

· 综述 ·

3D 打印组织工程半月板的研究现状[△]

李佳峒^{1,2}, 黄显程², 叶素芬², 尤田^{2*}

(1. 深圳大学医学部, 广东深圳 518060; 2. 北京大学深圳医院, 广东深圳 518036)

摘要: 半月板撕裂在骨科疾病中越来越常见, 由于半月板的组织特殊性, 通常通过保守治疗或者手术治疗撕裂的半月板来避免发展为骨关节炎。因为半月板缺乏血液供应, 且具有不可再生性, 所以无论是外伤性或者退行性病变, 半月板切除后都会导致后期骨关节炎的发生。随着 3D 打印技术的兴起, 给半月板修复带来了希望。当然, 3D 打印需要高精密的仪器和性能优良的 3D 打印墨水。本综述对目前用于生物打印的不同生物墨水(包括细菌纤维素)进行了深入的讨论, 并概述了其进一步发展的前景。

关键词: 半月板, 3D 打印, 半月板撕裂, 细菌纤维素

中图分类号: R687 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2024) 21-1976-05

Research status of 3D printing tissue engineering meniscus // LI Jia-tong^{1,2}, HUANG Xian-cheng², YE Su-fen², YU Tian². 1. Medical School, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China; 2. Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen, Guangdong 518036, China

Abstract: Meniscal tears are becoming increasingly common in orthopedic field. Due to its histological specificity, the torn meniscus is usually treated conservatively or surgically to prevent the development of osteoarthritis. Because the meniscus lacks blood supply and is non-renewable, whether it is traumatic or degenerative tear the meniscectomy will lead to the occurrence of later osteoarthritis. With the rise of 3D printing technology, it has brought hope to meniscus repair. Of course, 3D printing requires highly sophisticated instruments and the preparation of 3D printing inks with excellent properties. This review provides an in-depth discussion of the different bioinks currently used for bioprinting and outlines prospects for their further development. In addition, bacterial cellulose, which was found to be a 3D printing ink with good performance, is introduced in this paper.

Key words: meniscus, 3D printing, meniscus tear, bacterial cellulose

半月板在保持膝关节稳定和生物力学方面发挥着关键作用^[1], 半月板损伤会导致膝关节疼痛, 加速骨关节炎的发生^[2, 3]。目前, 半月板的修复对骨科医生来说仍是一个巨大的挑战。理想的半月板支架应满足如下要求: (1) 优良的机械和摩擦学性能, 类似于天然半月板; (2) 适当的形状和尺寸(最好根据患者需求定制); (3) 制作材料的生物相容性, 在吸收过程中不会产生细胞毒性; (4) 良好的孔隙率, 以满足机械稳定性和细胞定殖要求; (5) 良好的降解曲线。

由于 3D 打印技术的优势是复制半月板内部微观

结构^[4, 5], 针对目前存在的问题, 本文对该类文献进行了综述。

1 半月板的特点

在膝关节中, 外侧半月板(C形)和内侧半月板(半圆形)是纤维软骨结构, 横截面大致呈三角形^[6, 7]。它们覆盖了约 70% 的胫骨平台关节面。半月板对膝关节的负荷和减震都很重要。如果半月板丧失, 会导致创伤软骨变性和骨关节炎的发生。在半月板中也可以检测到不同数量的 III、IV、V 和 VI 型胶

DOI:10.20184/j.cnki.Issn1005-8478.100621

△基金项目: 深圳市卫生经济学会科研基金项目(编号:202353); 深圳市科技计划项目(编号:JCYJ20220530160218040); 深圳大学教学改革研究项目(编号:JG2022165); 北京大学深圳医院临床研究项目(编号:LCYJ2020005); 广东省体育局科技创新和体育文化发展项目(编号:GDSS2020N002); 广东省自然科学基金项目(编号:2017A030310616)、深圳市三名工程项目(编号:SZSM202211019); 广东省医学科学技术研究基金项目(编号:A2017202; A2024319)

作者简介: 李佳峒, 硕士研究生, 研究方向: 低温沉积 3D 打印半月板等, (电子信箱)ligepangzi@163.com

***通信作者:** 尤田, (电子信箱)17914@163.com

原。半月板抗牵拉的主要原因是因为有胶原的存在^[8, 9]。半月板切面呈三角形, 正是因为这个特点, 可将垂直压力转换为水平环向应力^[10]。韧带(即内侧副韧带、横韧带和半月板股骨韧带)形状良好且紧密是确保有效半月板功能的前提^[8, 11, 12]。通常描述的半月板撕裂模式包括垂直纵向、斜向、复杂(包括退行性)、横向(径向)和水平撕裂^[13, 14]。目前 3D 打印也出现了如下的几种 3D 打印半月板的方法。

2 3D 打印技术

3D 打印技术, 也称为添加剂制造(AM)技术或 3D 快速原型技术(即粘合剂喷射、定向能量沉积、材料挤压、材料喷射、粉末床融合、片材层压和还原光聚合)。3D 生物打印技术主要依赖于先进的 3D 生物打印机和有效的载有细胞的生物墨水。

3D 生物打印方法是有助于设计/制造 3D 支架的更生物化的方法^[15, 16]。通常用于 3D 生物打印的生物材料是柔软且机械性较弱的水凝胶, 但具有允许细胞定植的固有生物特性^[17-19]。现今比较流行的有如下几种打印方法:(1) 基于材料挤出的 3D 打印, 这种技术要求加热热塑性的材料至融化, 通过加热喷嘴沉积。热塑性的材料价格比较便宜, 但是打印出的成品表面往往比较粗糙^[20];(2) 基于立体光刻的 3D 打印, 这种技术使用的一般是液态树脂类材料, 因为其是光源选择性固化液体光聚合材料, 相比于材料挤出的 3D 打印, 立体光刻的 3D 打印具有更好的细节处理, 但同时也需要支持紫外线敏感的材料;(3) 基于材料喷射的 3D 打印, 这是一种将液体光敏的熔融剂的液滴沉积在粉末床上并通过光固化。此技术可以应用多种打印材料的使用, 比上述两种打印方法大大提高了精准度。缺点是成本较高;(4) 基于粉末床融合的 3D 打印, 是热塑性材料或者金属粉末被高能量源融合。这种方法也带来了更高的成本;(5) 基于直接能量沉积的 3D 打印, 就是将聚合物、陶瓷、金属类的材料融合同时沉积。能够打印材料范围较大的零件。但是其成本较为昂贵, 并且表面也较为粗糙^[21]。

3 打印材料: 生物墨水

为了打印出更好的类似于天然半月板的模型, 找到理想生物墨水的配方是最重要的环节之一。包括足够的流变学特征、提供模仿目标组织的适当生物相容微环境的能力、与构建体的动态细胞重塑兼容的受控

生物降解性。此外, 由于细胞的存在, 还希望在不堵塞喷嘴的条件下, 最大程度保护负载细胞(在挤出过程中对细胞的应力最小)。同时, 印刷结构需要表现出与植入部位相匹配的令人满意的机械强度和刚度、形状保真度和适当的超微结构(孔径), 以支持构建体的生物活性(氧气、二氧化碳和营养物质的扩散)^[22]。

由于确定最佳的载有细胞的生物墨水配方是成功生物打印的关键步骤, 因此已经尝试了几种方法。例如, 考虑到用于基于挤出的生物打印的生物墨水, 它最初处于整体静止状态, 然后通过喷嘴时经历向高剪切状态的转变, 最后需要在挤出后呈现新的稳定静止形状。所有这些转变都必须以保护细胞为前提。

配制备有细胞的生物墨水是一个微妙的多步骤阶段, 最终将会影响整个打印材料的性能。必须找到一种合适配方, 以保证生物墨水的内在特征、细胞密度/存活率以及所采用的生物打印机技术之间的适当平衡。一旦确定了核心材料, 就必须进行初步测试, 以评估不同的浓度和比例, 从而在物理化学特征、印刷性、流变学和机械特性、细胞分布和存活率方面获得令人满意的结果。在这种情况下, 还应测试并最终调整生物打印机设置(温度、压力、流速、喷嘴类型、交联策略), 从而实现有效的模拟和有前途的组织替代品。

3.1 细菌纤维素

纳米纤维素(nanocellulose, NC)是指至少有 1 个维度空间尺寸在纳米尺度(1~100 nm)内的纤维素^[23], 与宏观尺度的纤维素相比, NC 具有高比表面积、高抗拉伸强度、高杨氏模量、高亲水性和高结晶度等特性, 是一种极具发展潜力的新型纳米材料^[24, 25]。细菌纳米纤维素由某些细菌在细胞外分泌, 其中研究最多、产量最高的是木醋杆菌, 是以 β -1,4 糖苷键将多个 D-葡萄糖聚合而成的网状结构, 是世界上公认的性能优异的新型生物医用材料^[26]。早在 2007 年, Bodin 等就将细菌纤维素(bacterial cellulose, BC)凝胶与猪正常半月板和胶原材料的力学性能进行对比, 研究发现, BC 的杨氏模量类似于正常半月板, 高于胶原材料半月板, 而且 BC 相对便宜, 能促进细胞的迁移, 还能自我塑形为天然半月板的形态^[27]。Martínez 等同样用 BC 制备了半月板支架, 发现该支架能很好地模仿半月板的超微结构, 可以引导组织生长, 促进细胞和胶原纤维的排列, 并且能够通过机械刺激增强胶原蛋白的产生。Twomey-Kozak^[28]总结了 BC 的特点:(1) 具有较高结晶度、

高聚合度以及非常一致的分子取向，能够以单一的纤维存在；(2) BC 的抗拉力的强度高；(3) 孔隙率达 90% 以上，有较强的吸水性和透气性；(4) 具有较好的降解性，其降解产物对自然界无危害，且细胞相容性好。由于 BC 有如上优良的特性，所以可以更好地仿生出天然半月板的结构。用 BC 制造半月板支架既可以有好的力学支撑，又有利于半月板细胞黏附、增殖及维持表型。所以，认为 BC 在 3D 打印半月板上有着极大的前景。

3.2 水凝胶

水凝胶的抗原性低于胶原蛋白。它以温度依赖的方式（在 37°C 以下保持凝胶状态）或浓度依赖的方式成为水凝胶；其显示 RGD 基序促进与细胞的相互作用。据报道，它在印刷中的应用范围很广，还与丙烯酸甲酯基团结合，产生光聚合水凝胶 GelMA。目前基于水凝胶的 3D 生物打印结构不能提供与天然人类半月板兼容的刚度和生物力学支架，所以许多医生对水凝胶进行了改造，提高了水凝胶的性能。其中有基于酰胺的氢键交联超分子聚合物水凝胶，并且发现稍微改变氢键的位置即可大大改善水凝胶的性质，从而使 3D 打印出的半月板产生了不错的力学强度^[29-31]。

3.3 纳米材料

纳米材料能够模仿细胞外基质和纤维成分，纳米材料可以模拟原始环境并诱导细胞表现得与天然组织相似。同时，纳米纤维增强水凝胶的机械性能有较大的改进。在此基础上，国外团队还开发出新型的静电纺丝方法，能够径向和圆周排列合成纳米纤维的膜。最后，他们发现加入纳米材料的水凝胶比单纯的水凝胶打印出的半月板具有更高的完整性和形状保真性，并且可以更好地维持支架的形态。同时，该打印材料也不会对细胞生长产生不良的影响^[32]。

3.4 糖聚壳-胶原水凝胶复合材料

糖聚壳-胶原水凝胶复合材料是由聚乳酸支柱和纳米纤维素组成的复合支架。首先将含有微通道的聚乳酸支柱结合到纤维素纳米材料中，然后将其嵌入壳聚糖-胶原蛋白基质中，获得微米和纳米尺寸的特征。同时，该支架还可以使细胞附着、增殖和迁移到支架内部，被认为有希望用于软骨的修复^[33]。

3.5 细胞外基质

细胞外基质是细胞外分子和矿物质组成的 3D 网络。细胞外基质可以为周围的细胞提供营养支持，且其来源于供体本身，所以没有免疫排斥反应。目前它由于诸多的特性，也被用于 3D 打印半月板。天然的细胞外基质成分复杂，主要包括：胶原蛋白、糖蛋

白、糖胺聚糖和蛋白聚糖。其中，1 型胶原蛋白和透明质酸是细胞外基质的主要纤维成分^[21]。还有一种方法就是先用聚己内酯 3D 打印出半月板，接着在支架上注射细胞外基质，并且得出结论：制备的聚己内酯和细胞外基质的支架在亲水性和生物活性方面均有显著提高^[31, 34, 35]。

3.6 聚己内酯

聚己内酯是一种具有优异生物相容性和机械性能的可降解的脂肪族聚酯。由于其良好的熔融温度（60°C）和黏弹性，已经被用于基于熔融挤出的 3D 打印。有人通过 3D 打印聚己内酯支架作为骨架，然后注射半月板细胞外基质，并用生长素负载的药物作为药物传递系统。最终的结果表明，注射细胞外基质的聚己内酯半月板支架亲水性和生物活性都显著提升^[21, 34]。

4 讨论

半月板是膝关节不可或缺的一部分。但是目前在临床上半月板损伤和撕裂并没有更好的解决办法。3D 打印技术的出现为患者带来了福音。因为 3D 打印可以更好地模仿天然的半月板纤维蛋白走向等。本文主要综述了一些常见的可以用来 3D 打印半月板的天然墨水。值得一提的是 NC 具备诸多优良特性，可以更好地模拟天然半月板，所以 NC 在 3D 打印半月板组织工程上有着较为广阔的前景。但是就目前的打印墨水来看，3D 打印并不能同时满足临床上的种种需要，3D 打印半月板距离真正的临床使用还是有一段很长的路要探索。

参考文献

- [1] Gungor-Ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, et al. Bioinks for 3D bioprinting: an overview [J]. *Biomater Sci*, 2018, 6 (5) : 915-946. DOI: 10.1039/c7bm00765e.
- [2] Kwon H, Brown WE, Lee CA, et al. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15 (9) : 550-570. DOI: 10.1038/s41584-019-0255-1.
- [3] Murphy CA, Garg AK, Silva-Correia J, et al. The meniscus in normal and osteoarthritic tissues: facing the structure property challenges and current treatment trends [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2019, 21: 495-521. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-060418-052547.
- [4] Winkler PW, Rothrauff BB, Buerba RA, et al. Meniscal substitution, a developing and long-awaited demand [J]. *J Exp Orthop*, 2020, 7 (1) : 55. DOI: 10.1186/s40634-020-00270-6.
- [5] Fonseca AC, Melchels F, Ferreira M, et al. Emulating human tis-

- sues and organs: a bioprinting perspective toward personalized medicine [J]. *Chem Rev*, 2020, 120 (19): 11128–11174. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00342.
- [6] 王文志, 冯世庆. 膝关节半月板损伤的治疗进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14 (12): 937–938. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8478.2006.12.019
Wang WZ, Feng SQ. Progress in the treatment of knee meniscus injury [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2006, 14 (12): 937–938. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8478.2006.12.019.
- [7] 吴鹏飞, 邓亮, 谷文光. 半月板损伤与修复研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2011, 19 (20): 1706–1709. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2011.20.10
Wu PF, Deng L, Gu WG. Research progress on meniscus injury and repair [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2011, 19 (20): 1706–1709. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2011.20.10.
- [8] Markes AR, Hodax JD, Ma CB. Meniscus form and function [J]. *Clin Sports Med*, 2020, 39 (1): 1–12. DOI: 10.1016/j.csm.2019.08.007.
- [9] Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of human knee meniscus: structure, composition, and function [J]. *Sports Health*, 2012, 4 (4): 340–351. DOI: 10.1177/1941738111429419.
- [10] Fox AJ, Wanivenhaus F, Burge AJ, et al. The human meniscus: a review of anatomy, function, injury, and advances in treatment [J]. *Clin Anat*, 2015, 28 (2): 269–287. DOI: 10.1002/ca.22456.
- [11] Kurosawa H, Fukubayashi T, Nakajima H. Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1980, 149 (149): 283–290.
- [12] Narayanan LK, Huebner P, Fisher MB, et al. 3D-bioprinting of polylactic acid (PLA) nanofiber-alginate hydrogel bioink containing human adipose-derived stem cells [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2016, 2 (10): 1732–1742. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00196.
- [13] Matar HE, Duckett SP, Raut V. Degenerative meniscal tears of the knee: evaluation and management [J]. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2019, 80 (1): 46–50. DOI: 10.12968/hmed.2019.80.1.46.
- [14] 孙向阳, 桑晨, 刘阳, 等. 旋转按压试验诊断半月板损伤的意义 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2022, 30 (24): 2289–2292. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.24.18.
Sun XY, Sang C, Liu Y, et al. The significance of rotating compression test in diagnosing meniscus injury [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2022, 30 (24): 2289–2292. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.24.18.
- [15] Murphy SV, Skardal A, Atala A. Evaluation of hydrogels for bioprinting applications [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101 (1): 272–284. DOI: 10.1002/jbm.a.34326.
- [16] 米发椌, 杨如意, 赵天宝, 等. 3D 打印技术在骨科临床与基础研究应用的现状 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2022, 30 (9): 810–814. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.09.09.
Mi FY, Yang RY, Zhao TB, et al. The current status of 3D printing technology in clinical and basic research applications in orthopedics [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2022, 30 (9): 810–814. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.09.09.
- [17] Chartrain NA, Williams CB, Whittington AR. A review on fabricating tissue scaffolds using vat photopolymerization [J]. *Acta Biomater*, 2018, 74: 90–111. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.05.010.
- [18] Sekar MP, Budharaju H, Zennifer A, et al. Current standards and ethical landscape of engineered tissues—3D bioprinting perspective [J]. *J Tissue Eng*, 2021, 12: 1758517981. DOI: 10.1177/20417314211027677.
- [19] Ng WL, Lee JM, Zhou M, et al. Vat polymerization-based bioprinting—process, materials, applications and regulatory challenges [J]. *Biofabrication*, 2020, 12 (2): 22001. DOI: 10.1088/1758-5090/ab6034.
- [20] Ozbolat IT, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting [J]. *Biomaterials*, 2016, 76: 321–343. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.076.
- [21] Wang H, Yu H, Zhou X, et al. An overview of extracellular matrix-based bioinks for 3D bioprinting [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 905438. DOI: 10.3389/fbioe.2022.905438.
- [22] Veiga A, Silva IV, Duarte MM, et al. Current trends on protein driven bioinks for 3D printing [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (9): 1444. DOI: 10.3390/pharmaceutics13091444.
- [23] Bodin A, Concaro S, Brittberg M, et al. Bacterial cellulose as a potential meniscus implant [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007, 1 (5): 406–408. DOI: 10.1002/term.51.
- [24] Xu G, Zhao Y, Geng Y, et al. Nano-hybrid gradient scaffold for articular repair [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, 208: 112116. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.112116.
- [25] Gregor-Svetec D, Leskovsek M, Leskovic B, et al. Analysis of PLA composite filaments reinforced with lignin and polymerized-lignin-treated NFC [J]. *Polymers (Basel)*, 2021, 13 (13): 2174. DOI: 10.3390/polym13132174.
- [26] Khalil H, Jummaat F, Yahya EB, et al. A review on micro- to nanocellulose biopolymer scaffold forming for tissue engineering applications [J]. *Polymers (Basel)*, 2020, 12 (9): 2043. DOI: 10.3390/polym12092043.
- [27] Aditya T, Allain JP, Jaramillo C, et al. Surface modification of bacterial cellulose for biomedical applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (2): 610. DOI: 10.3390/ijms23020610.
- [28] Twomey-Kozak J, Jayasuriya CT. Meniscus repair and regeneration: a systematic review from a basic and translational science perspective [J]. *Clin Sports Med*, 2020, 39 (1): 125–163. DOI: 10.1016/j.csm.2019.08.003.
- [29] Xu Z, Zhang Q, Fan C, et al. A gel microparticle-based self-thickening strategy for 3D printing high-modulus hydrogels skeleton cushioned with PNAGA hydrogel mimicking anisotropic mechanics of meniscus [J]. *Bioact Mater*, 2023, 26: 64–76. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.02.020.
- [30] Rey-Rico A, Cucchiari M, Madry H. Hydrogels for precision meniscus tissue engineering: a comprehensive review [J]. *Connect Tiss Res*, 2017, 58 (3–4): 317–328. DOI: 10.1080/03008207.2016.1276576.