

# 人牙髓细胞共混物三维生物打印技术

薛世华<sup>1</sup>, 吕培军<sup>2△</sup>, 王 勇<sup>2</sup>, 赵 雨<sup>3</sup>, 张 婷<sup>3△</sup>

(1. 北京大学口腔医学院·口腔医院第一门诊部, 北京 100034; 2. 北京大学口腔医学院·口腔医院口腔医学计算机应用中心, 卫生部口腔医学计算机应用工程技术研究中心, 口腔数字化医疗技术和材料国家工程实验室, 北京 100081; 3. 清华大学机械工程系生物制造工程研究所, 先进成形制造教育部重点实验室, 北京 100084)

**[摘要]** **目的:** 对人牙髓细胞(human dental pulp cells, hDPCs)共混物三维生物打印技术进行初步的探索, 为三维生物打印技术应用于牙再生奠定初步基础。**方法:** 用 Imageware 11.0 软件设计三维生物打印蓝图; 制备海藻酸钠-明胶水溶胶, 与体外分离、培养的 hDPCs 共混, 共混物中 hDPCs 的密度为  $1 \times 10^6$  个/mL, 海藻酸钠和明胶的终浓度分别为 20 g/L 和 80 g/L; 用三维生物打印技术按一定参数进行 hDPCs 共混物的三维生物打印, 观察打印获得的三维结构体, 用钙黄绿素-AM 和碘化丙啶溶液对结构体进行染色, 评价打印后 hDPCs 的活性, 计算细胞存活率; 体外培养打印获得的结构体, 用 Cell Counting Kit-8 试剂检测 hDPCs 在三维结构体中的增殖。**结果:** 利用 Imageware 11.0 软件设计出了由圆柱状微丝逐层交错堆积构成的具有网格结构的三维结构体数字模型, 用三维生物打印技术可构建出具有自定义形状及尺寸的三维结构体, 结构体中 hDPCs 的存活率为  $87\% \pm 2\%$ , 经打印处理的 hDPCs 在三维结构体中仍可增殖。**结论:** 本研究实现了 hDPCs 共混物的三维生物打印, 为三维生物打印技术应用于牙再生奠定了初步基础。

**[关键词]** 生物打印; 牙髓; 细胞, 培养的; 组织工程

**[中图分类号]** R783 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2013)01-0105-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-167X.2013.01.022

## Three dimensional bioprinting technology of human dental pulp cells mixtures

XUE Shi-hua<sup>1</sup>, LV Pei-jun<sup>2△</sup>, WANG Yong<sup>2</sup>, ZHAO Yu<sup>3</sup>, ZHANG Ting<sup>3△</sup>

(1. First Clinical Division, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100034, China; 2. Center of Digital Dentistry, Peking University School and Hospital of Stomatology, Research Center of Engineering and Technology for Digital Dentistry Ministry of Health, National Engineering Laboratory for Digital and Material Technology of Stomatology, Beijing 100081, China; 3. Bio-manufacturing Engineering Research Institute, Department of Mechanical Engineering, Tsinghua University, Key Laboratory for Advanced Materials Processing Technology, Ministry of Education, Beijing 100084, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the three dimensional (3D) bioprinting technology, using human dental pulp cells (hDPCs) mixture as bioink and to lay initial foundations for the application of the 3D bioprinting technology in tooth regeneration. **Methods:** Imageware 11.0 computer software was used to aid the design of the 3D biological printing blueprint. Sodium alginate-gelatin hydrosol was prepared and mixed with *in vitro* isolated hDPCs. The mixture contained 20 g/L sodium alginate and 80 g/L gelatin with cell density of  $1 \times 10^6$ /mL. The bioprinting of hDPCs mixture was carried out according to certain parameters; the 3D constructs obtained by printing were examined; the viability of hDPCs after printing by staining the constructs with calcein-AM and propidium iodide dye and scanning of laser scanning confocal microscope was evaluated. The *in vitro* constructs obtained by the bioprinting were cultured, and the proliferation of hDPCs in the constructs detected. **Results:** By using Imageware 11.0 software, the 3D constructs with the grid structure composed of the accumulation of staggered cylindrical microfilament layers were obtained. According to certain parameters, the hDPCs-sodium alginate-gelatin blends were printed by the 3D bioprinting technology. The self-defined shape and dimension of 3D constructs with the cell survival rate of  $87\% \pm 2\%$  were constructed. The hDPCs could proliferate in 3D constructs after printing. **Conclusion:** In this study, the 3D bioprinting of hDPCs mixtures was realized, thus laying initial foundations for the application of the 3D bioprinting technology in tooth regeneration.

**KEY WORDS** Bioprinting; Dental pulp; Cells cultured; Tissue engineering

近年来随着组织工程学的发展,人们寄希望于利用组织工程技术实现牙齿的重建修复。国内外学者通过传统的组织工程手段进行了大量牙再生的相

关研究,已取得一定成绩<sup>[1-4]</sup>,但是,牙齿的形态、结构复杂,组织构成多样,用传统的组织工程技术进行牙再生存在众多难以解决的问题。

△ Corresponding author's e-mail, kqlpj@bjmu.edu.cn, t-zhang@tsinghua.edu.cn

网络出版时间:2013-1-3 10:21:34 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20130103.1021.004.html>

三维生物打印是在快速成形技术发展的基础上,结合细胞生物学、计算机辅助设计(computer aided design, CAD)和生物材料学等多个领域的研究成果,发展而来的一种新型的组织工程技术,其最终目标是实现器官打印<sup>[5]</sup>。三维生物打印技术克服传统组织工程技术的局限性,不但可构建形态、结构复杂的组织工程支架,而且可实现不同密度的种子细胞在不同支架材料中的三维精确定位<sup>[5-11]</sup>。将三维生物打印技术应用于牙再生,预期有良好的应用前景。

本研究对人牙髓细胞(human dental pulp cells, hDPCs)共混物的三维生物打印技术进行了初步的探索,为牙再生研究提供了新思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 主要器材和试剂

主要器材:生物打印机由清华大学机械工程系生物制造工程研究所、先进成形制造教育部重点实验室提供,LSM5 Excitor 激光共聚焦显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司,ELx808 酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司,Imageware 11.0 软件购自德国 Siemens PLM Software 公司,Image pro plus 6.0 软件购自美国 Media Cybernetics 公司,海藻酸钠和明胶均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

主要试剂: $\alpha$ -最低必须培养基( $\alpha$ -minimum essential medium,  $\alpha$ -MEM)购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自美国 HyClone 公司,无水  $\text{CaCl}_2$  购自美国 Sigma-Aldrich 公司,氯化钠注射液购自北京双鹤药业有限公司,Cell Counting Kit-8 (CCK-8)、钙黄绿素-AM 和碘化丙啶均购自日本 DOJINDO 公司。

### 1.2 实验方法和步骤

**1.2.1 hDPCs 共混物的三维生物打印** 三维生物打印结构体的 CAD 建模:用逆向工程软件 Imageware 11.0 进行三维生物打印结构体的 CAD 建模。拟构建内部结构为网格状的,尺寸为  $5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 1.5\text{ mm}$  的长方体结构。定义该网状结构由直径约  $300\text{ }\mu\text{m}$  的圆柱状微丝逐层交错堆积形成。网状结构中微丝交错构成的孔隙大小设定为  $350\text{ }\mu\text{m} \times 350\text{ }\mu\text{m}$ 。共混物的制备:采用酶联合消化法原代培养人牙髓细胞,取第 3 代作为实验用细胞。本实验方案经过北京大学生物医学伦理委员会批准,所有志愿者均被告知相关实验情况,并签署知情同意书。本研究用完全培养基为  $\alpha$ -MEM,含青霉素  $100\text{ U/mL}$ ,链霉素  $100\text{ mg/L}$ ,L-谷氨酰胺  $2\text{ mmol/L}$  及  $10\%$  (体积分数)胎牛血清。用生理盐水分别溶解海藻酸钠粉末和明胶干粉,用恒温磁力搅拌器低速搅拌,  $70\text{ }^\circ\text{C}$  间歇式灭菌,制备海藻

酸钠、明胶水溶胶。消化、收集、计数对数生长期的第 3 代人牙髓细胞,用生理盐水重悬细胞。将细胞悬液与海藻酸钠-明胶水溶胶材料混合,轻柔混匀,获得人牙髓细胞-海藻酸钠-明胶水溶胶的共混物。同法制备不含细胞的海藻酸钠-明胶水溶胶共混物。两种共混物中,海藻酸钠的终浓度均为  $20\text{ g/L}$ ,明胶的终浓度均为  $80\text{ g/L}$ 。含细胞的共混物中 hDPCs 的密度为  $1 \times 10^6$  个/mL。三维结构体的构建:将装有共混物的注射器前端连接打印喷头,载入三维生物打印机的温控成形室,由预先设计的 CAD 数字模型及选定的成形参数,驱动打印机的喷头运动。步进电机驱动柱塞挤出成形,将共混物喷出到三维生物打印机的低温成形腔内,在载有无菌培养皿的三维微动平台处拉成线状,挤出的共混物因明胶的温度敏感性发生物理交联,由溶胶转变为凝胶。在具有层片信息的 CAD 模型数控驱动下,共混物逐层挤出/沉积形成不同的层面,不同的打印层面之间逐层交错叠加,以形成三维结构体。生物打印成形过程的主要控制参数:成形室温度为  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ,打印喷头内径为  $0.1\text{ mm}$ ,打印速率为  $7\text{ mm/s}$ ,挤出速度为  $9\text{ mm}^3/\text{min}$ 。打印后即刻,依次用  $100\text{ mmol/L}$  的  $\text{CaCl}_2$  溶液和  $0.25\%$  (体积分数)的戊二醛液进行交联,交联时间分别为  $5\text{ min}$  和  $15\text{ s}$ ,交联后,用生理盐水漂洗 3 次。将最终获得的三维生物打印结构体浸入完全培养基培养。

**1.2.2 三维生物打印后的观察和评价** 三维生物打印后的观察:对打印获得的三维结构体进行肉眼观察,然后用倒置相差显微镜对结构体进行观察。细胞活性分析:将培养  $24\text{ h}$  的含细胞的三维结构体用 LIVE/DEAD 荧光染色剂(含  $5\text{ }\mu\text{mol/L}$  的钙黄绿素-AM 和  $3\text{ }\mu\text{mol/L}$  碘化丙啶)进行染色。用激光共聚焦显微镜分别在  $488\text{ nm}$  (钙黄绿素-AM 的激发波长)和  $543\text{ nm}$  (碘化丙啶的激发波长)的激发光下在 Z 轴每隔  $20\text{ }\mu\text{m}$  对结构体进行扫描观察,保存图像。任选 5 个激光共聚焦扫描层面的图像,用 Image pro plus 6.0 软件计数图像中的红、绿荧光点(红、绿光点分别代表死细胞、活细胞)的个数,计算三维生物打印后 hDPCs 的存活率,细胞存活率 = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数)  $\times 100\%$ 。生物打印后 hDPCs 在三维结构体中的增殖情况:打印 20 件尺寸为  $5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 1.5\text{ mm}$  的含 hDPCs 的三维结构体作为实验组样本,4 件不含细胞仅含海藻酸钠-明胶共混物的三维结构体作为空白调零样本,用完全培养基进行培养,分别于培养第 1、3、7 和 10 天,各取 5 件实验组样本及 1 件空白调零样本,采用 CCK-8 试剂测定光密度值(D)。

## 2 结果

### 2.1 实验获得的 hDPCs

图 1 为用于实验的第 3 代 hDPCs,细胞呈单层排列,生长状态良好,细胞外形多为长梭形的成纤维样细胞,细胞质向周围伸出突起,胞浆均匀、透亮,胞浆中央的细胞核圆,核仁清晰。

### 2.2 hDPCs 共混物的三维生物打印

通过 Imageware 11 软件可完成三维生物打印结构体的 CAD 数字建模(图 2),获得由 5 层圆柱状微丝逐层交错堆积形成的具有网格结构的长方体状数字模型。长方体的尺寸为  $5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 1.5\text{ mm}$ 。长方体中的每层结构由 7 条直径  $300\text{ }\mu\text{m}$ 、长  $1.5\text{ mm}$  的圆柱状微丝构成。单层中的微丝相互平行,间距  $350\text{ }\mu\text{m}$ ,相邻两层间的微丝无间隔垂直交错叠放。

### 2.3 三维结构体的观察

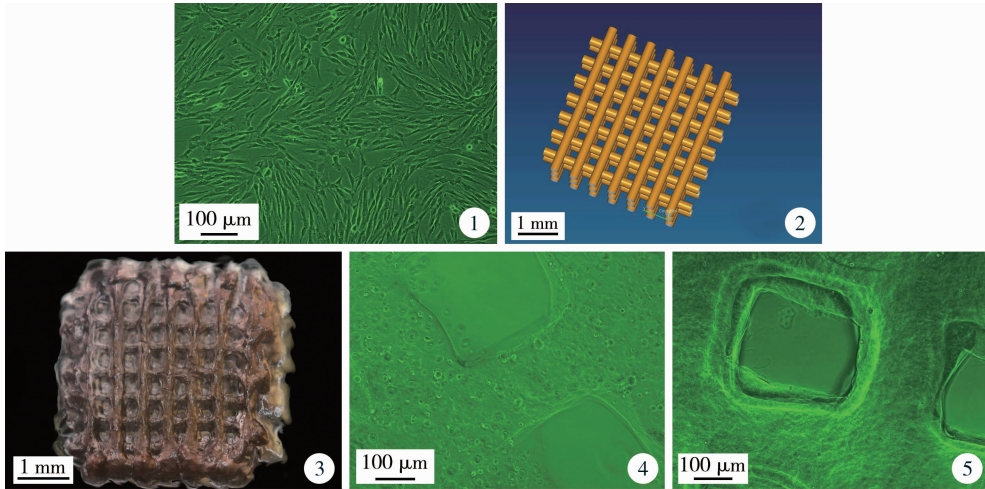


图 1 实验用第 3 代 hDPCs( $\times 100$ ) 图 2 三维生物打印结构体的数字模型 图 3 生物打印获得的三维结构体  
图 4 含 hDPCs 的三维结构体( $\times 100$ ) 图 5 不含细胞的三维结构体( $\times 100$ )

Figure 1 The 3rd generation hDPCs for the studies( $\times 100$ ) Figure 2 The digital model of the 3D bioprinting constructs  
Figure 3 Printed 3D construct Figure 4 3D construct seeded with hDPCs ( $\times 100$ ) Figure 5 Cell-free 3D construct ( $\times 100$ )

### 2.5 打印后 hDPCs 在三维结构体中的增殖情况

如图 7 所示,人牙髓细胞共混物经三维生物打印后,随着培养时间的延长,三维结构体中的 hDPCs 数量明显增加。

## 3 讨论

### 3.1 三维生物打印蓝图的设计

本研究中三维生物打印蓝图的设计主要基于以下考虑:长方体的外形规则,便于测量和观察,因此有利于对生物打印三维结构体进行观察、评价和分析。三维结构体设计为微丝交错的结构,有利于被水凝胶材料包裹的细胞与外界环境进行营养物质的交换,同时有利于细胞代谢产物的排出。

### 3.2 关于三维生物打印的原理和过程的讨论

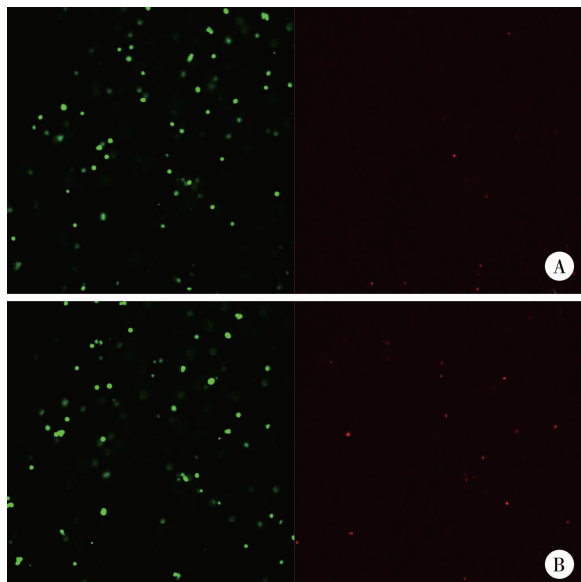
通过三维生物打印技术,可获得半透明网格状三维结构体(图 3),大小约为  $5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 1.5\text{ mm}$ ,肉眼观察基本符合预先的设计。倒置相差显微镜下可见三维结构体中微丝直径约  $300\text{ }\mu\text{m}$ ,孔隙的尺寸在  $350\text{ }\mu\text{m} \times 350\text{ }\mu\text{m}$  左右(图 4, 5),细胞在结构体中呈圆球形均匀分布(图 4)。

### 2.4 经打印后的 hDPCs 存活情况

图 6A 和 6B 分别为 LIVE/DEAD 荧光染色后,在三维结构体中的不同层面用激光共聚焦显微镜观察到的细胞存活情况。图 6A 为 Z 轴高度  $205\text{ }\mu\text{m}$  平面,图 6B 为 Z 轴高度  $345\text{ }\mu\text{m}$  平面。激光共聚焦显微镜在不同层面上可见细胞分布均匀,大部分细胞呈绿色荧光,少量呈红色荧光的死细胞零散分布。用 Image pro plus 6.0 图像分析软件对活、死细胞进行计数后,计算出本研究中 hDPCs 经三维生物打印后的存活率为  $87\% \pm 2\%$ 。

本研究所采用的生物打印技术的基本原理<sup>[12]</sup>是结合离散-堆积快速成形原理和溶胶-凝胶相变机制,在计算机控制下,根据预先设计的三维数字模型,构建含活细胞的三维结构体,从而实现细胞打印。本研究以海藻酸钠-明胶水溶胶为载体,在打印前将  $1 \times 10^6$  个/mL 的 hDPCs 与水溶胶均匀混合,实现了细胞在三维结构体里的均匀分布(图 4)。在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  的低温成形室内,以容积驱动挤出成形的的方式,通过精确的三维定位系统,按照计算机软件预先设计的结构体外形、大小和内部孔径,将水溶胶以微丝形式精确挤出,不同层面的微丝逐层交错堆积,相邻层面的微丝相互粘接,构建出了含有 hDPCs 的网格状三维结构体(图 3,4)。该结构体符合预先设计的尺寸和外形,结构体内部具有互相连通的孔隙,有利于

组织形成及其中的 hDPCs 新陈代谢。打印过程中,微丝中的明胶水溶胶在低温环境下转变为凝胶,使结构体得以成形。后处理过程中,结构体中的海藻酸钠溶胶与 CaCl<sub>2</sub> 溶液中的 Ca<sup>2+</sup> 发生化学交联,转变为海藻酸钙凝胶,使结构体的稳定性得以维持。



A, the plane of Z205 μm; B, the plane of Z345 μm; Green light spots, living cells; Red light spots, dead cell.

图 6 LIVE/DEAD 荧光染色图像 (×100)

Figure 6 Fluorescent image using LIVE/DEAD staining (×100)

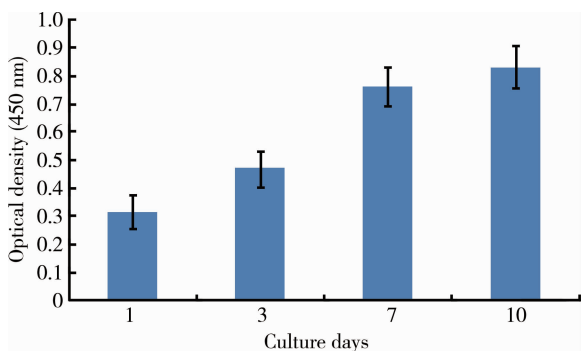


图 7 生物打印后 hDPCs 在三维结构体中增殖的 CCK-8 检测结果

Figure 7 Results of CCK-8 assay to identify the proliferation of hDPCs in the 3D structures after bioprinting

### 3.3 打印后细胞的活性和增殖评价

打印后细胞活性和细胞增殖是评价细胞打印效果的关键指标。打印过程容易对细胞造成损伤,如果不能使细胞所受损伤降至最低或零损伤,打印所得的三维结构体亦将随着细胞的大量死亡而失去意义。本研究中的 hDPCs 经三维生物打印,存活率可达 87% ± 2%,与文献所报道的其他同类技术的研究结果<sup>[13-14]</sup>相比,细胞存活率较高。CCK-8 检测观察了打印后 10 d 内 hDPCs 在三维结构体中的增殖情况,证明 hDPCs 在三维结构体内可增殖。

### 3.4 影响 hDPCs 在三维生物打印后存活率和 hD-

PCs 在三维结构体中增殖情况的主要因素

打印喷头的内径、成型室温度、溶胶的挤出速度、交联剂对细胞的毒性作用和载体材料与 hDPCs 的生物相容性等是影响的主要因素。喷头内径越小、成型室温度越低、挤出速度越快、交联剂的细胞毒性越大、载体材料与细胞的生物相容性越差,越不利于细胞存活和增殖。

本研究实现了 hDPCs-海藻酸钠-明胶共混物在生物打印设备上按照一定参数打印,成功构建具有自定义形状、尺寸、细胞密度为 10<sup>6</sup> 个/mL、细胞存活率 87% ± 2% 的三维结构体,hDPCs 在该结构体内可增殖。尽管本研究利用生物打印技术构建的结构体尺寸较小、结构也比较简单,但现有研究结果已经验证了生物打印技术在人牙齿组织工程中应用的可行性,为三维生物打印技术应用于人牙齿再生奠定了初步的科学基础。

### 参考文献

- [ 1 ] Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine [J]. *PLoS One*, 2006, 1: e79.
- [ 2 ] Huang GT, Yamaza T, Shea LD, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(2): 605-615.
- [ 3 ] Kim K, Lee CH, Kim BK, et al. Anatomically shaped tooth and periodontal regeneration by cell homing [J]. *J Dent Res*, 2010, 89(8): 842-847.
- [ 4 ] Wang Y, Preston B, Guan G. Tooth bioengineering leads the next generation of dentistry [J]. *Int J Paediatr Dent*, 2012, 22(6): 406-418.
- [ 5 ] Mironov V, Boland T, Trusk T, et al. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(4): 157-161.
- [ 6 ] Peltola SM, Melchels FP, Grijpma DW, et al. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes [J]. *Ann Med*, 2008, 40(4): 268-280.
- [ 7 ] Mironov V. Printing technology to produce living tissue [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3(5): 701-704.
- [ 8 ] Mironov V, Trusk T, Kasyanov V, et al. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm [J]. *Biofabrication*, 2009, 1(2): 1-16.
- [ 9 ] Konig G, McAllister TN, Dusserre N, et al. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(8): 1542-1550.
- [ 10 ] Jakab K, Neagu A, Mironov V, et al. Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2864-2869.
- [ 11 ] Wang X, Yan Y, Zhang R. Recent trends and challenges in complex organ manufacturing [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, 16(2): 189-197.
- [ 12 ] Li S, Xiong Z, Wang X, et al. Direct fabrication of a hybrid cell/hydrogel construct by a double-nozzle assembling technology [J]. *J Bioact Compat Polym*, 2009, 24: 249-264.
- [ 13 ] Smith CM, Stone AL, Parkhill RL, et al. Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs [J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(9-10): 1566-1576.
- [ 14 ] Fedorovich NE, Swennen I, Girones J, et al. Evaluation of photocrosslinked luteal hydrogel for tissue printing applications [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(7): 1689-1696.

(2012-10-09 收稿)  
( 本 文 编 辑 : 刘 淑 萍 )