

## 医学3D打印技术在视网膜修复的研究进展

谢雨杉<sup>1</sup>, 汪艳芳<sup>1</sup>, 黄文华<sup>1,2</sup>

1. 南方医科大学基础医学院人体解剖国家重点学科, 广东 广州 510515; 2. 广东省医学3D打印应用转化工程技术研究中心, 广东 广州 510515

**【摘要】**生物3D打印技术为视网膜受损修复这一难题的解决提供了可能。用海藻酸钠水凝胶打印一个用于细胞生长的支架,利用3D打印的超高精度将视网膜的神经节细胞和神经胶质细胞植入支架,并加入一定浓度的生长因子,诱导细胞向特性方向生长,用这种方法打印视网膜细胞将实现形态可控、强度可控、梯度释放,有望实现体外视网膜细胞的精确打印,解决临床视网膜神经缺损修复的难题。本文在对这些成果进行系统总结的基础上,简要评析了研究现状并且提出了亟待解决的问题,以期为该领域的进一步研究提供参考。

**【关键词】**3D打印;视网膜细胞;海藻酸钠水凝胶;综述

**【中图分类号】**R312

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2019)02-0234-05

### Research progress on 3D printing technology in retinal repair

XIE Yushan<sup>1</sup>, WANG Yanfang<sup>1</sup>, HUANG Wenhua<sup>1,2</sup>

1. National Key Discipline, Department of Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Guangdong Province Medical 3D Printing Application Transformation Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** Biological three-dimensional (3D) printing technology provides the possibility to develop retinal prosthesis. Firstly, sodium alginate hydrogel is used to print a scaffold for cells. And then the ganglion and cells were implant to the scaffold with the use of 3D printing technology with a high accuracy. The growth factors were added into the scaffold to induce the growth of cells. The technology allows the morphology and intensity of cells to be controlled. Moreover, using this technology to print retinal cells can realize gradient release. Herein the achievements of 3D printing technology in retinal repair are summarized; the research status are briefly analyzed; and the existing issues are putted forward, in order to provide a reference for the further research on 3D printing technology in retinal repair.

**Keywords:** three-dimensional printing; retinal cell; sodium alginate hydrogel; review

### 前言

视网膜损伤和退行性病变是引起严重视力损伤甚至失明的重要原因<sup>[1]</sup>。如何修复受损的视网膜是临床治疗中长期存在的一大难题。视网膜细胞移植及促细胞生长的相关因子注射是很有潜力的治疗手段,但如何获得安全有效、数量可观的移植供体并实现移植后的细胞存活、整合,仍是我们亟需解决的问题。

近年来,随着3D生物打印技术的发展,皮肤、骨组织纷纷被打印出来并成功移植,3D生物打印技术在组织工程的应用方面展现了极大的优势<sup>[2]</sup>。许多相关领域的研究者们也对视网膜的3D生物打印做了不同尝试,在不同类型的视网膜细胞领域取得了不错的进展。本文将回顾现有阶段所采用的生物打印技术及其各类型视网膜细胞生物打印的进度,从而为今后创造可用于治疗、可打印的功能性类视网膜组织器官提供指导和建议。

### 1 生物3D打印

#### 1.1 打印技术

目前主要的生物3D打印技术有喷墨3D打印技术、微挤压印刷技术、激光辅助打印技术等。

**【收稿日期】**2018-09-11

**【基金项目】**国家重点研发计划(2017YFC1103403);深圳市三名工程(SZSM201612019)

**【作者简介】**谢雨杉,硕士研究生,研究方向:3D打印,E-mail: 2293723919@qq.com

**1.1.1 喷墨3D打印技术** 喷墨3D打印技术是一种数字模型文件为基础,运用粉末状金属或塑料等可粘材料,通过逐层堆叠累积的方式来构造物体的技术(即“积层造形法”)<sup>[3]</sup>。过去其常在模具制造、工业设计等领域被用于制造模型,现正逐渐用于一些产品的直接制造,现在可以利用患者的细胞作为原材料打印功能齐全的器官。和之前的喷墨打印机一样,将培养的生物墨水一层层堆积。喷墨生物3D打印有两种常见的方式:连续喷墨印刷和按需滴墨喷墨印刷<sup>[4]</sup>。虽然喷墨打印可以提高沉积材料的吞吐量,但由于喷嘴存在一些缺陷,很难打印出高浓度的液体(超过1 000万个细胞/mL),同时由于喷嘴附近的剪切压力<sup>[5]</sup>,造成细胞损伤的风险增加<sup>[6]</sup>。

**1.1.2 微挤压印刷技术** 微挤压印刷技术是一种相对低成本和快速的方法,可以打印高度浓缩的细胞悬液<sup>[7]</sup>。使用加热器将热熔性材料熔化,材料先抽拉成丝状,通过送丝装置送进热熔喷头,材料在喷头内加热融化,喷头沿零件截面轮廓和填充轨迹运动,同时按照CAD分层数据的路径控制半流动状态的材料,挤出并沉积在指定的位置凝固成形,并与周围的材料粘结,层层堆积成型。由于其在打印过程中需要加热,与喷墨打印相比,细胞的生存能力更低<sup>[8]</sup>。

**1.1.3 激光辅助打印技术** 激光辅助打印是一种最昂贵的方法,它在保持细胞生存能力的同时增加了打印过程中细胞的浓度,但速度相对较慢,而且细胞植入的精度难以保证<sup>[9]</sup>。激光辅助生物打印可分为两个类别:一是激光导致局部射流形成的细胞打印;二是过程涉及光聚合的成型技术。前者使用激光对生物墨水进行局部加热,形成高压气泡,导致射流形成。激光辅助生物打印的分辨率受到许多因素的影响,如激光能量密度、表面密度、基底湿度、基底和吸收层气隙以及生物样品层的厚度和黏度等。因此激光辅助打印技术速度相对较慢,而且细胞植入的精度难以保证。

**1.1.4 静电纺丝** 静电纺丝技术是指聚合物溶液或者熔体在高压静电场作用下形成纤维的过程,是一种简单、快捷,且可以较大规模制备均匀、连续的一堆纳米结构材料的方法,其制备的纤维直径可从几十个纳米到几微米,可以对人造肌肉、神经、血管等复杂的人体组织器官进行模拟。影响静电纺丝的因素有很多,包括纺丝溶液的固有性质(例如聚合物种类、聚合物分子链结构、溶液的浓度和粘度、溶液的导电性、溶剂的极性和表面张力情况等)、纺丝条件(例如电场强度、纺丝距离、聚合物溶液的挤出速度等)<sup>[10]</sup>。

## 1.2 支架结构生物材料

为了改进打印过程中,细胞悬液浓度难以控制的问题,可以用非细胞水凝胶来打印三维支架,之后在支架上含有生长因子的底物,并植入细胞<sup>[11]</sup>。经观察,细胞可以在这些支架上生长,并形成错综复杂的网络。但目前这项技术由于前期很难引导细胞定向生长,大多数应用于骨和软骨的打印<sup>[12]</sup>。

**1.2.1 海藻酸钠水凝胶** 海藻酸钠是从褐藻类的海带或马尾藻中提取碘和甘露醇后的副产物,海藻酸钠具有良好的生物相容性、生物降解性和pH敏感性<sup>[13]</sup>。海藻酸钠水凝胶与其他聚合物相比,具有价格低、来源丰富、易塑形、更好的亲水性、易于细胞吸附、营养物质易于渗透等特点。此外,海藻酸钠还能促进巨噬细胞和人浆细胞的许多免疫学功能。因此,其具有较好的生物相容性和力学性能,是目前最有前景的生物材料之一。

**1.2.2 明胶** 明胶是胶原经温和而不可逆的断裂后的主要产物,化学性质稳定。构成蛋白质的氨基酸大约有20种,而明胶就含有其中的18种,因此其还具有极高的生物相容性。明胶中缺少色氨酸,是胶原变性所得的产物,属蛋白质大分子范畴。明胶微球广泛用于生物材料,因为明胶和光引发剂的混合物通过暴露于紫外线的环境下,可以在挤出期间或之后实现快速交联<sup>[14]</sup>。此外,明胶具有丰富的整合素结合基序,如纤连蛋白、波形蛋白和体外结合蛋白,它们通常参与细胞增殖过程。虽然光固化成型技术是用于高分辨率明胶生物材料打印,但挤出式生物打印技术则是明胶生物材料打印最广泛应用的方法,并且其使用相对容易。

**1.2.3 天然来源的人造支架** 它是一系列的生物支架,可以用来承载视网膜3D打印的细胞,来源于体内的已有组织和体内元素的集合体。主要的天然支架有胶原薄膜、明胶支架、晶状体囊、血浆、羊膜。天然生物支架可以通过不同的物理、化学或酶学去细胞方法从细胞、组织和器官中获得。天然生物支架具有良好的细胞相容性、力学特性以及生物降解性,有利于细胞生长、增殖、粘附及分化,可有效地降低其免疫源性,从而避免过敏反应和疾病传播。

**1.2.4 去细胞的细胞外基质** 细胞外基质是细胞分泌到细胞外间充质中的蛋白质和多糖类大分子物质,具有高度组织有序的细胞外微环境,可形成结构复杂的网架,连接各个组织结构,对细胞的生长、发育以及细胞生理活动具有关键的调节作用,是细胞的外环境。但是,天然的细胞外基质是由多种蛋白质组成(主要分为胶原、糖蛋白、氨基聚糖及蛋白聚糖、

弹性蛋白4大类),由于结构复杂,不易在体外培养重构。通过不同物理、化学或酶学去细胞方法从细胞、组织和器官获得天然的细胞外基质对这一难题的解决提供了新的有效解决途径。去细胞化基质具有良好的细胞相容性、力学特性以及生物降解性,有利于细胞生长、增殖、粘附及分化,可有效地降低其免疫源性,从而避免过敏反应和疾病传播。去细胞的细胞外基质是通过去除自身组织的细胞成分及一些小分子抗原,保留细胞外基质,是最为接近正常组织结构及微环境,理论上最为适合细胞的生长、分化及基质分泌,它最近被认为是生物打印应用中具有巨大潜力的材料。各种蛋白质、蛋白聚糖和糖蛋白的混合组成可以模仿原生组织的细胞基质的组成。在符合生理温度的条件下,丰富的胶原蛋白的凝胶化促进了交联的简化,这是去细胞的细胞外基质在打印过程中所具有的特定优势<sup>[15]</sup>。

## 2 神经细胞打印

神经细胞分化程度高,再生能力非常有限,如何制造一个具有三维结构,同时保留细胞的神经元表面型和基本的电生理学的神经细胞是目前神经组织工程的一大难题。

Hu等<sup>[16]</sup>用微型光刻装置,使用3-羟基丁酸酯和3-羟基戊酸酯的共聚物为原料,并从老鼠的脂肪组织中提取骨髓间充质干细胞培养,再加入FGF2因子,通过3D光固化的打印方式制备出仿生神经,植入大鼠坐骨神经损伤缺口中,28 d后观察发现仿生神经修复效果与自体移植效果相近。Johnson等<sup>[17]</sup>使用神经干细胞、藻酸盐、氯化钙、聚乳酸-乙醇酸共聚物、聚己内酯、硅酮和明胶水凝胶作为3D打印材料,通过微挤压的打印方式制备出3D打印的空心导管,植入到神经缺损的大鼠模型,经过12周后,实验组与空白组进行步态运动分析,发现实验组的抓力有明显的提高,几乎接近正常大鼠。Xu等<sup>[18]</sup>通过喷墨打印将NT2细胞和纤维蛋白凝胶逐层打印,制造除了具有神经结构和电生理特性的神经元,NT2神经元来自ATCC 3813555,培养液是10%的FBS,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的标准条件下培养。实验结果在光学显微镜下可以看到,细胞符合预先设计的圆形图案,存活率74.2%±6.3%。电生理记录显示在组织内外有Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>浓度的变化,并检测到了10~85 mV的电压变化。打印细胞的存活率和细胞功能都有了很大的提升。

## 3 神经节和神经纤维层打印

单个神经细胞的生存率和电生理功能可以得到

保证,但是将一系列神经细胞成功打印并生成具有功能性的神经节甚至神经纤维层将大大增加打印的难度,这需要保证细胞本身具有一定的生长可控性。

Kador等<sup>[19]</sup>创造了一个可生物降解的电纺(ES)支架,用来引导视网膜神经节细胞(RGC)轴突的生长,模仿视网膜上的轴突定向,通过建立几组不同的纤维结构来进行比较,如图1所示。在电压15 kV、流速2 mL/h、距离12 cm时具有最高的纤维走向一致性。利用这个支架,RGC的存活量明显增加,并且在电生理特性上没有显著的变化。当对校准进行分析时,有81%的RGC被观察到,在支架纤维上的轴突与视网膜移植的神经纤维层相比没有差别。当移植到视网膜移植体上时,在ES支架上的RGC遵循宿主视网膜神经纤维的放射状模式,而RGC则直接以随机的模式移植了轴突。因此,使用这种支架作为一种细胞输送装置,是朝着使用细胞移植疗法治疗青光眼和其他视网膜退化疾病迈出的重要一步。

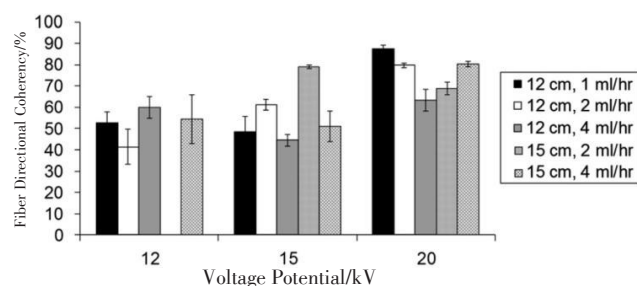


图1 纤维方向一致性占比

Fig.1 Fiber directional coherency

指导RGC轴突向视神经头延伸是一个重要的难点,无论是在正常的发展过程中,还是在考虑RGC替代疗法在伤害或疾病方面。在发育过程中,视网膜神经纤维层中的RGC轴突被定向到视神经头,在视神经的头部,可以通过分泌一些可溶性的引导因子引导神经细胞生长。Netrin-1是视网膜内的可溶性蛋白质,负责指导神经在大脑皮层分支和定位<sup>[20]</sup>。

为了保证在轴突引导过程中Netrin-1浓度对于化学固定所需的量是足够的,采用一种随机的、非梯度成型的方法进行固定。在-coated支架上培养Netrin-1,显示了极化RGC数量的增加,即细胞只有一个轴突延伸。此外,在这些支架上培养的RGC也延长了轴突,这是因为在支架上的netrin-1集团形成了一个引导神经生长的浓度梯度。这些结果证明固定在支架上的Netrin-1的浓度足以引起生物反应。其次,有必要确定光启动交联的方法是否将使蛋白质的最高浓度达到最高。为了确定这一点,荧光标



记的 bsa-fitc 蛋白通过两种不同的紫外线活性交联方式被固定。在第一种方法中,交联剂最初是通过 NHS 的亚单位和可溶蛋白结合,然后通过光激活的二氯化单元进行交联。在第二种方法中,这个过程被逆转了 uv-crosslinker 在溶液中和 bsa-fitc 蛋白质进行反应,然后通过 diazirine 子单元与表面进行耦合。样品用可溶性 BSA-FITC 蛋白质显示荧光比,大幅提高耦合交联的可控性。在此方法的固定化过程中观察到的小点的荧光点,这可能代表了聚合的 bsa-fitc 的固定,而不是单层的细胞,这种方法是用一种化学方法或一种方法来形成的,因此在最初的可溶蛋白中固定不动蛋白,产生更大的固定蛋白浓度,可以使用这种方法来检测轴突引导的生物学效应<sup>[21]</sup>。

#### 4 干细胞打印

再生医学领域需要可修复、可替换和再生能力强的细胞,通过干细胞培养可达体外制造组织和器官的目的。人类胚胎干细胞和诱导多能干细胞具有自我更新的能力。全能干细胞可以分化成所有的细胞类型有机体,而多能干细胞只能分化成为那些在成人中发现的细胞。Faulkner-Jones 等<sup>[22]</sup>成功地通过喷墨打印机在方形网格的结构中滴入细胞悬液,在每个正方形的角落上各分配了一滴,并在已有液滴的通道上覆盖了新的液滴,通过在同一位置增加液滴,改变位置浓度偏移量,达到精准打印的目的。同时采用阀瓣的方法,改良打印喷头,降低打印时的温度,提高细胞的生存率,并成功地打印出了一个细胞团。

虽然,干细胞组织团已经被成功打印出来,但是其分化方向仍是一个难点,如何在打印过程中控制其分化程度是一个关键问题,一旦一些分化程度较低或异分化的细胞进入人体,有可能会形成恶性肿瘤危害人体健康。因此,干细胞打印在应用于临床的道路上,还有很多关键问题要解决。

#### 5 结论

总结上面的论述,将 ES 细胞移植支架与热喷墨 3D 细胞打印技术结合在一起,能够精确定位在支架表面的 RGC。为保证生存能力、电生理功能和神经病理,应结合各个指标最优参数,可以将不同的媒介在不同的情况下进行测试。当在生长介质中含有脑源性神经营养因子和睫状神经营养因子时,RGC 维持生存和正常的电生理功能,并在 ES 支架上显示径向轴突生长。这些结果表明,在未来的视网膜模型或治疗方法的设计中,3D 打印技术可能与复杂的 ES

表面结合在一起。同时,细胞变异水平、分化程度也应引起人们的关注,保证生存率并不是需要解决的唯一问题,3D 生物打印技术最终还应以服务临床为第一要务。

最近的研究表明,某些哺乳动物的视网膜细胞、成年鼠 RGC 和神经胶质细胞可以成功地打印出来,而不会丧失生存能力和某些表型特征<sup>[23]</sup>。虽然视网膜细胞的 3D 打印技术取得了令人鼓舞的进展,但目前还没有可以应用于人体的打印材料。生物材料既要考虑材料在打印前后的安全性、生物相容性、机械性能、降解性能等,又要考虑材料能产业化转型。同时还有干细胞的来源、培养、诱导分化等诸多问题还有待于去解决。这也是接下来视网膜细胞 3D 打印所要解决的难题。随着这些问题的解决,3D 打印的视网膜才能真正应用于临床。

#### 【参考文献】

- [1] BOURNE R R, STEVENS G A, WHITE R A, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis[J]. *Lancet Glob Health*, 2013, 1(6): e339-e349.
- [2] MURPHY S V, ATALA A. 3D bioprinting of tissues and organs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(8): 773-785.
- [3] NICHOLLS J G, ADAMS W B, EUGENIN J, et al. Why does the central nervous system not regenerate after injury? [J]. *Surv Ophthalmol*, 1999, 43 (6): S136-S141.
- [4] XU T, GREGORY C A, MOLNAR P, et al. Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(19): 3580-3588.
- [5] CUI X, DEAN D, RUGGERI Z M, et al. Cell damage evaluation of thermal inkjet printed Chinese hamster ovary cells[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(6): 963-969.
- [6] XU T, ZHAO W, ZHU J M, et al. Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(1): 130-139.
- [7] LEE V, SINGH G, TRASATTI J P, et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014, 20(6): 473-484.
- [8] GAETANI R, FEYEN D A, VERHAGE V, et al. Epicardial application of cardiac progenitor cells in a 3D-printed gelatin/hyaluronic acid patch preserves cardiac function after myocardial infarction [J]. *Biomaterials*, 2015, 61(5): 339-348.
- [9] STEFANIE M, HEIKO S, CLAAS-TIDO P, et al. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57741.
- [10] KADOR K E, GROGAN S P, DORTHA E W, et al. Control of retinal ganglion cell positioning and neurite growth: combining 3D printing with radial electrospun scaffolds[J]. *Tissue Eng Part A*, 2016, 22(3-4): 286-294.
- [11] GAO G, SCHILLING A F, HUBBELL K, et al. Improved properties of bone and cartilage tissue from 3D inkjet- bioprinted human mesenchymal stem cells by simultaneous deposition and photocrosslinking in PEG-GelMA[J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(11): 2349-2355.

- [12] DERBY B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds[J]. Science, 2012, 338(6109): 921-926.
- [13] COLOSI C, SHIN S R, MANOHARAN V, et al. Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3D tissue constructs using low-viscosity bioink[J]. Adv Mater, 2016, 28(4): 677-684.
- [14] 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.
- [15] YONG S E, PU J S, CHOO C, et al. Tissue engineering of retina and Bruch's membrane: a review of cells, materials and processes[J]. Br J Ophthalmol, 2018, 102(9): 1182-1187.
- [16] HU F, ZHANG X, LIU H, et al. Neuronally differentiated adipose-derived stem cells and aligned PHBV nanofiber nerve scaffolds promote sciatic nerve regeneration [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 489(2): 171-178.
- [17] JOHNSON B N, LANCASTER K Z, ZHEN G, et al. 3D printed anatomical nerve regeneration pathways[J]. Adv Funct Mater, 2015, 25(39): 6205-6217.
- [18] XU T, GREGORY C A, MOLNAR P, et al. Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method[J]. Biomaterials, 2006, 27(19): 3580-3588.
- [19] KADOR K E, MONTERO R B, VENUGOPALAN P, et al. Tissue engineering the retinal ganglion cell nerve fiber layer[J]. Biomaterials, 2013, 34(17): 4242-4250.
- [20] XIE P, HU Z, ZHANG X, et al. Application of 3-dimensional printing technology to construct an eye model for fundus viewing study[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e109373.
- [21] LORBER B, HSIAO W K, MARTIN K R. Three-dimensional printing of the retina[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2016, 27(3): 262-267.
- [22] FAULKNER-JONES A, GREENHOUGH S, KING J A, et al. Development of a valve-based cell printer for the formation of human embryonic stem cell spheroid aggregates[J]. Biofabrication, 2013, 5(1): 015013.
- [23] LORBER B, HSIAO W K, HUTCHINGS I M, et al. Adult rat retinal ganglion cells and glia can be printed by piezoelectric inkjet printing [J]. Biofabrication, 2014, 6(1): 015001.

(编辑:陈丽霞)