

特约专栏

## 基于胶原蛋白的干细胞 3D 打印研究进展

倪添雨, 张雅洁, 刘 敏, 裴仁军

(中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 江苏 苏州 215123)

**摘 要:** 干细胞 3D 打印是以“生物打印机”为手段, 以干细胞、生长因子、生物材料等为主要内容重建人体组织或器官的跨学科领域的新型再生医学工程技术, 有着美好的发展前景和巨大的社会价值。但细胞活性的维持、打印材料和打印过程与细胞的相容性、快速凝胶化等要求限制了可打印水凝胶材料的选择。胶原蛋白是天然生物组织中细胞外基质的重要成分, 优异的生物相容性使其在干细胞 3D 打印中有天然优势。综述了基于胶原蛋白的几种物理、离子作用及共价作用凝胶化方式, 以及干细胞 3D 打印支架在组织工程上的研究进展。

**关键词:** 胶原蛋白; 干细胞; 3D 生物打印; 水凝胶; 组织工程

**中图分类号:** R318.1    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1674-3962(2019)06-0551-08

## 3D Bioprinting with Stem Cells Based on Collagen

NI Tianyu, ZHANG Yajie, LIU Min, PEI Renjun

(Suzhou Institute of Nano-Tech and Nano-Bionics, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** The 3D bioprinting with stem cells has great prospect in organ or tissue repair. It constructs the 3D scaffolds with stem cells, growth factors and hydrogel biomaterials to regenerate the injured organs with the help of 3D bioprinter. However, the printable hydrogel biomaterials are deficient by considering the maintained activity of stem cells, biocompatibility between cells and the materials and the printing process, fast gelation property and so on. Collagen, an essential component of extracellular matrix in natural tissues, has emerged as a hydrogel material for 3D printing with great advantages in encapsulating stem cells. In this review, the gelation of collagen hydrogels in physical, ion-bonding and covalent-bonding ways and their advances in 3D bioprinting with stem cells for tissue engineering are highlighted.

**Key words:** collagen; stem cells; 3D bioprinting; hydrogels; tissue engineering

### 1 前 言

随着医疗手段的进步, 器官移植和修复技术得到了极大的发展, 器官移植也已成为终末期器官疾病的主要治疗手段。但由于目前供体器官极度短缺, 器官移植很受限制。近年来, 组织工程技术飞速发展, 人们已经可以在体外培养各种仿生组织或器官以供器官移植, 比如已经有了应用组织工程制造的胃、骨、皮肤、脊髓、食道等。但传统的人造器官或仿生支架无生理活性, 还存

在诸多不足, 譬如: 支架技术的空间分辨率限制了细胞渗透到支架材料内部的速度, 细胞不能均匀贯穿整个支架; 无法精确地将不同种类的细胞按照人体组织器官的结构准确定位, 不能形成类似于天然组织器官的三维结构; 直接使用支架接种细胞可能会导致血管化的缺失、供氧不足、容易引起组织或器官的坏死等<sup>[1]</sup>。

直至 2003 年, Mironov 等<sup>[2]</sup>基于生物自组装原理提出“细胞打印”的设想。细胞打印技术能够将细胞、生长因子和支架结合在一起形成一个完整的整体结构, 且各种类型的细胞能够按照正常的解剖结构准确定位, 通过细胞、生长因子和支架等之间的相互作用, 行使正常的生物学功能(见图 1<sup>[3]</sup>)。细胞打印技术发展至今, 已经有了相对成熟的 3 种方式, 分别是: 挤出成型打印、喷墨打印和激光辅助打印<sup>[4]</sup>, 3 者中挤出成型打印方法简单、价格低廉, 是目前使用最广泛的细胞打印方式。挤出成型打印是指以受控方式迫使生物材料通过喷嘴喷射

收稿日期: 2018-10-26    修回日期: 2018-11-21

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA16020100); 中科院重点部署项目(ZDRW-ZS-2016-2); 苏州市科技项目(SYG201747)

第一作者: 倪添雨, 男, 1994 年生, 硕士研究生

通讯作者: 裴仁军, 男, 1971 年生, 研究员, 博士生导师,

Email: rpei2011@sinano.ac.cn

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.201810020

含有细胞的连续长丝以构造 3D 结构的技术<sup>[5]</sup>。其中,生物材料通常指水凝胶,利用其高含水量、优良的生物相容性和温和的凝胶条件,促进细胞封装,把不利于细胞活性的影响降至最低<sup>[6, 7]</sup>。目前最常用的水凝胶材料有聚乙二醇(PEG)、海藻酸盐、壳聚糖、透明质酸和胶原蛋白等。其中,胶原蛋白是一种广泛存在于人体组织内的蛋白质,具有接近正常组织表面的生理生化特性和优良的生物可降解性,是一种优良的组织工程材料<sup>[8]</sup>。

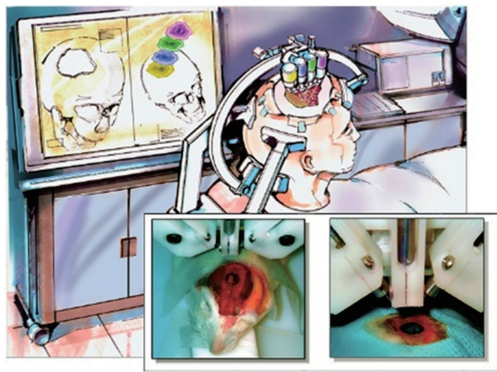


图 1 在大鼠颅骨缺损处用喷墨打印纤维蛋白原、凝血酶和显像染料验证原位生物打印的可行性<sup>[3]</sup>

Fig. 1 Conceptual vision of *in-situ* bioprinting, with feasibility demonstrated by inkjet printing fibrinogen, thrombin and visualization dye into a rat calvarial defect<sup>[3]</sup>

而在细胞的选择上,干细胞相较于分化完全的功能细胞有着明显的优势。干细胞具有长期的自我更新能力和广泛的分化潜能,理论上可以提供无限数量的细胞<sup>[9]</sup>。干细胞来源广,在适当的诱导下能进行定向分化,能更好地促进器官修复与再生。因此,干细胞 3D 打印被认为是组织工程中最有潜力的技术。

2 干细胞 3D 共打印

正常的生理组织具有自我更新和修复能力,参与修复更新的主要是组织特异性干细胞,如造血干细胞、表皮干细胞、神经干细胞等。随着干细胞技术的不断发展,干细胞分离、培养、移植等方面都取得了突破性的进展,并越来越多地应用于临床治疗中。至 2016 年底,全球已有 13 种干细胞治疗药物获批上市,可用于治疗急性心肌梗死、退行性关节炎、赫尔勒综合征等疾病<sup>[10]</sup>。

在干细胞治疗中,最有治疗潜力的细胞是多能干细胞(PSCs),包括胚胎干细胞(ESCs)和诱导多能干细胞(iPSCs)<sup>[9]</sup>。但 ESCs 的临床应用受到伦理限制,iPSCs 的临床应用受到安全性(尤指致癌风险)、临床疗效及成本等限制,所以目前干细胞治疗以成体干细胞治疗为主<sup>[10]</sup>。成体干细胞治疗根据部位的不同,可以选用间充质干细胞(MSCs)及神经干细胞(NSCs)等。表 1 列举了常见的干细胞、支架材料及其应用。

传统的细胞支架是在已成型的支架中种植细胞,体外培养后再植入体内,这种方式难免会遇到诸多组织移植的问题,如支架技术的空间分辨率低、细胞不能渗透到支架内部、血管化的缺失导致组织供养不足及坏死等。而干细胞的状态及行为与其生存的微环境密切相关,支架材料的硬度、表面特征、孔隙结构、降解性等对干细胞的活性和功能也有一定的影响,同时,材料的化学组成会影响细胞的粘附、迁移、增殖和后续组织的形成<sup>[30]</sup>。良好的支架材料应该既能为细胞提供增殖和分泌基质的微环境,又能维持细胞表型以及功能的表达。因此,选用细胞包埋水凝胶比传统支架形成后种植细胞有更多优点,包括能更好地注入细胞和控制细胞分布等<sup>[31]</sup>。

表 1 水凝胶封装干细胞的应用举例  
Table 1 Examples of stem cells encapsulated by hydrogel

Stem cells	Materials	Application
PSCs	Collagen <sup>[13]</sup> , hyaluronic acid <sup>[14]</sup> , etc.	Repair cardiac myocytes <sup>[14]</sup> , cartilage tissue <sup>[13]</sup> , pancreas <sup>[13]</sup> , etc.
MSCs	Alginate <sup>[16]</sup> , collagen <sup>[17]</sup> , chitosan <sup>[18]</sup> , fibrin <sup>[17]</sup> , PCL <sup>[16]</sup> , etc.	Repair bone tissue <sup>[16]</sup> , cardiac tissue <sup>[19]</sup> , articular cartilage <sup>[18]</sup> , nerve injury <sup>[20]</sup> , etc.
NSCs	Alginate <sup>[21]</sup> , collagen <sup>[22]</sup> , graphene <sup>[23]</sup> , PAM <sup>[24]</sup> , PCL <sup>[25]</sup> , PU <sup>[23, 25]</sup> , etc.	Repair nerve tissue <sup>[22]</sup> , for the treatment of stroke, Alzheimer's disease and Parkinson's disease <sup>[26]</sup> , etc.
CPCs	Alginate <sup>[27]</sup> , collagen <sup>[28]</sup> , hyaluronic acid <sup>[29]</sup> , PEG <sup>[30]</sup> , PLGA <sup>[31]</sup> , etc.	Treat myocardial infarction and regenerate cardiac tissue <sup>[31]</sup>

Notes: CPCs: Cardiac progenitor cells; PCL: Polycaprolactone; PAM: Polyacrylamide; PU: Polyurethane; PEG: Polyethylene glycol; PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid)

### 3 胶原蛋白及其细胞支架

胶原蛋白是人体中分布最广泛的蛋白质, 大约占蛋白质总量的 30%<sup>[32]</sup>, 在脊椎动物中已经发现了 28 种不同的胶原蛋白, 类胶原蛋白的种类更加丰富<sup>[33]</sup>。胶原蛋白分子存在独特的功能域, 是由 3 条左旋且平行的  $\alpha$  链形成的三螺旋结构。甘氨酸在三螺旋结构中有至关重要的地位, 因为它是最小的氨基酸, 能被三螺旋结构紧密包裹在内部<sup>[34]</sup>; 此外, 该结构中还存在许多垂直于螺旋轴的氢键, 将肽链紧密地连接在一起, 使三螺旋结构更加稳定<sup>[35]</sup>。

胶原蛋白作为一种天然生物大分子材料, 来源广泛且与人体多数组织的生理性质相近, 已被广泛地应用于组织工程中, 尤其是血管<sup>[36]</sup>和骨组织<sup>[37]</sup>修复。并且胶原蛋白中含有的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列可以与干细胞相互作用, 制成的 3D 胶原支架可以增加细胞的粘附、增殖和分化<sup>[38]</sup>, 同时, 胶原支架的降解成分在新组织形成过程中可以被细胞重复利用, 十分有利于促进组织修复<sup>[39]</sup>。但单纯的胶原蛋白用于组织支架制备, 存在难于塑形、缺乏一定的力学性能、在生物体内降解过快等问题。为了满足组织修复中的复杂需求, 胶原蛋白通常与其他高分子材料复合, 制造出功能各异的细胞支架。

在胶原蛋白中添加其他天然的高分子材料可以发挥它们不同的理化性质, 优势互补, 能更好地促进细胞粘附、生长和增殖。Madhavan 等<sup>[36]</sup>在胶原凝胶中加入弹性蛋白及壳聚糖, 其拉升率和极限应力明显提高。Buttafoco 等<sup>[40]</sup>将胶原蛋白和弹性蛋白以 1:1 的比例共混电纺, 制备出的纤维膜支架能很好地支持血管平滑肌细胞生长及增殖。同样地, 胶原蛋白复合丝素蛋白<sup>[41]</sup>、透明质酸<sup>[42]</sup>等天然高分子材料后, 力学性能都有明显提升。

虽然天然高分子的生物相容性好, 但其机械性能、降解速率等还不能媲美许多人工合成的高分子材料, 所以研究者们也使用胶原蛋白与人工合成高分子复合, 以制备性能优良的组织工程支架。其中常用于与胶原蛋白复合的人工合成高分子材料有聚己内酯(PCL)、聚对二氧杂环己酮(PDO)和聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)等。胶原蛋白与 PCL 共混后电纺制备的支架力学强度高、能在体内保持稳定结构, 有望成为传统人工血管的代替物<sup>[43]</sup>。PDO 与其他材料相比, 具有形状记忆功能、力学性能理想、抗原性低和降解速率慢等特性, 与胶原蛋白共混后进行电纺得到的支架, 可以模拟血管微环境的力学和形态学性能<sup>[44]</sup>。胶原蛋白复合 PLGA 制备的支架能

促进内皮细胞的粘附及延伸, 并保持细胞表型<sup>[43]</sup>。

胶原蛋白支架发展至今, 已有许多机械强度、降解速度、细胞亲和力都有很好改善的仿生支架面市。总而言之, 现有的胶原仿生支架大多是通过交联、侧链引入等方法将胶原蛋白与其他材料复合制备的, 而在支架制备工艺上使用较多的是经典的静电纺丝法、冷冻干燥法、气体发泡法和致孔剂制孔法等。然而, 这些方法制备的支架存在孔径大小和空间分布难以控制等不足<sup>[45]</sup>, 无法为细胞提供最佳的生存空间。基于胶原蛋白利用 3D 打印技术构建细胞 3D 打印一体化策略, 一方面利用 3D 打印技术实现快速、精确、可控地构造仿生组织替代物, 另一方面利用胶原蛋白的特性为细胞提供良好的微环境, 提高细胞的存活率和增殖率。

### 4 基于胶原蛋白的干细胞 3D 打印

#### 4.1 物理凝胶法

物理交联水凝胶主要是通过高分子链间的缠结或者非化学键(如氢键和亲/疏水相互作用等)形成, 具有动态特征, 可以实现溶液-凝胶的可逆变化。常见的物理凝胶方法有热诱导的链缠结、分子自组装等<sup>[46]</sup>。

##### 4.1.1 热诱导的链缠结致凝胶化

许多聚合物的凝胶化是由热驱动的过程, 它们对温度升高或降低响应的直接表现为溶解度的改变, 实际是亲水和疏水链段比率的变化, 所以又被称为具有“温敏性”。根据转变行为的不同, 分别定义为低临界溶解温度(LCST)和高临界溶解温度(UCST)<sup>[46]</sup>。

在干细胞 3D 打印中, 这种具有温敏性的可注射水凝胶是研究热点。Tan 等<sup>[47]</sup>使用 PLGA 封装细胞形成多孔微球, 再混合胶原蛋白/琼脂溶液, 利用微管挤压法在冷平台上打印, 可立即形成复合水凝胶。37 °C 孵育 24 h, 水凝胶中形成胶原纤维, 为细胞提供更好的附着(如图 2)。Wang 等<sup>[48]</sup>将人 MSCs 封装进一种由 I 型胶原蛋白、硫酸软骨素和一种复杂聚合物组成的复合水凝胶, 其中的复杂聚合物是 N-异丙基丙烯酰胺、丙烯酸、丙烯酰氧基琥珀酰亚胺、聚(环丙烷碳酸盐)甲基丙烯酸羟乙基酯的嵌段共聚物, 在室温附近显示出具有 LCST 的相变行为。该水凝胶需要在 4 °C 下注射成型, 能够在 37 °C 的环境中于 6 s 内发生凝胶化。这种复合型水凝胶具有与人类心肌相匹配的模量和柔性、良好的可注射性、透氧性、力学性能和可降解性, 可用作心血管组织工程中生长因子和细胞的载体。Song 等<sup>[49]</sup>将人源脂肪间充质干细胞(ADSCs)与壳聚糖/ $\beta$ -甘油磷酸盐/胶原蛋白混合, 37 °C 下很快形成凝胶。壳聚糖/ $\beta$ -甘油磷酸盐是一种温敏型水凝胶, 胶原蛋白的参与可以促进细



胞增殖,维持细胞形态和细胞活性。这种新型水凝胶具有良好的组织相容性,为 ADSCs 的生长提供了良好的三维微环境。

热诱导的链缠结致凝胶化方法,不利用其它诱导条件,如 pH 调节、诱导剂、UV 光等,仅通过温度控制胶原复合水凝胶快速成型,凝胶中的干细胞和生长因子的生物活性可以得到很好的保存,在干细胞 3D 打印中有着很好的应用前景。

#### 4.1.2 自组装致凝胶化

非化学键分子自组装是一种重要的凝胶化机理,在蛋白质水凝胶中尤为常见。自组装的定义是在没有外部的干预下,分子链在至少一个维度上自发形成新的有序结构。弱非共价键,包括氢键、范德华力和疏水相互作用,能使大分子折叠成具有明确定义的结构和功能构象。胶原蛋白的分层自组装依赖于其氨基酸排列,由三螺旋结构进一步促成胶原微纤维,最终形成胶原水凝胶<sup>[46]</sup>。

胶原蛋白水凝胶在成分和结构上与天然细胞外基质相似,且对成骨分化有着促进作用,被广泛用于三维基质以支持骨髓间充质干细胞(BMSCs)的增殖和分化。Zhang 等<sup>[50]</sup>提取小牛皮肤的胶原蛋白,在中性条件下与新生兔 BMSCs 混合注入模具,30 min 实现凝胶化。结果表明在无任何生长因子添加的条件下,胶原水凝胶对 BMSCs 仍具有固有的成软骨分化诱导性,对临床软骨再生有极大帮助。

除了直接将干细胞封装在水凝胶中,研究者们还提出了使用纳米微球封装干细胞的概念,与水凝胶一起使用可以增加细胞桥接作用。DeVolder 等<sup>[51]</sup>通过在凝胶内掺入可水解的 PLGA 微粒来调节胶原蛋白凝胶的机械性能。一定直径的 PLGA 微粒能刺激胶原原纤维的物理缔合作用,显著改变凝胶的弹性和硬度,同时对凝胶的抗渗透性影响很小。Chen 等<sup>[52]</sup>使用水包油包水双乳液溶剂蒸发法制备 3-羟基丁酸酯和 3-羟基戊酸酯的共聚物(PH-BV)微球,将小鼠神经前体细胞(NPCs)接种在 PHBV 微球上,再将含有细胞的微球、层粘连蛋白、神经生长因子(NGF)等封装入胶原蛋白中,37 °C 下孵育 2 h 以形成水凝胶,这种水凝胶通过更紧密的包装以及将细胞接种到凝胶空间中可进一步促进基质材料与细胞桥接。

#### 4.2 离子作用凝胶法

海藻酸盐是从褐藻中提取的一种无规嵌段共聚物,其水溶液在许多二价金属阳离子(如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等)的作用下会发生分子链和离子的螯合作用,使海藻酸盐分子链形成螺旋状结构并成对地包裹和环绕在阳离子周围。由于海藻酸盐溶胶-凝胶转变过程条件温和,其本身对细胞没有明显的负面作用,且在需要的时候可发生可逆转

变,因而被广泛用于细胞封装。

海藻酸盐可以很好地与胶原蛋白复合成细胞载体,在干细胞打印中有很好的应用前景。Nguyen 等<sup>[53]</sup>利用海藻酸盐和  $\text{Ca}^{2+}$  的交联作用,用胶原蛋白/海藻酸盐封装人 MSCs 和人脐静脉内皮细胞(HUVECs),挤出至培养基中孵育,交联成型后分别进行了动态培养和静态培养,证明了胶原蛋白在促进成骨和血管生成方面有独特功能。

随着生物 3D 打印技术的不断进步,研究者们越来越不满足于单一结构的打印方式,其中最典型的是利用海藻酸盐和胶原蛋白复合的核-壳打印方式。Olmos 等<sup>[54]</sup>设计了用于细胞封装的大鼠 I 型胶原蛋白/海藻酸盐核-壳结构水凝胶,他们用同心双喷嘴同时喷射注有大鼠 BMSCs 的胶原蛋白溶液的核和含海藻酸盐溶液的壳,在氯化钙离子浴中制备双层水凝胶结构,以获得纤维结构的支架。该研究在壳结构中加载生物活性分子,比如药物、生长因子或是基因等,在细胞靶向治疗和组织工程应用中具有极好的前景。Perez 等<sup>[55]</sup>也使用了胶原蛋白/海藻酸盐的核-壳结构封装兔 MSCs,装载有 MSCs 的胶原溶液作为核,海藻酸盐溶液作为壳,通过钙离子交联成型,再进一步孵育用于骨组织工程的细胞培养。这种生物墨水可由生物 3D 打印机模塑成任何确定的形状,其本身也可保持连续的纤维结构。Yeo 等<sup>[56]</sup>通过计算机控制的三轴打印系统打印了多层的载有细胞的网状结构。他们使用 I 型猪腱胶原蛋白混合人 ADSCs 作核结构,以纯海藻酸盐作为壳结构,使用氯化钙溶液进行气溶胶处理以暂时交联壳层中的海藻酸盐部分,使得载有细胞的胶原组分可以稳定地保留在圆柱形核-壳的核心区域中。此复合型水凝胶在成肝诱导分化培养基诱导后,表现出高水平的肝特异性基因表达,说明使用这种组合工艺制造的载有细胞的核-壳结构,可能具有作为用于组织再生的细胞负载结构的显著潜力。

单纯的海藻酸盐水凝胶存在细胞附着点少、交联后收缩、降解性差等缺点,即使经较长期的培养,海藻酸盐与细胞构建体仍缺乏如胶原原纤维和蛋白多糖类的连续网络,这对于组织工程支架的应用是不利的。而海藻酸盐复合胶原蛋白水凝胶结合了两者的优势,有着良好的生物相容性、广泛的来源和较强的可塑性等特点,尤其是在二价阳离子中交联速度极快、可在细胞存活的条件下载成,呈现出“1+1>2”的效应。

#### 4.3 共价作用凝胶法

化学交联水凝胶则是通过高分子链间的共价键交联形成,与物理交联水凝胶相比,化学交联在稳定水凝胶基质方面表现更好。研究者们也已经设计了多种生物相

容的化学反应用于在基质内细胞存在的条件下直接形成水凝胶<sup>[46]</sup>。

#### 4.3.1 光引发致凝胶化

某些化合物在特定波长光的照射下会产生活性中心, 从而引发聚合反应, 在空间中联结成交联网络进而形成水凝胶, 比较典型的有核黄素和甲基丙烯酸修饰的大分子等。

核黄素又被称为维生素 B2, 在碱性条件下易被破坏。核黄素诱导的胶原蛋白光交联是一种非细胞毒性的交联方式, 能强化水凝胶的机械性能。Koh 等<sup>[57]</sup>研发了一种核黄素诱导的光交联胶原蛋白/透明质酸水凝胶, 紫外光照射 3 min 即可使凝胶成型。用这种水凝胶封装扁桃体衍生的间充质干细胞(T-MSCs), 代替传统的 BMSCs 应用于半月板组织工程, 能刺激纤维软骨相关的基因表达, 也能一定程度上解决同种异体移植的问题。Choi 等<sup>[58]</sup>将甲基丙烯酸修饰到壳聚糖上, 混合鸡胸骨 II 型胶原蛋白和 MSCs, 并以核黄素作为光引发交联剂, 暴露于可见蓝光(VBL)下几十秒之后形成水凝胶。其中掺入的转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )进一步增强了 MSCs 的成软骨分化能力。实验结果表明, 皮下植入该水凝胶干细胞共混培养物后, 显示出很高的软骨修复潜力。

甲基丙烯酸酯基团中含有共轭双键, 用其修饰的蛋白在紫外光的照射下易转变为激发态, 产生活性中心从而引起光化学反应。Yang 等<sup>[59]</sup>利用胶原蛋白上的赖氨酸与甲基丙烯酸酐上的  $\varepsilon$ -氨基发生酰胺化反应合成 II 型胶原甲基丙烯酸酐, 使胶原能够实现光交联。实验结果表明, 功能化修饰不仅保护了胶原蛋白的天然三螺旋构象, 而且赋予其光交联能力, 可用于有明确定义的复杂组织结构的精细加工, 为 3D 细胞打印提供了一种理想的生物墨水材料。Gaudet 等<sup>[60]</sup>用甲基丙烯酸酯功能化修饰胶原

蛋白, 这种合成反应可以保留胶原蛋白的基本性质, 并使其在波长为 365 nm 的紫外光照射下发生凝胶化, 且储能模量比修饰前增加 5 倍, 其封装的人源 MSCs 也能很好地存活。Du 等<sup>[61]</sup>将带有胶原结合域的骨形态发生蛋白 2 (CBD-BMP2) 微纤维、BMSCs 以及甲基丙烯酸酐修饰的明胶共混液, 3D 打印出一定形貌后以光引发剂 I2959 作交联剂紫外光照射 1~5 min 可发生凝胶化, 结果表明该胶原微纤维可以更安全有效地诱导 BMSCs 分化为成骨细胞。

PEG 是公认的一种良好的生物材料, 在一定条件下能形成水凝胶, 此外还可对四臂聚乙二醇(4arm-PEG)进行进一步的化学修饰, 从而构成性能更优的水凝胶。Collin 等<sup>[62]</sup>设计了一种由四臂-琥珀酰亚胺基戊二酸酯醚-聚乙二醇(4S-StarPEG)交联的 II 型去端肽胶原蛋白/透明质酸的可注射水凝胶, 用于封装 NPCs 和 ADSCs, 在 37 °C 下约 8 min 可以发生凝胶化, 该水凝胶系统在培养基中保持形状稳定并且具有支持细胞生长的能力。因牙髓干细胞(DPSCs)可以分化成软骨细胞, Yao 等<sup>[63]</sup>使用 I 型和 II 型胶原蛋白和 4S-StarPEG 交联形成水凝胶, 封装在 I 型和 II 型胶原水凝胶中的 DPSCs 和 DPSCs 衍生的软骨细胞在水凝胶中仍保持较高的活动性, 可以移植到退化的椎间盘中以修复受损组织。Amer 等<sup>[64]</sup>用降冰片烯修饰 4arm-PEG, 这种 PEG 可以与双半胱氨酸交联剂(CVPLSLYSGC)在紫外光照射下发生交联。他们将和人 ESCs 衍生的胰腺祖细胞包埋进大鼠尾 I 型胶原蛋白, 37 °C 下 UV 照射 6 min 发生凝胶化, 这种水凝胶可以维持细胞活性并诱导细胞向胰腺分化。Chen 等<sup>[65]</sup>将双键修饰的结冷胶和 I 型胶原与干细胞混合, 构建负载干细胞的水凝胶, 通过光/离子双重交联可以显著提高水凝胶的固化速度以及机械性能, 并用于血管形成研究(见图 2)。

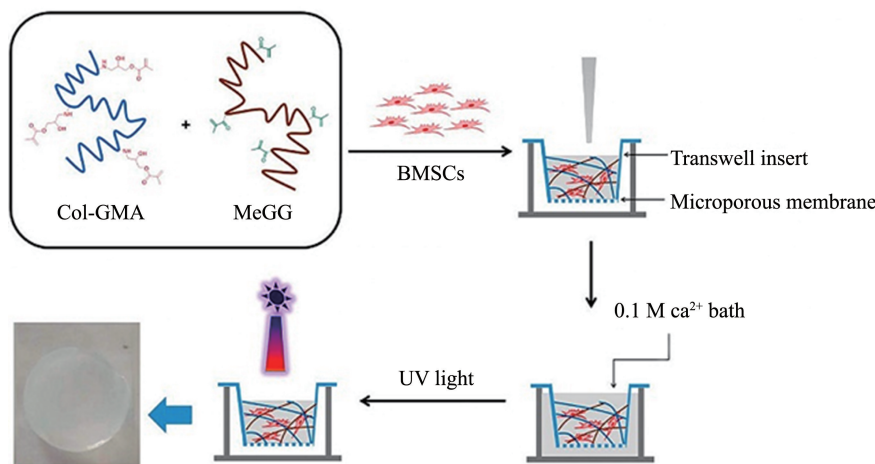


图2 封装 BMSCs 的胶原蛋白/结冷胶水凝胶的制备<sup>[65]</sup>

Fig. 2 Preparation of BMSCs-encapsulating methacrylated gellan gum/collagen hydrogel<sup>[65]</sup>

#### 4.3.2 点击化学致凝胶化

研究者还设计了多种生物相容的点击反应用于在基质内细胞存在下直接形成水凝胶<sup>[66]</sup>,如炔烃和叠氮化物之间的 Huisgen 1,3-偶极环加成,该反应在铜(I)催化下温和且高效,在许多情况下既不需要保护基也不需要纯化步骤。该反应中的叠氮基和炔基与生物分子的反应可忽略不计,在水性环境中具有良好的稳定性,可用于靶向引导合成和基于活性的蛋白质分析<sup>[67]</sup>。为了避免铜(I)引入的细胞毒性,研究者们也开发了无铜(I)催化的[3+2]叠氮-炔烃环加成法<sup>[68]</sup>、炔烃-硫醇产生稳定硫醚键的点击反应、2-氰基苯并噻唑(CBT)与硫基点击反应<sup>[69]</sup>等,大大提高了生物3D打印应用范围。Xu等<sup>[70]</sup>开发了一种硫醇化的胶原与丙烯酸酯共聚物组成的可注射水凝胶,用于包封 BMSCs,利用巯基与碳碳双键的 Michael 加成反应,实现生理条件下(37℃、pH 7.4)的快速凝胶化,最快可在 0.4 min 内成胶,储能模量最大可达 55.6 kPa。大鼠的心肌梗塞实验也证明,该水凝胶能对心脏的功能性再生有积极作用。Lee 等<sup>[71]</sup>利用叠氮化物-炔烃环加成反应成功实现了将生长因子固定在胶原蛋白表面。利用这种思路可以把一些特异性基团引入胶原分子,使胶原高效、定向发生凝胶化,这在干细胞 3D 打印中有广泛的应用前景。

#### 4.3.3 酶促凝胶化

用酶和相应底物反应,使蛋白质或多肽链发生共价交联形成分子内或分子间的交联网状结构,比单纯使用化学交联剂要更加绿色,也减少了细胞毒性。Kuo 等<sup>[72]</sup>从小鼠表皮提取胶原蛋白,对其进行酪胺化修饰,并与内皮集落形成细胞(ECFCs)、MSCs、过氧化氢和辣根过氧化氢酶共混,37℃下可以在 10 min 凝成胶原蛋白水凝胶。经过模拟细胞外基质条件和小鼠体内条件培养实验,证明了可注射和酶促交联的胶原-酚羟基水凝胶适用于支持人类祖细胞形成体外和体内 3D 血管网络。Mitra 等<sup>[73]</sup>发现利用赖氨酰氧化酶介导胶原交联可以调节胶原水凝胶的机械性能并调节 MSCs 向成骨分化的表型,能很好地改善成骨移植的特性。

#### 4.3.4 醛基缩合致凝胶化

在一定的温度下,有相互作用的基团会发生反应,进而使分子交联成凝胶网络,经典的有羟醛缩合和醛醛缩合等。Wise 等<sup>[74,75]</sup>用胶原蛋白/壳聚糖水凝胶封装 MSCs,利用 $\beta$ -磷酸甘油酯和乙二醛的交联作用,在 37℃下使用“油包水”的方法制造含有细胞的微珠。微珠水凝胶包封干细胞的形式为药物递送和组织修复提供了一定的方便性,在骨移植组织工程中有一定程度的应用。Wang 等<sup>[76]</sup>用水油乳化法制备壳聚糖/胶原蛋白复合微

珠,简而言之就是将壳聚糖、牛型 I 型胶原蛋白、 $\beta$ -磷酸甘油酯、乙二醛和 MSCs 按照一定比例混合,在冰水浴中预冷,叶轮搅拌后获得均匀的水油乳剂,再将溶液温度提高到 37℃,一段时间后形成凝胶。其中乙二醛和 $\beta$ -磷酸甘油酯作为物理和化学交联剂,为基质材料提供共聚合作用。Wang 等<sup>[77]</sup>的另一篇文章指出, $\beta$ -磷酸甘油酯引发的壳聚糖/胶原蛋白水凝胶比纯胶原或纯壳聚糖凝胶的机械性能更高,但 $\beta$ -磷酸甘油酯的存在会使人 BMSCs 的代谢活性降低。

## 5 结 语

传统的 2D 培养已经无法满足干细胞的发展需求,且存在很多缺陷,3D 干细胞培养倍受重视和推广。尤其是干细胞 3D 打印技术摒弃了传统的批量化生产的模式,可以根据患者需求量体裁衣,制备个性化的植入物,从而实现受损部位的修复,这些优势特点在组织器官重建领域的价值被寄予厚望。但是,由于干细胞 3D 打印的条件严格,要求材料兼顾细胞活性、无毒无害、快速凝胶等,适合的材料十分有限。

胶原蛋白作为细胞分泌的细胞外基质的主要成分之一,具有优良的生物相容性、可降解性和弱抗原性等特征,用作干细胞 3D 打印材料有着巨大的优势。许多研究者通过物理、化学交联复合其它材料等方法来制备胶原支架。物理凝胶法不用添加额外的物质,绿色环保。但物理凝胶法与大分子的自身性质密切相关,可以实现溶液-凝胶的可逆变化,稳定性不够。与物理凝胶方法相比,化学凝胶法处理材料的交联程度更高、时空精确度更高,能显著提高胶原蛋白水凝胶的使用性能。但是化学交联过程中可能会引入外源性物质,这些物质经过化学反应或者细胞作用分解成其他小分子,致使材料具有细胞毒性,还需谨慎使用。

随着干细胞 3D 打印技术的快速发展,解决干细胞 3D 打印生物材料问题是助力干细胞 3D 打印临床应用的关键,进而为将来真正实现器官打印提供强有力的支持,为解决器官供体短缺问题开辟出新的路径。

## 参考文献 References

- [1] 魏玉雪,刘晓秋,李迪,等.海南医学[J],2017,28(5):801-804.  
WEI Y X, LIU X Q, LI D, *et al.* Hainan Medical Journal[J], 2017, 28(5): 801-804.
- [2] MIRONOV V, BOLAND T, TRUSK T, *et al.* Trends in Biotechnology [J], 2003, 21: 157-161.
- [3] CAMPBELL P G, WEISS L E. Expert Opinion on Biological Therapy [J], 2007, 7(8): 1123-1127.



- [4] MIRONOV V, REIS N, DERBY B. *Tissue Engineering*[J], 2006, 12: 631–634.
- [5] FEDOROVICH N E, ALBLAS J, DE WIJN J R, *et al.* *Tissue Engineering*[J], 2007, 13: 1905–1925.
- [6] FERRIS C J, GILMORE K G, WALLACE G G, *et al.* *Applied Microbiology and Biotechnology*[J], 2013, 97: 4243–4258.
- [7] SART S, MA T, LI Y. *Biores Open Access*[J], 2014, 3: 137–149.
- [8] 赵晋, 李敏. 中国修复重建外科杂志[J], 2011, 25(07): 859–862.
- ZHAO J, LI M. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*[J], 2011, 25(07): 859–862.
- [9] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, *et al.* *Science* [J], 1998, 282(5391): 1145–1147.
- [10] 孙耀, 张斌, 陈虎. 中国肿瘤生物治疗杂志[J], 2018, 25(6): 549–554.
- SUN Y, ZHANG B, CHEN H. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy* [J], 2018, 25(6): 549–554.
- [11] HINDLE P, BAILY J, KHAN N, *et al.* *Stem Cells and Development* [J], 2016, 25: 1659–1669.
- [12] OGASAWARA T, OKANO S, ICHIMURA H, *et al.* *Scientific Reports* [J], 2017, 7: 8630.
- [13] LIU H Y, GREENE T, LIN T Y, *et al.* *Acta Biomaterialia*[J], 2017, 48: 258–269.
- [14] DALY A C, CRITCHLEY S E, RENCOSOK E M, *et al.* *Biofabrication* [J], 2016, 8(4): 045002.
- [15] BENNING L, GUTZWEILER L, TROENDLE K, *et al.* *Journal of Biomedical Materials Research Part A*[J], 2017, 105: 3231–3241.
- [16] SONG K, YANG Y, LI W, *et al.* *Journal of Functional Materials*[J], 2015, 46: 15021–15030.
- [17] MELHEM M R, PARK J, KNAPP L, *et al.* *ACS Biomaterials Science & Engineering*[J], 2017, 3: 1980–1987.
- [18] BAE J H, SHRESTHA K R, PARK Y H, *et al.* *Urology*[J], 2014, 84(5): 1248. e1–1248. e7.
- [19] ALESSANDRI K, FEYEU M, GURCHENKOV B, *et al.* *Lab on a Chip*[J], 2016, 16: 1593–1604.
- [20] LEE Y B, POLIO S, LEE W, *et al.* *Experimental Neurology* [J], 2010, 223: 645–652.
- [21] HUANG C T, SHRESTHA L K, ARIGA K, *et al.* *Journal of Materials Chemistry B*[J], 2017, 5: 8854–8864.
- [22] ILKHANIZADEH S, TEIXEIRA A I, HERMANSON O. *Biomaterials* [J], 2007, 28: 3936–3943.
- [23] LIN H H, HSIEH F Y, TSENG C S, *et al.* *Journal of Materials Chemistry B*[J], 2016, 4: 6694–6705.
- [24] KRIKS S, SHIM J W, PIAO J, *et al.* *Nature*[J], 2011, 480: 547–551.
- [25] HAO T, LI J, YAO F, *et al.* *ACS Nano*[J], 2017, 11: 5474–5488.
- [26] GAETANI R, YIN C, SRIKUMAR N, *et al.* *Cell Transplantation*[J], 2016, 25: 1653–1663.
- [27] JHA A K, THARP K M, YE J, *et al.* *Biomaterials*[J], 2015, 47: 1–12.
- [28] CIOCCI M, MOCHI F, CAROTENUTO F, *et al.* *Stem Cells and Development*[J], 2017, 26: 1438–1447.
- [29] LI Z, GUO X, GUAN J. *Biomaterials*[J], 2012, 33: 5914–5923.
- [30] 杨雪, 高华丽, 张鲁鲁, 等. 口腔医学研究[J], 2018, 34(5): 474–476.
- YANG X, GAO H L, ZHANG L L, *et al.* *Journal of Oral Science Research*[J], 2018, 34(5): 474–476.
- [31] CRESCENZI V, CORNELIO L, DI M C, *et al.* *Biomacromolecules* [J], 2007, 8(6): 1844–1850.
- [32] BAUER A J P, LIU J, JACK WINDSOR L, *et al.* *Soft Materials*[J], 2014, 12: 359–370.
- [33] VEIT G, KOBBE B, KEENE D R, *et al.* *Journal of Biological Chemistry*[J], 2006, 281: 3494–3504.
- [34] BECK K, CHAN V C, SHENOY N, *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*[J], 2000, 97: 4273–4278.
- [35] SHOULDERS M D, RAINES R T. *Annual Review of Biochemistry*[J], 2009, 78: 929–958.
- [36] MADHAVAN K, BELCHENKO D, MOTTA A, *et al.* *Acta Biomaterialia*[J], 2010, 6: 1413–1422.
- [37] FU W, WANG J, WAN C, *et al.* *Journal of Biomedical Engineering* [J], 2010, 27: 458–462.
- [38] KUO K C, LIN R Z, TIEN H W, *et al.* *Acta Biomaterialia*[J], 2015, 27: 151–166.
- [39] BAHNEY C S, HSU C W, YOO J U, *et al.* *FASEB Journal*[J], 2011, 25(5): 1486–1496.
- [40] BUTTAFOCO L, KOLKMAN NG, ENGBERS-BUIJTENHUIJS P, *et al.* *Biomaterials*[J], 2006, 27: 724–734.
- [41] LU Q, HU K, FENG Q, *et al.* *Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications*[J], 2009, 29: 2239–2245.
- [42] 孙秀娟, 范代娣, 朱晨辉, 等. 生物工程学报[J], 2009, 25(4): 591–598.
- SUN X J, FAN D D, ZHU C H, *et al.* *Chinese Journal of Biotechnology* [J], 2009, 25(4): 591–598.
- [43] STITZEL J, LIU L, LEE S J, *et al.* *Biomaterials* [J], 2006, 27: 1088–1094.
- [44] BOLAND E D, COLEMAN B D, BARNES C P, *et al.* *Acta Biomaterialia*[J], 2005, 1: 115–123.
- [45] 徐云强, 刘迎节, 李瑞欣, 等. 中国组织工程研究[J], 2016, 20(38): 5745–5751.
- XU Y Q, LIU Y J, LI R X, *et al.* *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*[J], 2016, 20(38): 5745–5751.
- [46] ZHANG Y S, KHADEMHOSEINI A. *Science* [J], 2017, 356: eaaf3627.
- [47] TAN Y J, TAN X, YEONG W Y, *et al.* *Scientific Reports*[J], 2016, 6: 39140.
- [48] WANG F, LI Z, KHAN M, *et al.* *Acta Biomaterialia*[J], 2010, 6: 1978–1991.

- [49] SONG K, LI L, YAN X, *et al.* Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications[J], 2017, 70: 231–240.
- [50] ZHANG L, YUAN T, GUO L, *et al.* Journal of Biomedical Materials Research Part A[J], 2012, 100: 2717–2725.
- [51] DEVOLDER R J, KIM I W, KIM E S, *et al.* Tissue Engineering Part A[J], 2012, 18: 1642–1651.
- [52] CHEN W, TONG Y W. Soft Matter[J], 2011, 7: 11372.
- [53] NGUYEN B B, MORIARTY R A, KAMALITDINOV T, *et al.* Journal of Biomedical Materials Research Part A[J], 2017, 105: 1123–1131.
- [54] OLMOS BUITRAGO J, PEREZ RA, EL-FIQI A, *et al.* Acta Biomaterialia[J], 2015, 28: 183–192.
- [55] PEREZ R A, KIM M, KIM T H, *et al.* Tissue Engineering Part A[J], 2014, 20: 103–114.
- [56] YEO M, LEE J S, CHUN W, *et al.* Biomacromolecules[J], 2016, 17: 1365–1375.
- [57] KOH R H, JIN Y, KANG B J, *et al.* Acta Biomaterialia[J], 2017, 53: 318–328.
- [58] CHOI B, KIM S, LIN B, *et al.* Acta Biomaterialia[J], 2015, 12: 30–41.
- [59] YANG K, SUN J, WEI D, *et al.* Journal of Materials Chemistry B[J], 2017, 5: 8707–8718.
- [60] GAUDET I D, SHREIBER D I. Biointerphases[J], 2012, 7: 25.
- [61] DU M, CHEN B, MENG Q, *et al.* Biofabrication[J], 2015, 7: 044104.
- [62] COLLIN E C, GRAD S, ZEUGOLIS D I, *et al.* Biomaterials[J], 2011, 32: 2862–2870.
- [63] YAO L, FLYNN N. The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society[J], 2018, 18: 1070–1080.
- [64] AMER L D, HOLTZINGER A, KELLER G, *et al.* Acta Biomaterialia[J], 2015, 22: 103–110.
- [65] CHEN H, ZHANG Y J, DING P, *et al.* ACS Applied Bio Material[J], 2018, 1: 1408–1415.
- [66] YUAN Y, LIANG G. Cheminform[J], 2014, 45(15): 865–871.
- [67] MANETSCH R, KRASIŃSKI A, RADIĆ Z, *et al.* Journal of the American Chemical Society[J], 2004, 126(40): 12809–12818.
- [68] AGARD N J, PRESCHER J A, BERTOZZI C R. Journal of the American Chemical Society[J], 2004, 126(46): 15046–15047.
- [69] WHITE E H, MCCAPRA F, FIELD G F. Journal of the American Chemical Society[J], 1960, 85(3).
- [70] XU G, WANG X, DENG C, *et al.* Acta Biomaterialia[J], 2015, 15: 55–64.
- [71] LEE H J, FERNANDES-CUNHA G, PUTRA I, *et al.* ACS Applied Materials & Interfaces[J], 2017, 9(28): 23389–23399.
- [72] KUO K C, LIN R Z, TIEN H W, *et al.* Acta Biomaterialia[J], 2015, 27: 151–166.
- [73] MITRA D, YASUI O W, HARVESTINE J N, *et al.* Biotechnology Journal[J], 2018, 14(3): 1700763.
- [74] WISE J K, ALFORD A I, GOLDSTEIN S A, *et al.* Tissue Engineering Part A[J], 2014, 20: 210–224.
- [75] WISE J K, ALFORD A I, GOLDSTEIN S A, *et al.* Connective Tissue Research[J], 2016, 57: 516–525.
- [76] WANG L, RAO R R, STEGEMANN J P. Cells Tissues Organs[J], 2013, 197: 333–343.
- [77] WANG L, STEGEMANN J P. Biomaterials[J], 2010, 31: 3976–3985.

(编辑 惠 琼)