

# 生物研究中高仿真微生态环境的建立

王晓晨, 鲁金蕾, 容晓晖, 袁洁, 叶方富\*, 刘雳宇\*

中国科学院物理研究所, 北京 100190

\* 联系人, E-mail: liu@iphy.ac.cn

2015-12-03 收稿, 2016-01-05 修回, 2016-01-08 接受

国家重点基础研究发展计划(2013CB837200)、国家自然科学基金(11474345)和北京自然科学基金(7154221)资助

**摘要** 随着当今生物和医学复杂问题的深入研究, 迫切需要体外可模仿生物体(如人体)内部的三维微环境的实验工具, 而传统的软刻蚀和微加工工艺已难以满足需求. 因此结合生物兼容性材料的三维打印技术, 是未来体外构建个体化的生物实验装置的大趋势. 本文系统性地介绍了3-D打印技术的背景. 因为三维生物结构构建的特殊性, 生物3-D打印在材料和技术层面都面临着新的挑战. 通过对近几年相关领域发展的回顾, 我们提出了一种高仿真微生态环境构建和监测一体化系统的方案, 为三维生物体系的研究提供了新的思路.

**关键词** 高仿真微生态环境, 3-D打印, 生物兼容性材料, 生物物理

自从培养皿被发明, 传统的生物学家们就习惯了在二维环境中培养、操纵细胞、微生物, 完成体外研究工作, 而至于模拟体内环境的实验就完全依赖于实验动物. 但是随着研究工作的不断深入, 科学家们发现二维环境中生物体的行为与三维环境中有着巨大差异, 并且越来越科学量化的实验要求、组织工程等新学科的发展、动物实验的广为诟病和伦理学挑战等都在催促着体外三维高仿真微生态环境制造技术的发展<sup>[1,2]</sup>.

但是具有高仿真度的生物微环境是相对复杂、精细的, 并且需要兼顾生物相容性, 传统制造方式显然是无能为力, 所以对于这一领域, 就不得不提到时下最受关注的制造技术: 3-D打印. 3-D打印又称三维打印, 是一种累积制造技术, 它是以数字模型文件为基础, 运用特殊蜡材、粉末状金属或塑料等可黏合材料, 通过打印一层层的黏合材料来制造三维的物体<sup>[3,4]</sup>. 3-D打印技术, 被认为是对于未来具有革命性意义的, 现在已经被广泛应用于装备制造、食品加工、文物保护、组织工程等众多领域<sup>[5]</sup>, 甚至现在已经有了

可以供普通民众体验的3-D人像写真的服务公司, 而家用级别的3-D打印机也是层出不穷, 它就好像是神笔马良手中的一支画笔, 可以让我们的所想所看快速地变为现实.

最早的3-D打印技术为Charles. W. Hull在1986年发明的立体平板印刷(stereo lithography appearance, SLA), 即通过紫外光逐层固化光敏材料(光敏树脂), 之后的数字光处理法(digital light processing, DLP)<sup>[6]</sup>也是采用该原理. 除此之外还有一类采用融化材料逐层叠加固化的方式, 如S. Scott Crump 20世纪80年代后期发明的熔融沉积法(fused deposition modeling, FDM)<sup>[7]</sup>, 在1990年被Stratasys公司商业化推广. 熔融沉积式打印是将材料在喷头处融化后喷出, 在衬底冷却凝固, 通过移动喷头位置, 达到在三维尺度上加工的目的. 与此相类似的, 还包括熔丝制造法(fused filament fabrication, FFF)<sup>[8]</sup>、分层实体制造法(laminated object manufacturing, LOM)、电子束熔化成型(electron beam melting, EBM)、选择性激光烧结(selective laser sintering, SLS)<sup>[9]</sup>、直接激光烧结(direct

**引用格式:** 王晓晨, 鲁金蕾, 容晓晖, 等. 生物研究中高仿真微生态环境的建立. 科学通报, 2016, 61: 1-11

Chen W X, Lei L J, Hui R X, et al. Micro-ecological environment simulation for biological research (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 1-11, doi: 10.1360/N972015-01229

metal laser sintering, DMLS)<sup>[10]</sup>等.

3-D打印技术到现在,发展了近30年,最常见的打印技术总结起来包括:通过变温固化的喷墨式打印、通过双光子固化的飞秒双光子三维直写技术、通过紫外固化的紫外固化水凝胶技术.随之而来的是不同的打印速度、精度,以及不同的打印材料需求,而中外科学家也利用这3种三维微结构加工手段在生物学、医学研究中进行了探索<sup>[5]</sup>,接下来将予以介绍.

## 1 3-D打印技术方法

### 1.1 喷墨式3D打印技术

喷墨式3D打印,是打印喷头将一薄层(1~100 pL)液体或胶体喷出,通过冷却(或加热)使材料凝结,再在此基础上逐层喷涂,从而打印出三维结构(图1),打印喷头包括加热熔融式和压电控制式(非加热)<sup>[3,11]</sup>.先进的喷墨式3-D打印机精度可达到十几微米、打印速度较快适用于大尺度结构的加工.喷墨式3-D打印技术可以利用的打印材料也非常广泛,包括塑料、蜡质、金属、水凝胶等<sup>[12~17]</sup>,并且,该方法是外部叠加式加工,因而可以在打印过程中更换打印材料<sup>[18]</sup>,从而能够在同一样品中集合不同材料来满足不同部位的性能需求.且加工设备相对简单,因此

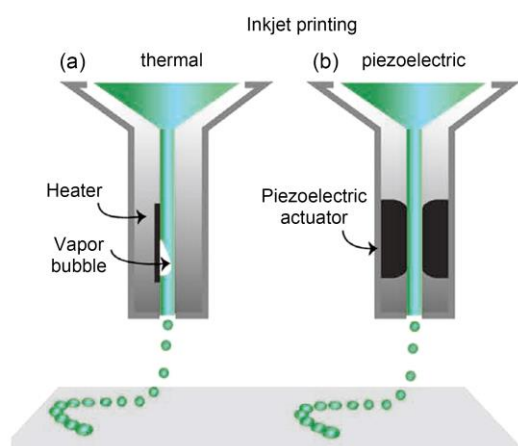


图1 (网络版彩色)喷墨式3-D打印工作原理,(a)热融式,将加热融化的材料从加热式喷头喷出;(b)压电控制式,通过调节压力来控制打印过程<sup>[3]</sup>

**Figure 1** (Color online) The schematic of inkjet printing. (a) is thermal inkjet printing, small volumes of the printing fluid are vaporized by a micro-heater to create the pulse that expels droplets from the print head; (b) is piezoelectric inkjet printing, a direct mechanical pulse is applied to the fluid in the nozzle by a piezoelectric actuator, which causes a shock wave that forces the bioink through the nozzle<sup>[3]</sup>

现阶段不论是研究使用还是民用,该形式的3D打印机都是被最广泛推广的.

在生物医学研究中,这项技术被应用于组织工程学以及细胞三维微环境建立,包括:(1)生物相容性高仿真微环境构造,从而在更具有仿真度的结构中研究细胞行为<sup>[19]</sup>;(2)混合细胞的组织打印<sup>[4,20]</sup>;(3)支架打印,在组织重构中起到支撑结构的作用<sup>[1]</sup>;(4)植入物加工,如骨钉、人造骨骼等<sup>[21~23]</sup>.

Ahn研究团队,将海藻酸钠混合细胞作为材料,采用喷墨式3-D打印的方法,利用CaCl<sub>2</sub>固化,探索低温加工领域兼顾加工精度(孔径、孔径连接等)和细胞活性的最适宜条件,最终发现-10℃,60 min为最佳处理条件,在三维微孔结构中成骨细胞(MG63)和间质干细胞(MSC)存活率分别可达到84%和70%<sup>[19]</sup>(图2).

### 1.2 飞秒双光子三维直写技术

喷墨式3D打印技术虽然在加工速度、材料选择范围上占据优势,但是在制造高精度三维微结构时仍稍显粗糙,而飞秒双光子三维激光直写技术则可在加工精度方面大为提升.

飞秒双光子三维激光直写技术固化材料的方式为依靠双光子聚合化学反应,即利用光刻胶中的光引发剂与光敏化剂配合吸收双光子,引起聚合物单体链式聚合反应.由于双光子的吸收率正比于光强的平方,因此固定物镜焦点不变精确移动样品台,可使光敏材料逐点聚合固化,从而得到较高精度的三维微结构<sup>[15,24~26]</sup>(图3).飞秒双光子激光直写技术拥有的打印精度可到达二维特征尺度100 nm,三维特征尺度也可以小于150 nm.

由于飞秒双光子三维直写技术无法直接固化混合细胞的材料,且加工精度高、所需时间长,从而限制了其制造尺寸,因而在生物研究领域主要被应用在制造三维微结构、组织支架、微型机器人等<sup>[27,28]</sup>.

Tottori研究组<sup>[29]</sup>利用激光直写技术将SU-8光刻胶加工成三维结构,之后在其表面用电子束蒸发镀膜的方法分别镀上一层镍(Ni)和钛(Ti),制成磁螺旋微机械结构.这些螺旋微型机器能够在三维空间中高速在去离子水和血清中运动(图4).小鼠成肌细胞也可轻易在设备上黏附、迁移,证明其并不具有生物毒性.这种灵活的制造方式可以广泛应用在微机械领域,未来很有希望在局部药物递送等领域得到应用.

不仅如此,科学家们还尝试用三维微结构限制

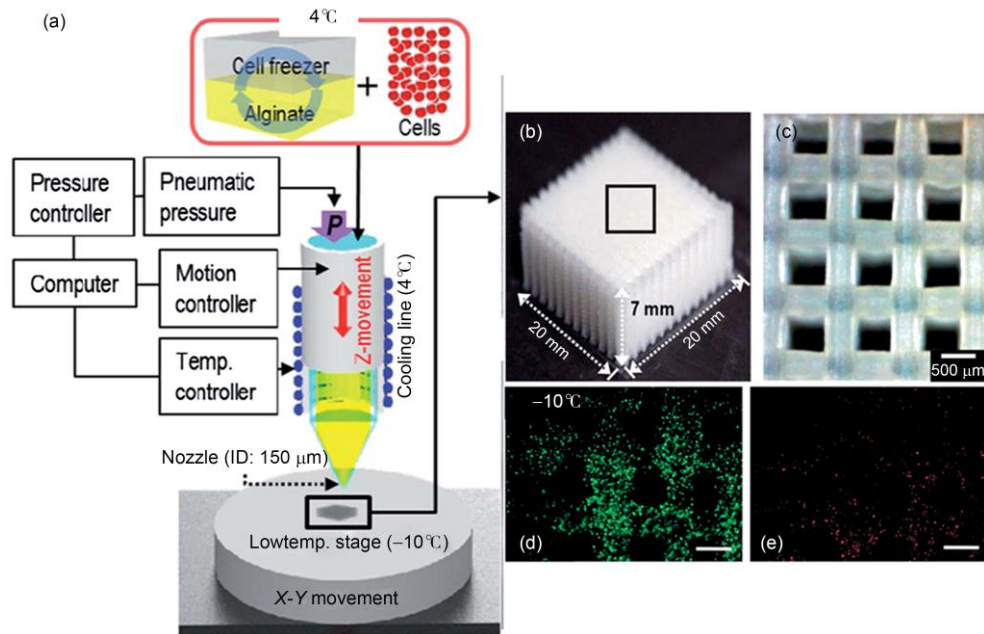


图2 (网络版彩色)利用喷墨式将混合细胞的海藻酸钠加工成三维阵列。(a) 低温喷墨式3-D打印原理图; (b), (c) 三维微孔支架的侧面及表面细节图; (d), (e) 在 $-10^{\circ}\text{C}$ 条件下加工的结构中MG63 细胞存活率((d) 存活细胞图像, (e) 死亡细胞图像)<sup>[19]</sup>

Figure 2 (Color online) (a) Schematic of the cell dispensing with low-temperature processing method; (b), (c) surface and side views of magnified images illustrating the pore structures; (d), (e) cell (MG63) viability with processing temperature of  $-10^{\circ}\text{C}$  in the DLTM. Fluorescence images indicating live (d) and dead (e) cells in the same region<sup>[19]</sup>

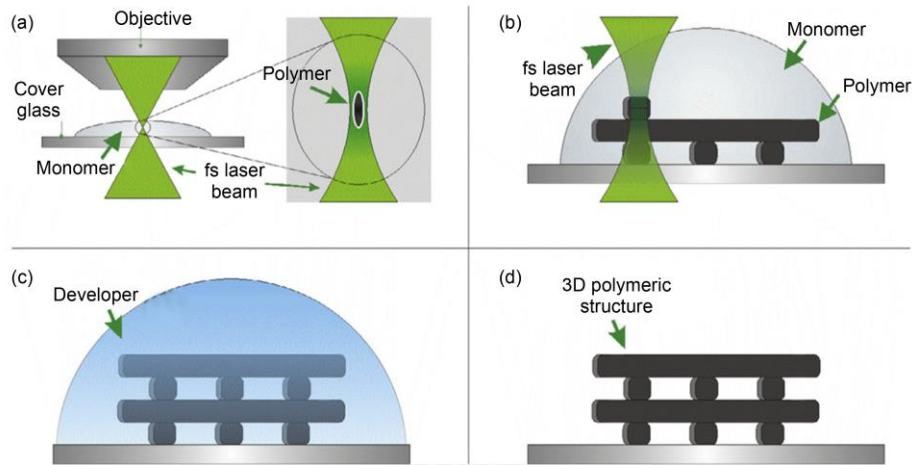


图3 (网络版彩色)飞秒双光子三维激光直写技术加工原理图。(a) 激光聚焦; (b) 激光直写加工; (c) 显影; (d) 完成三维聚合物结构<sup>[25]</sup>

Figure 3 (Color online) Schematic of DLW. (a) Beam focusing; (b) laser writing; (c) development; (d) completed structure<sup>[25]</sup>

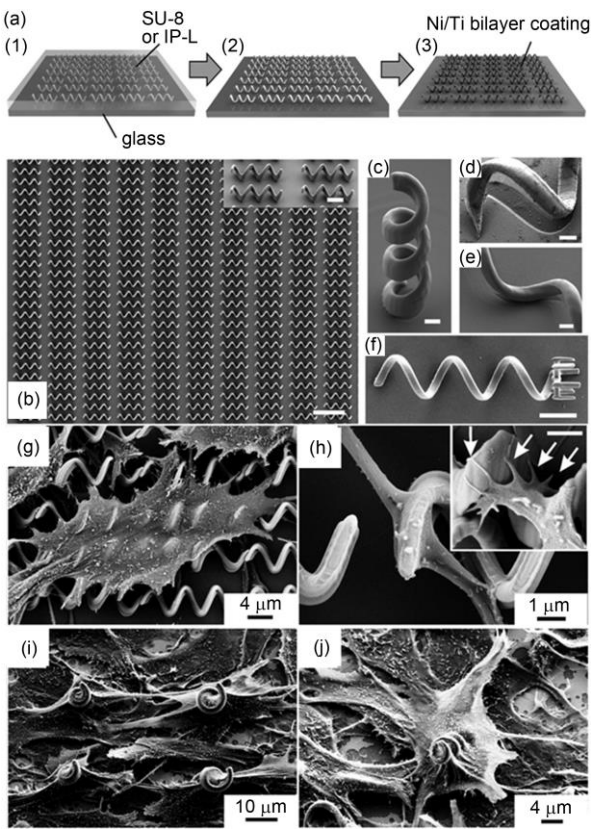
细胞行为<sup>[30]</sup>、测量细胞力<sup>[31]</sup>, 把控制与测试引入了更微观的领域。相应的局面是, 现阶段双光子激光直写技术加工出的结构也确实更多是作为实验的辅助工具, 只是附着细胞或者微生物, 起到机械或者力学作用, 很难与生物体本身产生互动。并且受制于加工尺寸, 并不适于生物体的群体性行为研究。

### 1.3 紫外固化水凝胶技术

分析过喷墨式3-D打印与飞秒双光子激光直写技术, 如何兼顾精度与速度成为了三维微结构制造领域面临的重大问题, 而紫外固化水凝胶技术成为现阶段, 解决这一问题的一大突破口。

目前传统的紫外固化水凝胶技术, 则是通过紫



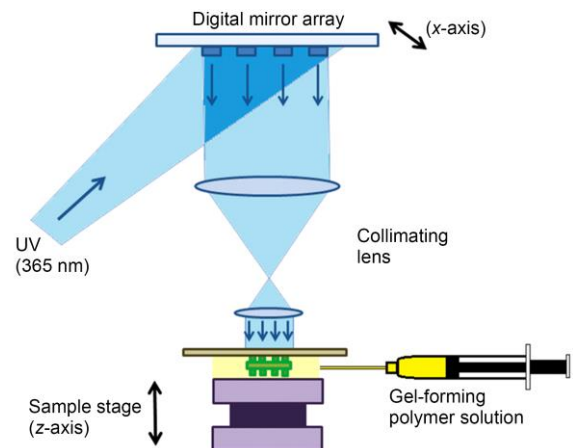


**图 4** 激光直写技术加工磁螺旋微机械结构. (a) 加工过程原理图: 利用三维激光直写技术将SU-8 或IP-L光刻胶加工成螺旋结构, 再在其表面镀上Ni和Ti; (b)~(f) 螺旋微机械及细节图(b)中大图及(f)标尺为 10  $\mu\text{m}$ , 其余标尺为 2  $\mu\text{m}$ ; (g), (h) 成肌细胞在水平IP-L螺旋结构上培养 3 天后的扫描电镜照片; (i), (j) 成肌细胞在垂直SU-8 螺旋结构上培养 3 天后的扫描电镜照片<sup>[29]</sup>

**Figure 4** The fabrication of helical micromachines using DLW. (a) The schematic of fabrication procedure: helical swimming micromachines are from SU-8 or IP-L using DLW, which are coated with Ni and Ti; (b)~(f) details and a horizontal array of micromachines (the scale bars are 2  $\mu\text{m}$  from (b) inset to (e) and 10  $\mu\text{m}$  in (b) overview and (f)); (g) and (h) SEM microscopy images show cells rested on the horizontal array of IP-L helices after 3-day culture; (i) and (j) SEM microscopy images show cells rested on the vertical array of SU-8 helices after 3-day culture<sup>[29]</sup>

紫外光聚合交联固化水凝胶材料. 紫外光聚焦后照射在数字微镜芯片上, 逐层照射水凝胶材料固化成型, 就可以实现对材料外部和内部结构的精确调控(图5)<sup>[32~34]</sup>.

Cha研究组<sup>[32]</sup>用具有生物相容性的聚乙二醇双丙烯酸酯化明胶(Polyethylene glycol 200 diacrylate, PEGDA)通过紫外光固化水凝胶的方法制造出了三维支架, 并将其放置在水凝胶中紫外二次固化, 从而形成内部包含支架的三维结构(图6). 该结构与单一固化水凝胶相比, 在未改变水凝胶本身刚性的



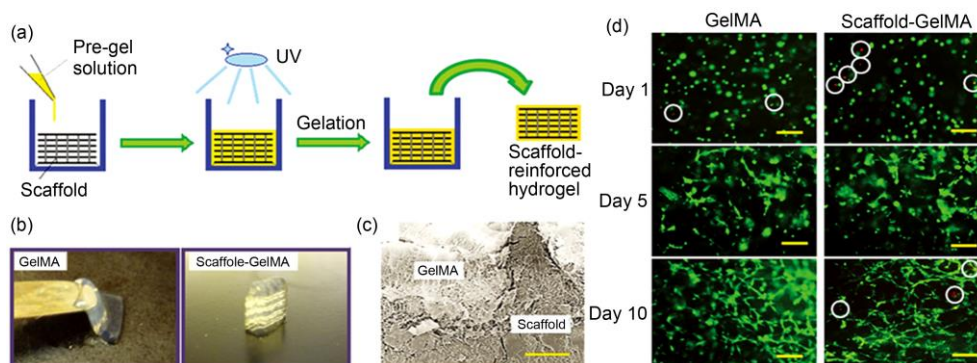
**图 5** (网络版彩色)紫外光照射固化水凝胶技术原理图, 包含紫外光源、数字微镜阵列、投影光学系统、可动移动平台、注胶系统, 逐层固化形成三维微结构<sup>[32]</sup>

**Figure 5** (Color online) Schematic of digital mirror device projection printing (DMD-PP) system, including UV light source, digital mirror array, projection lens assembly, sample stage, gel-injection system. The 3-D structures are made layer by layer<sup>[32]</sup>

基础上增加了整体结构的强度. 此项研究提出的通过设计内部支架来增强结构强度的思路, 将为组织工程领域的发展提供新的思路. 但是与此同时, 该实验中将成纤维细胞混合入水凝胶中做外部结构固化, 细胞在照射紫外光后虽保持了80%的存活率, 但是并没有验证细胞是否发生基因突变, 这也正是紫外固化水凝胶技术的一大弊端——由于紫外光对细胞存在伤害, 从而无法直接加工混合细胞的材料.

综合以上3种技术, 喷墨式3D打印技术打印速度快、结构简单易于推广, 且材料可选范围广, 但打印精度较低, 不能满足精细化微结构设计制造的要求; 双光子三维直写技术打印精度高, 但打印速度较慢、加工尺寸过小, 在组织工程产业化应用领域存在短板; 紫外光固化水凝胶技术在速度和精度上相对兼顾了前两种技术的优势, 可成为3D打印在高仿真生物微生态环境建立方面应用的一大技术基础, 不过由于无法加工含细胞微结构, 也并非十全十美.

因而, 在实际研究工作中, 经常是综合利用多种打印技术来取长补短地巧妙制造. Bertassoni等人<sup>[35]</sup>就在研究工作中, 用喷墨式3D打印技术开发出了一种琼脂糖纤维线状物来作为人工血管的框架, 后利用生物相容性水凝胶覆盖, 经紫外光照射后固化交联成型, 再抽出模版就形成了血管的微通道结构. 应用该项技术研究人员已经成功构建出了可以表现出



**图 6** (网络版彩色)聚乙二醇双丙烯酸酯化明胶三维支架。(a) 加工原理图: 将微加工的PEGDA支架置于含细胞水凝胶中再次紫外固化形成支架加固的三维结构;(b) 含5%甲基丙烯酸酯明胶(Methacrylated Gelatin, GelMA)的水凝胶分别加工的不含支架和包含支架的三维结构;(c) 支架强化结构界面区域的扫描电镜照片(标尺为200 μm);(d) 培养1, 5, 10天后细胞活性对比, 未标注代表活细胞, 圆圈内代表死细胞(标尺为100 μm)<sup>[32]</sup>

**Figure 6** (Color online) PEGDA scaffolds. (a) Schematic of fabrication: The microfabricated PEGDA scaffold was placed in a mold, and the pre-gel solution containing GelMA and a photoinitiator was added. Subsequent UV-initiated polymerization led to scaffold-reinforced hydrogel formation; (b) GelMA hydrogels at 5 wt% had a weak structural integrity whereas the structural integrity of the scaffold-reinforced GelMA hydrogel at the same concentration was well maintained. (c) SEM image of a cross-section of scaffold-reinforced GelMA hydrogels (scale bar: 200 μm). (d) Fluorescent microscopic images of GelMA and scaffold-GelMA hydrogels, encapsulated with fibroblasts at days 1, 5 and 10 (Outside circle: live cells, Inside circles: dead cells), scale bar: 100 μm<sup>[32]</sup>

具有交叉结构的血管网络,之后用充满细胞的水凝胶来填充该网络,表明了血管网络具有良好的生物相容性,未对细胞活性及分化产生影响(图7)。这项研究为解决人工血管这一组织工程学领域的难题提供了新思路,也表明,未来更加成熟的3-D打印系统也许并不是依靠单一的成型方式,而应该是综合利用多种加工手段,甚至也将观察、外界控制高度一体化,简化整个制造过程,丰富系统的功能。

## 2 生物3-D打印的“油墨”

并且,相比于其他行业的结构制造,生物医学领域的3-D打印技术除了精度、速度、尺寸大小的要求,更重要的是所打印出的产品还要具有生物相容性。而如今3-D生物打印优势发挥的主要障碍,就是兼具机械性能和生物相容性的打印“油墨”的匮乏。现阶段配合不同加工手段主要使用的生物3-D打印材料主要分为:有机聚合物、无机材料、天然生物材料<sup>[4]</sup>。

### 2.1 有机聚合物

光固化法(双光子固化和紫外光固化)是3-D打印的重要手段,因而各式具有生物相容性的光敏有机化合物就成为生物骨架打印中的主力军,包含丙烯酸酯光敏聚合物、SU-8光刻胶(负性环氧树脂型近紫外线光刻胶)、ORMOCER光刻胶、甲基丙烯酸、聚乙二醇双丙基酸酯化明胶等。在温敏材料中也有相

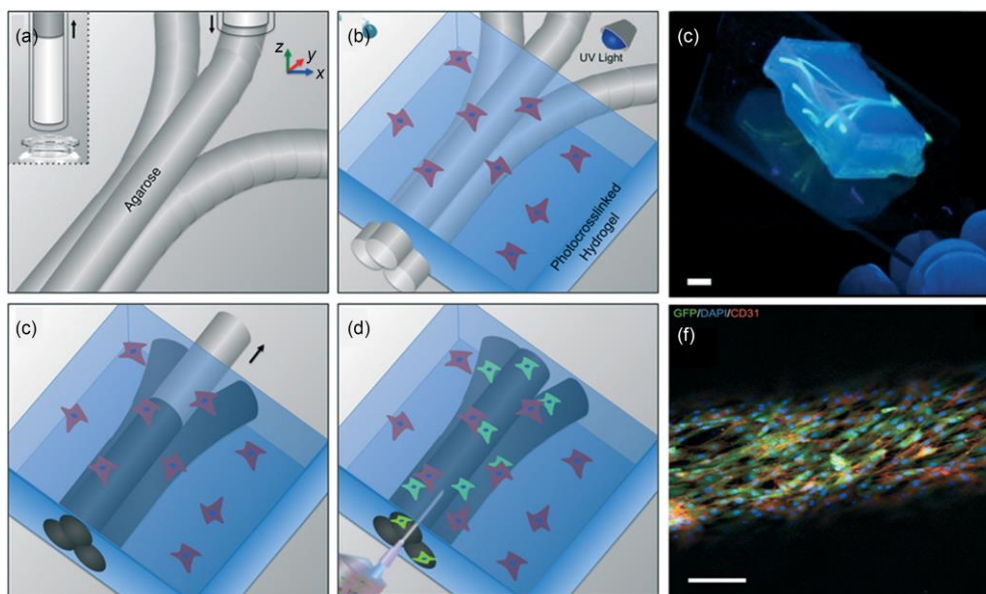
当数量的有机聚合物,如:聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)、聚己内酯(Polycaprolactone, PCL)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)等<sup>[12,24,25,28,31,33,36-39]</sup>。

为了改良材料性质,研究人员还会采用双网络(Double-Network, DN)的策略复合不同种材料,例如Gong等就用聚-2-丙烯酸胺-2-甲基丙磺酸(Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid), PAMPS)、聚丙烯酰胺(Poly acrylamide, PAAm)制成双网络,相比单一PAMPS结构最大应力提升了4.8倍<sup>[40]</sup>。Shin等人<sup>[41]</sup>为开发水凝胶,使其具有较高的机械强度兼顾刚度和韧性。即采用两步法,第一步光固化用绞兰胶甲基丙烯酸酯(Gellan Gum Methacrylate, GGMA)提供刚性和脆性,第二步使甲基丙烯酸酯明胶(GelMA)扩散入第一网络中,成为柔软具有韧性的第二网络。DN水凝胶不仅显示出高达6.9 MPa,接近软骨强度的断裂应力,对于NIH-3T3成纤维细胞也具有较高的兼容性。高强度和良好的细胞兼容性,使得光交联DN水凝胶可成为软骨组织再生领域探索的有利方向(图8所示)。

### 2.2 无机材料

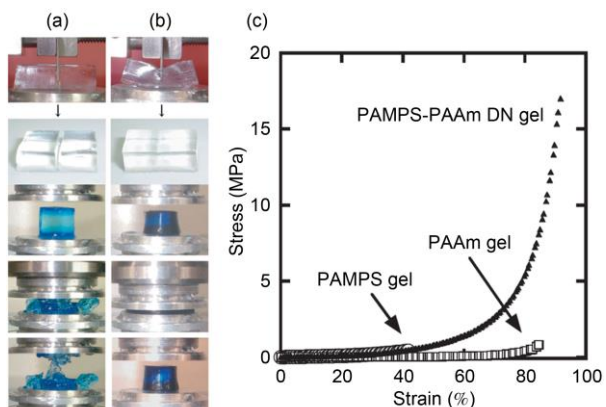
现阶段,技术最成熟的生物3-D打印应用方向就是骨骼、骨钉等固态无机材料植入物的制造,利用的材料如:羟基磷灰石、钛合金、磷酸三钙(Tricalcium Phosphate, TCP)等<sup>[21-23,42]</sup>。





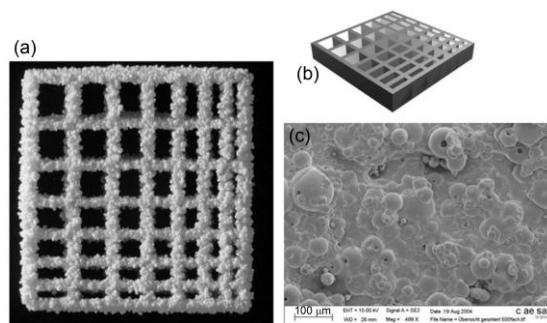
**图 7** (网络版彩色)结合喷墨式打印及紫外光固化技术打造人造血管网络。(a)~(d) 利用琼脂糖和光敏水凝胶制成微管道结构的原理图: (a) 利用活塞将琼脂糖从毛细玻璃管中挤出, 置于 4°C 中成型为模具; (b) 光敏水凝胶被浇筑在模具周围通过紫外光交联; (c) 将结构内部的琼脂糖去除; (d) 微管道结构形成; (e) 嵌入GelMA凝胶中的三维立体具有分叉结构的微管道结构; (f) 一个被GFP/DAPI/CD31 标记的 500 μm 单层内皮细胞通道(比例尺为 250 μm)的共聚焦图像<sup>[35]</sup>

**Figure 7** (Color online) The fabrication of vascular network using inkjet printing and UV photocrosslink. (a)~(f) Schematic of microchannels fabrication made by bioprinting of agarose template fibers and photocrosslink hydrogel; (a) A bioprinter equipped with a piston fitted inside a glass capillary aspirates the agarose (inset). After gelation in 4°C, agarose fibers are bioprinted at predefined locations; (b) a hydrogel precursor is casted over the bioprinted mold and photocrosslinked; (c) the template is removed from the surrounding photocrosslinked gel; (d) fully perfusable microchannels are formed; (e) 3-D branching agarose templates embedded in a GelMA hydrogel construct; (f) confocal image of GFP/DAPI/CD31 markers from a HUVEC monolayer inside a 500 μm channel (scale bar 250 μm)<sup>[35]</sup>



**图 8** (网络版彩色)利用双网络策略复合材料提升强度; (a), (b) 单网络与双网络结构抵抗剪切力和正压力能力的比较, (a) 单网络结构, (b) 双网络结构; (c) 水凝胶结构的单轴压缩应力-应变曲线, 圆代表 PAMPS-1-4 单网络结构, 方代表 PAAm-2-0.1 单网络结构, 三角形代表 PAMPS-1-4/PAAm-2-0.1 双网络结构<sup>[40]</sup>

**Figure 8** (Color online) Double-network hydrogels can improve mechanical strength. (a), (b) Comparing the ability of resisting slicing and sustaining compression between SN(single-network) and DN; (a) SN, (b) DN; (c) stress-strain curves for hydrogels under uniaxial compression. Circles: PAMPS-1-4 SN gel; squares: PAAm-2-0.1 SN gel; triangles: PAMPS-1-4/PAAm-2-0.1 DN gel<sup>[40]</sup>



**图 9** 利用羟基磷灰石粉体高温烧制制成三维多孔陶瓷材料支架。(a) 三维多孔陶瓷材料支架的俯视图, 总体尺寸为 7.8 mm×7.8 mm, 内部横梁的宽度为 330 μm; (b) 三维CAD模型; (c) 结构表面的扫描电镜照片, 材料的颗粒形态被保留<sup>[22]</sup>

**Figure 9** Fabrication of 3-D porous ceramic scaffolds made by cosolidated hydroxyapatite powder. (a) The vertical view of the 3-D porous ceramic scaffold, the overall dimensions of the parts are 7.8 mm×7.8 mm, grid test part with wall thickness of 330 μm; (b) 3-D rendering of the CAD model; (c) SEM of typical surface texture of a sintered part. The shape of the powder granules is preserved<sup>[22]</sup>

Seitz课题组就用改性后的羟基磷灰石粉体作为原材料, 加聚合物黏连剂制成了三维多孔陶瓷材料

支架,之后再在1250°C下烧结(聚合物热解).羟基磷灰石具有良好的生物相容性,这种支架可以应用在骨移植、骨修复中(图9)<sup>[22]</sup>.

### 2.3 天然生物材料

为使材料获得更好的生物兼容性,也为未来降低组织移植带来的排异反应,天然生物材料自然成为了最优质的选择之一,现有的报道中海藻酸钠(多糖)、胶原蛋白(Collagen)、基质胶(Matrigel)、生长因子(蛋白质)、琼脂糖等<sup>[3,16,18,19,43]</sup>都被尝试用3-D打印的方式加工成生物微结构辅助、引导细胞行为.具体操作时天然生物材料大多与细胞混合,固化后形成含细胞组织,能够更好模拟细胞在细胞外基质中行为.并且相比其他人工合成化合物,天然生物材料最大的特点就是与生物体间的互动行为,材料自身中的纤维蛋白、生长因子等可以引导细胞运动,促进细胞生长.在这种情况下,细胞才被真正当作生命体,而非简单是建造大厦的砖瓦或者构成材料的原子分子.生物组织打印最终的目标并不是要完成细胞堆砌,而是让组织具备生理功能,因而尊重细胞的生物学特性就显得尤为重要,可能也是未来生物3-D打印要考虑的重要因素.

在众多科学家将目光投射在想尽办法在三维尺度上用不同材料构造微结构时,Ito等人<sup>[44]</sup>则尝试利用将由鼠表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)与光敏聚烯丙基胺合成的光敏表皮生长因子,通过紫外光固化为二维图案,从而引导细胞群形成不同图案(图10所示).而Campbell研究组<sup>[43]</sup>也尝试在纤维蛋白薄膜上用叠印的手段将成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGF-2)打印出兼具浓度梯度的二维图案,来引导细胞生长、控制细胞密度,从而使细胞形成具有不同细胞密度的图形.这种方法就可能在组织再生学和发育生物学的基础研究中得到应用,如果未来能够从二维拓展到三维,也许在生物3-D打印领域就是具有开拓性的进展.

目前在组织工程领域常见的是先打印出生物支架,然后将细胞进行培养扩增后接种到生物支架上后,细胞-生物支架复合物在体外培养后被移植到体内.在这种情况下,细胞无法种植到生物支架内部,也无法构建内部比较复杂的组织和器官,尤其无法实现构建的组织和器官与体内通过血管相连.人体组织的弹性模量按器官种类不同分布比较宽,从大

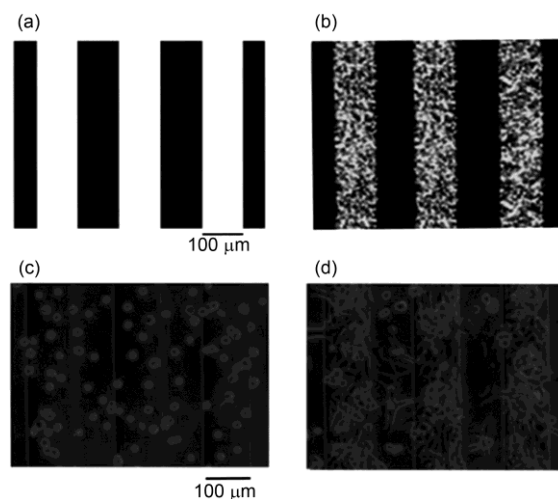


图 10 利用紫外固化表皮光敏生长因子引导细胞形成特定图案. (a) 条状图案掩模版的显微照片; (b) 条状表皮生长因子图形的荧光显微照片; 中国仓鼠卵巢细胞在 100  $\mu\text{m}$  EGF 条形图案上培养 0 和 48 h 后形态分别如(c), (d)所示<sup>[44]</sup>

Figure 10 Microattenuation patterns made of EGF crosslinked by UV light. (a) Micrographs of photomask; (b) corresponding fluorescence micrographs of EGF immobilized in a stripe pattern; Phase-contrast micrograph of CHO-ER cells on EGF immobilized in a stripe pattern with a 100  $\mu\text{m}$  width before culture (c) and after a 48 h culture (d)<sup>[44]</sup>

脑、脂肪的几百帕到肌肉组织的几千帕,再到骨头的兆帕量级.此外体内细胞的生长、分化以及功能形成受到体内组织微环境中各种物理、化学因素的影响,包括细胞之间、细胞与细胞外基质之间的相互作用.

因此3-D打印在生物兼容性材料研发方面,面临以下3个难题.

(1) 3-D打印的生物材料一般是高分子材料,无法得到在力学性能、化学通透性都能够模拟体内环境的结构.

(2) 高分子材料当中的游离单体或者其降解物,或产生细胞毒性进而影响种植细胞的存活率.

(3) 3-D打印的人工组织作为异物被移植到生物体内,体内必定产生某种应答或者出现排异现象,会引起一系列的免疫反应并在临床上表现为过敏反应.

像基质胶、胶原蛋白这些水凝胶虽然生物兼容性好,但又缺乏必要的机械强度,无法支撑大尺寸的三维复杂结构.因此开发生物兼容性好、机械力学性能适当的“油墨”是实现3-D打印技术应用与生物医学研究的前提条件.

## 3 未来生物3-D打印技术和装备发展趋势

3-D生物打印本质上是一个高精度的细胞受控组

装过程,其中心任务是要人工创造一个多细胞类型和各种胞外基质在宏观、介观和微观多个尺度上协同工作的组织系统,实现期望的生物功能.因此3-D打印技术需要在以下几个方面取得突破.

(1) 具备一定力学性能及生物兼容性和可降解性的材料.目前相比如传统3-D打印技术,生物3-D打印技术的发展极度缓慢,其瓶颈在于生物材料的兼容性.目前所谓的生物打印材料大多数都是基于塑料等高分子材料构成,严格来讲这仅能称为生物无毒材料.而未来的研究和应用需要的优良生物兼容性材料,适合细胞的黏附、增殖和分化;并且该材料随着时间可以控制其降解,不会影响本来的母体结构.

(2) 可对3-D微结构进行全方位的内外观测.目前三维结构制成之后,通常都不是透明结构,不能对其内部进行观测.而生物3-D打印需要观察内部微结构的变化以及当中细胞的演化.这就不仅需要生物打印材料为透明体,而且要有相应三维光学装置进行实时观测并对其内外部结构进行三维重构.

(3) 具备三维贯通的内部管道结构并可对3-D结构中的细胞进行精确的空间微操控.如果要打印大块组织,那么营养输送和代谢产物排出的通道是必不可少的,而且未来打印结构中需要精确装配各类型细胞和胞外成分,这就需要辅助的机械系统能够进入三维结构中进行操作,并能在后续研究中干预生物体.

(4) 能集成不同加工手段,充分利用不同类型材料,制造非均一性、复杂结构、更具仿真度的微生态结构.真正生物体内微环境可能不仅不具备几何结构上的对称,材质的力学性质、化学性质等也并不均一.因此在未来的生物3-D打印系统应该不仅具有几何位置信息,更应该具有该点的材料信息,从而更精确的控制和构造高仿真生物微环境.

面对这一长远的目标,笔者研究组在生物高仿真微生态环境制造领域,计划做出初步的探索,即设计搭建高仿真微生态环境构建和监测一体化系统<sup>[45]</sup>,高度集成新型生物3-D打印系统、光片成像单元、纳米吸管取样单元等关键部件,为了攻克现今癌症和脑科学重大研究中实验手段的严重不足.

(1) 构建细胞三维微环境.实现模拟人体内癌细胞转移和进化过程中的微环境,实现细胞的三维培养;满足脑科学研究中神经元细胞的三维分层装配

和空间繁殖.

(2) 实现三维结构全空间成像.对癌细胞在模拟转移和进化过程中进行连续成像和追踪;对神经细胞元形成网络的过程进行动态成像.

(3) 对细胞进行装配和操作.将癌细胞可以精确放置到三维转移结构中,并且对细胞在侵袭和进化过程中进行精密操作,能将单细胞取出分析;可以将不同神经元细胞(兴奋性神经元和抑制性神经元等)分别放置和装配到三维结构中.

高仿真微生态环境系统的设计图及主要部件如图11所示.该平台主要由4个部分组成:高精度水凝胶单层厚控制模块(hydrogel multilayer controller)、动态紫外立体光刻模块(UV stereo-lithography)、多方位光片成像(light sheet imaging)模块和细胞精确注入和提取的微纳米吸管(nano pipette)模块.

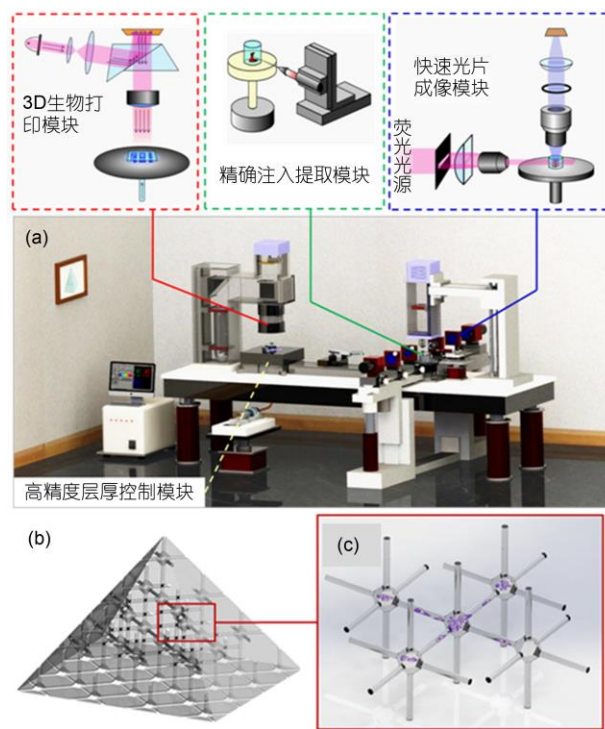


图 11 (网络版彩色)高仿真微生态环境系统. (a) 高仿真微生态环境系统的设计图组成部分; (b) 用于研究癌细胞网络的三维微型“星系”芯片; (c) 活癌细胞在结构内部单元排布并且在管道中演变、移动以及相互联系的示意图

Figure 11 (Color online) The design of the Micro-ecological Environment Simulation. (a) The system of Micro-ecological Environment Simulation and four main components; (b) “Galaxy”—the 3-D micro-device for research of cancer cellular network; (c) schematic of cancer cells’ configuration in the array of units and evolution, movement, interaction in the channels.



设计搭建这套系统的动机来源于实际研究的需求, 希望借助这套系统实现体外癌细胞的新型三维转移模型的构建和对神经元细胞的分层排布及演变过程的研究. 同时通过这些科学实验的成功实施, 验证系统的科学性和可靠性.

与此同时, 高仿真微生态环境构建和监测一体化系统也只是构建高仿真生态微环境在体外环境中

科学定量研究生物体行为上尝试的一小步, 至于多材质复杂结构打印、组织功能性打印, 现有的设计也都还做不到. 但是之于未来, 3-D打印技术一定会是颠覆现有生物研究手段的关键, 人体器官重建、高机械化实验操作、高仿真生物微环境模拟, 甚至终结动物实验, 也许都不会再是梦想. 可能这才是3-D打印这项革命性技术的真正“革命成功”之时.

## 参考文献

- 1 Derby B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science*, 2012, 338: 921–926
- 2 Zorlutuna P, Annabi N, Camci-Unal G, et al. Microfabricated biomaterials for engineering 3D tissues. *Adv Mater*, 2012, 24: 1782–1804
- 3 Malda J, Visser J, Melchels F P, et al. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater*, 2013, 25: 5011–5028
- 4 Murphy S V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 773–785
- 5 Wen L, Weaver J C, Lauder G V. Biomimetic shark skin: Design, fabrication and hydrodynamic function. *J Exp Biol*, 2014, 217: 1656–1666
- 6 Hribar K C, Soman P, Warner J, et al. Light-assisted direct-write of 3D functional biomaterials. *Lab Chip*, 2014, 14: 268–275
- 7 Hutmacher D W, Schantz T, Zein I, et al. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res*, 2000, 55: 203–216
- 8 Malinauskas M, Rekštytė S, Lukoševičius L, et al. 3D microporous scaffolds manufactured via combination of fused filament fabrication and direct laser writing ablation. *Micromachines*, 2014, 5: 839–858
- 9 Shirazi S F S, Gharekhani S, Mehrli M, et al. A review on powder-based additive manufacturing for tissue engineering: Selective laser sintering and inkjet 3D printing. *Sci Technol Adv Mater*, 2015, 16: 033502
- 10 Bhaskaran E, Azhagarasan N S, Miglani S et al. Comparative evaluation of marginal and internal gap of Co-Cr copings fabricated from conventional wax pattern, 3D printed resin pattern and DMLS tech: An *in vitro* study. *J Indian Prosthodont Soc*, 2013, 13: 189–195
- 11 Gans B J, Duineveld P C, Schubert U S. Inkjet printing of polymers: State of the art and future developments. *Adv Mater*, 2004, 16: 203–213
- 12 Skardal A, Zhang J, Prestwich G D. Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates. *Biomaterials*, 2010, 31: 6173–6181
- 13 Guillemot F, Souquet A, Catros S, et al. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomater*, 2010, 6: 2494–2500
- 14 Guillotin B, Souquet A, Catros S, et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*, 2010, 31: 7250–7256
- 15 Greenbaum E. *Laser Technology in Biomimetics Basics and Applications*. Berlin: Springer-Verlag, 2013
- 16 Norotte C, Marga F S, Niklason L E, et al. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials*, 2009, 30: 5910–5917
- 17 Wust S, Godla M E, Muller R, et al. Tunable hydrogel composite with two-step processing in combination with innovative hardware upgrade for cell-based three-dimensional bioprinting. *Acta Biomater*, 2014, 10: 630–640
- 18 Xu T, Zhao W, Zhu J M, et al. Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials*, 2013, 34: 130–139
- 19 Ahn S, Lee H, Lee E J, et al. A direct cell printing supplemented with low-temperature processing method for obtaining highly porous three-dimensional cell-laden scaffolds. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 2773
- 20 Xu T, WBinder K, Albanna M Z, et al. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication*, 2012, 5: 1–10
- 21 Tam M D, Laycock S D, Bell D, et al. 3-D printout of a DICOM file to aid surgical planning in a 6 year old patient with a large scapular osteochondroma complicating congenital diaphyseal aclasia. *J Radiol Case Rep*, 2012, 6: 31–37
- 22 Seitz H, Rieder W, Irsen S, et al. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005, 74: 782–788

- 23 Fielding G A, Bandyopadhyay A, Bose S. Effects of silica and zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed tricalcium phosphate tissue engineering scaffolds. *Dent Mater*, 2012, 28: 113–122
- 24 Gill A A, Ortega I, Kelly S, et al. Towards the fabrication of artificial 3D microdevices for neural cell networks. *Biomed Microdevices*, 2015, 17: 27
- 25 Selimis A, Mironov V, Farsari M. Direct laser writing: Principles and materials for scaffold 3D printing. *Microelectron Eng*, 2015, 132: 83–89
- 26 Wang J, Auyeung R C, Kim H, et al. Three-dimensional printing of interconnects by laser direct-write of silver nanopastes. *Adv Mater*, 2010, 22: 4462–4466
- 27 Buckmann T, Stenger N, Kadic M, et al. Tailored 3D mechanical metamaterials made by dip-in direct-laser-writing optical lithography. *Adv Mater*, 2012, 24: 2710–2714
- 28 Kim S, Qiu F, Kim S, et al. Fabrication and characterization of magnetic microrobots for three-dimensional cell culture and targeted transportation. *Adv Mater*, 2013, 25: 5863–5868
- 29 Tottori S, Zhang L, Qiu F, et al. Magnetic helical micromachines: Fabrication, controlled swimming, and cargo transport. *Adv Mater*, 2012, 24: 811–816
- 30 Seidlits S K, Schmidt C E, Shear J B. High-resolution patterning of hydrogels in three dimensions using direct-write photofabrication for cell guidance. *Adv Funct Mater*, 2009, 19: 3543–3551
- 31 Klein F, Striebel T, Fischer J, et al. Elastic fully three-dimensional microstructure scaffolds for cell force measurements. *Adv Mater*, 2010, 22: 868–871
- 32 Cha C, Soman P, Zhu W, et al. Structural reinforcement of cell-laden hydrogels with microfabricated three dimensional scaffolds. *Biomater Sci*, 2014, 2: 703–709
- 33 Hong S, Sycks D, Chan H F, et al. 3D printing of highly stretchable and tough hydrogels into complex, cellularized structures. *Adv Mater*, 2015, 27: 4035–4040
- 34 Soman P, Kelber J A, Lee J W, et al. Cancer cell migration within 3D layer-by-layer microfabricated photocrosslinked PEG scaffolds with tunable stiffness. *Biomaterials*, 2012, 33: 7064–7070
- 35 Bertassoni L E, Cecconi M, Manoharan V, et al. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. *Lab Chip*, 2014, 14: 2202–2211
- 36 Harrison B S, Eberli D, Lee S J, et al. Oxygen producing biomaterials for tissue regeneration. *Biomaterials*, 2007, 28: 4628–4634
- 37 Falconnet D, Csucs G, Grandin H M, et al. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*, 2006, 27: 3044–3063
- 38 Lima M J, Correlo V M, Reis R L. Micro/nano replication and 3D assembling techniques for scaffold fabrication. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 42: 615–621
- 39 Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 2003, 24: 4385–4415
- 40 Gong J P, Katsuyama Y, Kurokawa T, et al. Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength. *Adv Mater*, 2003, 15: 1155–1158
- 41 Shin H, Olsen B D, Khademhosseini A. The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules. *Biomaterials*, 2012, 33: 3143–3152
- 42 de Peppo G M, Palmquist A, Borchardt P, et al. Free-form-fabricated commercially pure Ti and Ti6Al4V porous scaffolds support the growth of human embryonic stem cell-derived mesodermal progenitors. *Scientific World J*, 2012, 2012: 1–14
- 43 Campbell P G, Miller E D, Fisher G W, et al. Engineered spatial patterns of FGF-2 immobilized on fibrin direct cell organization. *Biomaterials*, 2005, 26: 6762–6770
- 44 Ito Y, Chen G, Imanishi Y. Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function. *Bioconjugate Chem*, 1998, 9: 277–282
- 45 Lu J L, Wang X C, Rong X H, et al. 3D micro/nano fabrication and its application in cancer biophysics (in Chinese). *Acta Phys Sin*, 2015, 64: 058705 [鲁金蕾, 王晓晨, 容晓晖, 等. 三维微纳米制造技术在癌症生物物理研究中的应用. *物理学报*, 2015, 64: 058705]

# Micro-ecological environment simulation for biological research

WANG XiaoChen, LU LeiJin, RONG XiaoHui, YUAN Jie, YE FangFu & LIU LiYu

*Laboratory of Soft matter, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*

In approach to simulate biological and medical issues, traditional soft lithography and micro-processing technology are facing extreme difficulties in building complex biological structures where living cells are able to live and proliferate. It is highly necessary for some methods or technology that could mimic the three-dimensional (3-D) microenvironment of organisms (such as human tissues) *in vitro*. Currently the 3-D printing technique combined with biocompatible material is a very promising key for meeting this demand. The 3-D printing technique used in biology and organ engineering could also be called 3-D bioprinting, which solidifies biological materials, biochemicals and living cells layer-by-layer to fabricate 3-D microstructures and microenvironments. This report systematically presents a brief review of the background and developments in the related fields of 3-D printing technology, including inkjet printing, direct laser writing (DLW), and digital micromirror device projection printing (DMD-PP). Inkjet printing uses micro-heaters or piezoelectric actuators to control volumes of liquid from the print heads. Direct laser writing and digital micromirror device projection printing are based on photo-crosslinking reaction. Because of the different focus modes they may present different ranges of layer thickness and machining dimension. Corresponding with these most commonly 3-D printing approaches, there exist several kinds of 3-D printing materials, such as synthetic polymers, inorganic material and natural polymers, which have biocompatibility, printability, and structural and mechanical properties. But in the future, the 3-D printing technique need to break through in four main areas: (1) Biocompatibility and biodegradable material combining mechanical properties similar to organs; (2) omnidirectional observation of 3-D microstructures; (3) precise manipulation of cells in microenvironment; (4) manufacture of non-uniformity, complex microstructures integrating different types of techniques and materials. On account of the particularity of three-dimensional biological structures and biological 3-D printing materials, development of both 3-D printing technique and materials are equally important and urgent for the new challenges. Therefore, we propose to establish a new system (Micro-ecological Environment Simulation) containing hydrogel multilayer controller, UV stereo-lithography, light sheet imaging and nano pipette. And in combination with 3-D *in situ* monitoring program, the system is hopefully able to greatly facilitate the study of high-dimensional biological systems. In the future, 3-D printing technology will become a key means to human organs reconstruction, mechanization experimental operation and biological microenvironment simulation. Even it may be no longer a dream to replace animal experiments, and that might be the real success of this revolutionary technology.

**micro-ecological environment simulation, 3-D printing, biocompatible material biophysics**

doi: 10.1360/N972015-01229