

生物三维打印技术在肝组织工程的应用与展望*

游辅宇 综述,高毅[△]审校

(南方医科大学珠江医院肝胆二科,广东珠江 510282)

[摘要] 生物三维打印(TDP)技术是组织工程重要的新兴技术;不同于传统的组织工程技术,生物 TDP 技术具备在微观及宏观多尺度构建组织的能力,是连接不同尺度组织工程的桥梁。本综述总结分析生物 TDP 技术在肝组织工程各尺度的最新进展,为生物 TDP 技术在肝组织工程的应用提供参考。

[关键词] 生物三维打印;肝脏;组织工程;三维培养

[中图分类号] R318.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)31-4056-03

肝脏是人体物质代谢的中心,具有众多的功能,糖原存储、药物代谢、血清蛋白合成、激素代谢等均在肝脏进行。同时肝脏也是多种致病因素的攻击靶点,急性肝衰竭、肝硬化等肝脏疾病严重威胁着人类的健康,肝移植是治疗这些疾病的惟一有效方法。然而供体的缺乏及免疫排斥等限制了肝脏移植的临床应用,肝组织工程是解决这一问题的希望^[1]。

目前肝组织工程主要有两种构建策略:自上而下和自下而上^[2]。自上而下技术注重对肝脏宏观结构及功能的模拟,而难以对肝脏微观结构及细胞微环境进行模拟^[3];后者则注重对微观结构的模拟,却难以规模化。生物三维打印(three dimensional printing, TDP)技术因具备在微观及宏观两种尺度构建组织的特点,成为连接微观与宏观的希望^[4-6]。本文就生物 TDP 技术在各尺度肝组织工程的应用现状进行总结,为生物 TDP 技术构建兼具微观与宏观结构及功能的肝组织提供参考。

1 生物 TDP 技术概述

生物 TDP 技术是以生物材料、细胞及生物学分子等为材料,通过逐层堆积精确构建具有一定空间结构和一定生物学功能组织的技术,是快速成型技术和增材制造技术的一种^[7-8]。生物 TDP 能够极大地提高细胞、生物材料和生物活性分子空间分布的精确性,精确控制体外模型的结构。这一特性使其在构建体外组织模型及组织工程受到越来越多的关注。

目前常用的生物 TDP 技术主要分为 3 种:喷墨式生物 TDP、激光生物 TDP、微挤出式生物 TDP^[7,9-10]。喷墨式生物 TDP 机及激光生物 TDP 机均能够在微观层次实现对细胞及其微环境的操控;而微挤出式生物 TDP 机具备在宏观层面对大量肝细胞进行排布的能力。

2 生物 TDP 技术在微观尺度构建肝组织

喷墨生物 TDP 机通过热能或声压控制一定体积

的含细胞液滴分布到预设位置实现 TDP,是最常用的打印机类型,具有价格低、高分辨率、打印速度快、能够兼容多种生物材料、打印精度可调等众多优点^[7]。2013 年 MATSUSAKI 等^[11]利用喷墨生物 TDP 机在单细胞层次实现对肝细胞和内皮细胞进行打印;成功构建了具有多层细胞结构的肝组织芯片。检测肝细胞功能显示,相较于简单的三维培养、三明治培养,具备此种精确结构的肝组织芯片具有更好的清蛋白分泌、细胞色素酶 P450(CYP450)同工酶诱导与代谢功能。Organovo 公司利用自主研发的 TDP 机构建出类似肝小叶结构,具有良好的 CYP 酶活力的微肝组织^[12-13]。

激光生物 TDP 机基于激光介导转移的原理,利用激光使黏附在平板上特定位置的细胞脱落,从而构建三维结构。其具有打印精度高(可精确至单个细胞),细胞活力高(达 95%)、对细胞损害小、细胞打印密度高等优点。2016 年 MA 等^[14]利用激光生物 TDP 机成功打印具有肝小叶结构的肝组织模型,此组织中细胞具有良好的形态学特征,肝组织的分泌及代谢功能均得到了良好的表达。可见,生物 TDP 技术能够在微观层次,以细胞为“砖块”进行三维搭建,精确化、标准化的定义细胞位置及其微环境,从而构建具有良好功能的微肝组织。

3 生物 TDP 技术在宏观尺度构建肝组织

微挤出式生物 TDP 机通过气压、活塞、螺旋等方式将液体或凝胶状生物墨水连续挤出从而构建三维模型^[7]。适用于微挤出的生物 TDP 机材料包括水凝胶、具有生物相容性的聚合物材料,细胞球等。此种生物 TDP 机可兼容较高的细胞密度,能够实现对大量细胞的宏观排布,在组织工程规模化方面具有很大的优势^[7]。WANG 等^[15]利用微挤出式生物 TDP 技术打印细胞凝胶混合物构建具有多层空间结构的肝组织,此组织细胞能够保持至少 2 个月的活力及功

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81470875)。 作者简介:游辅宇(1992-),在读博士研究生,主要研究领域为肝细胞三维培养。

[△] 通信作者, E-mail: gaoyi6146@163.com。

能,表明其具备规模化构建人工肝组织的可能。此后多个研究利用挤出式生物 TDP 机进行肝组织打印,且构建的肝组织具有良好的功能^[3,6,16-18]。2017 年 JEON 等^[19]利用微挤出式生物 TDP 技术构建的肝组织块细胞数量可达到 1×10^7 /mL 水平,接近体内组织细胞数量级水平。此外有研究将挤出式生物 TDP 机构建的肝组织块移植入肝损伤模型小鼠体内,肝组织表现出更好的活力及功能^[20]。综上所述,挤出式生物 TDP 机具有规模化、标准化的构建出可用于移植的人工肝组织的可能。

4 生物 TDP 技术连接宏观与微观的桥梁

模块化构建肝组织工程技术便是基于生物 TDP 技术特性所提出的一种新型组织工程策略^[21]。这种策略的基本方法为大规模构建组织器官的基本功能/结构单元,而后对这些基本单元为模块进行仿生组装,从而得到兼具微观与宏观结构功能的组织^[21]。生物 TDP 技术因其在微观和宏观层次均能够规模化、标准化精确构建具有复杂三维结构的组织而成为此种策略的重要工具,成为连接微观与宏观之间的桥梁。

2017 年 YANAGI 等^[22]提出了一种利用生物 TDP 技术将肝芽样细胞球组装为宏观肝组织的方法;作者首先大规模构建由肝细胞、人脐静脉内皮细胞、骨髓间充质干细胞混合组成的肝芽样细胞球(直径 $500 \sim 600 \mu\text{m}$);以细胞球为基本模块进行打印组装从而构建规模化的肝组织。构建的肝组织具备体外自我修复能力,并有向肝组织结构方向演化的可能。将构建的肝组织移植入小鼠体内后检测到组织具备清蛋白分泌功能及 CYP 酶活性;并具有再发生胆总管的可能。目前利用 TDP 技术连接微观与宏观构建肝组织的文献报道较少,然而仍可看出生物 TDP 技术相较于传统组织工程技术,其具备成为连接微观与宏观桥梁的可能性,是肝组织工程重要的技术方法。

5 生物 TDP 技术在构建血管网络中的应用

血管化是限制宏观组织构建的重要因素^[23]。合理的血管分布是保证人工组织能够获取足够营养物质、排出废物、存活并表达相应功能的重要保证^[24]。近年来生物 TDP 技术已经被用于构建内皮化、可灌注的三维血管网络。MILLER 等^[25]利用 TDP 技术将直径为 $200 \mu\text{m}$ 的糖玻璃网络打印在包埋有小鼠原代肝细胞的凝胶组织中,而后将糖玻璃溶解并内衬于内皮细胞从而成功构建血管网络。2017 年 MASSA 等^[26]结合水凝胶支架、生物 TDP 技术及微流控技术构建了一种含血管的肝组织芯片,利用肝组织芯片进行药物筛选表明含有人工血管的组织具有更接近体内的性质。目前利用生物 TDP 技术构建肝组织血管网络的报道较少,但可看出生物 TDP 技术具备构建具有复杂三维结构的血管网络的能力与前景。

6 生物 TDP 肝组织动物体内移植

目前生物 TDP 技术构建的宏观肝组织块只进行

了少量的动物实验。由于对微观结构、宏观组织、血管网络三者现阶段无法进行良好的整合,在移植过程中无法实现有效的血管吻合。因此,目前动物实验所采用的主要移植方式是将打印的肝组织块种植于小鼠肝脏表面或大网膜中。2017 年 KANG 等^[20]将生物 TDP 的肝组织块植入肝损伤小鼠网膜之中,结果表明,与体外比较,植入小鼠体内的肝组织表现出更好的功能。尽管生物 TDP 肝组织技术仍不成熟,然而动物实验表明了其应用于移植的可能。

7 展 望

生物 TDP 技术仍然处于其发展的初期^[7]。尽管其在各尺度的肝组织工程均表现出独特的优势,然而利用生物 TDP 技术消除微观与宏观的鸿沟,构建具有功能并可用于移植的肝组织仍面临巨大的挑战。当前限制生物 TDP 肝组织面临的挑战主要集中在 3 个方面:打印技术、生物材料与种子细胞、打印策略。

微观肝组织的构建需要在打印精度、打印速度、细胞活力三者间寻找合适的平衡;在快速构建微肝组织的同时需具备足够精度及保证较高细胞活力,才可为宏观构建肝组织提供足够可用的微模块。而宏观组织同样具有复杂的三维结构。目前的生物 TDP 技术均难以同时在多方面满足构建需求;由此研发新的、具备平衡上述各种要求能力的打印机是促进生物 TDP 技术的重要方面。生物 TDP 技术是对种子细胞及生物材料的有序组装过程。种子细胞是决定 TDP 肝组织功能的基石,目前用于打印的细胞有肿瘤细胞系、原代细胞、干细胞等,这些细胞有着各自的特点与缺陷;近年来干细胞因具有分化为不同特定功能细胞的特性,是近年来最受关注的细胞来源之一。特别是诱导多功能干细胞能够从患者组织中获取细胞,经过重新编程获得,解决了来源的限制;且由于与患者细胞同源,不存在免疫排斥的问题。TDP 技术生物材料的物理化学性质在很大程度上限制了生物 TDP 方法选择,间接限制了打印的速度、精度等。同时良好的生物材料具备保护种子细胞,促进种子细胞功能表达与维持等重要作用。

目前生物 TDP 技术规模化构建策略单一,可选择的生物 TDP 机及兼容的打印微肝组织模块少。研制可兼容微肝组织模块及血管网络的新型打印机,制订合理的、标准化的构建策略是当前的重要方向。尽管生物 TDP 技术仍然存在着许多不足,但随着技术的发展,生物 TDP 技术在空间与时间精度上的提升,生物材料及种子细胞的优化,生物 TDP 技术将成为有效、可靠、快速的肝组织构建方法。

参考文献

- [1] GRIFFITH L G, WELLS A, STOLZ D B. Engineering liver[J]. *Hepatology*, 2014, 60(4):1426-1434.
- [2] SUDO R. Multiscale tissue engineering for liver recon-

- struction[J]. *Organogenesis*, 2014, 10(2): 216-224.
- [3] LEE H, HAN W, KIM H, et al. Development of liver decellularized extracellular matrix bioink for three-dimensional cell printing-based liver tissue engineering[J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(4): 1229-1237.
- [4] SHAFIEE A, ATALA A. Tissue engineering: toward a new era of medicine[J]. *Annu Rev Med*, 2017, 68(1): 29-40.
- [5] MURPHY S V, ATALA A. 3D bioprinting of tissues and organs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(8): 773-785.
- [6] NGUYEN D G, FUNK J, ROBBINS J B, et al. Bioprinted 3D primary liver tissues allow assessment of organ-level response to clinical drug induced toxicity in vitro[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e158674.
- [7] CUI H, NOWICKI M, FISHER J P, et al. 3D bioprinting for organ regeneration[J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(1): 1601118.
- [8] MIRONOV V, REIS N, DERBY B. Review: bioprinting: a beginning[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(4): 631-634.
- [9] LI J, CHEN M, FAN X, et al. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 271.
- [10] MALDA J, VISSER J, MELCHELS F P, et al. 25th Anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication[J]. *Adv Mater*, 2013, 25(36): 5011-5028.
- [11] MATSUSAKI M, SAKAUE K, KADOWAKI K, et al. Three-dimensional human tissue chips fabricated by rapid and automatic inkjet cell printing[J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2(4): 534-539.
- [12] NGUYEN D, ROBBINS J, CROGANGRUNDY C, et al. Functional characterization of three-dimensional (3D) human liver tissues generated by an automated bioprinting platform[J]. *FASEB J*, 2015, 29(1): 291-300.
- [13] ROBBINS J B, GORGEN V, MIN P, et al. A novel in vitro three-dimensional bioprinted liver tissue system for drug development[J]. *FASEB J*, 2013, 27(3): 872-881.
- [14] MA X, QU X, ZHU W, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2016, 113(8): 2206-2211.
- [15] WANG X, YAN Y, PAN Y, et al. Generation of three-dimensional hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(1): 83-90.
- [16] LEE J W, CHOI Y J, YONG W J, et al. Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering [J]. *Biofabrication*, 2016, 8(1): 015007.
- [17] BERTASSONI L E, CARDOSO J C, MANOHARAN V, et al. Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels[J]. *Biofabrication*, 2014, 6(2): 024105.
- [18] ZHONG C, XIE H Y, ZHOU L, et al. Human hepatocytes loaded in 3D bioprinting generate mini-liver[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2016, 15(5): 512-518.
- [19] JEON H, KANG K, PARK S A, et al. Generation of multilayered 3D structures of HepG2 cells using a bio-printing technique[J]. *Gut Liver*, 2017, 11(1): 121-128.
- [20] KANG K, KIM Y, LEE S B, et al. Three-dimensional bioprinting of hepatic structures with direct-converted hepatocyte-like cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2018(7/8): 576-583.
- [21] ZHANG Y S, YUE K, ALEMAN J, et al. 3D Bioprinting for tissue and organ fabrication[J]. *Ann Biomed Eng*, 2017, 45(1): 148-163.
- [22] YANAGI Y, NAKAYAMA K, TAGUCHI T, et al. In vivo and ex vivo methods of growing a liver bud through tissue connection[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14085.
- [23] JEYARAJ R, G N, KIRBY G, et al. Vascularisation in regenerative therapeutics and surgery[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015(54): 225-238.
- [24] LEE G B, WU H C, YANG P F, et al. Optically induced dielectrophoresis sorting with automated medium exchange in an integrated optofluidic device resulting in higher cell viability[J]. *Lab Chip*, 2014, 14(15): 2837-2843.
- [25] MILLER J S, STEVENS K R, YANG M T, et al. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues[J]. *Na Mater*, 2012, 11(9): 768-774.
- [26] MASSA S, SAKR M A, SEO J, et al. Bioprinted 3D vascularized tissue model for drug toxicity analysis [J]. *Biomicrofluidics*, 2017, 11(4): 044109.

(收稿日期: 2018-03-14 修回日期: 2018-06-16)

(上接第 4055 页)

- many podocyte autophagosomes are there in immunoglobulin a nephropathy and idiopathic membranous nephropathy? [J]. *Int Urol Nephrol*, 2016, 48(12): 2109-2114.
- [23] JIN J, ZHAN H, LIN B, et al. Association of podocyte autophagosome numbers with idiopathic membranous nephropathy and secondary membranous nephropathy[J]. *Int Urol Nephrol*, 2017, 49(6): 1025-1031.
- [24] 吕倩影, 周建华, 杨凤杰, 等. 亚容量 C5 b-9 可诱导足细胞的保护性自噬应答[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(1): 59-63.
- [25] WANG L, HONG Q, LV Y, et al. Autophagy can repair endoplasmic reticulum stress damage of the passive Heymann nephritis model as revealed by proteomics analysis [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(13): 3866-3876.
- [26] ELIMAM H, PAPIILLON J, KAUFMAN D R, et al. Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2 α induces glomerular injury in mice[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(28): 14468-14482.

(收稿日期: 2018-03-22 修回日期: 2018-06-16)