

支架与组织的设计及 3D 打印

安佳, Joanne Ee Mei Teoh, Ratima Suntornnond, Chee Kai Chua*

摘要: 目前,组织工程学中应用 3D 打印工艺的情况越来越多。本文介绍 3D 打印技术在组织工程学应用领域的最前沿研究,尤其侧重于计算机辅助支架设计系统的开发、功能梯度支架的直接 3D 打印、选择性激光烧结 (SLS) 和熔融沉积成型 (FDM) 工艺建模、利用微观和宏观特征进行支架间接增材制造、生物反应器的开发,以及 3D/4D 生物打印。本文还讨论 3D 打印的技术限制,进而突出新 3D 打印方法在组织工程学领域得到进一步改善的可能性。

关键词: 快速原型制造, 3D 打印, 增材制造, 组织工程, 生物打印

1 引言

1993 年, Langer 和 Vancanti 在《Science》上发表了具有历史里程碑意义的论文,正式提出了“组织工程”的概念,第一次详细描述了生物可降解性 3D 支架的特征和应用 [1]。在理想情况下,3D 支架应该是高度多孔、互连情况良好的孔隙网络,并具有稳定而充足的孔径供细胞迁移和渗透 [2]。该论文发表后的十年中(1993—2002 年),人们应用了许多传统的制造技术来制造多孔 3D 支架,如纤维黏结、相分离、溶剂浇筑、粒子沥滤、膜材层压、模塑和发泡等技术 [3]。然而,所有这些方法都有一个共同的主要缺点:它们均无法对支架结构、孔隙网络和孔径进行充分地控制,导致 3D 支架不够稳定、不够理想。为了克服这个问题,研究人员提出了使用 3D 打印法(也称为快速原型制造、实体自由制造或增材制造)来制造具有可控孔径和孔隙结构的定制式支架 [4–6]。目

前正在开发的 40 多种不同的 3D 打印技术中,熔融沉积成型 (FDM)、立体光刻、喷墨打印、选择性激光烧结 (SLS) 和 Colorjet 打印等由于其良好的工艺塑性能力成为最受欢迎的 3D 打印技术 [7–8]。由此带来的结果是,在第二个十年中(2003—2012 年),组织工程学领域的 3D 打印研究数量成倍增长。这些研究涵盖支架设计、过程建模和优化、3D 打印方法比较、3D 打印支架的后期处理和特征表示、3D 打印支架在体外和体内的应用、3D 打印用新型支架材料、支架制造用新型 3D 打印方法,甚至衍生出来一个全新的领域——3D 生物打印或器官打印。我们的研究团队广泛参与了这一波研究热潮。本文首先介绍了本团队在此领域的研究成果和工作进展,然后对这一领域在第三个十年(2013—2022 年)的前景予以展望。

2 支架结构设计

2.1 支架库

支架结构设计能够显著影响细胞的机械性能和行为 [9]。我们采用自下而上的方法构建 3D 支架,即首先制造单胞,然后将单胞组装成 3D 支架。利用这种方法,我们可以根据多孔结构设计来微调支架的机械特性。我们现已在室内开发出了组织支架计算机辅助系统 (CASTS),它可以自动创建具有受控结构的高度多孔 3D 支架模型,并能够精确地与天然解剖结构(如骨骼)的外表面轮廓匹配 [10–12]。在这个系统中,约有 20 种多面体形状可供选择,用来生成单胞的基本几何形状。支架库和各个单胞的参数(如孔径和支柱尺寸)可以调节,每个多面

Singapore Centre for 3D Printing, School of Mechanical and Aerospace Engineering, Nanyang Technological University, Singapore 639798, Singapore

* Correspondence author. E-mail: mckchua@ntu.edu.sg

Received 30 January 2015; received in revised form 23 March 2015; accepted 30 June 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/>)

英文原文: Engineering 2015, 1(2): 261–268

引用本文: Jia An, Joanne Ee Mei Teoh, Ratima Suntornnond, Chee Kai Chua. Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering*, DOI 10.15302/

J-ENG-2015061

单胞能够按照空间排列顺序自动叠加，直到其在尺寸上形成一个适合支架应用目的模块(图1)。然后在支架模块和缺陷组织的实际表面模型之间通过布尔运算就可以创建具有解剖形状的多孔支架。Naing 等 [13] 详细描述了组织支架计算机辅助系统 (CASTS) 设计并制造组织工程支架所用的数学公式的详细推导过程。

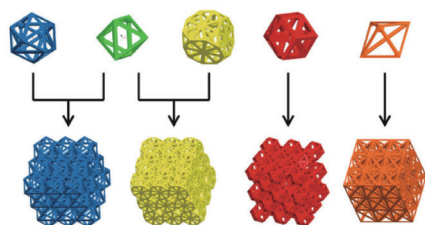


图 1. CASTS 支架库中的五种多面单胞及其生成的模块示例。

2.2 功能梯度支架

天然组织(如骨骼)通常具有梯度性多孔结构，因此多孔支架设计和目标组织结构之间的机械强度和刚度匹配是很重要的 [14]。骨骼中存在两种刚度梯度：长骨的径向梯度，短骨和不规则骨骼的线性梯度。我们现已通过同心排列圆柱形单胞的方式实现了径向梯度设计，使得孔隙度从中心向四周呈线性降低。这种线性梯度是由于支柱直径沿着梯度方向变化而产生的结果。因此，我们可以通过调整孔隙与刚度之间的关系使刚度变化适合 CASTS 支架的需要 [15]。修改并改进 CASTS 系统后，本研究团队成功制造了人类下颌网状骨骼支架和股骨片段，均具有功能梯度 [16, 17]。图 2 展示了一段具有功能梯度的股骨片段示例。这种工艺精确度高，重复性好。另一种设计梯度结构的方法是以形状函数和全六面体网格细化为基础进行设计 [18]。用这种方法时，一节骨头会被进一步细分并以各种不规则的六面体单元呈现出来，然后这些六面体单元再根据形状函数转换

成各种不规则的多孔元件。在这些不规则的孔隙之间进行“并运算”之后，得到整体孔隙模型，然后在轮廓模型和孔隙模型之间进行“差运算”，得到骨骼支架。采用这种方法能够以明确定义的孔径分布实现梯度骨骼-支架设计。最近，一种基于 S 型函数和高斯径向基函数的新方法得到了开发，能够生成功能梯度结构，并且由此生成的模型能够以 STL 文件形式导出，进行 3D 打印 [19]。

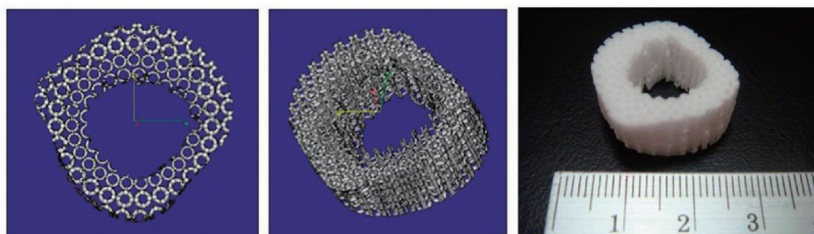


图 2. 股骨片段功能梯度多孔支架的虚拟原型和实体原型。

2.3 血管设计

除机械性能之外，组织工程学的另一个主要限制是如何形成血管，尤其是进行大厚度、大体积组织工程设计时。研究人员现已提出多种策略来提高或加快血管形成，其中支架设计发挥了至关重要的作用 [20]。研究表明，250 μm 或以上的孔径设计比更小的孔径更有利于血管的生长 [21]。另外，高孔隙率并不一定促成更多的血管形成，因为如果孔隙之间的连通性很低，那么细胞迁移和血管形成过程可能会受到抑制 [22]。最近，研究人员开发了一个工具箱，用于评估 3D 多孔支架 [23]，这个工具箱基于模块化支架设计，能够对支架孔径和孔隙率进行微调以便进行血管形成研究。本研究团队正在探索混合支架设计新理念，以解决血管形成问题。这种新方法涉及采用多孔薄膜和细丝网格代替分层材料来形成 3D 支架(图3) [24]。

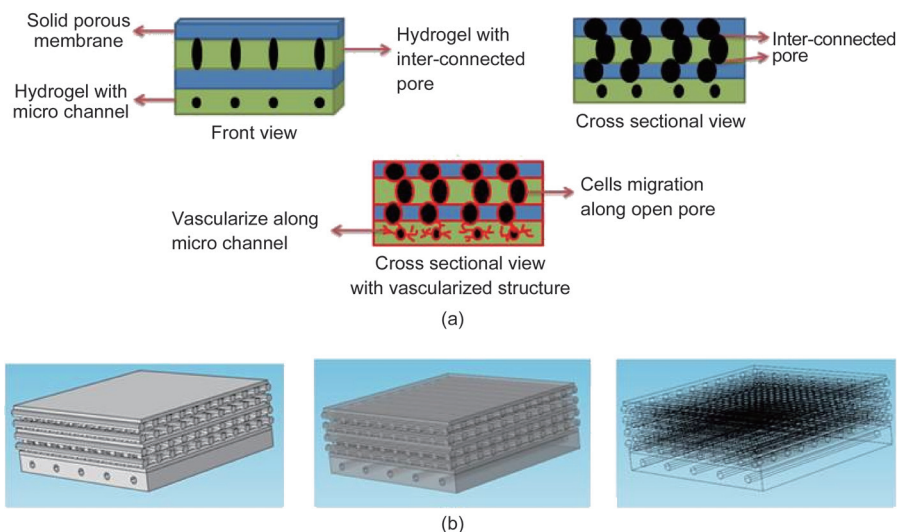


图 3. 一种推荐的便于血管形成的混合支架设计。

3 直接 3D 打印

3.1 具体的材料形式

在室温下，3D 打印使用的主要材料形式是可固化流体、非脆性长丝、层

叠薄片和精细粉末 [25]。每种形式的材料只针对特定的 3D 打印工艺。如果认为某种材料适合特定应用，但所要采用的 3D 打印工艺需要的特定材料形式很难制备，那么要打印这种材料就会很有挑战性。即使某种材料可以制备成特定的形式，但这也并不能保证这种材料可以进行 3D 打印，因为要在垂向维度上成功进行打印，还依赖层与层之间的黏结强度。因此，在探讨某种材料是否适合 3D 支架应用时，很重要的一点是从一开始就考虑这种材料

可以采用的形式。此外，为了扩大 3D 打印生物材料的范围，未来的开发应包括发明新的方法，以将现有的生物材料转换成适合 3D 打印的形式。例如，明胶凝胶的固化需要在低温下进行，但是这种低温环境与有利于细胞存活的环境相冲突。因此，未来的研究可能涉及明胶凝固新机制的开发，比如通过酶化交联进行固化 [26]，或者开发一种新的混合机制用于水凝胶和系统的低温沉积 [27]。

表 1. 具体的材料形式和适合的 3D 打印工艺

| Form | Examples | Suitable 3D printing processes | Refs. |
|----------------------|--|---|--------------|
| Solidifiable fluid | Photopolymer resins, temperature sensitive polymers, ion cross-linkable hydrogels, ceramic paste, etc. | Stereolithography (SLA) | [28] |
| | | Polyjet | [29, 30] |
| | | Digital light processing (DLP) | [31] |
| | | Micro-extrusion | [32] |
| Non-brittle filament | Thermoplastics, e.g. ABS, PLA, PCL | Fused deposition modeling (FDM) | [33] |
| Laminated thin sheet | Paper, plastic sheet, metal foil | Paper lamination technology (PLT) | [34] |
| | | Laminated object manufacturing (LOM) | [35] |
| | | Ultrasonic consolidation (UC) | [36] |
| Fine powder | Plastic fine powder, ceramic powder, metal powder | Selective laser sintering/melting (SLS/SLM) | [17, 37, 38] |
| | | Electron beam melting (EBM) | [39] |
| | | Laser engineered net shaping (LENS) | [40] |
| | | Direct metal deposition (DMD) | [41] |
| | | Color jet printing (CJP) | [42–44] |

Notes: ABS—acrylonitrile-butadiene-styrene; PLA—polylactic acid; PCL—polycaprolactone.

3.2 工艺参数和限制

本研究团队调查了大量的材料以便利用选择性激光烧结工艺来制造组织工程支架。表 2 总结了选择性激光烧结技术的主要工艺参数，即部件基床的温度、激光功率和扫描速度。特别值得一提的是，在聚醚醚酮 / 羟基磷灰石 (PEEK/HA) 系统中，结果表明羟基磷灰石含量应保持在 40 % (质量比) 或以下才能保证结构的完整性。在聚乙烯醇 /

羟基磷灰石 (PVA/HA) 和聚己内酯 / 羟基磷灰石 (PCL/HA) 系统中，羟基磷灰石含量应保持在 30 % (质量比) 或以下才能成功生成具有明确定义的孔隙连通性和良好的结构完整性的支架样品。开发复合材料系统时，虽然添加羟基磷灰石最初能够提高机械性能和生物活性，但它在水解降解过程中会损害材料的性能 [45]。除支架外，我们还研究了药物输送装置的激光烧结应用及其微观特征 [46–48]。

表 2. 不同类型聚合物的选择性激光烧结工艺参数

| Polymer type | Composition (wt.%) | Part-bed temperature (°C) | Laser powder (W) | Scan speed (mm·s ⁻¹) | Refs. |
|--------------|--------------------|---------------------------|------------------|----------------------------------|----------|
| PCL | 100 | 30–55 | 1–7 | 3810–5080 | [49] |
| PLLA | 100 | 60 | 10–15 | 1270 | [49] |
| PVA | 100 | 60–65 | 10–15 | 1270–5080 | [49] |
| PLGA | 100 | 70 | 10 | 1651 | [50] |
| PEEK | 100 | 110–140 | 9–28 | 5080 | [49] |
| PEEK/HA | > 60/40 | 140 | 16 | 5080 | [51, 52] |
| PVA/HA | > 70/30 | 65–80 | 13–15 | 1270–1778 | [53, 54] |
| PCL/HA | > 70/30 | 40 | 3 | 1270–2540 | [55] |

Notes: PLLA—poly-L-lactic acid; PLGA—poly(lactic-co-glycolic acid).

选择性激光烧结工艺的一个局限性是制造小型设计原型 (如组织工程支架) 时材料浪费严重。不过这个问题可通过在选择性激光烧结部件床中纳入紧凑型适配系统

来解决，这样适配器就可以将选择性激光烧结部件床的运动转换为自带的小部件床的运动 [56]。利用这个装置，可以节约高达 6.5 倍的粉末消耗量。用选择性激光烧结技

术制造支架的第二个局限性是：在细胞接种过程中支架保持细胞的能力很低。原因之一是，选择性激光烧结所用的材料是合成的，不利于初始细胞附着。另一个原因是，选择性激光烧结技术的分辨率问题导致孔径比细胞大很多，因而在接种过程中细胞会从孔隙中掉落。然而，采用由替代性的静电纺纳米纤维和 3D 打印支架层组成的混合 3D 支架后，由于纳米纤维的孔径很小，因而能够防止细胞掉落 [57, 58]。还有一种替代的解决方案，就是将载有细胞的胶原水凝胶注入到多孔结构中 [59]。选择性激光烧结支架确实还存在尚未解决的缺陷，如多孔支架内部区域的粉末截留问题。截留的粉末很难手工去除，特别是当孔径 < 500 μm 时。研究人员探讨了利用超声波清洗截留粉末的方法，但收效甚微 [60]。

3.3 熔融沉积成型 (FDM) 和选择性激光烧结 (SLS) 建模

在 3D 打印中，理解工艺本身以及背后的科学原理很重要，只有理解之后才能进一步改善工艺 (图4)。聚己内酯 (PCL) 是熔融沉积成型 (FDM) 工艺所用的一种代表性生物材料。建模和有限元分析的结果表明：熔融聚

己内酯流体的压降和速度取决于流体通道参数 [61]。熔融聚己内酯的温度梯度表明：聚己内酯会在通道长度的 35 % 以内液化 [61]。同样，我们在研究选择性激光烧结工艺过程中对热传递现象进行了建模。我们的模型将诸如热导率、热扩散率、表面反射率和吸收系数之类的材料性质纳入其中，从而有利于识别对烧结结果很关键的生物材料性质和激光束性质 [62]。了解在 3D 打印中机械性能和支架孔隙度之间的关系同样重要 (图5)。根据从丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物 (ABS) 样品所得的实验数据，我们得到了适用于熔融沉积成型工艺的关系曲线 [63, 64]。此外，对于组织支架计算机辅助系统设计的聚己内酯 (PCL) 支架，我们发现了其可行的孔隙度和综合刚度范围 [65]。此刚度范围与颌面部松质骨的刚度梯度十分吻合，从磨牙区的 35.55 MPa，逐渐变为犬牙和门牙区的 67.48 MPa [66]。

4 间接 3D 打印

与合成聚合物相比，天然聚合物通常具有非常好的生物相容性，并能提供有利于细胞生存的微环境。但

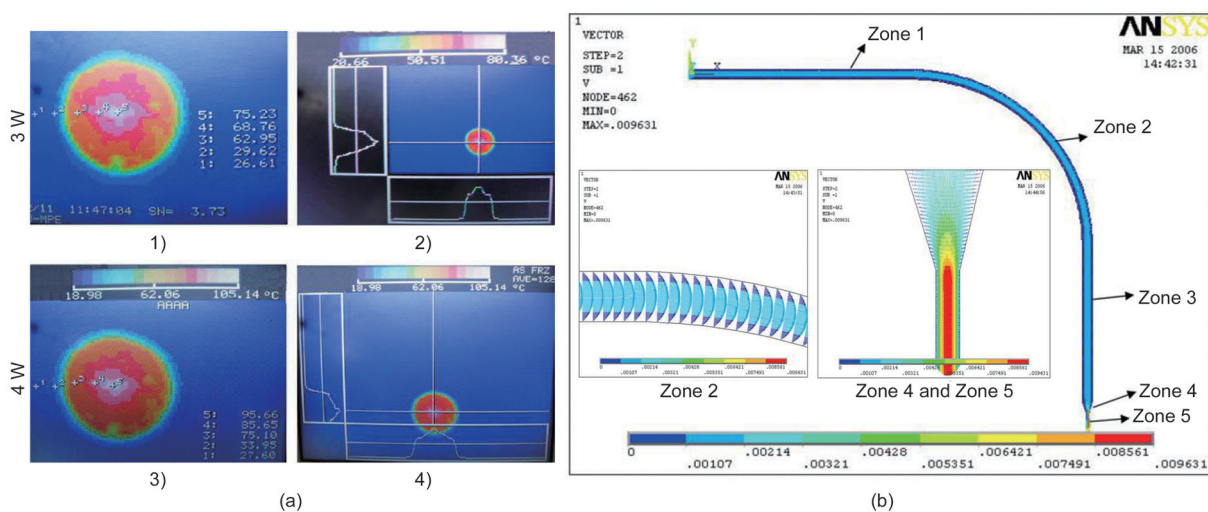


图 4. (a) 激光烧结工艺的温度分布和高斯轮廓线；(b) 熔融沉积成型流体通道沿线五个不同区域的融化速度曲线。

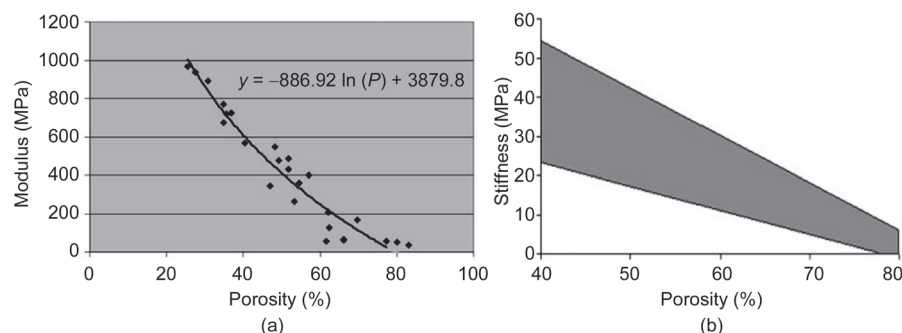


图 5. (a) 熔融沉积成型支架中孔隙度和模数之间的关系；(b) 选择性激光烧结工艺制造的聚己内酯支架中可行的孔隙度和压缩刚度范围 (灰色部分)。

是天然聚合物的 3D 可打印性普遍较差。为了利用天然聚合物 (如胶原和明胶) 制造 3D 多孔支架，间接 3D 打印技术应运而生。直接 3D 打印直接利用模型材料生产支架，而间接 3D 打印与此相反，它通常利用支撑材料创建一个凹模，然后用这个凹模以干燥法来铸造所需要的聚合物支架 [6, 67, 68]。采用这种方法可以制造具有

6 3D 生物打印与超前发展

组织工程学的主要进展之一出现了 3D 打印这个新领域 [80]。Mironov 等最初以“器官打印”为名提出了 3D 打印的概念，将其定义为基于计算机辅助的喷涂式活体人类器官 3D 组织工程 [81]。这种器官打印工艺完全遵循典型的 3D 打印工艺链，也就是说，从计算机辅助设计 (CAD) 模型开始，转换为 STL 文件，分层，然后打印。器官打印相比基于支架的传统方法的主要优点是能够实现自动化和很高的细胞密度 [82]。器官打印所用的材料是微组织，通常以球状体形式存在。这些紧密排列的球状体能够自动进行组装，融为一体 [83]，为器官的 3D 打印奠定基础。器官打印具有即将实现的潜力，但需要解决工程组织学中的组织问题和复杂性问题 [84]。器官打印还具有造就工业规模的机器人组织装配生产产业的巨大潜力 [73]。然而，目前器官打印的应用仅限于体外药物测试。根据 Mironov 的报告，世界第一例生物打印器官移植很可能是将于 2015 年进行的老鼠甲状腺移植 [85]。

除器官打印之外，还存在其他简便的生物打印途径和方法，如喷墨打印、微挤压和激光辅助前推转移技术等，具体情况可在参考文献 [86] 中查阅。这些方法的主要挑战是如何在一个确定位置以一种单独的工艺定位并培养多种类型的细胞。尽管研究人员在打印异质性组织上已获得初步成功 [87, 88]，但这些组织被打印在单独的小隔间内，未能复制出天然组织的微观结构。为了应对这一挑战，本研究团队计划把重点放在生物打印工艺的基础研究上，如开发时间-压力模型来精确控制挤压材料 [89]。

3D 生物打印现有一个令人关注的派生领域，就是微电子组件与机电

三维内部通道网络的胶原支架 [69]。此外，现已发现在间接 3D 打印中冷冻干燥法是最合适的干燥方法，因为它产生的收缩比临界点干燥法更小，并能够精确地再现各个通道的设计形态 [69]。此外，间接制造法与发泡工艺相结合可以生产出具有复杂通道结构的高孔隙度、高均匀度明胶支架 [29, 70]，如图 6 (a)~(d) 所示。这种结构的有序性还可以通过在铸造过程中加入均匀分散的微球体而进一步提高 [71]，如图 6 (e) 和 (f) 所示。除胶原和明胶之外，本研究团队还利用蚕丝素蛋白成功制造出同时满足宏观和微观形态特征的多孔支架 [30, 72]。

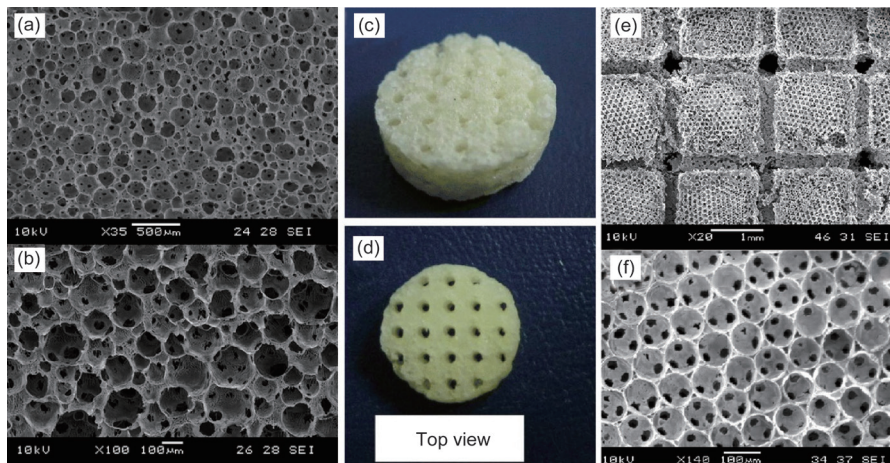


图 6. 间接 3D 打印和发泡工艺相结合制造的均匀多孔的互连网络结构。

5 生物反应器

在组织工程中，生物反应器是一种重要的后期处理工具，因为生物反应器可为细胞-支架复合体提供动态的环境，促进复合体的成熟。更重要的是，生物反应器是组织工程学实现工业规模生产中自动化生产线的组成部分 [73]。最近的一项研究报告指出，支架结构在生物反应器中可以影响细胞分化，但在静态培养中却不能 [74]，这进一步证明了生物反应器的重要作用。令人惊讶的是，利用在旋转式生物反应器中常见的空气-液体界面，可以诱导诱导多能干细胞 (iPS 细胞) 向肺泡上皮细胞分化，这就是说生物反应器在解决细胞源问题上可发挥新的作用 [75]。最新的生物反应器设计采用了双流生物反应器与机械刺激相结合的形式 [76]。这种新颖的设计能够让营养物质、合成代谢因素或分解代谢因素从复合体的一侧扩散，从而产生梯度。因此，这种生物反应器的设计非常适用于工程界面组织。本研究团队专门研究了间隙渗流对纤维原细胞响应能力的影响 [77]。通过计算流体动力学研究，我们发现动态流体即使以低至 $0.002 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速度流动，也比静态培养更有利于支持物质交换，更有利于提高细胞数量，并更有利于让细胞分布和营养分布更均匀 [78]。我们还开发了双窗口双带宽分光光学相干断层扫描技术 (DWDB-SOCT) 来监测“成纤维细胞”在支架中的增殖。“成纤维细胞”及其在支架中的分布在分光图像上清晰可辨 [79]。我们期望生物反应器将来发挥更多的生物学作用，并与各种类型的刺激技术和非侵入性监测技术相结合，形成集成度更高的设计。

组件的整合集成。例如，生物机器人就是依靠一根哺乳动物骨骼肌肉细胞条带来驱动行走的机器人 [90]。3D 生物打印的另一个令人关注的派生领域是 4D 生物打印概念。4D 打印是指可编程材料的 3D 打印。由于所打印的部件在形状上是随着后期打印阶段的推进而逐渐变化的，因而第四维是指时间 [91]。现在已有的一项 4D 打印物理演示涉及的是能够折纸的智能活动铰链 [92]，而这个概念经过进一步的扩展，已能够让光响应窗口根据光线的强弱作出打开或关闭响应。因此，研究界认为 4D 打印将会成为一个新兴的领域 [93]。本研究团队目前正在与 Stratasys 公司 (www.stratasys.com) 合作，开发可用于 4D 打印的形状记忆聚合物 [94]。在 4D 生物打印方面，可编程生物材料的开发在实现“根据时间改变形状”上似乎是至关重要的。“4D 生物打印”这个术语目前在定义上不如“4D 打印”清晰，它将来如何发展定型很大程度上还是未知数，但非常值得关注。

7 未来展望

组织工程学诞生后的第二个十年中，3D 打印由于其独有的可控性和制造能力，逐渐成为这一领域的一个明确的组成部分。展望未来，即使上述技术难题有朝一日被克服，但要将学术研究的成果转换成造福社会的临床产品，仍然有很长的路要走。在此领域中，研究人员目前的任务是加速推进 3D 打印医疗设备的标准化和认证。标准化工作的长期拖延会让监管工作变得更为复杂，尤其是针对当前流行和转变的 3D 生物打印技术，因为“医疗器械”的概念可能很快会被重新定义。另一个未来趋势可能涉及法律环境 [95]，因为围绕 3D 打印出现的侵权和知识产权保护会更为激烈地相互交织。因此，及早而明智地探索各种法律途径是应对未来变化的最好策略。

致谢

作者谨此感谢新加坡国家研究基金会 (NRF) 对新加坡 3D 打印中心 (SC3DP) 提供的资金支持，同时还要感谢曼彻斯特大学 Li Lin 教授盛情邀请其提交论文。

Compliance with ethics guidelines

Jia An, Joanne Ee Mei Teoh, Ratima Suntornnond, and Chee Kai Chua declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- R. Langer, J. P. Vacanti. Tissue engineering. *Science*, 1993, 260(5110): 920–926
- Q. L. Loh, C. Choong. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2013, 19(6): 485–502
- S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, C. K. Chua. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.*, 2001, 7(6): 679–689
- S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, C. K. Chua. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng.*, 2002, 8(1): 1–11
- K. F. Leong, C. M. Cheah, C. K. Chua. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2363–2378
- W. Y. Yeong, C. K. Chua, K. F. Leong, M. Chandrasekaran. Rapid prototyping in tissue engineering: Challenges and potential. *Trends Biotechnol.*, 2004, 22(12): 643–652
- T. Boland, et al. Rapid, prototyping of artificial tissues and medical devices. *Adv. Mater. Process.*, 2007, 165(4): 51–53
- 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 and Physical Prototyping*, 2009, 4(4): 203–216
- S. J. Hollister. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.*, 2005, 4(7): 518–524
- C. M. Cheah, C. K. Chua, K. F. Leong, S. W. Chua. Development of a tissue engineering scaffold structure library for rapid prototyping. Part 1: Investigation and classification. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, 2003, 21(4): 291–301
- C. M. Cheah, C. K. Chua, K. F. Leong, S. W. Chua. Development of a tissue engineering scaffold structure library for rapid prototyping. Part 2: Parametric library and assembly program. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, 2003, 21(4): 302–312
- C. M. Cheah, C. K. Chua, K. F. Leong, C. H. Cheong, M. W. Naing. Automatic algorithm for generating complex polyhedral scaffold structures for tissue engineering. *Tissue Eng.*, 2004, 10(3–4): 595–610
- M. W. Naing, C. K. Chua, K. F. Leong, Y. Wang. Fabrication of customised scaffolds using computer-aided design and rapid prototyping techniques. *Rapid Prototyping J.*, 2005, 11(4): 249–259
- K. F. Leong, C. K. Chua, N. Sudarmadji, W. Y. Yeong. Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2008, 1(2): 140–152
- N. Sudarmadji, C. K. Chua, K. F. Leong. The development of computer-aided system for tissue scaffolds (CASTS) system for functionally graded tissue-engineering scaffolds. *Methods Mol. Biol.*, 2012, 868: 111–123
- C. K. Chua, N. Sudarmadji, K. F. Leong, S. M. Chou, S. C. Lim, W. M. Firdaus. Process flow for designing functionally graded tissue engineering scaffolds. In: *Innovative Developments in Design and Manufacturing—Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping*, 2010: 45–49
- C. K. Chua, K. F. Leong, N. Sudarmadji, M. J. J. Liu, S. M. Chou. Selective laser sintering of functionally graded tissue scaffolds. *MRS Bull.*, 2011, 36(12): 1006–1014
- S. Cai, J. Xi, C. K. Chua. A novel bone scaffold design approach based on shape function and all-hexahedral mesh refinement. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 868: 45–55
- N. Yang, Z. Quan, D. Zhang, Y. Tian. Multi-morphology transition hybridization CAD design of minimal surface porous structures for use in tissue engineering. *Comput. Aided Design*, 2014, 56: 11–21
- J. Rouwkema, N. C. Rivron, C. A. van Blitterswijk. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.*, 2008, 26(8): 434–441
- D. Druecke, et al. Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds *in vivo*: Long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2004, 68A(1): 10–18
- V. Karageorgiou, D. Kaplan. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2005, 26(27): 5474–5491
- M. O. Wang, et al. Evaluating 3D-printed biomaterials as scaffolds for vascularized

- bone tissue engineering. *Adv. Mater.*, 2015, 27(1): 138–144
24. R. Sutorntmond, J. An, W. Y. Yeong, C. K. Chua. Hybrid membrane based structure: A novel approach for tissue engineering scaffold. In: *The 4th International Conference on Additive Manufacturing and Bio-manufacturing (ICAM-BM 2014)*. Beijing, China, 2014: 41–42
 25. C. K. Chua, K. F. Leong. *3D Printing and Additive Manufacturing: Principles and Applications*. Singapore: World Scientific Publishing Company Pte Limited, 2014
 26. C. W. Yung, L. Q. Wu, J. A. Tullman, G. F. Payne, W. E. Bentley, T. A. Barbari. Transglutaminase crosslinked gelatin as a tissue engineering scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, 83A(4): 1039–1046
 27. Y. Yan, et al. Direct construction of a three-dimensional structure with cells and hydrogel. *J. Bioact. Compat. Pol.*, 2005, 20(3): 259–269
 28. F. P. 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
 29. J. Y. Tan, C. K. Chua, K. F. Leong. Indirect fabrication of gelatin scaffolds using rapid prototyping technology. *Virtual and Physical Prototyping*, 2010, 5(1): 45–53
 30. M. J. J. Liu, S. M. Chou, C. K. Chua, B. C. M. Tay, B. K. Ng. The development of silk fibroin scaffolds using an indirect rapid prototyping approach: Morphological analysis and cell growth monitoring by spectral-domain optical coherence tomography. *Med. Eng. Phys.*, 2013, 35(2): 253–262
 31. D. Dean, et al. Multiple initiators and dyes for continuous Digital Light Processing (cDLP) additive manufacture of resorbable bone tissue engineering scaffolds: A new method and new material to fabricate resorbable scaffold for bone tissue engineering via continuous Digital Light Processing. *Virtual and Physical Prototyping*, 2014, 9(1): 3–9
 32. C. Wu, et al. 3D-printing of highly uniform CaSiO₃ ceramic scaffolds: Preparation, characterization and *in vivo* osteogenesis. *J. Mater. Chem.*, 2012, 22(24): 12288–12295
 33. D. W. Hutmacher, T. Schantz, I. Zein, K. W. Ng, S. H. Teoh, K. C. Tan. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, 55(2): 203–216
 34. G. Yu, Y. Ding, D. Li, Y. Tang. A low cost cutter-based paper lamination rapid prototyping system. *Int. J. Mach. Tools Manuf.*, 2003, 43(11): 1079–1086
 35. D. Ahn, J. H. Kweon, J. Choi, S. Lee. Quantification of surface roughness of parts processed by laminated object manufacturing. *J. Mater. Process. Technol.*, 2012, 212(2): 339–346
 36. G. S. Kelly, M. S. Jr Just, S. G. Advani, J. W. Gillespie. Energy and bond strength development during ultrasonic consolidation. *J. Mater. Process. Technol.*, 2014, 214(8): 1665–1672
 37. Z. H. Liu, D. Q. Zhang, S. L. Sing, C. K. Chua, L. E. Loh. Interfacial characterization of SLM parts in multi-material processing: Metallurgical diffusion between 316L stainless steel and C18400 copper alloy. *Mater. Charact.*, 2014, 94: 116–125
 38. W. Y. Yeong, et al. Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering. *Acta Biomater.*, 2010, 6(6): 2028–2034
 39. C. Guo, W. Ge, F. Lin. Effects of scanning parameters on material deposition during Electron Beam Selective Melting of Ti-6Al-4V powder. *J. Mater. Process. Technol.*, 2015, 217: 148–157
 40. T. Durejko, M. Ziętala, W. Polkowski, T. Czujko. Thin wall tubes with Fe₃Al/SS316L graded structure obtained by using laser engineered net shaping technology. *Mater. Des.*, 2014, 63: 766–774
 41. M. Gharbi, et al. Influence of various process conditions on surface finishes induced by the direct metal deposition laser technique on a Ti-6Al-4V alloy. *J. Mater. Process. Technol.*, 2013, 213(5): 791–800
 42. M. Castilho, et al. Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects. *Biofabrication*, 2014, 6(1): 015006
 43. A. Butscher, et al. Printability of calcium phosphate powders for three-dimensional printing of tissue engineering scaffolds. *Acta Biomater.*, 2012, 8(1): 373–385
 44. A. Butscher, M. Bohner, N. Doebelin, S. Hofmann, R. Müller. New depowdering-friendly designs for three-dimensional printing of calcium phosphate bone substitutes. *Acta Biomater.*, 2013, 9(11): 9149–9158
 45. K. C. Ang, K. F. Leong, C. K. Chua, M. Chandrasekaran. Compressive properties and degradability of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composites under accelerated hydrolytic degradation. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, 80A(3): 655–660
 46. C. M. Cheah, K. F. Leong, C. K. Chua, K. H. Low, H. S. Quek. Characterization of microfeatures in selective laser sintered drug delivery devices. *Proc. Inst. Mech. Eng. H*, 2002, 216(6): 369–383
 47. K. F. Leong, C. K. Chua, W. S. Gui, Verani. Building porous biopolymeric microstructures for controlled drug delivery devices using selective laser sintering. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, 2006, 31(5–6): 483–489
 48. K. F. Leong, F. E. Wiria, C. K. Chua, S. H. Li. Characterization of a poly- ϵ -caprolactone polymeric drug delivery device built by selective laser sintering. *Biomed Mater Eng.*, 2007, 17(3): 147–157
 49. K. H. Tan, et al. Selective laser sintering of biocompatible polymers for applications in tissue engineering. *Biomed Mater Eng.*, 2005, 15(1–2): 113–124
 50. R. L. Simpson, et al. Development of a 95/5 poly(L-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite and ϵ -tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via selective laser sintering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2008, 84B(1): 17–25
 51. K. H. Tan, et al. Scaffold development using selective laser sintering of poly(etheretherketone)-hydroxyapatite biocomposite blends. *Biomaterials*, 2003, 24(18): 3115–3123
 52. K. H. Tan, C. K. Chua, K. F. Leong, M. W. Naing, C. M. Cheah. Fabrication and characterization of three-dimensional poly(ether-ether-ketone)-hydroxyapatite biocomposite scaffolds using laser sintering. *Proc. Inst. Mech. Eng. H*, 2005, 219(3): 183–194
 53. C. K. Chua, K. F. Leong, K. H. Tan, F. E. Wiria, C. M. Cheah. Development of tissue scaffolds using selective laser sintering of polyvinyl alcohol/hydroxyapatite biocomposite for craniofacial and joint defects. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2004, 15(10): 1113–1121
 54. F. E. Wiria, C. K. Chua, K. F. Leong, Z. Y. Quah, M. Chandrasekaran, M. W. Lee. Improved biocomposite development of poly(vinyl alcohol) and hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication using selective laser sintering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008, 19(3): 989–996
 55. F. E. Wiria, K. F. Leong, C. K. Chua, Y. Liu. Poly- ϵ -caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. *Acta Biomater.*, 2007, 3(1): 1–12
 56. F. E. Wiria, N. Sudarmadji, K. F. Leong, C. K. Chua, E. W. Chng, C. C. Chan. Selective laser sintering adaptation tools for cost effective fabrication of biomedical prototypes. *Rapid Prototyping J.*, 2010, 16(2): 90–99
 57. G. Kim, J. Son, S. Park, W. Kim. Hybrid process for fabricating 3D hierarchical scaffolds combining rapid prototyping and electrospinning. *Macromol. Rapid Commun.*, 2008, 29(19): 1577–1581
 58. S. H. Park, U. H. Koh, M. Kim, D. Y. Yang, K. Y. Suh, J. H. Shin. Hierarchical multilayer assembly of an ordered nanofibrous scaffold via thermal fusion bonding. *Biofabrication*, 2014, 6(2): 024107
 59. C. H. Chen, V. B. H. Shyu, J. P. Chen, M. Y. Lee. Selective laser sintered poly- ϵ -caprolactone scaffold hybridized with collagen hydrogel for cartilage tissue engineering. *Biofabrication*, 2014, 6(1): 015004
 60. C. K. Chua, M. W. Naing, K. F. Leong, C. M. Cheah. Novel method for producing polyhedra scaffolds in tissue engineering. In: *Virtual Modeling and Rapid Manufacturing—Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping*, 2003: 633–640
 61. H. S. Ramanath, C. K. Chua, K. F. Leong, K. D. Shah. Melt flow behaviour of poly- ϵ -caprolactone in fused deposition modelling. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008, 19(7): 2541–2550

62. F. E. Wiria, K. F. Leong, C. K. Chua. Modeling of powder particle heat transfer process in selective laser sintering for fabricating tissue engineering scaffolds. *Rapid Prototyping J.*, 2010, 16(6): 400–410
63. K. C. Ang, K. F. Leong, C. K. Chua, M. Chandrasekaran. Investigation of the mechanical properties and porosity relationships in fused deposition modeling-fabricated porous structures. *Rapid Prototyping J.*, 2006, 12(2): 100–105
64. H. S. Ramanath, M. Chandrasekaran, C. K. Chua, K. F. Leong, K. D. Shah. Modeling of extrusion behavior of biopolymer and composites in fused deposition modeling. In: *Key Engineering Materials*, 2007, 334–335: 1241–1244
65. N. Sudarmadji, J. Y. Tan, K. F. Leong, C. K. Chua, Y. T. Loh. Investigation of the mechanical properties and porosity relationships in selective laser-sintered polyhedral for functionally graded scaffolds. *Acta Biomater.*, 2011, 7(2): 530–537
66. C. E. Misch, Z. Qu, M. W. Bidez. Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: Implications for dental implant treatment planning and surgical placement. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 1999, 57(6): 700–706, discussion 706–708
67. C. K. Chua, M. J. J. Liu, S. M. Chou. Additive manufacturing-assisted scaffold-based tissue engineering. In: *Innovative Developments in Virtual and Physical Prototyping—Proceedings of the 5th International Conference on Advanced Research and Rapid Prototyping*, 2012: 13–21
68. W. Y. Yeong, C. K. Chua, K. F. Leong, M. Chandrasekaran, M. W. Lee. Indirect fabrication of collagen scaffold based on inkjet printing technique. *Rapid Prototyping J.*, 2006, 12(4): 229–237
69. W. Y. Yeong, C. K. Chua, K. F. Leong, M. Chandrasekaran, M. W. Lee. Comparison of drying methods in the fabrication of collagen scaffold via indirect rapid prototyping. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2007, 82B(1): 260–266
70. J. Y. Tan, C. K. Chua, K. F. Leong. Indirect fabrication of tissue engineering scaffolds using rapid prototyping and a foaming process. In: *Innovative Developments in Design and Manufacturing—Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping*, 2010: 51–57
71. J. Y. Tan, C. K. Chua, K. F. Leong. Fabrication of channeled scaffolds with ordered array of micro-pores through microsphere leaching and indirect Rapid Prototyping technique. *Biomed. Microdevices*, 2013, 15(1): 83–96
72. C. H. Chen, J. M. J. Liu, C. K. Chua, S. M. Chou, V. B. H. Shyu, J. P. Chen. Cartilage tissue engineering with silk fibroin scaffolds fabricated by indirect additive manufacturing technology. *Materials (Basel)*, 2014, 7(3): 2104–2119
73. V. Mironov, V. Kasyanov, R. R. Markwald. Organ printing: From bioprinter to organ biofabrication line. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011, 22(5): 667–673
74. M. Bartnikowski, T. J. Klein, F. P. W. Melchels, M. A. Woodruff. Effects of scaffold architecture on mechanical characteristics and osteoblast response to static and perfusion bioreactor cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 2014, 111(7): 1440–1451
75. M. Ghaedi, J. J. Mendez, P. F. Bove, A. Sivarapatna, M. S. B. Raredon, L. E. Niklason. Alveolar epithelial differentiation of human induced pluripotent stem cells in a rotating bioreactor. *Biomaterials*, 2014, 35(2): 699–710
76. T. W. G. M. Spitters, et al. A dual flow bioreactor with controlled mechanical stimulation for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2013, 19(10): 774–783
77. L. Dan, C. K. Chua, K. F. Leong. Fibroblast response to interstitial flow: A state-of-the-art review. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, 107(1): 1–10
78. D. Liu, C. K. Chua, K. F. Leong. A mathematical model for fluid shear-sensitive 3D tissue construct development. *Biomech. Model. Mechanobiol.*, 2013, 12(1): 19–31
79. B. C. M. Tay, C. Y. Fu, B. K. Ng, J. M. J. Liu, S. M. Chou, C. K. Chua. Monitoring cell proliferation in silk fibroin scaffolds using spectroscopic optical coherence tomography. *Microw. Opt. Technol. Lett.*, 2013, 55(11): 2587–2594
80. C. K. Chua, W. Y. Yeong. *Bioprinting: Principles and Applications*. Singapore: World Scientific Publishing Company Pte Limited, 2014
81. V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs, R. R. Markwald. Organ printing: Computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21(4): 157–161
82. V. Mironov, V. Kasyanov, C. Drake, R. R. Markwald. Organ printing: Promises and challenges. *Regen. Med.*, 2008, 3(1): 93–103
83. 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
84. J. An, C. K. Chua, T. Yu, H. Li, L. P. Tan. Advanced nanobiomaterial strategies for the development of organized tissue engineering constructs. *Nanomedicine (Lond)*, 2013, 8(4): 591–602
85. Alec. Russian scientists to unveil 3D bioprinted transplantable organ in March 2015. 2014-11-10. <http://www.3ders.org/articles/20141110-russian-scientists-to-unveil-3d-bioprinted-transplantable-organ-in-march-2015.html>
86. S. V. Murphy, A. Atala. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32(8): 773–785
87. D. B. Kolesky, R. L. Truby, A. S. Gladman, T. A. Busbee, K. A. Homan, J. A. Lewis. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv. Mater.*, 2014, 26(19): 3124–3130
88. N. E. Fedorovich, 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
89. J. M. Lee, W. Y. Yeong. A preliminary model of time-pressure dispensing system for bioprinting based on printing and material parameters. In: *Virtual and Physical Prototyping*, 2014: 1–6
90. C. Cvetkovic, et al. Three-dimensionally printed biological machines powered by skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2014, 111(28): 10125–10130
91. S. Tibbits. 4D printing: Multi-material shape change. *Architectural Design*, 2014, 84(1): 116–121
92. Q. Ge, C. K. Dunn, H. J. Qi, M. L. Dunn. Active origami by 4D printing. In: *Smart Materials and Structures*, 2014, 23: 094007–094022
93. E. Pei. 4D printing—Revolution or fad? *Assembly Automation*, 2014, 34(2): 123–127
94. E. M. Teoh, C. K. Chua, Y. Liu, D. Q. Zhang. Four dimensional (4D) printing using polyjet technology. In: *The 4th International Conference on Additive Manufacturing and Bio-manufacturing (ICAM-BM 2014)*. Beijing, China, 2014: 35–36
95. R. W. Esmond, G. C. Phero. The additive manufacturing revolution and the corresponding legal landscape. In: *Virtual and Physical Prototyping*, 2014: 1–4