

组织工程和给药技术中的三维光制造

Rúben F. Pereira^{1,2,3,4} and Paulo J. Bártolo^{1,5,6*}

摘要: 组织工程中最有前景的方法就是将生物材料、细胞和生物活性分子结合加入人工的模拟环境,用以准确地模拟人体组织修复环境,并刺激组织修复和再生。这个环境必须在细胞或亚细胞尺度上模拟出尽可能接近原生细胞外基质的主要特性,只有这样此方法才会在临床应用上有效。光制造技术通过多层工艺,如对光敏预聚物的选区光交联反应,构建包含精确结构和多相材料组合的环境。细胞和治疗分子可以包含在初始水凝胶前体的溶液中,并加工成三维(3D)结构。近来,光制造也已被开发用来动态调节水凝胶的实时特性,加强控制细胞寿命和生物活性物质的传递。本文聚焦于利用3D光制造技术为组织再生和给药技术生产先进结构的相关研究,同时介绍了目前最先进的光制造技术,重点放在控制细胞生物活性因子分布形式的工作原理和生物制造方法上。因光制造技术具有工艺快速、时空控制、高分辨率和高精度等特性,故其在复杂的3D结构设计中扮演着重要角色。这种技术同样能够为组织再生构建适当的环境,并可调节治疗方法的实施状况。

关键词: 三维光制造, 生物材料, 组织工程, 给药

1 前言

最近二十年间,组织工程研究在很多领域取得了巨大进步(如隔离新细胞源技术、高度仿生的先进生物材料合成技术、新药发现和高产生物制造技术),这些技术促进了新型临床疗法的发展,使组织损伤修复和再生达到了更好的临床疗效[1–7]。目前在组织工程和再生医

疗领域的治疗方法大致可分为三大类:①基于细胞的治疗方法;②无细胞或细胞接种支架疗法;③载细胞结构/基质植入法(图1)。

在细胞疗法中,自体的、同种异体的或异种的细胞从病人(自体)或捐赠者(同种异体、异种)获得,然后经过一系列处理步骤(如细胞分选、体外扩增)后植入损伤部位[8]。尽管这种疗法相对简单,但是植入细胞后,在不降低细胞活性的情况下,要在某段时间内维持细胞在特定位置却非常困难。或者,将细胞置于聚合物载体上,这样细胞可能无法转移,从而延长了细胞在目标位置的停留时间,提高了临床疗效[9]。根据组织损伤尺度和其生物力学特性,植入支架可能是最好的选择,因为它为细胞提供了一个临时环境,用以引导植入细胞或宿主细胞的渗透、定殖、附着以及增殖扩散,并刺激新细胞外基质的合成[1, 10]。为了适当刺激修复过程,支架必须满足一系列传统的物理化学、机械和生物要求,包括生物相容性、生物可吸收性、无细胞毒性、适当的刚度、弹性和表面特性[1, 10, 11]。支架特性主要由所选择的生物材料的自然特性和化学性质决定。天然以及合成的聚合物是最常用的生物材料,用其制造的支架具有广泛的生物活性、仿生性、生物降解性以及细胞互动特性[12]。在某些应用如骨或骨软骨组织工程中,聚合物支架通常用生物活性陶瓷(如羟磷灰石和 β -磷酸三钙)加强,以达到更好的矿化和植入效果[13, 14]。除了生物材料的自然特性,生物制造技术也决定了支架在宏观、微观以及纳米尺度上的主要特性(如孔的大小、形状和

¹ Centre for Rapid and Sustainable Product Development (CDRsp), Polytechnic Institute of Leiria, Marinha Grande 2430-028, Portugal; ² Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S), Universidade do Porto, Porto 4200-393, Portugal; ³ Instituto Nacional de Engenharia Biomédica (INEB), Universidade do Porto, Porto 4150-180, Portugal; ⁴ Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Porto 4050-313, Portugal; ⁵ School of Mechanical, Aerospace and Civil Engineering, University of Manchester, Manchester M13 9PL, UK; ⁶ Manchester Institute of Biotechnology, University of Manchester, Manchester M1 7DN, UK

* Correspondence author. E-mail: paulojorge.dasilvabartolo@manchester.ac.uk

Received 5 March 2015; received in revised form 25 March 2015; accepted 25 March 2015

© The Author(s) 2015. Published by Engineering Sciences Press. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

引用本文: Rúben F. Pereira and Paulo J. Bártolo. 3D Photo-Fabrication for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Engineering*, DOI 15302/J-ENG-2015015

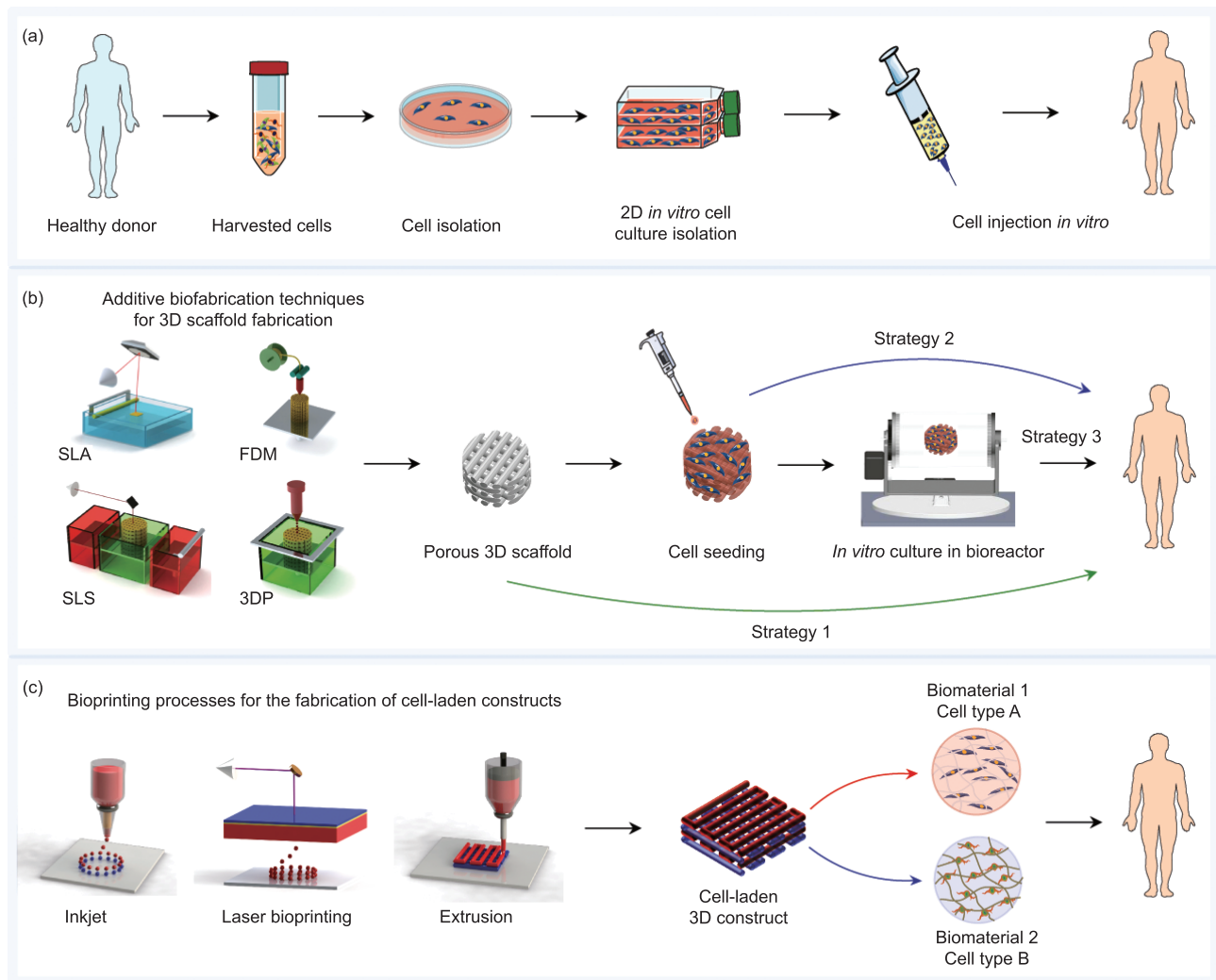


图 1. 组织工程和再生医疗中的主要治疗方法。(a) 细胞疗法; (b) 支架疗法; (c) 载细胞三维结构植入疗法。在支架疗法中, 支架可以无细胞植入 (方法 1), 接种细胞后植入 (方法 2), 或细胞体外培养后植入 (方法 3)。为精简起见, 本文不再介绍传统生产三维支架的生物制造技术。

互连通性、内部架构、微观和宏观的孔隙率、表面形貌以及孔的空间分布), 这些特性强烈影响着体外细胞的行为和体内组织的形成 [15–17]。迄今为止, 已有多种生物制造技术可以为支架疗法生产二维 (2D) 和三维 (3D) 基体。传统的生物制造技术, 如溶剂浇铸法、冷冻干燥法或气体发泡法, 仍然应用于多种生物材料的多孔支架制造中。由于这些方法简单、成本低且不需要复杂的器械, 它们得到了持续的应用。然而, 由于它们对支架内部结构 (如孔隙率、孔径、孔的空间分布和连通性) 的控制有限, 严重限制了生物材料在整个支架的空间分布 [10, 18]。另外一个重要的限制是, 由于不相容溶剂的存在、漫长的时间以及严酷的环境条件, 活细胞和信号分子无法在制造过程中存活 [18]。与这些技术相反, 生物增材制造技术, 如光固化 (SLA)、选区激光烧结 (SLS)、熔融挤出或熔融沉积成型 (FDM) 以及喷墨打印或 3D 打印 (3DP), 使支架的制造具有更高的精度、分辨率和可重复性 [1, 19]。通过这些技术, 三维支架被一层一层地

制造出来, 显著地增加了制造结构的复杂性和不均匀性。增材制造技术还可以和医疗影像系统集成使用, 并能更好地控制支架特性。然而, 这些技术依然存在许多不足, 如细胞接种的不均匀性、血管化不足以及异类组织生长等问题 [20]。尽管如此, 载细胞基体植入疗法在解决细胞疗法和支架疗法的限制方面却很有前景, 因为它可以在不同长度尺度下直接构造出多样化的三维环境 [21]。在这些治疗方法中, 一组能够处理冗余生物材料、细胞和信号分子的生物制造技术被用来构造特定的原生细胞外基质环境, 这些环境不仅在结构方面, 还在生化方面都很接近目标组织中的环境 [20, 22]。这些技术被称为生物打印, 是组织工程中的重要工具。它们通过在基板 (“生物纸张”) 上逐层沉积预聚物溶液、悬浮细胞、细胞团块以及生物活性分子 (“生物墨水”) 来快速制造复杂结构 [18, 22]。生物打印已在高度多样性载细胞结构的制造中得到成功应用, 这些结构同时也充当支架为治疗分子的传递提供细胞和平台 [23]。

目前,用于制造生物医学应用的三维结构的生物制造技术中,光制造技术因其优异的分辨率、精确度及其在三维环境中对生物材料、细胞和治疗分子的精确控制,越来越受到关注 [24]。在光制造技术中,如光聚合、光掩膜、光降解等众多光介导反应被用于促进水凝胶合成(光聚合)和/或改变水凝胶网络的生物化学或机械性能(光掩膜和光降解)。光制造技术的光介导反应中,光敏聚合物在细胞和生物活性分子存在的情况下,可在原位进行交联反应,极大地控制了水凝胶在时间和空间上的成形过程 [25, 26]。这些技术的吸引力还在于它们可以在微米级分辨率下实时控制水凝胶特性(如改变凝胶交联密度、局部地断开感光键,以及模仿生物功能性),进一步控制细胞行为(如迁移和增殖)和生化配体的释放 [24, 27, 28]。以上侧重于近期组织再生和给药技术领域 3D 光制造技术的发展。下面介绍感光系统的关键因素,重点放在光聚合方式、光引发剂和向聚合物链中引入活性官能团的方法上,最后重点介绍用于设计制造生物医学应用的三维结构的光制造技术。

2 生物制造光敏系统的设计

感光系统可以定义为基于聚合物的制剂,通过一系列物理、化学或力学性能的改变,对外部光刺激做出响应。光聚合和光降解反应通常用于引发感光系统的变化并生成三维结构。

光聚合是经过深度探索的方法之一,它在紫外线(200~400 nm)或可见光(400~800 nm)下,通过曝光由不饱和预聚物、光引发剂和其他物质如细胞和治疗分子组成的光敏系统,来得到共价交联水凝胶 [25, 29]。利

用光能可以在生物相容反应和少量初始自由基的条件下,原位快速形成水凝胶(在几秒到几分钟的时间内发生)。这种快速成型方法在相关长度尺度下使凝胶的成形控制更加简单 [25, 30, 31],其分辨率和对光的时空控制,不仅在诱导水凝胶交联反应上很重要,而且在促进感光键的断开 [32],向三维环境引入特定的生化官能团 [27],以及协助细胞的生物墨水打印 [33] 上也很重要。

2.1 光聚合反应

用作生物相容水凝胶合成的光聚合反应,可以分为自由基引发的链聚合反应和生物正交点击反应 [34]。

基于(甲基)丙烯酸酯官能化的预聚合物,自由基光聚合反应通过链增长机制发生反应(图2),它是生产水凝胶最常用的方法。入射光能(光子)被光引发剂吸收,触发了自由基的形成,自由基与存在于预聚物中的乙烯基反应,促进了聚合物链之间的化学交联 [35]。该聚合反应可以用多种天然和合成聚合物合成水凝胶,从而使水凝胶具有可调的力学、降解和生物特性。水凝胶也可以用一种相对简单和可重复的方法,在细胞吸附部分和降解位置,进一步官能化 [36, 37]。然而,自由基引发的链增长聚合反应有几个限制,其中包括:相对差的交联动力学控制,氧阻聚,存在可能和生物基质反应的未反应双键,以及由于无规律链聚合反应而存在的聚合物不均匀性 [30, 34, 38, 39]。另一方面,生物正交点击反应的特征在于正交反应性和聚合反应中的逐步增长机制,使水凝胶的制造以最小的缺陷在结构上具有统一性 [30, 34, 38, 39]。而且,点击化学对水和氧气不敏感,可在温和的反应条件下进行,与自由基聚合反应相比,效率更高,选择性更强,动力更强 [27, 39, 40]。

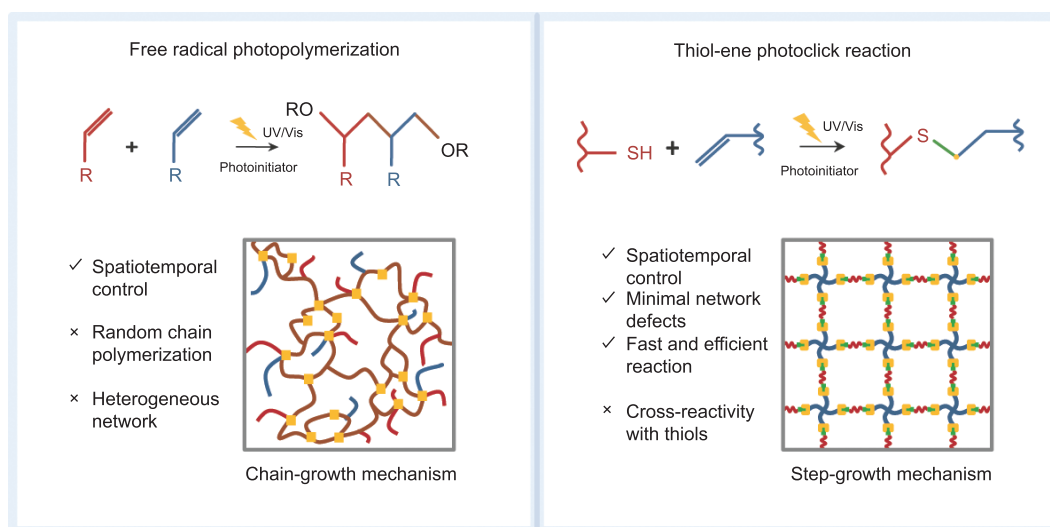


图 2. 用于组织工程制备水凝胶的光介导聚合反应。

在众多的现有生物正交点击方法中, 巯基-降冰片烯(硫醇烯)光点击反应已成为一个强大的手段, 用以制备生物相容性水凝胶。此反应是在少量光引发剂条件下, 降冰片烯封端的多面官能化大分子单体和含巯基交联剂之间的光介导正交反应 [34, 39–41]。紫外光(UV)或可见光照射下, 在官能化的预聚物(如降冰片烯官能化的四臂聚乙烯(乙二醇)(PEG))中, 硫醇烯反应快速促进自由基介导的加成巯基(如双半胱氨酸肽和二硫苏糖醇)到碳碳双键中的反应, 得到硫醚键, 同时不对封装细胞造成毒性作用(图2) [27, 42, 43]。和自由基聚合反应类似, 硫醇烯反应由光化学控制, 并使可降解基质金属蛋白酶(MMP)的侧基和/或吸附性多肽序列局部共价结合, 加强了对水凝胶降解、细胞寿命和细胞基质相互作用的控制 [27]。自由基介导的巯基-降冰片烯光聚合可以在无细胞和载细胞水凝胶上进行, 用来改变凝胶内的生物力学和生物化学性质 [44]。

2.2 细胞相容的光引发剂

合适的光引发剂的选择是保证足够聚合率的首要条件, 并可避免对包埋细胞和周围组织的细胞毒性作用。选择光引发剂时, 应该考虑其关键特性, 包括水溶性、稳定性、吸收光谱、摩尔吸光系数以及产生自由基的效率 [25, 43]。当前可用的光引发剂可分为两大类: 自由基或阳离子 [45]。自由基光引发剂具有优良的生物相容性, 是最常用的光引发剂。另一方面, 使用阳离子光引发剂会产生质子酸, 使得这些光引发剂无法在生物医学领域中广泛应用 [25]。根据自由基的产生机理, 自由基光引发剂可以进一步分为光致裂解的光引发剂(I型)或双分子光引发剂(II型)。在光照射下, I型光引发剂(如苯偶姻衍生物、苯甲基缩酮、苯乙酮衍生物, 羟基烷基苯和酰基膦氧化物)吸收入射的光子, 并分解成两种基本的自由基, 然后引发交联; 而II型光引发剂(如苯甲酮、樟脑醌和噻吨酮)从一个共引发剂中得到一个氢原子, 然后为交联产生次级自由基 [43, 45]。虽然I型引发剂引发效率较好, 它通常也是第一选择 [39], 然而最近用于可见光介导聚合反应的II型引发剂也持续受到关注(表1)。光介导聚合作用在细胞封装中的主要问题在于, 其光引发剂产生的自由基有潜在的细胞毒性。光聚合作用期间, 自由基可以通过直接接触或者形成活性氧与细胞成分反应(如细胞膜、核酸或蛋白质), 这可能会危及包埋细胞的活性, 甚至导致DNA损伤 [26, 46]。已有研究详细说明了光引发剂对原代细胞和细胞系的毒性作用, 这种毒性作用强烈地依赖于光引发剂的种类和浓度、曝

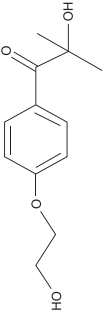
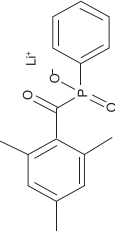
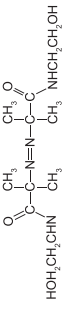
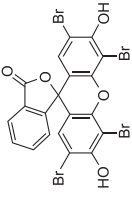
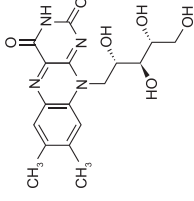
光时间以及光强度 [26, 46–49]。Irgacure 2959 (1-[4-(2-羟乙氧基)-苯基]-2-羟基-2-甲基-1-丙烷-1-酮)是最常用的光引发剂, 拥有适中的水溶性和低细胞毒性。然而, 它的低摩尔消光系数在UV-A光谱范围内, 以及其较低的引发效率, 促进了其他光引发剂研究的发展, 改善了生物相容性和/或引发效率, 如2, 2'-偶氮[2-甲基-N-(2-羟乙基)丙酰胺](VA-086)和锂苯基-2, 4, 6-三甲苯基甲酰亚膦酸盐(LAP) [47, 50–52]。和这项研究相类似, 为了减轻紫外光对封装细胞潜在的有害作用, 研究人员集中研究了构建含有对可见光敏感的引发剂(如樟脑醌、核黄素、曙红-Y)的光聚合系统 [43–53]。

2.3 为光介导反应设计生物材料

为光介导的反应设计水凝胶前体, 包括光聚合、光降解和光掩膜的设计, 考虑了许多决定水凝胶加工及性能的物理化学、力学和生物特性, 如图3所示 [29, 59]。

由于水凝胶可用交联方式的多样性以及其与天然细胞外基质(ECM)某些特性的相似性, 它在组织工程和给药中已被广泛探索应用 [31, 60]。拥有细胞相容性的水凝胶可以使用天然或合成的聚合物材料制备 [60]。天然的聚合物能够保留ECM的生化相似性, 并拥有生物识别、细胞触发降解和重建特性; 然而, 它们还存在几个问题, 即复杂的提纯工艺、批与批之间的差异性、有限的力学性能和潜在的致免疫性 [35]。另一方面, 由于合成聚合物的性能可控, 具有较好的力学性能, 同时还可能得到性能可调的多功能水凝胶, 它在现代医疗疗法中占据中心位置 [61]。但是, 单一的合成聚合物通常表现出有限的生物相容性、生物降解性和细胞相互作用性 [35], 为避开这些局限性, 通常将合成聚合物在一些生物基序(如细胞-蛋白水解域和/或细胞黏附位点)上进行官能化, 这可以控制水凝胶的降解、细胞寿命和组织的重建 [27]。虽然无论是天然的还是合成的聚合物, 在它们的化学结构中都是一些官能团(如COOH, NH₂和OH), 但是它们大多不包含光反应性基团, 这就阻碍了光介导反应的发生 [62]。因此, 为光介导化学反应设计水凝胶前体主要是对包含反应性侧基(如丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯或降冰片烯)的预聚物进行化学改性, 这些化学改性必须根据光聚合方法和其内在的细胞毒性、反应性以及生物降解性进行选择。加入聚合物主链中的反应基数目和类型同样应该仔细优化, 从而防止聚合物的性质急剧改变(如亲水性、电荷、水溶性、弹性、网格尺寸和扩散性), 因为这些性能可能最终削弱水凝胶的细胞相容性、生物降解性和生物活性。下面我们简要介绍一下最常见

表 1. 光制造中最常用的光引发剂和目前用作细胞封装的光聚合系统实例

Name	Type	Chemical structure	Photopolymerizable system				Reference	
			Photopolymerization reaction	Irradiation conditions	Hydrogel precursor	Encapsulated cells		Cell viability
I2959	I		Free-radical polymerization Thiol-ene click chemistry	UV light (360–480 nm), 6.9 mW·cm ⁻² , 15 s UV light, 10 mW·cm ⁻² , 30 s	Gelatin methacrylate, 0.5% (w/v) I2959 HA-norbormene, DTT, 0.05 wt.% I2959	NIH 3T3 fibroblasts (5 × 10 ⁶ cells·mL ⁻¹) hMSCs (1 × 10 ⁷ cells·mL ⁻¹)	75%–92%, 8 h post- encapsulation 9% (1 d) and 88% (3 d) post- encapsulation	[54] [55]
LAP	I		Free-radical polymerization Thiol-ene click chemistry	Visible light (405 nm)/UV light (365 nm) 10 mW·cm ⁻² , 5 min UV light (365 nm), 5 mW·cm ⁻² , 2 min	PEGDA, 2,2/ 0.22 mmol·L ⁻¹ LAP PEG-norbormene, 0.05 wt.% LAP	Human neonatal fibroblast (1 × 10 ⁶ cells·mL ⁻¹) hMSCs (5 × 10 ⁶ cells·mL ⁻¹)	>95%, 24 h post- encapsulation Cells survive, 14 d post-encapsulation*	[51] [36]
VA-086	I		Free-radical polymerization	UV light (365 nm), 2 mW·cm ⁻² , 5 min UV light (365 nm), 4 mW·cm ⁻² , 1800 mJ·cm ⁻²	Alginate Methacrylate, 0–1.5% (w/v) VA-086 Gelatin methacrylamide, 20 mol% VA-086	Bovine articular chondrocytes (50 × 10 ⁶ cells·mL ⁻¹) HepG2 cells (1.5 × 10 ⁶ cells·mL ⁻¹)	>90%, 48 h post- encapsulation >95%, 24 h post- encapsulation	[47] [50]
Eosin-Y	II		Mixed mode (chain and step- growth reactions) [§] Thiol-ene click chemistry	Visible light (525 nm), 5 mW·cm ⁻² (7 min) / 100 mW·cm ⁻² (1.5 min) Visible light (515 nm), 10 mW·cm ⁻² , 4 min	PEGDA, Thiolated heparin, TEOA, 0.01 % Eosin-Y PEG4NB, TEOA, NVP, 0.1 × 10 ⁻³ mol·L ⁻¹ Eosin-Y	NIH 3T3 fibroblasts (2 × 10 ⁶ cells·mL ⁻¹) Human mesenchymal stem cells (5 × 10 ⁶ cells·mL ⁻¹)	>96% ~95%, 14 h post- encapsulation	[56] [43]
Riboflavin	II**		Free-radical polymerization Free-radical polymerization	Visible light: (780 nm femtosecond laser, followed by 1 min at 570 nm light) Visible light 400–500 nm), 300 mW·cm ⁻² , 120–600 s	PEGDA, TEOA, 200 μmol·L ⁻¹ riboflavin Methacrylated glycol chitosan/HA, 6 μmol·L ⁻¹ Riboflavin	Bovine aortic endothelial cells (1 × 10 ⁶ cells·mL ⁻¹) Auricular chondrocytes (2 × 10 ⁶ cells·mL ⁻¹)	>90%, after 24 h ^{§§} 60%–90%, 24 h post-encapsulation [#]	[57] [58]

Notes: Irgacure 651 (2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone); PEG4NB (poly(ethylene glycol)-tetra-norbormene); PEG (poly(ethylene glycol)); PEGDA (poly(ethylene glycol) Diacrylate); HA (hyaluronic acid); TEOA (triethanolamine); NVP (1-vinyl-2 pyrrolidone); hMSCs (Human mesenchymal stem cells); DTT (dithiothreitol); HepG2 (hepatocarcinoma cell line). *Quantitative data about cell viability is not available, but authors reported that cells survived and retain differentiation ability. **Riboflavin can form either singlet or triplet-excited states upon light absorption. †Authors state a predominance of thiol-ene reaction and negligible acrylate polymerization rates. ‡Cell viability was assessed by culturing cells in the presence of photopolymer extract solutions, instead of cell encapsulation. ††Depending on the irradiation time and presence of HA.

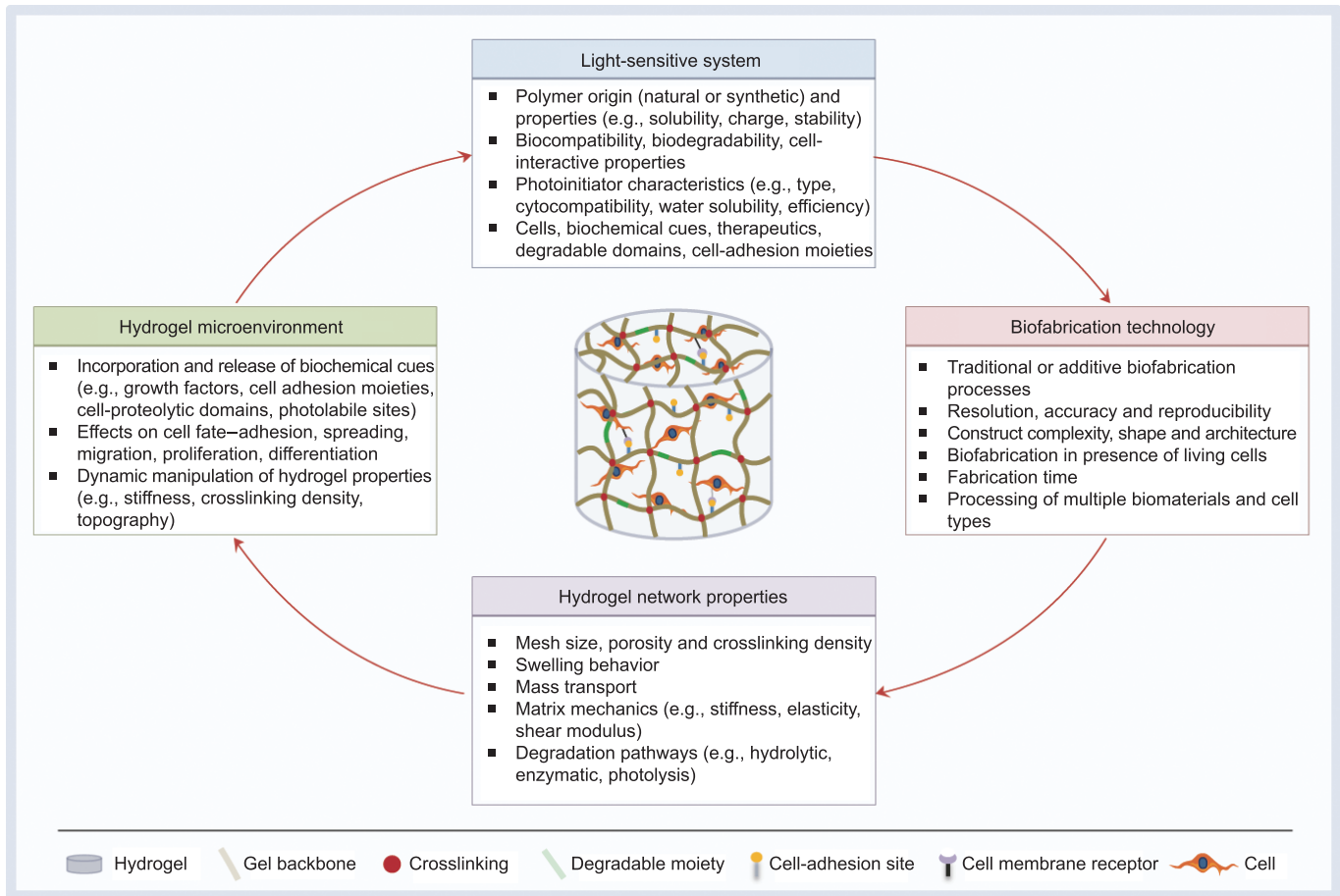


图 3. 光介导聚合反应中制备生物相容及生物降解水凝胶的设计考虑因素。

的反应基团和光介导反应中水凝胶前体的化学制备方法。

2.3.1 自由基聚合反应中的水凝胶前体

自由基聚合反应中水凝胶前体是通过把乙烯基团引入天然和合成聚合物的主链中合成的，并用丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、富马酸酯和乙烯酯进行化学改性（表 2）。丙烯酸酯具有最强的反应性，其次是乙烯酯、碳酸乙烯基酯、乙烯基氨基甲酸酯、甲基丙烯酸酯和富马酸酯衍生物 [63, 64]。虽然丙烯酸酯具有高反应动力和双键转化率，但毒性和皮肤刺激性仍然是其主要缺陷，阻碍了其在生物医学领域的应用 [64]。另一方面，由于甲基丙烯酸酯甲基基团的空间阻碍和自由基诱导稳定性，其反应性受到限制 [65]。皮肤刺激性可以通过消除双键，避免与蛋白质中氨基和巯基的非特异性反应得到解决。细胞毒性可以用替代单体解决，特别是基于乙烯酯的单体 [63, 65]。基于乙烯酯的光聚合单体是由 Heller 合成的，与用丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯改性的聚合物相比，在 MC3T3-E1 细胞系存在的情况下，表现出优异的生物相容性。研究人员还发现体外降解发生的强弱顺序是：乙烯酯 > 丙烯酸酯 > 碳酸乙烯基酯 > 甲基丙烯酸酯 > 乙

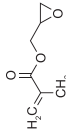
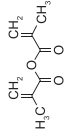

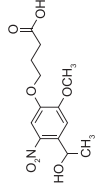
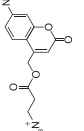
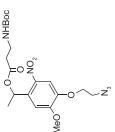
烯基氨基甲酸酯 [63, 65]。

聚合物的（甲基）丙烯酸酯化是一种最普遍的化学改性方法，它通过与甲基丙烯酸缩水甘油酯、甲基丙烯酸酐或丙烯酰氯作用进行反应而达到改性效果。根据聚合物化学特性和反应剂，在均质或非均质条件下，酯化反应主要依据聚合物的伯羟基团 [66]、羧基团 [67] 和胺侧基团 [54] 进行。因为天然聚合物具有亲水性 [47, 50]，均质条件是其改性的第一选择，但是反应剂在这种环境中容易水解。因此，另一种代替方法是将天然聚合物转换为一个四丁铵（TBA）盐，使其溶解在有机溶剂中 [68]，或在非均质环境下用混合溶剂降低反应剂的水解作用，同时又加强改性作用 [69]。

2.3.2 巯基点击聚合作用中的水凝胶前体

自由基介导的巯基反应同样需要带有反应基的天然或合成聚合物进行官能化。根据 Tasdelen 和 Yagci [41] 的研究，巯基共轭率是由烯烃的化学结构决定的，其与富电子的和 / 或过滤的烯烃的反应比缺电子的快，并根据以下顺序进行：降冰片烯 > 乙烯醚 > 烯烃 > 乙烯酯 > 烯丙醚 > 丙烯酸 > *N*-烷基马来酰亚胺 > 甲基丙烯酸酯 > 共轭

表 2. 光介导反应中水凝胶前体制备最常用的反应基团

Reactive group	Commercial Reagent	Chemical structure	Hydrogel precursors	Light-mediated reaction	Application	Reference
	Glycidyl methacrylate (GMA)		Hyaluronic acid	Free-radical photopolymerization	Tissue engineering and cell encapsulation	[69]
	Methacrylic anhydride (MA)		Glycol chitosan	Free-radical photopolymerization	Cartilage tissue engineering, cell encapsulation	[53]
			Gelatin	Free-radical photopolymerization	Tissue engineering, cell encapsulation and bioprinting	[50]
			Alginate	Free-radical photopolymerization	Cell encapsulation	[47]
Methacrylate			Hyaluronic acid	Free-radical photopolymerization	Cell encapsulation	[68]
			Tropoelastin	Free-radical photopolymerization	Tissue engineering and cell encapsulation	[74]
			Heparin	Free-radical photopolymerization	Growth factor delivery	[67]
			Hyaluronic acid	Free-radical photopolymerization	Drug delivery	[75]
			Dextran	Free-radical photopolymerization	Drug delivery	[66]
Acrylate			PEG	Free-radical photopolymerization	Cell encapsulation	[51]
	Acryloyl chloride		Hyperbranched polyester	Free-radical photopolymerization	Drug delivery	[76]
			4-arm PEG	Thiol-norbornene photopolymerization	Cell encapsulation and peptide photopatterning	[44]
Norbornene			Hyaluronic acid	Thiol-norbornene photopolymerization	Cell encapsulation and peptide photopatterning	[55]
			Gelatin	Thiol-norbornene photopolymerization	Cell encapsulation	[77]
			Gelatin methacrylamide, photodegradable PEG	Photodegradation	Photopatterning and cell manipulation	[32]
<i>o</i> -nitrobenzyl ester	Photodegradable (meth) acrylate units were synthesized from commercially available 4-(4-(1-hydroxyethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid)		Dextran functionalized with acrylate-modified <i>o</i> -nitrobenzyl moieties and dithiolated PEG	Photodegradation	Protein delivery	[78]
Coumarin	Amine containing coumarin azide*		4-armed PEG tetracarboxylic acid	Photodegradation	Tissue engineering and spatiotemporal patterning of cellular microenvironments	[72]
Nitrobenzyl/Coumarin	Amine containing coumarin azide*/ Nitrobenzyl azide**		PEG-DBCO, PEG-N ₃	Photodegradation	Protein delivery	[73]

Notes: PEG-DBCO (PEG tetra-dibenzocyclooctyne); PEG-N₃ (4-armed PEG tetraazide); BMP (bone morphogenetic protein). *Synthesized using commercially available 7-amino-4-methylcoumarin. **Synthesized from commercially available acetovanillone.

二烯。由于降冰片烯单体优越的反应性和理想的逐步增长聚合作用，它是光引发硫基反应最常用的反应基团。与降冰片烯的逐步增长聚合反应相反，由于丙烯酸酯基团和硫基耦合之间的竞争，像丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯这样的反应基团，会通过链条式和阶梯式增长聚合反应，形成水凝胶网络。然而，最近一项研究指出，硫基丙烯酸酯键的形成反应在丙烯酸酯基团的链增长均聚反应中占主导地位 [56]。

2.3.3 光降解和光掩膜中的水凝胶前体

光介导反应并不是只能建立聚合物链之间的化学键来诱导水凝胶的形成，它在促进交联的时空降解（如释放治疗剂和减少交联）和具有微米级分辨率的水凝胶实时诱导生化图像中非常具有吸引力。

目前为光降解设计水凝胶前体最常用的方法是基于含有硝基苄基醚基团（如 *o*-硝基苄基醚）的分子，这些基团在紫外光和低可见光区域中吸收光能发生光解，典型的波长范围是 280~450 nm [32, 70, 71]。然而，硝基苄基基团的光解产生一个亚硝基酮基团和一个羧酸基团，它们会和蛋白质中的胺基发生反应 [32, 72]。这个缺点最近通过使用香豆素作为光降解基团得到了解决；香豆素在单和双光子（2PP）照射下光解，得到低反应性的副产物乙醇 [72]。一种更简单的为光掩膜制备水凝胶前体的方法是，首先根据上述方法向聚合物主链中引入反应性官能团，接着这些可用的官能团（未反应的）在水凝胶形成之前被用作二次反应（如光介导的肽结合），从而避免了复杂和耗时的化学改性 [55]。在更复杂的方法中，水凝胶前体经过特别设计，其中包含光敏的、被封装的基团（如成骨蛋白-2 (BMP-2) 和用叠氮化物进行共价改性的 BMP-7），这些基团在水凝胶形成过程中保持不变（不进行反应）。一旦局部曝光，封装被解除，基团被激活，就可用以后续的生物分子反应 [28, 73]。虽然这种方法涉及附加的、复杂的化学反应，特别是封装基团的合成，但是它提供了一个工程环境，能保存微弱的生化信号，并使它们在特定时间内在凝胶内预定的位置进行反应。

3 三维光制造：从无细胞支架到时空上控制载细胞结构

三维光制造是由一组在感光系统中使用光能触发一系列化学反应的技术构成，包括单立体光刻和 2PP 立体光刻 [10]。另一种与之不同的方法，激光直写技术，如激光引导直写 (LGDW) 和改良激光诱导向前转移 (改良-

LIFT)，利用光能产生相应的辐射力或局部加热，使生物墨水喷向基板 [79, 80]。在这两种方法中，光制造通过应用在生物增材制造中的一种多步骤协议，从电脑实体模型开始，可以制造个性化、复杂的三维结构。该模型可以通过计算机辅助设计 (CAD) 和医学图像技术（如 CT 和磁共振）获得，后者可以得到患者特定的植入器官。这个模型被细分成 STL 文件，即用若干三角形平面表示这个三维模型，每个三角形平面定义该对象的部分外表面。最终，该 STL 模型被精确地均匀分割或者自适应分割成 25~100 μm 厚的薄层。均匀分割是指模型每层的厚度一致，而自适应分割是指每层的厚度随模型表面几何形状变化 [1, 19, 81]。

光制造技术目前有许多应用。例如，在溶液中诱导预聚物交联，以制造三维结构（“增模式”）；促进光部分的局部切割，从而在时空上控制聚合物网络破裂（“减模式”）；辅助生物墨水三维打印（“增模式”）；调整生物分子图形（“增模式”）。在以下章节中，我们描述了光制造技术的原理和方法，以制造三维结构，用于组织工程和给药。

3.1 单、双光子立体光刻

立体光刻法是一种生物增材制造技术，通过液态感光材料的选择性光引发固化反应，逐层制造三维实体对象。固化反应是由特定波长（紫外光、可见光或近红外）、强度和持续时间的入射光引发的，产生了两种不同的过程：单光子聚合或双质子聚合。虽然这些过程的化学原理相似，单光子聚合涉及单光子吸收，而在双质子聚合中，分子同时吸收两个具有较低强度的光子，激发到更高的单重态。分子同时吸收两个光子而电子激发的概率取决于入射光强度的平方，因此，双质子聚合可以实现更大深度和超快制造亚微米分辨率（约 200 nm）的三维结构 [45, 81]。

立体光刻工艺逐层制造三维结构，使用了两种基本曝光方法：①直接或激光写入；②基于掩膜的写入（图 4）。第一种方法采用聚焦激光束选择性诱导液态光聚合物进行聚合，而第二种方法则通过照射包含对应模型待建部分透明区域的图形化掩膜，来将整个图像转移到液态预聚物上。掩膜方法的主要优点在于预聚物的快速处理和低密度的光通量，因此避免了不期望的聚合反应 [81, 82]。

传统立体光刻设备由一个装载有预聚物的容器、一个用于建立模型的计算机控制平台、一个光源和一个将光投射在预聚物上的系统组成。在激光写入方法中，计

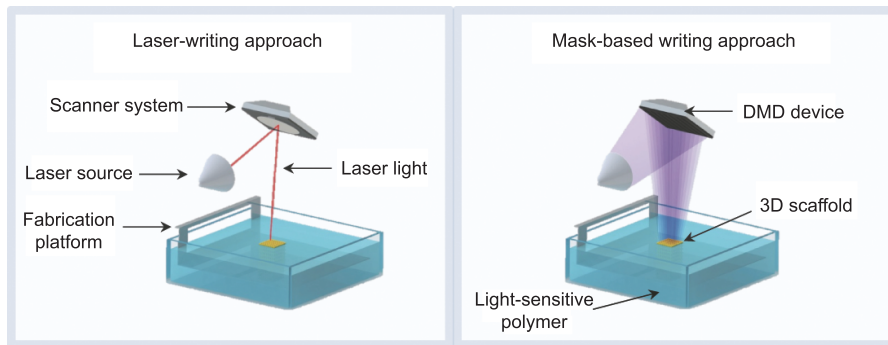


图 4. 立体光刻曝光方法示意图。

计算机控制的动态镜面系统引导并将激光束以逐点扫描的方式投射在光敏预聚物上。基于掩膜的方法则相反，它使用液晶显示面板和数字微镜器件 (DMDs) 快速生成具有精确对准的掩膜，从而将图形转移到预聚物表面上。一旦一层固化完毕，该平台则下降到聚合物容器中。在固化层上再次旋涂一层均匀的液态预聚物用于随后的曝光。有序地重复这些步骤直到完成三维结构的制造。通常需要后处理步骤来移除未聚合的预聚物。在一些应用中，甚至需要对结构加强后固化 [81, 82]。

尽管常规立体光刻相对于其他生物增材制造技术（如熔融挤出或喷墨印刷）具有更好的分辨率和精度，然而工程和光子领域的发展催生了更高分辨率的替代工艺，如微立体光刻和 2PP 立体光刻。在微立体光刻中，激光束被更精确地聚焦，将光斑直径大小降低到几微米，提高了工艺的分辨率。例如，在基于数字微镜器件的微立体光刻中，可达到的水平和垂直方向的分辨率分别是 $2\ \mu\text{m}$ 和 $1\ \mu\text{m}$ [83]。2PP 立体光刻是目前最先进的技术，可以利用近红外飞秒聚焦激光（波长约 $800\ \text{nm}$ ）诱导聚合，超高速加工三维亚微米分辨率 ($>65\ \text{nm}$) 结构 [84]。在双质子聚合中，聚合可发生在材料的表面之下，但由于激发分子数量随着与该区域距离的增加而快速衰减，所以聚合仅局限于飞秒激光的焦点内。因此，2PP 立体光刻技术可以实现三维环境中聚合反应的精确控制 [84]。虽然 2PP 立体光刻系统具有诸多优点，却由于其价格昂贵，并

且只能实现单一材料加工，阻碍了其在多材料结构制造上的应用 [45, 79]。为了规避这些限制，Bártolo 等 [85] 开发了一种基于掩膜的多光子多材料立体光刻系统，命名为微立体热光刻 (μSTLG)。这个系统可以在 3 种不同的模式下工作，单独或同时使用紫外和近红外辐射效应产生聚合自由基 (图 5)。该系统包括一个多容器结构，可以加工多材料结构，而不是一次处理一种材料 [79, 86, 87]。基于投影的立体光刻代表了传统立体光刻技术的另一转变，其中由数镜装置生成的二维图形通过一个透明的非附着板投射在液态树脂中。在这一步骤中，支撑平台骤降到树脂中，从而使结构在光照射时不暴露于氧中，显著地削弱了氧的抑制作用 [81, 88]。

最近，Tumbleston 等 [89] 对传统立体光刻进行了新的开发，使其可以快速并连续制造三维结构，同时分辨率低于 $100\ \mu\text{m}$ 。这一工艺被称为连续液体界面发生技术 (CLIP)，通过紫外透明、可渗氧的窗口，将紫外光数字处理成像单元生成的一系列连续图像投影到待建物体上。可渗氧窗口可以形成一个含氧“死区”，即

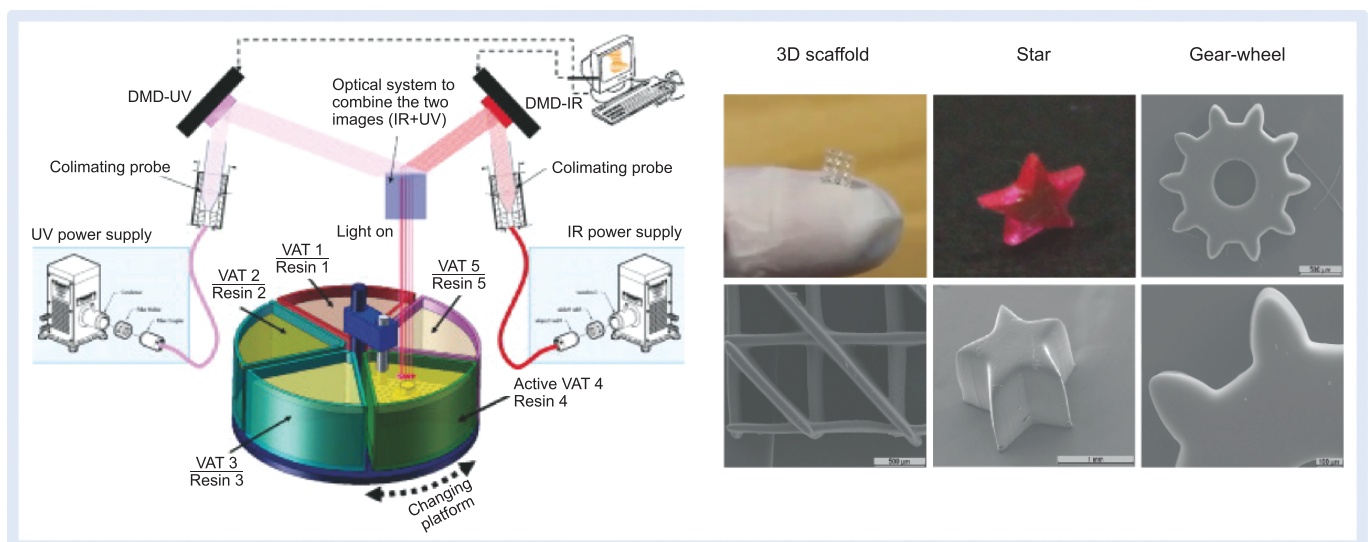


图 5. 微立体热光刻系统及其制造的 3D 结构实例。

构建窗口与交联结构表面之间的一层未固化液体薄层。该未固化液体薄层（在几十微米的范围）的厚度可以通过优化运行参数调节，以防止该结构附着到透明窗口上，并且允许在制造过程中连续地从容器中提出对象物体。从树脂容器中提出物体时产生的吸力可以连续地更新光敏聚合物的结构表面，消除中间耗时的重新涂层和重新定位操作。由于切片厚度不影响制造速度，CLIP 可以快速制造光滑结构，而不增加制造时间，这在常规光固化中是不可能的。CLIP 的分辨率和快速制造特点，对临床相关尺寸的复杂工程结构和用于生物医学的复杂结构十分具有吸引力。

3.1.1 立体光刻用于支架疗法

具有复杂微结构的三维支架制造是立体光刻技术在生物医学领域中探索最多的应用之一。在支架疗法中，立体光刻法被应用于生产可直接植入病变部位或预先接种细胞以备后续植入的支架。由于预聚物溶液既不包含活细胞，也没有治疗分子，可加工生物材料的范围不仅局限于天然的和合成的水凝胶 [90–92]，而且还包括可生物降解的热塑性聚合物，如丙烯富马酸酯（PPF）[93]，聚（ ϵ -己内酯）（PCL）[94]，聚（D, L-丙交酯）（PDLLA）[95]，和聚（三亚甲基碳酸酯）（PTMC）[96]。在修饰了光反应性基团后，这些预聚物通常与反应性（如富马酸二乙酯 [DEF]）或非反应性（如碳酸亚丙酯）的稀释剂混合，以降低黏度，并能够增强控制交联度和支架的机械性能 [81, 96, 97]。另外，为了制造能够增强生物降解性和生物相容性的结构，无溶剂方法也被用于减少不可降解的稀释剂的使用 [90, 95]。通常，将 Orasol 橙色染料的残留部分加入树脂制剂中以精确地控制光进入液态预聚物的穿透深度 [96, 98]。

大多数涉及非细胞支架的立体光刻的研究都致力于评估开发树脂的适用性和细胞毒性方面，而不是证明其在体内的功效 [90, 93, 95, 97, 99, 100]。Leigh 等 [90] 开发了一系列抑制剂和无溶剂的 PEG 基树脂，并展示了其使用微立体光刻设备加工多孔三维支架的过程。培养 1 周后发现，该支架能够为人骨髓间充质干细胞的附着和增殖提供支撑。在一项类似的研究中，立体光刻制造的基于三甲基丙烯酸 PTMC 树脂的柔性支架被用于软骨组织工程 [96]。在 6 周的培养时间下，牛软骨覆盖所述支架的表面，分泌硫酸化糖胺聚糖和纤维状胶原蛋白，使得所述结构压缩模量显著增加。最近，Gonçalves 等 [101] 使用富马酸作为光反应性基团，通过生物基脂族二酸（琥珀酸、己二酸和癸二酸）和两种不同的二醇（丙二醇和二甘醇）缩聚，合成了一系列生物基不饱和聚酯。细胞

相容性树脂的配方成功地应用在微立体光刻系统的三维支架中。

尽管这些工作证明了三维支架支持细胞生存的能力，但它仍缺乏在合成聚合物网络中生物功能性的研究，而这仍是细胞最优引导和新组织形成的一个重要限制。为了解决这些问题，三维支架的表面可以用细胞黏接性多肽或磷酸钙型涂料进行处理，以改善细胞黏附，并将其整合到宿主组织中 [102, 103]。最近的一项研究表明，磷酸钙涂层表面修饰的多孔 PPF 支架结合重组的人骨形态蛋白-2 的输送是促进体内骨骼愈合的有效途径 [102]。Elomaa 等 [104] 采用不同的方法，研究 ϵ -己内酯与 L-丙氨酸衍生的缩酞酸肽的共聚，以调整合成聚合物的性质。缩酞酸肽的引入增强了亲水性、水解降解和三维支架的抗压强度，同时不会损害接种在光交联膜上细胞的活力、增殖和分化。用于立体光刻工程的光聚合天然聚合物是克服合成聚合物与细胞有限交互性和避免昂贵、昂贵的表面改性的替代途径之一。Gauvin 等 [105] 证实了基于掩膜的立体光刻工艺制造基于明胶甲基丙烯酸酯的复杂多孔支架的可行性，而明胶甲基丙烯酸酯自然地包含了细胞黏附位点和可降解基团。动态接种的人脐静脉内皮细胞（HUVECs）在支架上黏附和增殖，并保持表型特征。

对于类似骨头这种利用多相组合物来承载组织的应用，通常用类陶瓷材料加固热塑性聚合物。这种搭配不但结合各材料的最佳特性，而且更重要的是能够仿造骨组织有机和非有机相的支架。科学家特别研究了陶瓷颗粒对预聚合物黏度和三维支架生物活性的影响 [106–108]。例如，有人将生物活性玻璃 S53P4 和甲基丙烯酸酯化的 PCL 预聚物相结合，来制造具有螺旋二十四面体孔隙网络架构的三维支架。生物活性玻璃均匀地分散在整个支架中，使得磷酸钙可以沉积在支架表面，刺激成纤维细胞的增殖 [107]。其他通过立体光刻制造陶瓷支架的生物制造方法也有一些报道。一般情况下，这些方法包括聚合物/陶瓷浆的聚合，随后除去聚合物（热或溶解处理），并烧结 [88]。

2PP 立体光刻是一项有吸引力的技术，它使用天然和合成聚合物来制造三维支架，具有更高的分辨率 [92, 109–112]。Kufelt 等 [110] 利用 2PP 立体光刻技术，使用透明质酸和聚乙二醇二丙烯酸酯来制造三维支架。为了证明相关因子传递这一搭配潜力，他们利用上表皮生长因子结合官能化的透明质酸，评估上表皮生长因子的释放对细胞密度的影响。在一个类似的工作中，将明胶用甲基丙烯酰胺侧基化学改性，随后加工成三维支架，能够促进间质干细胞的黏附、增殖和分化 [92]。尽

管人们对 2PP 立体光刻的兴趣日益增加,合适的预聚物和双光子光引发剂的数量仍然是这项技术的主要壁垒 [84]。

在其中一个证明立体光刻制造三维支架用于生长因子传输的例子中, Lee 等 [16] 用 PPF/DEF 光聚合物和 BMP-2 聚乳酸共乙醇酸 (PLGA) 微球这一配方合成树脂, 并采用微立体光刻系统聚合。为了评估体内骨的形成, 由微立体光刻或颗粒状浸出/气体发泡制造的含 BMP-2 的支架被植入大鼠的缺损颅骨中。结果表明, 在植入 11 周后, 在支架修复的缺损部位形成了大量新骨, 这揭示了生长因子释放的积极效果, 以及生物制造技术对骨愈合的影响 (图 6)。后来, 这个研究小组报道了载有 BMP-2 的 PLGA 微球的 PPF 支架的优越性能, 并将人脂肪干细胞接种在支架上, 以帮助大鼠颅骨内无细胞支架上骨的形成 [113]。在另一项研究中, 使用 rhBMP-2 和磷酸钙涂覆多孔三维 PPF 支架, 并对骨缺损的兔子颅骨模型在体内骨再生能力进行了为期 6 周的评估 [101]。结果表明, rhBMP-2 释放和涂覆磷化钙 (特别是镁取代的 β -磷酸三钙和羟基磷灰石) 之间的协同效应促进了新骨的形成。立体光刻法也被用于制造给药应用中的可生物降解 PTMC 网络 [114]。将富马酸单乙酯官能化的 PTMC 低聚物与亲水性 *N*-乙烯基吡咯烷酮 (NVP) 和疏水乙烯酯 (VAc) 在不同的比例下进行共聚, 以获得不同亲水性的网络结构。PTMC 网络作为模型药物, 载有维生素 B12, 通过紫外曝光进行交联反应。体外释放研究表明, PTMC 网络可以在 23 周中持续释放维生素 B12, 而释放动力可以通过改变亲水性和聚合物网络的交联密度来控制。

由于其独特的分辨率和创建小型器件的能力, 立体光刻被广泛应用于制造通过刺入皮肤传递药物的微针。Gittard 等 [115] 结合 2PP 立体光刻和聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 微复型技术, 用聚乙二醇 600 二丙烯酸酯、硫酸庆大霉素和 Irgacure369 作为光聚合引发剂组成的光敏聚合物制造微针阵列。首先, 2PP 立体光刻被用来创建实体微针阵列, 这些微针阵列用于随后 PDMS 微成型工艺的凹模具。然后, 用 PDMS 模具通过复型和固化光敏聚合物从而得到微针阵列。该微针底部直径 $150\ \mu\text{m}$, 长 $500\ \mu\text{m}$, 尖角 45° , 尖端直径大于 $10\ \mu\text{m}$ 。琼脂层分析表明从微针释放的庆大霉素, 抑制了金黄色葡萄球菌的生长。在另一项工作中, 结合可见光动态掩膜微立体光刻和脉冲激光沉积制造抗菌微针, 用于皮肤感染的局部治疗。先用丙烯酸酯感光聚合物 (eShell 200) 微立体光刻制造微针, 然后利用脉冲激光沉积涂覆一层银或者氧化

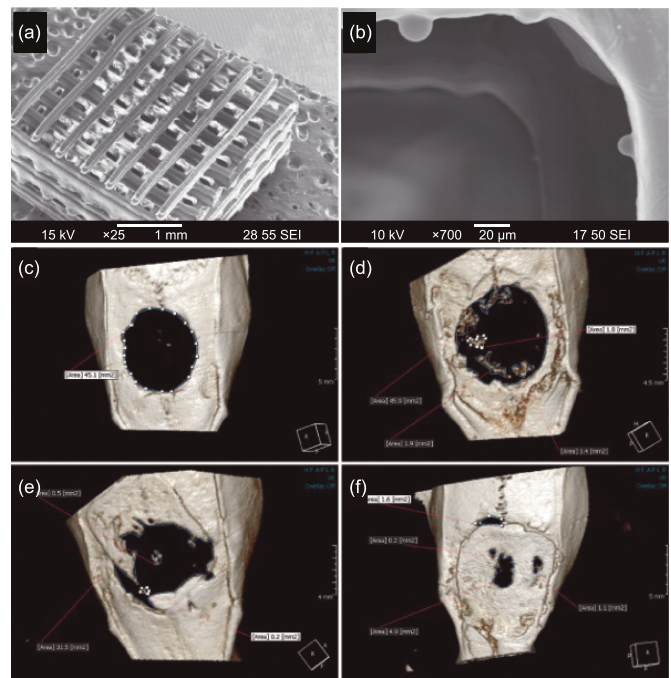


图 6. (a) 微立体光刻制造的载有 BMP-2 的 PPF 的支架的扫描电子显微镜图像; (b) 包埋的 PLGA 微球; (c) 植入 11 周后再生骨的微 CT 图像; (d) 未载有 BMP-2 的传统支架; (e) 未载有 BMP-2 的微立体光刻支架; (f) 载有 BMP-2 的微立体光刻支架 [16]。

锌薄膜。将微针刺入猪皮, 对表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌展现出了显著的抗菌活性 [116]。

3.1.2 细胞水凝胶立体光刻法

立体光刻工艺的一个显著特点是能够将活细胞和敏感分子在生物相容性条件下, 以较高的分辨率和精度嵌入水凝胶前体中。这些功能已探索形成一种方法, 用来设计体外复杂的三维微环境, 使其类似于天然 ECM 结构和组成特性。这样的环境是由载细胞水凝胶前体的选择性光聚合制造, 并在研究细胞对生化信号的响应及阐明细胞与细胞间、细胞与材料间的相互作用机理中起关键作用 [117, 118]。在改良的立体光刻系统中, 同时探索自上而下和自下而上的方法, 由 RGDS (精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸) 官能团和嵌入的 NIH/3T3 成纤维细胞直接制造三维聚(乙二醇)二丙烯酸酯 (PEGDA) 得以实现。尽管可以通过自上而下的方法, 在不损伤细胞生存能力的前提下制得 $2\ \text{mm}$ 厚的结构。观察细胞沉降在容器底部的结果, 却发现细胞的分布是不均匀的。相反, 虽然自下而上的方法需要手动输送细胞, 但是可以制造细胞均匀分布的结构。使用后一种方式, 研究人员用放置在预先设定空间位置的标记细胞来制造多层三维构造, 并证明了该方法的可行性 (图 7(a)) [119]。最近, 这一研究小组用类似的方法, 为研究两种细胞类型之间的相互作用, 使用包含多种细胞类型的水凝胶, 在特定位置

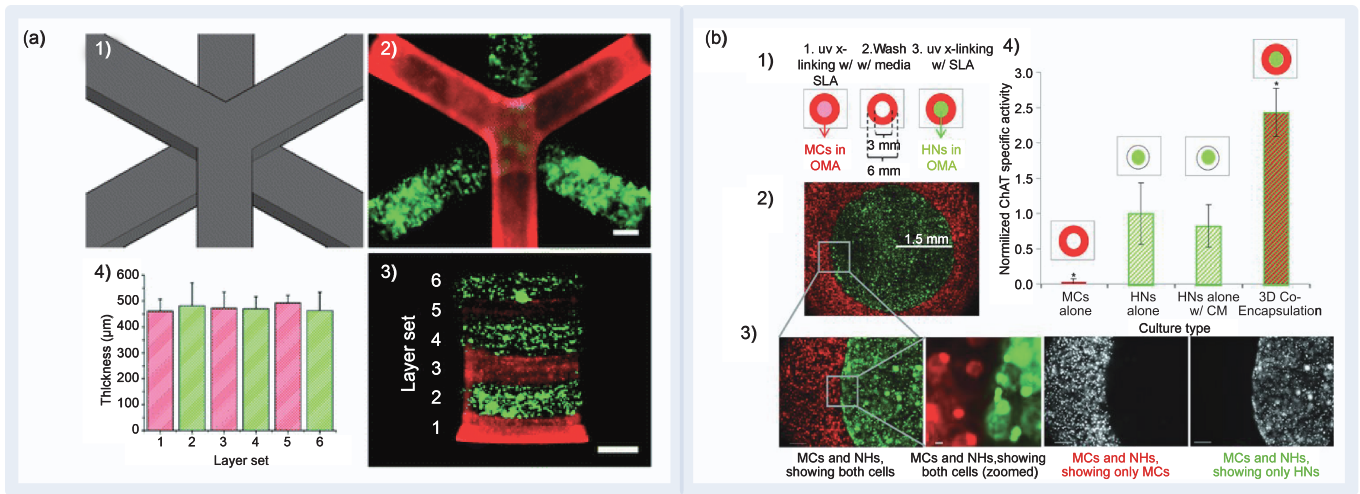


图 7. 立体光刻法制造的载细胞水凝胶结构。(a) 三维水凝胶由包含成纤维细胞的 PEGDA 预聚物逐层照射制得，每层厚度均匀（比例尺代表 1 mm）[119]；(b) 制造骨骼肌成肌细胞和初级海马神经元的共同培养环境，经过 10 天的培养，通过测定胆碱乙酰转移酶（ChAT）活性，评估细胞间距离对神经元功能的影响 [118]。

创建了复杂的 3D 结构（图 7(b)）。结果清楚表明，由骨骼肌成肌细胞分泌的因子通过互相包裹，增强了初级海马神经元的神经元功能（增加了 2.5 倍），这证明立体光刻在这些应用中的用途 [118]。在另一项研究中，以 LAP 作为光引发剂，用 Percoll 来防止细胞沉降，利用悬浮于 PEGDA 中的人脂肪源性干细胞，可发出可见光的投影立体光刻系统被用来制造三维水凝胶支架。在为期 7 天的整个结构的后期制造中，90% 以上封装在多孔三维支架内的细胞仍然存活 [120]。最近，2PP 立体光刻首次在有活细胞存在的情况下探索制造了三维结构。首先，初步筛选适合的双质子聚合光引发剂；随后，将人骨肉瘤细胞悬浮于甲基丙烯酰胺改性的明胶中；最后，进行光聚合。结果显示，由于操作参数不损害细胞活力，所以双质子聚合期间产生的活性反应组分可能是所观察到的细胞损伤的原因。将包裹在基体中的细胞培养 3 周后，发现其能够增殖并迁移到结构内的空白空间中 [121]。

3.2 激光直写技术：通过光导效应打印细胞

激光直写技术利用光能可以在受

体基片上精准地打印生物材料、细胞和治疗分子。尽管这些技术并不引发光聚合反应，但是可以与立体光刻工艺相结合，用来制造复杂的结构，将细胞放置在特定三维位置的光交联凝胶内 [122]。激光直写技术通过使用计算机控制的衬底，在多层打印过程中，以高分辨率和高准确性制造复杂的三维环境。其他生物印刷技术无法达到这样的分辨率，因此这一技术对 ECM 状环境工程非常具有吸引力。

3.2.1 激光引导直写

激光引导直写（LGDW）是一种利用弱聚焦连续近红外激光高能散射光子的光学力，直接将细胞以微米级的精度推进到受体表面（如胶原或基底膜）散射孔口的生物制造技术。利用细胞和周围介质之间折射率的差别，入射光子通过一个低数值孔径透镜聚焦，产生的辐射力将细胞引导并固定在靶标上（图 8）[123]。LGDW 由一个弱聚焦束、含有细胞的悬浮液、受体基片和一个控制细胞沉积的计算机控制的移动系统组成 [124]。由于激光光束的发散和对流流体的流动力，传统系统能够引导细胞移动约 300 μm。而在更先进的设备中，更高沉积质量的中空光纤的使用，使得细胞的移动距离长达 7 mm [125]。LGDW 已经可以二维打印数种细胞类型和有限的几种三维图形而不损害细胞活力 [123, 125, 126]。虽然 LGDW 在图形化活细胞方面比较先进，但其细胞吞吐量低（每分钟 2.5 个细胞），重复性差，随着

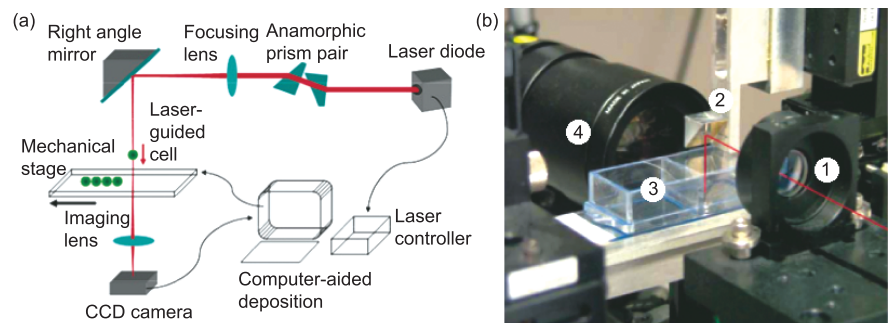


图 8. 经典激光引导直写装置。(1) 聚焦透镜；(2) 直角反射镜；(3) 密封玻璃腔室 - 薄片；(4) 可选侧向成像透镜 [123]。

更有效技术的开发,已经显著地限制了它在组织工程领域的使用 [124]。

3.2.2 激光诱导向前转移

激光诱导向前转移 (LIFT) 技术充分利用高能脉冲激光,使液体悬浮液局部熔化,从而使其向受体基片喷射。和 LGDW 不同的是,基于 LIFT 的工艺没有孔口,从而避免了有关堵塞、黏度和污染方面的问题;然而,特定的条件必须得到满足,以实现液滴的形成和喷射。液滴形成主要依赖于激光和生物油墨的性质(如激光流畅性、生物油墨黏度和膜厚度),可以分成 3 种不同模式:亚阈值(没有材料沉积)、喷射(明确定义的射流形成)和雾化(形成雾化液滴) [127]。

传统的 LIFT 最早应用在金属直写中,通过对一些传统设备的修改,其独特的分辨率和图形化功能也被开发用于生物医学领域。例如,对激光源和打印带的组分进行改良,以免损坏生物材料,从而提高打印重复率;通过对激光脉冲特征、生物油墨黏度、吸收层的厚度和基片特性等过程参数进行详细优化,打印期间对细胞有害的潜在因素还可以被大量降低,甚至消除 [128–130]。依据打印带的组分,用于生物制造的改良 LIFT 技术可分为两大类:基体辅助脉冲激光蒸发直写 (MAPLE DW) 和生物激光加工(生物化学)。尽管两者差异很小,这两种技术使用了相同的配置,包括脉冲激光源、供体玻片或打印生物材料的打印带,以及与供体玻片相距几百微米远、用以接收印刷液滴的受体基片 [124]。

MAPLE DW 使用一个在紫外或近紫外波长(通常为 193 nm)下工作的低功率脉冲激光,通过显微镜物镜,将其在打印带与光学吸收材料之间聚焦,从而局部加热、汽化生物聚合物层,并喷射细胞悬浮液(图 9)。打印带是一种涂有包含细胞的牺牲性生物聚合物层的激光透明石英盘 [131]。通常由明胶或基质胶组成的生物聚合物层,可以使初始细胞附着,吸收入射激光,并促进能量的传递以喷射液滴。然而,该生物聚合物层并没有消除入射光和细

胞悬浮液之间的相互作用。MAPLE DW 可以实现小于 10 μm 的空间精度 [131]。

已有研究证明了 MAPLE DW 能够将哺乳动物细胞有序地图形化成任意形状,同时在打印后展现出高的生存力 [133–136]。Schiele 等 [135] 开发了一种新的打印活细胞的方法,他们将明胶涂覆在打印带和受体基片上,从而避免了可能影响细胞寿命的干扰因素的存在。通过这种方法打印的人真皮成纤维细胞不存在 DNA 损伤并表现出高活性。科学家对这种方法进行了更深入的探索,通过在涂覆明胶的基片上精确地图形化胚胎干细胞,以便重新建立一个干细胞生态位。87% 的印刷细胞仍然存活,并且沉积后未分化,在培养 7 天后形成胚胎。此外,胚胎干细胞的分化能力在印刷过程中并不会受到损伤 [132]。在羟基磷灰石存在的情况下,MAPLE DW 还被用来探索图形化 MG63 成骨细胞,这表明了打印复合生物墨水的可能性 [137]。

生物激光加工 (BioLP),也称为激光辅助生物打印 (LaBP),代表了当前可用的最先进的激光辅助技术。在该技术中,打印带和细胞层(图 10)之间被嵌入一层 1~100 nm 的生物相容的激光吸收层,相比 MAPLE DW,它有许多优点:消除激光和生物材料之间的相互作用;减少加热;可以更有效地喷射液滴;提供优异的重复性 [80, 127]。通常,通过将近红外高能激光脉冲聚焦在吸收层上,局部加热、汽化,随之蒸气气泡形成、扩张,从而实现液滴的形成和喷射 [127]。

在组织工程领域,生物激光加工被用来制造用于组织再生和三维环境的载细胞结构,进而阐明细胞和生物材料之间的相互作用 [33, 139–141]。双层三维皮肤替代物制造的实现很

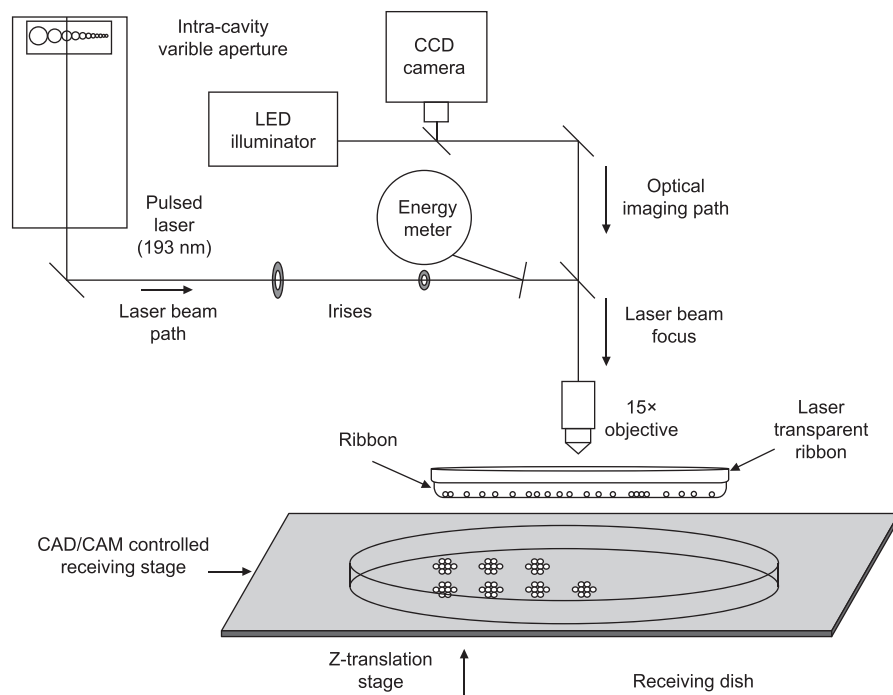


图 9. MAPLE DW 装置原理示意图。(摘自参考文献 [132])

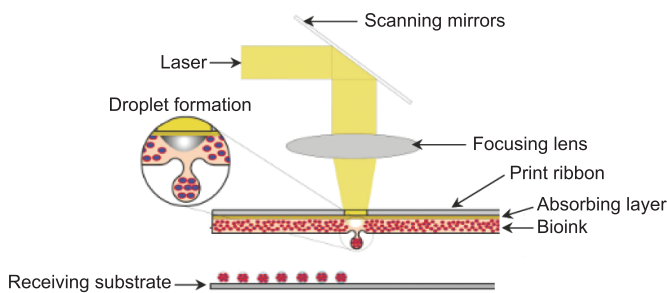


图 10. 生物激光加工装置。(摘自参考文献 [138])

好地证明了 BioLP 技术制造复杂有序载细胞结构用于组织再生的能力。在此，成纤维细胞和角化细胞被分别嵌入胶原蛋白中，并随后打印到涂覆有人真皮细胞的玻片上。培养 10 天后，构件保持结构形态，在细胞之间检测到功能化的胞间连结 [140]。BioLP 技术的分辨率和多细胞打印功能还被用来探索通过打印人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和人脐静脉平滑肌细胞 (VSMC HU) 的分支 / 茎结构，以模仿血管网络 [141]。除了打印包覆在聚合物中的细胞，生物激光加工技术还可以图形化复合生物墨水。这种复合生物墨水由生物聚合物、细胞和陶瓷构成，打开了在小型组织工程应用领域广阔的前景。Guillemot 等 [33] 打印了悬浮于褐藻酸钠和纳米羟基磷灰石中的人内皮细胞。石英盘上图形化的每个液滴直径为 70 μm，含 5~7 个细胞，打印后细胞可以存活多达 11 天。最近，该研究小组报道了在二维和三维结构的加工过程中顺序打印纳米羟基磷灰石和人骨原细胞 [138]。在一种组合生物制造方法中，由 2PP 立体光刻制造 PEGDA 凝胶，BioLP 独特的分辨率被用来探索在凝胶内特定的空间位置图形化多种细胞。通过将血管平滑肌细胞精确地植入外支架区，将内皮细胞植入内支架区而制成的三维细胞支架，展示出了集成光制造技术的优点 [122]。

尽管大多数涉及 BioLP 的现有研究都集中在印刷参数和它们对体外细胞寿命的影响方面，但是针对体内评估三维载细胞基体仍有可能做出令人印象深刻的工作。这种基体可以用于皮肤组织工程和用于骨愈合的体内生

物制造植入。在第一种情况下，将含有成纤维细胞和排列在两个分开的区域的角化细胞的三维皮肤替代物植入裸鼠全层皮肤伤口中。结果表明，在表皮区域形成薄分层组织，成纤维细胞分泌出新的胶原，这证明了新皮肤组织的形成 [142]。在第二种情况下，运用 BioLP 技术在体内将纳米羟基磷灰石直接打印到小鼠颅盖缺损模型上 (图 11)。尽管结果不一致，但是仍可能在一定程度上在体内利用生物制造方法来形成新骨，通过对脱钙组织部分和微计算机断层扫描数据的分析可以证明这一点 [143]。事实上，BioLP 技术是不多的几种生物增材制造技术之一，目前已经能够在体内制造植入器官，这表明了向临床转化的一大进步。

3.3 光降解和光掩膜：向动态三维微环境原位工程发展

基于光刻和光降解技术的生物制造，在组织工程和细胞生物学中扮演重要的角色，它们在不改变周围结构的情况下，对生化实体的接合 / 分裂进行时空控制。最重要的是，这些技术允许三维环境中的动态变化，并拥有微纳米尺度的亚微米分辨率，为构造近似自然细胞外基质环境打开了一扇窗。与传统的合成环境相反，天然的细胞外基质是复杂和动态变化的环境，它给予细胞特定时空上的刺激，决定细胞功能，如黏附性、增殖性、变异和形态发生性。同样，细胞用其表面受体感知周围生物化学和生物力学环境中的刺激信号，并通过重塑细胞外基质做出动态响应 [28, 61]。因此，我们在实验室中重建这一复杂和交互式三维环境的能力，对组织修复和再生方面治疗方法的发展必不可少。

对于创造动态近似细胞外基质的环境，三维光掩膜是一种令人振奋的方法，无论是基质 (如水凝胶和纳米纤维) 内部或者表面，它都可以用激光或灯光照射来控制多种生物材料的增加，并在时空上进行控制。这些技术可以制备仿生结构，使这些结构在特定的位置包含多种细胞，并且同时调节可能影响细胞实时功能的生物化



图 11. 使用 BioLP 的活体打印。(a) 工作设置示意图；(b) 放置在特定夹具内的小白鼠；(c) 生物打印过程。(摘自参考文献 [143,144])

学和 / 或生物力学刺激 [27, 28, 55, 145–147]。在典型的方法中, 一种细胞相容的光引发剂和目标分子在水凝胶中进行培养, 这样可使它们在聚合物内扩散。通过在特定位置照射膨胀的水凝胶, 所期望的结构就制造出来了, 使目标分子分布到未反应的光敏基团周围, 这些光敏基团是在水凝胶前体中引入的。2PP 照射产生的光能通常是首选, 这是因为其具有非常小的聚焦体积、加工深度以及生物组织相容性。

DeForest 等 [27] 在一个无铜点击化学反应中, 将四臂聚乙二醇四叠氮化物与双 (DIFO3) 二次官能化的多肽置于纤维母细胞中进行反应得到生化官能团, 然后使用三维光刻法在多孔水凝胶中引入生化官能团。水凝胶一旦形成, 正交巯基光耦合化学反应建立交联多肽和烯丙酯之间的共价键, 在水凝胶中特定位置形成多肽。通过将特定区域选择性地暴露在单光子或双光子光下, 光耦合反应发生的位置就很容易得到控制。这些研究发现, 在凝胶内包含半胱氨酸并用荧光标记的 RGD (精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸) 氨基酸序列的刻蚀中, 他们的方法很容易实现, 其局部地影响细胞附着和迁移 (图 12)。Wylie 等 [145] 也采用了类似的方法, 用以制备三维仿生水凝胶, 并对干细胞中生长因子 (音猬因子和睫状神经营养因子) 进行空间上的控制, 并控制细胞寿命情况。本研究和其他类似研究都表明, 3D 光刻法可以实现影响细胞迁移的蛋白质的浓度梯度要求, 突出构建天然细胞外基质中信号分子梯度的可能性 [145, 148]。在另一种方法中, Mosiewicz 等 [28] 研究了光能对促进酶介导生物共轭反应的光敏化的局部控制, 对生物分子进行选择抑制。这种光激活酶的方法, 通过对纤连蛋白衍生的吸附性肽 RGD、重组纤连蛋白片段 FN9-10 和血小板源性的生长因子 B 的选择性刻蚀, 调节对 MMP 敏感的 PEG 水凝胶中间充质干细胞的三维侵染。

除了在生物化学材料结合方面的应用, 光掩膜也被用来从空间、时间和强度方面改善力学性能。Gramlich 等 [55] 通过巯基-降冰片烯的化学反应, 应用光掩膜增强了透明质酸水凝胶的力学性能。透明质酸首先被降冰片烯基团官能化, 然后和二硫醇反应, 使未反应的降冰片烯基团留在聚合物主链中, 以待后期交联。接着, 未反应的基团和二硫醇交联剂之间的二次光聚合反应发生, 使压缩模量比初始值增加两倍。他们还表示, 巯基-降冰片烯可以精确控制凝胶内的荧光染料的光刻。近日, Mosiewicz 等 [149] 开发了一种基于光不稳定基团的替代方法, 以提高凝胶刚度。在他们的办法中, 光不稳定基团被用来暂时掩盖水凝胶交联中的一个官能团。在光的照射下, 这些官能团被重新激活, 使局部刚度增加。

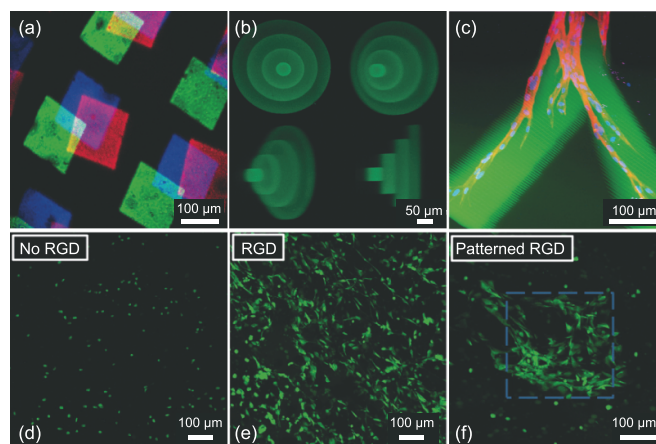


图 12. 3D 水凝胶图形化实例。(a) 水凝胶中用遮光罩和巯基反应刻蚀荧光标记肽序列; (b) 用共聚焦显微镜进行 3D 微米级结构控制; (c) 人体真皮纤维母细胞的共聚焦显微镜下, 胶原酶敏感的 PEG 水凝胶中的 RGDS 图形区域的图像; (d) ~ (f) RGD 图形对纤维母细胞在三维水凝胶中吸附的影响, 其中 (d) 没有图形化, (e) 完全图形化, (f) 有限范围图形化。除了图 (c) 从文献 [147] 中得到以外, 所有图像都从文献 [27] 中取得。

这种方法被用来调整 Micheal 型加成化学反应中 PEG 合成水凝胶在 3.3~8.2 内的基质刚度, 并评估其对人体间充质干细胞迁移的影响。由于它们的通用性, 光掩膜技术也已用于其他基质, 包括在三维支架中用 500 μm 图形深度种植血管内皮生长因子 [150], 以及用静电纺丝在纳米纤维中创建 RGD 多肽图形指导细胞行为 [151]。光刻法也适用于在 PCL / 明胶纤维支架中种植生长因子 (bFGF 和 BMP-2), 以调节人体间充质干细胞 (hMSCs) 的骨生成 [152]。在此方法中, 同时为了在早期阶段得到低剂量的 bFGF 持续供给, 以及长期的 BMP-2 释放, bFGF 种植在纤维上, BMP-2 种植在 PEG 水凝胶中。细胞培养研究表明, 与单独释放两种因子相比, 经过控制的持续传输对 hMSCs 的成骨分化有积极作用 (图 13)。在另一逐步生长 PEG 水凝胶的工作中, 硫醇烯化学被用来固定硫醇转化的生长因子 (TGF- β 1), 以局部作用于包埋的软骨细胞 [153]。这种方法成功地以均匀的而不改变其生物活性的方式, 将 TGF- β 1 因子共价结合到整个水凝胶中。在超过 4 周的时间中, 相比于存在可溶性生长因子的细胞, 局部持续的传递 TGF- β 1 造成 DNA 含量、糖胺聚糖和水凝胶内软骨细胞分泌的胶原蛋白的增加。总之, 结果表明了光介导反应收集、释放生长因子以增强软骨组织再生的有效性。

光降解正在成为一个强大的工具, 它通过削减而不是增加生物信号或生物材料的方式, 来实时改变水凝胶的特性以达到控制细胞环境的作用。因此, 这些反应在某种程度上能够模拟自然组织中一些重要变化, 包括细胞外基质重建和伤口愈合过程中的蛋白质水解。光降解作用在生物医学方面的应用受到越来越多的关注, 带动

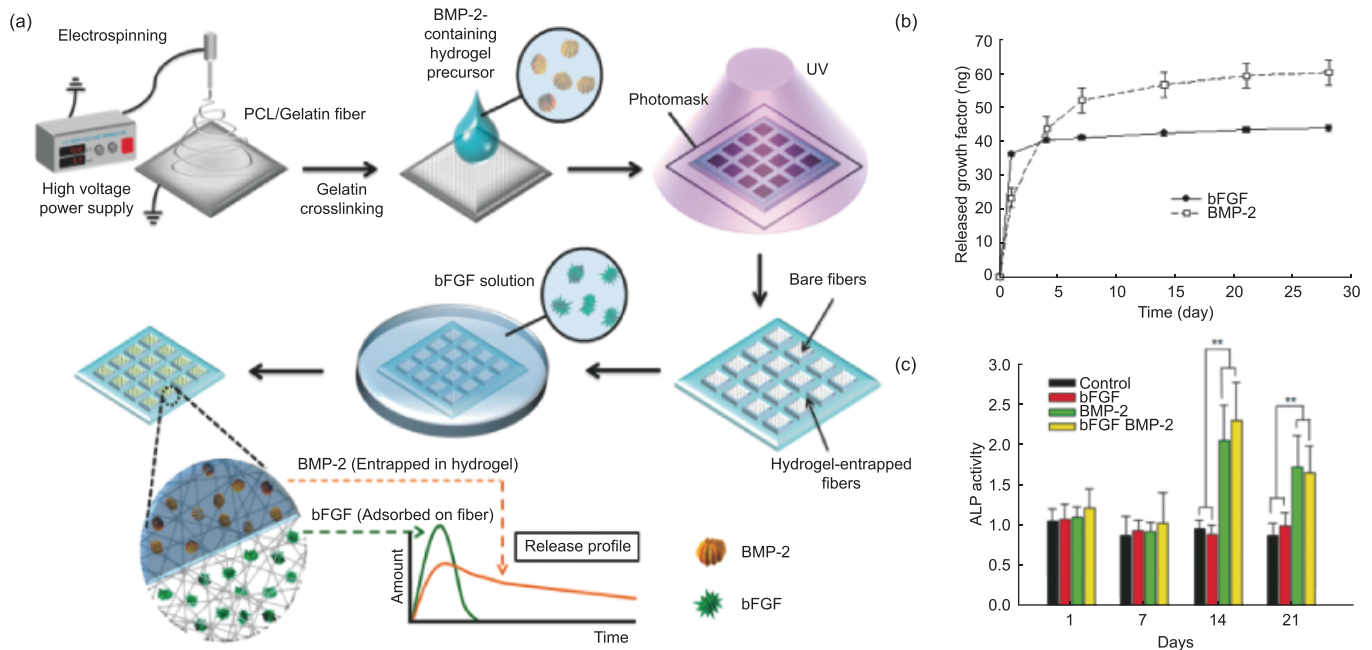


图 13. (a) 用静电纺丝和光刻法种植双生长因子的支架的组合制造方法; (b) 体外支架生长因子释放; (c) 对培养的 hMSCs 中 ALP 活动的影响 [152]。

了对新型光降解水凝胶的研究 [78, 154–156]。光降解的优点已被探索用于各方面, 包括在三维环境中控制细胞行为和释放治疗剂的释放。光降解的基本概念涉及局部光照射的使用, 以触发感光部分 (*o*-硝基苄基醚, 芳基取代的四唑和香豆素基团) 的光解, 这样可以使聚合物的交联断裂和 / 或释放药物 [72, 157–159]。与其他降解机制相比, 如水解和酶促降解, 在光介导的降解中, 光解的程度很容易通过改变光的照射强度、照射时间和光波长来实时控制 [158, 160]。

光化学反应的一种最有效的应用是控制基质实时弹性, 以研究其对细胞响应动态变化的影响, 或研究直接的细胞表型 [155, 161, 162]。Kloxin 等 [161] 发明了基于 PEG 的可光解水凝胶, 它可以封装活细胞并在光照射下可控降解。此动态系统作为可变弹性的 2D 培养平台被探索开发, 用作研究基质弹性 (光照射 5 min, 7~32 kPa) 和弹性模量梯度对纤维原细胞-成肌纤维细胞分化过程的影响。光降解的另一个相关应用是水凝胶交联的局部光致断裂, 以控制在三维或二维环境下的细胞功能 [32, 71, 160, 163]。DeForest 和 Anseth [160] 对这种方法进行了精确说明, 他们用无铜、应变促进炔叠氮化物环加成作用 (SPAAC) 制造基于四臂 PEG 的水凝胶, 并用多种光波长控制其功能和结构。水凝胶的功能是在可见光 (490~650 nm 的单光子, 860 nm 为双光子) 存在的条件下, 通过巯基光共轭反应而改变的, 而其三维结构是在紫外光 (365 nm 的单光子, 740 nm 为双光子) 下, 通过可光解的 *o*-硝基苄基醚基团的光致裂解反应改变的。多肽配体的巯基光共轭反应和光解作用可以在载细胞三

维水凝胶上实现, 对细胞没有毒性作用 (> 95% 活性)。研究还表明, 这些反应通过腐蚀三维迁移通道, 用 RGD 吸附性基序修改其表面, 控制纤维母细胞在水凝胶内的转移 (图 14)。最近 Tsang 等 [32] 使用了类似的方法, 在基于明胶的光可降解水凝胶中, 控制心肌细胞的组织和排列。光可降解 PEG 交联剂中的末端 *o*-硝基苄基酯和甲基丙烯酸酯基团可以引发光解和交联 (通过氧化还原引发聚合或可见光引发聚合), 明胶甲基丙烯酰胺用此交联剂进行交联作用。一旦暴露在光下 (5 min, 320~500 nm, 20 mW·cm⁻²), 在水凝胶的表面上便形成了明确定义的微型图案, 以便控制接种的新生大鼠心脏成纤维细胞和心肌细胞。光降解在用不同的载体如纳米粒子、微粒和凝胶控制药物传递的应用方面, 也非常具有吸引力 [73, 164–169]。例如, 一系列合成的光可降解的聚氨酯聚合物, 可以装入纳米颗粒中, 纳米颗粒包含不溶于水的封装药物。在这项研究中, 最有前景的是在细胞存在的情况下加入药物, 进行给药研究。载药纳米颗粒被巨噬细胞所吸收, 一旦得到外部光的照射, 即可释放药物 [166]。在另一项研究中, Azagarsamy 和 Anseth [73] 开发了一种新型的方法, 他们使用两个光致裂解单元, 选择性地连续释放水凝胶中的蛋白质 (BMP-2, BMP-7)。基于硝基苄基醚 (365 nm 光解) 和香豆素甲酯 (405 nm 光解), 蛋白质通过光致裂解单元共价结合水凝胶网络中, 它们的释放时间则通过改变光波长、强度和强度调节。同时, 在涉及 hMSCs 的成骨分化实验中, 未检测到释放蛋白生物活性的改变。光能时空控制还可以用来控制人成纤维细胞和肝细胞内抗癌药物——紫杉

醇的释放 [167]。将紫杉醇装载在纳米金包覆的介孔二氧化硅纳米微球上 (PR-AuNPs-MSN), 可以被这两种类型细胞快速吞噬。在紫外线曝光 (365 nm) 10 min 后, 观察到含载药纳米微球的细胞生存力显著降低, 其中包括肝脏 (44.2%) 和成纤维细胞 (43.5%)。与此相反, 没有载药的 PR-AuNPs-MSN 在紫外光照射前或后并不能成为细胞的毒素。总之, 这些结果表明光介导反应在化疗中控制抗癌药物释放方面的潜力。在一个类似的方法中, 紫外光触发抗癌药物 (5- 氟尿嘧啶) 的传递, 使其共价连接至香豆素 [聚 (环氧乙烷) - *b* - 聚 (甲基丙烯酸正丁酯 - *co* - 4 - 甲基 - [7 - (甲基丙烯酰) 乙氧基] - 香豆素)] 功能化的胶粒上 [168]。通过曝光于波长为 350 nm 的紫外光得到的胶粒 - 药物缀合物直径为 70 nm, 并表现出对 L929 细胞优良的生物相容性。胶粒 - 药物缀合物释放的 5- 氟尿嘧啶是通过使用波长 254 nm 的紫外光照射, 以裂解药物和聚合物链之间对光不稳定的连接分子来实现的。体外测试表明, 68% 的药物是在 12 h 内、在没有破裂释放的影响下从胶囊 - 药物缀合物释放的。紫外线穿透进入皮肤的深度有限, 因此排除了胶粒 - 药物缀合物对在深部组织中癌症的应用, 但是这种方法可以通过换用具有较深皮肤穿透深度的光波长来弥补。

4 结论

在为组织再生和药物传递构建三维微环境方面, 光

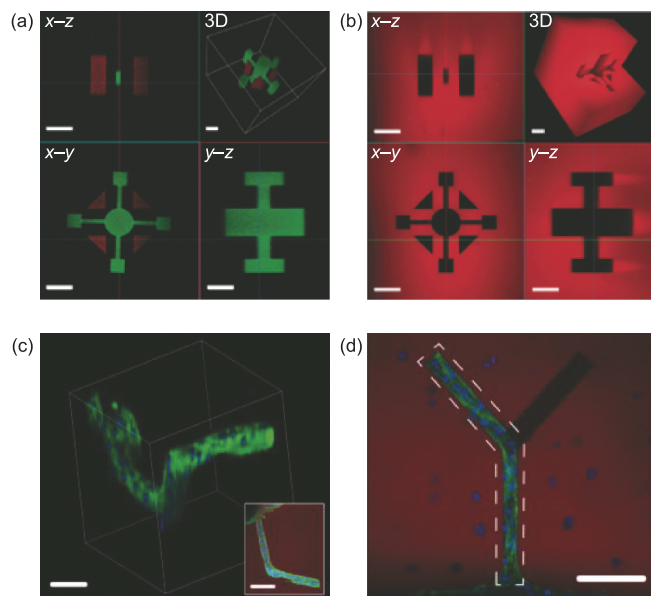


图 14. (a) 在三维水凝胶中用多光子激光图形化红、绿标记的多肽 ($\lambda = 860 \text{ nm}$); (b) 微米尺度下用多光子激光 ($\lambda = 740 \text{ nm}$) 在特定位置进行三维光解反应; (c) 光解反应制造管道并光掩膜修改管道后, 在包含 3T3- 纤维母细胞凝块的凝胶中控制细胞运动性; (d) 细胞在 RGD 官能化管道中移动 [160]。

制造技术是最有前景的方法之一。目前, 有多种光介导反应可以在微纳米分辨率下制造高度复杂的基质, 并在结构和成分上与天然细胞外基质相似。光介导反应可以在包含敏感性物质如细胞和生化信号的生物相容性环境中进行, 这样可以精确地控制生物材料和细胞在三维环境中的位置。因此, 含有多种细胞类型, 并用多种生化物质如细胞黏连基序、蛋白水解域和相关生长因子修饰后的动态三维结构的制造已经实现了。然而, 这些因子在细胞中位置、浓度和剂量方面的调节依然是该技术面临的巨大挑战。在过去十年中, 这些问题通过组合的或单独的方法进行了充分的研究, 带动了相关领域的发展, 如先进生物材料、更高效的光化学反应 (如正交点击反应、光引发剂和光反应性基团) 和更高精度的生物制造技术。这些发展使得应用光制造技术体内打印骨替代物成为可能, 这充分地显现出这些技术在生物医学领域的潜力。虽然以上进展令人鼓舞, 但关于新开发的三维结构对生物系统的影响及其相互作用的系统研究仍然较少。

致谢

作者感谢葡萄牙科技基金会 (FCT) 战略项目 UID/Multi/04044/2013 给予的支持。Rúben F. Pereira 致谢 FCT 博士基金 (SFRH/BD/91151/2012)。

Compliance with ethics guidelines

Rúben F. Pereira and Paulo J. Bártolo declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

1. F. P. W. Melchels, M. A. N. Domingos, T. J. Klein, J. Malda, P. J. Bartolo, D. W. Huttmacher. Additive manufacturing of tissues and organs. *Prog. Polym. Sci.*, 2012, 37(8): 1079–1104
2. A. Ranga, M. P. Lutolf. High-throughput approaches for the analysis of extrinsic regulators of stem cell fate. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2012, 24(2): 236–244
3. A. Khademhosseini, R. Langer, J. Borenstein, J. P. Vacanti. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, 103(8): 2480–2487
4. R. S. Tuan, G. Boland, R. Tuli. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.*, 2003, 5(1): 32–45
5. D. J. Newman, G. M. Cragg. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 2012, 75(3): 311–335
6. P. X. Ma. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, 60(2): 184–198
7. R. F. Pereira, C. C. Barrias, P. L. Granja, P. J. Bartolo. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. *Nanomedicine (Lond)*, 2013, 8(4): 603–621
8. R. Passier, L. W. van Laake, C. L. Mummery. Stem-cell-based therapy and lessons

- from the heart. *Nature*, 2008, 453(7193): 322–329
9. R. S. Kirsner, W. A. Marston, R. J. Snyder, T. D. Lee, D. I. Cargill, H. B. Slade. Spray-applied cell therapy with human allogeneic fibroblasts and keratinocytes for the treatment of chronic venous leg ulcers: A phase 2, multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2012, 380(9846): 977–985
 10. P. J. Bártolo, C. K. Chua, H. A. Almeida, S. M. Chou, A. S. C. Lim. Biomanufacturing for tissue engineering: Present and future trends. *Virtual Phys. Prototyp.*, 2009, 4(4): 203–216
 11. D. W. Hutmacher. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2529–2543
 12. D. Puppi, F. Chiellini, A. M. Piras, E. Chiellini. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog. Polym. Sci.*, 2010, 35(4): 403–440
 13. H. Cao, N. Kuboyama. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ β -TCP for bone tissue engineering. *Bone*, 2010, 46(2): 386–395
 14. N. T. Khanarian, N. M. Haney, R. A. Burga, H. H. Lu. A functional agarose-hydroxyapatite scaffold for osteochondral interface regeneration. *Biomaterials*, 2012, 33(21): 5247–5258
 15. F. P. W. Melchels, et al. The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding. *Biomaterials*, 2011, 32(11): 2878–2884
 16. J. W. Lee, K. S. Kang, S. H. Lee, J. Y. Kim, B. K. Lee, D. W. Cho. Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly(propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres. *Biomaterials*, 2011, 32(3): 744–752
 17. K. Kim, D. Dean, J. Wallace, R. Breithaupt, A. G. Mikos, J. P. Fisher. The influence of stereolithographic scaffold architecture and composition on osteogenic signal expression with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 2011, 32(15): 3750–3763
 18. P. Bajaj, R. M. Schweller, A. Khademhosseini, J. L. West, R. Bashir. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2014, 16(1): 247–276
 19. R. F. Pereira, P. J. Bártolo. Recent advances in additive biomanufacturing. In: S. H. Masood, ed. *Comprehensive Materials Processing, Volume 10: Advances in Additive Manufacturing and Tooling*. Oxford: Elsevier, 2014: 265–284
 20. V. Mironov, R. P. Visconti, V. Kasyanov, G. Forgacs, C. J. Drake, R. R. Markwald. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 2009, 30(12): 2164–2174
 21. J. W. Nichol, A. Khademhosseini. Modular tissue engineering: Engineering biological tissues from the bottom up. *Soft Matter*, 2009, 5(7): 1312–1319
 22. S. V. Murphy, A. Atala. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32(8): 773–785
 23. Y. B. Lee, et al. Bio-printing of collagen and VEGF-releasing fibrin gel scaffolds for neural stem cell culture. *Exp. Neurol.*, 2010, 223(2): 645–652
 24. M. P. Lutolf. Materials science: Cell environments programmed with light. *Nature*, 2012, 482(7386): 477–478
 25. K. T. Nguyen, J. L. West. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2002, 23(22): 4307–4314
 26. I. Mironi-Harpaz, D. Y. Wang, S. Venkatraman, D. Seliktar. Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: Crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomater.*, 2012, 8(5): 1838–1848
 27. C. A. DeForest, B. D. Polizzotti, K. S. Anseth. Sequential click reactions for synthesizing and patterning three-dimensional cell microenvironments. *Nat. Mater.*, 2009, 8(8): 659–664
 28. K. A. Mosiewicz, et al. *In situ* cell manipulation through enzymatic hydrogel photopatterning. *Nat. Mater.*, 2013, 12(11): 1072–1078
 29. R. F. Pereira, P. J. Bártolo. Photopolymerizable hydrogels in regenerative medicine and drug delivery. In: *Hot Topics in Biomaterials*. London: Future Science Ltd., 2014: 6–28
 30. M. A. Azagarsamy, K. S. Anseth. Bioorthogonal click chemistry: An indispensable tool to create multifaceted cell culture scaffolds. *ACS Macro Lett.*, 2013, 2(1): 5–9
 31. M. K. Nguyen, E. Alsberg. Bioactive factor delivery strategies from engineered polymer hydrogels for therapeutic medicine. *Prog. Polym. Sci.*, 2014, 39(7): 1235–1265
 32. K. M. C. Tsang, et al. Facile one-step micropatterning using photodegradable gelatin hydrogels for improved cardiomyocyte organization and alignment. *Adv. Funct. Mater.*, 2015, 25(6): 977–986
 33. F. Guillemot, et al. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomater.*, 2010, 6(7): 2494–2500
 34. C. C. Lin, C. S. Ki, H. Shih. Thiol-norbornene photo-click hydrogels for tissue engineering applications. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2015, 132(8): 41563
 35. N. Annabi, et al. 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater.*, 2014, 26(1): 85–124
 36. S. B. Anderson, C. C. Lin, D. V. Kuntzler, K. S. Anseth. The performance of human mesenchymal stem cells encapsulated in cell-degradable polymer-peptide hydrogels. *Biomaterials*, 2011, 32(14): 3564–3574
 37. F. R. Maia, K. B. Fonseca, G. Rodrigues, P. L. Granja, C. C. Barrias. Matrix-driven formation of mesenchymal stem cell-extracellular matrix microtissues on soft alginate hydrogels. *Acta Biomater.*, 2014, 10(7): 3197–3208
 38. M. W. Tibbitt, A. M. Kloxin, L. Sawicki, K. S. Anseth. Mechanical properties and degradation of chain and step polymerized photodegradable hydrogels. *Macromolecules*, 2013, 46(7): 2785–2792
 39. C. E. Hoyle, C. N. Bowman. Thiol-ene click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010, 49(9): 1540–1573
 40. Y. Jiang, J. Chen, C. Deng, E. J. Suuronen, Z. Zhong. Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 2014, 35(18): 4969–4985
 41. M. A. Tasdelen, Y. Yagci. Light-induced click reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2013, 52(23): 5930–5938
 42. K. A. Kyburz, K. S. Anseth. Three-dimensional hMSC motility within peptide-functionalized PEG-based hydrogels of varying adhesivity and crosslinking density. *Acta Biomater.*, 2013, 9(5): 6381–6392
 43. H. Shih, C. C. Lin. Visible-light-mediated thiol-ene hydrogelation using eosin-Y as the only photoinitiator. *Macromol. Rapid Commun.*, 2013, 34(3): 269–273
 44. B. D. Fairbanks, M. P. Schwartz, A. E. Halevi, C. R. Nuttelman, C. N. Bowman, K. S. Anseth. A versatile synthetic extracellular matrix mimic via thiol-norbornene photopolymerization. *Adv. Mater.*, 2009, 21(48): 5005–5010
 45. P. J. Bártolo. Stereolithographic processes. In: P. J. Bártolo, ed. *Stereolithography*. New York: Springer US, 2011: 1–36
 46. N. E. Fedorovich, M. H. Oudshoorn, D. van Geemen, W. E. Hennink, J. Alblas, W. J. Dhert. The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels. *Biomaterials*, 2009, 30(3): 344–353
 47. A. D. Rouillard, et al. Methods for photocrosslinking alginate hydrogel scaffolds with high cell viability. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2011, 17(2): 173–179
 48. S. J. Bryant, C. R. Nuttelman, K. S. Anseth. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts *in vitro*. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2000, 11(5): 439–457
 49. C. G. Williams, A. N. Malik, T. K. Kim, P. N. Manson, J. H. Elisseeff. Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials*, 2005, 26(11): 1211–1218
 50. T. Billiet, E. Gevaert, T. De Schryver, M. Cornelissen, P. Dubruel. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 49–62
 51. B. D. Fairbanks, M. P. Schwartz, C. N. Bowman, K. S. Anseth. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphine: Polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials*, 2009, 30(35): 6702–6707
 52. Z. Li, et al. Initiation efficiency and cytotoxicity of novel water-soluble two-photon

- photoinitiators for direct 3D microfabrication of hydrogels. *RSC Adv.*, 2013, 3(36): 15939–15946
53. J. Hu, et al. Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. *Acta Biomater.*, 2012, 8(5): 1730–1738
 54. J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar, A. Khademhosseini. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*, 2010, 31(21): 5536–5544
 55. W. M. Gramlich, I. L. Kim, J. A. Burdick. Synthesis and orthogonal photopatterning of hyaluronic acid hydrogels with thiol-norbornene chemistry. *Biomaterials*, 2013, 34(38): 9803–9811
 56. A. Fu, K. Gwon, M. Kim, G. Tae, J. A. Kornfield. Visible-light-initiated thiol-acrylate photopolymerization of heparin-based hydrogels. *Biomacromolecules*, 2015, 16(2): 497–506
 57. A. K. Nguyen, et al. Two-photon polymerization of polyethylene glycol diacrylate scaffolds with riboflavin and triethanolamine used as a water-soluble photoinitiator. *Regen. Med.*, 2013, 8(6): 725–738
 58. H. Park, B. Choi, J. Hu, M. Lee. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.*, 2013, 9(1): 4779–4786
 59. P. M. Kharkar, K. L. Kiick, A. M. Kloxin. Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42(17): 7335–7372
 60. J. A. Yang, J. Yeom, B. W. Hwang, A. S. Hoffman, S. K. Hahn. *In situ*-forming injectable hydrogels for regenerative medicine. *Prog. Polym. Sci.*, 2014, 39(12): 1973–1986
 61. M. P. Lutolf, J. A. Hubbell. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23(1): 47–55
 62. L. Fertier, et al. The use of renewable feedstock in UV-curable materials—A new age for polymers and green chemistry. *Prog. Polym. Sci.*, 2013, 38(6): 932–962
 63. C. Heller, et al. Vinylcarbonates and vinylcarbamates: Biocompatible monomers for radical photopolymerization. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 2011, 49(3): 650–661
 64. B. Husár, R. Liska. Vinyl carbonates, vinyl carbamates, and related monomers: Synthesis, polymerization, and application. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41(6): 2395–2405
 65. C. Heller, M. Schwentenwein, G. Russmueller, F. Varga, J. Stampfl, R. Liska. Vinyl esters: Low cytotoxicity monomers for the fabrication of biocompatible 3D scaffolds by lithography based additive manufacturing. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 2009, 47(24): 6941–6954
 66. J. F. Almeida, P. Ferreira, A. Lopes, M. H. Gil. Photocrosslinkable biodegradable responsive hydrogels as drug delivery systems. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2011, 49(5): 948–954
 67. O. Jeon, C. Powell, L. D. Solorio, M. D. Krebs, E. Alsberg. Affinity-based growth factor delivery using biodegradable, photocrosslinked heparin-alginate hydrogels. *J. Control. Release*, 2011, 154(3): 258–266
 68. S. Sahoo, C. Chung, S. Khetan, J. A. Burdick. Hydrolytically degradable hyaluronic acid hydrogels with controlled temporal structures. *Biomacromolecules*, 2008, 9(4): 1088–1092
 69. S. A. Bencherif, A. Srinivasan, F. Horkay, J. O. Hollinger, K. Matyjaszewski, N. R. Washburn. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials*, 2008, 29(12): 1739–1749
 70. C. S. Ki, H. Shih, C. C. Lin. Facile preparation of photodegradable hydrogels by photopolymerization. *Polymer (Guildf)*, 2013, 54(8): 2115–2122
 71. Q. Guo, X. Wang, M. W. Tibbitt, K. S. Anseth, D. J. Montell, J. H. Elisseeff. Light activated cell migration in synthetic extracellular matrices. *Biomaterials*, 2012, 33(32): 8040–8046
 72. M. A. Azagarsamy, D. D. McKinnon, D. L. Alge, K. S. Anseth. Coumarin-based photodegradable hydrogel: Design, synthesis, gelation, and degradation kinetics. *ACS Macro Letters*, 2014, 3(6): 515–519
 73. M. A. Azagarsamy, K. S. Anseth. Wavelength-controlled photocleavage for the orthogonal and sequential release of multiple proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2013, 52(51): 13803–13807
 74. N. Annabi, S. M. Mithieux, P. Zorlutuna, G. Camci-Unal, A. S. Weiss, A. Khademhosseini. Engineered cell-laden human protein-based elastomer. *Biomaterials*, 2013, 34(22): 5496–5505
 75. M. S. Bae, et al. Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing simvastatin as a bone tissue regeneration scaffold. *Biomaterials*, 2011, 32(32): 8161–8171
 76. H. Zhang, et al. Hyperbranched polyester hydrogels with controlled drug release and cell adhesion properties. *Biomacromolecules*, 2013, 14(5): 1299–1310
 77. Z. Muñoz, H. Shih, C. C. Lin. Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation. *Biomaterials Science*, 2014, 2(8): 1063–1072
 78. K. Peng, et al. Dextran based photodegradable hydrogels formed via a Michael addition. *Soft Matter*, 2011, 7(10): 4881–4887
 79. R. F. Pereira, H. A. Almeida, P. J. Bártolo. Biofabrication of hydrogel constructs. In: J. Coelho, ed. *Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013: 225–254
 80. N. R. Schiele, D. T. Corr, Y. Huang, N. A. Raof, Y. Xie, D. B. Chrisey. Laser-based direct-write techniques for cell printing. *Biofabrication*, 2010, 2(3): 032001
 81. F. P. W. Melchels, J. Feijen, D. W. Grijpma. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, 2010, 31(24): 6121–6130
 82. R. F. Pereira, P. J. Bártolo. Photocrosslinkable materials for the fabrication of tissue-engineered constructs by stereolithography. In: P. R. Fernandes, P. J. Bartolo, eds. *Tissue Engineering*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014: 149–178
 83. J. W. Choi, R. Wicker, S. H. Lee, K. H. Choi, C. S. Ha, I. Chung. Fabrication of 3D biocompatible/biodegradable micro-scaffolds using dynamic mask projection microstereolithography. *J. Mater. Process. Technol.*, 2009, 209(15–16): 5494–5503
 84. J. Torgersen, X. H. Qin, Z. Li, A. Ovsianikov, R. Liska, J. Stampfl. Hydrogels for two-photon polymerization: A toolbox for mimicking the extracellular matrix. *Adv. Funct. Mater.*, 2013, 23(36): 4542–4554
 85. P. J. Bártolo, G. Mitchell. Stereo-thermal-lithography: A new principle for rapid prototyping. *Rapid Prototyping J.*, 2003, 9(3): 150–156
 86. T. Patrício, R. Pereira, L. Oliveira, P. Bártolo. Polyethylene glycol and polyethylene glycol/hydroxyapatite constructs produced through stereo-thermal lithography. *Adv. Mater. Res.*, 2013, 749: 87–92
 87. P. Bartolo, et al. Biomedical production of implants by additive electro-chemical and physical processes. *CIRP Annals—Manuf. Technol.*, 2012, 61(2): 635–655
 88. Y. J. Seol, D. Y. Park, J. Y. Park, S. W. Kim, S. J. Park, D. W. Cho. A new method of fabricating robust freeform 3D ceramic scaffolds for bone tissue regeneration. *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, 110(5): 1444–1455
 89. J. R. Tumbleston, et al. Continuous liquid interface production of 3D objects. *Science*, 2015, 347(6228), 1349–1352
 90. S. J. Leigh, et al. Fabrication of 3-dimensional cellular constructs via microstereolithography using a simple, three-component, poly(ethylene glycol) acrylate-based system. *Biomacromolecules*, 2013, 14(1): 186–192
 91. A. P. Zhang, et al. Rapid fabrication of complex 3D extracellular microenvironments by dynamic optical projection stereolithography. *Adv. Mater.*, 2012, 24(31): 4266–4270
 92. A. Ovsianikov, et al. Laser fabrication of three-dimensional CAD scaffolds from photosensitive gelatin for applications in tissue engineering. *Biomacromolecules*, 2011, 12(4): 851–858
 93. K. W. Lee, S. Wang, B. C. Fox, E. L. Ritman, M. J. Yaszemski, L. Lu. Poly(propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: Effects of resin formulations and laser parameters. *Biomacromolecules*, 2007, 8(4): 1077–1084

94. L. Elomaa, S. Teixeira, R. Hakala, H. Korhonen, D. W. Grijpma, J. V. Seppälä. Preparation of poly(ϵ -caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Acta Biomater.*, 2011, 7(11): 3850–3856
95. F. P. W. Melchels, J. Feijen, D. W. Grijpma. A poly(D,L-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomaterials*, 2009, 30(23–24): 3801–3809
96. S. Schüller-Ravoo, S. M. Teixeira, J. Feijen, D. W. Grijpma, A. A. Poot. Flexible and elastic scaffolds for cartilage tissue engineering prepared by stereolithography using poly(trimethylene carbonate)-based resins. *Macromol. Biosci.*, 2013, 13(12): 1711–1719
97. J. W. Lee, P. X. Lan, B. Kim, G. Lim, D. W. Cho. Fabrication and characteristic analysis of a poly(propylene fumarate) scaffold using micro-stereolithography technology. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2008, 87B(1): 1–9
98. J. Jansen, F. P. Melchels, D. W. Grijpma, J. Feijen. Fumaric acid monoethyl ester-functionalized poly(D,L-lactide)/N-vinyl-2-pyrrolidone resins for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomacromolecules*, 2009, 10(2): 214–220
99. T. M. Seck, F. P. Melchels, J. Feijen, D. W. Grijpma. Designed biodegradable hydrogel structures prepared by stereolithography using poly(ethylene glycol)/poly(D,L-lactide)-based resins. *J. Control. Release*, 2010, 148(1): 34–41
100. K. Arcaute, B. Mann, R. Wicker. Stereolithography of spatially controlled multi-material bioactive poly(ethylene glycol) scaffolds. *Acta Biomater.*, 2010, 6(3): 1047–1054
101. F. A. M. M. Gonçalves, et al. 3D printing of new biobased unsaturated polyesters by microstereo-thermal-lithography. *Biofabrication*, 2014, 6(3): 035024
102. M. Dadsetan, et al. Effect of calcium phosphate coating and rhBMP-2 on bone regeneration in rabbit calvaria using poly(propylene fumarate) scaffolds. *Acta Biomater.*, 2015 (in press)
103. J. H. Shin, J. W. Lee, J. H. Jung, D. W. Cho, G. Lim. Evaluation of cell proliferation and differentiation on a poly(propylene fumarate) 3D scaffold treated with functional peptides. *J. Mater. Sci.*, 2011, 46(15): 5282–5287
104. L. Elomaa, Y. Kang, J. V. Seppälä, Y. Yang. Biodegradable photocrosslinkable poly(depsipeptide-co- ϵ -caprolactone) for tissue engineering: Synthesis, characterization, and *in vitro* evaluation. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 2014, 52(23): 3307–3315
105. R. Gauvin, et al. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials*, 2012, 33(15): 3824–3834
106. F. Scalera, C. Esposito Corcione, F. Montagna, A. Sannino, A. Maffezzoli. Development and characterization of UV curable epoxy/hydroxyapatite suspensions for stereolithography applied to bone tissue engineering. *Ceram. Int.*, 2014, 40(10, Part A): 15455–15462
107. L. Elomaa, A. Kokkari, T. Närhi, J. V. Seppälä. Porous 3D modeled scaffolds of bioactive glass and photocrosslinkable poly(ϵ -caprolactone) by stereolithography. *Compos. Sci. Technol.*, 2013, 74: 99–106
108. A. Ronca, L. Ambrosio, D. W. Grijpma. Preparation of designed poly(D,L-lactide)/nanosized hydroxyapatite composite structures by stereolithography. *Acta Biomater.*, 2013, 9(4): 5989–5996
109. F. Claeysens, et al. Three-dimensional biodegradable structures fabricated by two-photon polymerization. *Langmuir*, 2009, 25(5): 3219–3223
110. O. Kufelt, A. El-Tamer, C. Sehring, S. Schlie-Wolter, B. N. Chichkov. Hyaluronic acid based materials for scaffolding via two-photon polymerization. *Biomacromolecules*, 2014, 15(2): 650–659
111. V. Melissinaki, et al. Direct laser writing of 3D scaffolds for neural tissue engineering applications. *Biofabrication*, 2011, 3(4): 045005
112. M. T. Raimondi, et al. Three-dimensional structural niches engineered via two-photon laser polymerization promote stem cell homing. *Acta Biomater.*, 2013, 9(1): 4579–4584
113. J. W. Lee, K. J. Kim, K. S. Kang, S. Chen, J. W. Rhie, D. W. Cho. Development of a bone reconstruction technique using a solid free-form fabrication (SFF)-based drug releasing scaffold and adipose-derived stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2013, 101A(7): 1865–1875
114. J. Jansen, M. J. Boerakker, J. Heuts, J. Feijen, D. W. Grijpma. Rapid photo-cross-linking of fumaric acid monoethyl ester-functionalized poly(trimethylene carbonate) oligomers for drug delivery applications. *J. Control. Release*, 2010, 147(1): 54–61
115. S. D. Gittard, et al. Two photon polymerization-micromolding of polyethylene glycol-gentamicin sulfate microneedles. *Adv. Eng. Mater.*, 2010, 12(4): B77–B82
116. S. D. Gittard, et al. Deposition of antimicrobial coatings on microstereolithography-fabricated microneedles. *JOM*, 2011, 63(6): 59–68
117. Y. Lu, G. Mapili, G. Suhali, S. Chen, K. Roy. A digital micro-mirror device-based system for the microfabrication of complex, spatially patterned tissue engineering scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 77A(2): 396–405
118. P. Zorlutuna, J. H. Jeong, H. Kong, R. Bashir. Stereolithography-based hydrogel microenvironments to examine cellular interactions. *Adv. Funct. Mater.*, 2011, 21(19): 3642–3651
119. V. Chan, P. Zorlutuna, J. H. Jeong, H. Kong, R. Bashir. Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation. *Lab Chip*, 2010, 10(16): 2062–2070
120. H. Lin, et al. Application of visible light-based projection stereolithography for live cell-scaffold fabrication with designed architecture. *Biomaterials*, 2013, 34(2): 331–339
121. A. Ovsianikov, et al. Laser photofabrication of cell-containing hydrogel constructs. *Langmuir*, 2014, 30(13): 3787–3794
122. A. Ovsianikov, et al. Laser printing of cells into 3D scaffolds. *Biofabrication*, 2010, 2(1): 014104
123. Y. Nahmias, D. J. Odde. Micropatterning of living cells by laser-guided direct writing: Application to fabrication of hepatic-endothelial sinusoid-like structures. *Nat. Protoc.*, 2006, 1(5): 2288–2296
124. B. R. Ringeisen, C. M. Othon, J. A. Barron, P. K. Wu, B. J. Spargo. The evolution of cell printing. In: U. Meyer, J. Handschel, H. P. Wiesmann, T. Meyer, eds. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2009: 613–631
125. D. J. Odde, M. J. Renn. Laser-guided direct writing of living cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 67(3): 312–318
126. Y. Nahmias, R. E. Schwartz, C. M. Verfaillie, D. J. Odde. Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 92(2): 129–136
127. F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin. Laser-assisted cell printing: Principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. *Nanomedicine (Lond)*, 2010, 5(3): 507–515
128. S. Catros, B. Guillotin, M. Bačáková, J. C. Fricain, F. Guillemot. Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting. *Appl. Surf. Sci.*, 2011, 257(12): 5142–5147
129. J. A. Barron, D. B. Krizman, B. R. Ringeisen. Laser printing of single cells: Statistical analysis, cell viability, and stress. *Ann. Biomed. Eng.*, 2005, 33(2): 121–130
130. Y. Lin, G. Huang, Y. Huang, T. R. Jeremy Tzeng, D. Chrisey. Effect of laser fluence in laser-assisted direct writing of human colon cancer cell. *Rapid Prototyping J.*, 2010, 16(3): 202–208
131. B. C. Riggs, et al. Matrix-assisted pulsed laser methods for biofabrication. *MRS Bull.*, 2011, 36(12): 1043–1050
132. N. A. Raof, N. R. Schiele, Y. Xie, D. B. Chrisey, D. T. Corr. The maintenance of pluripotency following laser direct-write of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*, 2011, 32(7): 1802–1808
133. J. A. Barron, B. R. Ringeisen, H. Kim, B. J. Spargo, D. B. Chrisey. Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films*, 2004, 453–454: 383–387
134. T. M. Patz, et al. Three-dimensional direct writing of B35 neuronal cells. *J.*

- Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2006, 78B(1): 124–130
135. N. R. Schiele, D. B. Chrisey, D. T. Corr. Gelatin-based laser direct-write technique for the precise spatial patterning of cells. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2011, 17(3): 289–298
 136. N. R. Schiele, et al. Laser direct writing of combinatorial libraries of idealized cellular constructs: Biomedical applications. *Appl. Surf. Sci.*, 2009, 255(10): 5444–5447
 137. A. Doraiswamy, R. J. Narayan, M. L. Harris, S. B. Qadri, R. Modi, D. B. Chrisey. Laser microfabrication of hydroxyapatite-osteoblast-like cell composites. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, 80A(3): 635–643
 138. S. Catros, et al. Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite. *Biofabrication*, 2011, 3(2): 025001
 139. M. Gruene, et al. Laser printing of three-dimensional multicellular arrays for studies of cell-cell and cell-environment interactions. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2011, 17(10): 973–982
 140. L. Koch, et al. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109(7): 1855–1863
 141. P. K. Wu, B. R. Ringeisen. Development of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human umbilical vein smooth muscle cell (HUVSMC) branch/stem structures on hydrogel layers via biological laser printing (BioLP). *Biofabrication*, 2010, 2(1): 014111
 142. S. Michael, et al. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e57741
 143. V. Keriquel, et al. *In vivo* bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: Preliminary study in mice. *Biofabrication*, 2010, 2(1): 014101
 144. B. Guillotin, et al. Laser-assisted bioprinting for tissue engineering. In: G. Forgacs, W. Sun, eds. *Biofabrication*. Boston: William Andrew Publishing, 2013: 95–118
 145. R. G. Wylie, S. Ahsan, Y. Aizawa, K. L. Maxwell, C. M. Morshead, M. S. Shoichet. Spatially controlled simultaneous patterning of multiple growth factors in three-dimensional hydrogels. *Nat. Mater.*, 2011, 10(10): 799–806
 146. R. G. Wylie, M. S. Shoichet. Three-dimensional spatial patterning of proteins in hydrogels. *Biomacromolecules*, 2011, 12(10): 3789–3796
 147. S. H. Lee, J. J. Moon, J. L. West. Three-dimensional micropatterning of bioactive hydrogels via two-photon laser scanning photolithography for guided 3D cell migration. *Biomaterials*, 2008, 29(20): 2962–2968
 148. S. C. Owen, S. A. Fisher, R. Y. Tam, C. M. Nimmo, M. S. Shoichet. Hyaluronic acid click hydrogels emulate the extracellular matrix. *Langmuir*, 2013, 29(24): 7393–7400
 149. K. A. Mosiewicz, L. Kolb, A. J. van der Vlies, M. P. Lutolf. Microscale patterning of hydrogel stiffness through light-triggered uncaging of thiols. *Biomater. Sci.*, 2014, 2(11): 1640–1651
 150. A. T. Alsop, J. C. Pence, D. W. Weisgerber, B. A. Harley, R. C. Bailey. Photopatterning of vascular endothelial growth factor within collagen-glycosaminoglycan scaffolds can induce a spatially confined response in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Biomater.*, 2014, 10(11): 4715–4722
 151. R. J. Wade, E. J. Bassin, W. M. Gramlich, J. A. Burdick. Nanofibrous hydrogels with spatially patterned biochemical signals to control cell behavior. *Adv. Mater.*, 2015, 27(8): 1356–1362
 152. H. J. Lee, W. G. Koh. Hydrogel micropattern-incorporated fibrous scaffolds capable of sequential growth factor delivery for enhanced osteogenesis of hMSCs. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, 6(12): 9338–9348
 153. B. V. Sridhar, N. R. Doyle, M. A. Randolph, K. S. Anseth. Covalently tethered TGF- β 1 with encapsulated chondrocytes in a PEG hydrogel system enhances extracellular matrix production. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2014, 102(12): 4464–4472
 154. G. Pasparakis, T. Manouras, P. Argitis, M. Vamvakaki. Photodegradable polymers for biotechnological applications. *Macromol. Rapid Commun.*, 2012, 33(3): 183–198
 155. M. T. Frey, Y. L. Wang. A photo-modulatable material for probing cellular responses to substrate rigidity. *Soft Matter*, 2009, 5(9): 1918–1924
 156. V. V. Ramanan, J. S. Katz, M. Guvendiren, E. R. Cohen, R. A. Marklein, J. A. Burdick. Photocleavable side groups to spatially alter hydrogel properties and cellular interactions. *J. Mater. Chem.*, 2010, 20(40): 8920–8926
 157. D. R. Griffin, A. M. Kasko. Photodegradable macromers and hydrogels for live cell encapsulation and release. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134(31): 13103–13107
 158. D. R. Griffin, J. T. Patterson, A. M. Kasko. Photodegradation as a mechanism for controlled drug delivery. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, 107(6): 1012–1019
 159. M. He, J. Li, S. Tan, R. Wang, Y. Zhang. Photodegradable supramolecular hydrogels with fluorescence turn-on reporter for photomodulation of cellular microenvironments. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135(50): 18718–18721
 160. C. A. DeForest, K. S. Anseth. Cytocompatible click-based hydrogels with dynamically tunable properties through orthogonal photoconjugation and photocleavage reactions. *Nat. Chem.*, 2011, 3(12): 925–931
 161. A. M. Kloxin, J. A. Benton, K. S. Anseth. *In situ* elasticity modulation with dynamic substrates to direct cell phenotype. *Biomaterials*, 2010, 31(1): 1–8
 162. C. M. Kirschner, D. L. Alge, S. T. Gould, K. S. Anseth. Clickable, photodegradable hydrogels to dynamically modulate valvular interstitial cell phenotype. *Adv. Healthc. Mater.*, 2014, 3(5): 649–657
 163. M. V. Tsurkan, et al. Photopatterning of multifunctional hydrogels to direct adult neural precursor cells. *Adv. Healthc. Mater.*, 2015, 4(4): 516–521
 164. M. A. Azagarsamy, D. L. Alge, S. J. Radhakrishnan, M. W. Tibbitt, K. S. Anseth. Photocontrolled nanoparticles for on-demand release of proteins. *Biomacromolecules*, 2012, 13(8): 2219–2224
 165. M. W. Tibbitt, B. W. Han, A. M. Kloxin, K. S. Anseth. Synthesis and application of photodegradable microspheres for spatiotemporal control of protein delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2012, 100A(7): 1647–1654
 166. C. Lv, Z. Wang, P. Wang, X. Tang. Photodegradable polyurethane self-assembled nanoparticles for photocontrollable release. *Langmuir*, 2012, 28(25): 9387–9394
 167. J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, C. W. Wu, V. S. Lin. Photoinduced intracellular controlled release drug delivery in human cells by gold-capped mesoporous silica nanosphere. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131(10): 3462–3463
 168. Q. Jin, F. Mitschang, S. Agarwal. Biocompatible drug delivery system for photo-triggered controlled release of 5-fluorouracil. *Biomacromolecules*, 2011, 12(10): 3684–3691
 169. B. Yan, J. C. Boyer, D. Habault, N. R. Branda, Y. Zhao. Near infrared light triggered release of biomacromolecules from hydrogels loaded with upconversion nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134(40): 16558–16561