



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Additive Manufacturing—Review

面向医学应用的 3D 打印技术现状综述

严倩^a, 董汉华^{b,*}, 苏瑾^a, 韩建华^c, 宋波^{a,*}, 魏青松^a, 史玉升^a

^a State Key Laboratory of Materials Processing and Die and Mould Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

^b Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

^c Department of Clinical Science, University of Bergen, Bergen 5020, Norway

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2017

Revised 25 February 2018

Accepted 1 August 2018

Available online 4 August 2018

关键词

3D 打印

植入体

支架

生物医学材料

摘要

器官移植供体短缺一直是世界各国医学界面临的重大难题之一。传统方法不可避免地存在并发症、二次损伤和供体来源有限等潜在问题。3D 打印技术具有解决目前这些问题的潜力,可用于快速制造个性化组织工程支架、细胞原位修复组织缺陷,甚至直接打印组织和器官。打印的植入体和器官不仅与患者的受损组织完美匹配,而且能够调控材料微结构和细胞排列,促进细胞生长和分化。因此,这类植入体有望实现组织修复,甚至最终解决供体短缺问题。本文总结了 3D 打印在医学领域相关研究和最新进展的四个层次,介绍了不同类型的生物医用材料,并讨论了医学应用中 3D 打印所需材料和构建体外细胞质基质 (ECM) 存在的问题和未来的发展方向。

© 2018 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

组织或器官的病变和缺损一直是临床医学急需解决的重大难题[1],目前治疗方法主要包括自体移植、异种移植和人工机械器官替代,但这些方法仍存在不足。自体移植治疗效果令人满意,但该方法以牺牲自体健康组织为代价,可能会导致并发症和二次损伤。异种移植过程中的供体器官来源极为有限,而且存在免疫排斥反应和传播病毒的潜在风险。临床治疗中人工机械器官能够成功植入人体,但会严重影响患者的生活质量。采用 3D 打印技术个性化构建人类仿生组织或器官,则有望能解决这些传统治疗方法难以避免的问题。

3D 打印,又称为增材制造,以“分层制造,逐层堆积”为基本制造原理,在计算机控制下,利用计算机辅助设计 (CAD) 模型或计算机断层扫描 (CT) 数据等[2],通过对实体建模,精确堆积材料,快速制造出任意复杂形状的构件。近些年,随着 3D 打印机制造成本的降低及打印精度、速度的提高,3D 打印产业发生了爆炸式增长,特别是在医用器械、植入材料和细胞打印等方面都取得了巨大进步。借助于 3D 打印技术,可根据不同患者的 CT 或磁共振等成像数据,制备器官模型、实现个性化支架的快速制造,甚至对组织缺损部位直接打印成形,为构建仿生组织或器官、解决供体短缺问题带来了新的希望。

* Corresponding author.

E-mail addresses: hanhua_dong@hotmail.com (H. Dong), bosong@hust.edu.cn (B. Song).

目前, 面向医学应用3D打印技术的研究主要包括四个层次: ①制造辅助医生术前规划和手术治疗分析的病理器官原型的研究[3]; ②个性化制造永久性非生物活性植入体的研究; ③制造具有局部生物活性和可生物降解支架的研究; ④直接打印具有完整生命功能整体器官的研究[4-6]。尽管由于若干关键技术和基础科学问题尚待攻克, 3D打印技术还未获得广泛临床应用, 但在这些领域已经实现了显著的科学进步。

2. 面向医学应用 3D 打印的四个层次

2.1. 辅助术前规划和治疗分析的器官模型

高保真物理器官模型在临床治疗和医学教育中发挥

着重要作用。传统制造工艺, 如铸造或锻造, 在制备昂贵模具上耗费了大量时间, 而且往往会忽略患者间的个体差异[7]。而3D打印不需要模具, 在较低成本快速制造个性化的医疗模型方面具有优势。3D打印具有复杂形状的个性化医学模型, 可以为医生和工程师提供交流媒介, 辅助手术分析和术前演练。打印的模型主要用于术前规划、假肢设计、测试标准等的体外使用的医疗模型、医疗器械, 不进入人体, 所以对使用的材料没有生物相容性的要求。

中国和美国的一组研究人员使用3D打印技术, 将HeLa细胞和明胶/海藻酸盐/纤维蛋白水凝胶成功制造出体外宫颈肿瘤模型[8], 从而构建了肿瘤环境的逼真三维表象。如图1所示, 三维凝胶中的HeLa细胞为表面光

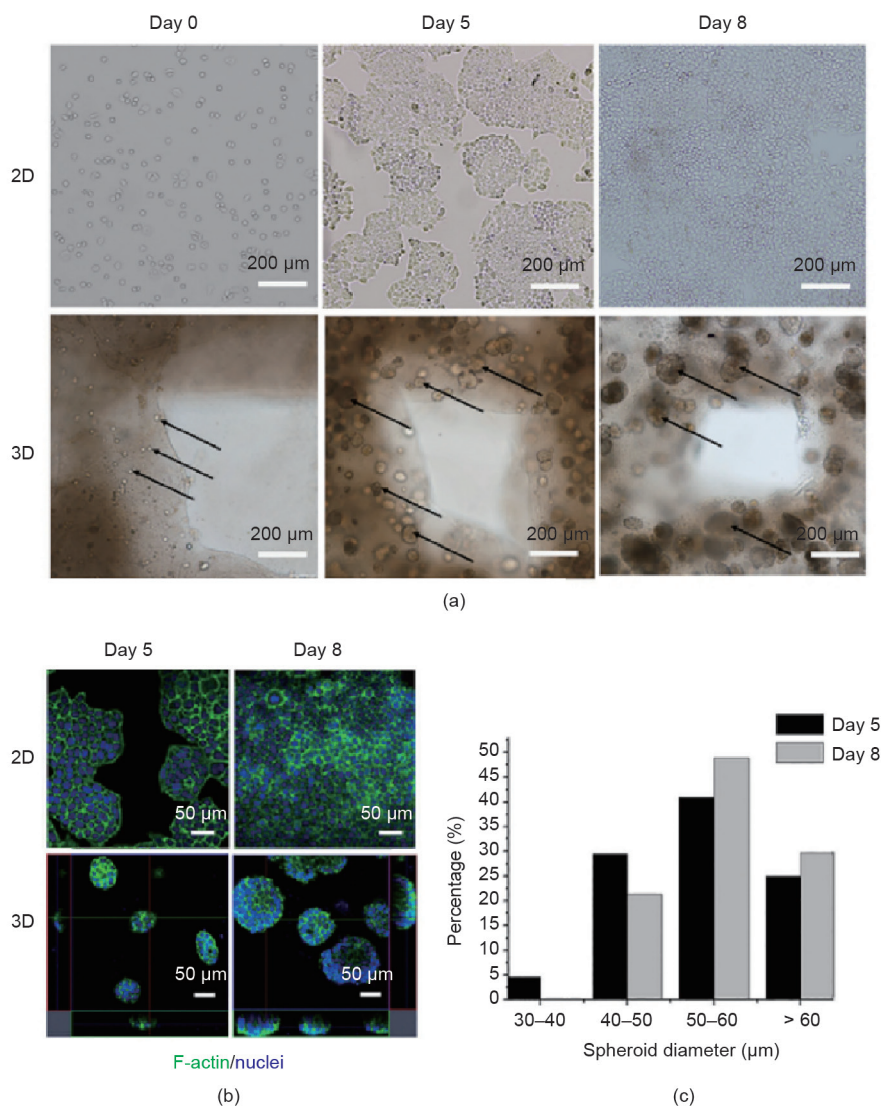


图1. 细胞在三维结构和二维培养皿中的形态变化。(a) 不同时期的HeLa细胞; (b) 染色后的细胞骨架分布; (c) 三维HeLa细胞/水凝胶结构中球状体直径分布[8]。

滑的圆形球体，细胞连接紧密，而在二维组织培养皿上呈扁平细长形态。与二维培养皿相比，三维肿瘤模型更好地揭示了肿瘤细胞的特性，研究人员和临床医生能够更好地了解肿瘤的增殖、分化和扩散。

澳大利亚莫纳什大学的研究人员开发了一套独特的3D打印人体解剖模型，通过使用CT扫描或平面激光扫描器扫描的真实解剖标本，使用石膏状粉末或塑料材料打印出来。该高解析度、高精度的3D打印系列彩色的解剖复制品包括了四肢、胸部、腹部、头部和颈部等人体主要部分（图2），可用于医学院或医院的人体解剖培训。

3D打印出个性化器官模型不仅展示了各个组织、器官在体内的真实情况，还可以帮助医生更清楚地了解患者病情，进行术前规划。在密歇根州的Grand Rapids, Spectrum Health Helen DeVos儿童医院的心脏专家团队宣布，他们已经通过使用多个成像技术获得的数据，3D打印出一个更精细的患者心脏模型（图3），这也是首开先例地综合使用CT扫描和三维超声心动图的数据3D打印出复合模型。以前的3D打印方法只利用一个成像模态，而复合3D打印技术则通过集成各种成像方法和对应数据集来模拟外科手术并减少并发症，以此辅助正确诊断和手术规划。

3D打印模型在几何尺寸和耐用性方面比塑料标本更具竞争力，甚至可以通过组织类型进行颜色或材料编码。然而，除了更高的价格和需要三维数据采集之外，3D打印模型还需要解决诸如打印分辨率有限、打印时间

较长、预期器官或组织可使用的多材料（multi-material）有限的问题[9]。为了提高3D打印模型的有效性，研究人员进一步开发了具有不同触觉弹性、颜色和成分的材料，来模拟人体组织和器官的外观，从而使人们在模型中获得触觉体验[10]。

2.2. 永久性非生物活性植入体

医学应用中永久植入体通常用于牙科和骨科，要求使用的材料植入后具有良好的生物相容性但是不能在体内降解。与传统加工方法相比，3D打印可以实现个性化实时制造任意复杂植入体，尺寸精度高且生产周期短。在骨治疗过程中，因为传统的金属植入体比骨骼硬度更大，很容易发生应力屏蔽现象，最终会损害骨骼的完整性。拓扑优化设计与3D打印整合成为一种新型制造技术，能够有效调节轻型定制植入体刚度[11]。该技术还能与数字化测量设备在数据转换上和空间对接上实现完美兼容，已获得广泛应用。

Zhang等[12]根据胫骨近端骨肉瘤截除的骨质形态，设计并制造了定制型肿瘤关节植入体。图4展示了定制人工假体的术后影像。在该研究中，大多数患者恢复了良好的运动功能，极少出现并发症，但仍需长期关注患者的功能恢复情况。由此表明，在新型辅助化疗和保肢手术期间，定制肿瘤关节假体重建对于胫骨近端或近端胫腓关节骨肉瘤患者产生了令人满意的结果。Galasso等[13]还将定制的组配式股骨远端假体植入了一位20岁的患有IIB期骨肉瘤患者体内。术后10个月，患者膝关节活

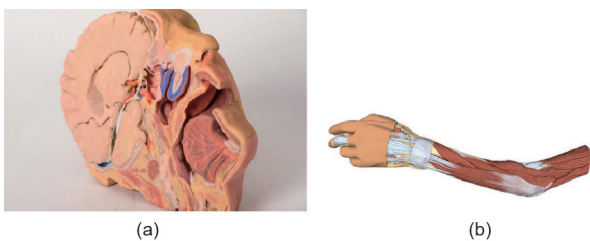


图2. 莫纳什大学公布的3D打印人体解剖模型套件，包括头部（a）和手臂（b）。

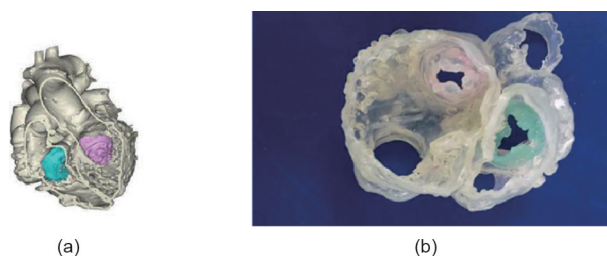


图3. (a) CT扫描和三维超声心动图数据模型；(b) 综合多种医学成像技术的3D打印心脏模型。

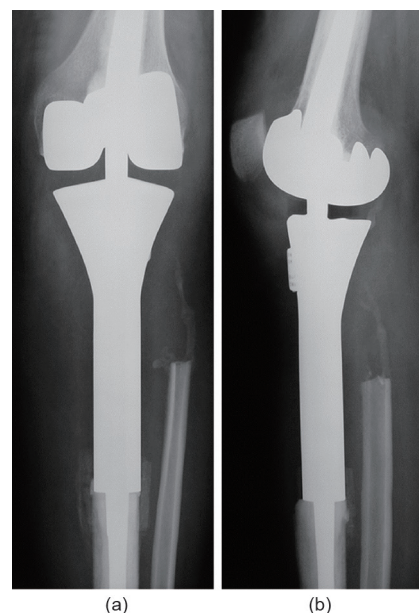


图4. 定制人工假体重建术后正位（a）和横向（b）的X射线影像[13]。

动范围达到0~110°，无需支撑就能够完全无痛负重。

目前，3D打印永久植入体已较为成熟，对此研究主要趋于三个方面。一是致力于开发具有更好综合性能的医用材料。Winder等[14]就使用立体光刻树脂直接制造了定制的颅骨钛合金植入体[图5(a)]，大大简化了制造工艺。二是使用先进制造技术，制造出与骨组织力学性能匹配的植入体结构。德国SLM Solutions公司利用激光选区熔化技术(SLM)为一位澳大利亚患者制造了钛髌关节植入体[图5(b)]，该植入体强度高、轻量化，并且能够很好地与人体组织相容。三是对现有成熟医用材料进行表面改性来提高其生物相容性，以满足医学应用要求。如图6(a)所示，西安交通大学边卫国等[15]将所研制的羟基磷灰石(HA)涂层多孔钛作为载体，将其与骨成型蛋白-2(BMP-2)通过明胶复合，成功制备了具有骨传导性和骨诱导活性的三维复合多孔明胶涂层钛。相比于对照组[图6(b)]的组织切片，图6(c)、(d)表明，6周后BMP-2/凝胶/HA多孔钛组中形成了更多表面直接接触的新骨。24周后多孔钛内部完全长满新

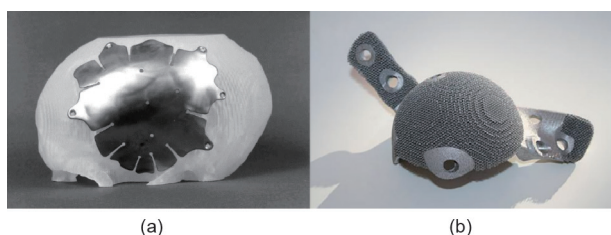


图5. (a) 定制固定钛板的头骨的光固化树脂模型；(b) 德国SLM Solutions制作的髌关节植入体[14]。

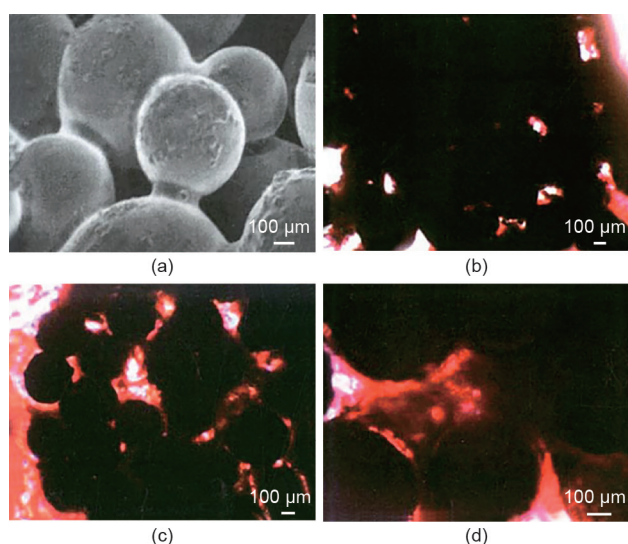


图6. (a) BMP-2/明胶/HA多孔钛复合体的X线片；(b) 植入HA涂层多孔钛6周后的组织切片观察；植入BMP-2/明胶/HA多孔钛复合体6周(c)和12周(d)后组织切片观察。

骨，有效促进骨的早期愈合。除了羟基磷灰石，其他凝胶材料也能作为金属支架涂层。Sing等[16]整合SLM技术与渗透胶原蛋白，以构建具有钛/1型胶原和钛-钽/1型胶原的双相支架。胶原在细胞分化和生长中发挥促进骨和血管再生的作用，支架则提供所需的机械强度。

表面改性甚至可以抑制细菌黏附和会导致感染的长期生物膜的形成。研究人员发现，尽管宿主防御和常规抗生素可以消除由浮游细菌引起的感染，但它们对细菌形成的生物膜无能为力。因此，避免初始细菌黏附形成生物膜对降低植入体的感染风险至关重要[17]。最近的研究表明，使用两性离子化对生物材料进行化学改性来调节植入体表面的抗菌性能，特殊表面纳米形貌或结构对于控制和预防植入体的细菌黏附也是有效的。Zong等[18]通过直写封装技术，设计和合成具有细菌抗黏附特性和体外生物相容性行为的两性离子HA。与未修饰的HA相比，这些HA表面上的两性离子对的有效相互作用将细菌黏附降低了90%以上，并且在实验过程中保留了HA的体外生物相容性。Izquierdo-Barba等[19]还发现，采用磁控溅射(MS-GLAD)的掠射角沉积技术，涂覆Ti纳米结构的Ti6Al4V具有高的纳米柱密度，而且严重损坏细菌黏附性，抑制生物膜形成。这些防止细菌黏附的方法为满足医疗要求的3D打印永久性植入体提供了新方向。

2.3. 制造局部生物活性可生物降解支架

根据成形过程中是否直接操作细胞，有两种不同的方法来人工制造组织或器官。一种是先成形三维支架再接种细胞，称为组织工程[图7(a)]或细胞间接组装[20]。无论是否封装活细胞，生物相容性材料、生长因子和物理因子都可以用来制造仿生组织样微结构支架[21]。另一种方法则同时将细胞和生物材料成形复合结构，称为细胞直接组装[1]。如图7(b)、(c)所示，将细胞和凝胶的混合物封装到另一种具有良好力学性能的凝胶制备的三维支架，或者直接打印细胞和凝胶的混合物来控制细胞的空间分布，甚至实现原位修复。可生物降解支架作为细胞外基质仿生结构，在该过程中占据重要地位。与传统支架成形方法相比，3D打印可整体成形微观孔隙与宏观外形的复杂结构，并能有效控制支架的微观结构和理化性质。

作为细胞依附的载体，要求支架材料具有良好的生物相容性和可生物降解性，而且支架植入后必须能够与人体组织反应以促进组织再生。作为一种新型功能材

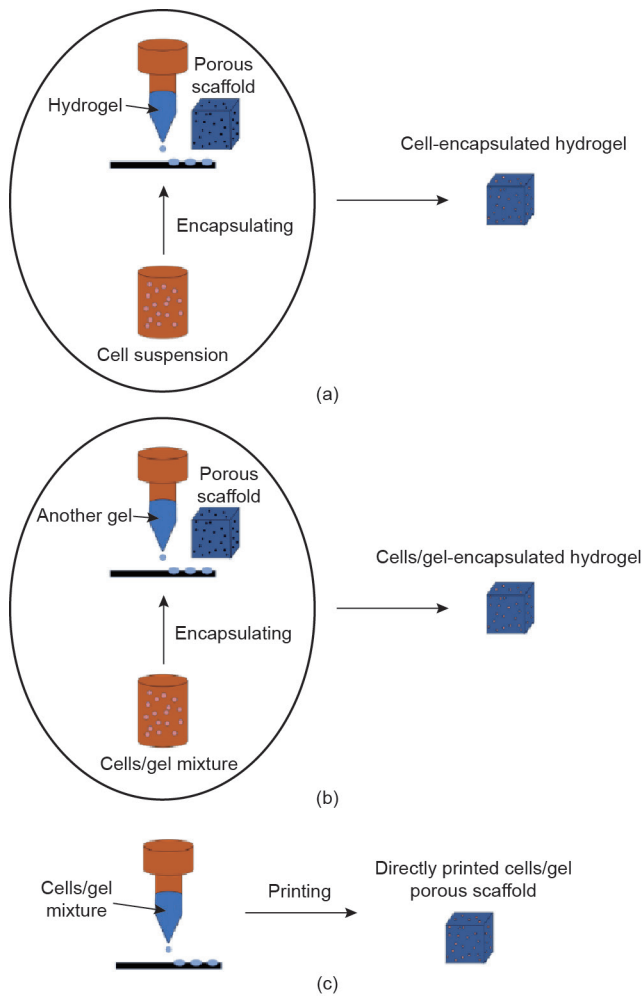


图7. 个性化可生物降解支架的三种加工方法示意图。(a) 将细胞直接封装到凝胶支架中；(b) 将细胞/凝胶混合物封装到三维支架中；(c) 细胞/凝胶直接打印。

料，三维网络结构凝胶具有类似于细胞外基质的仿生特性，能够进一步帮助细胞迁移和生长，从而提高组织再生和修复速度。越来越多的研究人员已经意识到使用这些生物材料作为细胞移植和延迟释放生长因子的载体，因为凝胶的特性使它们特别有利于软组织和器官的修复和再生[22]。在修复组织时，研究人员非常注重增加或加速血管形成，这也是临床治疗上的重要问题。因此，一个研究小组[23]设计了一种新概念，其中复合支架由多孔薄膜和长丝网组成，它们分层交替以促进血管生长。为了改善三维支架逐层堆积模式并拓宽网络设计空间，三维仿生微血管网络甚至可以通过直写封装技术，在可光固化的凝胶库中进行打印以制造所需的微血管网络[24]。原位打印三维支架能够有效促进大块组织再生。例如，通过雾化喷嘴，纤维蛋白/胶原凝胶和凝血酶可以同时沉积打印在成纤维细胞层上[25]。在该研究中，

大伤口最终完全愈合，这表明原位皮肤打印可用于立即修复伤口。

2.3.1. 支架特性

临床治疗中3D打印个性化支架适用于不同的患者以及不同的症状，在生物理化性质、结构特点、力学性能等方面均有要求，需要具备以下特性[26]：用于细胞生长和营养物质、代谢废物流动运输的三维多孔的互联孔隙网络；生物相容性和匹配细胞/组织在体外和（或）体内生长的可控降解和吸收速度；用于细胞附着、增殖和分化的合适表面化学；与植入部位的组织相匹配的力学性能。

2.3.2. 支架分类

(1) 细胞间接封装：将细胞直接封装到凝胶支架。对于细胞间接封装，细胞被接种到多孔凝胶支架中[图7(a)]。基于支架主要制造技术，可以将快速成形的高含水量、优异生物相容性和可控生物降解的支架初步分类为[27]：①挤出成形；②喷墨成形；③微阀成形；④激光辅助生物打印。基于挤出原理的生物打印技术结合流体分配系统和自动化机器人系统来实现挤出和生物打印。Ozbolat和Hospodiuk [28]使用计算机控制和沉积系统实现圆柱形细丝与接种细胞精确沉积的定制三维结构。基于喷墨原理的生物打印技术（包括连续喷墨生物打印和按需滴定喷墨生物打印）具有简单灵活的巨大优势，也可以精确控制细胞和生物材料的沉积。该方法利用重力、大气压力和流体力学来物理操纵生物墨水产生液滴，然后喷射到接收基板上[29]。基于微阀原理的生物打印技术也是一种按需滴定喷墨打印，但与基于喷墨原理的生物打印相比，它是一种更可靠的高通量打印系统[30]。可以实现具有高细胞活力和高通量率的多细胞和生物材料的精确沉积控制，并具有适中的打印精度。与前三种生物打印方法不同，激光辅助生物打印的基板通常涂有激光吸收材料的薄层和生物材料的第二厚层，如封装细胞的凝胶。激光脉冲聚焦到激光吸收层中，接着在激光聚焦区域中该层蒸发产生高压蒸汽泡。蒸汽泡通过蒸汽压向前推动生物材料，生物材料液滴沉积在收集器载玻片的预定位置上[31]。

由于快速3D打印精细结构结合CT影像、CAD/CAE仿生功能结构设计、凝胶/细胞复合过程的优势，通过不同3D打印技术制造的个性化封装细胞支架在细胞实验和手术移植过程中都取得了很好的效果。表1总结了

表1 国际不同技术制备的个性化支架的研究和最新进展

| Researchers | Material | Manufacturing | Encapsulated cells | Achievements |
|------------------------|------------------------------|--|--|---|
| Fedorovich et al. [32] | Alginate hydrogel | 3D fiber deposition | Human chondrocytes and osteogenic progenitors | Possibility for the repair of osteochondral defects |
| Gauvin et al. [33] | GelMA | PSL | HUVECs | Demonstrating the biological functionality of the micro-fabricated scaffolds |
| Lam et al. [34] | Starch-based polymer powders | 3DP | — | The scaffold properties were characterized |
| Chen et al. [35] | nHA/PLGA | Low-temperature deposition manufacturing | Chondrocytes of fetal rabbit | Good biocompatibility, proper pore size and porosity |
| Hutmacher et al. [36] | PCL | FDM | Primary human fibroblasts and periosteal cells | The PCL scaffolds have the potential to be applied in tissue engineering bone and cartilage |
| Fisher et al. [37] | PPF | Ultraviolet laser stereolithography | — | Photocrosslinked PPF scaffolds are biocompatible in both soft and hard tissues |
| Williams et al. [38] | PCL | SLS | Fibroblasts | <i>In vivo</i> results show PCL scaffolds with high-precision enhancement of tissue ingrowth |
| Zhang [39] | PLGA/PU | FDM | — | Mechanical properties of scaffolds are better than those of commercialized artificial blood vessels |
| Kim et al. [40] | PLGA | 3DP | HCs and nonparenchymal liver cells from Lewis rats | Cells can attach to and survive on the 3D scaffolds in both static and flow conditions |
| Pati et al. [41] | PCL | 3DP | Adipose tissue, cartilage tissue, and heart tissue | High cell viability and functionality of the printed dECM structures, and enhanced structural maturation of myoblasts |

GelMA: gelatin methacrylate; PSL: projection stereolithography; HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; 3DP: three-dimensional printing; nHA/PLGA: nanohydroxyapatite/poly lactic-co-glycolic acid; PCL: polycaprolactone; FDM: fused deposition modeling; PPF: poly propylene fumarate; SLS: selective laser sintering; PU: polyurethane; HCs: hepatocytes; ECM: extracellular matrix.

封装细胞凝胶支架的国际研究和最新进展[32–41]。

(2) 细胞直接封装：将细胞/凝胶混合物封装到三维支架。直接将细胞接种到3D打印支架中容易导致细胞接种率低、无法控制细胞空间分布的缺陷[42,43]。为了解决这些问题，研究人员将细胞/凝胶混合物封装到由另一种凝胶制成的三维支架中，发挥三维支架良好的力学性能和塑性（图8），以及凝胶对细胞均匀包埋和黏附的优势。苏木精-伊红染色切片[图8（b）]和番红O染色切片[图8（c）]上可以观察到均匀分布的凹陷细胞，形成岛状软骨组织。

通过将具有一定强度的胶原凝胶与具有某些机械性质的快速成形聚乳酸-羟基乙酸（PLGA）支架同时结合，软骨细胞均匀且有效地封装到支架中为软骨细胞提供了合适的三维生长环境。如图9所示，样品表面为梭形细胞，深层为数层已形成软骨陷窝的圆形细胞。大多数紧密堆积的细胞已经成熟，均匀分布的细胞是圆形的，周围有陷窝。生物材料孔隙间有软骨基质形成，促进了岛状软骨生长。支架完全降解后，可见材料降解所留的空隙。Hong等[44]将人类胚肾（HEK）细胞封装到1型鼠尾胶原蛋白溶液，然后将混合物胶凝到打印的PEG-海藻酸钠-纳米黏土网络的联通孔隙中，形成合成水凝胶。

接种细胞在培养7天后保持高活力[图9（c）]，证实含有纳米黏土的高坚韧水凝胶具有良好的生物相容性，适合于细胞长期培养。

(3) 细胞直接封装：直接打印细胞/凝胶。将细胞或细胞/凝胶混合物直接封装到三维支架中只能在体外模拟细胞外基质的仿生结构，支架植入损伤部位甚至可能导致二次损伤和并发症。为了实现体内原位修复，许多研究人员直接将细胞封装到水凝胶，同时控制细胞生长和空间分布[图7（c）]。Hockaday等[45]使用聚（乙二醇）-二丙烯酸酯（PEG-DA）和藻酸盐混合物，结合猪主动脉瓣膜间质细胞（PAVIC）进行打印。图10表明，支架中PAVIC细胞活力在21天内保持接近100%。该方法可用于快速制造细胞植入的解剖异质瓣膜导管。薛世华等[46]混合人牙髓细胞和藻酸盐/明胶凝胶，使用生物打印设备按照一定参数制造出具有定制形状尺寸的支架，细胞密度可控，具有高活力的活细胞黏附在三维网络中。该研究为生物打印技术进一步应用于牙齿组织工程奠定了基础，有望为牙齿再生提供一种新的方法。

3D打印技术不仅能用在体外构建活体生物结构，还可以将凝胶直接打印在缺陷部位进行原位修复，这意味着复杂损伤部位可以被修复而不是替换，甚至还可以应

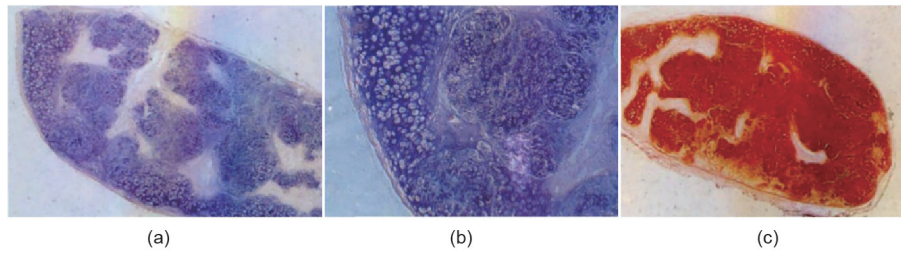


图8. 光镜下, 聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA)-胶原凝胶包埋软骨细胞体内培养12周影像。(a) 苏木精-伊红染色切片 ($\times 40$); (b) 苏木精-伊红染色切片 ($\times 100$); (c) 番红O染色切片 ($\times 40$)。

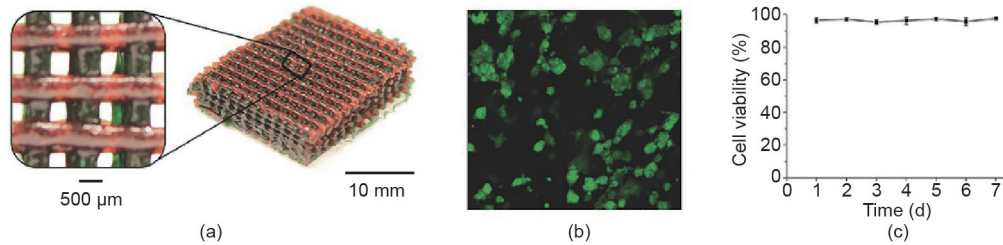


图9. (a) 具有韧性和生物相容性水凝胶打印的网状物; (b) 接种到3D打印网状物中, 注入胶原凝胶的HEK细胞活率实验; (c) 7天后HEK细胞活性[44]。

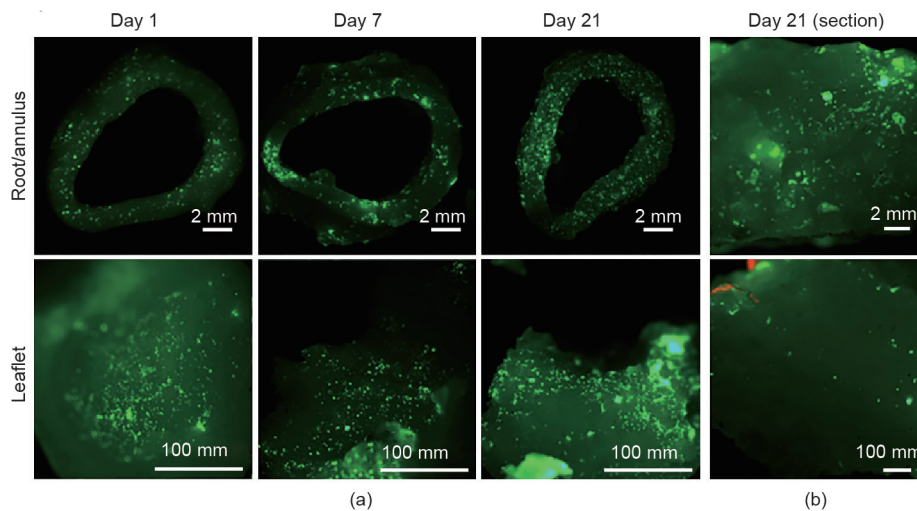


图10. PAVIC细胞活率的影像。(a) 不同时期内, 根部和小叶表面可视的活细胞; (b) 21天后根部和小叶间质组织探测到的细胞[45]。

用到微创修复的新领域。例如, 藻酸盐水凝胶和一种新的脱矿骨基质配方已分别用于软骨和骨的原位修复[47], 修复部位的表面误差在临床上可接受的误差范围内(图11)。通过选择其他材料和适当的接种细胞, 这项技术还可以扩展到生物学领域的整形外科修复, 如微创和个性化的面部重建。Cui等[48]也在细胞/凝胶原位打印方面取得了重大进展, 他们制备了聚(乙二醇)二甲基丙烯酸酯(PEGDMA)和人关节软骨细胞的混合物作为生物墨水, 在紫外线照射下对软骨缺陷部位进行构建原位打印。打印后的细胞均匀分布在凝胶支架中并保持高活力。表2表明, 打印的水凝胶的压缩模量接

近天然关节软骨, 是理想的解剖软骨材料。

虽然原位生物打印已经解决了依赖外部环境因素(如紫外线、温度和钙元素)来引发体外构建组织沉积后相变的问题, 但是在原位打印时还需要精确规划路径和变形。在伤口部位打印意味着不能通过表面处理实现化学改性和改善表面纳米形貌。因此, 研究人员在进行原位生物打印时, 必须更多地考虑防止植入体的细菌黏附。

2.3.3. 增强支架力学性能

个性化支架, 特别是工程软骨替代品, 应提供与细

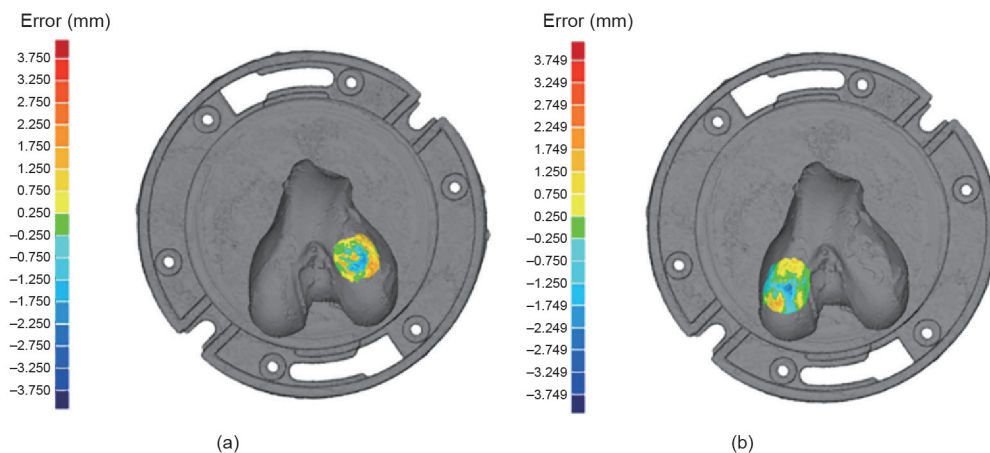


图11. 软骨缺损 (a) 和骨软骨缺损 (b) 的俯视误差图。将打印表面的激光扫描与预损伤CT扫描参考几何结构进行比较[47]。

表2 含有/不含有人软骨细胞的打印/非打印PEGDMA的特性

| | PEGDMA content(% (w/v)) | Mass-swelling ratio | Equilibrium water content (%) | Compressive modulus (kPa) |
|-------------|--|---------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Printed | 10 (without human chondrocytes) | 12.54±0.30 | 9.02±0.19 | 37.75±7.18 |
| | 10 (with human chondrocytes ^a) | 11.80±0.07 | 91.53±0.05 | 30.14±4.41 |
| | 20 (without human chondrocytes) | 6.19±0.10 | 83.85±0.26 | 395.73±80.40 |
| | 20 (with human chondrocytes ^a) | 6.10±0.05 | 83.60±0.14 | 321.06±43.99 |
| Non-printed | 10 (without human chondrocytes) | 12.18±0.01 | 91.74±0.06 | 47.61±2.80 |
| | 10 (with human chondrocytes ^a) | 12.51±0.04 | 92.00±0.03 | 36.12±8.44 |
| | 20 (without human chondrocytes) | 6.68±0.15 | 85.04±0.34 | 483.75±29.47 |
| | 20 (with human chondrocytes ^a) | 6.75±0.10 | 85.19±0.23 | 372.40±37.85 |

^a Human chondrocyte concentration in hydrogels: 5×10^6 cells/mL; w/v: weight/volume.

胞自然环境相等的微应力环境, 保持结构稳定性和完整性, 并具有与软骨下骨和邻近软骨相匹配的机械强度, 来为植入部位提供即时和长期的承重功能[49]。因为目前普遍使用的凝胶材料易收缩、脆性大、力学性能差, 研究人员通常采用交联工艺来改善凝胶材料的力学性能[50], 交联工艺主要分为热敏交联、离子交联和pH交联。在交联过程中使用不同的官能团可防止潜在的细胞毒性交联剂[51]。例如, Wu等[52]使用3D打印技术制造了各种外形的分层有序孔隙结构的生物活性玻璃支架, 并用聚乙烯醇(PVA)作为热交联剂来改善力学性能。

同时使用多种交联工艺, 如用离子交联消耗机械能, 共价交联保持弹性, 可以显著提高力学性能。Hong等[44]构建了一个相互渗透的网络, 制备了高延伸性、高韧性水凝胶(图12)。这种生物兼容性水凝胶的韧性依赖于两个机制的联合体: 海藻酸钠的可逆 Ca^{2+} 交联消耗机械能, 而在大变形下, PEG共价交联保持弹性。增加高分子材料的浓度也能提高复合水凝胶的力学性能。

研究人员近期还开发了许多具有抗撕裂、高细胞量和类似多层人工软组织的高强度水凝胶, 如双网络

(DN)水凝胶[53–57]。Gong[58]发现由聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸)(PAMPS)聚电解质和聚丙烯酰胺(PAAm)中性聚合物制成的高强度DN水凝胶具有独特的性能: 低摩擦、低磨损和细胞相容性[图13(a)]。Sherwood等[59]设计了多层软骨-骨组织工程复合支架[图13(b)]。支架上部是由D,L-PLGA/L-聚乳酸(PLA)构成的软骨诱导部分, 以促进均质细胞接种, 下部是由L-PLGA/磷酸三钙(TCP)组成的骨诱导部分, 有利于骨向内生长。中间的过渡区域则由梯度材料和梯度孔隙构成, 以防止层间剥离。体内试验表明, 该支架的力学性能可满足体内植入和全关节置换的需要。

Cui等[60]利用双喷头低温纤维沉积技术制备了用于外周神经修复再生的双层聚氨酯(PU)-胶原导管。图14为双层PU-胶原神经导管, 这种结构设计结合了内部较好组织相容性的胶原和外层较好力学性能聚氨酯的优势。

2.4. 组织、器官直接打印

传统组织工程是将细胞封装到可降解生物支架中,

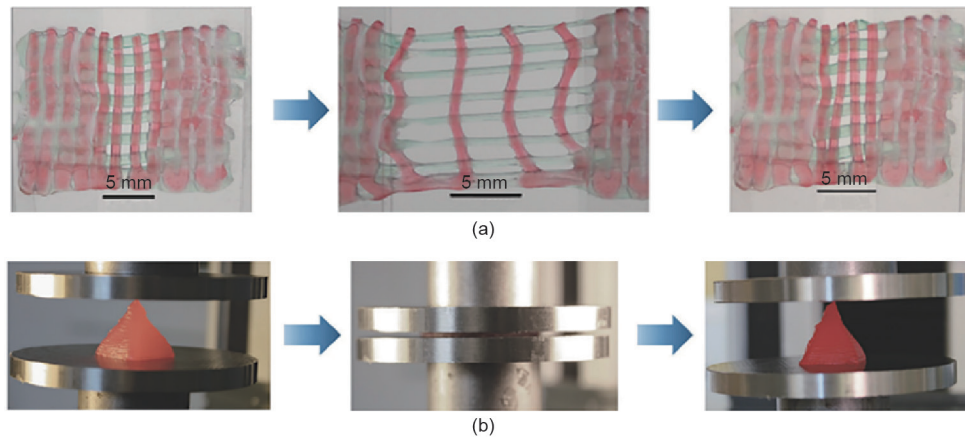


图12. (a) 打印的双层网格单轴拉伸到初始长度的三倍, 松弛后几乎完全恢复其原始形状; (b) 打印的锥状物承受95%的压缩应变, 松弛后恢复原始形状[44]。

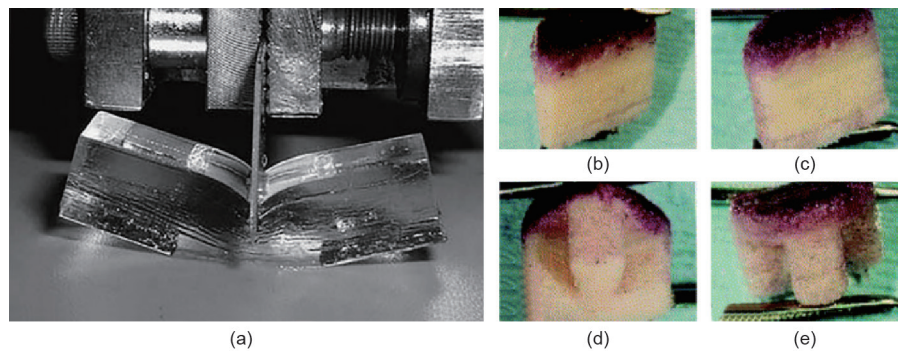


图13. (a) 高强度PAMPS/PAAm双网络水凝胶的影像; (b) 细胞顶部接种后MTT染色的骨软骨支架的剖视图; (c) 细胞顶部接种后MTT染色的骨软骨支架的剖视图; (d) 细胞顶部接种后MTT染色的骨软骨支架的外部视图; (e) 细胞旋转接种后MTT染色的骨软骨支架的外部视图[53–57]。

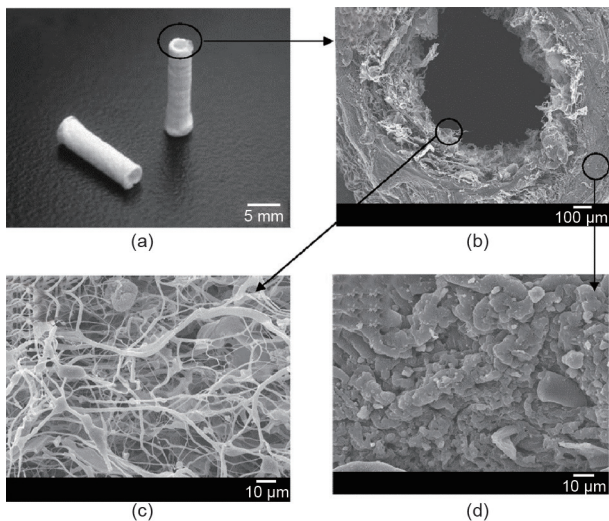


图14. 双层PU-胶原神经导管的形态特征。(a) 双层导管的图片; (b) 界面层(截面)的扫描电镜图像; (c) 胶原层的显微组织; (d) PU层的显微组织[60]。

细胞无法精确接种到支架内部, 生长因子也只能影响到支架表面细胞的生长分化。所以, 越来越多的研究人员关注细胞或生长因子的直接打印技术, 其最终目标是

制造出组织、器官。2000年, 美国Clemson大学Thomas Boland教授提出“细胞及器官打印”的崭新概念, 这也是现代意义上生物3D打印技术的起源, 即以种子细胞(干细胞、已分化细胞等)、生长因子和营养成分等组成的“生物墨汁”, 结合其他材料层层打印出定制结构, 经培育处理形成有生理功能的组织或器官。

然而实现组织、器官打印最大的困难并不是加工工艺本身, 而是复制器官内部错综复杂的血管网络, 因此, 许多研究人员将关注点转向血管打印。2009年, 美国Ganovo公司首次使用3D打印技术制造出人工血管[61]。美国南卡罗莱纳医科大学和密歇根大学利用3D打印装置, 以混合琼脂糖和细胞作为支撑, 打印出管径小于3 mm的血管分支网[62]。

哈佛大学Wyss仿生工程研究所的科学家[63]报道了一种新的用于制造复杂结构3D生物打印的方法, 使用多个打印头和特殊的“墨水”制造出复杂微血管结构。在制造带有血管、多种细胞和细胞外基质(ECM)组织过程中, 多个独立控制打印喷头的3D生物打印机用于同时成形精确的多种材料异质结构。甲基丙烯酸明胶

(GelMA) 作为细胞和基质载体, 而不同荧光团染色的聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)用于标记不同的生物材料[图15 (a)、(b)]。接着同时打印异质3D架构[图15 (c)], 每层由不同的GelMA组成。可以清楚地观察到绿色荧光蛋白表达的人新生儿真皮成纤维细胞 (HNDF) 和红色荧光蛋白表达的人脐静脉内皮细胞(HUVEC) [图15(d)、(e)], 这证明了HUVEC细胞可以在打印的血管中黏附和增殖, 最终分化成可移植的、全功能活组织甚至器官。

国内外已经有研究人员成功打印出组织或器官。Michael等[64]利用激光辅助生物打印技术将角质细胞和纤维细胞在精确的三维空间中分层打印, 制成了人工皮肤替代物(图16)。将打印的皮肤结构置于小鼠皮肤的伤口上, 包括在人工脱细胞异体真皮顶部的标记为红色的成纤维细胞和绿色的角质形成细胞[图16 (b)], 而小鼠皮肤的其他部分保持完整作为对比。在裸鼠背部皮肤褶皱腔上测试皮肤结构时, 打印的细胞保持活性并能持续增殖分泌细胞外基质。此外, 如图16 (c) 所示, 在伤口边缘也生长了一些血管有利于修复。这种多层细胞生物打印技术为今后更复杂的组织打印奠定了基础。

Mannoor等[65]将接种软骨细胞的藻酸盐水凝胶基质3D打印成人耳形状, 再将银纳米粒子打印成耳蜗形

状, 制成仿生耳[图17 (a)、(b)], 这种打印出来的仿生耳比人耳能接收到更广频率的声音。美国康奈尔大学的生物学家使用干细胞和生物高分子材料也打印出能正常工作的心脏瓣膜[图17 (c)], 而且干细胞能够逐渐转换为人体细胞。目前也有3D打印器官成功用于临床治疗。如图17 (d) 所示, 密歇根大学的研究人员在有先天性气管缺陷的婴儿喉咙里植入了3D打印人工气管, 帮助其正常呼吸, 这也是全球首例成功的3D打印人体器官移植手术。

3. 3D 打印生物医用材料

生物医用材料(图18)主要包括金属材料(钛合金)、高分子材料[热塑性聚合物(聚苯乙烯和PLGA)、弹性体聚合物(PDMS)、软水凝胶]和陶瓷材料(HA), 已经被广泛用于3D打印永久性植入体或细胞质基质支架[66]。

3.1. 医用金属材料

医用金属材料主要用于制造永久植入体, 如不锈钢、钴铬合金、钛合金[图18 (a)], 钽合金的骨科或牙

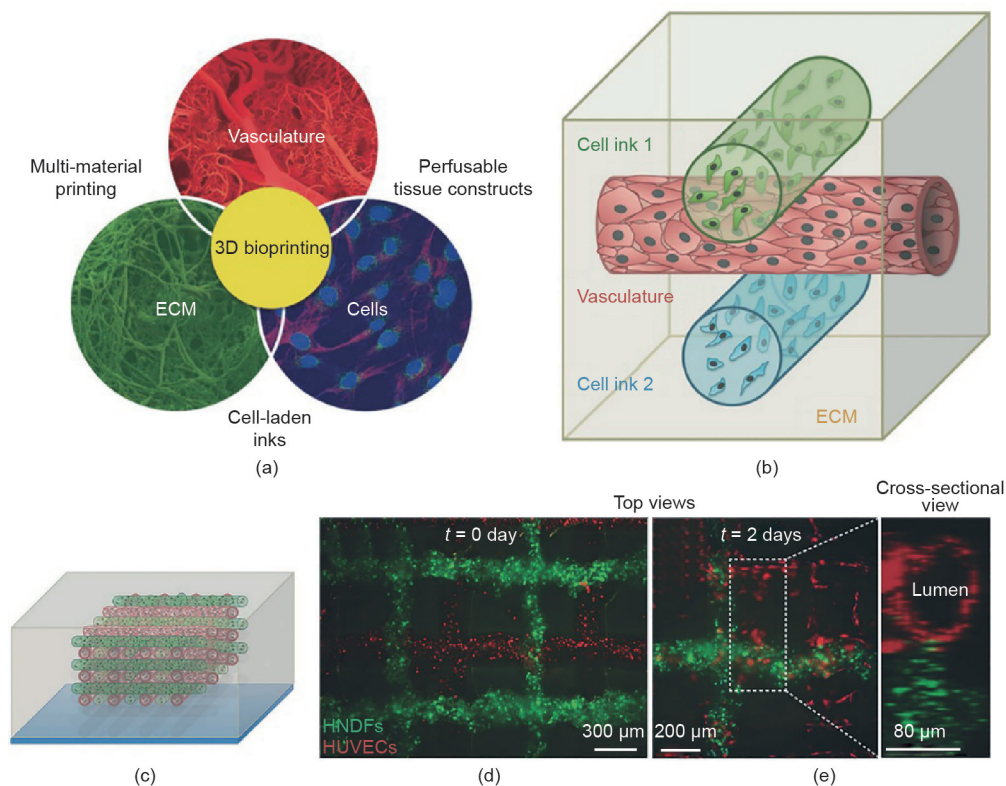


图15. (a~b) 3D生物打印示意图; (c) 培养的工程组织结构示意图; (d) 工程组织结构培养0天的荧光示意图; (e) 工程组织结构培养两天的荧光示意图。(e) 中的剖视图显示了内皮细胞排列在三维血管网络管腔[63]。

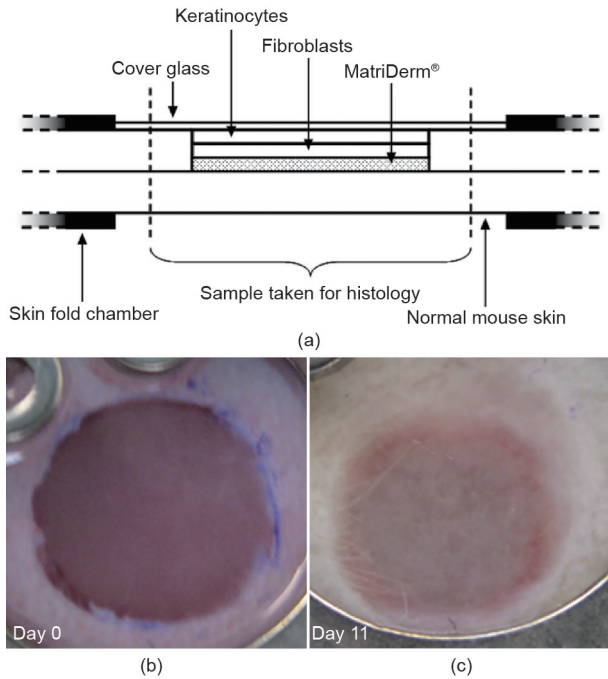


图16. (a) 小鼠成纤维细胞和角质形成细胞形成的特殊三维结构示意图; (b) 移植后在裸鼠背部皮肤褶皱腔伤口部位的组织工程皮肤结构; (c) 移植11天后在裸鼠背部皮肤褶皱腔伤口部位的组织工程皮肤结构[64]。

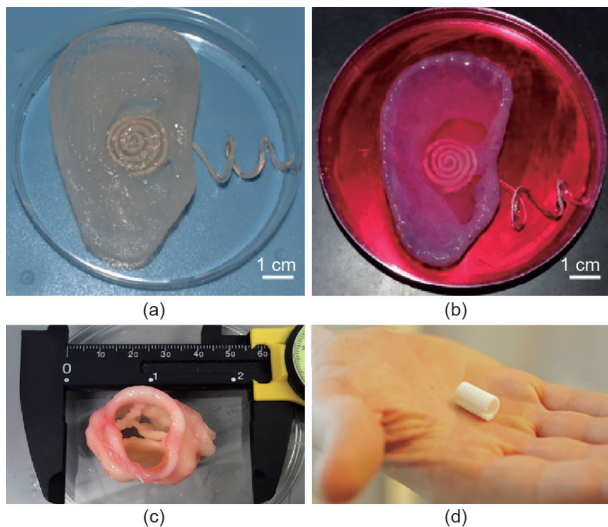


图17. (a) 3D打印仿生耳的图像; (b) 3D打印仿生耳体外培养的图像; (c) 3D打印人造气管; (d) 3D打印心脏瓣膜[65]。

科植入体，这些金属材料具有良好的生物相容性，符合医学标准。

3D打印金属植入体晶粒细小，具有更好的力学性能，因此比传统植入体更具优势。而且高度受控的打印环境可以确保打印部件的高纯度，获得材料所需性能。3D打印个性化制品的设计复杂度减小，还可以定制具有类似人骨或牙齿力学性能的植入体。表面处理，如电化学沉积、化学改性和碱热处理通常用于提高多孔金属

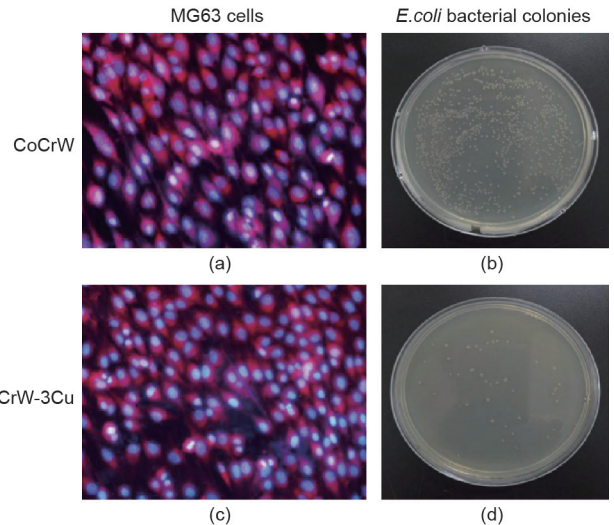


图18. 不同材料的3D打印制品。(a) 钛合金植入体; (b) 新型可再吸收陶瓷生物材料制成的聚合物支架; (c) 胶原凝胶支架[78]; (d) 羟基磷灰石支架[79]。

植入体的生物活性。作为金属3D打印价值链的一部分，热处理也可以同时调节生物相容性和力学性能。经过合适的热处理工艺和参数，SLM成形的 Ti_6Al_4V 表面更亲水、粗糙和均匀。表面特征分析表明，热处理后的植入体在抗开裂和疲劳方面具有更稳定的模量和硬度，而细胞增殖分析显示，由于热处理后生物相容性得到优化，细胞黏附增强且分布均匀[67]。因此，通过3D打印金属材料 and 后续热处理制造的定制植入物有利于获得所需的物理化学性质，而且避免了改善细胞相容性方面的额外成本。

由于常见 Ti_6Al_4V 多孔支架中Al、V元素有细胞毒性，目前正在开发用于医学应用的其他金属材料。例如，Ti-Nb合金由于其非常低的弹性模量、优异的生物相容性、高强度和低细胞毒性元素含量，非常适合生物医学应用[68]。为了进一步降低植入体弹性模量以最小化应力屏蔽的不利影响，可以在钛合金中添加钽作为稳定元素[69]。SLM成形的Ti-Ta块体比 Ti_6Al_4V 具有更高的强度和更低的弹性模量。Sing等[70]甚至证明了基于回归分析方法的激光制造多孔Ti-Ta蜂窝晶格结构的可行性，工艺参数极大地影响了Ti-Ta合金晶格结构的尺寸精度和力学性能。研究人员还可以使用SLM技术成形复杂结构，同时保持Ni-Ti合金超弹性和形状记忆功能特性[71]。特殊的Ni-Ti单位细胞在皮质骨和骨小梁中表现出压缩特性，并显示出更好的疲劳寿命。镁合金因其低的腐蚀电位而在人体内完全分解，与天然骨中镁相似的杨氏模量也能降低应力屏蔽效应，在植入体方面具有很大的应用潜力[72]。此外，Mg元素也是促进骨细胞增殖和

分化的人体必需元素之一。

目前研发出的一些具有力学性能和生物相容性的新型抗菌合金也可以解决细菌感染或炎症问题，如Co-CrWCu[73]中铜元素就具有抗菌活性并能促进新陈代谢。Lu等[74]研究了Cu元素对广泛用于整形外科和牙科的CoCr合金的影响。研究结果证实CoCrW无细胞毒性，在细胞活性测试期间，细胞能够在合金表面上黏附和增殖[图19 (a)、(c)]。抗菌测试证实了添加一定量Cu后显示出的对大肠杆菌的优异抗菌性能[图19 (b)、(d)]。

3.2. 医用高分子材料

高分子材料包括天然生物材料和人工生物材料，主要用于制备医学模型和可降解支架。广泛使用的天然医用高分子材料有壳聚糖、胶原[图18 (c)]、胶原蛋白等，细胞相容性好，能够促进细胞黏附增殖及维持细胞表型，但是力学性能差，易变形。人工高分子材料如聚乳酸、聚乙烯醇、聚己内酯[75]等，可以精确控制外形、相对分子质量和降解速度。然而，高分子材料表面缺乏细胞黏附的识别位点，细胞分布不均匀且容易流失。因此，需要增强高分子材料的力学性能、流动性和表面粗糙度等，使其适合打印过程，满足医学植入体要求。

Yue等[76]就将更多的复杂功能整合到高分子材料中。他们制备了抗菌复合树脂，发现这种抗菌3D打印植入体会接触杀菌，而且不会损害人体健康细胞，最终可能会取代传统牙科填充物。而且，3D打印抗菌高分子材料的方法可以应用到其他非医学应用领域，如食品包装、水净化甚至是儿童玩具。

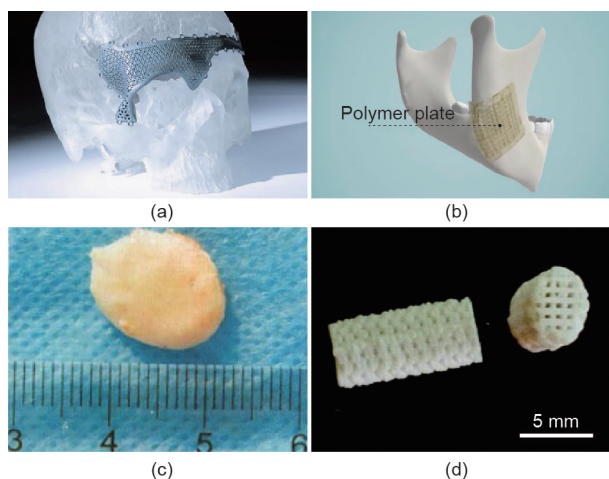


图19. (a) 封装到CoCrW合金的MG63细胞的荧光显微镜图像；(b) 在CoCrW合金上培养的大肠杆菌菌落；(c) 封装到CoCrW-3Cu合金的MG63细胞的荧光显微镜图像；(d) 在CoCrW-3Cu合金上培养的大肠杆菌菌落。

3.3. 医用陶瓷材料

陶瓷材料（主要是羟基磷灰石和磷酸三钙）在体内理化性能稳定、具有良好的生物相容性和骨传导性，广泛用于人工关节和牙科植入体[77]。这种材料在3D打印过程中易控制形状尺寸且易着色，是理想的口腔材料。由欧盟RESTORATION项目开发的新型可再吸收陶瓷生物复合材料[图18 (b)]将很快用于矫形和颌面应用。在微创手术过程中，植入3D打印定制关节假体将大大减少患者疼痛。羟基磷灰石[图18 (d)]是一种骨和牙齿组织中关键矿物成分，在临床应用中适合作为激光选区烧结（SLS）和SLM等快速原型技术的陶瓷材料。

与金属和高分子材料相比，大多数陶瓷材料在烧结后具有不同的固结机制和明显的残余应力，可能会影响其机械强度和孔隙形态。在SLM或SLS过程中，粉末逐层堆积、激光-粉末相互作用、热应力和残余应力等是形成完全致密陶瓷结构的关键因素[80]。此外，还需要在体外细胞中测试残留黏合剂的毒性。未来对全致密陶瓷的研究应着重于提高其生物力学性能、打印分辨率、生物相容性和持续药物释放等方面[81]。

上述生物材料在临床应用中各具有优缺点，因此，植入体通常需要整合不同材料以实现多种功能[82]。例如，三种类型的生物材料（即金属、高分子和陶瓷材料）可用于制造多孔支架以满足植入物要求。研究人员将羟基磷灰石涂层多孔Ti作为载体，与BMP-2通过明胶复合以成功制备三维多孔活性复合材料[15]。

对材料的研究将加速生物医学应用中3D打印技术的发展。除了现有传统材料，形状记忆材料（SMM），也称为智能材料，正引起广泛关注。具有可逆性的智能材料可以在特定的外部刺激下以预定方式改变其形状或特性[83]。将定制的植入体移植到伤口中，然后在温度、压力或磁场变化时转变其形状以适应组织缺陷的尺寸。因此，3D打印智能材料在生物医学应用中显示出微创治疗方面的巨大潜力。

4. 局限性

面向医学应用的3D打印技术属于新兴且快速发展的交叉学科，与材料科学、生物学和临床科学紧密结合，能够有效地解决器官移植的供体紧缺问题。现阶段虽然可以直接打印细胞，但离体外构建组织仍然非常遥远[84]。细胞外基质是一个组分很复杂的体系，因此体外难以模拟其结构和生物学功能。现有技术主要是堆叠

接种细胞的凝胶结构,无法解决细胞营养和氧气供应的问题。对于尺寸较大的支架,目前也无法提供足够细胞量,而且前期附着支架表面的细胞与后期的相比,无法获得足够的营养供应。这也就是说,细胞存活在非均衡三维空间中[85]。此外,打印的支架、组织甚至器官必须解决细胞存活、发育、分化和融合的一系列问题。

其次材料方面也存在限制。永久植入体一般选用具有高弹性模量的医用金属材料,容易导致植入体和骨之间的弹性失配。打印可降解支架往往使用生物相容性好但力学性能较差的天然高分子材料,如胶原、海藻酸钠和其他凝胶材料。而且目前国际上对于医用材料没有统一标准,分析材料的优劣仍无系统可靠的指标或充足的实验数据,只能依靠其结构、功能和临床效果等方面来综合评判。

此外,尽管近年来涉及多学科知识的面向医学的3D打印技术发展迅速,但3D打印最初用于工程学而不是医学。目前,医学研究人员和工程学研究人员的研究领域和结构框架相对独立,缺乏专业人才,这也在一定程度上限制了其发展。而且细胞诱导技术和伦理问题也不可忽视,因此面向医学3D打印技术的真正应用还需要经历长期努力[86–88]。

5. 结论及未来趋势

面向医学3D打印技术发展至今已经取得了很大进展。其中,器官模型和永久性植入体的制造技术日趋成熟,研究人员已成功使用多种方法增强个性化可降解支架的力学性能。尽管直接打印组织、器官仍处于初始阶段,但国内外研究人员已从打印血管着手来推进组织、器官直接打印。3D打印医用生物材料包括金属、高分子和陶瓷材料,通常需要集成多种材料以实现打印部件中的复杂功能。尽管已有3D打印制品用于临床治疗,但3D打印技术在材料和体外构建细胞质基质方面仍然受到限制。目前离打印出具有生物活性的组织和器官、真正将其应用于临床应用的目标,还有许多工作要做。

研究人员一直在致力于解决上述问题,真正实现将3D打印技术与组织工程结合,主要研究工作包括开发新设备以保证支架的高孔隙率和尺寸精度;研究适用于不同医学应用3D打印技术的高性能材料;为3D打印支架创建统一标准;加强市场监管以优化临床应用植入体;为加强医院、企业和研究机构之间的沟通建立3D

打印平台。这些举措将进一步推动3D打印组织工程支架的发展。

致谢

本工作由国家重点研发计划(2016YFB1101303)、武汉市青年科技晨光计划(0216110066)和华中科技大学学术前沿青年团队支持计划资助。

Compliance with ethics guidelines

Qian Yan, Hanhua Dong, Jin Su, Jianhua Han, Bo Song, Qingsong Wei, and Yusheng Shi declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Wolfe RA, Roys EC, Merion RM. Trends in organ donation and transplantation in the United States, 1999–2008. *Am J Transplant* 2010;10(4 Pt 2):961–2.
- [2] Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M, Lee MW. Indirect fabrication of collagen scaffold based on inkjet printing technique. *Rapid Prototyping J* 2006;12(4):229–37.
- [3] Butscher A, Bohner M, Doebelin N, Hofmann S, Müller R. New depowdering-friendly designs for three-dimensional printing of calcium phosphate bone substitutes. *Acta Biomater* 2013;9(11):9149–58.
- [4] Saunders RE, Gough JE, Derby B. Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing. *Biomaterials* 2008;29(2):193–203.
- [5] Xu T, Zhao W, Zhu JM, Albanna MZ, Yoo JJ, Atala A. Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials* 2013;34(1):130–9.
- [6] Derby B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science* 2012;338(6109):921–6.
- [7] Wang K, Ho CC, Zhang C, Wang B. A review on the 3D printing of functional structures for medical phantoms and regenerated tissue and organ applications. *Engineering* 2017;3(5):653–62.
- [8] Zhao Y, Yao R, Ouyang L, Ding H, Zhang T, Zhang K, et al. Three-dimensional printing of HeLa cells for cervical tumor model in vitro. *Biofabrication* 2014;6(3):035001.
- [9] Yap YL, Tan YSE, Tan HKJ, Zhen KP, Xue YL. 3D printed bio-models for medical applications. *Rapid Prototyping J* 2017;23(2):227–35.
- [10] Mogali SR, Yeong WY, Tan H, Tan GJS, Abrahams PH, Zary N, et al. Evaluation by medical students of the educational value of multi-material and multi-colored three-dimensional printed models of the upper limb for anatomical education. *Anat Sci Educ* 2018;11(1):54–64.
- [11] Altamimi AA, Fernandes PRA, Peach C, Cooper G, Diver C. Metallic bone fixation implants: a novel design approach for reducing the stress shielding phenomenon. *Vitr Phys Prototyping* 2017;12(2):141–51.
- [12] Zhang Y, Yang Z, Li X, Chen Y, Zhang S, Du M, et al. Custom prosthetic reconstruction for proximal tibial osteosarcoma with proximal tibiofibular joint involved. *Surg Oncol* 2008;17(2):87–95.
- [13] Galasso O, Mariconda M, Brando A, Iannò B. Disassembly of a distal femur modular prosthesis after tumor resection. *J Arthroplasty* 2010;25(2):334.e5–9.
- [14] Winder J, Cooke RS, Gray J, Fannin T, Fegan T. Medical rapid prototyping and 3D CT in the manufacture of custom made cranial titanium plates. *J Med Eng Technol* 1999;23(1):26–8.
- [15] Bian WG, Lei P, Liang FH, Bone XuHZ. morphogenetic protein-2 and gel complex on hydroxyapatite-coated porous titanium to repair defects of distal femur in rabbits. *Chin J Orthop Trauma* 2007;9(6):550–4. Chinese.
- [16] Sing SL, Wang S, Agarwala S, Wiria FE, Ha TMH, Yeong WY. Fabrication of titanium based biphasic scaffold using selective laser melting and collagen immersion. *Int J Bioprinting* 2017;1(3):65–71.
- [17] Sánchez-Salcedo S, Colilla M, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M. Preventing bacterial adhesion on scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Bioprinting* 2016;2(1):20–34.
- [18] Zong QG, Yuan CJ, Wang YF, Su ZP. Design and preparation of biocompatible

- zwitterionic hydroxyapatite. *J Mater Chem B* 2013;1(11):1595–606.
- [19] Izquierdo-Barba I, García-Martín JM, Álvarez R, Palmero A, Esteban J, Pérez-Jorge C, et al. Nanocolumnar coatings with selective behavior towards osteoblast and *Staphylococcus aureus* proliferation. *Acta Biomater* 2015;15:20–8.
- [20] Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. Science 1993;260(5110):920–6.
- [21] Li S, Qian T, Wang X, Liu J, Gu X. Noncoding RNAs and their potential therapeutic applications in tissue engineering. *Engineering* 2017;3(1):3–15.
- [22] Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* 2012;33(26):6020–41.
- [23] Jia A, Teoh JEM, Suntornnond R, Chua CK. Design and 3D printing of scaffolds and tissues. *Engineering* 2015;1(2):261–8.
- [24] Mosadegh B, Xiong G, Dunham S, Min JK. Current progress in 3D printing for cardiovascular tissue engineering. *Biomater* 2015;10(3):034002.
- [25] Ng WL, Wang S, Yeong WY, Naing MW. Skin bioprinting: impending reality or fantasy? *Trends Biotechnol* 2016;34(9):689–99.
- [26] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21(24):2529–43.
- [27] Pan T, Cao X. Progress in the development of hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Mater Chin* 2015;34(3):236–45. Chinese.
- [28] Ozbolat IT, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials* 2016;76(37):321–43.
- [29] Gudapati H, Dey M, Ozbolat I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: past, present and future. *Biomaterials* 2016;102:20–42.
- [30] Ng WL, Lee JM, Yeong WY, Win Naing M. Microvalve-based bioprinting—process, bio-inks and applications. *Biomater Sci* 2017;5(4):632–47.
- [31] Koch L, Brandt O, Deiwick A, Chichkov B. Laser assisted bioprinting at different wavelengths and pulse durations with a metal dynamic release layer: a parametric study. *Int J Bioprinting* 2017;3(1):42–53.
- [32] Fedorovich NE, Schuurman W, Wijnberg HM, Prins HJ, van Weeren PR, Malda J, et al. Biofabrication of osteochondral tissue equivalents by printing topologically defined, cell-laden hydrogel scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods* 2012;18(1):33–44.
- [33] Gauvin R, Chen YC, Lee JW, Soman P, Zorlutuna P, Nichol JW, et al. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials* 2012;33(15):3824–34.
- [34] Lam CXF, Mo XM, Teoh SH, Hutmacher DW. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. *Mater Sci Eng C* 2002;20(1):49–56.
- [35] Chen L, Zhu WM, Fei ZQ, Chen JL, Xiong JY, Zhang JF, et al. The study on biocompatibility of porous nHA/PLGA composite scaffolds for tissue engineering with rabbit chondrocytes in vitro. *Biomed Res Int* 2013;2013:412745.
- [36] Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res* 2001;55(2):203–16.
- [37] Fisher JP, Vehof JWM, Dean D, van der Waerden JP, Holland TA, Mikos AG, et al. Soft and hard tissue response to photocrosslinked poly(propylene fumarate) scaffolds in a rabbit model. *J Biomed Mater Res* 2002;59(3):547–56.
- [38] Williams JM, Adewunmi A, Schek RM, Flanagan CL, Krebsbach PH, Feinberg SE, et al. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* 2005;26(23):4817–27.
- [39] Zhang L. Fabrication and fundamental research of multi-branched blood vessel scaffolds with multi-layered wall [dissertation]. Beijing: Tsinghua University; 2006.
- [40] Kim SS, Utsunomiya H, Koski JA, Wu BM, Cima MJ, Sohn J, et al. Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels. *Ann Surg* 1998;228(1):8–13.
- [41] Pati F, Jang J, Ha DH, Won Kim S, Rhie JW, Shim JH, et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun* 2014;5:3935.
- [42] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2004;22(2):80–6.
- [43] Stephens JS, Cooper JA, Phelan Jr FR, Dunkers JP. Perfusion flow bioreactor for 3D in situ imaging: investigating cell/biomaterials interactions. *Biotechnol Bioeng* 2007;97(4):952–61.
- [44] Hong S, Sycks D, Chan HF, Lin S, Lopez GP, Guilak F, et al. 3D printing of highly stretchable and tough hydrogels into complex, cellularized structures. *Adv Mater* 2015;27(27):4035–40.
- [45] Hockaday LA, Kang KH, Colangelo NW, Cheung PYC, Duan B, Malone E, et al. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication* 2012;4(3):035005.
- [46] Xue SH, Wang Y, Zhao Y, Zhang T, Lin F, Sun W, et al. Preliminary study on three dimensional bioprinting of human dental pulp cells. *Sci Tech Eng* 2012;12(17):4103–7.
- [47] Cohen DL, Lipton JI, Bonassar LJ, Lipson H. Additive manufacturing for in situ repair of osteochondral defects. *Biofabrication* 2010;2(3):035004.
- [48] Cui X, Breitenkamp K, Finn MG, Lotz M, D'Lima DD. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue Eng Part A* 2012;18(11–12):1304–12.
- [49] Liu Y, Zhou G, Cao Y. Recent progress in cartilage tissue engineering—our experience and future directions. *Engineering* 2017;3(1):28–35.
- [50] Gratson GM, Xu M, Lewis JA. Microperiodic structures: direct writing of three-dimensional webs. *Nature* 2004;428(6981):386.
- [51] Ivirico JLE, Bhattacharjee M, Kuyinu E, Nair LS, Lauencin CT. Regenerative engineering for knee osteoarthritis treatment: biomaterials and cell-based technologies. *Engineering* 2017;3(1):16–27.
- [52] Wu C, Luo Y, Cuniberti G, Xiao Y, Gelinsky M. Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability. *Acta Biomater* 2011;7(6):2644–50.
- [53] Arakaki K, Kitamura N, Fujiki H, Kurokawa T, Iwamoto M, Ueno M, et al. Artificial cartilage made from a novel double-network hydrogel: in vivo effects on the normal cartilage and ex vivo evaluation of the friction property. *J Biomed Mater Res A* 2010;93(3):1160–8.
- [54] Kirschner CM, Anseth KS. Hydrogels in healthcare: from static to dynamic material microenvironments. *Acta Mater* 2013;61(3):931–44.
- [55] Ronken S, Wirz D, Daniels AU, Kurokawa T, Gong JP, Arnold MP. Double-network acrylamide hydrogel compositions adapted to achieve cartilage-like dynamic stiffness. *Biomech Model Mechanobiol* 2013;12(2):243–8.
- [56] Sharma B, Fermanian S, Gibson M, Unterman S, Herzka DA, Cascio B, et al. Human cartilage repair with a photoreactive adhesive-hydrogel composite. *Sci Transl Med* 2013;5(167):167ra6.
- [57] Sun JY, Zhao X, Illeperuma WR, Chaudhuri O, Oh KH, Mooney DJ, et al. Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature* 2012;489(7414):133–6.
- [58] Gong JP. Why are double network hydrogels so tough? *Soft Matter* 2010;6(12):2583–90.
- [59] Sherwood JK, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC, Monkhouse DC, Coates M, et al. A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials* 2002;23(24):4739–51.
- [60] Cui T, Yan Y, Zhang R, Liu L, Xu W, Wang X. Rapid prototyping of a double-layer polyurethane-collagen conduit for peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* 2009;15(1):1–9.
- [61] Qin L, Li DC, Cheng C, Zhang WJ, Liu YX. Tissue-engineered soft tissue oriented manufacturing technologies and additive manufacturing. *Chin J Tissue Eng Res* 2014;18(8):1263–9. Chinese.
- [62] Mironov V, Kasyanov V, Markwald RR. Organ printing: from bioprinter to organ biofabrication line. *Curr Opin Biotechnol* 2011;22(5):667–73.
- [63] Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv Mater* 2014;26(19):3124–30.
- [64] Michael S, Sorg H, Peck CT, Koch L, Deiwick A, Chichkov B, et al. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skinlike structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *PLoS One* 2013;8(3):e57741.
- [65] Mannoor MS, Jiang Z, James T, Kong YL, Malatesta KA, Soboyejo WO, et al. 3D printed bionic ears. *Nano Lett* 2013;13(6):2634–9.
- [66] Yang Y, Wang K, Gu X, Leong KW. Biophysical regulation of cell behavior-cross talk between substrate stiffness and nanotopography. *Engineering* 2017;3(1):36–54.
- [67] Wang M, Wu Y, Lu S, Chen T, Zhao Y. Fabrication and characterization of selective laser melting printed Ti–6Al–4V alloys subjected to heat treatment for customized implants design. *Prog Nat Sci-Mater Int* 2016;26(6):671–7.
- [68] Fischer M, Joguet D, Robin G, Peltier L, Laheurte P. In situ elaboration of a binary Ti–26Nb alloy by selective laser melting of elemental titanium and niobium mixed powders. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016;62(2):852–9.
- [69] Sing SL, Yeong WY, Wiria FE. Selective laser melting of titanium alloy with 50 wt% tantalum: microstructure and mechanical properties. *J Alloys Compd* 2016;660:461–70.
- [70] Sing SL, Wiria FE, Yeong WY. Selective laser melting of lattice structures: a statistical approach to manufacturability and mechanical behavior. *Robot Cim-Int Manuf* 2018;49:170–80.
- [71] Speirs M, Van Hooreweder B, Van Humbeeck J, Kruth JP. Fatigue behaviour of NiTi shape memory alloy scaffolds produced by SLM, a unit cell design comparison. *J Mech Behav Biomed Mater* 2017;70:53–9.
- [72] Yang Y, Wu P, Lin X, Liu Y, Bian H. System development, formability quality and microstructure evolution of selective laser-melted magnesium. *Virt Phys Prototyping* 2016;11(3):1–9.
- [73] Lu Y, Ren L, Wu S, Yang C, Lin W. CoCrWCu alloy with antibacterial activity fabricated by selective laser melting: composition, mechanical properties and microstructural analysis. *Powder Technol* 2018;325:289–300.
- [74] Lu Y, Ren L, Xu X, Yang Y, Wu S, Luo J, et al. Effect of Cu on microstructure, mechanical properties, corrosion resistance and cytotoxicity of CoCrW alloy fabricated by selective laser melting. *J Mech Behav Biomed Mater* 2018;81:130–41.
- [75] Xu T, Binder KW, Albanna MZ, Dice D, Zhao W, Yoo JJ, et al. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication* 2013;5(1):015001.
- [76] Yue J, Zhao P, Gerasimov JY, Marieke VDL, Grotenhuis A. 3D-printable antimicrobial composite resins. *Adv Funct Mater* 2015;25(43):6756–67.
- [77] Pistone A, Iannazzo D, Espro C, Galvagno S, Tampieri A. Tethering of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys peptides on Mg-doped hydroxyapatite. *Engineering* 2017;3(1):55–9.
- [78] Jia MA, Zhao Y, Wang X, Liu L, Qin H, Li M. A study on the chondrogenesis of collagen gel containing rapid prototyping PLGA and chondrocytes in vivo. *J Practical Stomatol* 2009;25(1):9–12.
- [79] Wu G. Preparation of 3D printed porous hydroxyapatite scaffold coated with collagen/rhBMP-2 chitosan microspheres and ectopic bone formation investigation in vivo [dissertation]. Beijing: Peking Union Medical College Hospital; 2015. Chinese.

- [80] Sing SL, Yeong WY, Wiria FE, Tay BY, Zhao Z. Direct selective laser sintering and melting of ceramics: a review. *Rapid Prototyping J* 2017;23 (3):611–23.
- [81] Trombetta R, Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. 3D printing of calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering and drug delivery. *Ann Biomed Eng* 2017;45(1):23–44.
- [82] Song C. Study on digital and direct manufacturing of customized implant based on selective laser melting [dissertation]. Guangzhou: South China University of Technology; 2014. Chinese.
- [83] Lee AY, Jia A, Chua CK. Two-way 4D printing: a review on the reversibility of 3D-printed shape memory materials. *Engineering* 2017;3 (5):663–74.
- [84] Quan W. 3D-printed alginate/hydroxyapatite hydrogel in combination of Atstrin to repair bone defects [dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University; 2015. Chinese.
- [85] Yan Y, Li S, Xiong Z, Wang XH, Zhang T, Zhang RJ. Fabrication technology of tissue engineering scaffold based on rapid prototyping. *J Mech Eng* 2010;46 (5):93–8.
- [86] McGuigan AP, Sefton MV. Design criteria for a modular tissue-engineered construct. *Tissue Eng* 2007;13(5):1079–89.
- [87] Chai G, Zhang Y, Liu QH, Ma SX, Hu QX, Cui L, et al. A pilot study of three dimensional printing of human bone marrow stem cells (hBMSCs). *Shanghai J Stomatol* 2010;19(1):77–80. Chinese.
- [88] Mironov V, Drake C, Wen X. Research project: Charleston bioengineered kidney project. *Biotechnol J* 2006;1(9):903–5.