

· 基础研究 ·

应用明胶甲基丙烯酸酰胺低温3D打印组织工程软骨

罗春阳,刘 杨,张 啸,范卫民*

南京医科大学第一附属医院骨科,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨应用低温3D打印制作的明胶甲基丙烯酸酰胺(gelatin methacrylamide, GelMA)支架能否构建高质量组织工程软骨。方法:经预冷处理后,利用低温沉积3D打印技术制备低浓度GelMA支架。大体观察、扫描电镜观察支架宏观、微观结构,并对水凝胶进行流变学和生物力学检测,以DMEM培养液培养大鼠骨髓间充质干细胞作为对照,细胞增殖(CCK-8法)和细胞活性(Live/Dead染色法)检测支架生物相容性,组织学染色定性分析支架成分。裸鼠皮下包埋支架,苏木素-伊红(HE)染色、阿利新蓝染色、番红染色评估软骨细胞外基质结构。结果:大体观察和扫描电镜观察示5%GelMA支架孔径均一,结构规整。与纯GelMA相比,添加细胞的支架力学强度稍强。骨髓间充质干细胞能在支架上黏附并增殖。体内体外组织学染色均表明构建的组织工程软骨在大小、色泽、氨基葡糖聚糖分泌等方面均满足组织工程软骨要求。结论:5%GelMA生物墨水可以在低温条件进行3D打印并成功构建组织工程软骨。

[关键词] 软骨组织工程;3D生物打印;明胶甲基丙烯酸酰胺

[中图分类号] R336

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)04-533-05

doi:10.7655/NYDXBNS20200413

Low-temperature 3D printing of tissue-engineered cartilage with gelatin methacrylamide

LUO Chunyang, LIU Yang, ZHANG Xiao, FAN Weimin*

Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate whether gelatin methacrylamide (GelMA) scaffolds made by low-temperature 3D printing could construct high-quality tissue-engineered cartilage. **Methods:** After pre-cooling, low-temperature deposition 3D printing technology was used to prepare low-concentration gelatin methacrylamide scaffolds. Macroscopic and scanning electron microscopic observation of the macroscopic and microscopic structure of the scaffold were followed by a rheological and biomechanical detection of the hydrogel. Cells were cultured with DMEM as control, cell proliferation (CCK-8 method) and cell activity (Live/Dead staining method) were used to detect the biocompatibility of the scaffold, and histological staining was used to qualitatively analyze the scaffold components. Nude mice were scaffolded subcutaneously for hematoxylin and eosin (HE) staining, alcian blue staining, and safranin staining to highlight the extracellular matrix structure of the cartilage. **Results:** Macroscopic and scanning electron microscopic observations showed that the 5% GelMA scaffolds had uniform pore diameters and a regular structure. The results of CCK-8 and live/dead cell staining showed that the scaffolds were biocompatible, and the in vivo and in vitro histological staining showed that the constructed tissue-engineered cartilage met the requirements in colors, glycosaminoglycan (sGAG) secretion and other aspects. **Conclusion:** 5% GelMA bio-ink can be used for 3D printing at low temperature and to successfully construct tissue-engineered cartilage.

[Key words] tissue-engineered cartilage; 3D bioprinting; gelatin methacrylamide

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(04): 533-537]

在软骨组织工程领域,3D生物打印的应用逐渐成为研究热点^[1-2]。3D生物打印的关键在于生物墨水材料的选择。常用的生物墨水材料分为天然生

物材料和人工合成高分子材料2类^[3-4]。其中,天然生物材料因具有可降解、低免疫原性等优点,在组织工程领域取得了广泛关注^[5-6]。

[基金项目] 国家自然科学基金(81974332,81672169)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fanweimin@vip.sina.com

明胶是一种天然衍生材料,经过甲基丙烯酸酯基官能团修饰后,形成明胶甲基丙烯酸酰胺(gelatin methacrylamide, GelMA)^[7]。由于化学交联后的Gel-

MA可以在正常体温(37℃)条件下维持稳定,形成适于细胞生长且具有强度的三维结构,因此可用于组织工程^[8]。众所周知,生物墨水必须具备双态性^[9]。所谓双态性,是指在3D生物打印的过程中,生物墨水可在某种条件的刺激下(温度、紫外线、化学刺激等)由液态转变为凝胶态^[10-11]。增加GelMA浓度是实现该材料双态性的最常用方法之一^[12]。但Gu等^[4,13]发现,高浓度GelMA(大于10%)具有抑制种子细胞活性的缺点。因此如果能实现较低浓度GelMA的3D生物打印,就能改善生物墨水中细胞的活力,为生物打印的临床应用提供可能。

在本研究中,我们应用载有骨髓间充干细胞(bonemarrowmesenchymal stem cell, BMSC)的5%GelMA生物墨水进行低温3D打印。打印后的样品在体外诱导21 d后,探究该支架上BMSC分化为软骨的能力;再将该支架植入裸鼠皮下,探究4周后软骨表型的稳定性。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级雄性裸鼠18只,6周龄,体重18~20 g。雄性SD大鼠4只,2周龄,体重40~45 g。均购于南京医科大学实验动物中心。本研究经南京医科大学动物伦理委员会批准。

GelMA(Sigma-Aldrich公司,美国);光引发剂(江阴司特易生物技术有限公司);PBS(Solarbio公司,美国);DMEM/F12完全培养基(Gibco公司,美国);OriCell鼠间充质干细胞成软骨诱导分化试剂盒(苏州赛业生物科技有限公司);Live/Dead细胞染色试剂盒;CCK-8检测试剂盒(同仁公司,日本);苏木精-伊红(HE)、阿利新蓝、番红O染液(Sigma公司,美国)。挤出式生物3D打印机(Regenhu公司,瑞士);凝胶测力仪(BOSE公司,美国);DHR-1型流变仪(TA公司,美国);扫描电子显微镜(Hitachi公司,日本);激光共聚焦显微镜(Zeiss公司,德国);BH-2生物显微镜(Olympus公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠BMSC的提取和培养

采用全贴壁培养法,SD大鼠抽取骨髓,在37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养,48 h后首次换液,之后每3 d换液,并实时观察。在倒置显微镜下观察到细胞长满培养瓶底70%~80%时,利用胰酶消化细胞进行1:2传代,3~5 d后进行下一次传代,最终传至第4代BMSC。

1.2.2 3D生物打印载有BMSC的GelMA支架

首先用1×PBS将GelMA配制成5%(W/V)溶液,50℃水浴加热溶解30 min,充分溶解后用Millipore 0.22 μm针头过滤器过滤除菌。再将混有细胞5×10⁵个/mL的5%GelMA溶液加入打印料筒内,并于0℃冰箱中避光适当时间冷冻预处理使GelMA呈凝胶状态。将打印机喷头设置为22℃后放入该料筒并静置5 min。将打印机平台温度调节至3℃,开启气压,调节为10 kPa,待喷嘴稳定挤出水凝胶微丝后,将水凝胶微丝打印到底板上,首层喷嘴距离底板表面0.2 mm,打印的方形支架高度为4 mm,直径为6 mm,每层高0.2 mm。喷嘴规格为25 G,移动速度为360 mm/min。打印结束后用光强为10 mW/cm²的紫外灯下光照90 s,充分固化载细胞GelMA水凝胶,最终得到载细胞GelMA水凝胶支架。将3D打印后光固化的水凝胶样品冻干切开,使用扫描电子显微镜观察截面。

1.2.3 流变动力学与力学性能检测

使用流变仪测试GelMA溶液的温敏过程及剪切变稀行为,所用夹具为40 mm平板。GelMA水溶液浓度为5%(W/V)。对于温敏过程,采用振荡模式,测试温度范围为5~40℃,降温速率为5℃/min,应变为10%,频率为5 rad/s。配制含有细胞的5%(W/V)GelMA溶液,其中光引发剂含量0.25%(W/V),加入到直径8.5 mm的圆柱模具中。使用紫外光源,距离3 cm,照射90 s,固化后制得高5.5 mm的圆柱形样品,通过水凝胶微力测试仪测试其压缩性能,取应力应变曲线前10%应变处的斜率作为其压缩模量,将不含有细胞的GelMA溶液用作对照组。

1.2.4 细胞增殖及细胞活性检测

将载细胞支架放入培养皿中,加入15 mL的完全培养基,于培养箱中孵育24 h后离心取上清液,经0.22 μm过滤器过滤得到GelMA浸出液。使用GelMA浸出液于96孔板中培养BMSC细胞(2 000个/孔),仅使用培养基培养的BMSC细胞作为对照组。分别在培养的第1、3、5、7天使用CCK-8法检测细胞的活力。具体过程为:去除培养液,用PBS清洗2次,接着向每个样本中加入100 μL培养基和10 μL CCK-8试剂,放入37℃培养箱2 h,最后用酶标仪在450 nm波长下读出吸光度的数值。

将打印好的载细胞支架分别置于普通培养基(对照组)与诱导培养基(诱导组)连续培养7 d,取出支架进行活死染色分析。Live/Dead细胞染色试剂盒使用步骤:将制备工作液充分混匀;取出载细胞

支架用1×PBS清洗3次;然后加入工作液室温孵育45 min;1×PBS清洗1次后立即用激光共聚焦显微镜采集图片,分析细胞存活或死亡状态。活细胞发出绿色荧光,死细胞发出红色荧光。

1.2.5 阿利新蓝染色

硫酸氨基葡萄糖聚糖是软骨基质中的主要成分,阿利新蓝染色是检测氨基葡萄糖聚糖(glucosaminoglycans, GAG)的一种特异性染色,因此阿利新蓝染色的深浅可以反映成软骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成情况。将打印好的载细胞支架分别置于诱导培养基和普通培养基中培养14 d。用4%多聚甲醛室温固定载细胞支架30 min,取适量阿利新蓝染液均匀滴在诱导组和仅使用DMEM培养基培养的对照组支架上,染色20 min。分别在显微镜下观察拍照。

1.2.6 裸鼠皮下培养

裸鼠通过0.3%戊巴比妥钠(10 mL/kg)腹膜内注射麻醉。在腹中线做1个小切口,并用钝器解剖形成皮下袋。将动物随机分为2组,实验组将经诱导的含有细胞的支架放置在皮下口袋中,另外将不含有细胞的支架用作对照组。然后用4-0可吸收缝线闭合切口。4周后,对动物实施安乐死,取回样品并分为两部分。将样品固定在4%多聚甲醛中,清洗后包埋在石蜡中,然后切片以进行组织学染色。根据先前建立的方法,用苏木精和曙红(HE)、番红O和阿利新蓝对切片进行染色,以评估组织结构和软骨在ECM中的沉积。

1.3 统计学方法

采用SPSS11.0软件进行处理,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用成组设计的t检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 支架微观结构分析

打印的5%GelMA支架网格清晰,孔隙均匀且孔径均一,网格孔隙宽度范围300~500 μm 。3D打印水凝胶冻干样品断面可以看出,冻干后支架的方形孔清晰可辨,横向和纵向挤出的水凝胶骨架层次分明未出现坍塌堆积(图1)。

2.2 流变与力学检测

当温度在16 $^{\circ}\text{C}$ 以上时,GelMA样品表现为溶液状态。当温度降调到16 $^{\circ}\text{C}$ 以下时,样品凝胶化表现出固体的性质(图2A)。对含有细胞和不含细胞5% GelMA水凝胶分别进行3次压缩测试,单纯GelMA

的压缩模量为(13.718±1.316)kPa;细胞+GelMA的压缩模量为(15.575±1.393)kPa。两组比较,差异无统计学意义(图2B)。

2.3 载细胞支架增殖实验与细胞活死染色

以培养基培养的BMSC细胞作为对照组,分别在培养的第1、3、5、7天使用CCK-8法检测细胞的活力,结果显示,除第1天外各组间的吸光度值均有显著性差异($P<0.05$,图3A),这表明支架具有促增殖作用。

将未经诱导(对照组)与诱导过后(诱导组)的载BMSC支架培养7 d取出进行细胞染色分析。载细胞支架培养至第7天时,细胞生长状态依然良好(图3B),表明低浓度GelMA具有良好的生物相容性。

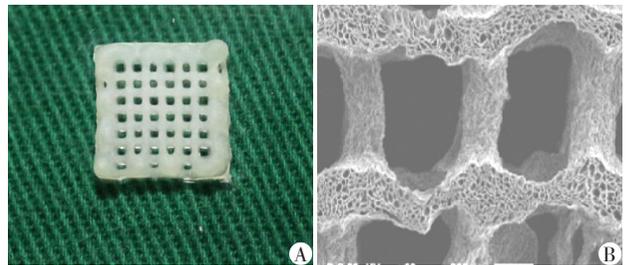
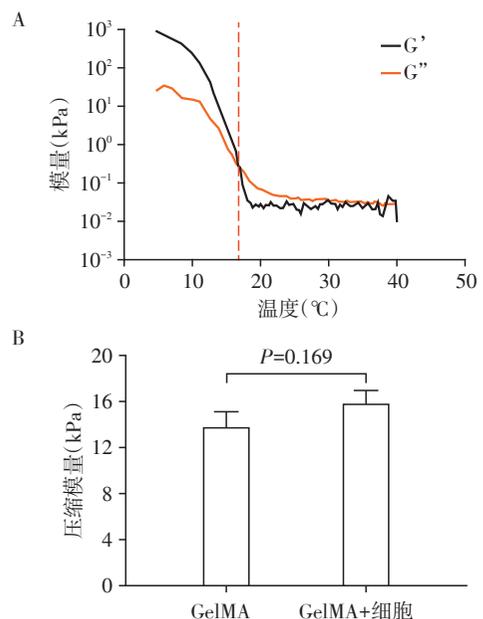


图1 3D打印GelMA支架大体图(A)及支架冻干样品SEM分析图(B,×70)

Figure 1 Overview of 3D printed GelMA scaffold (A) and SEM analysis of freeze-dried sample(B,×70)



A: GelMA溶液的温敏特性流变图;G':储能模量,G'':损耗模量,当 $G'<G''$ 时呈溶液状态,当 $G'>G''$ 为凝胶状态;B:5% GelMA压缩性能表征($n=3$)。

图2 GelMA溶液的温敏特性及5% GelMA的压缩性能表征
Figure 2 Rheological properties of GelMA solution and compression characteristics of 5% GelMA

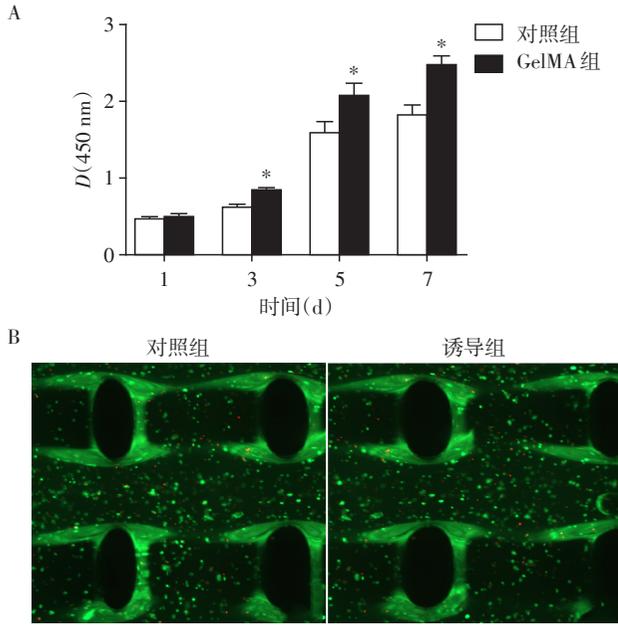


图3 支架细胞增殖情况及细胞活死检测

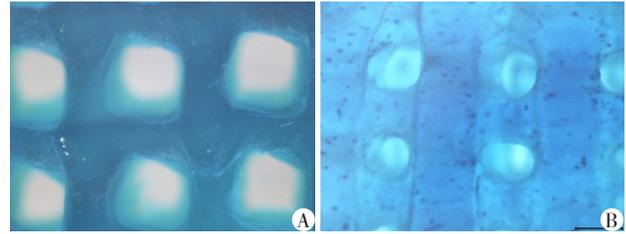
Figure 3 Cell proliferation and cell death on scaffold

2.4 载 BMSC 细胞支架诱导成软骨情况

在成软骨诱导培养基进行诱导培养 14 d 后,取出诱导组行阿利新蓝染色。实验结果显示诱导支架有明显颗粒状阿利新蓝阳性染色,而无诱导液的对照组细胞显色为阴性(图4)。说明诱导培养后,支架中出现了软骨 ECM 的合成。

2.5 裸鼠皮下成软骨染色结果

经过4周体内培养,HE染色表明实验组可以在裸鼠皮下成功再生稳定的成熟软骨,并且没有出现



A: 对照组支架; B: 诱导组支架(阿利新蓝染色, ×40)。

图4 培养 14 d 后支架软骨的形成

Figure 4 Induction of cartilage formation at 14 days

残留支架和明显的炎症反应。和对照组相比,所有实验组番红 O 和阿利新蓝均呈阳性染色,分别表明它们大量存在着蛋白聚糖和胶原(图5D、F),说明在体内, BMSC 向软骨细胞诱导分化且分泌了具有软骨特征的细胞外基质。这一发现表明该浓度(5%)的 GelMA 支架可以有效加速软骨再生。

3 讨论

GelMA 作为一种新型水凝胶,可以单独进行生物打印^[14]。但为满足生物墨水的双态性, GelMA 的使用浓度通常高于 10%^[10]。而 Gu 等^[13]发现过高浓度的 GelMA (> 10%)会导致水凝胶内部网络高度交联,从而限制种子细胞的迁移和增殖,抑制营养吸收和产物交换,对种子细胞的生物学行为产生负面影响^[15]。Levett 等^[14]使用 5%、10%、15% 3 种浓度 GelMA 分别装载细胞,发现 5% GelMA 可最大程度保证细胞活力,但无法打印出稳定的微纤维。然而,本研究通过低温打印,实现了低浓度、高细胞活力、高分辨率的生物墨水打印。

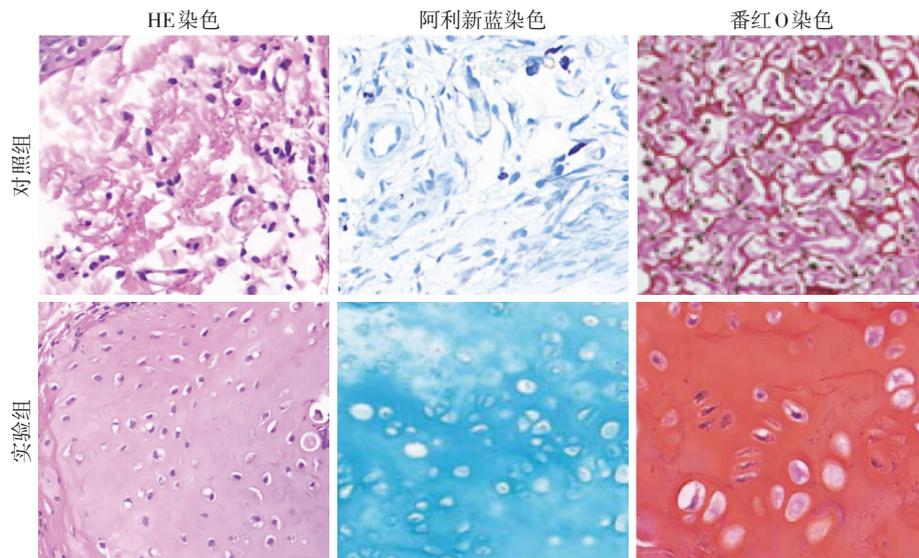


图5 体内培养4周后支架的组织学染色(×200)

Figure 5 Histological staining of scaffolds after 4 weeks of in vivo culture(×200)

GelMA 是一种温敏材料。在特定温度以下, GelMA 由液态变为凝胶态。但此过程具有可逆性, 当温度上升, 其又可变为液态。另外, GelMA 还是一种双键改性后的明胶, 它会在光引发剂作用下发生紫外光交联并进一步固化^[16], 且该过程是不可逆的。这一变化大幅度提高了支架的力学强度, 使其满足组织工程软骨支架的力学要求。在打印过程中, 我们首先将 GelMA 溶液加入料筒内并放于 0 °C, 利用低温诱导 GelMA 成凝胶状态。再将打印机喷头设置为 22 °C, 最后在 3 °C 的平台上打印出稳定的微纤维立体结构。若样品温度持续回升, 生物墨水会由凝胶态变回液态, 所以, 我们在打印后立刻采用紫外光交联, 使得 GelMA 水凝胶充分固化。从流变力学的检测中也可确定, 打印前 GelMA 的储能模量小于损耗模量, 打印后储能模量大于损耗模量。因此, 利用低温打印的方法就可以实现 5% GelMA 的可打印性。此外, 本研究发现通过短时间紫外照射, 不仅保留了种子细胞的活力, 而且使得组织工程软骨支架具有一定的生物力学和较高的打印分辨率。

本研究发现将支架行 3 周的体外诱导分化及 4 周的裸鼠皮下培养后, 其产生的组织工程软骨所分泌的细胞外基质均匀分布, 新生软骨块的压缩模量接近正常软骨。这很可能是因为 5% GelMA 能模拟细胞外基质, 为种子细胞提供力学支撑; 且低浓度 GelMA 具有更大的孔隙率, 有利于生成的细胞外基质扩散到整个水凝胶中, 为软骨提供优势再生环境。由于本研究只是一个初步研究, 因此我们下一步拟在关节软骨缺损模型中, 探究利用低温打印 5% GelMA 生物墨水在关节腔内修复软骨缺损的作用。

[参考文献]

- [1] WU J, MIAO G, ZHENG Z, et al. 3D printing mesoporous bioactive glass/sodium alginate/gelatin sustained release scaffolds for bone repair [J]. *J Biomater Appl*, 2018, 33(6):755-765
- [2] 唐成, 李旭祥, 凌辰, 等. 3D 打印个性化多孔钛金属支架重建髌臼骨缺损的中期疗效评估 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(12):1774-1778
- [3] LOESSNER D, MEINERT C, KAEMMERER E, et al. Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(4):727-746
- [4] SUN M, LIU A, SHAO H, et al. Systematical evaluation of mechanically strong 3D printed diluted magnesium doping wollastonite scaffolds on osteogenic capacity in rabbit calvarial defects [J]. *Sci Rep-Uk*, 2016, 6(1):34029
- [5] 胡超然, 邱冰. 3D 生物打印技术在骨组织工程中的应用 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(2):316-322
- [6] YAN Y, CHENG B, CHEN K, et al. Enhanced osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by a functionalized silk fibroin hydrogel for bone defect repair [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(3):1801043
- [7] HEINRICH M A, LIU W, JIMENEZ A, et al. 3D bioprinting: from benches to translational applications [J]. *Small*, 2019, 15(23):1805510
- [8] 程若昱, 燕宇飞, 陈皓, 等. 双效骨诱导性的有机-无机水凝胶的构建及其骨再生研究 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018, 38(8):900-909
- [9] MOUSER V H, MELCHELS F P, VISSER J, et al. Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting [J]. *Biofabrication*, 2016, 8(3):35003
- [10] YIN J, YAN M, WANG Y, et al. 3D bioprinting of low-concentration cell-laden gelatin methacrylate (GelMA) bioinks with a two-step cross-linking strategy [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2018, 10(8):6849-6857
- [11] CHEN P, ZHENG L, WANG Y, et al. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration [J]. *Theranostics*, 2019, 9(9):2439-2459
- [12] SCHUURMAN W, LEVETT P A, POT M W, et al. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs [J]. *Macromol Biosci*, 2013, 13(5):551-561
- [13] GU Y, ZHANG L, DU X, et al. Reversible physical cross-linking strategy with optimal temperature for 3D bioprinting of human chondrocyte-laden gelatin methacryloyl bioink [J]. *J Biomater Appl*, 2018, 33(5):609-618
- [14] LEVETT P A, MELCHELS F P W, SCHROBBACK K, et al. A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(1):214-223
- [15] LEVETT P A, MELCHELS F P W, SCHROBBACK K, et al. Chondrocyte redifferentiation and construct mechanical property development in single-component photocross-linkable hydrogels [J]. *J Biomed Mater Res*, 2014, 102(8):2544-2553
- [16] 费毫, 翟晨骏, 王振, 等. 以改良方法制作软骨细胞外基质构建高质量组织工程软骨 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(7):934-939

[收稿日期] 2020-01-07