链增长，最后终止。尽管链式增长反应受氧气抑制，但在低转化率(<2%)时也能实现凝胶化[69]。相比之下，逐步增长聚合反应虽不受氧的影响，能形成更均匀的网络结构，反应速率更快，但达到凝胶化所需的转化率更高[74]。富电子烯烃，如降冰片烯、烯丙基醚和乙烯基醚，与硫醇的反应速度比贫电子烯烃(如丙烯腈)快。其反应活性顺序如下：降冰片烯>烯丙基醚≥乙烯基醚>马来酰亚胺>甲基丙烯酸酯[75]。

2.2.2　墨水黏度

在光固化成型工艺中，墨水的黏度是一个重要参数，它会影响反应动力学、氧气扩散以及打印过程中物体所受的力(图5b)[69]。低黏度的墨水能使单体的反应速度加快，但也会导致氧气在墨水中的扩散过快，阻碍反应。整体来说，低黏度墨水更适合DLP技术，有利于平台抬起和打印层之间的结合。然而，低黏度墨水易引起细胞沉淀，会导致细胞分布不均；可向墨水中添加诸如Percoll(聚乙烯吡咯烷酮包覆的蚕丝颗粒胶体)、丝素蛋白或黄原胶之类的浮力调节剂来防止细胞沉淀[76]。在VAM中，通常使用高黏度的墨水来稳定旋转料池中的打印结构。墨水的黏度取决于聚合物的带电性(带电或中性)、浓度、分子量和结构(线性或支链)[73]。高分子量的线性聚合物，更易形成链缠结，从而增加墨水的黏度，而支链聚合物难以堆积，缠结较少，墨水黏度也较低。

2.2.3　透光率和折射率

在组织/器官打印中，需要较高的细胞密度才能重现天然组织的复杂性和功能；然而，细胞具有高度异质性，并且含有亚细胞器，这些亚细胞器会成为散射体。光的散射会降低横向分辨率，并减少垂直方向上的光穿透深度，尤其是在自下而上或自上而下的光投影中(图5b)。为了克服细胞与周围介质之间的折射率不匹配问题，碘克沙醇——一种生物相容性的造影剂，可使墨水介质

的折射率与细胞相匹配，被用于DLP和VAM技术，以实现高密度细胞悬液、细胞团和类器官打印[77]。在墨水中加入碘克沙醇后，光散射减少了10倍，分辨率可提高到50 μm，生物墨水中的细胞密度可提升到1×10^9个/mL[78] (图6a)。除了细胞之外，墨水中也可能存在纳米颗粒和水凝胶微粒等其他散射体。通过校正光的衰减以及增加图案的模糊度来修改投影图案，可以补偿散射[79]。除了实验操作外，还可以应用深度学习算法来生成能够补偿散射的打印参数[80]。

2.3 墨水材料设计要素

2.3.1 墨水类型和修饰

天然聚合物，例如明胶、透明质酸、丝素蛋白、海藻酸盐、纤维素、壳聚糖、卡拉胶、脱细胞基质等，通过引入反应性基团进行改性，可用于光刻基打印(图5c)[81~83]。它们具有生物降解性、生物活性、

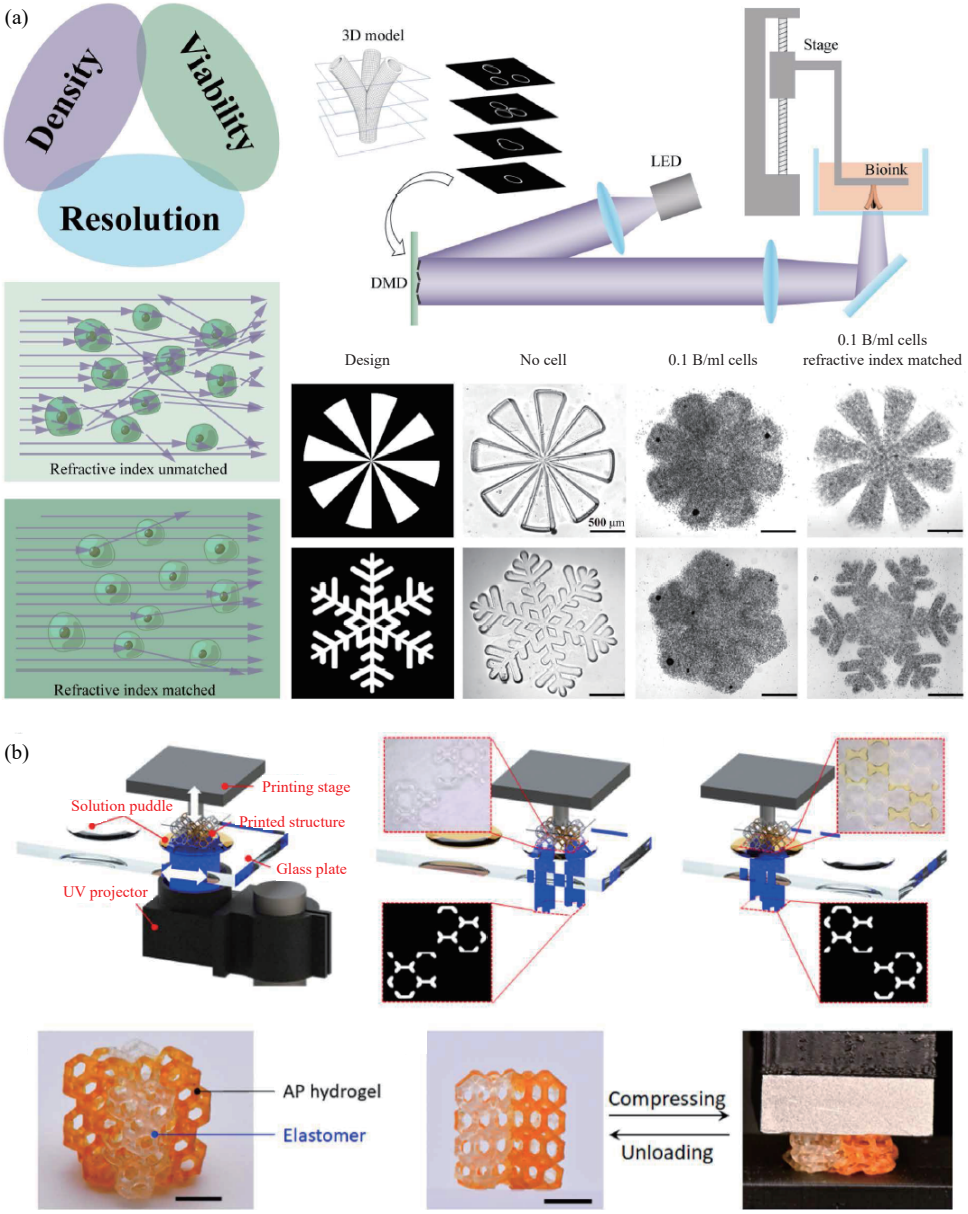


图6 用于光刻基生物打印的水凝胶墨水材料。(a)碘克沙醇改善光敏墨水光散射，提升打印精度[78] (2023 Science版权许可)；(b)合成聚合物墨水用于 DLP 打印[85] (2018 Science 版权许可)

Figure 6 Hydrogel ink materials for photolithography-based bioprinting. (a) Ioxaglate enhances the light scattering of photosensitive inks, thereby improving the printing accuracy (Reprinted with permission from Ref. [78]; Copyright 2023 The American Association for the Advancement of Science); (b) Synthetic polymer inks are employed for DLP printing (Reprinted with permission from Ref. [85]; Copyright 2018 The American Association for the Advancement of Science)

低免疫原性和生物相容性等优点。由于光聚合反应对交联动力学的变化非常敏感，因此批次间差异、分子量和功能化程度等都会影响光聚合反应，这限制了天然聚合物的应用。相比之下，合成单体或聚合物，包括聚乙二醇、聚乙烯醇和聚丙烯酰胺等，具有高度可调性，更易实现光刻基打印，且可通过引入细胞调控因子(如多肽、抗体等)调控细胞的黏附、生长和分化等行为[84,85](图6b)。

2.3.2　光引发剂

光引发剂能够吸收恒定波长的光，产生自由基以引发交联反应，是光刻基打印中的关键成分(图5c)。此外，在进行细胞打印时，光引发剂还必须具有水溶性、细胞相容性，以及高光吸收率，即使在低强度光照下也具有高量子产率。光引发剂分为两类。第一类光引发剂由单一成分组成，通常在紫外线或可见光范围内发生吸收，从而分解成激发态，随后产生自由基。最常用的I型引发剂包括Irgacure 2959、LAP、2,2'-偶氮双[2-甲基-*N*-(2-羟乙基)丙酰胺] (VA-086)、2-甲基-1-[4-(甲硫基)苯基]-2-(4-吗啉基)-1-丙酮(Irgacure 907)和 2,4,6-三甲基苯甲酰基二苯基氧化膦纳米粒子[86]。II型引发剂由光引发剂与共引发剂组合而成。在可见光范围内有吸收的引发剂，包括核黄素、伊红Y和六水合二氯化钌(II)三(2,2'-联吡啶)，以及共引发剂，例如过硫酸钠、过硫酸铵等[73]。在可见光照射下，基态的引发剂会被激发，并通过向共引发剂转移电子而被氧化。光引发剂浓度的增加能显著提高光聚合速率，但同时也会产生一些不利影响，包括由于自由基扩散到光照区域之外而导致的过度交联，由于自由基增多而造成的聚合物链变短以及光衰减导致的固化深度减小等[87]。

2.3.3　光抑制剂和光吸收剂

在光刻基打印中，光抑制剂和光吸收剂对于控制光聚合反应至关重要。光抑制剂可作为稳定的自由基淬灭剂，终止正在生长的聚合物链，从而终止聚合反应。光吸收剂通过与光引发剂竞争吸收光，从而以剂量依赖的方式延迟聚合反应的启动(图5c)。光吸收剂对光的吸收作用会减少光的穿透深度，并增加达到凝胶化所需的临界能量。与光引发剂类似，理想的光吸收剂应具有低细胞毒性、在光源波长处具有高吸收率，并且在水凝胶制备完成后能够充分洗脱。添加光吸收剂后，墨水的光转化率会随打印深度的增加而递减，因此必须平衡其浓度，以提高打印分辨率而不损失机械强度。酒石黄是一种黄色食用色素，其最大吸收波长为405 nm，是用于细胞打印的常用光吸收剂之一[68]。光吸收剂主要是天然和合成染料，如胭脂红4R、姜黄素、花青素或经过修饰的生物大分子[88]。生物相容性无机纳米粒子，如金或二氧化钛，也能赋予墨水光衰减特性，但可能会产生光散射或阻碍成像等不良影响[68]。

2.3.4　氧抑制剂

空气中以及墨水中的溶解氧，能够与光聚合过程中引发/增长阶段产生的自由基发生反应，导致自由基淬灭、链增长终止、聚合速率降低。这会阻碍打印层的固化，从而对打印体的机械性能和分辨率产生不利影响。通过增加辐照能量、在惰性环境中交联、打印前对墨水进行脱气处理或使用氧抑制剂(如维生素C、谷胱甘肽、硝基芳香族化合物等)，可克服氧气抑制交联的现象[89]。此外，通过扩散–反应耦合模型能够模拟在墨水光聚合过程中氧扩散和抑制行为，有助于预测不同墨水的固化行为[90]。

3　喷墨生物打印及其墨水材料设计

喷墨生物打印，也被称作数字微滴生物打印(DBB)，其机制既简单又高效，打印系统包括一个装有生物墨水(包含生物材料和细胞的混合物)的料筒以及喷嘴；生物墨水在喷嘴尖端形成液滴[91]。液滴以受控方式喷出，并逐滴沉积在基底上，形成预定义的图案，从而构建出所需的结构。通过控制液滴之间的间隔以及喷出速度，可以在基底上形成由均匀连续的液滴组成的特定二维或三维图案[92]。

3.1　分类

在喷墨生物打印系统中，首先生物墨水在喷嘴口处因表面张力被固定住，然后施加一个足以克服表面张力的短促压力脉冲，即可形成体积为纳升或皮升的单个液滴[93]。压力脉冲可通过热、压电或静电致动器产生，具体选择取决于生物墨水的成分和所需的液滴特性[94]；压力脉冲能够完全控制液滴的生成速率、大小和间隔，且易于生成复杂图案[95]。喷墨打印技术分为3类：热喷墨(TIJ)、压电喷墨(PIJ)、静电喷墨生物打印以及微阀喷墨生物打印(图7a)。

3.1.1　热喷墨生物打印

TIJ生物打印技术采用微电阻作为加热元件，

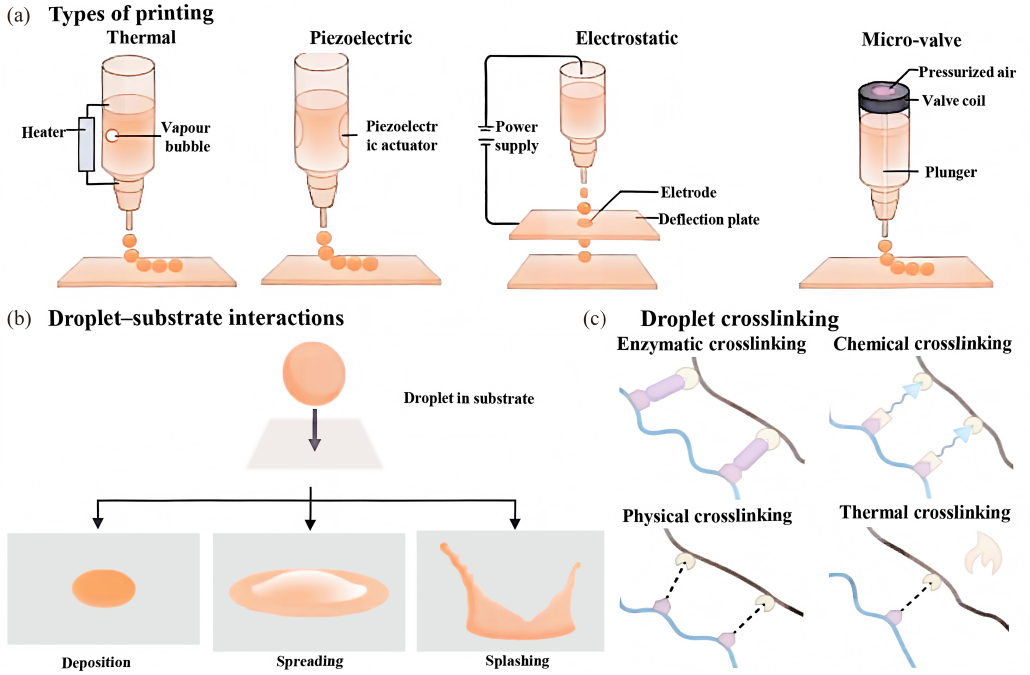


图 7 喷墨打印及其墨水适配性设计:(a)打印类型;(b)液滴–基质相互作用;(c)液滴交联

Figure 7 Inkjet printing and the adaptability design of ink: (a) printing categories; (b) droplet-substrate interactions; (c) droplet cross-linking

当电流通过时,可提高局部生物墨水的温度,从而形成一个气泡。气泡的存在使生物墨水的体积增大,并在喷嘴尖端形成液滴。随后,气泡破裂,产生压力脉冲,形成足以克服喷嘴表面张力的压力波,从而喷出皮升级的球形液滴。由于过热气泡存在时间极短(几微秒到几毫秒),因此生物墨水的整体温度仅略有升高(4~10 ℃),对细胞存活率影响不大[96]。然而,TIJ生物打印技术不适用于对温度敏感的生物墨水,因为这类生物墨水的流变特性会随温度变化而改变[91]。

3.1.2 压电喷墨生物打印

PIJ 生物打印采用压电致动器,当施加电压时其形状会发生变化,从而导致流体腔室壁发生变形。由此产生的体积变化会形成压力波,克服喷嘴孔处的表面张力,从而喷出液滴。喷嘴直径通常在18~120 μm之间,生成的液滴直径在50~100 μm之间[97]。然而,PIJ 生物打印机使用的超声频率(15~25 kHz)可能会损伤细胞膜,导致细胞破裂。PIJ 生物打印后的细胞存活率在70%~95%之间[98]。

3.1.3 静电喷墨生物打印

静电喷墨生物打印涉及静电作用力与机械运动之间复杂的相互作用,在这种情况下,一个闭合电路会在压力喷头与打印介质之间产生静电吸引力。施加短暂的电压脉冲会导致压板变形,从而压缩腔室并喷出生物墨水液滴。静电喷墨生物打印可实现高分辨率打印(2880 dpi × 1440 dpi),液滴体积在8~160 pL之间[91]。该方法耗电量低,可避免细胞因受热而失活;打印频率约为2000 Hz,可避免高频超声波对细胞造成的损害[99]。此外,它还能实现高黏度生物墨水(如明胶、壳聚糖、海藻酸盐或胶原蛋白)的打印,具有高精度和高分辨率的优势[100]。

3.1.4 微阀生物打印

微阀生物打印(MVB)采用由电磁脉冲控制的机电微阀,通过开启和关闭喷口来生成液滴。MVB系统由一个螺线管线圈、一个柱塞和一个喷口组成,生物墨水被储存在一个加压腔室中。螺线管线圈用于产生磁场,将柱塞抬起,使加压的生物墨水通过喷口喷出。根据生物墨水的流变特性来校准压力和阀开启时间。较长的阀开启时间能够使黏性生物墨水得以挤出;然而,如果阀开启时间过长,则会产生液滴粘连的现象[101]。通过改变喷口尺寸可以调节液滴大小和打印分辨率,还可以通过控制执行器的电压和频率进一步调整,从而实现比其他方法更高的精度[91]。微阀生物打印

(MVB)可在相对较低的温度和压力范围内运行，能够将细胞所受的机械应力降至最低，从而保持细胞的高存活率[102]。

3.2　墨水性能要求

3.2.1　墨水材料性能

用于DBB的生物墨水应具有较低的黏度(<20 mPa·s)，以便其能够顺畅地通过喷嘴和管路系统，防止堵塞，并在任意频率下形成大小均匀、稳定的液滴[91]。而且，它在固化后还应具有较高的机械强度，以维持生物打印后的结构。此外，生物墨水最好具有触变性，即在喷射过程中受力时黏度降低，有助于液滴的形成。同时，生物墨水必须能够促进细胞的存活和增殖，并且应当为细胞提供物理保护，使其免受机械应力、热应力和pH值波动的影响。

3.2.2　墨水–基底材料相互作用

在其他生物打印方式中基底主要作为生物墨水的接收装置；而在DBB中，当液滴沉积在基底材料上时，会对基底材料产生撞击，进而发生铺展、飞溅或反弹行为，影响生物打印结构的均匀性和保真度(图7b)[103]。因此，液滴与基底的相互作用直接影响DBB生物打印结构的精度和功能，其受生物墨水特性、打印条件以及基底特性等多种因素的共同影响。与低黏度墨水相比，高黏度生物墨水的飞溅程度更低，液滴沉积精度更高，生物打印后的细胞存活率也更高[104]。此外，液滴的喷射速度对其在基底上是铺展还是飞溅也有很大影响。在较低的速度下，液滴落在基底上并铺展开来，导致液滴表面积增大；而在较高的速度下，液滴撞击时受到更大的冲击力，产生飞溅，从而分解成更小的液滴。这种现象也可以通过韦伯值(*We*)来预测[105]。在低韦伯值的情况下，液滴在撞击时会平滑变形，铺展占主导。较高的韦伯值会导致飞溅，破坏液滴的完整性，并对分辨率和细胞活力产生负面影响。飞溅阈值对于保持结构保真度至关重要。基底的各种特性，如亲水性、粗糙度或温度，也极大地影响液滴的行为和均匀性。亲水性表面促进液滴铺展，增强液滴的连续性和液滴间的内聚力，但会增加融并的风险，降低分辨率[106]。相反，疏水性基底会限制液滴铺展，有利于提高分辨率，但易导致打印液滴的不连续。微米级的粗糙度可减少飞溅并有助于液滴附着，但如果粗糙度过高，则会导致液滴过度铺展[107]。成功的DBB生物打印需要对液滴铺展、交联动力学和基底特性进行控制，以实现理想的机械和生物学效果。可控铺展和无飞溅沉积有助于形成均匀的液滴和层状沉积结构。

3.3　墨水材料设计

3.3.1　墨水材料选择

因黏度可控且可模拟细胞外微环境，水凝胶适用于喷墨生物打印。海藻酸盐是用于喷墨生物打印的最常见水凝胶之一[108]。通过逐层喷墨打印氯化钙交联剂到液态海藻酸盐溶液中可制备得到具有“中空芯”结构的海藻酸盐支架，这是通过挤出式生物打印无法实现的[109]。在光学显微镜下可以观察到以海藻酸水凝胶为孔壁的“气孔阵列”(图8a)，这可归因于海藻酸盐溶液的表面快速凝胶化，交联剂液滴在浸没在海藻酸盐溶液中后，液滴与溶液界面会立即凝胶化，形成微胶囊；外层分子量大的海藻酸分子无法穿透微胶囊的壳层，而内部较小的钙离子则持续向外扩散，由此壳层逐渐增厚，形成三维结构；而当海藻酸盐被打印到氯化钙溶液中时，可以获得海藻酸水凝胶微球，这为制备封装药物或细胞的水凝胶微球提供了一种简便的方法。

此外，聚乙二醇、纤维蛋白、胶原蛋白、琼脂糖和GelMA也已用于喷墨生物打印[110~112]。聚乙二醇是一种线型聚醚化合物，已获美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于临床；其水溶液黏度低，易于成球。纤维蛋白可支持细胞生长，具有促进伤口愈合的潜力。胶原蛋白作为细胞外基质(ECM)的天然成分，在生理条件下易于交联，适用于皮肤、软骨以及神经和血管组织的生物打印。

3.3.2　液滴交联

与挤出式打印类似，液滴的交联可通过多种物理/化学机制实现(图7c)。需要注意的是，液滴交联均在沉积后发生。这就要求生物打印的图案在液态时需保持稳定，直至交联完成。一些生物墨水(酚羟基修饰的藻酸盐、羧甲基纤维素、透明质酸和明胶等)使用辣根过氧化物酶和过氧化氢来催化聚合物链上酚羟基的交联；通过精确控制酶浓度和在过氧化氢中的曝露时间可精准控制交联反应的发生[113]。另一种常见的化学交联方式是光交联–光引发剂曝露于光源下分解产生自由基，进而引发聚合反应。例如，聚乙二醇二甲基丙烯酸酯与光引发剂Irgacure 2959混合，通过照

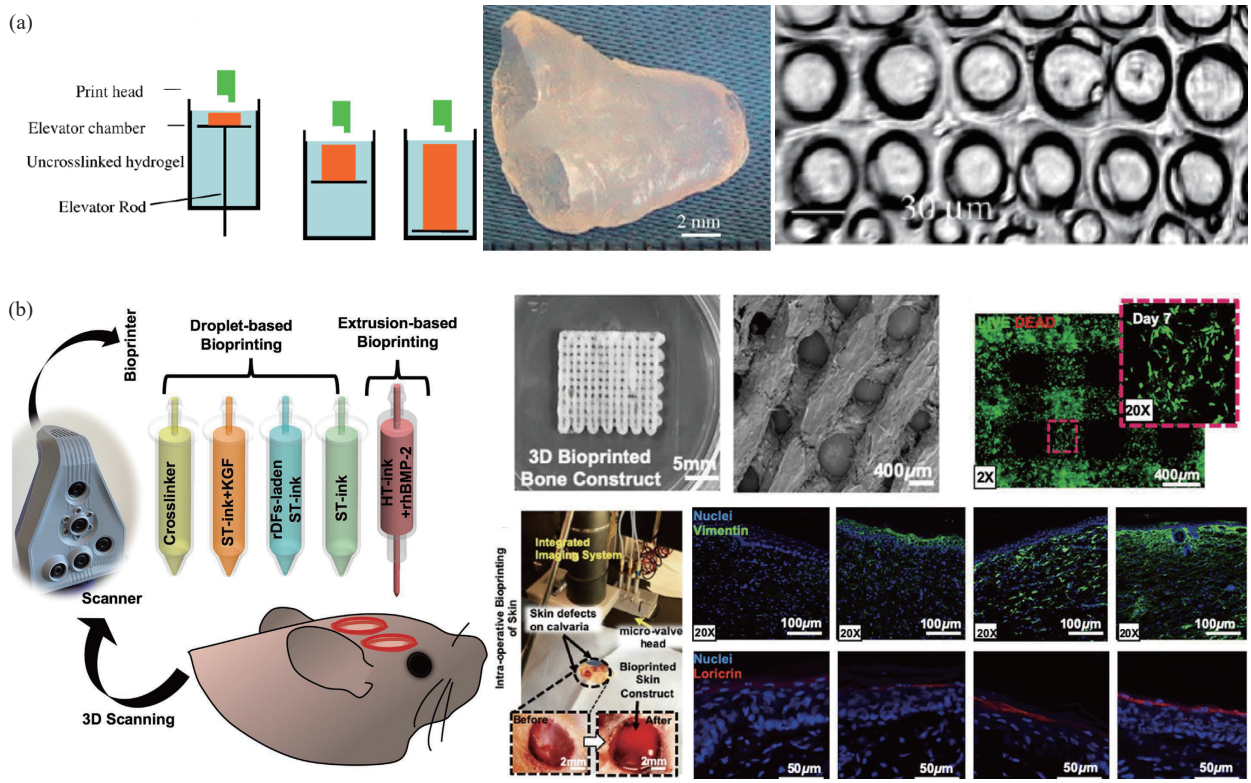


图 8 用于喷墨生物打印的水凝胶生物墨水。(a)海藻酸盐-$CaCl_2$ 体系用于制备“中空芯”结构[109] (2007 Elsevier 版权许可);(b)交替沉积墨水材料和交联剂以实现喷墨生物打印[115] (2021 John Wiley and Sons 版权许可)

Figure 8 Hydrogel bioinks for inkjet bioprinting. (a) The alginate-$CaCl_2$ system is utilized for fabricating “hollow-core” structures (Reprinted with permission from Ref. [109]; Copyright 2007 Elsevier); (b) Alternately depositing ink materials and cross-linkers to accomplish inkjet bioprinting (Reprinted with permission from Ref. [115]; Copyright 2021 John Wiley and Sons)

射紫外线可实现交联。物理交联方法涉及非共价相互作用,如氢键、离子键、疏水相互作用、范德华力和金属配位等[114]。在物理交联的相互作用中,离子相互作用最为常见。通常涉及将多价阳离子引入聚合物溶液中,通过离子交联实现凝胶化。多价阳离子通过金属配位或与聚合物主链上的离子基团静电结合形成凝胶网络。另一种常见的物理交联方式为温敏性交联,即通过加热或冷却来诱导聚合物发生相变,进而交联。例如,胶原蛋白分子在生理温度(37 ℃)下会自组装成凝胶。

喷墨打印的核心在于液滴与基底材料的相互作用,因此不同的交联方法需要不同的基底材料和实验条件。例如,藻酸盐基生物墨水的离子交联需要在氯化钙溶液中进行,而且通常是一个快速的过程[91]。光交联生物墨水可以直接沉积在固体基底上,但必须在连续层沉积之间保持足够的时间间隔,以确保初始液滴完全交联,并防止液滴意外融合[91]。酶交联物墨水(如基于纤维蛋白原的生物墨水)可以通过交替沉积生物墨水层和额外的交联剂层(如凝血酶)来实现稳定的喷墨打印[115](图8b)。这种方法有助于纤维蛋白原的快速聚合,从而提高生物打印的效率。如果打印的液滴在下一个液滴打印到其旁边或上面之前已经充分凝胶化,那么这2个液滴就不会融合,从而可以构建出高保真的结构。要构建3D多层结构,打印液滴的延迟凝胶化是必要的。这样液滴才能与先前打印的液滴结合,从而打印出无缝的线条,即相邻液滴之间没有明显的边界或边缘。但是,交联不能过慢,每一层都应在沉积下一层之前完成交联,以防止层与层之间的融合以及3D结构的变形或坍塌。

4 4D打印及其墨水材料设计

传统3D打印技术只能生产出静态“无生命”的物体。为构建动态“有生命”的物体,一些研究人员开始向4D打印——打印后的物体能够对环境刺激做出响应——迈进。这种响应包括形状、结构、功能、特性的改变,甚至可能出现一定的位移。4D打印的实现主要依赖于以下因素:增材制

造工艺、刺激响应材料的类型、刺激源，以及数学建模[116]。其中，刺激响应性材料(智能水凝胶)的类型至关重要。所谓的智能或刺激响应型水凝胶是指其物理或化学性质在受到特定外部刺激(如温度、pH、离子浓度、电场、磁场)时能够以可控方式发生变化的一类水凝胶[117]。在水凝胶4D 打印中使用的主要是两种技术，即光刻基生物打印和挤出式生物打印。以上2种打印技术已在前文中有详细介绍，这里不再赘述。本章节重点讨论适用于4D打印的墨水材料设计。

4.1　温度响应性水凝胶

用于引发水凝胶形状变化的最常见刺激因素是温度。聚(*N*-异丙基丙烯酰胺) (PNIPAM)具有温度敏感特性和较好的生物相容性，且其低临界溶解温度(LCST)接近人体温度，因此在生物医学领域被广泛使用[118]。在LCST以上，PNIPAM的异丙基侧链会部分脱水，发生相分离，失水、皱缩；在LCST以下，PNIPAM的亲水性基团曝露，会吸水、膨胀。这种从皱缩状态到膨胀状态的体积变化是可逆的。Baruch等提出了一种基于PNIPAM纳米颗粒的分步式一体化生物打印方法。首先，通过嵌入式打印构建血管结构；进而借助PNIPAM纳米颗粒的温敏性实现“血管壁”的动态收缩和膨胀，由此实现对“血管”内径的精准调节，构建出具有多级血管网络的“类心脏”组织[119]。

除PNIPAM之外，还有其他具有低临界溶解温度(LCST)的水凝胶材料，如聚(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基甲基丙烯酸酯) ($PMEO_2MA$)或聚(环氧乙烷)-聚(环氧丙烷)-聚(环氧乙烷) (PEO-PPO-PEO)。Ji等[120]利用DLP技术，将2-(2-甲氧基乙氧基)乙基甲基丙烯酸酯(MEO_2MA)与一种无响应水凝胶(聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)和2-羟乙基甲基丙烯酸酯(HEMA))共聚，打印出一种结构异质性热响应夹具(图9a)。该打印夹具在低于和高于低临界溶解温度(LCST)时，水凝胶的含水量分别为80%和20%。这种溶胀行为的变化使得在低于LCST的温度下，夹具的末端能够卷曲，从而实现夹具的闭合。在室温(低于LCST)的水浴中，该夹具能够夹住0.15 g的球，然后将其从该水浴中取出，放入60 ℃的热水浴中，夹具恢复原状并释放球。

普朗尼克(PEO-PPO-PEO)是一种热响应性聚合物，在水溶液中，通过提高聚合物浓度或溶液温度，其可自组装成胶束，其中PEO嵌段形成亲水性外壳，而PPO嵌段则构成疏水性核心。随着浓度或温度的进一步提高，胶束会排列成液晶结构，从而导致溶液凝胶化。这种热响应行为是可逆的，且凝胶化温度可通过控制溶液浓度来调节。由于这种凝胶具有剪切稀化特性，并且流变学性质可调，因此PEO-PPO-PEO嵌段共聚物凝胶被广泛用于挤出式生物打印。Dutta等在普朗尼克F127的链端修饰上丙烯酸酯基团，得到了二甲基丙烯酸酯化的聚合物(F127DA)；甲基丙烯酸酯基团使得胶束能够通过共价键交联[121]。在该研究中，丙烯酸(AA)通过SLA技术与F127DA进行共聚。与未修饰的F127水凝胶相比，基于F127DA的打印支架在低温下表现出更强的溶胀性。

琼脂糖也是一种常见的热响应性水凝胶。在35 ℃以上时，琼脂糖链处于溶解状态；而在低于此温度时，这些链会自组装，并通过氢键形成聚集的纳米纤维，进而形成紧密的三维网络。Guo等制备了一种含有琼脂糖、丙烯酰胺(AAM)和锂皂石的前驱体溶液，在95 ℃下进行喷墨打印来制备支架[122]。打印完成后，诱导聚丙烯酰胺(PAAM)的聚合和化学交联，最终在35 ℃下形成坚韧的双网络水凝胶。加热水凝胶至55~85 ℃，琼脂糖纳米纤维在交联的 PAAM网络内分解为柔性链，导致水凝胶变软，此时施加一些变形，再冷却回35 ℃，可保持该变形；再次加热时，水凝胶恢复了原始形状，从而赋予该水凝胶形状记忆特性。

4.2　pH响应性水凝胶

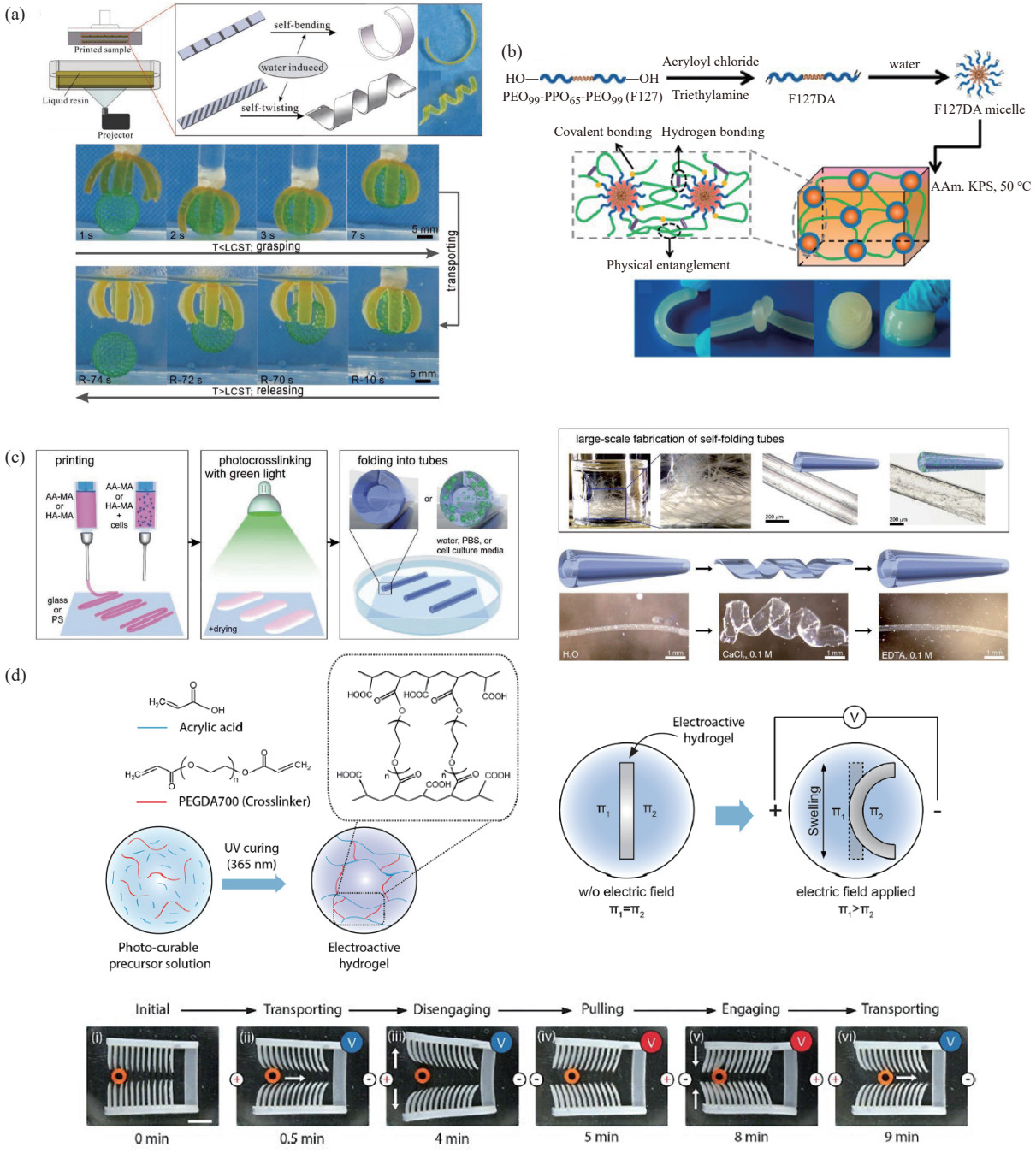
pH响应型水凝胶作为4D打印中的一种刺激响应性聚合物而备受关注。周围环境pH值的变化会引发聚合物结构或化学变化，进而引起溶胀程度的改变。聚电解质分子链上具有酸性或碱性侧基，这些侧基会随着周围介质pH值的变化而质子化或离子化，是一种理想的pH响应性材料[118]。

聚丙烯酸(PAA)是一种弱酸，其p*K*a值约为4.3，是一种常见的pH响应性聚合物。当浸入到pH值低于p*K*a的介质中时，PAA的羧基会质子化，而在高于p*K*a的介质中，则会解离形成羧酸根离子；这种解离会在溶液中产生可移动的正电荷，并在聚合物链上形成固定的负电荷，从而导致水凝胶网络中的链之间产生静电排斥，进而使水凝胶的溶胀度增加。PAA水凝胶可通过丙烯酸(AA)的自由基聚合以及共价或离子交联得到，因机械性能较低，限制了其在4D打印中的应用。在Sun等

的研究中，他们打印出了一种高强高韧水凝胶，该体系由PAA与F127DA胶束交联而成[123](图9b)。如前所述，F127DA负责热响应性，而PAA则作为pH敏感性分子。通过调整水凝胶的成分，可制造出对流体的pH值和温度敏感的“阀门”。

4.3 离子响应性水凝胶

离子是影响水凝胶溶胀程度的重要参数。根据水凝胶的化学结构，离子以不同的方式被用于触发水凝胶溶胀度的变化。首先，离子相互作用已被广泛应用于带电水凝胶中形成物理交联。二价或三价阳离子被用于与阴离子聚合物形成离子交联。其中最常见的例子是海藻酸盐，它可以与二价金属阳离子实现交联。这些水凝胶的溶胀程度受交联密度控制，即材料中阳离子的浓度。这种策略首先被用于调节海藻酸盐和透明质酸的行为，这两种多糖由于成本低、生物相容性好、具有剪切稀化特性以及能够调控细胞行为而被广泛用于生物打印。为了使它们具有光交联性，Kirillova



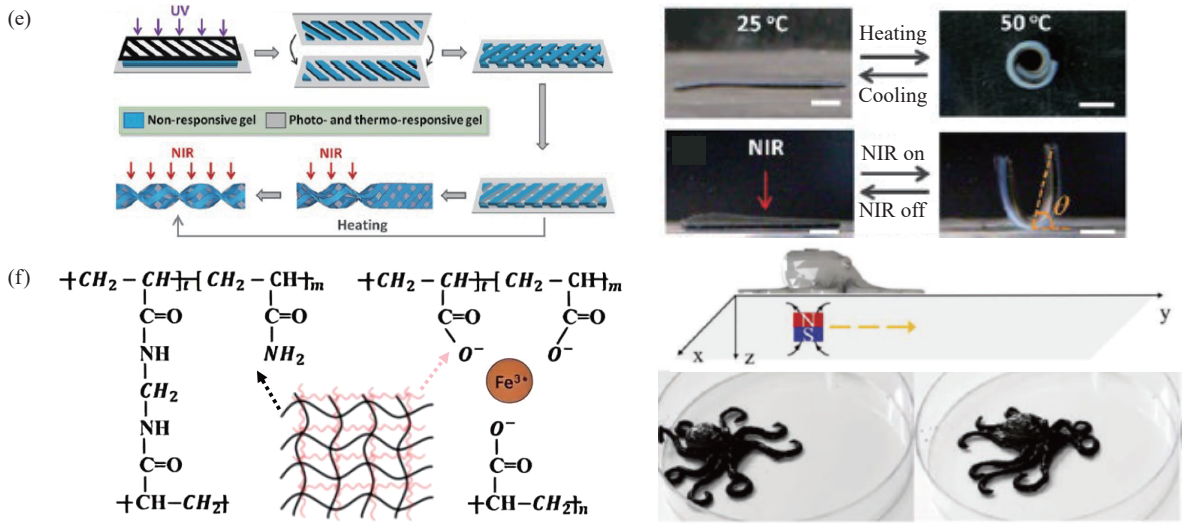


图 9　用于 4D 打印的刺激响应性水凝胶墨水：(a)温敏性 MEO_2MA 水凝胶墨水[120] (2019 John Wiley and Sons 版权许可)；(b) pH 和温度双响应水凝胶墨水[123] (2014 American Chemical Society 版权许可)；(c)离子响应性水凝胶墨水[124] (2017 John Wiley and Sons 版权许可)；(d)电活性水凝胶墨水[125] (2018 American Chemical Society 版权许可)；(e)光响应性水凝胶墨水[127] (2013 The Royal Society of Chemistry 版权许可)；(f)磁响应性水凝胶墨水[128] (2019 John Wiley and Sons 版权许可)

Figure 9　Stimuli-responsive hydrogel inks for 4D printing: (a) thermosensitive MEO_2MA hydrogel ink (Reprinted with permission from Ref. [120]; Copyright 2019 John Wiley and Sons); (b) hydrogel scaffold with dual responsiveness to pH and temperature (Reprinted with permission from Ref. [123]; Copyright 2014 American Chemical Society); (c) ion-responsive hydrogel scaffold (Reprinted with permission from Ref. [124]; Copyright 2017 John Wiley and Sons); (d) electroactive hydrogel scaffold (Reprinted with permission from Ref. [125]; Copyright 2018 American Chemical Society); (e) photo-responsive hydrogel scaffold (Reprinted with permission from Ref. [127]; Copyright 2013 The Royal Society of Chemistry); (f) Magneto-responsive hydrogel scaffold (Reprinted with permission from Ref. [128]; Copyright 2019 John Wiley and Sons)

等用甲基丙烯酸酐对其进行改性，形成甲基丙烯酸化海藻酸盐(AA-MA)和甲基丙烯酸化透明质酸(HA-MA)[124](图 9c)。将聚合物凝胶挤出形成一定厚度的支架，然后将其曝露于紫外线下，从而在支架厚度方向上形成交联梯度。一旦浸入水溶液中，薄膜会自动弯曲形成管状结构。在单价离子存在的情况下，2 种高分子的膨胀程度均有所降低，这些单价离子屏蔽了多糖链上所带的电荷。然而，在 0.1 mol/L 的 Ca^{2+} 存在下，海藻酸钠的膨胀率会显著降低。通过响应溶液中 Ca^{2+} 浓度的变化，管状结构实现了可逆的折叠与伸展运动。当浸泡溶液中含有 Ca^{2+} 时，水凝胶变得坚硬且膨胀程度很小，导致管状结构伸展。将伸展的管状结构浸泡在含有 Ca^{2+} 螯合剂的溶液中，离子交联程度降低，AA-MA 水凝胶膨胀，管状结构再次形成。

4.4　电场响应性水凝胶

电活性水凝胶对外部电场有响应，易于以非侵入性方式控制。外部电场会触发水凝胶内部的不均匀溶胀。目前已有能够精确控制电脉冲持续时间和电流大小的设备。此外，这种水凝胶的优点在于初始的电活性水凝胶可以具有均匀的化学成分和交联度，可简化打印过程。

电活性水凝胶分为 2 类：电子导电水凝胶(导电性源于电子迁移)和离子导电水凝胶(导电性源于离子迁移)[125]。迄今为止，在 4D 打印中应用的多为离子导电水凝胶。在离子导电水凝胶中，将具有离子基团的聚合物置于电解质中，这些基团会离子化。水会扩散进入水凝胶以平衡离子浓度，从而使水凝胶膨胀。将 2 个电极置于电解质中远离水凝胶的位置，并在电极之间施加电场，溶液中的阳离子会被阴极吸引(阴离子被阳极吸引)，从而在电解质中形成阳离子和阴离子的浓度梯度。这种梯度会在水凝胶制品的两侧产生不同的渗透压，渗透压失去平衡，导致水凝胶两侧的膨胀程度不同，从而使水凝胶朝向阴极或阳极弯曲。Han 等通过 3D 打印获得了由 PEGDA 和聚丙烯酸(PAA)组成的离子导电水凝胶[125](图 9d)。通过控制外部电场强度，可以轻松调节水凝胶细丝的弯曲曲率。打

印部分越薄，弯曲曲率越大，响应速度越快。得益于3D打印的高分辨率，作者打印出了具有不同区域且尺寸和响应速度精确可控的结构，还制造了可双向移动的小型机器人。

4.5 光响应性水凝胶

使用光作为刺激手段能够实现快速驱动和非侵入性刺激。将光敏颗粒，例如碳纳米管、石墨烯等，分散到水凝胶基质中，可以赋予水凝胶光响应特性[126]。Wang等将还原氧化石墨烯(RGO)与PNIPAM复合，用近红外光照射这种材料，RGO能够将辐射能转化为热能，从而引发PNIPAM的热响应[127](图9e)。将这种复合材料嵌入到无响应的基质中，会引发不均匀溶胀，从而产生变形。这种变形是可逆的，但由于溶胀过程中发生了链松弛，恢复到原始形状所需的时间比变形过程长。

4.6 磁场响应性水凝胶

磁性水凝胶是通过将磁性粒子掺入前驱体溶液中制得的。通过编程外部磁场驱动水凝胶变形。分散磁性粒子的介质必须具有一定的黏度，以防止粒子团聚。Chen等打印了章鱼结构，其触手由含10%铁磁性Fe_3O_4纳米粒子的聚丙烯酰胺(PAAm)制成，而章鱼的头部则由纯PAAm制成[128](图9f)。这款软体机器人通过编程的磁场驱动，能够迅速对刺激做出反应，自行移动。

5 应用

5.1 组织工程与再生医学

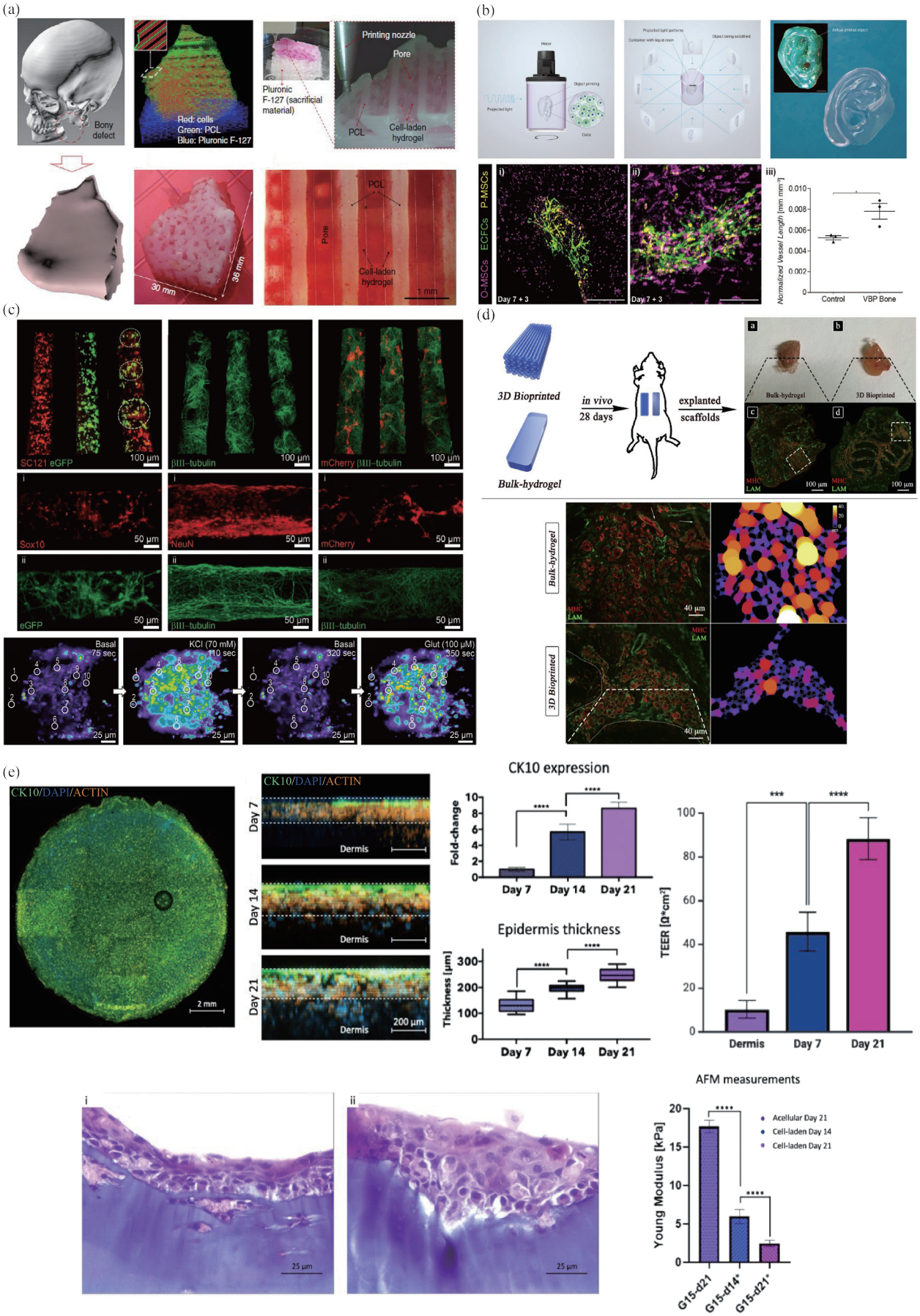
组织工程学旨在将生物学和工程学原理相结合，开发出用于替代、修复和再生受损、病变或缺失的组织和器官的功能性替代品。组织工程支架应具备多级孔结构或其他仿生复杂结构，从而实现所需的物质传输和机械性能，进而将机械性能与化学性能相结合，满足组织/器官再生的需要。然而，传统的制造方法，例如溶剂浇铸、相分离、气体发泡、纤维黏结、冷冻干燥和致孔剂/颗粒浸出等，在设计具有复杂拓扑结构和足够机械性能的支架方面存在局限性[1]。作为一种具有定制化和高精度等显著优势的先进制造技术，3D打印已成为研究人员、工程师和临床医生越来越强大的工具，有助于加快组织工程概念走向临床应用。

5.1.1 骨再生

由疾病(如骨质疏松症)、创伤(如骨折)、手术切除(如骨肿瘤治疗)以及先天性骨骼疾病导致的骨损伤/缺损需要通过定制的移植物进行再生和重建，以修复受损的骨骼结构和生理功能。3D打印有望制造出具有天然骨组织解剖特征的仿生复杂结构，从而增强骨再生能力。Kang等采用自制的3D打印系统打印出形状和大小与下颌骨相似的仿生支架，用于创伤性面部重建，以满足任意形状下颌骨缺损的重建需求[129](图10a)。生物墨水由复合水凝胶(明胶/纤维蛋白原/羟基磷灰石/甘油)和人羊水来源干细胞组成。结果表明，生物打印过程未对细胞活力产生负面影响，并且成骨诱导28天后，负载细胞水凝胶具有显著钙沉积。Khademhosseini等采用挤出式生物打印策略，使用含有GelMA、人脐静脉内皮细胞(HUVECs)、人骨髓间充质干细胞(hMSCs)的生物墨水，打印出了具有定制结构的血管化骨组织支架[130]。软性水凝胶内核(5% GelMA)快速降解，形成可灌注通道，在支架中充当中央血管。打印的骨组织支架能够支持细胞存活、增殖和成熟，并在保持较高的结构稳定性。

5.1.2 软骨再生

软骨是一种光滑且有弹性的结缔组织，其基质由蛋白聚糖、胶原纤维、糖胺聚糖和大量水分组成，呈凝胶状，坚韧且有弹性，在体内起到支撑和固定的作用。软骨组织仅含有一种细胞，即软骨细胞，可分为透明软骨(如气管、关节软骨)、弹性软骨(如耳、鼻)和纤维软骨(如半月板、椎间盘)3种类型，它们在胶原蛋白和蛋白聚糖的相对含量上有所不同。软骨是一种相对简单的组织，没有血管和神经，营养物质通过扩散作用供给软骨细胞。软骨组织没有自我修复能力，一旦出现软骨缺损，最终会导致退行性和骨关节炎病变。尽管结构简单，但软骨在人体中发挥着重要作用。外观上，软骨组织是分层结构。以关节软骨为例，随着深度增加，软骨细胞密度降低，糖胺聚糖含量增加(导致压缩模量增加)。此外，不同区域的胶原纤维排列方式不同：浅层区平行于表面，中间层随机排列，深层区垂直于表面。这些特定的排列方式结合纤维间分布的蛋白聚糖聚集体，赋予软骨组织独特的生物力学特性(弹性、压缩刚度、抗剪切性)。Bernal等采用体积生物打印，以对细胞友好的水凝胶生物墨水(GelMA)，构建出大尺寸活组织结构[131](图10b)。这种体积生物打印能够在数十秒内制造出任意大小和结构的负载细胞


(a)
Bony defect
Rod: cells
Green: PCL
Blue: Pluronic F-127
Pluronic F-127 (sacrificial material)
Printing nozzle
Pore
PCL
Cell-laden hydrogel
30 mm
36 mm
1 mm
(b)
Day 7 + 3
Normalized Vessel Length [mm mm⁻²]
Control
VBP Bone
(c)
SC121 eGFP
βIII-tubulin
mCherry βIII-tubulin
Sox10
NeuN
mCherry
eGFP
Basal 75 sec
KCl (70 mM) 110 sec
Basal 320 sec
Glut (100 μM) 350 sec
(d)
3D Bioprinted
Bulk-hydrogel
in vivo
28 days
explanted scaffolds
MHC
LAM
(e)
CK10/DAPI/ACTIN
Day 7
Day 14
Day 21
Dermis
CK10 expression
Fold-change
Epidermis thickness
Thickness [μm]
TEER [Ω*cm²]
AFM measurements
Young Modulus [kPa]
Acellular Day 21
Cell-laden Day 14
Cell-laden Day 21
G15-d21
G15-d14*
G15-d21*

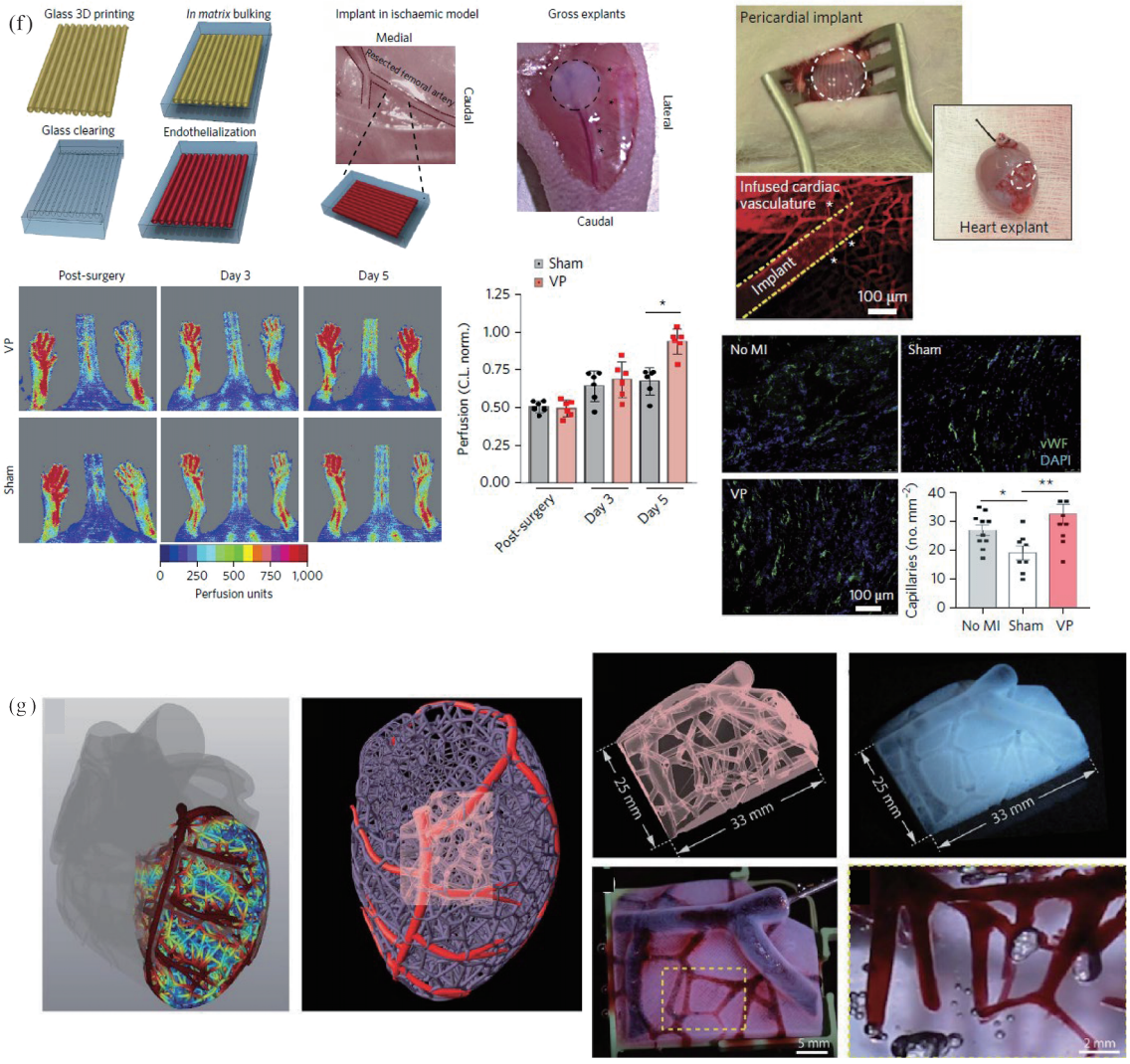


图 10 3D 打印水凝胶在再生医学中的应用。(a)基于明胶/纤维蛋白原/羟基磷灰石/甘油和人羊水来源干细胞组成的生物墨水构建颌骨组织工程支架[129] (2016 Springer Nature 版权许可)；(b)基于 GelMA 墨水构建活“软骨”组织结构[131] (2019 John Wiley and Sons 版权许可)；(c)通过挤出式多材料打印构建工程化脊髓组织[132] (2018 John Wiley and Sons 版权许可)；(d)基于含成肌细胞的 PEG–纤维蛋白原水凝胶墨水 3D 打印具有取向结构的类肌肉组织结构[134] (2017 Elsevier 版权许可)；(e)光刻基打印胶原蛋白水凝胶实现成纤维细胞和角质形成细胞的精确三维空间排列，以制造多细胞皮肤移植物[135] (2017 Elsevier 版权许可)；(f) 3D 打印含内皮细胞的水凝胶墨水，构建功能性血管补片 [137] (2017 Springer Nature 版权许可)；(g)基于胶原蛋白水凝胶的心脏移植物[138] (2019 The American Association for the Advancement of Science 版权许可)

Figure 10 Application of 3D printed hydrogels in regenerative medicine. (a) Construction of jawbone tissue engineering scaffold (Reprinted with permission from Ref. [129]; Copyright 2016 Springer Nature); (b) Construction of living cartilage tissue structures based on GelMA ink (Reprinted with permission from Ref. [131]; Copyright 2019 John Wiley and Sons); (c) Construction of engineered spinal cord tissue by extrusion multi-material printing (Reprinted with permission from Ref. [132]; Copyright 2018 John Wiley and Sons); (d) 3D printing of muscle-like tissue structures with oriented structures based on PEG-fibrinogen hydrogel ink containing myoblasts (Reprinted with permission from Ref. [134]; Copyright 2017 Elsevier); (e) Printing of collagen hydrogels for precise three-dimensional spatial arrangement of fibroblasts and keratinocytes for the production of multicellular skin grafts (Reprinted with permission from Ref. [135]; Copyright 2017 Elsevier); (f) Printing hydrogel inks containing endothelial cells to construct functional vascular patches (Reprinted with permission from Ref. [137]; Copyright 2017 Springer Nature); (g) Heart grafts based on collagen hydrogels (Reprinted with permission from Ref. [138]; Copyright 2019 The American Association for the Advancement of Science) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)

的移植物。在打印的生物结构中，细胞的存活率能够长期维持较高水平。半月板支架的形状能维持28天。在此期间，支架中可沉积大量新生纤维软骨基质，机械性能增强。

5.1.3　脊髓再生

脊髓组织在结构上并非完全均质，而是由不同类型的细胞以复杂的空间分布组成。创伤性脊髓损伤(SCI)可导致损伤部位以下的运动或感觉功能丧失，预后不良。将不同细胞及其基质成分按特定的空间分布，以构建仿生脊髓组织的支架，有助于促进脊髓再生修复。Joung等通过挤出式多材料打印策略构建工程化脊髓组织[132](图10c)。在打印过程中，诱导多能干细胞(iPSC)衍生的脊髓神经前体细胞(sNPCs)和少突胶质前体细胞(OPCs)的细胞团可以被精确地定位在3D打印支架内的指定位置，为中枢神经系统(CNS)受损区域功能性轴突的再生带来了希望。

5.1.4　骨骼肌再生

骨骼肌组织是高度有序的类似缆绳的结构。骨骼肌具有层次结构，最小的功能单位被称为肌原纤维，肌原纤维束可形成肌纤维，肌纤维进一步聚集形成肌束，肌束再组合可形成肌腹。骨骼肌组织工程旨在修复/再生骨骼肌缺陷。Merceron等采用3D 集成器官打印(IOP)系统打印了4种不同的墨水成分，制造出肌腱-肌肉单元[133]。打印后的支架在打印后第1天和第7天的细胞存活率均超过80%，并显示出分化效果。Costantini等[134]展示了一种新颖的 3D 生物打印策略，用于创建具有功能性形态的骨骼肌组织。微流体打印头与同轴针头相结合，从而以高分辨率3D打印含有成肌细胞的PEG-纤维蛋白原水凝胶纤维，并可精确定位细胞沉积位置(图10d)。组织学分析显示，支架内形成了类似肌肉的组织，具有类似骨骼肌的平行组织和定向排列。

5.1.5　皮肤再生

人类皮肤(平均厚度约2.5 mm)具有独特的解剖结构。皮肤由3层结构组成，即表皮、真皮和皮下组织。不同类型的皮肤细胞在高度区域特异性位置分布，包括表皮中的角质形成细胞和黑色素细胞、真皮中的成纤维细胞以及皮下组织的脂肪细胞。3D打印是一种很有前景的策略，能够实现快速、可靠且可扩展地生产仿生皮肤替代品，满足人类皮肤再生的临床需求。Maggiotto等通过生物打印在胶原蛋白水凝胶中实现了成纤维细胞和角质形成细胞的精确三维空间排列，制造出多细胞皮肤移植物[135](图10e)。Kim等设计出了一种新型3D细胞打印平台，可增加打印结构的复杂性，构建出可灌注的血管化人体皮肤替代物[136]。

5.1.6　血管再生

人体几乎所有的组织都拥有复杂的多分叉血管结构，以满足氧气和营养物质的供应。为了提升组织工程支架的性能，构建相互连通的三维血管网络至关重要。Mirabella等[137]证明，接种内皮细胞的3D打印血管移植物能够作为功能性血管补片，引导快速治疗性血管生成，用于治疗缺血性疾病(图10f)。可灌注的血管通道能够维持组织工程生物支架中大鼠原代肝细胞的代谢功能。

5.1.7　心脏再生

心血管疾病是导致死亡的首要原因，全球心血管疾病发病率居高不下。心脏瓣膜、动脉和心肌等心血管组织高度分化且持续承受负荷。鉴于可供移植的心脏供体数量极为有限，开发新型策略以满足再生/修复梗死心脏的需求十分迫切。3D生物打印技术是一种很有前景的方法，可用于制造定制化的心脏瓣膜、补片，甚至整个心脏。最近，Feinberg及其同事采用他们自主研发的水凝胶自由可逆嵌入式打印(freeform reversible embedding of suspended hydrogels, FRESH) 3D生物打印技术，制造出了用于心脏再生的胶原蛋白水凝胶支架[138](图10g)。在多个尺度上(从毛细血管到整个心脏)重建人体心脏的各个组成部分。他们证明，采用FRESH技术打印的心脏支架能够精确复制患者心脏的特定解剖结构，结合人类心肌细胞，3D打印的心室能够表现出同步收缩、动作电位定向传播以及在收缩期峰值时约14%的壁增厚。

5.2　类器官

类器官旨在全面模拟人体组织的结构、机械特性、生物特性和功能，这对于组织/器官再生、生物过程探究、药物安全性和有效性评估等领域至关重要。从组织模型(如硬组织：骨、软骨；软组织：皮肤、心脏组织、脂肪组织)到器官模型(如眼、耳、肝、肺、心、肾)，从血管化模型到组织芯片或器官芯片平台，这些多用途的组织/器官模型在体外疾病建模、药物开发和高通量筛选方面展现出巨大的前景。3D打印具有独特的技术优势，能

够精确定制细胞、细胞外基质和生长因子在支架/支架内的时空分布，从而为不同的生物医学应用创建仿生组织和器官模型。

5.2.1 类器官的构建

传统的二维细胞培养和动物模型存在局限性，无法重现/模拟天然人体组织复杂的微环境。在此背景下，人们越来越多地尝试开发更复杂且生理相似的三维类器官。近来，微生理平台，即仿生微流控装置，包括组织芯片和器官芯片，被广泛应用于类器官的构建。通过将体外三维细胞培养模型整合到可控的可灌注微生理系统中，重现天然人体组织/器官的生物学特征和功能。3D打印与微流控技术的结合能够提供更加多样和多功能的，用于创建组织芯片和器官芯片系统的三维体外疾病建模设计[139]。Kim等开发了一种动态多器官芯片(vAT)，该芯片采用脱细胞细胞外基质作为墨水，能够重现高血糖条件下内脏组织的病理状态(图11a)[140]。该芯片集成了代表糖尿病相关器官的独立腔室，包括胰腺、脂肪组织和肝脏。在高血糖条件下，vAT 芯片有效地展现了糖尿病

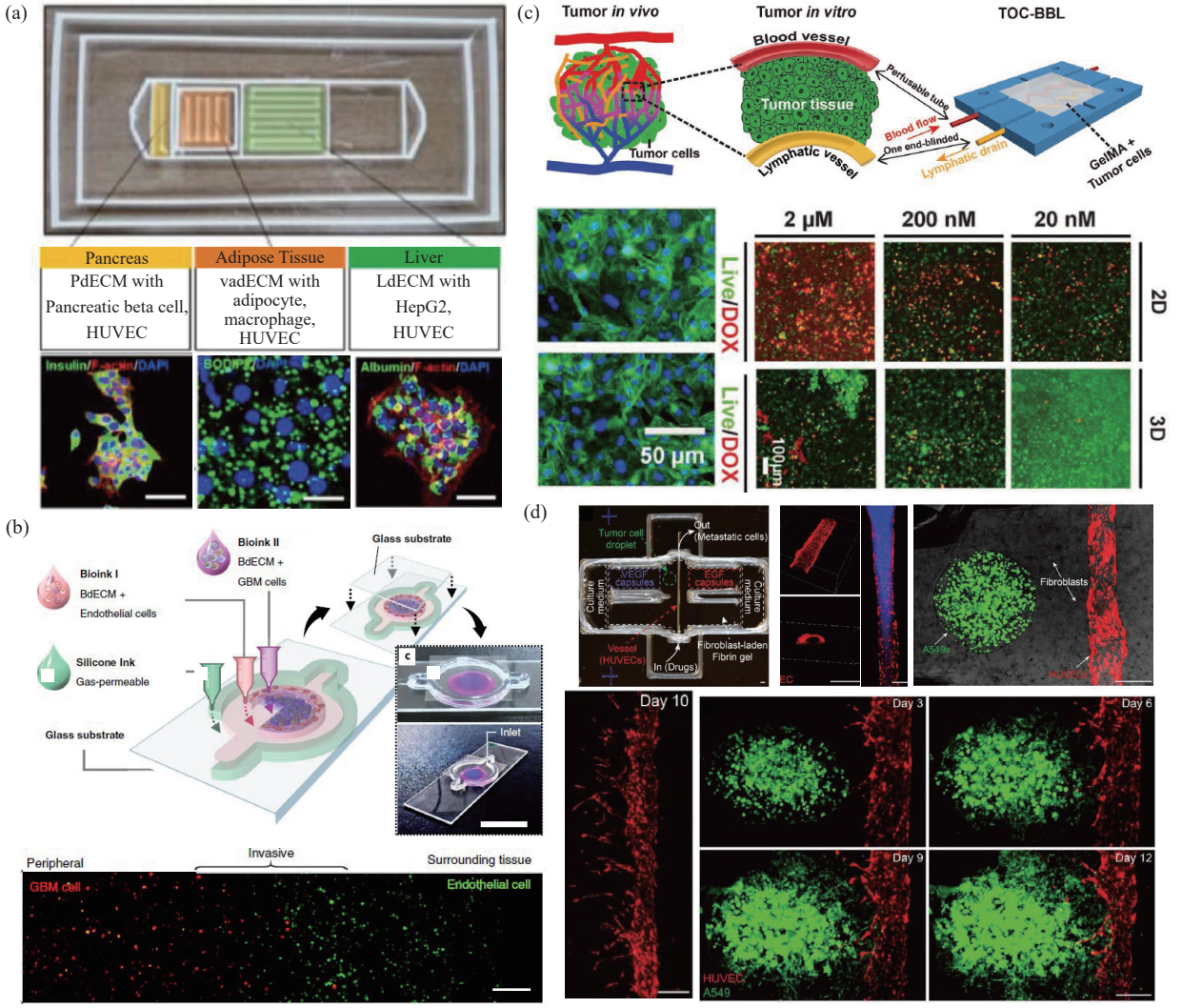


图 11 3D 生物打印水凝胶用于类器官构建。(a) DLP 打印具有精确细胞和细胞外基质的类器官[140] (2023 John Wiley and Sons 版权许可)；(b) 3D 打印带有血管和淋巴管的肿瘤芯片[143] (2019 John Wiley and Sons 版权许可)；(c) 3D 打印胶质母细胞瘤芯片[144] (2019 Springer Nature 版权许可)；(d) 3D 打印肿瘤细胞转移模型[145] (2019 John Wiley and Sons 版权许可)

Figure 11 3D bioprinted hydrogels for organoid construction. (a) DLP printing organoids with precise cells and extracellular matrix (Reprinted with permission from Ref. [140]; Copyright 2023 John Wiley and Sons); (b) 3D printing tumor chips with blood vessels and lymphatic vessels (Reprinted with permission from Ref. [143]; Copyright 2019 John Wiley and Sons); (c) 3D printed glioblastoma chip (Reprinted with permission from Ref. [144]; Copyright 2019 Springer Nature); (d) 3D printed tumor cell metastasis model (Reprinted with permission from Ref. [145]; Copyright 2019 John Wiley and Sons)

的关键病理特征。此外，在该芯片上评估的糖尿病治疗药物显示出与临床观察相当的疗效。

5.2.2　药物筛选

从临床前研究到临床试验的传统药物研发之路，是一个相当漫长且成本高昂的过程。新药研发的生产效率极低，每10000种新化学分子中只有1种最终能获批进入市场[141]。因此，开发新的药物筛选策略及理念非常必要且意义重大，有助于加快新药的发现和临床应用。众多尝试表明，三维体外类器官是模拟天然组织和器官的理想平台，它们可以集成在各种微阵列和微流控系统中，从而实现高通量药物试验和筛选。由于其独特的技术优势，3D打印已被广泛用于药物毒理学测试和高通量药物筛选的三维体外组织和器官模型的创建[142]。Cao等通过3D打印得到一种带有血管和淋巴管的肿瘤芯片。在血管和淋巴管的不同组合下，生物分子或抗癌药物的扩散模式各不相同；以这种方式模拟肿瘤微环境中的药物运输，从而提高抗癌药物筛选的准确性(图11b)[143]。

5.2.3　癌症研究

如今，癌症仍是威胁生命健康的最严重疾病之一。在世界范围内，许多因素可能会影响癌症的预后，这些因素包括癌症的类型和分期、肿瘤微环境、患者的年龄和性别、患者对癌症治疗的反应等。为了开展基础癌症研究并开发更有效的癌症治疗方法，在临床试验之前需要新的方法，例如建立体外癌症模型。这些癌症模型可以作为癌症研究平台，无需使用动物模型，从而能够在很大程度上减少癌症研究中动物的使用；然而，要创建能够完全模拟/复制人类实体肿瘤的解剖结构、生物学特征和药物反应的全功能癌症模型，仍然是一项挑战。3D打印通过创建模拟/再现实体肿瘤组织的异质性、血管网络、多细胞球体和天然细胞外基质的支架，有望解决这一问题。此外，3D打印技术还能将支架打印到微流控装置中，从而制造出适用于新药或治疗靶点高通量筛选的“肿瘤芯片”平台。最近，Cho及其同事利用3D打印的胶质母细胞瘤芯片，系统研究了患者对放化疗的个体化反应(图11c)[144]。首先，他们使用患者来源的肿瘤细胞和血管内皮细胞，将其负载到脱细胞基质中，通过3D打印构建了体外胶质母细胞瘤模型。该肿瘤模型能够重现天然胶质母细胞瘤的结构以及生物物理和生化特征，并再现患者在临床上对替莫唑胺和放化疗的个体化耐药性。该模型还可以筛选不同的抗癌药物组合，有助于为胶质母细胞瘤患者确定有效的治疗方案。3D打印的水凝胶体外微芯片还可用于研究癌细胞迁移行为。Meng等利用3D打印技术通过预先设定肿瘤细胞和基质细胞的位置来创建体外转移模型；以研究在生长因子和基质细胞存在的情况下，肿瘤细胞和内皮细胞的定向迁移(图11d)[145]。这种三维血管化的体外模型能够模拟癌症进展和转移，包括侵袭、内渗和血管生成。同时，这种生物打印的转移模型可作为无动物临床前研究中鉴定和筛选新型抗癌药物的有用平台。

5.3　柔性机器人

机械强度高且对外界刺激有响应的水凝胶材料的设计与开发，推动了基于水凝胶的仿生软体机器人技术的发展。通过3D打印技术开发软体机器人和软体驱动器已成为一个热点研究领域。3D打印能够实现复杂结构的软体机器人/驱动器的定制设计和一步成型，且具有高分辨率，从而能够更精确地控制其形状变形能力。将刺激响应型水凝胶与3D打印相结合，可以创造出新型的4D形状变换或驱动系统，使其能够对温度、pH值、光、电场或磁场等多种外部刺激做出不对称响应。常用的水凝胶材料包括海藻酸钠、琼脂糖、壳聚糖、甲基纤维素、聚乙二醇、PNIPAM、GelMA、泊洛沙姆等；它们具有多孔网络结构、高含水量、形状记忆效应以及可控的溶胶—凝胶相变等独特优势[146]。3D打印的技术优势，如逐层沉积和多材料沉积，有利于实现各向异性设计。

通过3D打印技术设定水凝胶架构和性能，其展现出水下驱动特性，使软机器人和驱动器在水中能够实现高速运动。例如，通过3D打印，使用由GelMA和有序排列的氧化铁纳米粒子组成的刺激响应纳米复合水凝胶墨水，制造出了一种磁性海星软机器人，表现出磁性远程控制和细胞引导效果，其中C2C12骨骼肌成肌细胞能够在无诱导培养基的情况下分化为肌肉细胞[147](图12a)。通过双光子3D打印方法微加工出具有螺旋结构的GelMA水凝胶微游动器，然后用磁性纳米粒子对其进行修饰[148]。这种水凝胶软体机器人在完成任务后可通过酶降解，有望用于靶向细胞输送或药物释放(图12b)。通过立体光刻打印技术，Bashir及其同事开发出了具有不对称结

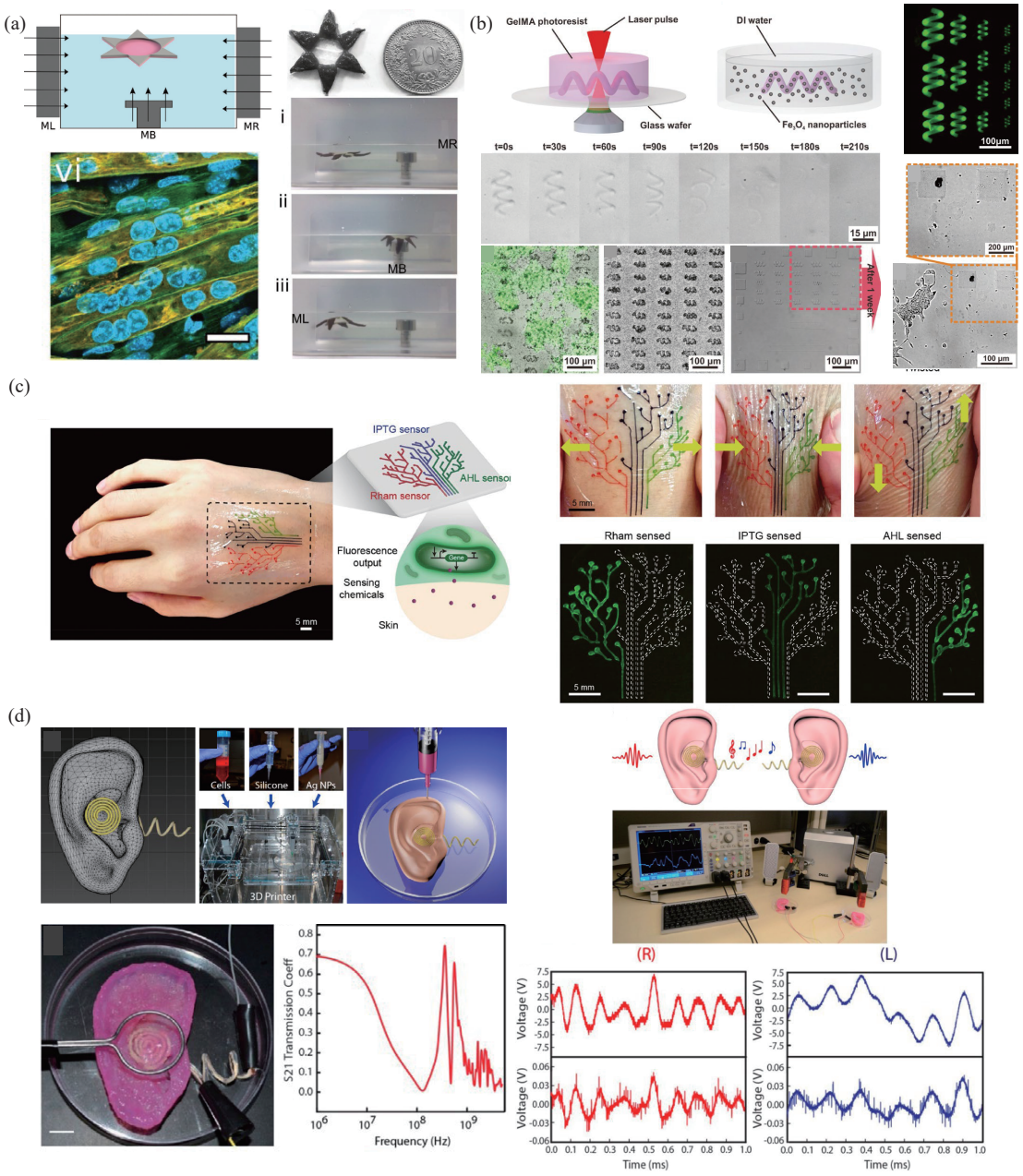


图 12 3D 生物打印水凝胶在软体机器人和生物电子中的应用。(a)基于 GelMA 和有序排列的氧化铁纳米粒子复合水凝胶墨水构建磁性海星软机器人，诱导 C2C12 骨骼肌成肌细胞定向成肌分化[147] (2018 John Wiley and Sons 版权许可)；(b) 3D 打印构建不对称结构的水凝胶“生物机器人”实现水下定向移动[148] (2018 John Wiley and Sons 版权许可)；(c)由水凝胶和编程细菌组成的新型生物活性系统实现可编程的信号交流和处理[150] (2017 John Wiley and Sons 版权许可)；(d)基于负载软骨细胞的构建水凝胶仿生耳，提高了对射频和立体声音乐的听觉感知能力[151] (2013 American Chemical Society 版权许可)

Figure 12 Applications of 3D-bioprinted hydrogels in soft robotics and bioelectronics. (a) Construction of a magnetic starfish-shaped soft robot using a composite hydrogel ink composed of GelMA and orderly-arranged iron oxide nanoparticles, which induces the directional myogenic differentiation of C2C12 skeletal myoblasts (Reprinted with permission from Ref. [147]; Copyright 2018 John Wiley and Sons); (b) 3D printing is employed to fabricate an asymmetric-structured hydrogel “biobot” that enables directional movement underwater (Reprinted with permission from Ref. [148]; Copyright 2018 John Wiley and Sons); (c) A novel bioactive system consisting of hydrogels and programmed bacteria realizes programmable signal communication and processing (Reprinted with permission from Ref. [150]; Copyright 2017 John Wiley and Sons); (d) Construction of a bionic ear based on hydrogels loaded with chondrocytes enhances the auditory perception ability for radio frequency and stereo music (Reprinted with permission from Ref. [151]; Copyright 2013 American Chemical Society)

构的水凝胶“生物机器人”，其由工程化“骨骼肌条带”提供动力以实现移动[149]。电刺激能够触发骨骼肌条带内C2C12细胞的收缩，使水凝胶生物机器人能够以每分钟超过1.5个身长的速度移动(约156 μm/s)。

5.4　生物电子

可穿戴柔性电子产品是未来技术发展的一个极其重要的领域，其应用范围远超智能手表，涵盖生物传感器、可编程生物医学植入物/设备、超级电容器以及由人体体液供电的电化学电池。这些可穿戴设备具有极大的潜力，能够显著提升我们的生活质量、健康水平和安全保障。与传统制造方法相比，3D打印技术能够通过精确预定义来制造具有复杂结构的定制化柔性电子设备，以满足个性化使用需求；其在构建个性化可穿戴设备、患者专用假肢、人机接口等众多定制化应用方面具有巨大潜力。Zhao及其同事利用3D打印策略开发了一种由水凝胶和编程细菌组成的新型生物活性系统，其中细菌能够进行可编程的信号交流和处理[150](图12c)。研究人员利用负载软骨细胞的水凝胶3D打印出仿生耳[151](图12d)。这种3D打印的耳朵能够读取来自耳蜗电极的感应耦合信号，并提高了对射频和立体声音乐的听觉感知能力。可穿戴电子设备/生物电子设备与人体的有机融合，有望推动半机械人/半机械生物体技术的发展。

6　结论与展望

总结了用于3D打印的水凝胶的合理设计以及新兴生物医学应用相关的最新进展，介绍了基于水凝胶的3D打印技术及其对水凝胶墨水材料的性能要求，讨论了水凝胶的材料改性方法、交联机制以及材料、物理、化学或生物特性。结合材料和技术优势，基于水凝胶的3D打印能够以可定制的方式满足个性化需求，从而实现一系列有前景的生物医学应用。

现如今，3D打印相关论文数量呈爆炸式增长，3D打印技术在组织工程和再生医学领域将发挥越来越重要的作用。未来，3D打印可用于制造具有仿生、生物相容性和生物活性的多功能特异性支架、植入物和设备，从而实现人体受损/患病组织和器官的功能替代、修复或再生。通过3D打印负载细胞的天然和/或合成水凝胶而建立的体外组织和器官模型，能够实现高通量新药筛选和发现，减少甚至避免动物实验。借助人机交互，3D打印的可穿戴电子设备能够以定制化和个性化的方式实现对人体的即时健康监测。

生长因子和其他生物活性分子激活细胞内信号通路并控制细胞基因表达。因此，生物活性分子的剂量、类型、释放速率和作用时间会影响细胞的反应和功能，需要进行适当调节以满足目标需求。利用微/纳米粒子递送系统来保护所负载的生长因子并调节其释放曲线是一种具有发展前景的策略。所用的粒子包括胶束、树枝状大分子、脂质体、固体脂质纳米粒和聚合物纳米粒等[152]。进一步开发新的方法以实现生长因子在打印结构内的时空释放，从而时序性调控炎症、血管生成、组织再生等过程，这至关重要，但迄今为止仍无法实现，有待进一步探索。

为维持支架内高密度细胞群的存活和生物功能，打印支架的血管化至关重要。在体内组织中基本每隔约100~200 μm就有毛细血管分布[153]。同样，对于大而厚的支架，需要将相互连通的血管网络整合到支架中，以促进营养物质、信号分子、氧气、生长因子、代谢废物等在支架内的传递。生物打印技术是制造血管化支架的有效方式。之前讨论过的包括同轴打印技术等，因其能够在支架内制造类似于天然血管的腔管状结构，因而备受关注。

3D打印技术依靠计算机辅助操作实现生物墨水的自动沉积；该过程存在若干手动步骤，这可能会降低仪器的整体可用性和精度。为此，将人工智能(AI)与3D打印相结合，能够实现智能、自主、自适应和可预测性打印。人工智能及其分支，如机器学习和计算机视觉，可用于增强生物打印的预处理设计和打印流程优化[154]。在预处理阶段，机器学习算法已被用于创建“数字生物墨水库”，以优化生物墨水的机械和流变特性，从而提高可打印性和形状保真度。此外，在支架结构设计过程中也可使用机器学习算法，以生成更高效的结构。优化诸如打印速度、挤出压力、支架层厚度和纤维间距等相互关联的设计和工艺参数，能够推动先进组织工程支架的创建，这些支架将展现出增强的物理化学性能和功能化特性。在工艺层面，生物打印系统可与实时传感反馈系统(如视觉、方向和位移)相耦合，从而创建一个闭环控

制的生物打印方案。这使得生物打印过程能够变得“智能”，能够对诸如打印缺陷、变形、目标基底的移动以及生物墨水流动和环境因素(如温度和湿度)等工艺变化做出响应和适应。通过人工智能工具处理传感数据，检测缺陷位置，然后将反馈信息传递给相应的控制单元(如运动控制系统)进行实时校正，从而提高打印质量。

在微重力或零重力环境下实施3D打印具有重要意义，探究生物材料墨水的悬浮状态和打印方法，将为宇航员在太空中开展科研工作带来便利。此外，负载细胞的水凝胶通过3D打印技术可用于制造各种“活”材料，应用于药物筛选、耐药性研究、生物催化等太空研究。终有一天，科幻电影中在太空3D打印器官或人体的场景将不再是科幻，而有望成为现实，走进我们真实的世界。

参考文献

1 Li, J. H.; Wu, C. T.; Chu, P. K.; Gelinsky, M. 3D printing of hydrogels: rational design strategies and emerging biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. R Rep.*, **2020**, 140, 100543.

2 DebRoy, T.; Wei, H. L.; Zuback, J. S.; Mukherjee, T.; Elmer, J. W.; Milewski, J. O.; Beese, A. M.; Wilson-Heid, A.; De, A.; Zhang, W. Additive manufacturing of metallic components–process, structure and properties. *Prog. Mater. Sci.*, **2018**, 92, 112–224.

3 Halloran, J. W. Ceramic stereolithography: additive manufacturing for ceramics by photopolymerization. *Annu. Rev. Mater. Res.*, **2016**, 46, 19–40.

4 Kotz, F.; Arnold, K.; Bauer, W.; Schild, D.; Keller, N.; Sachsenheimer, K.; Nargang, T. M.; Richter, C.; Helmer, D.; Rapp, B. E. Three-dimensional printing of transparent fused silica glass. *Nature*, **2017**, 544(7650), 337–339.

5 Ligon, S. C.; Liska, R.; Stampfl, J.; Gurr, M.; Mülhaupt, R. Polymers for 3D printing and customized additive manufacturing. *Chem. Rev.*, **2017**, 117(15), 10212–10290.

6 Bandyopadhyay, A.; Heer, B. Additive manufacturing of multi-material structures. *Mater. Sci. Eng. R Rep.*, **2018**, 129, 1–16.

7 Bose, S.; Vahabzadeh, S.; Bandyopadhyay, A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Mater. Today*, **2013**, 16(12), 496–504.

8 Marrella, A.; Lee, T. Y.; Lee, D. H.; Karuthedom, S.; Syla, D.; Chawla, A.; Khademhosseini, A.; Jang, H. L. Engineering vascularized and innervated bone biomaterials for improved skeletal tissue regeneration. *Mater. Today*, **2018**, 21(4), 362–376.

9 Bas, O.; Catelas, I.; De-Juan-Pardo, E. M.; Hutmacher, D. W. The quest for mechanically and biologically functional soft biomaterials *via* soft network composites. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2018**, 132, 214–234.

10 Bittner, S. M.; Guo, J. L.; Melchiorri, A.; Mikos, A. G. Three-dimensional printing of multilayered tissue engineering scaffolds. *Mater. Today*, **2018**, 21(8), 861–874.

11 Jungst, T.; Smolan, W.; Schacht, K.; Scheibel, T.; Groll, J. Strategies and molecular design criteria for 3D printable hydrogels. *Chem. Rev.*, **2016**, 116(3), 1496–1539.

12 Rosales, A. M.; Anseth, K. S. The design of reversible hydrogels to capture extracellular matrix dynamics. *Nat. Rev. Mater.*, **2016**, 1, 15012.

13 Brown, T. E.; Anseth, K. S. Spatiotemporal hydrogel biomaterials for regenerative medicine. *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46(21), 6532–6552.

14 Landers, R.; Hübner, U.; Schmelzeisen, R.; Mülhaupt, R. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials*, **2002**, 23(23), 4437–4447.

15 Jiang, T.; Munguia-Lopez, J. G.; Flores-Torres, S.; Kort-Mascort, J.; Kinsella, J. M. Extrusion bioprinting of soft materials: an emerging technique for biological model fabrication. *Appl. Phys. Rev.*, **2019**, 6, 011310.

16 Zhang, Y. S.; et al. 3D extrusion bioprinting. *Nat. Rev. Methods Primers.* **2021**, 1, 75.

17 Wu, W.; DeConinck, A.; Lewis, J. A. Omnidirectional printing of 3D microvascular networks. *Adv. Mater.*, **2011**, 23(24), H178–H183.

18 McCormack, A.; Highley, C. B.; Leslie, N. R.; Melchels, F. P. W. 3D printing in suspension baths: keeping the promises of bioprinting afloat. *Trends Biotechnol.*, **2020**, 38(6), 584–593.

19 Shiwarski, D. J.; Hudson, A. R.; Tashman, J. W.; Feinberg, A. W. Emergence of fresh 3D printing as a platform for advanced tissue biofabrication. *APL Bioeng.*, **2021**, 5(1), 010904.

20 Costantini, M.; Colosi, C.; Święszkowski, W.; Barbetta, A. Co-axial wet-spinning in 3D bioprinting: state of the art and future perspective of microfluidic integration. *Biofabrication*, **2019**, 11(1), 012001.

21 Pi, Q. M.; Maharjan, S.; Yan, X.; Liu, X.; Singh, B.; van Genderen, A. M.; Robledo-Padilla, F.; Parra-Saldivar, R.; Hu, N.; Jia, W. T.; Xu, C. L.; Kang, J.; Hassan, S.; Cheng, H. B.; Hou, X.; Khademhosseini, A.; Zhang, Y. S. Digitally tunable microfluidic bioprinting of

multilayered cannular tissues. *Adv. Mater.*, **2018**, 30(43), 1706913.

22 Tavafoghi, M.; Ali Darabi, M.; Mahmoodi, M.; Tutar, R.; Xu, C.; Mirjafari, A.; Billi, F.; Swieszkowski, W.; Nasrollahi, F.; Ahadian, S.; Hosseini, V.; Khademhosseini, A.; Ashammakhi, N. Multimaterial bioprinting and combination of processing techniques towards the fabrication of biomimetic tissues and organs. *Biofabrication*, **2021**, 13(4), 042002.

23 Liu, W. J.; Zhang, Y. S.; Heinrich, M. A.; De Ferrari, F.; Jang, H. L.; Bakht, S. M.; Alvarez, M. M.; Yang, J. Z.; Li, Y. C.; Trujillo-de Santiago, G.; Miri, A. K.; Zhu, K.; Khoshakhlagh, P.; Prakash, G.; Cheng, H.; Guan, X. F.; Zhong, Z.; Ju, J.; Zhu, G. H.; Jin, X. Y.; Shin, S. R.; Dokmeci, M. R.; Khademhosseini, A. Rapid continuous multimaterial extrusion bioprinting. *Adv. Mater.*, **2017**, 29(3), 1604630.

24 Hardin, J. O.; Ober, T. J.; Valentine, A. D.; Lewis, J. A. Microfluidic printheads for multimaterial 3D printing of viscoelastic inks. *Adv. Mater.*, **2015**, 27(21), 3279–3284.

25 Rajaram, A.; Schreyer, D. J.; Chen, D. X. B. Use of the polycation polyethyleneimine to improve the physical properties of alginate–hyaluronic acid hydrogel during fabrication of tissue repair scaffolds. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **2015**, 26(7), 433–445.

26 You, F.; Wu, X.; Chen, X. B. 3D printing of porous alginate/gelatin hydrogel scaffolds and their mechanical property characterization. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, **2017**, 66(6), 299–306.

27 Yang, Y. Y.; Yu, Z. Y.; Lu, X. H.; Dai, J. H.; Zhou, C.; Yan, J.; Wang, L.; Wang, Z.; Zang, J. F. Minimally invasive bioprinting for *in situ* liver regeneration. *Bioact. Mater.*, **2023**, 26, 465–477.

28 Decante, G.; Costa, J. B.; Silva-Correia, J.; Collins, M. N.; Reis, R. L.; Oliveira, J. M. Engineering bioinks for 3D bioprinting. *Biofabrication*, **2021**, 13(3), 032001.

29 Chen, D. X. B. *Extrusion bioprinting of scaffolds.* In: Extrusion Bioprinting of Scaffolds for Tissue Engineering Applications. Cham: Springer International Publishing, **2018**. 117–145.

30 Chaudhuri, R.; Ramachandran, M.; Moharil, P.; Harumalani, M.; Jaiswal, A. K. Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering: current choices. *Mater. Sci. Eng. C*, **2017**, 79, 950–957.

31 Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, **2006**, 126(4), 677–689.

32 Oravec, D.; Kim, W.; Flynn, M. J.; Yeni, Y. N. The relationship of whole human vertebral body creep to bone density and texture *via* clinically available imaging modalities. *J. Biomech.*, **2022**, 135, 111021.

33 You, F.; Wu, X.; Kelly, M.; Chen, X. B. Bioprinting and *in vitro* characterization of alginate dialdehyde–gelatin hydrogel bio-ink. *Bio Des. Manuf.*, **2020**, 3(1), 48–59.

34 Coşkun, S.; Akbulut, S. O.; Sarıkaya, B.; Çakmak, S.; Gümüşderelioğlu, M. Formulation of chitosan and chitosan-nanoHAp bioinks and investigation of printability with optimized bioprinting parameters. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2022**, 222, 1453–1464.

35 Maiz-Fernández, S.; Barroso, N.; Pérez-Álvarez, L.; Silván, U.; Vilas-Vilela, J. L.; Lanceros-Mendez, S. 3D printable self-healing hyaluronic acid/chitosan poly complex hydrogels with drug release capability. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2021**, 188, 820–832.

36 Dravid, A.; McCaughey-Chapman, A.; Raos, B.; O'Carroll, S. J.; Connor, B.; Svirskis, D. Development of agarose–gelatin bioinks for extrusion-based bioprinting and cell encapsulation. *Biomed. Mater.*, **2022**, 17(5), 055001.

37 Merceron, T. K.; Murphy, S. V. H*ydrogels for 3D bioprinting applications.* In: Essentials of 3D Biofabrication and Translation. Amsterdam: Elsevier, **2015**. 249–270.

38 Faust, H. J.; Guo, Q. Y.; Elisseeff, J. H. *Cartilage tissue engineering.* In: Principles of Regenerative Medicine. Amsterdam: Elsevier, **2019**, 937–952.

39 Li, C. R.; Zheng, Z. Z.; Jia, J. Y.; Zhang, W. J.; Qin, L.; Zhang, W.; Lai, Y. X. Preparation and characterization of photocurable composite extracellular matrix-methacrylated hyaluronic acid bioink. *J. Mater. Chem. B*, **2022**, 10(22), 4242–4253.

40 Amirrah, I. N.; Lokanathan, Y.; Zulkiflee, I.; Wee, M. F. M. R.; Motta, A.; Fauzi, M. B. A comprehensive review on collagen type I development of biomaterials for tissue engineering: from biosynthesis to bioscaffold. *Biomedicines*, **2022**, 10(9), 2307.

41 Soltan, N.; Ning, L. Q.; Mohabatpour, F.; Papagerakis, P.; Chen, X. B. Printability and cell viability in bioprinting alginate dialdehyde-gelatin scaffolds. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2019**, 5(6), 2976–2987.

42 Zhang, X. W.; Chen, X.; Hong, H.; Hu, R. B.; Liu, J. S.; Liu, C. S. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact. Mater.*, **2022**, 10, 15–31.

43 Zimmerling, A.; Yazdanpanah, Z.; Cooper, D. M. L.; Johnston, J. D.; Chen, X. B. 3D printing PCL/nHA bone

scaffolds: Exploring the influence of material synthesis techniques. *Biomater. Res.*, **2021**, 25, 3.

44 Deng, H. Z.; Dong, A. J.; Song, J. B.; Chen, X. Y. Injectable thermosensitive hydrogel systems based on functional PEG/PCL block polymer for local drug delivery. *J. Control. Release*, **2019**, 297, 60–70.

45 Salehi-Nik, N.; Rezai Rad, M.; Nazeman, P.; Khojasteh, A. *Polymers for oral and dental tissue engineering.* In: Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering. Amsterdam: Elsevier, **2017**. 25–46.

46 Suntornnond, R.; Tan, E. Y. S.; An, J.; Chua, C. K. A highly printable and biocompatible hydrogel composite for direct printing of soft and perfusable vasculature-like structures. *Sci. Rep.*, **2017**, 7(1), 16902.

47 Maisani, M.; Ziane, S.; Ehret, C.; Levesque, L.; Siadous, R.; Le Meins, J. F.; Chevallier, P.; Barthélémy, P.; De Oliveira, H.; Amédée, J.; Mantovani, D.; Chassande, O. A new composite hydrogel combining the biological properties of collagen with the mechanical properties of a supramolecular scaffold for bone tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **2018**, 12(3), e1489–e1500.

48 Baniasadi, M.; Minary-Jolandan, M. Alginate-collagen fibril composite hydrogel. *Materials*, **2015**, 8(2), 799–814.

49 Kim, M. H.; Kim, B. S.; Park, H.; Lee, J.; Park, W. H. Injectable methylcellulose hydrogel containing calcium phosphate nanoparticles for bone regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 109, 57–64.

50 Shin, S. R.; Zihlmann, C.; Akbari, M.; Assawes, P.; Cheung, L.; Zhang, K. Z.; Manoharan, V.; Zhang, Y. S.; Yüksekkaya, M.; Wan, K. T.; Nikkhah, M.; Dokmeci, M. R.; Tang, X. S.; Khademhosseini, A. Reduced graphene oxide-GelMA hybrid hydrogels as scaffolds for cardiac tissue engineering. *Small*, **2016**, 12(27), 3677–3689.

51 Pati, F.; Jang, J.; Ha, D. H.; Kim, S. W.; Rhie, J. W.; Shim, J. H.; Kim, D. H.; Cho, D. W. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat. Commun.*, **2014**, 5, 3935.

52 Burdick, J. A.; Prestwich, G. D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv. Mater.*, **2011**, 23(12), H41–H56.

53 Jung, H.; Park, J. S.; Yeom, J.; Selvapalam, N.; Park, K. M.; Oh, K.; Yang, J. A.; Park, K. H.; Hahn, S. K.; Kim, K. 3D tissue engineered supramolecular hydrogels for controlled chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*, **2014**, 15(3), 707–714.

54 Li, C.; Faulkner-Jones, A.; Dun, A. R.; Jin, J.; Chen, P.; Xing, Y. Z.; Yang, Z. Q.; Li, Z. B.; Shu, W. M.; Liu, D. S.; Duncan, R. R. Rapid formation of a supramolecular polypeptide–DNA hydrogel for In Situ three-dimensional multilayer bioprinting. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(13), 3957–3961.

55 Bertlein, S.; Brown, G.; Lim, K. S.; Jungst, T.; Boeck, T.; Blunk, T.; Tessmar, J.; Hooper, G. J.; Woodfield, T. B. F.; Groll, J. Thiol–ene clickable gelatin: a platform bioink for multiple 3D biofabrication technologies. *Adv. Mater.*, **2017**, 29(44), 1703404.

56 Levato, R.; Visser, J.; Planell, J. A.; Engel, E.; Malda, J.; Mateos-Timoneda, M. A. Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication*, **2014**, 6(3), 035020.

57 Li, Z. Y.; Lu, F. P.; Liu, Y. H. A review of the mechanism, properties, and applications of hydrogels prepared by enzymatic cross-linking. *J. Agric. Food Chem.*, **2023**, 71(27), 10238–10249.

58 Feng, Q.; Gao, H. C.; Wen, H. J.; Huang, H. H.; Li, Q. T.; Liang, M. H.; Liu, Y.; Dong, H.; Cao, X. D. Engineering the cellular mechanical microenvironment to regulate stem cell chondrogenesis: Insights from a microgel model. *Acta Biomater.*, **2020**, 113, 393–406.

59 Yan, M.; Lewis, P. L.; Shah, R. N. Tailoring nanostructure and bioactivity of 3D-printable hydrogels with self-assemble peptides amphiphile (PA) for promoting bile duct formation. *Biofabrication*, **2018**, 10(3), 035010.

60 Wang, L. L.; Highley, C. B.; Yeh, Y. C.; Galarraga, J. H.; Uman, S.; Burdick, J. A. Three-dimensional extrusion bioprinting of single- and double-network hydrogels containing dynamic covalent crosslinks. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2018**, 106(4), 865–875.

61 Xin, C.; Xia, N.; Zhang, L. Light-based 3D printing of stimulus-responsive hydrogels for miniature devices: recent progress and perspective. *Bio Des. Manuf.*, **2024**, 7(5), 721–746.

62 Fei, G. H.; Parra-Cabrera, C.; Xia, B. Z.; Zhong, K.; Clays, K.; Ameloot, R. Digital halftoning for printer-independent stereolithography of functionally graded materials. *Cell Rep. Phys. Sci.*, **2023**, 4(8), 101525.

63 Saha, S. K.; Wang, D. E.; Nguyen, V. H.; Chang, Y. N.; Oakdale, J. S.; Chen, S. C. Scalable submicrometer additive manufacturing. *Science*, **2019**, 366(6461), 105–109.

64 Tytgat, L.; Dobos, A.; Markovic, M.; Van Damme, L.; Van Hoorick, J.; Bray, F.; Thienpont, H.; Ottevaere, H.; Dubruel, P.; Ovsianikov, A.; Van Vlierberghe, S. High-resolution 3D bioprinting of photo-cross-linkable recombinant collagen to

serve tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, **2020**, 21(10), 3997–4007.

65 Dobos, A.; Van Hoorick, J.; Steiger, W.; Gruber, P.; Markovic, M.; Andriotis, O. G.; Rohatschek, A.; Dubruel, P.; Thurner, P. J.; van Vlierberghe, S.; Baudis, S.; Ovsianikov, A. Thiol-gelatin-norbornene bioink for laser-based high-definition bioprinting. *Adv. Healthc. Mater.*, **2020**, 9(15), 1900752.

66 Loebel, C.; Broguiere, N.; Alini, M.; Zenobi-Wong, M.; Eglin, D. Microfabrication of photo-cross-linked hyaluronan hydrogels by single- and two-photon tyramine oxidation. *Biomacromolecules*, **2015**, 16(9), 2624–2630.

67 Koch, T.; Zhang, W. X.; Tran, T. T.; Wang, Y. J.; Mikitisin, A.; Puchhammer, J.; Greer, J. R.; Ovsianikov, A.; Chalupa-Gantner, F.; Lunzer, M. Approaching standardization: Mechanical material testing of macroscopic two-photon polymerized specimens. *Adv. Mater.*, **2024**, 36(34), 2308497.

68 Grigoryan, B.; Paulsen, S. J.; Corbett, D. C.; Sazer, D. W.; Fortin, C. L.; Zaita, A. J.; Greenfield, P. T.; Calafat, N. J.; Gounley, J. P.; Ta, A. H.; Johansson, F.; Randles, A.; Rosenkrantz, J. E.; Louis-Rosenberg, J. D.; Galie, P. A.; Stevens, K. R.; Miller, J. S. Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. *Science*, **2019**, 364(6439), 458–464.

69 Dhand, A. P.; Davidson, M. D.; Burdick, J. A. Lithography-based 3D printing of hydrogels. *Nat. Rev. Bioeng.*, **2025**, 3(2), 108–125.

70 Kelly, B. E.; Bhattacharya, I.; Heidari, H.; Shusteff, M.; Spadaccini, C. M.; Taylor, H. K. Volumetric additive manufacturing *via* tomographic reconstruction. *Science*, **2019**, 363(6431), 1075–1079.

71 Orth, A.; Webber, D.; Zhang, Y. J.; Sampson, K. L.; de Haan, H. W.; Lacelle, T.; Lam, R.; Solis, D.; Dayanandan, S.; Waddell, T.; Lewis, T.; Taylor, H. K.; Boisvert, J.; Paquet, C. Deconvolution volumetric additive manufacturing. *Nat. Commun.*, **2023**, 14(1), 4412.

72 Riffe, M. B.; Davidson, M. D.; Seymour, G.; Dhand, A. P.; Cooke, M. E.; Zlotnick, H. M.; McLeod, R. R.; Burdick, J. A. Multi-material volumetric additive manufacturing of hydrogels using gelatin as a sacrificial network and 3D suspension bath. *Adv. Mater.*, **2024**, 36(34), 2309026.

73 Lee, M.; Rizzo, R.; Surman, F.; Zenobi-Wong, M. Guiding lights: tissue bioprinting using photoactivated materials. *Chem. Rev.*, **2020**, 120(19), 10950–11027.

74 Levato, R.; Dudaryeva, O.; Garciamendez-Mijares, C. E.; Kirkpatrick, B. E.; Rizzo, R.; Schimelman, J.; Anseth, K. S.; Chen, S. C.; Zenobi-Wong, M.; Zhang, Y. S. Light-based vat-polymerization bioprinting. *Nat. Rev. Methods Primers*, **2023**, 3, 47.

75 Northrop, B. H.; Coffey, R. N. Thiol-ene click chemistry: computational and kinetic analysis of the influence of alkene functionality. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134(33), 13804–13817.

76 Murphy, C. A.; Lim, K. S.; Woodfield, T. B. F. Next evolution in organ-scale biofabrication: bioresin design for rapid high-resolution vat polymerization. *Adv. Mater.*, **2022**, 34(20), 2107759.

77 Bernal, P. N.; Bouwmeester, M.; Madrid-Wolff, J.; Falandt, M.; Florczak, S.; Rodriguez, N. G.; Li, Y.; Größbacher, G.; Samsom, R. A.; van Wolferen, M.; van der Laan, L. J. W.; Delrot, P.; Loterie, D.; Malda, J.; Moser, C.; Spee, B.; Levato, R. Volumetric bioprinting of organoids and optically tuned hydrogels to build liver-like metabolic biofactories. *Adv. Mater.*, **2022**, 34(15), 2110054.

78 You, S. T.; Xiang, Y.; Hwang, H. H.; Berry, D. B.; Kiratitanaporn, W.; Guan, J. A.; Yao, E.; Tang, M.; Zhong, Z.; Ma, X. Y.; Wangpraseurt, D.; Sun, Y. Z.; Lu, T. Y.; Chen, S. C. High cell density and high-resolution 3D bioprinting for fabricating vascularized tissues. *Sci. Adv.*, **2023**, 9(8), eade7923.

79 Madrid-Wolff, J.; Boniface, A.; Loterie, D.; Delrot, P.; Moser, C. Controlling light in scattering materials for volumetric additive manufacturing. *Adv. Sci.*, **2022**, 9(22), 2105144.

80 Guan, J. A.; You, S. T.; Xiang, Y.; Schimelman, J.; Alido, J.; Ma, X. Y.; Tang, M.; Chen, S. C. Compensating the cell-induced light scattering effect in light-based bioprinting using deep learning. *Biofabrication*, **2022**, 14(1), 015011.

81 Tan, L. J.; Zhu, W.; Zhou, K. Recent progress on polymer materials for additive manufacturing. *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, 30(43), 2003062.

82 Xie, M. B.; Lian, L. M.; Mu, X.; Luo, Z. Y.; Garciamendez-Mijares, C. E.; Zhang, Z. R.; López, A.; Manríquez, J.; Kuang, X.; Wu, J. Q.; Sahoo, J. K.; González, F. Z.; Li, G.; Tang, G. S.; Maharjan, S.; Guo, J.; Kaplan, D. L.; Zhang, Y. S. Volumetric additive manufacturing of pristine silk-based (bio)inks. *Nat. Commun.*, **2023**, 14(1), 210.

83 Lian, L. M.; Xie, M. B.; Luo, Z. Y.; Zhang, Z. R.; Maharjan, S.; Mu, X.; Garciamendez-Mijares, C. E.; Kuang, X.; Sahoo, J. K.; Tang, G. S.; Li, G.; Wang, D.; Guo, J.; González, F. Z.; Abril Manjarrez Rivera, V.; Cai, L.; Mei, X.; Kaplan, D. L.; Zhang, Y. S. Rapid

volumetric bioprinting of decellularized extracellular matrix bioinks. *Adv. Mater.*, **2024**, 36(34), 2470274.

84 Lim, K. S.; Levato, R.; Costa, P. F.; Castilho, M. D.; Alcala-Orozco, C. R.; van Dorenmalen, K. M. A.; Melchels, F. P. W.; Gawlitta, D.; Hooper, G. J.; Malda, J.; Woodfield, T. B. F. Bio-resin for high resolution lithography-based biofabrication of complex cell-laden constructs. *Biofabrication*, **2018**, 10(3), 034101.

85 Ge, Q.; Chen, Z.; Cheng, J. X.; Zhang, B.; Zhang, Y. F.; Li, H. G.; He, X. N.; Yuan, C.; Liu, J.; Magdassi, S.; Qu, S. X. 3D printing of highly stretchable hydrogel with diverse UV curable polymers. *Sci. Adv.*, **2021**, 7(2), eaba4261.

86 Lim, K. S.; Galarraga, J. H.; Cui, X. L.; Lindberg, G. C. J.; Burdick, J. A.; Woodfield, T. B. F. Fundamentals and applications of photo-cross-linking in bioprinting. *Chem. Rev.*, **2020**, 120(19), 10662–10694.

87 Dhand, A. P.; Davidson, M. D.; Zlotnick, H. M.; Kolibaba, T. J.; Killgore, J. P.; Burdick, J. A. Additive manufacturing of highly entangled polymer networks. *Science*, **2024**, 385(6708), 566–572.

88 Ma, Y. Z.; Wei, W.; Gong, L.; Li, C. L.; Hong, Y.; Wang, X. Z.; Liang, R. J.; Shao, Q. Z.; Liang, Q. S.; Huang, W. W.; Shipston, M. J.; Ouyang, H. W. Biomacromolecule-based agent for high-precision light-based 3D hydrogel bioprinting. *Cell Rep. Phys. Sci.*, **2022**, 3(8), 100985.

89 Ligon, S. C.; Husár, B.; Wutzel, H.; Holman, R.; Liska, R. Strategies to reduce oxygen inhibition in photoinduced polymerization. *Chem. Rev.*, **2014**, 114(1), 557–589.

90 Emami, M. M.; Rosen, D. W. Modeling of light field effect in deep vat polymerization for grayscale lithography application. *Addit. Manuf.*, **2020**, 36, 101595.

91 Gupta, D.; Derman, I. D.; Xu, C. X.; Huang, Y.; Ozbolat, I. T. Droplet-based bioprinting. *Nat. Rev. Meth. Primers*, **2025**, 5, 25.

92 Li, X. D.; Liu, B. X.; Pei, B.; Chen, J. W.; Zhou, D. Z.; Peng, J. Y.; Zhang, X. Z.; Jia, W.; Xu, T. Inkjet bioprinting of biomaterials. *Chem. Rev.*, **2020**, 120(19), 10793–10833.

93 Strutt, J.W. On the capillary phenomena of jets. *Proceedings of the Royal Society of London*, **1879**, 29(196-199), 71–97.

94 Zhao, D. K.; Zhou, H. Z.; Wang, Y. F.; Yin, J.; Huang, Y. Drop-on-demand (DOD) inkjet dynamics of printing viscoelastic conductive ink. *Addit. Manuf.*, **2021**, 48, 102451.

95 Xu, H. Q.; Zhang, S. K.; Song, K. D.; Yang, H. Y.; Yin, J.; Huang, Y. Droplet-based 3D bioprinting for drug delivery and screening. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2025**, 217, 115486.

96 Alomari, M.; Mohamed, F. H.; Basit, A. W.; Gaisford, S. Personalised dosing: printing a dose of one's own medicine. *Int. J. Pharm.*, **2015**, 494(2), 568–577.

97 Dijksman, J. F. *Design of Piezo Inkjet Print Heads: From Acoustics to Applications*. Wiley, **2018**.

98 Murphy, S. V.; Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.*, **2014**, 32(8), 773–785.

99 Nakamura, M.; Kobayashi, A.; Takagi, F.; Watanabe, A.; Hiruma, Y.; Ohuchi, K.; Iwasaki, Y.; Horie, M.; Morita, I.; Takatani, S. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. *Tissue Eng.*, **2005**, 11(11-12), 1658–1666.

100 Umezu, S. Precision printing of gelatin utilizing electrostatic inkjet. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2014**, 53(5S3), 05HC01.

101 Sun, J.; Ng, J. H.; Fuh, Y. H.; Wong, Y. S.; Loh, H. T.; Xu, Q. Comparison of micro-dispensing performance between micro-valve and piezoelectric printhead. *Microsyst. Technol.*, **2009**, 15(9), 1437–1448.

102 Zandi, N.; Sani, E. S.; Mostafavi, E.; Ibrahim, D. M.; Saleh, B.; Ali Shokrgozar, M.; Tamjid, E.; Weiss, P. S.; Simchi, A.; Annabi, N. Nanoengineered shear-thinning and bioprintable hydrogel as a versatile platform for biomedical applications. *Biomaterials*, **2021**, 267, 120476.

103 Ng, W. L.; Shkolnikov, V. Jetting-based bioprinting: process, dispense physics, and applications. *Bio Des. Manuf.*, **2024**, 7(5), 771–799.

104 Ng, W. L.; Huang, X.; Shkolnikov, V.; Suntornnond, R.; Yeong, W. Y. Polyvinylpyrrolidone-based bioink: influence of bioink properties on printing performance and cell proliferation during inkjet-based bioprinting. *Bio Des. Manuf.*, **2023**, 6(6), 676–690.

105 Chen, X. X.; O'Mahony, A. P.; Barber, T. Spreading behavior of cell-laden droplets in 3D bioprinting process. *J. Appl. Phys.*, **2023**, 133, 014701.

106 Nguyen, P. Q. M.; Yeo, L. P.; Lok, B. K.; Lam, Y. C. Patterned surface with controllable wettability for inkjet printing of flexible printed electronics. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, 6(6), 4011–4016.

107 Zhu, H. X.; Li, R.; Li, S.; Guo, K.; Ji, C.; Gao, F. Y.; Zheng, Y. J.; Zhu, R. Y.; Wang, H. R.; Zhang, L. M.; Liu, L. Q.; Zheng, X. F. Multi-physical field control piezoelectric inkjet bioprinting for 3D tissue-like structure manufacturing. *Int. J. Bioprinting*, **2024**, 2120.

108 Axpe, E.; Oyen, M. L. Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting. *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, 17(12): 1976.

109 Boland, T.; Tao, X.; Damon, B. J.; Manley, B.; Kesari, P.; Jalota, S.; Bhaduri, S. Drop-on-demand printing of cells and materials for designer tissue constructs. *Mater. Sci. Eng. C*, **2007**, 27(3), 372–376.

110 Osidak, E. O.; Kozhukhov, V. I.; Osidak, M. S.; Domogatsky, S. P. Collagen as bioink for bioprinting: a comprehensive review. *Int. J. Bioprint.*, **2020**, 6(3), 270.

111 Ying, G. L.; Jiang, N.; Yu, C. J.; Zhang, Y. S. Three-dimensional bioprinting of gelatin methacryloyl (GelMA). *Bio Des. Manuf.*, **2018**, 1(4), 215–224.

112 Utama, R. H.; Tan, V. T. G.; Tjandra, K. C.; Sexton, A.; Nguyen, D. H. T.; O'Mahony, A. P.; Du, E. Y.; Tian, P. L.; Ribeiro, J. C. C.; Kavallaris, M.; Gooding, J. J. A covalently crosslinked ink for multimaterials drop-on-demand 3D bioprinting of 3D cell cultures. *Macromol. Biosci.*, **2021**, 21(9), 2100125.

113 Sakai, S.; Ueda, K.; Gantumur, E.; Taya, M.; Nakamura, M. Drop-on-drop multimaterial 3D bioprinting realized by peroxidase-mediated cross-linking. *Macromol. Rapid Commun.*, **2018**, 39(3), 1700534.

114 GhavamiNejad, A.; Ashammakhi, N.; Wu, X. Y.; Khademhosseini, A. Crosslinking strategies for 3D bioprinting of polymeric hydrogels. *Small*, **2020**, 16(35), 2002931.

115 Moncal, K. K.; Gudapati, H.; Godzik, K. P.; Heo, D. N.; Kang, Y.; Rizk, E.; Ravnic, D. J.; Wee, H.; Pepley, D. F.; Ozbolat, V.; Lewis, G. S.; Moore, J. Z.; Driskell, R. R.; Samson, T. D.; Ozbolat, I. T. Intra-operative bioprinting of hard, soft, and hard/soft composite tissues for craniomaxillofacial reconstruction. *Adv. Funct. Mater.*, **2021**, 31(29), 2010858.

116 Pei, E.; Loh, G. H. Technological considerations for 4D printing: an overview. *Prog. Addit. Manuf.*, **2018**, 3(1), 95–107.

117 Champeau, M.; Heinze, D. A.; Viana, T. N.; de Souza, E. R.; Chinellato, A. C.; Titotto, S. 4D printing of hydrogels: a review. *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, 30(31), 1910606.

118 Sydney Gladman, A.; Matsumoto, E. A.; Nuzzo, R. G.; Mahadevan, L.; Lewis, J. A. Biomimetic 4D printing. *Nat. Mater.*, **2016**, 15(4), 413–418.

119 Baruch, E. S.; Cohen, R.; Silberman, E.; Namestnikov, M.; Cabilly, I.; Shapira, A.; Dvir, T. One-step coordinated multi-kinetic 4D printing of human vascularized cardiac tissues with selective fast-shrinking capillaries. *Adv. Mater.*, **2025**, e12879.

120 Ji, Z. Y.; Yan, C. Y.; Yu, B.; Zhang, X. Q.; Cai, M. R.; Jia, X.; Wang, X. L.; Zhou, F. 3D printing of hydrogel architectures with complex and controllable shape deformation. *Adv. Mater. Technol.*, **2019**, 4(4), 1800713.

121 Dutta, S.; Cohn, D. Temperature and pH responsive 3D printed scaffolds. *J. Mater. Chem. B*, **2017**, 5(48), 9514–9521.

122 Guo, J. H.; Zhang, R. R.; Zhang, L. N.; Cao, X. D. 4D printing of robust hydrogels consisted of agarose nanofibers and polyacrylamide. *ACS Macro Lett.*, **2018**, 7(4), 442–446.

123 Sun, Y. N.; Gao, G. R.; Du, G. L.; Cheng, Y. J.; Fu, J. Super tough, ultrastretchable, and thermoresponsive hydrogels with functionalized triblock copolymer micelles as macro-cross-linkers. *ACS Macro Lett.*, **2014**, 3(5), 496–500.

124 Kirillova, A.; Maxson, R.; Stoychev, G.; Gomillion, C. T.; Ionov, L. 4D biofabrication using shape-morphing hydrogels. *Adv. Mater.*, **2017**, 29(46), 1703443.

125 Han, D.; Farino, C.; Yang, C.; Scott, T.; Browe, D.; Choi, W.; Freeman, J. W.; Lee, H. Soft robotic manipulation and locomotion with a 3D printed electroactive hydrogel. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10(21), 17512–17518.

126 Shin, S. R.; Li, Y. C.; Jang, H. L.; Khoshakhlagh, P.; Akbari, M.; Nasajpour, A.; Zhang, Y. S.; Tamayol, A.; Khademhosseini, A. Graphene-based materials for tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2016**, 105, 255–274.

127 Wang, Z. J.; Li, C. Y.; Zhao, X. Y.; Wu, Z. L.; Zheng, Q. Thermo- and photo-responsive composite hydrogels with programmed deformations. *J. Mater. Chem. B*, **2019**, 7(10), 1674–1678.

128 Chen, Z.; Zhao, D. H.; Liu, B. H.; Nian, G. D.; Li, X. K.; Yin, J.; Qu, S. X.; Yang, W. 3D printing of multifunctional hydrogels. *Adv. Funct. Mater.*, **2019**, 29(20), 1900971.

129 Kang, H. W.; Lee, S. J.; Ko, I. K.; Kengla, C.; Yoo, J. J.; Atala, A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat. Biotechnol.*, **2016**, 34(3), 312–319.

130 Byambaa, B.; Annabi, N.; Yue, K.; Trujillo-de Santiago, G.; Alvarez, M. M.; Jia, W. T.; Kazemzadeh-Narbat, M.; Shin, S. R.; Tamayol, A.; Khademhosseini, A. Bioprinted osteogenic and vasculogenic patterns for engineering 3D bone tissue. *Adv. Healthc. Mater.*, **2017**, 6(16), 1700015.

131 Bernal, P. N.; Delrot, P.; Loterie, D.; Li, Y.; Malda, J.; Moser, C.; Levato, R. Volumetric bioprinting of complex living-tissue constructs within seconds. *Adv. Mater.*, **2019**, 31(42), 1904209.

132 Joung, D.; Truong, V.; Neitzke, C. C.; Guo, S. Z.; Walsh, P. J.; Monat, J. R.; Meng, F. B.; Park, S. H.; Dutton, J. R.; Parr, A. M.; McAlpine, M. C. 3D printed stem-cell derived neural progenitors generate spinal cord scaffolds. *Adv. Funct. Mater.*, **2018**, 28(39), 1801850.

133 Merceron, T. K.; Burt, M.; Seol, Y.J.; Kang, H.W.; Lee, S. J.; Yoo, J. J.; Atala, A. 3D printed stem-cell derived neural progenitors generate spinal cord scaffolds. *Biofabrication*, **2015**, 035003.

134 Costantini, M.; Testa, S.; Mozetic, P.; Barbetta, A.; Fuoco, C.; Fornetti, E.; Tamiro, F.; Bernardini, S.; Jaroszewicz, J.; Święszkowski, W.; Trombetta, M.; Castagnoli, L.; Seliktar, D.; Garstecki, P.; Cesareni, G.; Cannata, S.; Rainer, A.; Gargioli, C. Microfluidic-enhanced 3D bioprinting of aligned myoblast-laden hydrogels leads to functionally organized myofibers *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials*, **2017**, 131, 98–110.

135 Maggiotto, F.; Dalla Valle, E.; Fietta, A.; Visentin, L. M.; Giomo, M.; Cimetta, E. 3D bioprinting of a perfusable skin-on-chip model suitable for drug testing and wound healing studies. *Mater. Today Bio*, **2025**, 33, 101974.

136 Kim, B. S.; Gao, G.; Kim, J. Y.; Cho, D. W. 3D cell printing of perfusable vascularized human skin equivalent composed of epidermis, dermis, and hypodermis for better structural recapitulation of native skin. *Adv. Healthc. Mater.*, **2019**, 8(7), 1801019.

137 Mirabella, T.; MacArthur, J. W.; Cheng, D.; Ozaki, C. K.; Woo, Y. J.; Yang, M. T.; Chen, C. S. 3D-printed vascular networks direct therapeutic angiogenesis in ischaemia. *Nat. Biomed. Eng.*, **2017**, 1, 83.

138 Lee, A.; Hudson, A. R.; Shiwarski, D. J.; Tashman, J. W.; Hinton, T. J.; Yerneni, S.; Bliley, J. M.; Campbell, P. G.; Feinberg, A. W. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart. *Science*, **2019**, 365(6452), 482–487.

139 Ma, X. Y.; Liu, J.; Zhu, W.; Tang, M.; Lawrence, N.; Yu, C.; Gou, M. L.; Chen, S. C. 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and *in vitro* disease modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2018**, 132, 235–251.

140 Kim, J. J.; Park, J. Y.; Nguyen, V. V.; Bae, M.; Kim, M.; Jang, J.; Won, J. Y.; Cho, D. W. Pathophysiological reconstruction of a tissue-specific multiple-organ on-A-chip for type 2 diabetes emulation using 3D cell printing. *Adv. Funct. Mater.*, **2023**, 33(22), 2213649.

141 Nam, J. H.; Seo, J. T.; Kim, Y. H.; Kim, K. D.; Yoo, D. L.; Lee, J. N.; Hong, S. Y.; Kim, S. J.; Sohn, H. B.; Kim, H. S.; Kim, B. S.; Lee, K. T.; Park, H. J. Inhibitory effects of extracts from Smilacina Japonica on lipopolysaccharide induced nitric oxide and prostaglandin E_2 production in $RAW_{264.7}$ macrophages. *J. Plant Biotechnol.*, **2014**, 41(4), 201–205.

142 Knowlton, S.; Tasoglu, S. A bioprinted liver-on-a-chip for drug screening applications. *Trends Biotechnol.*, **2016**, 34(9), 681–682.

143 Cao, X.; Ashfaq, R.; Cheng, F.; Maharjan, S.; Li, J.; Ying, G. L.; Hassan, S.; Xiao, H. Y.; Yue, K.; Zhang, Y. S. A tumor-on-a-chip system with bioprinted blood and lymphatic vessel pair. *Adv. Funct. Mater.*, **2023**, 33(33), 2307408.

144 Yi, H. G.; Jeong, Y. H.; Kim, Y.; Choi, Y. J.; Moon, H. E.; Park, S. H.; Kang, K. S.; Bae, M.; Jang, J.; Youn, H.; Paek, S. H.; Cho, D. W. A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. *Nat. Biomed. Eng.*, **2019**, 3(7), 509–519.

145 Meng, F. B.; Meyer, C. M.; Joung, D.; Vallera, D. A.; McAlpine, M. C.; Panoskaltsis-Mortari, A. 3D bioprinted *in vitro* metastatic models *via* reconstruction of tumor microenvironments. *Adv. Mater.*, **2019**, 31(10), 1806899.

146 Zolfagharian, A.; Kouzani, A. Z.; Khoo, S. Y.; Ali Amiri Moghadam, A.; Gibson, I.; Kaynak, A. Evolution of 3D printed soft actuators. *Sens. Actuat. A Phys.*, **2016**, 250, 258–272.

147 Tognato, R.; Armiento, A. R.; Bonfrate, V.; Levato, R.; Malda, J.; Alini, M.; Eglin, D.; Giancane, G.; Serra, T. A stimuli-responsive nanocomposite for 3D anisotropic cell-guidance and magnetic soft robotics. *Adv. Funct. Mater.*, **2019**, 29(9), 1804647.

148 Wang, X. P.; Qin, X. H.; Hu, C. Z.; Terzopoulou, A.; Chen, X. Z.; Huang, T. Y.; Maniura-Weber, K.; Pané, S.; Nelson, B. J. 3D printed enzymatically biodegradable soft helical microswimmers. *Adv. Funct. Mater.*, **2018**, 28(45), 1804107.

149 Cvetkovic, C.; Raman, R.; Chan, V.; Williams, B. J.; Tolish, M.; Bajaj, P.; Sakar, M. S.; Asada, H. H.; Saif, M. T. A.; Bashir, R. Three-dimensionally printed biological machines powered by skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, 111(28), 10125–10130.

150 Liu, X. Y.; Yuk, H.; Lin, S. T.; Parada, G. A.; Tang, T. C.; Tham, E.; de la Fuente-Nunez, C.; Lu, T. K.; Zhao, X. H. 3D printing of living responsive materials and devices. *Adv. Mater.*, **2018**, 30(4), 1704821.

151 Mannoor, M. S.; Jiang, Z. W.; James, T.; Kong, Y. L.; Malatesta, K. A.; Soboyejo, W. O.; Verma, N.; Gracias, D.

H.; McAlpine, M. C. 3D printed bionic ears. *Nano Lett.*, **2013**, 13(6), 2634–2639.

152 Mohabatpour, F.; Al-Dulaymi, M.; Lobanova, L.; Scutchings, B.; Papagerakis, S.; Badea, I.; Chen, X. B.; Papagerakis, P. Gemini surfactant-based nanoparticles T-box1 gene delivery as a novel approach to promote epithelial stem cells differentiation and dental enamel formation. *Biomater. Adv.*, **2022**, 137, 212844.

153 Chen, X. B.; Fazel Anvari-Yazdi, A.; Duan, X.; Zimmerling, A.; Gharraei, R.; Sharma, N. K.; Sweilem, S.; Ning, L. Biomaterials/bioinks and extrusion bioprinting. *Bioact. Mater.*, **2023**, 28, 511–536.

154 Zhu, Z. J.; Ng, D. W. H.; Park, H. S.; McAlpine, M. C. 3D-printed multifunctional materials enabled by artificial-intelligence-assisted fabrication technologies. *Nat. Rev. Mater.*, **2021**, 6(1), 27–47.