

3D生物打印技术及其在牙周骨缺损修复中的应用

钟恩意¹, 刘瑞源², 高杰³, 黄文华¹

1. 南方医科大学人体解剖学教研室, 广东 广州 510515; 2. 南方医科大学药学院, 广东 广州 510515; 3. 广州医科大学附属口腔医院, 广东 广州 510140

【摘要】与传统的“减材”制造相比, 3D打印技术具有精确的个性化设计、快速成型、复杂精细产品制造等“增材”制造的明显优势。近年来, 为了提高治疗的个性化及精确性, 医学领域已经广泛应用3D生物打印技术进行术前诊断、手术设计、术前模拟以及组织再生等各个阶段。本综述首先介绍3D生物打印技术的概况及其过程, 主要分为成像及模型设计、生物材料及细胞类型的选择、不同类型的生物打印等。在口腔牙周缺损修复中, 3D生物打印技术通过重建其组织缺损部位的解剖结构, 应用生物复合材料逐层精确地堆积出个性化植入物, 增加了植入物的稳定性与术后骨结合率, 使口腔组织形态及功能都得以恢复。然而, 材料选择的局限性等问题给3D生物打印技术在修复牙周骨缺损的发展带来了障碍。本文就3D生物打印技术应用于牙周骨缺损修复中的复合生物材料、细胞、生物活性药物传递等几个方面逐一介绍。

【关键词】3D生物打印; 牙周骨缺损修复; 生物材料; 快速成型技术

【中图分类号】R319

【文献标识码】A

【文章编号】1005-202X(2016)01-0049-05

Application of three-dimensional bio-printing technology in treatment for periodontal bone defect

ZHONG En-yi¹, LIU Rui-yuan², GAO Jie³, HUANG Wen-hua¹

1. Department of Anatomy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Affiliated Stomatological Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, China

Abstract: Compared with traditional material manufacturing, three-dimensional (3D) bio-printing technology has advantages of accurate customized design, rapid prototyping, complex and fine product manufacturing, and so on. Recently, 3D bio-printing technology has been widely used in the preoperative diagnosis, operation design, preoperative simulation, and tissue regeneration to improve the personalization and accuracy of treatments. The overview and process of 3D bio-printing were firstly introduced in this review, including imaging and mode designing, biomaterials and cells selecting, different types of bio-printing and so on. In the treatment for periodontal bone defect, 3D bio-printing technology reconstructed the anatomical conformation of tissue defected, accurately printed personalized implants layer-by-layer by using biological composites, and increased the stability of the implant and the postoperative osseointegration rate to restore the oral cavity defect morphologically and functionally. However, the limitations of biomaterials discouraged the development of 3D bio-printing in the treatment for periodontal bone defect. The biological composites, cells, and bioactive medicines delivery in the application of 3D bio-printing on the treatment for periodontal bone defect were introduced in this review.

Key words: three-dimensional bio-printing; treatment for periodontal bone defect; biomaterials; rapid prototyping

【收稿日期】2015-09-12

【基金项目】国家“863”计划(2012AA02A603); 广东省省院全面战略合作专项基金(2013B091500089); 广州市科技计划项目(2014J4100153)

【作者简介】钟恩意, 女, 在读硕士研究生。Tel: 15014151441; E-mail: donut_peanut@163.com。

【通信作者】黄文华, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 临床应用解剖学。E-mail: Huangwenhua2009@139.com。

前言

由于牙周病变、肿瘤、机械性创伤或先天性缺陷等原因都会引起牙周骨缺损, 从而引起严重的功能障碍及面部畸形, 影响患者咀嚼、发音及正常社交^[1]。目前治疗多采用自体骨、异体骨或组织工程骨移植, 但自体骨骨源有限且会造成新缺损^[2-3]; 异体骨存在

排斥反应且潜在传染病原体的危险^[4]。随着3D打印技术及材料学的发展,3D生物打印已经能够将生物相容性材料、细胞及生物活性药物制作成复杂的三维立体的功能活性组织。与3D非生物打印相比,3D生物打印采用生物相容性材料^[5]、细胞类型^[6]、生长因子^[4,6]等材料,利用自体具有多向分化潜能的细胞或自体已分化细胞打印出适合移植的组织及器官^[7],从而避免产生活体组织的免疫排斥。这些特点使其成为组织再生工程中的创新热点之一,并引起了国内外学者的广泛关注。对于牙周骨组织的再生,3D生物打印有着突出的优越性,本文就3D生物打印在牙周骨组织缺损修复的应用进行综述。

1 3D生物打印的过程

1.1 成像及模型设计

功能性组织及器官再造前必须了解其具体的组成及结构,因此医学成像技术在3D生物打印过程中是必不可少的一环。医学成像技术能够为3D生物打印提供三维立体的细胞、组织、器官、生物体水平的结构信息。常见的医学成像技术有计算机断层扫描(Computed Tomography, CT)及磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)。基于对组织的多个层面不同的X射线穿透率,CT成像技术将组织逐层扫描所得的2D断层影像通过图像重建最终实现三维模型的构建^[8]。MRI利用强大的磁场使组织中部分细胞核根据磁场排列,细胞核能级的改变能够产生射频信号并被接收器测量,从而形成磁共振信号成像。与CT相比,MRI不仅能够获取更高分辨率的软组织影像,并且使患者避免受到电离辐射。对于血管等软组织成像,MRI技术表现出明显的优越性^[9]。同时,计算机辅助设计及计算机辅助制造(Computer Aided Design-Computer Aided Manufacturing, CAD-CAM)工具及数字模型也被用于收集和数字化组织的血管造影及其结构信息。

3D生物打印目前主要有3种方法:生物仿生、自组装以及迷你组织块。生物仿生学已经被应用于很多领域,如航空、材料研究、细胞培养方法及纳米技术方面^[10]。3D生物打印应用生物仿生学模仿体内组织或器官细胞及细胞外环境构成^[11]。生物仿生成功的关键在于生物组织的微量复制。因此,笔者需要了解细胞的微环境,包括功能及支持细胞类型的特定排列、可溶或不可溶因子的梯度、细胞外基质的成分以及在微环境的生物力学^[12]。自组装是复制生物

组织的另一个方法,其原理是利用胚胎器官发育作为模板^[13]。正在发育组织的早期细胞能够产生它们自己的细胞外基质成分、适合的细胞信号及自发型并得到理想的生物微结构及功能^[14]。该方法利用自组装的细胞球体进行融合去模仿发育中的组织。自组装过程的关键在于了解胚胎组织及器官的发育机制及控制诱导胚胎发育的微环境^[13-14]。迷你组织的概念与以上两者3D打印的方法相关。组织及器官由微小的功能单位或迷你组织构成,如肾单元^[15]。通过合理的设计、自组装或相互结合,迷你组织能够合成更大的结构。然而,要打印出多功能的三维生物结构要求以上3种方法的结合。

1.2 生物材料及细胞类型的选择

最初,3D打印技术的材料主要是金属、陶瓷及热塑性聚合物,而不包括细胞及生物材料。因此,3D生物打印的主要挑战之一是找到合适的生物材料,而这种材料不仅仅可以被打印出来,而且打印后必须具备生物组织的机械及生物学性能。当前应用在组织修复及再生领域的材料有合成聚合物(如聚乙二醇)或天然聚合物(包括海藻酸盐、明胶、胶原、壳聚糖、纤维蛋白、透明质酸等)^[16]。3D生物打印所应用的天然聚合物优势在于它们与人类细胞外基质相似及它们固有的生物活性。而合成聚合物的优势是它们能够根据不同的应用调节其物理学性能。但是使用合成聚合物的挑战在于它们较差的生物相容性、毒性降解产物以及在降解过程中机械性能下降^[6]。尽管如此,由于合成水凝胶物理性能的易控性^[17],其在3D生物打印再生医学应用中依然很受欢迎。理想的生物打印材料应具备以下特性:①可打印性,即可以通过打印机控制并固化的性质,如粘度系数、凝胶作用以及流变性质;②生物相容性,即材料不会造成宿主局部或系统的不良反应,并对生物功能组分有积极可控的作用;③可降解性,即降解率应该与细胞形成其细胞外基质的能力相适应;④结构及机械性能,即根据组织所要求的机械性能选择材料,从以支撑为目的的坚硬热塑性聚合物纤维到以细胞相容性为目的的柔软水凝胶;⑤材料的生物仿生性,即理想的结构、功能、活性材料性能应该以组织特定的内源性材料组成为基础。

打印组织或器官时细胞的选择对合成组织的良好功能起着重要的作用。组织及器官由多种细胞类型组成,这些细胞都具有特有的生物功能,其中必须具有被移植组织的功能。当前打印细胞的选择包括

局部组织已分化的多种主要细胞以及能够分化成所需要细胞类型的干细胞。供打印所选择的细胞应该能够很好地模仿体内的细胞生理状态并能够在相应环境下维持体内功能。

1.3 3D生物打印技术

生物材料的打印技术主要为喷墨式、微挤压式以及激光辅助式。根据3D生物打印的一些重要因素(如分辨率、细胞活性及生物材料等)及这些技术不同的特点将考虑选择不同的打印方式。喷墨式生物打印是非生物及生物打印的最常用方法,将特定的液体容量打印到预定的区域^[18]。与传统2D喷墨打印不同,喷墨式3D生物打印将以生物材料代替墨水,并以可控制升降的平台代替纸张。Tamimi等^[19]用20%稀磷酸及 β -磷酸三钙通过喷墨式3D生物打印机成功打印出不同的高嵌体口腔植入物,并成功地促进兔颅盖骨骨质增生。微挤压式生物打印机通常包括可控温材料处理及调制系统和平台。通过微挤压式打印能够获得连续的材料颗粒,而不是液滴。现在已经有多种材料与微挤压式打印机匹配,如水凝胶、生物相容性的共聚物及细胞球等^[20]。而在3D生物微挤压打印中最常用的方法是通过空气或机械(活塞等)挤压系统。每年全球将卖出近30 000台3D打印机,其中越来越多的学院购买微挤压式打印机并将微挤压式技术应用于组织及器官工程研究上^[21]。激光辅助式生物打印以激光诱导转化为基础。激光诱导转化技术已经成功地应用于生物材料,如肽类、DNA以及细胞^[22]。尽管没有喷墨式或微挤压式生物打印技术普遍,但是激光辅助式生物打印技术已经越来越多地被应用于组织及器官工程上。经典的激光辅助式生物打印设备包括脉冲激光光束头、聚焦系统、条带(包含覆盖一层光能吸收层及一层液体状的生物材料)以及面向条带的接收基片。激光辅助式生物打印能够将激光束聚焦于条带吸收层,并产生高压气泡以将包含细胞的材料推进接收基片。

2 3D生物打印在牙周骨缺损修复中的应用

2.1 生物材料

随着3D生物打印的发展,对牙周骨缺损的修复研究热点渐渐转向了3D生物打印材料及其性能研究方面。利用3D生物打印可个性化地打印出患者牙周骨缺损部位特有的解剖结构,这将使生物材料与骨缺损部位紧密结合,创造了更好的骨组织再生微环境^[1]。其材料的特性与其他的生物3D打印材料既有

相似之处也有不同之处。对于应用在牙周骨缺损修复中理想的生物3D打印材料要求如下:①生物相容性/非毒性降解;②生物活性,能够使细胞与材料表面相互作用;③植入后三维形态的维持;④适合的孔隙率及孔径、孔的分布、孔的方向;⑤与目标再生组织相似的机械性能,如杨氏模量;⑥降解机制;⑦降解速率,与组织再生速率相匹配;⑧促成骨及成血管因子,促进细胞及血管生长^[23]。现今,应用于牙周骨缺损修复中的生物3D打印材料主要分为4种:天然聚合物(壳聚糖、胶原、海藻酸盐等)、合成聚合物(PLA、PGA、PCL、PEG)、生物陶瓷/玻璃(β -磷酸三钙、羟基磷灰石、生物活性玻璃)、复合材料(复合聚合物、聚合物混合物、聚合物-陶瓷)。国内袁景等^[3]应用 β -磷酸三钙3D打印出高性能的多孔结构,与其他工艺制作的骨组织工程支架相比其具有精确性、孔隙分布均匀性、抗压强度大等优点。Konopnicki等^[24]利用3D生物打印技术将 β -磷酸三钙结合聚乙酸内酯打印出三维立体结构,并在该结构上种上猪的骨髓干细胞后成功地进行猪的下颌骨早期修复。

2.2 细胞治疗

细胞治疗已经成为骨再生修复的潜在方法。在牙周骨缺损修复中,细胞治疗可以提高生物材料的生物活性及局部生长因子传递^[25]。以细胞为基础的生物3D打印修复牙周骨缺损已经由临床前研究逐渐过渡为临床治疗的方法,成为局部牙槽骨缺损治疗的安全及有效选择^[26]。在生物3D打印修复口腔牙周骨缺损的治疗过程中,常常使用骨诱导细胞(如骨髓间充质干细胞)以及干细胞(脂肪干细胞、间充质干细胞及多能干细胞等)。这些细胞都具有多向分化的潜能,能在缺损部位分化为成骨细胞等细胞并促进各种生长因子及功能蛋白传递促进骨缺损区域成骨。Konopnicki等^[24]实验证明种上骨髓干细胞的3D生物打印支架植入体内后,骨缺损中心部位能够达到更高的骨形成率。

2.3 生长因子及蛋白传递

生长因子的传递在调节3D生物打印材料微环境及后来的细胞反应中起着重要的作用。生长因子是可溶解的多肽,通过与细胞膜受体结合影响细胞的功能,其中包括一些骨诱导因子(BMP、TGF- β 、IGF、FGF-2、PDGF)在骨再生治疗中能够促进细胞分化及组织形成。Zhao等^[27]认为骨形成蛋白2能够促进牙囊细胞及牙周膜细胞分化为成牙骨质细胞及成骨细胞。同样,血管化在新生组织中也起到关键作用,因

此含有成血管肽的一些生长因子(PDGF、VEGF、FGF-2、TGF- β)也非常重要。生长因子应用的主要挑战是模仿自然组织修复及成型时的释放特点,即多种生长因子同时在缺损区域局部持续释放,这将使得组织再生达到最优化。Cui等^[28]认为同时将血管内皮因子及骨形成蛋白与骨髓基质干细胞结合到支架上,能够使得骨诱导及再生达到最优化,但是两者的比例及选择最有效的骨形成蛋白等需要进一步的研究。Ding等^[29]发现由于能够促进组织缺损部位同时成骨及成血管,二甲基草酰甘氨酸(Dimethyl oxaloylglycine, DMOG)能够使脂肪干细胞更有效地促进骨组织愈合。然而与静脉注射生长因子相比,3D生物打印材料联合生长因子治疗骨缺损有很多优点,包括生长因子的控释及局部作用浓度高等优点。结合3D生物打印材料,多种生长因子能够同时在骨缺损局部传递并持续地发挥促进修复骨缺损的作用。生长因子及蛋白能够局部作用于牙周细胞群活性,并调节骨形成及提高组织再生反应。其中,血小板衍生的生长因子(PDGF)的主要作用是促进软组织愈合,最初用于糖尿病性溃疡的治疗,最近才用于牙周组织再生。体外研究表明,PDGF能够促进牙周组织再生,包括促进牙骨质DNA的合成并调节骨桥蛋白的表达。PDGF能够刺激牙周膜细胞的催化作用及有丝分裂,而牙周膜细胞能够通过促进成骨细胞增殖及抑制成骨细胞分化调节骨形成。骨形态发生蛋白(BMPs)是转化生长因子- β (TGF- β)超级家族成员之一,具有很强的骨诱导能力,特别是BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7及BMP-9。BMP-2及BMP-7能够促进牙周膜细胞分化为成骨细胞并与牙周膜细胞或成骨细胞在体外结合后促进矿化因子表达^[27, 30],但是当剂量大于10 ng/mL时将会有细胞毒性作用。研究表明BMPs能下调成骨质细胞及牙龈成纤维细胞的增殖及矿化。它们主要用于提高植入区域的骨形成。临床试验表明,PDGF-BB能够安全有效地促进牙周再生,但是数据仍然很难明确地证明其临床应用潜能。

3 展望

3.1 局限性

在牙周骨缺损修复方面主要进展是应用支架材料及生物活性因子促进牙周组织再生。但是,现有的3D生物打印材料很难满足所有骨组织结构及生理功能恢复上的所有标准。3D生物打印只能够控制材

料的部分特征,如化学组成、孔隙率及降解速率等,而解决不了有限的生物材料选择的根本问题,如生物材料的降解速率很难与牙周骨缺损局部的组织再生速率相匹配。

3.2 发展前景

对于颌面部(包括牙周组织、牙槽脊、上下颌骨等)缺损的修复仍然存在很多发展机遇。材料学及生物学上的创新为临床及科学研究的口腔组织再生(包括牙槽骨及软组织)提供了很多发展机会。特别是3D生物打印材料设计、药物传递及生物因子上,为组织再生技术带来更好更安全的效果。3D生物打印技术为口腔牙周组织缺损修复提供了更个性化的治疗方案,并将为临床医生及患者提供更好的选择。

【参考文献】

- [1] PILIPCHUK S P, PLONKA A B, MONJE T, et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity [J]. Dent Mater, 2015, 31(4): 317-338.
- [2] CIOCCA L, CRESCENZIO F D, SCOTTI R, et al. CAD/CAM and rapid prototyped scaffold construction for bone regenerative medicine and surgical transfer of virtual planning: a pilot study [J]. Comput Med Imaging Graph, 2009, 33(1): 58-62.
- [3] 袁景, 甄平, 赵红斌. 高性能多孔 β -磷酸三钙骨组织工程支架的3D打印[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(43): 6914-6921.
- [4] YUAN J, ZHEN P, ZHAO H B, et al. High-performance porous beta-tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds using 3D printing [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2014, 18(43): 6914-6921.
- [5] WANG T, YANG X Y, QI X, et al. Osteoinduction and proliferation of bone-marrow stromal cells in three-dimensional poly (ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite/collagen scaffolds [J]. J Transl Med, 2015, 13(1): 152. doi: 10.1186/s12967-015-0499-8.
- [6] JOOSTEN E A. Biodegradable biomatrices and bridging the injured spinal cord: the corticospinal tract as a proof of principle [J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(1): 375-395.
- [7] MURPHY S V, ATALA A. 3D bioprinting of tissues and organs [J]. Nat Biotech, 2014, 32(8): 773-785.
- [8] CATROS S, GUILLEMOT F, NANDAKUMAR A, et al. Layer-by-layer tissue microfabrication supports cell proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. Tissue Eng Part C: Methods, 2012, 18(1): 62-70.
- [9] PLOOI J M, MAAL T J, HAERS P, et al. Digital three-dimensional image fusion processes for planning and evaluating orthodontics and orthognathic surgery. A systematic review [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2011, 40(4): 341-352.
- [10] HAKIM S W, SCHIEDA N, HODGDON T, et al. Angiomyolipoma (AML) without visible fat: Ultrasound, CT and MR imaging features with pathological correlation [J]. Eur Radiol, 2015. [Epub ahead of print].
- [11] HUH D, HAMILTON G A, INGBER D E. From 3D cell culture to organs-on-chips [J]. Trends Cell Biol, 2011, 21(12): 745-754.
- [12] HUH D, TORISAWA Y S, HAMILTON G A, et al. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips [J]. Lab Chip, 2012, 12(12): 2156-2164.

- [12] GUO Z, LIU W, SU B. Superhydrophobic surfaces: from natural to biomimetic to functional [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2011, 353(2): 335-355.
- [13] DERBY B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds [J]. *Science*, 2012, 338(6109): 921-926.
- [14] STEER D L, NIGAM S K. Developmental approaches to kidney tissue engineering [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 286(1): F1-F7.
- [15] GÜNTHER A, YASOTHARAN S, VAGAON A, et al. A microfluidic platform for probing small artery structure and function [J]. *Lab Chip*, 2010, 10(18): 2341.
- [16] HUNT N C, GROVER L M. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine [J]. *Biotech Lett*, 2010, 32(6): 733-742.
- [17] SPILLER K L, MAHER S A, LOWMAN A M. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects [J]. *Tissue Eng Part B: Rev*, 2011, 17(4): 281-299.
- [18] XU T, JIN J, GREGORY C, et al. Inkjet printing of viable mammalian cells [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(1): 93-99.
- [19] TAMIMI F, TORRES J, AL-ABEDALLA K, et al. Osseointegration of dental implants in 3D-printed synthetic onlay grafts customized according to bone metabolic activity in recipient site [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(21): 5436-5445.
- [20] MALDA J, VISSER J, MELCHELS F P, et al. 25th Anniversary Article: engineering hydrogels for biofabrication [J]. *Adv Mater*, 2013, 25(36): 5011-5028.
- [21] MIRONOV V, VISCONTI R P, KASYANOV V, et al. Organ printing: tissue spheroids as building blocks [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(12): 2164-2174.
- [22] GRUENE M, PFLAUM M, HESS C, et al. Laser printing of three-dimensional multicellular arrays for studies of cell-cell and cell-environment interactions [J]. *Tissue Eng Part C: Methods*, 2011, 17(10): 973-982.
- [23] LIN Z, RIOS H F, COCHRAN D L. Emerging regenerative approaches for periodontal reconstruction: a systematic review from the AAP regeneration workshop [J]. *J Periodontol*, 2015, 86(2s): S134-S152.
- [24] KONOPNICKI S, SHARAF B, RESNICK C, et al. Tissue-engineered bone with 3-Dimensionally printed β -tricalcium phosphate and polycaprolactone scaffolds and early implantation: an *in vivo* pilot study in a porcine mandible model [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2015, 73(5): 1016.e1-1016.e11.
- [25] WANG Y, PRESTON B, GUAN G. Tooth bioengineering leads the next generation of dentistry [J]. *Int J Paediatr Dent*, 2012, 22(6): 406-418.
- [26] KAIGLER D, PAGNI G, PARK C H, et al. Stem cell therapy for craniofacial bone regeneration: a randomized, controlled feasibility trial [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(5): 767-777.
- [27] ZHAO M, XIAO G, BERRY J E, et al. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(8): 1441-1451.
- [28] CUI Q, DIGHE A S, IRVINE J J. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery for bone regenerative engineering [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(19): 3374-3383.
- [29] DING H, GAO Y S, WANG Y, et al. Dimethylxaloylglycine increases the bone healing capacity of adipose-derived stem cells by promoting osteogenic differentiation and angiogenic potential [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(9): 990-1000.
- [30] LIN X, LI M, YAO H, et al. Transfection with follicular dendritic cell secreted protein to affect phenotype expression of human periodontal ligament cells [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(5): 940-948.