三维打印皮肤组织研究进展

胡锦涛¹, 王玲¹, 石然², 徐铭恩^{1*}

1. 杭州电子科技大学生命信息与仪器工程学院, 杭州 310018;

2. 浙江省医学信息与生物三维打印重点实验室, 杭州 310018

* 联系人, E-mail: xumingen@hdu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-20; 接受日期: 2017-03-14; 网络发表日期: 2017-04-17

国家高技术研究发展计划(批准号: 2015AA020303)和国家自然科学基金(批准号: 81371696, 61675059)资助

摘要 生物三维打印技术可以在计算机控制下, 将多种生物材料和细胞精准定位组装到设计位置形成三维类组织, 是目前制造复杂多层结构皮肤组织最具潜力的新技术. 本文在分析人体皮肤结构和组成基础上, 首先综述了生物三维打印皮肤的结构建模、生物材料和种子细胞等基本流程和关键要素; 然后系统介绍了激光打印皮肤、喷墨打印皮肤、连续挤出打印皮肤和原位打印皮肤的原理和研究现状, 总结了它们的优缺点; 在此基础上, 探讨了三维打印皮肤技术未来的发展方向, 系统归纳了生物三维打印皮肤在临床治疗、药物筛选和基础研究领域的价值.

关键词 生物三维打印, 皮肤, 生物材料, 种子细胞

皮肤是人体最大的器官, 具有重要的物理、化学和生物学屏障功能^[1]. 由创伤、烧伤及不愈合溃疡等导致的全层皮肤缺损在临床上十分常见. 大面积的皮肤缺损创面如不及时治疗, 则会造成患者体液大量丢失、继发严重感染, 严重威胁患者生命^[2]. 治疗全层皮肤缺损的关键是使创面尽早封闭, 以减少机体消耗和内环境紊乱, 以及微生物入侵造成感染等并发症的发生. 常用的治疗措施包括自体皮肤移植^[3]、异体/异种皮肤移植^[4]、细胞活性因子^[5]、细胞治疗^[6]、真皮替代物等^[7,8], 但传统治疗方法在皮肤修复时间、治疗成本、治疗效果等方面依然存在不足^[9].

生物三维打印技术为皮肤缺损的仿生精准修复提供了新技术^[10,11]. 生物三维打印^[12]基于快速成型分层制造原理, 可以通过对细胞、细胞外基质材料等生

命物质单元的准确定位与运输, 体外构建具有特殊三维结构及功能的类组织前体, 为制造复杂结构组织器官提供了新的理论和技术^[13]. 生物三维打印技术可以根据缺损部位的三维重建模型^[14], 将基质材料和多种皮肤细胞精准打印到设计位置, 设计制备的管网结构可实现皮肤的营养自供给和废物代谢运输^[15], 是制备具有多层状复杂结构的皮肤组织的具有潜力的新技术^[16]. 相比于传统皮肤组织工程技术, 生物三维打印技术具有细胞定位精确, 制备结构复杂可控的特点, 可使制造效率大幅提高^[17~19].

本文首先分析人体皮肤的结构和组成, 综述生物三维打印皮肤过程的结构建模、生物材料和种子细胞等基本流程和关键要素; 系统介绍了激光生物打印、喷墨生物打印、连续挤出生物打印和原位生物打印

引用格式: 胡锦涛, 王玲, 石然, 等. 三维打印皮肤组织研究进展. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 423–442

Hu J H, Wang L, Shi R, et al. The state-of-the-art of 3D bio-printing of skin tissues. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 423–442, doi: 10.1360/N052016-00352

等技术打印皮肤的原理和研究现状, 分析它们的优缺点; 在此基础上, 探讨三维打印皮肤技术未来的发展方向, 阐述生物三维打印皮肤在临床治疗、病理研究、药物筛选和化妆品测试领域的价值。

1 人体皮肤结构与组成

人体皮肤平均厚度大约为2.5 mm, 是一种分层结构(图1), 由几种特定种类的细胞按照特定的方式排列组成, 细胞的特殊分布使皮肤具有独特的功能, 细胞外基质作为细胞生存的微环境, 对细胞的基本生命活动具有重要生物学作用。皮肤分层结构中表皮层、真皮层、皮下组织中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分包括: (i) 胶原; (ii) 非胶原糖蛋白, 如纤维连接蛋白和层黏连蛋白; (iii) 氨基聚糖与蛋白聚糖; (iv) 弹性蛋白。表皮层厚度大约为0.2 mm^[20], 包含角质形成细胞和黑色素细胞, 黑色素细胞和角质形成细胞的比例大约为1:20^[21], 角质层由角质形成细胞分化形成, 表皮层ECM主要为纤维连接蛋白^[22,23]、胶原蛋白和层黏连蛋白^[24], 角质形成细胞在胶原蛋白支架上生长, 最后形成有屏障作用的脂质薄片^[25], 纤维连接蛋白与其他蛋白一起合成表皮层网状结构^[25], 角质形成细胞的增殖和分化可促进产生黑色素细胞, 黑色素细胞可合成黑色素蛋白, 用于皮肤着色同时保护皮肤免受紫外线强烈照射^[26], 层黏连蛋白对真皮层及表皮

层的连接有重要作用。真皮层细胞主要为成纤维细胞, 成纤维细胞分泌产生胶原蛋白和弹性蛋白促进伤口愈合^[27,28]; 皮下组织ECM主要为胶原蛋白, 由皮下组织的成纤维细胞合成产生(表1)。

2 生物三维打印皮肤的基本流程与要素

生物三维打印皮肤技术的流程如图2所示: 从患者身上获取皮肤样本, 通过细胞分选富集技术^[31]获取一定量的皮肤角质形成细胞和真皮成纤维细胞, 然后以细胞悬液、水凝胶或水凝胶包裹细胞的形式^[32], 制备出生物墨水打印出皮肤, 打印出的皮肤可以直接移植到创面上, 也可以在浸没环境下培养, 以及后续的气-液界面培养, 获得成熟皮肤, 并用于移植或其他场合(如化妆品安全性测试或者药物渗透性研究)^[33,34]。

2.1 打印皮肤结构建模

生物三维打印的第一步也是关键的一步是待打印的组织进行图像采集和仿生结构建模。对皮肤缺损的修复打印一般通过对缺损部位进行成像采集^[35], 利用三维建模和数字图像处理技术还原皮肤缺损部位的面貌信息, 再将构建的皮肤模型通过自适应分层算法进行分层处理, 最终生成相应的打印命令控制生物三维打印机制造出与缺损部位吻合的皮肤样品^[36,37]。目前临床上常用的组织缺损成像方式如计算层析技

图1 皮肤结构图^[8](网络版彩图)

表 1 皮肤组成和功能^[25,28-30]

层	组成	功能
表皮层	角质形成细胞	防止病原体、热、紫外辐射和水分流失对皮肤环境的破坏
	黑色素细胞	负责皮肤黑色素生成, 防止皮肤暴露于UV环境中
	Merkel细胞	触觉
	纤维连接蛋白	与其他蛋白结合, 使细胞外基质形成网络
	层黏连蛋白	连接真皮层和表皮层
真皮层	朗格汉斯细胞	细胞抗原呈递
	胶原(I, IV, V)	负责皮肤抵抗力和弹性
	成纤维细胞	合成细胞外基质胶原蛋白, 在伤口愈合中起关键作用
	弹性蛋白	赋予组织弹性
皮下组织	肥大细胞	过敏反应、伤口愈合和血管生成
	成纤维细胞	合成细胞外基质胶原蛋白, 在伤口愈合中起关键作用
	脂肪细胞	能量储存
	巨噬细胞	吞噬作用、获得性免疫、伤口愈合

图 2 三维打印皮肤流程图(网络版彩图)

术(computed tomography, CT)、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、超声成像等可通过特定软件, 如Mimics转变为3D模型, 但是对特定部位如手臂

和脸部损伤皮肤进行扫描和识别有一定困难。
外科医生, 对患者受损部位识别是基于2D草图轮廓绘制或使用依照面部美学设定的计算机设备, 之后

与患者讨论并了解患者需求。Oliveira-Santos等人^[38]在此基础上提出基于web的光学成像系统,该系统首先识别患者受伤部位2D数字图片然后进行建模,该过程分为3个步骤:(i) 2D特征和轮廓点检测(来自2D数字图像);(ii) 2D到3D受伤部位重建;(iii) 纹理映射。不同于CT或MRI,该系统的最大优点是它完全基于互联网,不需要进行复杂操作。虽然目前其3D重建不够精确,但它的简单性和易用性使得这种技术比其他方法更加优越,而且有一定经济适用性。Ahmad Fadzil等人^[39]使用非接触式的3D激光扫描装置,首先进行伤口表面图形的采集及预处理工作,通过扫描记录不同角度皮肤伤口表面,滤除噪点得到伤口边界范围,将皮肤伤口分为多部分。该过程的主要作用是获得伤口的关键数据,即伤口顶部面积、真实表面积、深度和体积,之后通过伤口边缘、边界形状及伤口基底曲率进行伤口建模。伤口外部轮廓可由三角网格化得到,内部轮廓由两个共面三角形组成,顶部面积为其投影到XY平面($Z=0$)提取伤口边界而创建的多边形面积。平均深度为伤口体积除以伤口面积来计算,表面真实面积通过对组成网格表面的所有三角形的面积求和而获得。伤口体积和实体构造通过填充表面覆盖的空腔来构造固体,主要采用Delaunay四面体化法(即中点投影和凸壳近似算法)。通过建模软件AutoCAD建立伤口填充模型,3D打印蜡制的溃疡伤口模型,测量伤口参数并与表面扫描量进行比较。该方法对比于三维重建软件,能更好地检测伤口内部愈合情况。该方法不仅适用于溃疡伤口而且也适用于烧伤,可帮助临床医生为损伤部位获得定制的皮肤移植物。基于web的光学成

像建模和3D激光扫描建模法具有非接触^[40]、快速测量^[41]等优点,经过清创手术以后,可以直接进行皮肤组织缺损扫描成像^[42],但这类技术只能获得皮肤表面的三维结构特征。皮肤内部结构特征尤其待修复对象个性化的内部微观特征对于缺损部位的内部管网重建及功能修复至关重要^[43],光学相干层析成像(optical coherence tomography, OCT)^[44]技术有望解决皮肤三维微观结构的采集与建模^[45,46]。对于测试用皮肤模型的构建一般基于各部位人体皮肤的结构特征,结合生物三维打印机的分层算法和成型精度进行简化的皮肤结构建模^[47]。

2.2 打印用基质生物材料

适于皮肤打印的生物材料应该满足3个基本条件:(i) 具备可打印性;(ii) 促进细胞黏附和增殖;(iii) 符合皮肤组织原有机械性能(支架具体性质要求及作用如表2所示)^[48]。现有皮肤打印大部分将I型胶原作为支架材料,因为天然高分子材料胶原与正常皮肤有相似的生理性能和较低的抗原性,手动沉积胶原亦可观察到类似于正常皮肤的收缩状况,而且可以维持一定的三维空间结构。但是使用单一的胶原还有一定的局限性^[49],如打印成型效果差,本身力学性能较低,在体内外力学环境中难以保持打印好的三维多孔结构,使组织、细胞及血管的长入受到一定限制^[50]。因此,如何在维系胶原类生物材料良好生物相容性和较低抗原性基础上改善其力学性能,从而维持皮肤打印整体结构的稳定性具有重要的现实意义和研究价值^[51-55]。

表2 皮肤支架材料性质要求及作用^[48]

性能要求		作用
细胞相容性	利于细胞的黏附、生长、增殖、分化	使细胞与正常皮肤细胞一样具有增殖能力
生物相容性	不会引起机体免疫排斥反应	植入人体后,可与周围组织正常融合,不会产生炎症反应
力学性能	具有一定机械强度和柔韧性	便于临床操作,移植到人体后不会因细胞聚集生长引起大幅度变形
微孔结构	具有内部连通微孔结构,孔径大于50 μm	促进细胞向支架内部生长,氧气、营养物质的输送和代谢产物的排出,促进生成微型血管
降解性	可降解,降解产物无毒,降解速度适宜	打印皮肤组织可被周围组织替代,不会坏死
形态性	接近人体皮肤基质真实结构,可重塑任何形状	与人体细胞外基质形态保持一致
安全性	无刺激性、无致敏性、无致癌性	移植到人体后,不会造成二次伤害

天然高分子材料的生物相容性、可降解性及与皮肤相似的细胞外基质是组织工程材料的首选,但是其机械性能差使得皮肤不易携带,而合成高分子材料有良好的机械性能,但是不具有细胞外基质的生物特性.因此,目前研究人员使用复合聚合物(各种生物材料合成物及对构建皮肤的作用如表3所示),使皮肤具有良好的生物相容性、较好的机械强度和足够的孔隙率,有助于氧气、营养物质的运输及代谢产物的排出.

2.3 皮肤种子细胞

人体皮肤的组成细胞有成纤维细胞、黑色素细胞和角质形成细胞等,人体皮肤生物三维打印需使用大量的可扩增细胞,其种子细胞来源分为3类: (i) 来自于人体组织的原代细胞; (ii) 人体干细胞; (iii) 异种细胞. 自体来源细胞可消除移植体的排斥[70,71]. 异体/异种皮片有产生免疫排斥反应、传播疾病、复发率高并需再次植皮的缺点,目前用于人体皮肤三维打印修复的研究较少. 干细胞是具有自我更新和分化能力的细胞,皮肤打印用干细胞有表皮干细胞(包括滤泡干细胞和核球干细胞)、真皮干细胞、脂肪干细胞、黑色素干细胞、间充质干细胞等,因其来源广,是皮肤生物三维打印种子细胞的重要来源[72],可以解决现有技术无法解决的问题,如缺少血管、感觉感受器、皮肤附属器官等,但使用干细胞也存在一定的局限性,如干细胞分化的不定向性[73],打印的组织未来将面临恶性畸形瘤的形成和长期的相反作用[72,74,75]. 人体原代细胞通常取自人体包皮组织,年龄越低提取细胞活性越高,原代细胞一般包括角质形成细胞、成纤维细胞和黑色素细胞. 角质形成细胞是表皮层的主要组成细

胞,使用角质形成细胞有很多优点: 如可在实验室培养并增殖,多次传代. 但是使用角质形成细胞也有很多缺点: 如培养时间长,形成致密角质层覆盖伤口时间更长; 另一个问题是瘢痕的形成,瘢痕形成的存在和程度与愈合时间成正比,当使用角质形成细胞时愈合时间明显更长. 成纤维细胞存在于皮肤真皮层中,并多存在于皮肤真皮替代物中,成纤维细胞对角质形成细胞有旁泌作用,使形成的角质层更均匀,已有研究表明,双层皮肤替代物对比于单层皮肤替代物,更接近人体真实皮肤[76]. 尽管表皮角质形成细胞和真皮成纤维细胞复合优于单独使用,但是需要存在许多其他细胞和附属物,以使其本身完全发挥功能.

3 现有三维打印皮肤的方法

目前皮肤三维打印技术主要包括如图3所示的3种打印方式: (i) 激光生物打印[77,78],是将高能量激光脉冲照射到薄板上,薄板涂层上特殊材料气化形成巨大的压力推动喷头内的生物材料和活性细胞到具有交联剂的底板成型. (ii) 喷墨生物打印[79],将生物材料和细胞以液滴形式由程序控制从喷头喷出的非接触式打印技术. (iii) 挤出沉积型打印[80],计算机控制喷嘴将温敏性材料逐层打出支架的大孔(100~500 μm),微孔(10 μm)通过在溶剂中材料冷冻干燥升华而成. (iv) 原位皮肤打印,将简易移动的三维打印系统移动到患者损坏皮肤上方,将生物墨水直接打印到伤口上.

3.1 基于激光的皮肤打印技术

基于激光的皮肤打印系统由德国Obata等人[81]开

表 3 皮肤组织工程支架材料

生物材料	作用	参考文献
胶原	减少伤口收缩, 促进细胞增殖	[56,57]
明胶	有助于皮肤分层, 与 I 型胶原混合后可用于伤口敷料, 与京尼平交联促进细胞增殖	[58,59]
胶原/丝素蛋白	促进细胞增殖, 增强支架机械性能	[60]
纤维蛋白原	适用于伤口修复或止血, 良好的机械性能, 适合作为伤口敷料	[61,62]
壳聚糖/胶原	促进角质形成细胞迁移和伤口部位的上皮化, 是伤口愈合的重要前提	[63,64]
PCL/胶原	二者合成物促进成纤维细胞的附着和增殖, 适用于真皮替代物	[65,66]
PLGA/胶原	PLGA/胶原纳米纤维膜在人成纤维细胞中的反应中具有功能活性, 作为促进剂在早期伤口愈合中有重要作用	[67,68]
PLGA/明胶	修饰后混合支架比单独支架更适合成纤维细胞的附着和生长	[69]

发,主要由激光光源、两个共平面的载玻片和基底层组成.上层载玻片平面底部有一层光吸收层(60 nm金色层),下层是用来打印的材料层(包含种植在胶原凝胶上的细胞或者血浆和海藻酸的混合物)^[82].脉冲激光束透过玻璃层聚焦到吸收层,吸收层吸收大部分热量后汽化,汽化产生巨大的压力迫使低层的细胞和材料混合物向下移动到吸收层.

德国汉诺威医学院的Koch等人^[83]采用鼠尾来源

I型胶原溶液作为细胞外基质,小鼠NIH-3T3成纤维细胞作为真皮层组成细胞、人HaCaT(永生)角质形成细胞代表表皮层组成细胞,逐层打印20层真皮层和20层表皮层,打印后的组织培养2天后,活细胞密集分布而且分层明显,液面下培养10天后,支架结构支撑性完好,钙黏蛋白黏附在角质形成细胞间,采用刮载法证明细胞间具有功能性间隙连接(图4E).该实验首次分析了细胞-细胞和细胞-细胞外基质间附着和黏附连接,

图3 三维打印皮肤技术

图4 激光体外打印多层皮肤^[83]

A: 激光打印机原理图; B: 打印皮肤结构(红色代表角质形成细胞,绿色代表成纤维细胞)。标尺: 500 μm ; C: 染色皮肤,红色为成纤维细胞层,绿色为角质形成细胞层。标尺: 50 μm ; D和E: 皮肤组织间隙连接情况。标尺: 50 μm

结果表明打印后结构连接紧密, 打印组织3D结构保持完整, 但实验仅用成纤维细胞和胶原, 无法完全模拟皮肤细胞和细胞外基质的复杂性, 后期研究中应该加入其他的皮肤细胞和基质材料。

汉诺威医学院同一团队的Michael等人^[84]采用相同的打印设备打印同样结构的皮肤组织进行大鼠(*Rattus norvegicus*)背部皮肤移植实验。实验逐层打印包裹着小鼠NIH3T3成纤维细胞的20层胶原和包裹着人HaCaT的角质形成细胞的20层I型胶原到Matriderm™(2.3 cm×2.3 cm)上, 打印后组织液面下培养1天后, 移植到BALB/c-Nude鼠用金属小室固定的没有伤到浅层神经的皮肤上(图5A), 本实验对照组为正常条件下培养的皮肤组织, 打印组织移植到BALB/c-Nude鼠背部皮肤缺损部位11天后, 免疫组化和高倍摄像检测结果表明打印组织与周围皮肤衔接完整, 周围皮肤生长到打印组织真皮层上, BALB/c-Nude鼠背部皮肤缺损没有炎症/坏死和收缩问题, H&E染色和免疫组化分析结果表明, 打印的角质形成细胞形成初始分化的表皮层, 可观察到E-钙黏蛋白的形成, 真皮层成纤维细胞分泌胶原, 胶原纤维生长后呈细条

状, 且可生长进底层基质层, 呈现顶层密度高低层密度低的形态, 符合人体皮肤结构学设计。此外, 打印的皮肤真皮层观测到IV型胶原蛋白表达, 表明打印皮肤可形成微型血管, 向未来形成网格化血管迈进了一大步。该团队^[81,84,85]打印的皮肤仅在动物体内实验了11天, 小鼠(*Mus musculus*)由于背部实验金属小室重量导致机体能力下降, 没能继续研究移植打印皮肤的后期生理特性, 而且皮肤缺损模型面积较小(2 cm×2 cm~2 cm×3 cm), 不能确定是由于啮齿动物伤口本身的收缩愈合还是移植打印皮肤产生的愈合修复, 人类伤口不具备收缩愈合能力。

基于激光的皮肤三维打印系统无喷嘴、无针管, 可有效地解决打印过程中喷嘴易堵塞问题, 打印系统分辨率高($\leq 100\ \mu\text{m}$), 可节约生物墨水, 打印细胞密度高($1 \times 10^8\ \text{cells/mL}$), 打印后细胞活性保持良好($>90\%$); 但是这种方法激光照射过程能量吸收层会产生细胞毒性材料, 打印过程无法保证高的流通率, 细胞和胶原在滴到基底的时候不能够以特定的密度混合, 所以并不能够实现精准、定制化的修复, 且基于这种方法的设备构造复杂, 造价昂贵, 性能稳定性较差。

图5 激光打印皮肤体内动物实验^[84]

A: 动物体内实验原理图; B: 体内实验皮肤在小鼠背部生长情况; C: 三色法观察打印皮肤与周围正常皮肤长合情况; D: H&E微型血管生成(箭头所指地方即微型血管生长位置); E: 打印皮肤和小鼠背部皮肤连接生长情况。pf: 打印皮肤表皮层; ne: 正常皮肤; m: matriderm; n: 正常皮肤

3.2 基于微型阀的皮肤打印技术

微型阀打印系统广义上是指喷墨细胞打印, 是一种通过数字信息控制小液滴从喷头喷出的非接触式打印技术, 小液滴通过热、电、磁及压力等信号控制其喷射方向, 并经由温度、频率和液体黏度控制液滴喷出体积^[86,87].

哈佛医学院Lee等人^[88,89]首次研发出基于微型阀的皮肤打印系统, 该系统包括4个微型阀组成的喷头和一个三维机械臂, 细胞和材料放置灭菌的塑料注射器中, 通过气动装置控制分配阀按一定的速度将细胞和材料打印在用户自定义位置, 竖直方向的机械臂控制底层平台的上升, 竖直方向固态热电装置控制打印温度; 系统装有3个高速摄像机, 1个用于喷射液滴大小测量, 2个用于观测系统机械臂移动速度和打印结构, 系统整体放置于层流罩中. 该团队将成人真皮成纤维细胞和表皮角质形成细胞以及 I 型胶原混合作为皮肤打印用的生物墨水, 成纤维细胞和角质细胞分布位于第2和8层(图6B), 该团队首次引入新的交联技术, 每打印一层将雾化的交联剂涂覆在表面, 打印后组织利用角质形成细胞培养基培养在37℃, 5% CO₂环境中, 7天后将表皮层暴露于空气中, 真皮层浸没于液

面下, 进行气-液面培养, 以促进表皮层成熟分层. 该研究代替将打印后组织浸泡于交联溶剂的方法, 使得在非平面表面打印基质材料成为可能, 在3D非平面聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)上打印组织证实了可行性, 可为后期在体皮肤打印甚至是非平面不规则缺损部位原位皮肤打印提供重要支撑, 但是该系统可打印的组织厚度有限, 打印系统分辨率为700~1000 μm, 使得皮肤打印厚度高于正常皮肤组织厚度. 此外, Lee等人^[89]发现, 在成纤维细胞和角质形成细胞间打印6层胶原不利于两种细胞间的相互作用, 使得成纤维细胞对角质形成细胞的旁泌作用降低, 导致后期角质层细胞分布不均匀, 其后期通过如图4C所示的方法, 在在6层胶原层间引入流体通道, 加强细胞间通信, 此流体通道也可以用于形成血管.

伦斯勒理工学院的Lee团队^[90,91]采用相似的打印设备, 与之前的4个喷头不同, 该打印系统由8个微型阀组成独立控制喷头, 8个喷头可将细胞、ECM、支架材料(如胶原)和生长因子放置于用户定义的位置. 每个机械臂由独立的机械阀门控制, 而且安装在三维控制平台上, 该打印系统精度提高到每滴液滴体积15 nL. 该研究用成纤维细胞(HFF-1)、角质形成细胞(HaCaT)和 I 型胶原按图7A和B所示方法打印皮肤组织, 两层

图6 微型阀皮肤打印技术^[88]

A: 微型阀打印系统装置图; B: 打印皮肤结构示意图; C: 侧向通道结构示意图; D~F: 打印后皮肤分层结构

图7 微型阀多层皮肤打印技术^[90](网络版彩图)

A: 打印皮肤结构示意图; B: 打印皮肤分层结构和顶部俯视图; C: 打印皮肤第0和7天形状对比; D: 打印组织液面下培养7天后共聚焦显微镜图; E: 皮肤组织培养14天后荧光免疫检测结果; F: 打印组织厚度变化

胶原后打印一层成纤维细胞(代替人体真皮层), 6层胶原上打印两层角质形成细胞(代替人体表皮层), 优化了打印层厚、层数、可打印细胞密度等参数以更好地模拟人体皮肤组织. 打印的三维结构浸入液体介质培养7天, 表皮层暴露于气液界面, 以促进成熟与分层. 组织学和免疫荧光表征表明, 4~7天内角质形成细胞快速增殖并铺满胶原层, 打印的皮肤组织呈现出人体皮肤组织的类似形态和生物学特征. 打印皮肤组织形态和形状完好, 无手动沉积方法呈现出的皮肤卷曲问题, 且真皮层和表皮层间无细胞侵袭. 但是该打印系统只能打印低黏度的水凝胶, 为了不堵塞喷头最高细胞浓度为 1×10^6 cells/mL, 可进一步优化制造包含附属器官的更复杂的皮肤结构模型, 也可用于优化伤口移植设计, 以及作为经皮药物开发所用工具, 减少对动物模型的依赖.

3.3 基于连续挤出皮肤打印技术

韩国朝鲜大学Ahn团队^[92]采用连续挤出三维打印系统构建皮肤组织. 该打印系统由三维机械臂、喷头和冷冻的打印平台组成, 流动氮气去除平台湿度, 循环硅油冷却平台, 优化设置皮肤结构孔径, 利用低温胶原可冻结成型特性, 在平台温度为 -40°C 、环境温度为 10°C 的环境下采用图8B所示方式进行打印, 打印后胶原支架放入冷冻干燥器(条件: -76°C , 3天), 冷冻支架中的溶剂发生升华反应, 得到具有微孔结构的支架, 使用前浸没在EDC(1-ethyl-(3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)溶液中交联24 h, 提取来自废弃手术皮片的角质形成细胞和成纤维细胞, 进行增殖后接种到胶原支架上, 用于皮肤组织的培养. 进行14天培养后, 发现在孔大小为 $160\ \mu\text{m}$ 时, 角质形成细胞/成纤维细胞共培养后的组织紧密性增强, 细胞密布填

图8 连续挤出打印胶原皮肤支架结构^[92](网络版彩图)

A: 支架结构设置($20 \times 20 \times 1.5 \text{ mm}^3$); B: 连续挤出打印系统工作原理图; C: 打印完成后的支架结构; D: 冻干后支架结构(顶部及侧向视图); E: 交联后支架内部结构

充支架空隙,形成类似人体正常皮肤的致密结构.该研究首次进行支架间细胞的增殖研究,探索到适合人体皮肤生长支架尺寸,支架内部微结构有利于细胞的增殖和代谢产物的排出,增强细胞间旁泌作用,但是由于本研究胶原多孔性和机械性能差,所以后期结构热稳定性差,不利于皮肤移植.

为了解决胶原机械性能差的特点,该实验室团队^[93]使用相同的连续挤出打印系统,但是与之前单独打印胶原支架不同,该装置使用同轴喷头共挤出打印胶原-海藻酸混合物,海藻酸的生物降解性和生物相容性使混合物有更好的机械性能和生物活性,同时海藻酸可分泌黏多糖,是ECM的主要成分,促进皮肤组织生长.同轴喷嘴外层装载胶原,内层装载海藻酸,外层直径为 $500 \mu\text{m}$,内层为 $175 \mu\text{m}$,打印后混合支架先用EDC进行交联(胶原交联),后用 CaCl_2 交联(海藻酸

交联),交联后支架放入冷冻干燥设备(图9A).提取来自人体包皮组织的角质形成细胞和成纤维细胞接种到打印后的支架上,采用两种细胞共培养的方式,打印的三维结构先在液体介质中进行培养,之后将表皮层暴露于液面上,进行气-液面培养,将全身麻醉的成年雄性小鼠背部移去一块皮肤,将直径为 6 mm 的一块打印后组织放置在伤口处,同时加入凝血酶促进长合.体外实验表明,胶原支架和胶原-海藻酸支架在结构上非常稳定,细胞在胶原丝间迁移并增殖,直到最后填满空的间隙,形成类似于人体皮肤的致密结构.体内实验在大鼠背部发现形成可让伤口永久闭合的肉芽组织,也形成完全覆盖受伤部位的表皮层,微型血管也同时生成,该研究制作形成皮肤因含有多种生物材料,更接近人体细胞外基质,低温沉积打印在成形过程中可以很好地保持材料的生物学性能,制备的组织工程

图9 连续挤出打印胶原-水凝胶皮肤支架结构^[93](网络版彩图)

A: 同轴喷嘴打印胶原-海藻酸支架结构; B: 胶原支架和胶原-海藻酸支架植入细胞后H&E染色对比图; C: 体内动物实验示意图及微血管生成示意图

支架孔隙率较高, 大孔结构可控制, 微孔结构也比较均匀而且可相互贯通, 这种结构有利于细胞黏附和增殖, 而且可避免加热对材料造成伤害, 具有传统支架无可比拟的优势. 但是打印支架结构代表的表皮层和真皮层材料厚度及浓度没有区别, 整个过程发生在低温环境中, 操作不便^[93].

中国人民解放军总医院附属第一医院皮肤损伤修复再生北京市重点实验室黄沙团队^[94]采用三维打印设备为Regenovo 3D Bio-printer(Bio-Architect®, 杭州捷诺飞生物技术有限公司), 该设备平台温度可控, 是一种快速成型设备, 可用于打印由多种细胞和材料混合物组成的含有复杂结构的组织. 该研究打印材料为真皮匀浆(分别来自于小鼠足部真皮和背部真皮)、悬浮细胞、明胶-海藻酸钠和各种生长因子, 真皮匀浆和悬浮细胞加入比例为4:1, 明胶和海藻酸钠比例为2:1, 将真皮匀浆和悬浮细胞加入到明胶-海藻酸钠溶液中, 打印结构为方形, 打印平台温度为10℃. 低温打印皮肤混合物后用10% CaCl_2 交联1 min, 打印后结构如图10A所示. 打印后组织24 h后荧光染色发现细胞活性较高. 构建小鼠足底烧伤模型发现, 14天后皮肤

图10 连续挤出技术构建具有汗腺的皮肤结构实验^[94](网络版彩图)

A: 打印皮肤结构; B: 打印24 h后细胞荧光染色; C: 体内动物实验修复结果

长合完好, 说明构建的三维细胞外基质为其他组织再生提供了很广泛的研究思路.

本研究使用杭州捷诺飞生物技术有限公司研发制造的生物3D打印系统(Regenovo 3D Bio-printer(Bio-Architect[®])), 结合人体正常皮肤的结构分析, 利用来自人体皮肤种子细胞和ECM材料, 体外构建的三维皮肤模型。角质形成细胞和成纤维细胞取自手术废弃皮片, 细胞外基质材料为 I 型胶原、明胶和海藻酸钠, 打印后结构如图11B所示, 本研究在低层混合打印海藻酸钠、明胶和成纤维细胞混合物, 模拟人体真皮层, 高层混合打印 I 型胶原和角质形成细胞, 模拟人体表皮层, 海藻酸钠和明胶不仅可以维持成纤维细胞的生长, 而且孔状结构有利于成纤维细胞生长、增殖过程中代谢产物的运送以及营养物质的输入, 同时设计的孔状结构有助于维持上层角质形成细胞的生长, 底部均匀的材料-细胞混合打印后会分泌生长因子, 促进顶部角质形成细胞的生长。打印组织液面下培养7天, 气-液面培养7天后, 荧光染色结果和H&E染色结果可观察到打印的皮肤组织出现明显的分层结构, 有分化的表皮层形成, 这说明三维打印皮肤组织的分层结构已经完善, 成熟的表皮层可以用于后期化妆品的测试工作。生物3D打印对比于二维的组织工程皮肤培养皮肤, 低层成纤维细胞的均匀放置可保证后期角质形成细胞分化形成均匀的表皮层, 在化妆品的测试过程中, 避免了由于细胞放置的不均匀呈现结果的差异性, 底层真皮层细胞-材料混合打印可以利用三维生物打印设备控制厚度和结构, 后期在临床医学中可根据伤口

的深度和形态进行相应的调整。

3.4 基于原位的皮肤打印技术

来自维克森林大学的Binder^[95]研发了一种原位皮肤打印系统, 该系统工作原理如图12所示。该系统制作标准: (i) 可移植性, 该系统必须能够快速运送到具有广泛烧伤的患者身边; (ii) 必须适应各种类型的身体条件; (iii) 能够根据不同患者的需要具体定制细胞及治疗方案; (iv) 容易灭菌; (v) 价格低易于维护。前两个标准可在移动轻型框架安装XYZ绘图系统实现, 此外, 打印系统需要足够小能够方便地通过大多数门框, 也需要打印范围足够大可覆盖患者整体躯干。在治疗期间, 系统定位在患者缺损部位上方并锁定在最佳位置, 精确到100 μm 的自主驱动Bioplottter系统有助于细胞悬浮液精确输送到患者身体上。Z轴的运动可以独立控制, 从而允许输送系统跟踪患者身体的速度, 从而适应许多不同的身体类型。基于激光的伤口扫描系统与基于墨盒的输送系统关联, 有助于根据个体患者的缺损定制治疗方案。激光扫描系统收集关于伤口的长度、宽度和深度数据; 收集的数据被处理以获得功能性伤口图, 系统软件基于伤口图用以确定不同皮肤区域的精确细胞组成和厚度分布。该研究在动物的胸背的胸膜层切开4个全厚度10 cm $\times$ 10 cm的伤口, 整个原位皮肤打印程序分为两个阶段, 第一阶段, 废弃皮片中分离成纤维细胞和角质形成细胞, 细胞增殖后与

图 11 基于3D Bio-printer(Bio-Architect[®])设备构建皮肤结构及结果示意图

A: 3D Bio-printer(Bio-Architect[®])设备; B: 打印后皮肤示意图; C: 浸没培养7天后皮肤表皮层荧光染色图; D: 气-液面培养7天后皮肤分层结构图; E: H&E染色图

图 12 原位皮肤打印系统^[96](网络版彩图)

A: 原位打印系统材料运输装置图; B: 打印过程皮肤原位扫描工作原理图; C: 打印系统软件工作流程图; D: 原位打印8周后细胞活性对比图

生物聚合物即纤维蛋白和 I 型胶原混合以制备生物墨水, 并进行打印喷头、墨盒、料筒的全面消毒; 第二阶段, 将待修复动物伤口区域置于便携式生物打印机下方, 将生物墨水直接打印到伤口上, 打印后静置 15 min 使材料重复融合。在打印过程中, 打印机的任何部分在任何时候都不与动物直接接触。结果表明, 原位打印8周后可见到完全分化的表皮, 角质形成细胞完全增殖并覆盖伤口, 真皮生长到伤口边缘。荧光标记的自体成纤维细胞和角质形成细胞以及同种异体成纤维细胞第8周时在伤口部位可见, 表明生物打印的皮肤细胞可以在大面积的伤口模型中存活, 增殖和形成皮肤组织。但该系统所用激光成像系统不能探测体内标记物, 且容易受到患者的呼吸运动影响产生运动伪影, 后期需要进一步改进^[96]。

3.5 现有三维打印皮肤技术总结

现有三维打印皮肤技术总结如表4所示。

4 三维打印皮肤技术的发展与应用方向

三维打印提供了一种高效的、自动化的打印分层结构皮肤的方法^[97]。生物三维打印可以控制打印皮肤的层数、细胞密度并精准地放置细胞和材料, 建立细胞间连接, 促进打印组织内细胞间旁分泌效应和细胞间的相互作用, 而且打印本身不影响细胞的生物学行为, 这些重要的特性构成体外构建组织工程皮肤至关重要的形态学和生理学特性。目前在生物打印领域, 3D打印皮肤可基于人体三维成像数据构建适合伤口的组织, 与其他复杂的组织或器官相比打印难度较低。当前的研究显示, 打印皮肤组织在成熟后可形成类似于人体正常皮肤组织。皮肤生物打印的进步促进自体皮肤移植业的蓬勃发展, 可根据患者伤口部位皮肤损坏情况实现按需定制打印皮肤。但目前三维打印皮肤还有一些地方需要改进, 如皮肤着色、血管网络、毛囊、老化皮肤等方面的研究^[97]。

表 4 不同皮肤打印技术的主要参数^[84,90,93,94]

主要参数	激光生物打印	喷墨生物打印	挤出沉积生物打印	原位生物打印
打印模式	以线为单位	以点为单位	以点为单位	以线为单位
打印组织大小	10 mm×10 mm×2 mm	9.6 mm×9.6 mm	10 mm×10 mm×2 mm	10 cm×10 cm
打印细胞密度	1×10 ⁸ cells/mL	1×10 ⁶ cells/mL	1×10 ⁶ cells/mL	—
打印材料	胶原	胶原	胶原+海藻酸	胶原
打印分辨率	≤100 μm	300 μm	>300 μm	—
打印速度	>10 mm/s	<3 mm/s	7 mm/s	—
打印压强(kPa)	无	6	151±5	—
同时打印多种材料	不可以	可以	可以	可以
打印支架空隙大小	不均匀	不均匀	150–200 μm	—
喷头大小	100 μm	可达到毫米	300 μm	—
细胞存活率	>90%	>86%	>95%	—
体外动物模型	大鼠背部	—	大鼠背部	猪(<i>Sus scrofa domestica</i>)伤口
支架交联试剂	NaOH	NaHCO ₃ 溶液	EDC溶液	—
支架弹性	低	低	低-中	中
参考文献	[83–85]	[86–91]	[92–94]	[95,96]

4.1 皮肤附属功能重建

皮肤散热占人体总散热量的90%,皮肤散热系统中起关键作用的是汗腺,位于真皮层下层,具有分泌汗液、排泄废物、调节体温的作用.三维打印皮肤需要构建基底层表皮层间相互连通的管道来均匀地排泄废物实现皮肤的汗腺功能.目前已有研究通过加入上皮细胞生长因子到真皮匀浆-悬浮细胞(4:1)和明胶-海藻酸钠(20%明胶:4%海藻酸=2:1)混合物,并利用3D生物打印构建的微环境来促进汗腺的再生^[92].

毛囊存在于皮肤毛发生长部位,毛囊向下伸入真皮约有1 cm深度,毛囊与相通连的皮脂腺导管将人体产生的分泌物运送到皮肤表面排出.目前尚未有成功诱导产生人类新生毛囊的研究,原因是缺少具有真皮感应性能的毛乳头细胞.为了更真实地模拟皮肤生理功能,应该在真皮乳头层和表皮层中加入毛乳头细胞,三维打印立体空间结构可以部分恢复毛发诱导性能,最终实现毛发再生^[98].

皮肤颜色是由黑素细胞合成黑素形成,存在于表皮基底层,可吸收紫外线,使机体免遭紫外线的损害^[99].皮肤颜色的深浅是由黑素细胞合成黑素数量来决定的,而皮肤白则是东方女性最为崇高的美的标

准之一.黑色素是一种蛋白质衍生物,呈褐色或黑色,是由黑素细胞产生的,可见色素最早是在角质形成细胞中发现的,人体皮肤色素沉着是由黑色素从黑素细胞转换到周围的角质形成的^[100].人正常皮肤表皮层黑素细胞和包围的角质形成细胞的比例大约为1:20,色素沉着的皮肤中黑色素细胞的最小密度是1.0×10⁴细胞/cm²,角质形成细胞生长因子可共培养角质形成细胞和黑素细胞并增强二者分化、迁移和增殖能力,所以混合打印角质形成细胞和黑素细胞对于黑色素合成和增殖是非常重要的^[101,102].

4.2 血管化组织工程皮肤

血管承担了皮肤中各类细胞和功能组织结构的营养供给与废物排出,血管也是皮肤实现汗腺分泌、皮脂分泌和再生的重要基础^[103].在三维打印皮肤过程中重建类血管网络并实现与机体血管网的连通,是3D打印皮肤未来需要解决的问题^[104].

三维打印皮肤组织的血管应在打印后4天内生成,以确保植入的皮肤能更好地与周围组织融合^[105].研究证明,可以通过在3D打印过程中使用牺牲材料明胶和同轴喷头实现构建空的血管通道,然后在空的通道

内加入血管内皮细胞, 结果表明有助于构建网格化血管^[89]. 证明, 生物材料的使用如丝素蛋白和透明质酸也可以加强血管化^[106,107]. 总的来说打印通道只是提供初始的血管网络, 依托细胞的培养才能生成血管. 基于细胞并以生物材料和微加工为主的组合方式可减轻血管延迟生成的问题^[108].

4.3 3D打印皮肤的应用

生物三维打印技术构建的人体皮肤具有重要的临床应用和科学价值: (i) 为大面积皮肤损伤和慢性皮肤溃疡患者提供新的修复技术; (ii) 作为药品检测模型实现对药物的高通量筛选, 解决目前体外筛选技术难、动物实验准确性不足、实验成本高的难题^[109]; (iii) 作为化妆品或化学品体外检测模型提供与人体皮肤高度类似的测试样本, 减少实验动物使用量^[110,111], 目前欧盟已经严禁将动物用于化妆品测试; (iv) 用于研究皮肤病因以及皮肤疾病进展和治疗的病理机制^[112].

以皮肤衰老的研究为例, 随着年龄的增长, 真皮层胶原纤维的酶化分裂使皮肤的弹性降低, 从而降低了成纤维细胞对周围细胞外基质的黏附, 老化皮肤成纤维细胞胞浆塌陷、细胞核形状为圆形, 年轻肌肤的细胞核呈纺锤形^[113]. 塌陷形态的成纤维细胞促进基

质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)作用: 胶原退化)增加进而抑制 I 型胶原蛋白的产生. 三维打印不同浓度的真皮层基质对细胞学形态影响可用于研究人体皮肤老化机制^[114,115], 也可用于化妆品抗皮肤衰老测试.

5 总结与展望

人工皮肤是最早应用于临床的组织工程产品, 因此皮肤三维打印技术相比于其他器官打印积累了更多经验. 三维生物打印可控制细胞和材料沉积时的空间结构, 增强细胞-细胞和细胞-基质间相互作用. 目前皮肤生物打印研究主要采用基于微型阀、激光和连续挤出的打印方式. 利用先进的三维打印设备已经可以制造出在结构和功能上更接近于人体真实皮肤的组织工程皮肤, 与传统的沉积方法相比, 三维打印构建的组织工程皮肤可以实现细胞和材料的精准定位, 这对未来皮肤打印的几个关键性研究如构建色素和皮肤老化模型、脉管系统和毛囊等方面体现出巨大的潜力. 随着人工智能和材料科学的不断进步、分子和细胞生物学的发展以及多种技术的综合运用和探索, 利用生物3D皮肤打印技术制备出具有理想人体仿生效果的皮肤组织将成为现实.

参考文献

- Groeber F, Holeiter M, Hampel M, et al. Skin tissue engineering—*In vivo* and *in vitro* applications. *Adv Drug Deliver Rev*, 2011, 63: 352–366
- Vaezi M, Yang S. Extrusion-based additive manufacturing of PEEK for biomedical applications. *Virtual Phys Prototyping*, 2015, 10: 123–135
- Ali J M, Catarino P, Dunning J, et al. Could sentinel skin transplants have some utility in solid organ transplantation? *Transplant Proc*, 2016, 48: 2565–2570
- Zuo H, Song G, Shi W, et al. Observation of viable alloskin vs xenoskin grafted onto subcutaneous tissue wounds after tangential excision in massive burns. *Burn Trauma*, 2016, 4: 23–28
- Demidova-Rice T N, Hamblin M R, Herman I M. Acute and impaired wound healing. *Adv Skin Wound Care*, 2012, 25: 349–370
- Shi C, Zhu Y, Su Y, et al. Stem cells and their applications in skin-cell therapy. *Trends Biotech*, 2006, 24: 48–52
- Lamme E N, van Leeuwen R T J, Jonker A, et al. Living skin substitutes: survival and function of fibroblasts seeded in a dermal substitute in experimental wounds. *J Invest Dermatol*, 1998, 111: 989–995
- Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration. *Nature*, 2008, 453: 314–321
- Diagone K V, Feliciano M A R, Pacheco M R, et al. Histology and morphometry of the testes of adult domestic cats (*Felis catus*). *J Feline Med Surgery*, 2012, 14: 124–130
- Tseng H, Gage J A, Haisler W L, et al. A high-throughput *in vitro* ring assay for vasoactivity using magnetic 3D bioprinting. *Sci Rep*, 2016, 6: 30640
- Fuh J Y H, Sun J, Li E Q, et al. Micro- and Bio-Rapid Prototyping Using Drop-On-Demand 3D Printing. Berlin: Springer, 2015, 3: 12–17
- Murphy S V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 773–785
- Tan Y J, Tan X, Yeong W Y, et al. Hybrid micro scaffold-based 3D bioprinting of multi-cellular constructs with high compressive strength: a new

- biofabrication strategy. [Sci Rep](#), 2016, 6: 39140
- 14 Zhang T, Yin F, Zhou T, et al. Multivariate time series analysis on the dynamic relationship between Class B notifiable diseases and gross domestic product (GDP) in China. [Sci Rep](#), 2016, 6: 29–37
- 15 Cubo N, Garcia M, Del Cañizo J F, et al. 3D bioprinting of functional human skin: production and *in vivo* analysis. [Biofabrication](#), 2017, 9: 015006
- 16 Lee V K, Lanzi A M, Haygan N, et al. Generation of multi-scale vascular network system within 3D hydrogel using 3D bio-printing technology. [Cel Mol Bioeng](#), 2014, 7: 460–472
- 17 Ng W L, Wang S, Yeong W Y, et al. Skin bioprinting: impending reality or fantasy? [Trends Biotech](#), 2016, 34: 689–699
- 18 Velasquillo C, Galue E A, Rodriguez L, et al. Skin 3D bioprinting. Applications in cosmetology. [J Cosmet Dermatol Sci Appl](#), 2013, 03: 85–89
- 19 周长春, 王科峰, 谢鹏飞, 等. 生物三维打印技术的研究现状及发展趋势. [科技与企业](#), 2014, 13: 381–382
- 20 Schröder J M. The role of keratinocytes in defense against infection. [Curr Opin Infect Dis](#), 2010, 23: 106–110
- 21 Zare S, Zarei M A, Ghadimi T, et al. Isolation, cultivation and transfection of human keratinocytes. [Cell Biol Int](#), 2014, 38: 444–451
- 22 MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. [Nature](#), 2007, 445: 874–880
- 23 Qian D J, Guo X K, Duan H C, et al. An application of embryonic skin cells to repair diabetic skin wound: a wound reparation trail. [Exp Biol Med](#), 2014, 239: 1630–1637
- 24 Méhul B, Bernard D, Schmidt R. Calmodulin-like skin protein: a new marker of keratinocyte differentiation. [J Investig Dermatol](#), 2001, 116: 905–909
- 25 Lootens L, Brusselaers N, Beele H, et al. Keratinocytes in the treatment of severe burn injury: an update. [Int Wound J](#), 2013, 10: 6–12
- 26 Rakar J, Krammer M P, Kratz G. Human melanocytes mitigate keratinocyte-dependent contraction in an *in vitro* collagen contraction assay. [Burns](#), 2015, 41: 1035–1042
- 27 Million R, Puricelli L, Iori E, et al. Skin fibroblasts as a tool for identifying the risk of nephropathy in the type 1 diabetic population. [Diabetes Metab Res Rev](#), 2012, 28: 62–70
- 28 Nolte S V, Xu W, Rennekampff H O, et al. Diversity of fibroblasts—a review on implications for skin tissue engineering. [Cells Tissue Organs](#), 2008, 187: 165–176
- 29 Vijayavenkataraman S, Lu W F, Fuh J Y H. 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. [Biofabrication](#), 2016, 8: 032001
- 30 Wang S, Lee J M, Yeong W Y. Smart hydrogels for 3D bioprinting. [Int J Bioprinting](#), 2015, 1: 3–14
- 31 Gutiérrez-Rivera A, Pavón-Rodríguez A, Cormenzana P, et al. A protocol for enrichment of CD34⁺ stromal cell fraction through human skin disaggregation and magnetic separation. [J Dermatol Sci](#), 2010, 59: 60–62
- 32 Choi G, Kim S. Adaptive modeling method for 3-D printing with various polymer materials. [Fibers Polym](#), 2016, 17: 977–983
- 33 Shakespeare P. Skin substitutes and wound treatment. [Int J Lower Extrem Wounds](#), 2004, 3: 119–120
- 34 Lam E Y, Moneta G L. Nonoperative management of venous ulcers and the emerging role of bioengineered skin substitutes. [Perspect Vasc Surg](#), 2000, 13: 0069–0080
- 35 Zhang J, Yang J. 3D face reconstruction based on non-absolute positive photos and skin model. International Conference on Transportation, 2011, 1: 1633–1636
- 36 Marro A, Bandukwala T, Mak W. Three-dimensional printing and medical imaging: a review of the methods and applications. [Curr Probl Diagn Radiol](#), 2016, 45: 2–9
- 37 Malik H H, Darwood A R J, Shaunak S, et al. Three-dimensional printing in surgery: a review of current surgical applications. [J Surg Res](#), 2015, 199: 512–522
- 38 Oliveira-Santos T, Baumberger C, Constantinescu M, et al. 3D face reconstruction from 2D pictures: first results of a web-based computer aided system for aesthetic procedures. [Ann Biomed Eng](#), 2013, 41: 952–966
- 39 Ahmad Fadzil M, Hani N M E S, Gill P. Assessment of ulcer wounds size using 3D skin surface imaging. In: IVIC '09 Proceedings of the 1st International Visual Informatics Conference on Visual Informatics: Bridging Research and Practice, 2009, 1: 243–253
- 40 Gorelov V A, Kireev A Y, Shilenkov S V. Nonequilibrium molecular radiation behind the front of a strong shock wave in the CO₂-N₂-O₂ mixture. [J Appl Mech Tech Phys](#), 2005, 46: 160–167
- 41 Spanjers C S, Senfle T P, van Duin A C T, et al. Illuminating surface atoms in nanoclusters by differential X-ray absorption spectroscopy. [Phys Chem Chem Phys](#), 2014, 16: 26528–26538
- 42 Tay C J, Thakur M, Quan C. Grating projection system for surface contour measurement. [Appl Opt](#), 2005, 44: 1393–1400
- 43 Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. [Science](#), 1997, 276: 75–81

- 44 Wang L, Xu M, Zhang L L, et al. Automated quantitative assessment of three-dimensional bioprinted hydrogel scaffolds using optical coherence tomography. *Biomed Opt Express*, 2016, 7: 894–910
- 45 Kehlet Barton J, Izatt J A, Kulkarni M D, et al. Three-dimensional reconstruction of blood vessels from *in vivo* color doppler optical coherence tomography images. *Dermatology*, 1999, 198: 355–361
- 46 王玲, 宋江新, 杜显斌, 等. 基于OCT的原位三维打印皮肤修复设备及其实现方法. 中华人民共和国专利, CN 106073788 A, 2016-07-19
- 47 Nahmias Y, Schwartz R E, Verfaillie C M, et al. Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 92: 129–136
- 48 Timpson P, McGhee E J, Erami Z, et al. Organotypic collagen I assay: a malleable platform to assess cell behaviour in a 3-dimensional context. *J Vis Exp*, 2011, 56: e3089
- 49 Ng W L, Yeong W Y, Naing M W. Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering. *Int J Bioprinting*, 2016, in press, doi: 10.18063/IJB.2016.01.009
- 50 Lee M H, You C, Kim K H. Combined effect of a microporous layer and type I collagen coating on a biphasic calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering. *Materials*, 2015, 8: 1150–1161
- 51 Rossi A, Appelt-Menzel A, Kurdyn S, et al. Generation of a three-dimensional full thickness skin equivalent and automated wounding. *J Vis Exp*, 2015, in press, doi: 10.3791/52576
- 52 Karunanithi P, Murali M R, Samuel S, et al. Three dimensional alginate-fucoidan composite hydrogel augments the chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells. *Carbohydr Polym*, 2016, 147: 294–303
- 53 Lee B R, Hwang J W, Choi Y Y, et al. *In situ* formation and collagen-alginate composite encapsulation of pancreatic islet spheroids. *Biomaterials*, 2012, 33: 837–845
- 54 Chandrasekaran A R, Venugopal J, Sundarajan S, et al. Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration. *Biomed Mater*, 2011, 6: 015001
- 55 刘洋. 生物打印构建体外细胞阵列和肿瘤模型. 博士学位论文. 大连: 大连理工大学, 2015
- 56 Powell H M, Supp D M, Boyce S T. Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. *Biomaterials*, 2008, 29: 834–843
- 57 Zhong S, Teo W E, Zhu X, et al. An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on *in vitro* fibroblast culture. *J Biomed Mater Res*, 2006, 79A: 456–463
- 58 Powell H M, Boyce S T. Fiber density of electrospun gelatin scaffolds regulates morphogenesis of dermal-epidermal skin substitutes. *J Biomed Mater Res*, 2008, 84A: 1078–1086
- 59 Min B M, Lee G, Kim S H, et al. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials*, 2004, 25: 1289–1297
- 60 Kundu B, Rajkhowa R, Kundu S C, et al. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, 65: 457–470
- 61 Wnek G E, Carr M E, Simpson D G, et al. Electrospinning of nanofiber fibrinogen structures. *Nano Lett*, 2003, 3: 213–216
- 62 McManus M C, Boland E D, Koo H P, et al. Mechanical properties of electrospun fibrinogen structures. *Acta Biomater*, 2006, 2: 19–28
- 63 Gu B K, Park S J, Kim M S, et al. Fabrication of sonicated chitosan nanofiber mat with enlarged porosity for use as hemostatic materials. *Carbohydr Polym*, 2013, 97: 65–73
- 64 Sarkar S D, Farrugia B L, Dargaville T R, et al. Chitosan-collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101: 46–56
- 65 Augustine R, Dominic E A, Reju I, et al. Electrospun poly(ϵ -caprolactone)-based skin substitutes: *in vivo* evaluation of wound healing and the mechanism of cell proliferation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2015, 103: 1445–1454
- 66 Venugopal J, Ramakrishna S. Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration. *Tissue Eng*, 2005, 11: 847–854
- 67 Li Y, Chen F, Nie J, et al. Electrospun poly(lactic acid)/chitosan core-shell structure nanofibers from homogeneous solution. *Carbohydr Polym*, 2012, 90: 1445–1451
- 68 Liu S J, Kau Y C, Chou C Y, et al. Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing. *J Memb Sci*, 2010, 355: 53–59
- 69 Hoveizi E, Nabiuni M, Parivar K, et al. Functionalisation and surface modification of electrospun polylactic acid scaffold for tissue engineering. *Cell Biol Int*, 2014, 38: 41–49
- 70 Liu Y, Suwa F, Wang X, et al. Reconstruction of a tissue-engineered skin containing melanocytes. *Cell Biol Int*, 2007, 31: 985–990
- 71 Aasen T, Izpisua Belmonte J C. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent

- stem cells. *Nat Protoc*, 2010, 5: 371–382
- 72 Gruene M, Pflaum M, Deiwick A, et al. Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells. *Biofabrication*, 2011, 3: 015005
- 73 Toma C, Pittenger M F, Cahill K S, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 2002, 105: 93–98
- 74 Tasoglu S, Demirci U. Bioprinting for stem cell research. *Trends Biotech*, 2013, 31: 10–19
- 75 Singh R, Chen C, Phelps R G, et al. Stem cells in the skin and their role in oncogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2014, 28: 542–549
- 76 Hennessy R, Markey M K, Tunnell J W. Impact of one-layer assumption on diffuse reflectance spectroscopy of skin. *J Biomed Opt*, 2015, 20: 027001
- 77 Mézel C, Souquet A, Hallo L, et al. Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applications: jet formation modeling. *Biofabrication*, 2010, 2: 014103
- 78 Guillotin B, Souquet A, Catros S, et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Bio-materials*, 2010, 31: 7250–7256
- 79 Zheng Q, Lu J, Chen H, et al. Application of inkjet printing technique for biological material delivery and antimicrobial assays. *Anal Biochem*, 2011, 410: 171–176
- 80 Ko S H, Chung J, Pan H, et al. Fabrication of multilayer passive and active electric components on polymer using inkjet printing and low temperature laser processing. *Sensors Actuators A Phys*, 2007, 134: 161–168
- 81 Obata K, El-Tamer A, Koch L, et al. High-aspect 3D two-photon polymerization structuring with widened objective working range (WOW-2PP). *Light Sci Appl*, 2013, 2: e116
- 82 Koch L, Kuhn S, Sorg H, et al. Laser printing of skin cells and human stem cells. *Tissue Eng Part C-Methods*, 2010, 16: 847–854
- 83 Koch L, Deiwick A, Schlie S, et al. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 1855–1863
- 84 Michael S, Sorg H, Peck C T, et al. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *PLoS ONE*, 2013, 8: e57741
- 85 Michael S, Sorg H, Peck C T, et al. The mouse dorsal skin fold chamber as a means for the analysis of tissue engineered skin. *Burns*, 2013, 39: 82–88
- 86 刘雪来, 杜娟. 3D生物打印技术在皮肤创面修复中的研究进展. *中华创伤杂志*, 2014, 30: 1063–1066
- 87 Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, et al. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. *Tissue Eng*, 2005, 11: 1658–1666
- 88 Lee W, Debasitis J C, Lee V K, et al. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. *Biomaterials*, 2009, 30: 1587–1595
- 89 Lee W, Lee V, Polio S, et al. On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105: 1178–1186
- 90 Lee V, Singh G, Trasatti J P, et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. *Tissue Eng Part C-Methods*, 2014, 20: 473–484
- 91 Lee W, Bae C Y, Kwon S, et al. Cellular hydrogel biopaper for patterned 3D cell culture and modular tissue reconstruction. *Adv Healthcare Mater*, 2012, 1: 635–639
- 92 Ahn S H, Yoon H, Kim G H, et al. Designed three-dimensional collagen scaffolds for skin tissue regeneration. *Tissue Eng Part C-Methods*, 2010, 16: 813–820
- 93 Kim G H, Ahn S, Kim Y Y, et al. Coaxial structured collagen-alginate scaffolds: fabrication, physical properties, and biomedical application for skin tissue regeneration. *J Mater Chem*, 2011, 21: 6165–6172
- 94 Huang S, Yao B, Xie J, et al. 3D bioprinted extracellular matrix mimics facilitate directed differentiation of epithelial progenitors for sweat gland regeneration. *Acta Biomater*, 2016, 32: 170–177
- 95 Binder K W. *In Situ* Bioprinting of the skin. Doctoral Dissertation. Winston-Salem: Wake Forest University, 2011
- 96 Sofokleous P, Stride E, Bonfield W, et al. Design, construction and performance of a portable handheld electrohydrodynamic multi-needle spray gun for biomedical applications. *Mater Sci Eng-C*, 2013, 33: 213–223
- 97 Monsuur H N, Boink M A, Weijers E M, et al. Methods to study differences in cell mobility during skin wound healing *in vitro*. *J Biomech*, 2016, 49: 1381–1387
- 98 Nowak J A, Polak L, Pasolli H A, et al. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 33–43

- 99 Delevoye C. Melanin transfer: the keratinocytes are more than gluttons. [J Invest Dermatol](#), 2014, 134: 877–879
- 100 Liu F, Luo X S, Shen H Y, et al. Using human hair follicle-derived keratinocytes and melanocytes for constructing pigmented tissue-engineered skin. [Skin Res Tech](#), 2011, 17: 373–379
- 101 Vultur A, Schanstra T, Herlyn M. The promise of 3D skin and melanoma cell bioprinting. [Melanoma Res](#), 2016, 26: 205–206
- 102 Tan Y, Richards D J, Trusk T C, et al. 3D printing facilitated scaffold-free tissue unit fabrication. [Biofabrication](#), 2014, 6: 024111
- 103 Benjamin L E, Golijanin D, Itin A, et al. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. [J Clin Invest](#), 1999, 103: 159–165
- 104 Al Moussawi A, Galusinski C, Nguyen C. 3D reconstruction of blood vessels. [Eng Comp](#), 2015, 31: 775–790
- 105 Hoch E, Tovar G E M, Borchers K. Bioprinting of artificial blood vessels: current approaches towards a demanding goal. [Eur J Cardiothorac Surg](#), 2014, 46: 767–778
- 106 Uppal R, Ramaswamy G N, Arnold C, et al. Hyaluronic acid nanofiber wound dressing-production, characterization, and *in vivo* behavior. [J Biomed Mater Res](#), 2011, 97B: 20–29
- 107 Galeano M, Polito F, Bitto A, et al. Systemic administration of high-molecular weight hyaluronan stimulates wound healing in genetically diabetic mice. [Biochim Biophys Acta](#), 2011, 1812: 752–759
- 108 Estañol B, Vinicio Corona M, Elías Y, et al. Sympathetic co-activation of skin blood vessels and sweat glands. [Clin Auton Res](#), 2004, 14: 107–112
- 109 Tokudome Y, Jinno M, Todo H, et al. Increase in ceramide level after application of various sizes of sphingomyelin liposomes to a cultured human skin model. [Skin Pharmacol Physiol](#), 2011, 24: 218–223
- 110 Roguet R, Cohen C, Leclaire J, et al. Use of a standardized reconstructed epidermis kit to assess *in vitro* the tolerance and the efficacy of cosmetics. [Int J Cosmetic Sci](#), 2000, 22: 409–419
- 111 Pereira R F, Barrias C C, Granja P L, et al. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. [Nanomedicine](#), 2013, 8: 603–621
- 112 Frankart A, Malaisse J, De Vuyst E, et al. Epidermal morphogenesis during progressive *in vitro* 3D reconstruction at the air-liquid interface. [Exp Dermatol](#), 2012, 21: 871–875
- 113 Koehler M J, König K, Elsner P, et al. *In vivo* assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. [Opt Lett](#), 2006, 31: 2879–2881
- 114 Pennacchi P C, de Almeida M E S, Gomes O L A, et al. Glycated reconstructed human skin as a platform to study the pathogenesis of skin aging. [Tissue Eng Part A](#), 2015, 21: 2417–2425
- 115 Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation—a review. [Int J Cosmet Sci](#), 2005, 27: 17–34

The state-of-the-art of 3D bio-printing of skin tissues

HU JinHua¹, WANG Ling¹, SHI Ran² & XU MingEn¹

1 School of Life Information and Instrument Engineering, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, China;

2 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Information and 3D Printing, Hangzhou 310018, China

Three-dimensional bio-printing technology is the most advanced new technology in the manufacture of complex multi-layered structures of the skin tissue. This computer-controlled technology is used to precisely place a variety of biological materials and cells at the designated position so that they can be assembled to form three-dimensional tissue layers. Based on the analysis of the structure and composition of human skin, this paper summarizes the basic processes and key elements of three-dimensional bio-printed skin structure modeling, biomaterials, and seed cells. Three types of printers, laser-assisted, inkjet, and extrusion printers, are described and their advantages and disadvantages analyzed. The future development of 3D bio-printing is discussed, and its value in clinical treatment, drug screening, and basic research is summarized.

3D bio-printing, skin, biological materials, seed cells

doi: [10.1360/N052016-00352](https://doi.org/10.1360/N052016-00352)