

具有生物相容性和結構完整性的三維生物列印聚合物支架，可用於潛在的組織再生應用
Three-dimensional bioprinted polymer scaffolds with biocompatibility and structural integrity can be used for potential tissue regeneration applications.

藍文謙 副教授
德育護理健康學院

一、研究背景及目的

人體對生物3D列印的兼容性與性能，是生物3D列印技術發展的重要瓶頸。目前，生物3D列印技術在材料、設備、工藝等方面仍處於探索階段。本研究旨在開發一種具有良好生物相容性和結構完整性的三維生物列印聚合物支架，以滿足組織再生應用的需求。本研究將從材料選擇、設備優化、工藝改進等方面入手，探討如何提高生物3D列印的兼容性與性能，為組織再生提供新的策略。

2. 材料與方法

水凝膠製備：以PBS溶解海藻酸鈉，加入1-4%不同濃度明膠製成GBH-1~GBH-4，使用氯化鈣交聯，並以商業生物墨水為對照。

性質測試：進行接觸角量測、流變分析，以及絲材融合與坍塌試驗，以評估親水性、黏彈性與可列印性。

細胞試驗：使用人類角膜成纖維細胞，評估列印前後在最佳配方中的存活率與形態，並以統計分析檢驗差異。

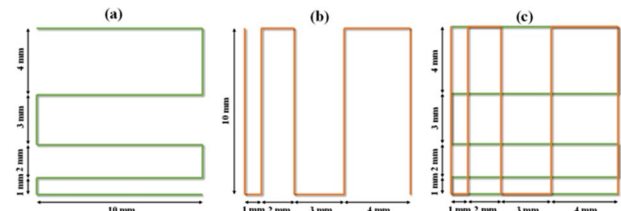


圖 1. 絲材融合測試圖案，分別沿著以下方向列印：

(a) 第一層，(b) 第二層，以及 (c) 最終圖案

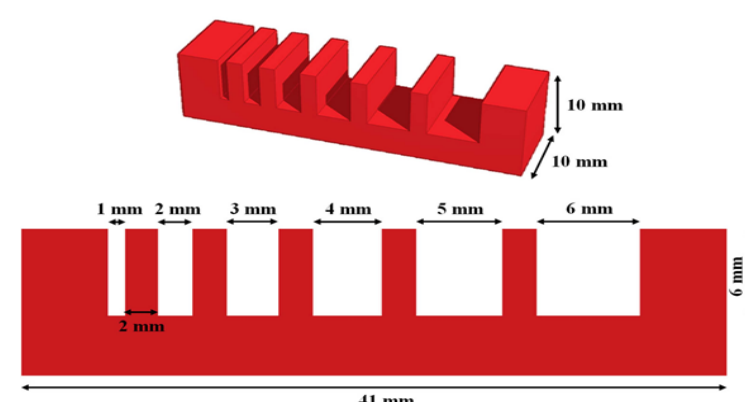


圖 2. 絲狀物坍塌測試平台模型。

2.6 細胞活力測定

在本研究中，採用人類角膜成纖維細胞系（編號6510，Blossom Biotechnologies Inc）來評估最佳生物墨水在打印之前（未經打印處理）和打印之後（經過打印處理）的細胞活力。列印前的細胞活力，將纖維母細胞懸浮液（ 4×10^5 個細胞）和 1 mL 生物墨水，將其裝入 35 mm 培養皿中，加入 1 mL 50 mM CaCl_2 溶液作為交聯劑並浸泡 5 分鐘（ $n = 5$ ）。當交聯完成後，移除 CaCl_2 溶液並以 PBS 溶液洗滌 3 次。此後，添加 1 mL 培養基 (DMEM/F12) 並在 37°C 、5% CO_2 下分別培養 1 天和 7 天。對於列印後細胞活力評估 (圖 3)，將濃度為 4 105 個細胞/mL 的 1 mL 生物墨水移入 10 mL 注射器中，並立即轉移到溫度為 25°C 的電子乾燥箱中 10 分鐘形成充滿細胞的生物墨水。然後，根據 2.4 節中提到的理想列印組合，將 200 μL 充滿細胞的生物墨水列印到 35 mm 培養皿中 ($n = 5$)。隨後加入 1 mL 50 mM CaCl_2 溶液作為交聯劑，並浸泡 5 min。交聯完成後，除去 CaCl_2 溶液，並以 PBS 溶液洗滌 3 次。此後，添加 1 mL 培養基並在 37°C 和 5% CO_2 下分別培養 1 天和 7 天。在每個時間點結束時，加入 LIVE/DEAD® 活力/細胞毒性試劑盒螢光染料 (488/570; Thermo Fisher Scientific) 並在 37°C 、5% CO_2 下孵育 1 小時。最後，透過倒置螢光顯微鏡 (Olympus IX71) 在不同放大倍率下觀察第 1 天和第 7 天列印處理的細胞。為了對每個時間點的細胞進行定量，使用 VisiView 軟體 (VisiTron Systems GmbH, Puchheim) 取得影像。然後，在隨機獲取的 3 至 4 個代表性圖像中對紅色螢光細胞 (死細胞) 進行計數。使用 Fiji-ImageJ 影像處理軟體評估死細胞的數量，該軟體允許進行實用的細胞計數。細胞活力如式(1)所示：細胞活力 (%) = $1 - (\text{死細胞}) / (\text{總細胞}) \times 100\%$

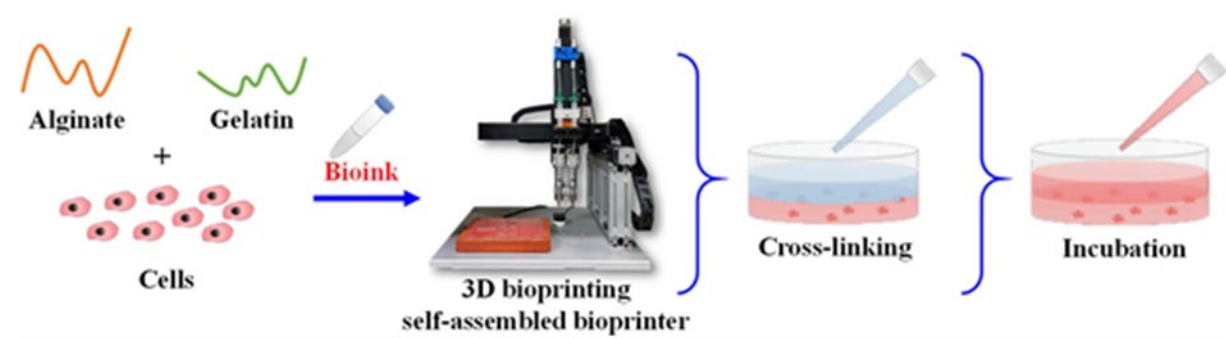


圖 3. 用於評估最佳生物墨水列印後細胞活力的實驗裝置的示意圖。

2.7. 統計分析

實驗資料以 SPSS 統計軟體 (19.0 版, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 進行分析。多組之間的差異是透過單向變異數分析和 Tukey 的 HSD 事後檢定來確定。p 值小於 0.05 被認為具有統計顯著性。

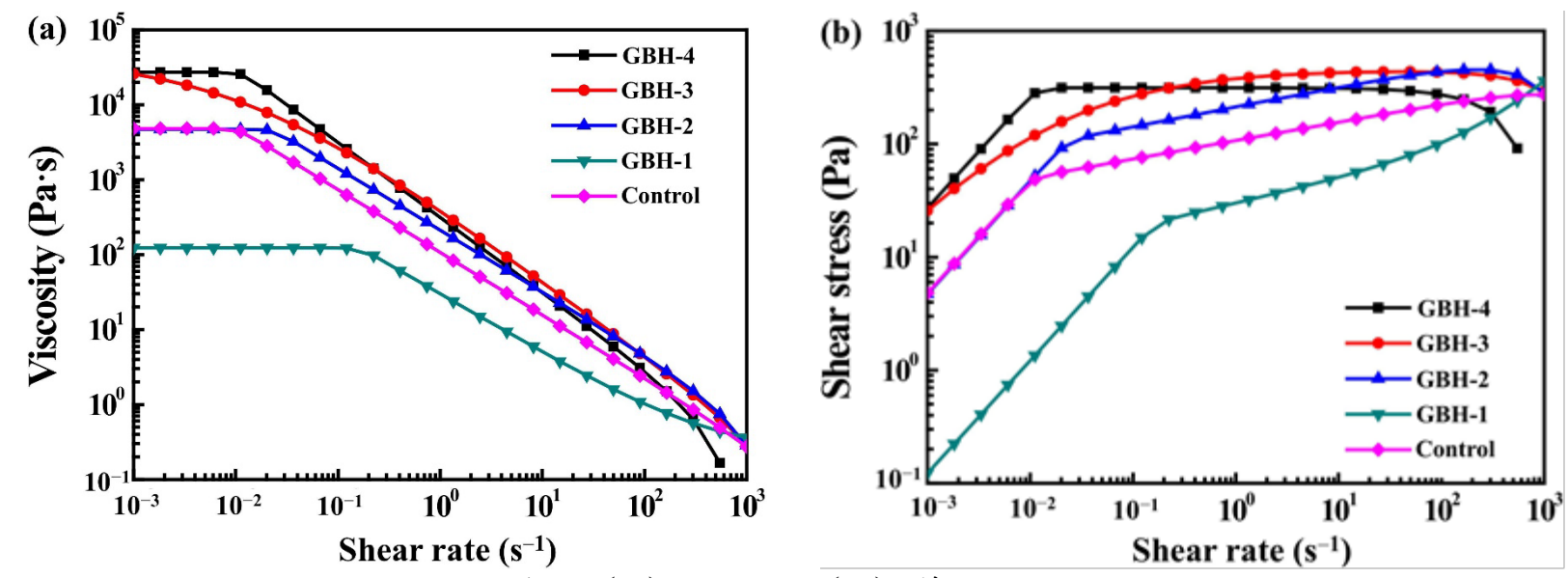


圖 5. 研究水凝膠的流變性質：(a) 黏度和 (b) 剪切應力

3. 結果與結論

GBH-2 (2% 明膠) 在接觸角損失率、黏度與剪切應力方面最接近商業生物墨水，列印過程中呈現較佳幾何穩定性與最低坍塌程度。以 GBH-2 列印的 3D 細胞支架可在 24 小時內維持形狀完整，線徑穩定，顯示良好可列印性與結構強度。人類角膜成纖維細胞在列印前後 7 天內存活率皆可維持約 70%，證實 GBH-2 具有良好生物相容性與作為軟組織工程細胞支架生物墨水的潛力

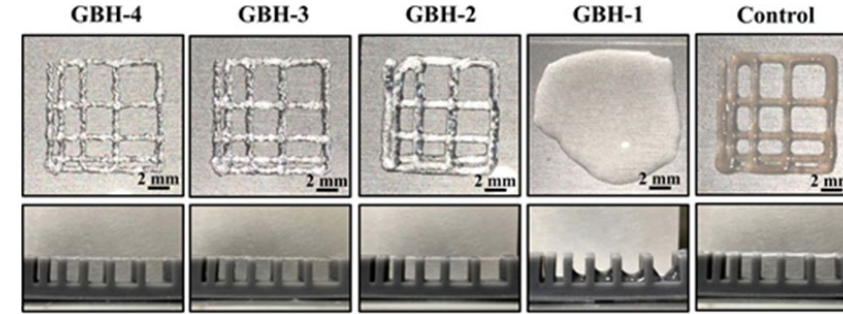


圖 6. 研究水凝膠的絲材融合 (上線) 和坍塌測試 (下線) 結果。

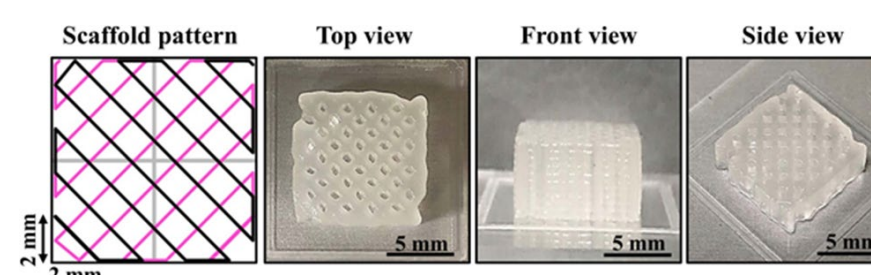


圖 8. 使用 GBH-2 生物墨水列印的細胞支架 (10 mm x 10 mm x 10 mm) 在列印後 24 小時內保持形狀完整性。網絡間距為 2 mm，列印層數為 10 層。

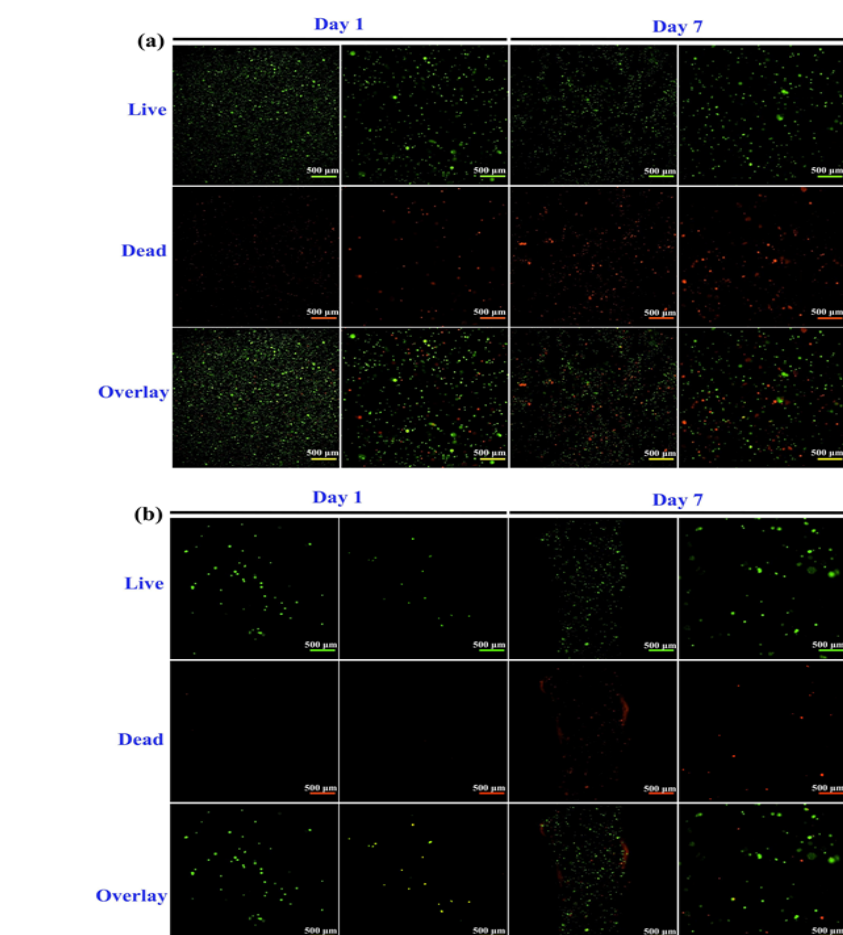
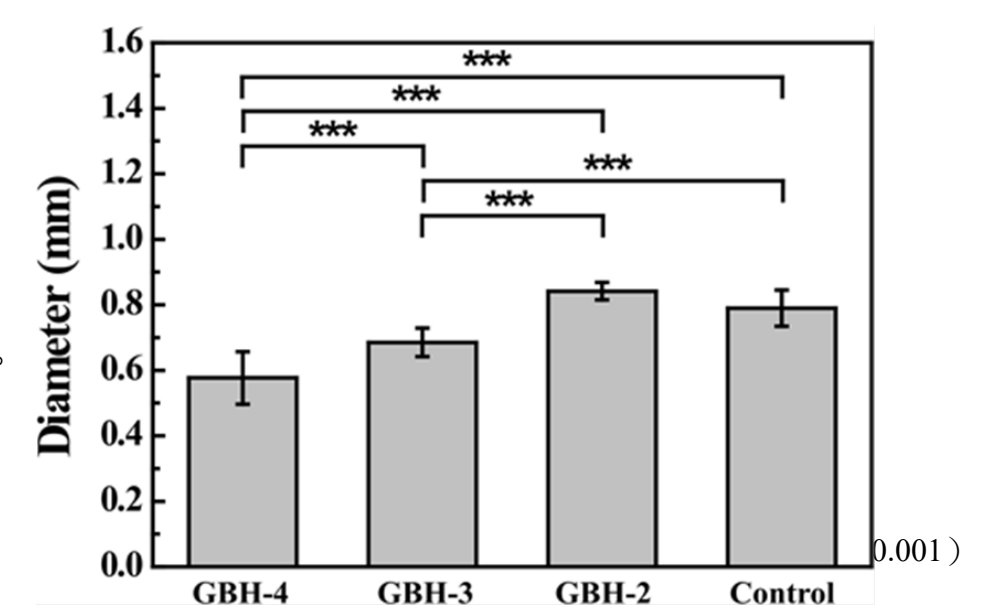


圖 9. 最佳生物墨水 GBH-2 的細胞活力/死亡分析結果：(a) 列印前 (未進行列印處理)，(b) 列印後 (進行列印處理)，以及 (c) 定量測量分析 (***) $p < 0.001$ 。

5. 結論

與其他研究的水凝膠相比，GBH-2 水凝膠在列印過程中接觸角損失率最低，僅 28%。所有水凝膠的流變學性質均表現出剪切稀化行為。然而，列印後，GBH-2 水凝膠與對照組相比，具有相似的黏度、低剪切應力和平均線徑。GBH-2 中藻酸鹽和明膠的組合展現出建構細胞支架的巨大潛力，該支架可在列印後 24 小時內保持形狀完整性。此外，GBH-2 生物墨水也表現出優異的可列印性能，列印前後人類角膜纖維母細胞的存活率均維持在 70% 以上。因此，本研究結果可為建構用於軟組織工程的複雜功能性細胞支架提供一種新的策略。

參考文獻

1. Moon, S.; Hasan, S.K.; Song, Y.S.; Xu, F.; Keles, H.O.; Manzur, F.; Mikkilineni, S.; Hong, J.W.; Nagatomi, J.; Haeggstrom, E.; et al. Layer by layer three-dimensional tissue epitaxy by cell-laden hydrogel droplets. *Tissue Eng. Part C Methods* 2010, 16, 157–166. [CrossRef] [PubMed]
2. Abdulmageed, A.I.; Soon, C.F.; Talip, A.B.; Othman, S.A.; Lim, G.P.; Tee, K.S. Investigation on the printability of bioink based on alginate-gelatin hydrogel and liquid crystals. *Bull. Electr. Eng. Inform.* 2020, 9, 1718–1725. [CrossRef]
3. Duarte Campos, D.F.; Blaeser, A.; Weber, M.; Jakel, J.; Neuss, S.; Jahnen-Dechent, W.; Fischer, H. Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid. *Biofabrication* 2013, 5, 015003. [CrossRef] [PubMed]
4. Cheng, L.; Yao, B.; Hu, T.; Cui, X.; Shu, X.; Tang, S.; Wang, R.; Wang, Y.; Liu, Y.; Song, W.; et al. Properties of an alginate-gelatin-based bioink and its potential impact on cell migration, proliferation, and differentiation. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 135, 1107–1113. [CrossRef]
5. Distler, T.; Solisito, A.A.; Schneidereit, D.; Friedrich, O.; Detsch, R.; Boccaccini, A.R. 3D printed oxidized alginate-gelatin bioink provides guidance for C2C12 muscle precursor cell orientation and differentiation via shear stress during bioprinting. *Biofabrication* 2020, 12, 045005. [CrossRef]
6. Gao, T.; Gillispie, G.J.; Copus, J.S.; Pr, A.K.; Seol, Y.J.; Atala, A.; Yoo, J.J.; Lee, S.J. Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: A systematic approach. *Biofabrication* 2018, 10, 034106. [CrossRef]
7. Gopinathan, J.; Noh, I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater. Res.* 2018, 22, 11. [CrossRef]
8. Habib, A.; Sathish, V.; Mallik, S.; Khoda, B. 3D Printability of Alginate-Carboxymethyl Cellulose Hydrogel. *Materials* 2018, 11, 454. [CrossRef]