

3D 打印海藻酸钠基功能材料的研究进展

张春阳¹, 傅超萍^{1*}, 吴冰¹, 张黎明², 陈爱政¹, 王士斌¹

(1. 福建省生物化工技术重点实验室(华侨大学), 生物材料与组织工程研究所, 厦门 361021;

2. 中山大学材料科学与工程学院, 广州 510275)

摘要:海藻酸钠优良的生物相容性和生物可降解性赋予其在生物医药领域广阔的应用前景, 如何实现利用海藻酸钠制造生物医用材料、组织、器官成为推动其优良性能在生物医学上应用的重要挑战之一。3D 打印技术拥有对结构的可控设计和材料的高利用率的优点, 在生物材料的个性化定制加工方面具有独特的优势。本文介绍了海藻酸钠的性质特点, 并综述了 3D 打印海藻酸钠基材料在组织工程以及肿瘤药物筛选模型等方面的最新应用, 最后作出了总结与展望。

关键词:3D 打印; 海藻酸钠; 水凝胶; 组织工程

引言

3D 打印技术是以数字模型文件为基础, 运用尼龙、石膏材料、金属材料、树脂等可粘合材料通过逐层打印的方式来构造物体的技术^[1]。区别于传统的制造工艺, 其是一种基于离散-堆积的增材制造技术, 已经广泛应用于机械制造、房屋建筑、生物医学、电子工业等领域。

海藻酸钠(Sodium Alginate, 简称 SA)是由 α -L-古洛糖醛酸(G)和 β -D-甘露糖醛酸(M)按(1-4)键接的一种线型无规共聚物, 是属于从褐藻中提取的一种水溶性阴离子聚多糖^[2]。海藻酸钠是一种无毒、生物相容性好、可降解的天然聚合物材料, 广泛用于生物 3D 打印研究中。本文对生物 3D 打印技术和海藻酸钠性质进行了简述, 重点总结了以海藻酸钠为生物 3D 打印墨水在骨组织工程支架、人工血管、人造器官以及体外构建肿瘤模型等方面的研究进展, 对未来海藻酸钠生物 3D 打印发展方向进行了展望。

1 生物 3D 打印技术介绍

生物 3D 打印是以细胞或生物材料为打印墨水通过增材制造方法按仿生形态、生物体功能、细胞微环境等要求打印出具有复杂结构和生物功能的生物三维结构。自 1995 年 3D 打印机出现以来, 3D 打印技术在生物医学领域的发展经历了四个层次(图 2)^[3]: 第一层次是使用无生物相容性材料用于 3D 打印, 所以打印出的产品不会用于人体, 一般用于制造医疗器械、手术模型等。例如, 复旦大学附属中山医院利用二维影像数据构建三维数字模型并利用 3D 打印技术制造出实体模型, 指导完成了经导管主动脉瓣置换手术^[4]; 第二层次是使用具有良好生物相容性但不可降解的材料, 一般用来制造永久性植入物。例如, 第四军医大学郭征教授团队以钛铝合金 3D 出植入假体, 与病人锁骨和肩胛骨病损部位完全一致, 完成世界范围内首次胛带不定形骨的重建^[5]; 第三层次是使用具有良好生物相容性且可降解的材料, 一般用来打印组织工程支架, 促进人体组织再生修复。例如, 广州迈普公司研发的以聚乳酸(Polylactic acid, PLA)为打印材料的可吸收硬脑膜补片, 最终可在人体内降解成二氧化碳和水, 不会在体内遗留异物^[6]; 第四层次是使用活细胞、蛋白及其它细胞外基质为材料, 打印出具有生物活性的产品, 其最终目标是制造

10.14028/j.cnki.1003-3726.2022.01.002

收稿:2020-06-08;修回:2021-09-02;

基金项目:国家重点研发计划重点专项(2018YFB1105600);

作者简介:张春阳, 硕士研究生, 主要研究方向生物材料;

* 通讯联系人:傅超萍, 博士, 讲师。E-mail:fuchp@hqu.edu.cn.

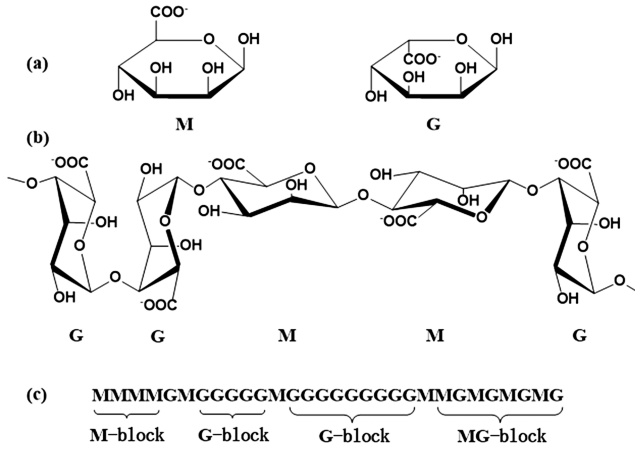


图 1 海藻酸钠分子结构

(a)M,G 单体;(b)海藻酸钠单体;(c)海藻酸钠聚合物链序列

Figure 1 Alginate structures

(a) Alginate monomers (M vs. G); (b) The alginate polymer; (c) Chain sequences of the alginate

组织、器官。2019 年,以色列科学家使用人类的脂肪组织打印出一个具有细胞、血管、心室和心房的心脏,实现了历史性的突破^[7]。

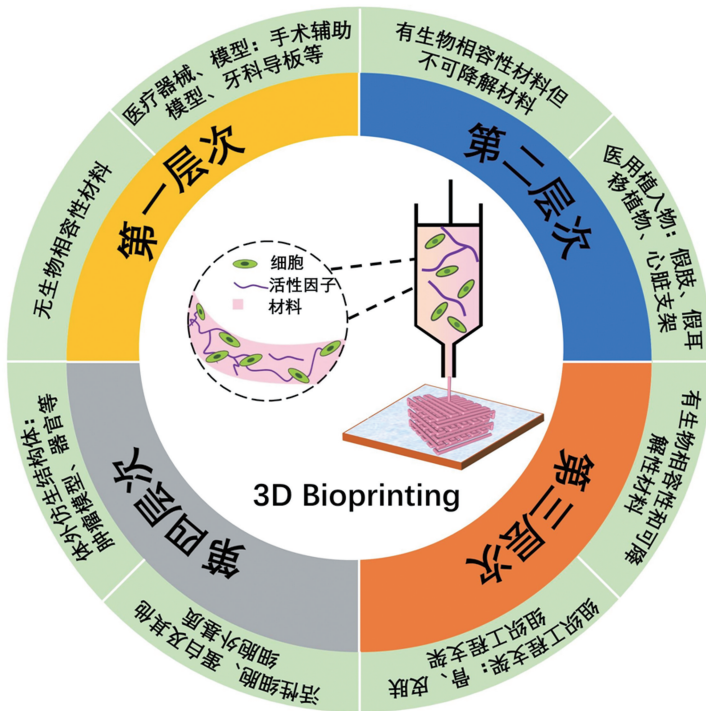


图 2 生物 3D 打印的四个层次

Figure 2 Hierarchical classification of 3D bio-printing technology

3D 打印技术能够精准、快速地根据不同患者进行各种组织、器官的个性化定制,并且对于打印结构的内在形态和孔隙大小高度可控,因此,3D 打印技术在组织工程领域受到了越来越多的关注。生物 3D 打印研究经过几十年的发展,3D 打印的材料种类越来越丰富,基于增材制造的原理已经开发了多种生物 3D 打印技术,包括光固化生物 3D 打印、喷墨生物 3D 打印、激光直写生物 3D 打印、挤出式生物 3D 打印

以及电纺丝生物 3D 打印(图 3)^[8]。光固化生物 3D 打印采用的墨水材料需要具有可光交联性、一定的力学性能和良好的生物相容性。因此,在墨水材料选择上较为丰富,然而由于需要激光光源进行光交联导致打印系统复杂性有所提高。电纺丝生物 3D 打印由于需要电场辅助精准控制材料沉积,因此对于打印系统的要求相对其它打印方式更为严格。这里对不同 3D 打印策略的优势、局限性做出了讨论(表 1)。

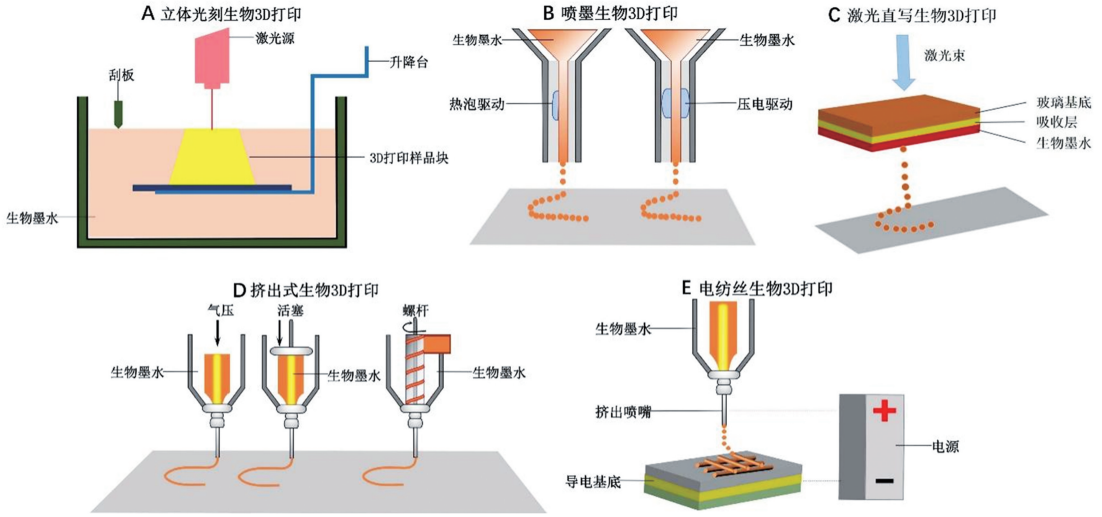


图 3 典型生物 3D 打印技术

(A)光固化生物 3D 打印;(B)喷墨生物 3D 打印;(C)激光直写生物 3D 打印;(D)挤出式生物 3D 打印;
(E)电纺丝生物 3D 打印

Figure 3 Schematic representations of the different strategies currently used in 3D bioprinting
(A) Stereolithography bioprinting; (B) Injected bioprinting; (C) Laser-assisted bioprinting;
(D) Extrusion bioprinting; (E) Electrospinning-based bioprinting

表 1 几种生物 3D 打印技术优缺点

Table 1 Overview of advantages and disadvantages of different bioprinting techniques

| 3D 打印技术 | 优点 | 缺点 |
|--------------|--|---------------------------------|
| 光固化生物 3D 打印 | 高细胞活性(>85%);生物墨水选择丰富;成型分辨率高($\approx 1\mu\text{m}$) | 打印系统复杂;对生物墨水要求高; |
| 喷墨生物 3D 打印 | 打印系统简单,成本低;成型分辨率高($\approx 30\mu\text{m}$);高细胞活性(80%~90%); | 负载细胞数量有限;对生物墨水粘度要求高 |
| 激光直写生物 3D 打印 | 高细胞活性(>95%);生物油墨粘度区间广($1\text{mPa}\cdot\text{s}\sim 300\text{mPa}\cdot\text{s}$) | 负载细胞数量有限;打印系统复杂;打印成本高 |
| 挤出式生物 3D 打印 | 可打印高粘墨水($30\sim 6\times 10^7\text{mPa}\cdot\text{s}$);负载细胞数多(含细胞球);打印工艺简单; | 打印速度慢;打印分辨率较低;细胞活性相对较低(40%~80%) |
| 电纺丝生物 3D 打印 | 打印分辨率高($< 1\mu\text{m}$);最适合高精度制造支架; | 不能直接负载细胞打印;打印系统复杂;打印成本高 |

2 海藻酸钠凝胶特性

当 pH 在 6~11 之间,海藻酸钠溶液具有良好的稳定性。当 pH 低于 6 时,会析出不溶于水的海藻酸;当 pH 高于 11 时,溶液会发生凝聚现象。海藻酸钠是一种天然聚阴离子电解质,每个六元环上都有一个羧酸根离子,因此不仅很容易和 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 等多价金属阳离子通过离子交换形成交联水

凝胶,也易与阳离子电解质(如聚赖氨酸和壳聚糖)形成性能优良的共混凝胶,还能够通过共价交联等方式形成复合凝胶。

2.1 离子交联

制备海藻酸凝胶的最常见方法是将海藻酸溶液和离子交联剂(如二价阳离子 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 等)混合。二价阳离子被认为仅与海藻酸分子链中的 G-嵌段有相互作用,因为 G-嵌段的结构能与二价阳离子高度配位^[9]。一条分子链上的 G-嵌段与邻近的另一条分子链的 G-嵌段共同与 Ca^{2+} 交叉连接,形成“蛋-盒(Egg-Box)”模型,并构成凝胶的三维网络结构^[10],图 4 表示“蛋-盒”的形成。由于 Cu^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 等对生物体具有一定的毒性,因此 Ca^{2+} 是最常用的离子交联剂。

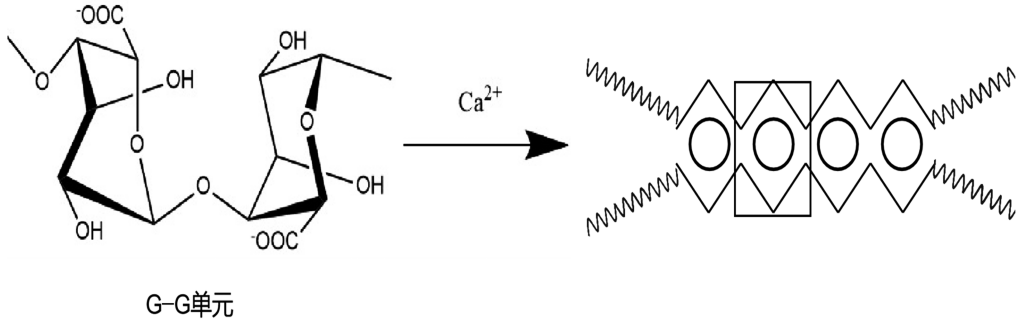


图 4 海藻酸钠与钙离子形成的“蛋-盒”结构

Figure 4 Schematic representation of the calcium-induced gelation of alginate in accordance with the “egg-box” structure

2.2 共价交联

共价交联已被广泛用于提高凝胶的物理性能的研究中。加在以离子交联方式形成的海藻酸钠水凝胶上的应力会逐渐变松弛,这是由交联键受力断裂或在别处重新形成的原因,会导致凝胶体系中水分的流失,引起塑性形变。以共价交联方式形成的凝胶中虽然也会发生水分迁移导致应力松弛的现象,但是不可游离及不可重新形成的共价键使其能够发生有效的弹性形变^[11]。然而,共价交联剂可能存在毒性,没有反应完的交联剂需要从凝胶中彻底除去。

通过共价交联制备海藻酸与不同分子量的聚乙二醇(PEG)-二元胺的凝胶,随着交联密度或凝胶中 PEG 重量百分数的增大,弹性模量一开始逐渐增大,当交联的分子量(MC)小于柔顺的 PEG 的分子量时,弹性模量会下降^[12]。后来的研究中证实,通过使用分子量不同的高分子或控制交联密度来控制海藻酸水凝胶的力学性能和溶胀性能是可行的。水凝胶的溶胀性能还会受到交联剂本身化学性质的影响。例如,可以将亲水性的交联分子(如 PEG)作为引入的高分子进入体系中,达到补偿水凝胶因交联反应而降低的亲水性的效果^[12]。

光交联也是属于共价交联的一种,可原位交联形成凝胶。光交联可以在温和的反应条件下实施,不仅可以加入合适的化学引发剂来引发,还能通过与药物或细胞的直接接触来引发。通过对海藻酸钠双键改性也可实现材料的可光交联特性,使用光交联水凝胶为打印墨水的光固化生物 3D 打印具有成型速度快、分辨率高的优点,已经被广泛应用。

3 3D 打印海藻酸钠在组织工程中的应用

以研究种子细胞、生长因子和支架材料的组织工程技术已经得到了迅速的发展^[13]。海藻酸钠作为热门的支架材料之一,具备性质稳定、良好的生物相容性和可降解性的优点,与其它材料复合后可具备优异的力学性能和降解可控性。同时,三维网状结构的海藻酸钠水凝胶可存储大量水分,多孔结构有助于营养物质和代谢废物的运输,为细胞生长粘附提供了舒适的立体空间^[14]。器官芯片的出现对于构建人体组织和模拟器官功能以及研发临床药物带来了极大的便利,可更进一步在体外模拟人体不同组织器官

的主要结构功能特征和复杂的器官间联系,预测人体对药物或外界不同刺激产生的反应,与 3D 技术结合在组织工程中具有广泛应用前景。

3.1 骨组织工程

由于频繁的外科创伤、意外事故及骨科疾病等导致临床上用于骨修复的材料一直以来呈供小于求的局面。临床上治疗主要是采取骨移植的方式,但无论是自体骨还是异体骨移植都会有不可避免的缺点。自体骨由于来自患者本身,在取骨量有限的条件下会增加患者的痛苦,异体骨由于潜在的免疫排斥反应也不适用于骨移植。因此,寻找具有良好的生物相容性的人工骨修复材料显得尤为重要,组织工程技术的出现为其提供了新思路。

Kim 等^[15]提出了一种制备骨组织工程支架的新思路,以 PCL(聚己内酯)/SA 为打印材料先通过熔融沉积的方式打印首层,再以负载 MG63 细胞的海藻酸钠预交联生物墨水为涂层逐层打印在 PCL/SA 多孔支架上,经过多次重复堆叠制备得到机械增强的负载细胞植入支架(图 5)以用于硬组织的修复。该方法显著提高了支架的力学强度、细胞活性、钙沉积以及细胞碱性磷酸酶(ALP)表达水平,证明了这种细胞涂层骨组织工程支架的制备方式是安全且有效的。

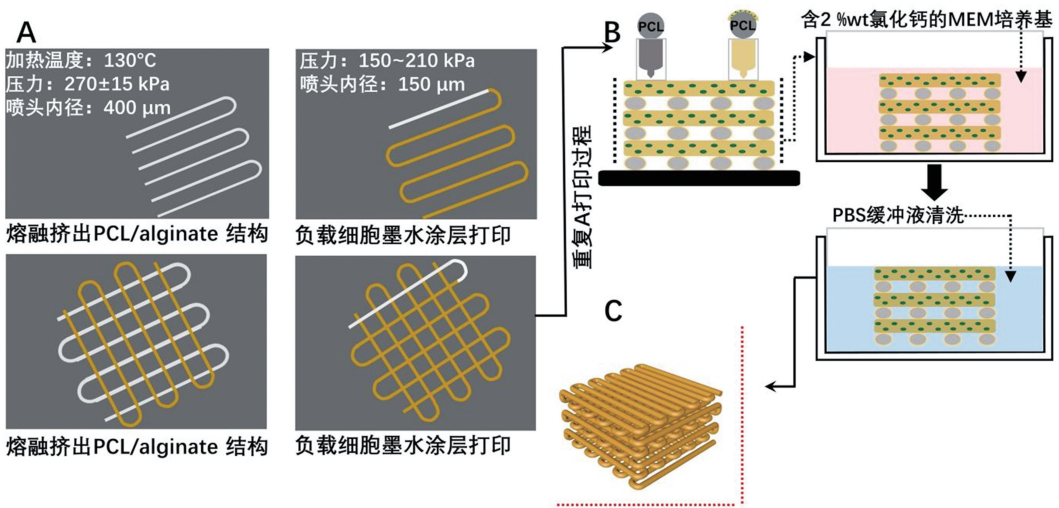


图 5 3D 打印 PCL/alginate 支架

(A) PCL/alginate 支架和 alginate 涂层打印; (B) 重复打印; (C) 完成负载细胞支架打印

Figure 5 Schematic showing the fabrication procedures of bioinks and cell-laden scaffold

(A) Fabrication procedure of cell-laden scaffold using PCL/alginate struts and cell-laden alginate fabricated by a melting plotting of PCL/alginate struts and cell-printing of the bioinks; (B) Repeat of cell-printing; (C) Fabricated cell-laden scaffold

由于海藻酸钠水凝胶的力学强度的局限性,相对于制备硬组织工程支架,更适用制备软骨组织工程支架^[16]。但是海藻酸钠水凝胶前驱体的粘度低、含水量较高,制备具有精密的外部形状和内部结构的水凝胶支架或细胞水凝胶结构仍然具有挑战性。黄永波^[17]以海藻酸钠水凝胶为载体培养成年动物关节软骨细胞,发现软骨细胞增殖迅速、细胞表型稳定,构建的工程化软骨可取得良好的软骨修复效果,证明了海藻酸钠在软骨修复方面的潜力。Antich 等^[18]以透明质酸(Hyaluronic acid, HA)及海藻酸钠为生物墨水、以人源软骨细胞为种子细胞,通过 3D 生物打印技术将生物墨水填充到以聚乳酸预制的软骨支架空隙中,通过该方法制备的生物墨水具备更好的打印特性、成胶特性和力学特性,还能诱导细胞成软骨化,为制造软骨组织过程支架提供了新的方法。You 等^[19]利用 3D 打印技术与一步浸没交联法制备了细胞负载海藻酸钠水凝胶软骨结构,在打印基底和交联剂中引入聚阳离子聚乙烯亚胺(Poly(ethylenimine), PEI)与呈聚阴离子的海藻酸钠通过静电吸引来维持支架的结构。结果表明,交联剂浓度处于较高水平时,细胞包封率越高,蛋白释放更符合人体内真实环境,更有利于细胞外基质的沉积。然

而,由于软骨结构分为三层,最外层为软骨层,中间层是钙化层,下层是软骨下骨层,其在化学成分和物理性质上都存在显著的差异^[20]。因此,软骨组织修复必须设计出一种能够高度还原软骨组织的结构,并能够诱导干细胞定向分化为软骨和骨细胞,从而在缺损的地方形成一个完整的软骨组织。为此,Zhang 等^[21]设计了通过物理交联、光交联和化学交联三种交联方法首次设计并成功制备了一种具有三层结构的梯度支架。经体内和体外的一系列测试证实,该支架具有理想的尺寸稳定性、多孔的内部结构、显著的力学性能、合适的溶胀和降解性能以及最佳的体内修复效果,能够精确地模仿软骨、钙化软骨和软骨下骨的结构。

3.2 血管组织工程

心血管疾病(CVD)是导致全球死亡人数最多的疾病。随着人口老龄化的到来,这一疾病的治疗将是人类面临的巨大挑战。合适的水凝胶材料和三维细胞培养技术结合 3D 打印,对于制造人工血管具有很大的优势。

Tabriz 等^[22]以 Ca^{2+} 预交联海藻酸钠水凝胶为打印墨水,设计了一种打印后在界面进行交联的装置,最后使用再次 Ba^{2+} 交联,三步交联的设计显著提高了打印的血管状结构的力学性能和降解稳定性,这种技术可适用于制备具有更复杂和多细胞结构的临床尺寸的软组织。

Gao 等^[23]提出一种全新的血管 3D 打印工艺实现了宏微跨尺度血管结构的打印,宏观流道可用于各种机械力的加载,微观通道可用于营养输送和化学物质加载。通过创新打印装置,利用同轴喷头制造出中空海藻酸钠凝胶纤维,装载成纤维细胞和平滑肌细胞的凝胶纤维可控沉积在三维打印平台的旋转模板上,内皮细胞种在中空凝胶纤维融合后形成的宏观通道内。细胞实验表明,培养七天后细胞活性仍维持在 90% 以上,微通道清晰可见。这些打印的血管结构与真实血管结构上有较高的相似性,机械性能良好,有望应用于组织工程中。

为制备出强度优异的血管结构,Zhou 等^[24]通过一种界面打印的新型技术以海藻酸钠- Ca^{2+} 和聚乙烯酰胺(PAM)双网络水凝胶为打印墨水,加入细菌纤维素(Bacterial cellulose,BC)以产生氢键作用,制备了高抗压低膨胀的人工血管。测试结果表明,制备出的血管可以承受人体正常血压并且能进行缝合,体外细胞培养和动物实验中均表现出优异的生物相容性,可诱导新血管的长出。

相比于传统的纯凝胶基生物墨水,脱细胞基质(Decellularized articular extracellular matrix, dECM)则能更好地模拟真实的细胞微环境。Gao 等^[25]将 VdECM(血管脱细胞外基质)与海藻酸钠混合制备复合生物墨水,用于阿伐他汀(Atorvastatin)/聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)微球和内皮祖细胞的包封,采用三维同轴打印技术构建了载药细胞型生物血管,通过将该结构移植到结扎的肢体静脉附近以治疗缺血性疾病,在小鼠模型中评估了所制备的生物血管(BBVs)(图 6),负载内皮祖细胞/阿伐他汀的生物血管可有效促进内皮祖细胞的存活和分化,提高新生血管率,挽救缺血肢体。

3.3 3D 打印其它人造器官

3D 打印人造器官属于生物 3D 打印的第四层次,它结合了生物学、材料学、计算机科学等主多学科,旨在制造出可适用于人体的组织、器官,以缓解目前器官移植中供体严重缺乏的窘境。Jeon 等^[26]以海藻酸钠为打印墨水通过 3D 打印制造出了肝脏模型,并与 HepG2 细胞共培养。检测肝脏的相关生物标记物(ALB/AFP/Ki67/CK19/CYP1A2)发现,标记物水平和正常肝组织相当,肝特异性基因表达增高。

虽然 3D 打印技术在软骨、皮肤等组织的打印已经取得成功,但对于肝、心脏、肾等功能器官的打印受限于难以打印微米尺度的血管,导致无法通过血液循环实现将氧气和营养成分输送到组织内以及将代谢废物排出^[27]。杜显彬等^[28]利用同轴流挤出系统制造封装肝细胞的中空细丝,利用 3D 打印技术叠层制造出含微通道网络的肝组织;实验表明,将肝细胞封装进海藻酸钠中打印成型,肝细胞存活率维持在 90% 以上且组织内部微通道网络完整,灌注测试证明灌注组可以显著提高肝细胞的存活率。为解决血管化问题,Yang 等^[29]选择 5% 明胶(Gelatin)搭配 1% 海藻酸钠作为打印墨水,包裹 HepaRG 细胞后经 3D 打印构建出三维肝脏类器官。通过对 3D 打印的肝脏类器官进行肝功能检测,其肝功能蛋白表达(ALB、

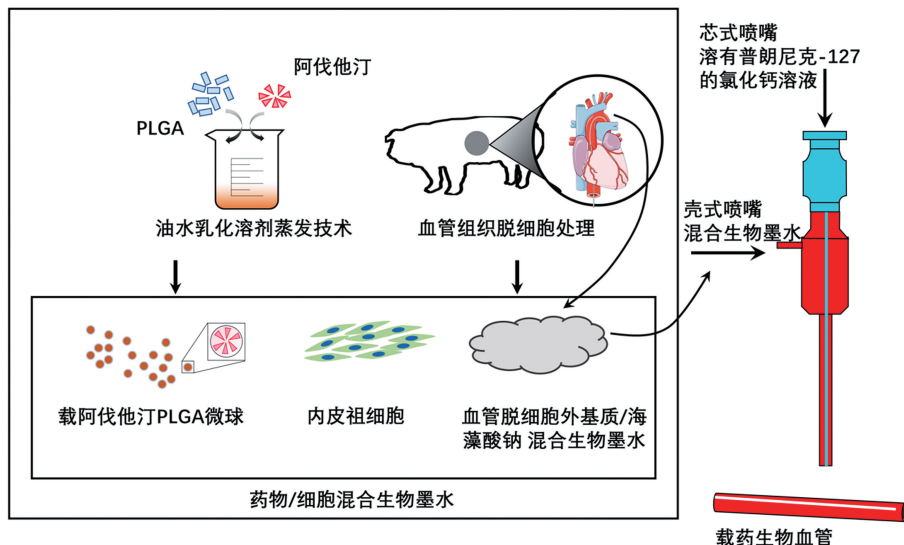


图 6 3D 打印构建生物血管示意

- (A) 将 VdECM 与海藻酸钠混合制备复合生物墨水,用于 Atorvastatin/PLGA 微球和内皮祖细胞的封装;
- (B) 采用三维同轴打印技术构建了载药细胞型 BBV

Figure 6 Schematic diagram of biological blood vessel constructed by 3D printing

- (A) A hybrid bioink was prepared by mixing VdECM and sodium alginate, which was used to encapsulate the atorvastatin/PLGA microspheres and endothelial progenitor cells;
- (B) A 3D coaxial printing technique was applied to construct the cell/drug-laden BBV

CK18、AAT、MRP2、TRANSFERRIN 等)远高于 2D 肝细胞和基质胶 3D 肝细胞,并且与原代人肝细胞的表达非常接近。研究者发现这是因为 3D 打印的肝脏类器官更好地诱导了肝特异性转录因子(FOXA2、HNF4A 等)。更重要的是,3D 打印的肝脏类器官分泌的白蛋白、 α -1 抗胰蛋白酶和因子 VII 与原代人肝细胞的分泌相当。进一步实验发现,3D 打印的肝脏类器官的排毒功能依然远高于 2D 肝细胞和基质胶 3D 肝细胞,并且与原代人肝细胞相当。而在形态方面,3D 打印的肝脏类器官构成团簇,并且细胞积累了糖原聚集体,说明 3D 打印的肝脏类器官在分化后达到了肝功能的水平。为进一步研究 3D 打印肝脏类器官在体内的肝脏功能,将其移植到肝衰的小鼠体内。移植后的小鼠寿命延长了近一倍,体重减轻现象也显著下降,并且移植后小鼠肝功能指标的血清水平也有显著上升。小鼠肝脏在移植 14 天后自发的构建出血管网络系统,这也进一步论证了 3D 打印肝脏类器官在移植后的体内功能性以及其确保寿命延长的心血管化的形成,为实现人造器官血管化提供了一种新思路。

除此之外,还有关于心脏^[30,31]、肺^[32,33]等案例有所报道,但目前的器官打印研究还仅停留在初级阶段。其中获取种子细胞以及实现血管化是目前最大的障碍,还需要结合微流控技术、器官芯片等继续探索。

4 3D 打印海藻酸钠在药物筛选中的应用

癌症是 21 世纪人类最主要的杀手,是一种在环境因素和遗传因素相互作用下导致的复杂性疾病^[34]。然而,受限於目前对癌症的发病发展机理的认识仍不够充分,临床上治疗癌症的手段十分有限。为解决这一难题,研究者通过在体外构建肿瘤模型用于肿瘤研究和抗肿瘤药物的筛选。传统方法是采用二维细胞培养,缺点是细胞所处肿瘤微环境(Tumor microenvironment, TME)与体内差异较大,影响细胞的基因表达、信号转导以及细胞间相互作用,研究所揭示的肿瘤细胞活动机制和耐药机制并不能等同于体内的实际情况。3D 打印技术的日趋完善,近年来发展起来的三维细胞培养(Three-dimensional cell

culture, 3DCC) 技术极大地推动了体外药物筛选模型的构建。3DCC 技术, 不仅可以弥补单层细胞培养的缺陷, 还可以最大程度地模拟细胞在体内的微环境和物质结构基础, 体现了细胞培养的直观性和条件可控制性^[35]。

海藻酸钠由于其在生理条件下能快速交联, 容易形成基质, 因而被广泛用于细胞的包封应用于体外肿瘤模型构建。2014 年, 清华大学孙伟教授团队^[36]运用该技术以明胶/海藻酸钠/纤维蛋白原负载为打印墨水在世界范围内首次构建出 *HeLa* 细胞体外三维肿瘤模型; 结果表明, *HeLa* 细胞在三维微环境中表新出更高的扩散速率, 更高的基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinase, MMP) 表达和对紫杉醇的抗药性。

Dai 等^[37]同样利用模拟细胞外基质的改良多孔明胶/海藻酸钠/纤维蛋白原水凝胶, 建立了三维生物打印胶质瘤干细胞模型。培养后发现, 胶质瘤干细胞在打印后增殖速率快, 细胞活性维持在 86% 以上, 不仅保持了肿瘤干细胞(Nestin) 的固有特性, 而且具有分化潜能(gliafibrillary acidic protein 和 β -tubulin III)。肿瘤血管生成生物标志物 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor) 表达在 1~3 周内持续增加。药敏结果显示, 在替莫唑胺(TMZ) 浓度为 $400\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 1600\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 3D 打印肿瘤模型对替莫唑胺的耐药率高于 2D 单层模型。

Mao 等^[38]使用 3D 打印技术, 以明胶-海藻酸钠-基质胶复合水凝胶材料及病人来源的肿瘤细胞构建了个性化的肝胆管癌肿瘤模型, 重现了原发肿瘤病理学特征及复杂生态环境, 为患者进行药物筛选。在该 3D 打印构建的结构体中, 肝胆管癌的细胞存活率达到了 90%, 并具有持续增殖及克隆形成能力。与 2D 培养相比, 肿瘤细胞在三维环境中展现出完全不同的生长形态, 而肿瘤的其他生物学特性, 如恶性化程度、干性、纤维化程度、入侵和迁移能力等均显著上调。在化疗药物 5-氟尿嘧啶、顺铂和靶向药物索拉菲尼处理后, 结构体中肿瘤细胞所表现出的高度抗性与其干性程度相一致。这些结果展示了 3D 打印个性化肿瘤模型在未来大规模药物检测方面的巨大应用价值。为进一步构建出稳定、高效的体外肝癌模型, Xie 等^[39]首次采用患者手术切除的肝细胞癌的肿瘤细胞样本用于模型构建, 将不同患者原代 HCC 肿瘤细胞与明胶海藻酸钠生物墨水混合经 3D 打印挤出完成肿瘤药筛模型构建。通过对 3D 打印 HCC 模型进行特异性生物标志物(AFP) 表达的测试, 研究者发现, 全部六名患者的个性化模型, AFP 表达测试的结果与患者表达一致。这说明 3D 打印 HCC 模型可以保留 HCC 细胞的特定生物标记。通过进一步进行外显子组测序(WES), 研究发现 3D 打印 HCC 模型与亲本 HCC 组织的单核苷酸位点变异(SNV) 保持高度一致性, 并发现长期培养的模型很好的保留亲本 HCC 组织的突变谱, 尤其是 HCC 的关键突变。这说明 3D 打印 HCC 模型高度还原人类 HCC 的遗传变异与表达谱, 模型质量十分可靠。

为了准确模拟肿瘤部位复杂的微环境, Cao 等^[40]将聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA) 和多臂聚乙二醇(PEGOA) 分别加入到含有甲基丙烯酸酯化明胶、海藻酸钠和光引发剂的生物墨水中, 利用同轴 3D 打印并经过 Ca^{2+} 交联和紫外光交联形成可灌注的中空血管和一端封闭的中空淋巴管, 再将其整合到含乳腺癌细胞的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶中构成乳腺癌肿瘤器官芯片。考察了芯片中细胞存活状况, 并比较了阿霉素(Doxorubicin) 在二维培养下与芯片三维培养条件下的作用效果。与二维培养相比, 芯片中抗肿瘤药物半抑制浓度(IC_{50}) 大大提高, 此肿瘤芯片的应用为肿瘤药物筛选提供了更类似于体内的循环途径。

5 展望

以海藻酸钠为 3D 打印墨水, 因其良好的生物相容性和生物可降解性、化学修饰的多样性、可复合材料选择丰富等诸多优势, 已成为构筑具有精准结构的生物活性组织的研究热点。主要研究方向有以下几个方面: (1) 设计海藻酸钠和其它生物材料或合成材料复合生物墨水, 研究重点是墨水的流变性, 目前基于海藻酸钠的生物墨水开发工作已经报道了很多, 今后基于 dECM 的海藻酸钠水凝胶生物墨水可能会成为热门; (2) 改进基于海藻酸钠生物墨水的打印方式, 最常见的挤出打印过程中产生的剪切力会对细胞

造成伤害,因此改进打印方式以提高细胞存活率是今后研究的重点方向;(3)构建血管化组织,这方面的报道也逐渐开始出现,但数量不多;由于制造微血管具有很大的难度,导致目前打印的活性组织难以应用于临床治疗,使用 3D 打印技术结合其它制造技术以解决这一难题也是未来的研究重点;(4)构建体外肿瘤模型用于药物筛选,越来越多研究表明,三维培养较二维培养的优势已经很明显,开发与体内微环境相似的生物墨水制造血管化体外肿瘤模型用于研究肿瘤的机理以及细胞的侵袭、转移将会进一步推动抗肿瘤药物的开发。

尽管生物 3D 打印海藻酸钠基材料在组织工程中已经取得许多成果,但海藻酸钠本身存在的缺点还需要不断的改善。如海藻酸钠自身聚阴离子特性使其易受到 pH 的影响,高度亲水性对于水溶性药物和疏水性药物的控释和负载效果较差,可采用与其它生物高分子复合或采取对分子结构进行修饰等方法进行改善。在制造构建体外药物筛选平台、器官方面,仍然面临制造出相互贯通的高度血管化结构的挑战,难以制造出具有生物活性的组织和器官。目前已证实将细胞接种到体外或体内预血管化的结构中比非预血管化结构中拥有更好的细胞活性,因此这种方式很适合与微流控技术相结合以解决这一技术难点。相信随着科研人员的共同努力,3D 打印海藻酸钠材料在组织工程领域将会有更好的成果不断涌现。

参考文献:

- [1] 胡堃,李路海,余均武,杜彩霞,危岩. 高分子通报, 2015, 9:61~70.
- [2] George M, Abraham T E. *J Control Release*, 2016, 114(1):1~14.
- [3] 徐毅. 中国工业评论, 2015, 5:46~53.
- [4] 孙小磊,汪纓,张晖,何伟. 中国医疗设备, 2017, 32(1): 99~102.
- [5] 裴延军,吴智刚. 中华创伤骨科杂志, 2014, 16:5.
- [6] 徐蒙蒙,阳范文,张雅欣,王晨光,陈晓明,田秀梅,朱继翔. 合成材料老化与应用, 2019, 48(1):93~98.
- [7] Noor N, Shapira A, Edri R, Wertheim L, Dvir T. *Adv Sci*, 2019, 6(11):1900344.
- [8] Heinrich A M, Liu W J, Jimenez A, Yang J Z, Akpek A, Pi Q M, Mu X, Hu N, Schiffelers M R, Prakash J, Xie J W, Zhang Y S. *Small*, 2019, 15(23):1805510.
- [9] Lee K Y, Mooney D J. *Prog Polym Sci*, 2012, 37(1):106~126.
- [10] Grant G T, Morris E R, Reese D A, Smith P J, Thom D. *FEBS Lett*, 1973, 32(1):195~198.
- [11] Zhao X H, Huebsch N, Mooney D J, Suo Z G. *J Appl Phys*, 2010, 107(6):3509.
- [12] Lee K Y, Rowley J A, Eiselt P, Moy E M, Bouhadir K H, Mooney D J. *Macromolecules*, 2000, 33(11):4291~4294.
- [13] 方幸幸. 仿生明胶甲基丙烯酰胺水凝胶支架的骨组织工程研究. 广州:南方医科大学, 2016.
- [14] Rokstad A M, Laci I, Vos P D, Strand B L. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 67(10):111~130.
- [15] Kim Y B, Lee H, Yang G H, Choi C H, Lee D, Hwang H, Jung W K, Yoon H, Kim G H. *J Colloid Interf Sci*, 2016, 461(1): 359~368.
- [16] Unagolla J M, Jayasuriya A C. *Appl Mater Today*, 2020, 18:100479.
- [17] 黄永波. 海藻酸钠-成年软骨细胞培养移植修复成年兔关节软骨缺损的实验研究. 太原:山西医科大学, 2007.
- [18] Antich C, Vicente J D, Jiménez G, Chocarro C, Carrillo E, Montañez E, Gálvez-Martín P, Marchal J A. *Acta Biomater*, 2020, 106(1):114~123.
- [19] You F, Wu X, Zhu N, Lei M, Eames B F, Chen X B. *ACS Biomater Sci Eng*, 2016, 2(7):1200~1210.
- [20] Heinegård D, Saxne T. *Nat Rev Immunol*, 2011, 7:50~56.
- [21] Zhang H, Huang H F, Hao G R, Zhang Y S, Ding H, Fan Z J. *Adv Funct Mater*, 2021, 31, 2006697.
- [22] Tabriz A G, Hermida M A, Leslie N R, Shu W M. *Biofabrication*, 2015, 7(4):5012.
- [23] Gao Q, Liu Z J, Lin Z W, Qiu J J, Liu Y, Liu A, Wang Y D, Xiang M X, Chen B, Fu J Z, He Y. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3(3):399~408.
- [24] Zhou Y, Gui Q Y, Yu W Y, Liao S L, He Y L, Tao X L, Yu Y, Wang Y P. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, 5(11):6311~6318.
- [25] Gao G, Lee J H, Jang J, Lee D H, Kong J S, Kim B S, Choi Y J, Jang W B, Hong Y J, Kwon S M, Cho D W. *Adv Funct Mater*, 2017, 27(33):1700798.
- [26] Jeon H, Kang K, Park S A, Kim W D, Paik S S, Lee S H, Jeong J, Choi D H. *Gut Liver*, 2017, 11(1):121~128.
- [27] Gao Q, He Y, Fu J, Liu A, Ma L. *Biomaterials*, 2015, 61:203~215.

- [28] 杜显彬, 徐铭恩, 王玲, 周永勇. 中国生物医学工程学报, 2018, 37(6):731~738.
- [29] Yang H Y, Sun L J, Pang Yu, Hu D D, Xu H F, Mao S S, Peng W B, Wang Y N, Xu Y Y, Zheng Y C, Du S D, Zhao H T, Chi T Y, Lu X, Sang X T, Zhong S X, Wang X, Zhang H B, Huang P Y, Sun W, Mao Y L. *Gut*, 2021, 70:567~574.
- [30] Hinton T J, Jallerat Q, Palchesko R N, Park J H, Grodzicki M S, Shue H J, Ramadan M H, Hudson A R, Feinberg A W. *Sci Adv*, 2015, 1(9): e1500758.
- [31] Duan B, Hockaday L A, Kang K H, Butcher J T. *J Biomed Mater Res Part A*, 2013, 101A(5):1255~1264.
- [32] 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, Jahansson F, Randles Amanda, Rosenkrantz J E, Louis-Rosenberg J D, Galie P A, Stevens K R, Miller J S. *Science*, 2019, 364(6439):458~464.
- [33] Matoba M, Takagi T, Tsujimoto H, Ozamoto Y, Ueda J, Hagiwara A. *Biomed Res Int*, 2018, 3808675.
- [34] 段纪俊, 严亚琼, 杨念念, 曾晶, 郑荣寿, 张思维, 陈万青. 中国医学前沿杂志, 2016, 8(7):17~23.
- [35] 卓志远, 陈刚, 刘华. 肿瘤, 2018, 38(5):502~507.
- [36] Zhao Y, Yao R, Ouyang L L, Ding H X, Zhang T, Zhang K T, Chen S J, Sun W. *Biofabrication*, 2014, 6(3):035001.
- [37] Dai X L, Ma C, Lan Q, Xu T. *Biofabrication*, 2016, 8(4):5005.
- [38] Mao S S, He J Y, Zhao Y, Liu T K, Xie F H, Yang H Y, Mao Y L, Pang Y, Sun W. *Biofabrication*, 2020, 12:0045014.
- [39] Xie F H, Sun L J, Pang Y, Xu Gang, Jin B, Xu H F, Lu X, Xu Y Y, Du S D, Wang Y N, Feng S, Sang X T, Zhong S X, Wang X, Sun W, Zhao H T, Zhang H B, Yang H Y, Mao Y L. *Biomaterials*, 2021, 265:120416.
- [40] Cao X, Ashfaq R, Cheng F, Maharjan S, Li J, Ying G L, Hassan S, Xiao H Y, Yue K, Zhang Y S. *Adv Funct Mater*, 2019, 29, 1807173.

Sodium Alginate-based Functional Materials for 3D Printing

ZHANG Chun-yang¹, FU Chao-ping^{1*}, WU Bing¹, ZHANG Li-ming², CHEN Ai-zheng¹,
WANG Shi-bin¹

(1. *Fujian Provincial Key Laboratory of Biochemical Technology (Huaqiao University), Institute of Biomaterials and Tissue Engineering, Xiamen 361021, China*; 2. *School of Materials, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China*)

Abstract: The excellent biocompatibility and biodegradability of sodium alginate give it wide applications in the field of biomedicine. How to use sodium alginate to manufacture biomedical materials, tissues and organs has become one of the important challenges to promote its excellent performance in medical applications. 3D printing technology gets the advantages of controllable design of structure and high utilization rate of materials, which can realize personalized manufacturing. In this paper, the latest applications of 3D printing sodium alginate based materials in bone tissue engineering scaffolds, artificial blood vessels, *in vitro* construction of tumor models, artificial organs and other aspects in tissue engineering were discussed and prospected.

Key words: 3D Printing; Alginate; Hydrogel; Tissue-engineering