

特约专栏

微尺度组织工程与组织结构的组装构建

肖文谦, 孙 静, 范红松

(四川大学 国家生物医学材料工程技术研究中心, 四川 成都 610064)

摘 要: 自然组织是由高度复杂化的组织微单元结构体组成, 如何在体外重现这些微结构体的结构和功能是现今组织工程学的巨大挑战。微尺度组织工程是一项利用现代微制造技术加工和控制支架材料的微观空间特征从而精确控制细胞微环境, 在微尺度水平上引导和促进制备具有模拟天然组织的非同质性和各向异性的人造组织工程复合体的新型组织工程构建技术。微尺度组织工程通过制备功能化微结构单元并通过“自下而上”构建路径使得制备具有复杂精细结构的工程化组织成为可能, 也为组织工程提供了一条新的思路。本文对微尺度组织工程的常用技术和构建方式做了详细介绍, 重点阐述了通过微凝胶单元制造和“自上而下”的组装构建方式制备组织工程复合体的新技术, 并对该领域的未来应用和挑战进行了展望。

关键词: 组织工程; 微尺度组织工程; 微制造; 水凝胶; 组装

中图分类号: R318.0⁺8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2015)07-0582-07

Microscale Tissue Engineering and the Bottom-up Assembly for 3D Tissue Construction

XIAO Wenqian, SUN Jing, FAN Hongsong

(National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Since most living tissues are composed of repeating micro-units with highly complex organizational structure, one of the major challenges in tissue engineering is to reproduce the architectures and functional properties of these micro-units in vitro. Microscale tissue engineering is a new emerging field which can precisely control the cellular microenvironment by the regulation of the microscopic geometry of scaffold using modern microfabrication technology. Accordingly, the simulation of natural tissues with non-homogeneous and isotropic heterosexual artificial can be directed and promoted on the microscale level. Through fabricating the micro-units and assembly by the “bottom-up” approach, construction of the engineered tissue with complicated structure became possible. Therefore the microscale tissue engineering could provide us with a new pathway and idea for the tissue engineering. In this paper, an overview of microfabrication technologies and construction approaches commonly used in microscale tissue engineering were presented, and the future applications and challenges of this field were discussed. Meanwhile, a bottom-up approach to direct the assembly of cell-laden microgels to generate tissue constructs was illustrated.

Key words: tissue engineering; microscale tissue engineering; microfabrication; hydrogel; assembly

1 前 言

组织、器官的丧失或功能障碍是人类健康面临的主要危害之一, 也是人类疾病和死亡的最直接原因。虽然器官/组织移植可为这些疾病的治疗提供一种手段, 但供求的严重不平衡, 以及由此引发的若干社会问题与伦

理道德问题成为制约人体器官移植的最大瓶颈。组织工程和再生医学通过组织再生、器官修复或者替换, 为需要器官移植的患者带来了希望。组织工程的原理为: 将体外培养扩增的正常组织细胞吸附于具有优良细胞相容性并可被机体降解吸收的生物材料上形成复合物, 然后将细胞/生物材料复合物植入人体组织、器官的病损部位, 在作为细胞生长支架的生物材料逐渐被机体降解吸收的同时, 细胞不断增殖、分化, 形成新的并且其形态、功能与相应组织、器官一致的组织, 从而达到创伤修复和重建功能的目的^[1]。

从最初提出将细胞植入可降解生物材料以构建组织

收稿日期: 2014-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071272, 51273121)

第一作者: 肖文谦, 男, 1982年生, 博士

通讯作者: 范红松, 女, 1968年生, 教授, 博士生导师, Email: hsfan@scu.edu.cn

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2015.07.13

的设想,到近年来应用组织工程技术修复临床缺损的成功,组织工程技术已被广泛证实是解决组织创伤修复和功能重建的有效途径之一。近年来,组织工程与各种现代科学技术,例如基因克隆技术、影像学技术、干细胞技术、纳米技术以及微制造技术的结合极大地推进了组织工程的发展,并已取得巨大进展,包括组织工程皮肤和软骨等^[2-3]。但迄今,组织工程技术成功构建的组织中大多只具有相对简单的结构及单一的细胞类型,血管化的要求不高^[4]。更为复杂的组织构建当前仍然存在诸多阻碍,其中最大的问题是大块组织中的血管化的困难以及如何对天然组织的复杂结构和形态学进行精确仿生。

血管化的问题 在正常机体内,由于细胞与血管的距离很近,血管可以为组织提供营养和氧气并及时移除废弃产物和二氧化碳。通常,植入体中的种子细胞只有在血管周围150~200 μm 的范围内才能通过营养物质的扩散得以继续存活,如果不能快速建立血管,就难以构建真正有功能的器官^[5]。因此,如何设计与构建一个具有与天然血管功能相似的血管网络是制造和维持工程化组织正常功能的一个非常重要的因素^[6-8]。

复杂组织或器官构建中多种细胞的精密分布与构建 细胞作为构成人体器官的基本单元,其尺寸在几微米到几十微米的范围内,而传统组织工程技术则难以实现如此精细的分辨率。此外,如何精确模拟体内细胞—细胞外基质及细胞—细胞之间相互作用,如何在三维尺度上精确控制不同种类的细胞及细胞外基质的分布,并形成与人体组织或器官相似的三维工程化组织体是传统组织工程所面临的一大难题。

复杂组织的结构仿生 天然组织有着特定的微结构,如何对这些天然的复杂结构进行精确模拟是组织工程面临的又一难题^[9]。许多传统方法,例如溶剂浇注、颗粒浸出、发泡、冷冻干燥及静电纺丝等技术已广泛应用于制备具有特定微结构的支架材料,并能支持种子细胞的粘附、迁移和生长,但这些支架材料的物理性质(比如:孔的大小、贯通性和空间分布等)更多地取决于制备过程本身,而不是取决于工程师的设计,从而限制了支架材料对细胞微环境的调控作用^[10]。

2 微尺度组织工程

微尺度组织工程技术是将微制造技术与组织工程仿生构建相结合而产生的一门新型技术。根据麻省理工大学的 Ali Khademhosseini 与 Langer 教授和哈佛医学院 Vancanti 教授的定义,微尺度组织工程技术是一项利用现代微制造技术通过加工和控制支架材料的微观空间特征从而精确控制细胞微环境,在微尺度水平上引导和促

进制备具有模拟天然组织的非同质性和各向异性的人造组织工程复合体的新型组织工程技术^[10]。与传统组织工程技术的构建途径和方式具有很大不同,微尺度组织工程技术在组织仿生结构与功能构建方面表现出特别的优势。利用微制造技术,一些能更好地模拟体内细胞微环境的组织工程支架不断地被开发出来,并成为当前研究的热点。这些技术主要包括:光刻技术、纳米-微米流体技术、微模塑技术以及生物打印等(图1)^[6,11-12]。

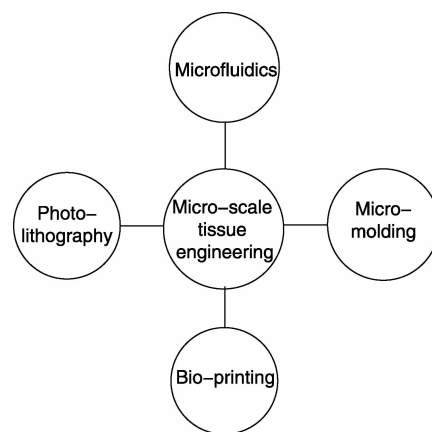


图1 微尺度组织工程的关键技术

Fig. 1 The key technologies of the micro-scale tissue engineering

2.1 微尺度组织工程的常用技术

2.1.1 光刻蚀技术

基于光掩膜的光刻技术是微尺度组织工程中最常用的用于制备图案化支架材料的技术^[11-12]。光刻过程中,将可光交联的聚合物单体溶液通过光掩膜暴露在紫外光下,当紫外光透过光掩膜的透明区域接触到光敏感聚合物时产生光聚合反应使聚合物交联^[13-15]。光刻技术已经成功应用在光敏水凝胶中,可以被用来制备特殊微结构的水凝胶支架,并能够实现细胞的原位固定。利用光刻技术制备图案化微凝胶需要特定化学结构的聚合物单体,这种聚合物单体可以在合适的光引发剂和光照条件下产生光敏感的自由基聚合反应。该反应速率很快,通常在几十秒左右,反应速率取决于聚合物和光引发剂的浓度,以及光强度与曝光时间。在具体实验中,则需要对紫外光的强度、曝光时间以及光引发剂的浓度进行优化以确保细胞的活性不受自由基以及紫外光的影响^[16]。

传统光刻法本质上是一种二维的方法,在此基础上,立体光刻技术是以光敏树脂为原料,采用激光器发射激光,在光敏树脂表面进行扫描,使被扫描区域的树脂薄层发生光聚合反应而固化,形成预定的图案;固化完毕后,工作台下降一层的厚度,在原先固化好的树脂表面

再涂敷上一层液态树脂,再次进行扫描加工,使新固化的一层牢固地粘在前一层上,如此反复直到三维构建完成。但是此方法仅适用于树脂类材料,不具有生物可降解性^[17]。

2.1.2 微模塑技术

微模塑技术是近年来发展起来的一种新型微制造技术,它起源于软刻蚀技术,是制备微图案化三维组织工程复合体的常用方法之一,制得图案的形状和大小可以被精确地控制在 $1\ \mu\text{m}$ 以下^[18]。这种方法要使用弹性体聚合物,浇注在刻蚀好的硅模板上以形成弹性印章,然后将水凝胶预聚溶液浇注在弹性印章上形成微凝胶,交联方法通常采用紫外光交联或者温度交联。聚二甲基硅氧烷(PDMS)是当前使用最广泛的弹性印章材料,可以实现微米级图案的复制,具有低温固化、无毒性等诸多优点,但是也存在着一些缺点,比如大多数有机溶剂会使 PDMS 溶胀,并不是所有的几何图形都能很好地从 PDMS 模具上脱模等。除了 PDMS,聚氨酯或者特氟龙等高分子材料也可以用来制备图案化的弹性印章。例如,研究人员发现通过一种新型的特氟龙材料可以制备出可控形状和大小的纳米级粒子^[19]。

2.1.3 微流体技术

微流体技术是指在微观尺寸下控制、操作和检测复杂流体的技术,是在微电子、微机械、生物工程和纳米技术基础上发展起来的一门全新交叉学科。近年来,已经有大量的研究将微流体技术应用到组织工程中,在传统的组织工程支架中,离体的细胞多以二维贴壁形式生长,失去了体液的调节和细胞与细胞之间的相互作用,并不能反映在体内的真实情况。采用微流体技术,可以更好地赋予支架中的细胞更为精确的体内微环境。然而,如何将精细的微流体系统与大块支架材料结合,如何制备复杂仿生的血管网络以及如何将体内复杂的细胞外基质,多种细胞系的同时共存与微流体技术很好地结合起来等,是当前将微流体技术应用到组织工程领域的最大问题^[20]。

2.1.4 生物打印技术

与光刻的概念相似,生物打印技术能方便地制造出细胞和细胞外基质(ECM)/聚合物的二维有序排列。传统的生物打印方法有激光打印^[21]和喷墨打印^[22]。首先用计算机设计一个图案,将打印机的墨水用细胞悬液代替,细胞悬浮在液体细胞外基质或者模拟细胞外基质的高分子预聚物溶液中,并将这个图案通过打印机打印在基底上。这个技术的优势在于可以精确控制细胞和生物材料的相对位置和排列,从而制备出具有特定性质和几何形状的工程化组织。一旦打印出的细胞片层有了足够的培养时间,还可以在此基础上打印之后的细胞片层,制备出细胞的三维阵

列^[23]。然而,生物打印技术对生物材料的选择有很大的限制,目前还多限于可注射的水凝胶。

3D 打印是真实打印三维物体的一种技术,其最早应用于工业制造领域。其打印原理是采用分层加工、迭加成形的技术来形成 3D 实体。3D 打印机与传统喷墨打印机最大的不同在于:3D 打印机的喷头不仅仅能在平面上移动,还能够垂直移动。将打印机的墨水盒内按需装入配比好的混入种子细胞的液态材料,形成打印“墨水”,甚至可以选择不同的细胞、生长因子、支架材料等,按不同配比装入不同的色槽,构成“各种颜色的彩色墨水”,从而实现复杂组织或器官的组装和构建^[24]。

2.2 微尺度组织工程的构建方式

2.2.1 “自上而下”的构建方法

微尺度组织工程按照尺度的加工方向,可以分为“自上而下”(Top-down)和“自下而上”(Bottom-up)两种构建方式(图2)。传统的组织构建策略是利用“自上而下”构建方法,将体外分离并扩增到一定数量的种子细胞接种到具有一定形状大小的生物材料支架上,随着培养时间的延长,细胞在支架材料上逐渐增殖并分泌细胞外基质,形成具有生物活性的组织。然而无论是在制造分辨率方面还是支架材料的复杂形态仿生方面,“自上而下”方法在构建组织的复杂结构以及控制细胞的均匀性方面遇到许多具体问题,例如:①人体组织由多种细胞和细胞外基质构成,“自上而下”方法难以在三维支架结构中精确沉积不同种类的细胞和细胞外基质;②受支架技术的空间分辨率的限制,细胞渗透到支架材料内部的速度较慢;③不能对细胞及细胞外基质的空间分布进行精确控制,并且会出现细胞种植不均匀的情况^[25]。

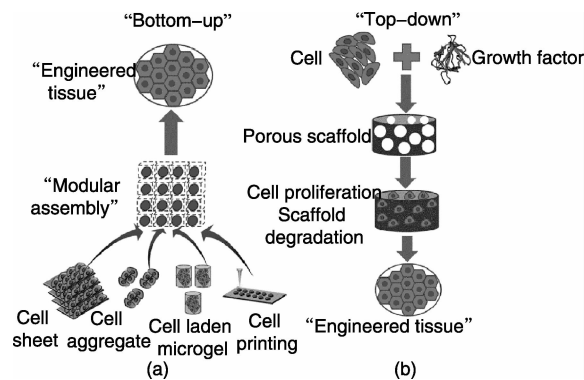


图2 “自下而上”(a)与“自上而下”(b)的组织工程构建方式

Fig. 2 Bottom-up (a) and Top-down (b) approaches to tissue engineering

2.2.2 “自下而上”的模块化构建方法

体内大多数组织是由小的组织块组成,即由重复的

功能单元组成,例如肌肉由肌纤维束组成,肝脏由肝小叶组成,肾脏由肾单位组成,胰脏由胰小岛构成^[26]。为了能制造出更多的复杂组织——如功能化的微血管系统、错综复杂的组织形态学模拟,组织工程技术开始关注利用重复的功能微单元来构建工程化组织。因此,“自下而上”组织工程方法应运而生,其目标就是通过模仿天然显微结构的功能性单元,从较小的构件组装进而形成更大的组织,模仿天然组织或者器官重复功能单元的组织结构,能够从纳微米尺度层面上进行组织结构与功能的仿生设计。这首先需要根据不同组织的结构特点,在微尺度上设计制备具有不同结构的功能化组织微模块。这些微模块可以通过上文提到的微制造的方法来制备,一旦这些微模块被制备出来,就可以通过一系列方法(如随机组装、多层堆叠或者顺序组装等)装配成更大的组织^[27-29]。通过“自下而上”方法构建的组织工程复合体具有更均匀的细胞分布和更可控的细胞微环境,其中,两个最为关键的技术就是微单元的制备技术及微单元的组装技术(图3)。

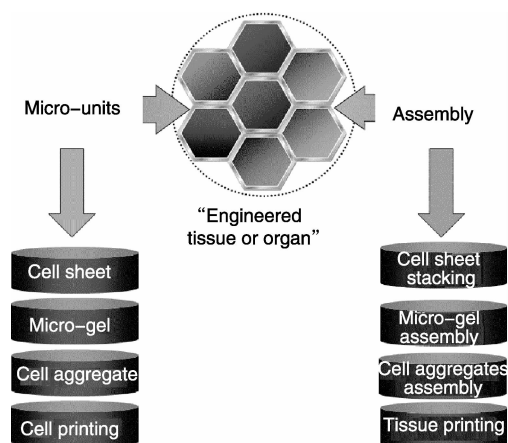


图3 “自下而上”组织工程方法的构建过程与关键技术

Fig. 3 The construction approach and key technologies of the modular tissue engineering

2.3 “自下而上”微尺度组织构建中微单元的制备及组装

2.3.1 模块化组织工程微单元

“自下而上”组织工程构建方法通过模块化微单元的制备及进一步组装实现大块组织的组装构建,模块化微单元即组装构建的基本单元,常用的微单元主要有:组织工程细胞片层,装载有细胞的微球和微凝胶等。

组织工程细胞片层技术通过组织工程方法使细胞从培养皿表面分离形成含有细胞外基质的一层片状结构。该技术是将温敏性的聚合物共价结合到培养皿表面,在37℃培养条件下,培养皿表面呈疏水性,细胞可以在其表面粘附、铺展、增殖,培养一段时间后,当细胞分泌

出足够的细胞外基质,人为地将温度降至临界温度以下,培养皿表面呈亲水性,在培养皿的表面和培养的细胞之间形成水化层,细胞不能在其上粘附,无需酶的消化便可以自动与培养皿脱离。应用组织工程细胞片构建的组织结构更接近于正常组织,有良好的应用前景^[30-31]。组织工程细胞片虽然能克服传统组织工程方法带来的许多缺点,但仍存在一些需解决的问题:①收获的细胞片有不同程度尺寸收缩的情况,这些收缩的细胞片对细胞功能及重建的组织有无影响,仍有待研究;②有些构建方法存在着潜在的生物毒性;③组织工程细胞片可以通过层叠的方式来构建三维组织,但构建的三维组织中没有可以利用的血管网来输送营养和移除代谢产物,层叠的组织厚度不能超过100~200 μm;④体外培养的细胞不能在短时间产生足够多的ECM,细胞/ECM板层的力学强度非常有限^[32]。

由于许多细胞类型并不能产生足够多的ECM来形成稳固的微组织,越来越多的研究工作开始将细胞与天然或合成水凝胶混合形成具有特定几何形态和力学性能的微单元组织。水凝胶具有与细胞外基质类似的物理性质,较高的含水量可减少周围组织的摩擦和机械作用,对营养物质及代谢废物有很好的通透性等。水凝胶的物理性质可以通过对组成聚合物的类型、交联密度、聚合物浓度等进行调控,其生物相容性及生物活性可以通过选择具有相容性的合成或天然聚合物或者交联剂来进行调节。此外,水凝胶还能够完全环绕单个细胞,从而给细胞提供生物仿生的微环境。由于大多数水凝胶的制备工艺能与微制造技术相容,同时伴随着对凝胶材料性质研究的逐步深入,水凝胶在微尺度组织工程中得到了越来越广泛的应用。相对于前面的细胞片层技术,微水凝胶在“自下而上”的组织仿生结构构建中具有更为重要的意义和可行性^[33-35]。为了制备微水凝胶,水凝胶预聚物的交联过程必须被控制在一个很高的空间分辨率上,目前已经有制备几十纳米大小的纳米水凝胶的技术。常用的制备水凝胶的方法有乳化法以及微制造方法,微制造方法包括光刻技术、微流体技术和微模塑及生物打印等。其中乳化法是最早用于制备微凝胶的方法。乳化法最大的优势是它易于制备微凝胶,尽管通过优化工艺条件可以使凝胶中的粒度分布最小化,然而这一方法制备的微水凝胶粒度分布仍然较广,且乳化过程中不能控制微凝胶的形状,只能产生球形微凝胶^[36]。软刻蚀技术和微流体技术制备微凝胶也分别存在着硅模板加工繁琐及制备的微凝胶形貌单一,难以制备更复杂结构的问题。当前,光刻蚀技术是制备微水凝胶的首选方法,具有操作简单、不需要昂贵仪器和超净环境等优势。随着化学合成的进

步,很多具有优良生物相容性的天然材料通过光刻技术制备微水凝胶成为可能。光刻技术制备的微凝胶的空间分辨率可以从亚微米级达到毫米级。同时光刻技术可以配合“增材制造”来实现更为复杂结构的制备,比如肝小叶、骨单位等^[37-38]。

2.3.2 微单元的组装技术

“自下而上”组织工程方法的另一个主要问题是如何将具有特定结构和形貌的微单元组装成为宏观组织工程复合体。目前最大的挑战在于,在保持微单元的特殊组成与结构的同时,制备具有一定的力学性能能够实现临床植入并与周围细胞及组织产生相互作用的工程化组织。模块化组装技术需要克服的具体问题在于:研究并开发出具有优良理化性能同时具有很好生物相容性的材料;组装微单元形成稳固的完整组织复合体;制备出具有功能的微血管化组织;改善组装技术将产品规模提升至组织级别大小并能成功地应用于体内。本文将重点描述“自下而上”的组织工程方法中几种有希望的组装技术,并评价它们的优缺点。

细胞片层组装技术 将前文描述得到的单层细胞片层堆叠可获得三维多层立体组织结构。除了单种细胞片层重叠构成的三维立体结构外,还可以将不同细胞片层重叠在一起,形成多种细胞共培养的三维立体结构。有学者曾尝试将不同细胞混合培养,然后通过细胞片层技术将其完整取下,再通过重叠方式获得复杂的组织结构。此外还有研究人员通过双重温度敏感培养皿,获得多种细胞混合培养片层,再通过层层堆叠,就可以形成复杂的立体三维结构。然而这种方法的缺陷在于:在种子细胞选择方面,细胞片层只能由那些既能大量增殖同时也能分泌大量细胞外基质的细胞制备,同时细胞片层组装出来的几何体形状非常有限,而且细胞片层间连接的不紧密会导致细胞片层间的泄漏,从而最终影响到组织的功能^[39-40]。

细胞逐层打印技术 采用细胞打印技术,可由计算机逐点控制含有细胞液滴的位置,并层层叠加形成组织或器官,以保证不同种类细胞的位置和分布的准确性。现有研究工作已经验证了细胞打印技术在微尺度组织工程中应用的可行性。但目前仍然存在多种问题,如利用细胞打印技术构建的组织尺寸较小、结构较简单,生物材料的降解性与组织生长速率之间的匹配问题;构建复杂组织(如肾脏和肝脏)时,细胞打印技术的分辨率和速率还远不能满足要求;对所构建的组织后期培养问题;并不是所有的细胞类型都对这种技术相容^[41]。

微水凝胶的组装技术 通过光刻蚀、微流体、微模塑等技术,可以得到尺寸小于 1 μm 的微凝胶单元;通过

包裹细胞、添加信号分子等途径对微凝胶进行设计与修饰,可以得到具有特定结构和功能的微单元;再通过微单元之间的组装能够实现复杂结构的三维构建。目前已经用于微凝胶组装的技术有:灌流组装、表面张力组装、微流体组装、声场组装、磁场组装、纳米织纹的表面组装等^[42]。

通过微凝胶组装实现复杂组织的构建是当前组织工程的一个新兴研究领域,虽然目前还没有实质性的进展,但是无疑已成为组织工程中组织器官构建的新方向和新的研究热点。通过微凝胶自下而上组装成为三维组织工程复合体的一个先驱技术是通过灌流组装技术制备出具有微血管网络结构的肝组织。研究者首先制备出许多圆柱型且包裹有 HepG2 细胞的胶原微水凝胶,再在其表面种植 HUVEC 细胞,之后将同时装载两种细胞的微凝胶放入管道中进行灌流培养。通过灌流,微凝胶单元能够自发地紧密结合并最终形成一个贯通的微凝胶组装复合体。然而由于这种方法中微凝胶之间的结合是通过细胞外基质的分泌与粘结获得的,因此组装体缺乏一定的力学强度和结构稳定性^[43]。Du 等人首先报道了溶液中装载细胞的微水凝胶单元的自组装,为通过组装方法大规模构建工程化组织提供了可能。在他们的研究中,微凝胶单元的组装由多相液体表面积和自由能最小化的趋势来驱动,从而直接引发亲水性水凝胶的组装过程,组装体的稳定性可以通过二次曝光来提高。目前这种可扩展的技术可以被用来制造高度仿生的三维结构。

结合“钥匙与锁型”的机械嵌合和增料制造法,研究人员随后开发了一种新型的顺序微凝胶组装方法,并可以实现对天然微血管的精确仿生。然而,由于这种方法是依靠亲水-疏水界面的相互作用(需要在矿物油中进行组装),可能存在潜在的细胞毒性,对于组装后得到的复合体的大小有很大的限制,随机或者不可控结构的可能性仍然存在。而且,仅靠机械操作,难以进行大规模的组装,速度缓慢,操作较为繁琐^[44]。Xu 等在此基础上采用声场在水相中快速地组装微凝胶,他们将微凝胶悬浮在液滴中利用外加声场能快速地将微凝胶组装在一起。研究发现声场对包裹在微凝胶中细胞的活性并无显著影响,并且利用声场组装可以制备具有多层结构的组织复合体^[45]。Javier 等人采用了一个固体表面作为模板来引导微水凝胶的组装,可以获得具有精细结构的复合体。由于预聚物溶液的毛细管力的作用,微水凝胶能在固体模板表面紧密排列结合在一起,这种方法在制备较大及多层组织工程复合体时具有较大优势,但很难产生类似于天然组织的三维各向异性的结构^[46]。

3 结 语

综上所述,微尺度组织工程,特别是基于微凝胶单元及“自下而上”方法组装构建工程化组织复合体具有很好的应用前景,可望在微尺度上实现组织的结构仿生,最终有望实现功能仿生。理论上,通过装载有细胞的微凝胶“自下而上”组装可以获得类似于自然组织的复杂结构,目前已有一些利用微尺度技术实现一些组织或器官构建的报道,如血管^[47-48]、肝脏组织^[49-50]、骨单位构建^[38,51]等。但是大多数研究目前还停留在结构的构建上,获得功能性再生组织的成果并不多。目前的研究工作更多体现在概念设计、具有不同种类细胞层状分布的复杂结构的初期构建,显示出由这种方法构建复杂分级结构设计的可能性,但鲜有真正生物功能化的再生组织成功构建的报道。缺乏既适于微制造及组装过程,又具有良好的细胞生物活性的材料是制约该技术发展的重要原因。发展更为先进与可行的制造技术对于微尺度组织工程仿生构建自然组织具有重要意义,而建立适用于单元组装成型的材料体系是生物材料研究面临的主要问题,需解决如下几方面的问题:首先,组织单元组装制造使用的材料必须具有特定的力学强度,能够满足单元制造及组装的要求;其次,其成型制备组装过程必须是细胞相容的,能够保持细胞在微单元中的活性;最后,微凝胶材料必须为所装载细胞提供类细胞外基质的结构和功能,能促进细胞在其中的粘附、增殖和分化,即既要实现微制造技术对组织的结构仿生,同时基质必须具有功能仿生的性能,这是构建组织能够实现最终的细胞成活和功能重建的关键。随着新型先进材料研究的进展,结合先进制造技术如三维打印等,未来可望实现缺损组织和器官的个性化、功能化再生构建。

参考文献 References

- [1] Langer R, Vacanti J P. Tissue Engineering[J]. *Science*, 1993, (260): 920-926.
- [2] Boucard N, Viton C, Agay D, et al. The Use of Physical Hydrogels of Chitosan for Skin Regeneration Following Third-Degree Burns[J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 3 478-3 488.
- [3] Uematsu K, Hattori K, Ishimoto Y, et al. Cartilage Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells and a Three-Dimensional Poly-lactic-glycolic acid (PLGA) Scaffold[J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 4273-4 279.
- [4] Fidkowski C, Kaazempur M R, Borenstein J, et al. Endothelialized Microvasculature Based on a Biodegradable Elastomer[J]. *Tissue Engineering*, 2005, 11: 302-309.
- [5] Carmeliet P. Mechanisms of Angiogenesis and Arteriogenesis[J]. *Nature Medicine*, 2000, 6: 389-395.
- [6] Khademhosseini A, Langer R. Microengineered Hydrogels for Tissue Engineering[J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 5 087-5 092.
- [7] Ford M C, Bertram J P, Hynes S R, et al. A Macroporous Hydrogel for the Coculture of Neural Progenitor and Endothelial Cells to Form Functional Vascular Networks In vivo[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 2 512-2 517.
- [8] Choi N W, Cabodi M, Held B, et al. Microfluidic Scaffolds for Tissue Engineering[J]. *Nature Materials*, 2007, 6: 908-915.
- [9] Griffith L G, Swartz M A. Capturing Complex 3D Tissue Physiology in Vitro[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7: 211-224.
- [10] Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, et al. Microscale Technologies for Tissue Engineering and Biology[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 2 480-2 487.
- [11] Nguyen K T, West J L. Photopolymerizable Hydrogels for Tissue Engineering Applications[J]. *Biomaterials*, 2002, 23: 4 307-4 314.
- [12] Nichol J W, Koshy S T, Bae H, et al. Cell-Laden Microengineered Gelatin Methacrylate Hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 5 536-5 544.
- [13] Tsang V L, Chen A A, Cho L M, et al. Fabrication of 3D Hepatic Tissues by Additive Photopatterning of Cellular Hydrogels[J]. *The FASEB Journal*, 2007, 21: 790-801.
- [14] Liu T V, Bhatia S N. Three-Dimensional Tissue Fabrication[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56: 1 635-1 647.
- [15] Coutinho D F, Sant S V, Shin H, et al. Modified Gellan Gum Hydrogels with Tunable Physical and Mechanical Properties[J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 7 494-7 502.
- [16] Zorlutuna P, Annabi N, Camci-Unal G, et al. Microfabricated Biomaterials for Engineering 3D Tissues[J]. *Advanced Materials*, 2012, 24: 1 782-1 804.
- [17] Melchels FPW, Feijen J, Grijpma D W. A Review on Stereolithography and Its Applications in Biomedical Engineering[J]. *Biomaterials*, 2010, 31, (24): 6 121-6 130.
- [18] Whitesides G M, Ostuni E, Takayama S, et al. Soft Lithography in Biology and Biochemistry[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2001, 3: 3 35-3 73.
- [19] Rolland J P, Maynor B W, Euliss L E, et al. Direct Fabrication and Harvesting of Monodisperse, Shape-Specific Nanobiomaterials[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127: 10 096-10 100.
- [20] Inamdar N K, Borenstein J T. Microfluidic Cell Culture Models for Tissue Engineering[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(5): 681-689.
- [21] Pirlo R K, Dean DMD, Knapp D R, et al. Cell Deposition System Based on Laser Guidance[J]. *Biotechnology Journal*, 2006, 1: 1 007-1 013.

- [22] Ringeisen B R, Othon C M, Barron J A, *et al.* Jet-Based Methods to Print Living Cells[J]. *Biotechnology Journal*, 2006, 1: 930 – 948.
- [23] Moon S, Hasan S K, Song Y S, *et al.* Layer by Layer Three-Dimensional Tissue Epitaxy by Cell-Laden Hydrogel Droplets[J]. *Tissue Engineering*, 2009, 16: 157 – 166.
- [24] Murphy S V, Atala A. 3D Bioprinting of Tissues and Organs[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(8): 773 – 785.
- [25] Elbert D L. Bottom-up Tissue Engineering[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(5): 674 – 680.
- [26] Khademhosseini A, Vacanti J P, Langer R. Progress in Tissue Engineering[J]. *Scientific American*, 2009, 300: 64 – 71.
- [27] Gurkan U A, Tasoglu S, Kavaz D, *et al.* Emerging Technologies for Assembly of Microscale Hydrogels[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2012, 1: 149 – 158.
- [28] Gauvin R, Khademhosseini A. Microscale Technologies and Modular Approaches for Tissue Engineering: Moving toward the Fabrication of Complex Functional Structures[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(6): 4 258 – 4 264.
- [29] Kim T G, Shin H, Lim D W. Biomimetic Scaffolds for Tissue Engineering[J]. *Advanced Functional Materials*, 2012, 22(12): 2 446 – 2 468.
- [30] Matsuda N, Shimizu T, Yamato M, *et al.* Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology[J]. *Advanced Materials*, 2007, 19(20): 3 089 – 3 099.
- [31] Masuda S, Shimizu T, Yamato M, *et al.* Cell Sheet Engineering for Heart Tissue Repair[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60(2): 277 – 285.
- [32] Yang J, Yamato M, Kohno C, *et al.* Cell Sheet Engineering: Recreating Tissues without Biodegradable Scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(33): 6 415 – 6 422.
- [33] Du Y, Lo E, Vidula M, *et al.* Method of Bottom-Up Directed Assembly of Cell-Laden Microgels[J]. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2008, 1(2–3): 157 – 162.
- [34] Du Y, Ghodousi M, Lo E, *et al.* Surface-Directed Assembly of Cell-Laden Microgels[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105(3): 655 – 662.
- [35] Xu F, Finley T D, Turkyaydin M, *et al.* The Assembly of Cell-Encapsulating Microscale Hydrogels using Acoustic Waves[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(31): 7 847 – 7 855.
- [36] Tobita H, Kumagai M, Aoyagi N. Microgel Formation in Emulsion Polymerization[J]. *Polymer*, 2000, 41(2): 481 – 487.
- [37] Liu V A, Bhatia S N. Three-Dimensional Photopatterning of Hydrogels Containing Living Cells[J]. *Biomedical Microdevices*, 2002, 4: 257 – 266.
- [38] Zuo Y, Xiao W, Chen X, *et al.* Bottom-up Approach to Build Osteon-Like Structure by Cell-Laden Photocrosslinkable Hydrogel[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(26): 3 170 – 3 172.
- [39] L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, *et al.* A Completely Biological Tissue-Engineered Human Blood Vessel[J]. *Faseb Journal*, 1998, 12: 47 – 56.
- [40] Yuan B, Jin Y, Sun Y, *et al.* A Strategy for Depositing Different Types of Cells in Three Dimensions to Mimic Tubular Structures in Tissues[J]. *Advanced Materials*, 2012, 24: 890 – 896.
- [41] Fedorovich N E, Alblas J, Hennink W E, *et al.* Organ Printing: the Future of Bone Regeneration[J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(12): 601 – 606.
- [42] Gurkan U A, Tasoglu S, Kavaz D, *et al.* Emerging Technologies for Assembly of Microscale Hydrogels[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2012, 1: 149 – 158.
- [43] McGuigan A P, Sefton M V. Vascularized Organoid Engineered by Modular Assembly Enables Blood Perfusion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 11 461 – 11 466.
- [44] Du Y, Lo E, Ali S, *et al.* Directed Assembly of Cell-Laden Microgels for Fabrication of 3D Tissue Constructs[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 9 522 – 9 527.
- [45] Xu F, Finley T D, Turkyaydin M, *et al.* The Assembly of Cell-Encapsulating Microscale Hydrogels Using Acoustic Waves[J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 7 847 – 7 855.
- [46] Fernandez J G, Khademhosseini A. Micro-Masonry: Construction of 3D Structures by Microscale Self-Assembly[J]. *Advanced Materials*, 2010, 22: 2 538 – 2 541.
- [47] Kolesky D B, Truby R L, Gladman A S, *et al.* 3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs[J]. *Advanced Materials*, 2014, 26(19): 3 124 – 3 130.
- [48] Miller J S, Stevens K R, Yang M T, *et al.* Rapid Casting of Patterned Vascular Networks for Perfusable Engineered Three-Dimensional Tissues[J]. *Nature Materials*, 2012, 11(9): 768 – 774.
- [49] Snyder J E, Hamid Q, Wang C, *et al.* Bioprinting Cell-Laden Matrigel for Radioprotection Study of Liver by Pro-Drug Conversion in a Dual-Tissue Microfluidic Chip[J]. *Biofabrication*, 2011, 3(3): 034 112.
- [50] Chang R, Emami K, Wu H, *et al.* Biofabrication of a Three-Dimensional Liver Micro-Organ as an In Vitro Drug Metabolism Model[J]. *Biofabrication*, 2010, 2(4): 045 004.
- [51] Sun J, Wei D, Zhu Y, *et al.* A Spatial Patternable Macroporous Hydrogel with Cell-Affinity Domains to Enhance Cell Spreading and Differentiation[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(17): 4 759 – 4 768.