DOI:10.16016/j.2097-0927.202112206



3D 打印技术构建含界层结构关节骨软骨支架的现状与展望

杨 柳,黄 杨 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院关节外科

[摘要] 关节骨软骨缺损在临床上十分常见,组织工程技术方法可为这一病损提供具有广阔前景的再生治疗方案。关节骨软骨单元由透明软骨、钙化软骨层、软骨下骨构成,其中钙化软骨层作为关节骨与软骨的界层结构,在应力传导和微环境调控方面均具有重要作用;含有界层结构复合支架用于再生修复这类缺损是未来关节骨软骨复合组织工程的发展方向。3D 打印制造技术具有快速、精准、个性化定制的优势和特点,能够满足含界层结构的关节骨软骨支架不规则几何外形与多层结构、成分差异化构建的需求。本文概述了关节骨软骨单元的形态结构、生化组分及生理功能,评述了关节骨软骨复合组织工程支架中构建其界层结构的必要性,以及利用材料挤出、熔融电写、静电纺丝、光固化和数字光处理等 3D 打印技术构建含界层结构骨软骨支架的方案。未来需要深入骨软骨界层结构的基础研究,并且积极开发和拓展 3D 打印技术在含有界层结构的关节骨软骨支架构建方面的应用,从而更好地实现骨软骨支架的功能和结构的仿生,最终提升各类伤病所致关节骨软骨缺损的再生治疗水平。

[关键词] 3D 打印;组织工程;骨软骨支架;钙化软骨层

[中图法分类号] R319; R684 [文献标志码] A

Current status and perspective of 3D printing technology to construct articular osteochondral scaffolds with boundary structure

YANG Liu, HUANG Yang Center for Joint Surgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] Articular osteochondral defects are very common in clinical practice. Tissue engineering technology provides a promising treatment strategy for the disease. The articular osteochondral unit is composed of hyaline cartilage, calcified cartilage zone and subchondral bone. As the boundary structure between articular bone and cartilage, calcified cartilage zone plays an important role in stress conduction and microenvironment regulation. Composite scaffolds with boundary structure for defect repair is a development direction of osteochondral tissue engineering in the future. 3D printing technology has the advantages and characteristics of speediness, accuracy and personalized customization, which meet the needs of geometric shape, multi-layer structure and component differentiation when manufacturing osteochondral scaffold with boundary structure. We summarize the morphological structure, biochemical components and physiological

[基金项目] 重庆市博士后研究项目特别资助(2021XM3092)

[通信作者] 杨 柳,教授,主任医师,博士生导师,国家首批重点研发计划项目首席科学家,重庆市优秀科学家。现任关节外科精准医学重庆市重点实验室、关节生物学重庆市重点实验室主任,兼任国际软骨修复学会(ICRS)中国部常委,中国生物材料学会骨修复材料与器械分会副主任委员和关节修复材料及应用专委会副主任委员,重庆市增材制造产业协会医学 3D 打印分会会长,中华医学会骨科分会关节外科学组、运动医疗分会和中国医师协会运动医学分会常务委员。先后主持包括国家重点研发计划、国家自然科学基金重点项目等国家、省市及军队科研项目 30 余项。发表学术论文 290 余篇,其中 SCI 收录期刊论文 60 余篇,在 *Biomaterial*, *Bioactive Material* 等 Q1 区期刊发表论文 20 余篇,3 篇获得 Faculty Opinions(F1000)推荐。主要从事关节骨软骨再生医学、骨关节炎发病机制与防治、金属假体 3D 打印技术研发与应用、机器人关节外科精准重建技术等基础与临床研究。E-mail:jointsurgery@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

functions of articular osteochondral unit, and comment on the necessity of constructing its boundary structure in articular osteochondral composite tissue engineering scaffold and its construction scheme by 3D printing technologies, such as material extrusion, melt electro-writing, electro-spinning, stereolithography, and digital light processing. Deepening the basic research of articular cartilage boundary structure and expanding the application of 3D printing technology in the construction of osteochondral scaffolds containing boundary structure will realize the bionic function and structure of osteochondral scaffold, and finally improve the regeneration treatment of articular osteochondral defects caused by various injuries.

[**Key words**] 3D printing; tissue engineering; osteochondral scaffold; calcified cartilage zone

Supported by the Special Project of Chongqing Postdoctoral Research (2021XM3092). Corresponding author: YANG Liu, E-mail: jointsurgery@163.com

关节内上、下骨端覆盖一层光滑而富有弹性的关节软骨(articular cartilage, AC),钙化软骨层(calcified cartilage zone, CCZ)位于骨与软骨之间,三者共同构成关节骨软骨单元[1]。关节软骨内无血管和淋巴管,细胞密度很低,自我修复能力很弱,受到创伤或发生疾病后,往往进展成为整个骨软骨单元的病损——关节骨软骨缺损。在临床上,各种伤病所致的关节骨软骨缺损十分常见,其关节镜手术检出率可达19.2%[2];若未给予很好的干预治疗,其骨软骨缺损则可加速整个关节的退变,最终发展成为重度骨关节炎,严重影响患者身心健康和生活质量,同时给社会和家庭带来巨大经济负担。

目前临床上针对关节骨软骨缺损的治疗方法,包括非手术治疗及关节清理术、微骨折术、自体骨软骨移植或马赛克镶嵌成形术、自体软骨细胞移植术(autologous chondrocyte implantation, ACI)及基质诱导自体软骨细胞移植术(matrix-associated autologous chondrocyte implantation, MACI)等手术治疗[3],但是远期疗效均不能令人满意。其中,微骨折术后的缺损修复组织为纤维软骨,较透明软骨的力学及润滑性能均相差甚大[4];自体骨软骨移植及ACI手术治疗均类似于拆东墙补西墙,而且移植物或移植细胞的来源受限,同时缺损面积大于4 cm^2 或者35岁以上患者的疗效不理想[5]。

组织工程技术策略旨在通过将种子细胞、生长因子与组织支架复合的方法再生修复损伤组织的结构与功能。关节软骨组织成分相对单一,结构相对简单,没有复杂的脉管系统,其组织工程实现难度较低,被视作治疗关节骨软骨缺损最有应用前景的技术方案。自20世纪90年代以来,关节软骨及骨组织工程研究已取得了较大进展,但同时存在着诸如组织过度纤维化、移植物下沉、异常骨形成、软骨过度生长及支架分离等缺点[6]。与天然关节骨软骨组织相比,单层或双层支架在软骨和骨之间缺乏“界层结构”——钙化软骨层[7],导致关节软骨与软骨下骨(subchondral bone, SB)各自的微环境稳态失衡,以及应力传导方式改变,最终造成其修复结果失败。为了实现其完全仿生,研究人员尝试了多种方案以构建含界层结构的关节骨软骨多层支架。近年来,随着新工业革命的增材制造技术的出现,3D打印技术迅猛发展,为解决这一难题提供了新的工具手段和技术方法,相关研究已取得了显著进展。本文将从关节骨软骨单元组分与结构功能、构建其界层结构的必要性、3D打印技术方案及单层与多层支架构建效能的对比等几个方面,述评3D打印技术构架含界层结构关节骨软骨多层支架的科学意义、技术方法及其未来前景。

1 关节骨软骨单元组分与结构功能

人体关节骨软骨单元组织由三部分构成,即关节软骨(AC)、软骨下骨(SB)及其之间的界层结构——钙化软骨层(CCZ),其组织成分、纤维排列、细胞群落及机械性能互不相同。其中AC和SB的物理、化学及生物学特征已有很多研究报道,而CCZ的解剖部位特殊且较为隐蔽,同时对其研究的技术方法有限,致使其成为关节骨软骨单元研究领域的难点。

CCZ是一种天然的界层结构,即在成熟滑膜关节内,位于AC和SB之间的一层钙化软骨组织[8]。相关研究结果显示,CCZ形态致密,以“齿梳”状形态与SB相铆合,厚度为(104.16±20.87)μm,主要干质量成分为Ⅱ型胶原(20.16±0.96)%、羟基磷灰石(65.09±2.31)%[9-10],压缩弹性模量为(208.6±39.7)MPa,拉伸弹性模量为(178.3±35.9)MPa,较透明软骨硬10倍,为骨硬度的1/60[11]。这种特殊的形貌特征、组成成分赋予了CCZ独一无二的力学特性,使得关节在运动时的力学冲击在CCZ处得到显著衰减。更重要的是,CCZ可将关节软骨的剪切力转化为压应力传递至SB,从而大大降低了关节软骨被压碎和撕裂的可能性。

CCZ除具有独特的力学功能外,还具有重要的屏

障作用。关节软骨与软骨下骨之间的物质交换是否被CCZ完全阻隔,还是存在着部分的物质交换,一直以来均存在着争议,而大多数学者认为CCZ的存在致使关节软骨与软骨下骨之间的物质交换非常困难[12-14]。一项活体成熟/未成熟小鼠CCZ通透性的原位观测研究结果显示,无论是罗丹明B(476)还是荧光标记的葡聚糖(20×10^3),成熟小鼠的CCZ对两种荧光示踪剂均具有阻隔效应(以潮线为界限),而发育未成熟小鼠的CCZ则无这种阻隔效应[15]。CCZ的这种屏障作用的变化,在关节软骨的发育形成,以及维持正常软骨的生理功能过程中均扮演着重要的角色,但其具体机制目前尚未阐明。此外,含天然CCZ骨软骨支架修复小香猪膝关节骨软骨缺损的实验研究发现,对照不含天然CCZ骨软骨支架组,含天然CCZ骨软骨支架取得了再生修复的优良效果[16]。这一结果表明,重建CCZ结构在关节骨软骨缺损再生修复中的必要性。

综上,CCZ是关节软骨与软骨下骨之间的一种特殊过渡结构,以其独有的方式,在化学成分、力学作用及生物学性能上连接了机体两种完全不同的组织,其完整性对于维持关节骨软骨的生理微环境和生理功能至关重要。因此,在设计制造关节骨软骨复合组织支架时,需要考虑其包含CCZ的构建技术和方法。

2 3D打印构建技术

在天然机体组织中,关节软骨多糖链之间的孔径约为6 nm,胶原纤维网络的孔径为60~200 nm,并且竖直延续至CCZ[17]。与AC不同,CCZ和SB的内部结构更加致密,而关节骨软骨组织单元又是一个有序相连的整体,这种结构特征的差异性为仿生制造含CCZ关节骨软骨复合组织工程支架带来了很大的挑战,特别是如何考虑其构建的原材料选择及其构建的技术方案。目前,3D打印构建关节骨软骨复合组织工程支架的最常用技术包括:材料挤出(material extrusion, ME)、熔融电写(melt electro-writing, MEW)、静电纺丝(electro-spinning, ES)、光固化(stereolithography, SLA)及数字光处理(digital light processing, DLP)。

2.1 材料挤出技术

材料挤出(ME)技术是通过喷嘴移动材料以将其沉积在X-Y轴平面上的打印床上,然后在Z轴平面上逐层堆加。因此,在标准ME打印中,所有沉积的材料需要(至少部分需要)构建在底面层级的支撑材料或支撑浴上[18]。

ME打印技术允许使用多种材料,包括热聚合物、水凝胶及生物陶瓷,其中每种类别的打印材料或复合材料均需要微调打印参数,例如温度、挤出压力、打印速度、水凝胶交联或凝胶化的速度[19-20]。ME的优势在于可以创建相对多孔的高孔隙率支架,使种子细胞得以黏附增殖和容易向组织内生长。研究显示,具有较小孔径(<0.1 mm)的支架可以帮助新软骨形成,而具有较大孔径(>0.3 mm)者可以促进细胞成骨的生长[21]。

基于热聚合物的ME技术能够打印出与SB最相近的多孔结构。在多相骨软骨支架的SB部分,其孔径通常为0.3~1.0 mm,孔隙率为70%~80%[22-23]。使用基于热聚合物材料调控支架的孔隙率范围和孔径大小,能够促进骨生长,很适合用于制造骨软骨支架的SB部分。

基于生物陶瓷的ME打印技术主要用于骨软骨支架的CCZ和SB部分[24]。总体而言,采用生物陶瓷打印的支架,可实现的孔隙率较低(20%~60%),因而基于生物陶瓷材料制造高孔隙率支架十分困难。同时,其孔径也很小(0.1~0.4 mm),许多支架未能产生>0.3 mm的孔径而难以促进SB部分的骨生长[25-26]。虽然该技术被广泛用于构建骨软骨支架的CCZ和SB部分,但其低孔隙率和小孔径,对组织生长并非有利。

3D打印水凝胶支架在关节骨软骨复合组织工程中已有广泛应用,特别是用于AC部分的打印,而其多相支架的连续打印目前应用较少。因此,用于具有完整连续性天然关节骨软骨单元的仿生连续挤压技术,可能是水凝胶3D打印的一个未来发展方向。KILIAN等[24]以链式图案水凝胶3D打印形成骨软骨支架的AC部分,然后再以铸造的方式获得CCZ,从而获得连续的含界层结构的骨软骨支架。尽管水凝胶ME打印技术通常用于骨软骨支架AC部分,但GAO等[27]完全采用基于水凝胶ME的3D打印技术生产出双相骨软骨支架,并在SB部分的水凝胶中添加β-磷酸三钙(β-tricalcium phosphate, β-TCP),增加了水凝胶的力学刚度和骨诱导性质,而在AC部分包含了转化生长因子-β1(TGF-β1)以增强软骨的形成与分化。

2.2 熔融电写及静电纺丝技术

熔融电写(MEW)及静电纺丝(ES)技术可使得长纤维丝通过喷嘴逐层沉积[28]。其纤维直径的尺寸范围从微米到纳米,实际上MEW通常会生产出微米纤维,而ES通常会生产出纳米纤维。此外,ES是一种基于溶剂的打印技术,可将材料纤维随机沉积在收集器床上;而MEW是一种无溶剂方法,可控制纤维的沉积位置和方式,从而控制最终的图案。对于MEW和ES技术,其材料的选择分别依据其电流体动力学原理的材料可加工性而确定[29]。聚己内酯(polycaprolactone,

PCL)是 MEW 使用最多的材料,还包括凝胶、壳聚糖、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)、透明质酸及胶原蛋白[30]。尽管 ES 中使用的材料有所增加,但所使用的溶剂通常具有生物毒性,可能留有毒性残留物,需要引起高度关注[31]。

将 MEW 和 ES 应用于关节骨软骨支架构建时,主要面临的挑战是在 Z 轴方向上打印出的结构总厚度有限[32]。目前克服这种限制的方式是把材料打印至各种收集器和主体床上,以增加 Z 轴方向的结构高度[33]。另一方面,鉴于生产的高度及微/纳米纤维强度有限,MEW 和 ES 通常会产生较软的支架,很适合用于制造关节骨软骨支架的 AC 部分。

CUI 等[34]应用 ES 创建了一个构造完整、厚度 2~3 mm 的单相骨软骨支架,虽然这一厚度足以填补大鼠模型中的关节骨软骨缺损,但难以用于人关节骨软骨缺损。将该技术与其他制造方法(多层堆积)结合使用,打印到非扁平收集器床或堆叠支架上,可将高度增加至 6~15 mm,以适用人体骨软骨缺损修复[30]。

2.3 光固化和数字光处理技术

光固化(SLA)和数字光处理(DLP)技术是通过材料逐层沉积以实现 3D 打印成型。然而,这些技术均非基于喷嘴方式,而是液体材料位于树脂浴中,其中构建板降低并且光源跟踪编程图案,仅交联设计的部分,该过程可逐层让材料沉积,直到物体成型完成。

SLA 和 DLP 技术之间的区别是使用的光源不同。SLA 使用激光,而 DLP 使用来自投影的光源[35]。SLA/DLP 常规打印的精度可达 50 μm,其介于 MEW/ES 和 ME 之间[36]。这些技术采用的基础材料与前述的许多基础材料相互兼容,但通常需要对材料进行广泛的改性[37]。目前用于关节骨软骨支架的材料包括聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)、明胶甲基丙烯酰氯(gelatin methacryloyl,GelMA)及磷酸三钙(tricalcium phosphate,TCP),可与光引发剂、光吸收剂、溶剂和/或分散剂的任何组分混合[22,38]。在支架制备中,SLA 和 DLP 打印技术不如 ME 那样使用广泛,可能是由于这些系统高昂的前期投入和维护成本所致。

截至目前,与其他技术相比,SLA 和 DLP 打印的支架尚无孔隙率方面的优势(50%~65%)[22]。该类技术可用于构建多层关节骨软骨支架,如 ZHU 等[39]使用 DLP 技术创建了基于 PEG 材料结合天然牛软骨细胞外基质的多层骨软骨支架。

3 多层骨软骨支架构建

关节骨软骨复合组织工程支架的设计可分为单相、双相、三相或多相。理论上,单相或双层支架均难以复刻每种组织的特定性质,而多相支架通过协同每种材料、生物与机械元件的不同组合,可以重现其 3 种组织中至少两种组织的性质。构建含 CCZ 的关节骨软骨仿生支架需要增加相的数量,从而增加了制造的难度,同时如何在体内保持其各层之间连接的稳定性也具有很大的挑战。

3.1 单层或者双层骨软骨支架

单相支架设计并采用均匀的材料或复合材料修复整个关节骨软骨缺损。这就需要支架以单一孔隙率和机械性能满足其中每一组织区域的结构与功能要求。然而,使用单相支架修复关节骨软骨缺损中的不同组织结构与功能具有相当的挑战性。目前已有使用系列材料和生物制造技术进行单相支架创建的研究报道,包括基于氧化锌-PCL 复合材料的 ES 及基于生物陶瓷的 ME[40-41]。其中,材料溶液浓度或其表面特征均进行了优化与改性,以增强细胞成软骨或成骨分化潜能,而单相支架要同时实现这两种功能十分困难。

双相支架通常具有软骨相和骨相,而它们之间的 CCZ 均被忽略。相对于单层支架而言,双层支架更接近天然骨软骨组织。两层支架分别构造,给予研究者更多的发挥空间,可以分别控制优化其材料、设计、孔隙率、力学功能和/或单元类型等,为仿生构建关节骨软骨的组织结构与功能,并促进其多种新组织的形成提供了更大的可能性。例如 KILIAN 等[24]为解决 CCZ 材料问题,进行了无细胞陶瓷“水泥”和基于细胞藻酸盐水凝胶的各种双相组合试验。

3.2 三层或多层骨软骨支架

开发三层或多层结构关节骨软骨支架过程中,CCZ 是一个需要着重考虑的层次结构,包括其材料构建方式及使用何种类型的细胞等。目前一般采用两种材料构建方式,一种是完全独立于软骨相的材料构建方式,如分别采用聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid),PLGA]、TCP、Alginate(藻酸盐)及 GelMA 等的构建;另一种则是沿用软骨相的材料或者在软骨相材料基础上加入另一些提高刚性、支撑性的材料,如采用甲基丙烯酸透明质酸或丙烯酸异辛烷乙酯改性 β 环糊精[42],或在海藻酸钠中添加介孔生物活性玻璃[43]。

多层结构关节骨软骨支架的设计最为复杂,其支架中至少拥有 4 个不同的层次。虽然这种构建方法尚未被广泛使用,但从三相增加到四相或更多相通常会将 AC 部分分解成不同的区域。如 MANCINI 等[44]提出的一种由 4 层不同结构组成的骨软骨支架,目的是

更好地模仿 AC 不同区域的性质,即从上到下不同的(胶原)排列结构等;这种 PCL 支架以 0°、90°交叉排列模式作为基础,孔隙率逐渐减小直至质地致密,类似 CCZ 而充当其界面区;然后,PCL 沿着含有间充质干细胞(mesenchymal stromal cells, MSCs)的水凝胶继续保持 70%的孔隙率延伸作为第 3 层,第 4 层除去 PCL,仅留下水凝胶和 MSCs,再次使用相同的水凝胶但使用关节软骨祖细胞(articular cartilage progenitor cell, ACPC)代替 MSCs[45]。由此不难看出这种构造十分复杂,并需要更加精细的 3D 打印技术才能便捷地实现。

4 未来趋势与展望

含界层结构的多相复层支架构建是关节骨软骨复合组织工程未来发展的主流方向。近年来,随着增材制造 3D 打印技术的不断进步,含界层结构关节骨软骨支架构建变得更加便捷与可行。展望未来,基于 3D 打印技术的关节骨软骨支架设计制造,还有以下几方面的机遇和挑战。

4.1 界层结构的深入研究

骨软骨复合组织工程技术策略治疗关节骨软骨缺损的研究已有了十多年的历程,其支架构建制造从简单的单层支架到多层支架,以更好地模拟天然关节骨软骨单元的组织结构。然而,其三层支架的结构复杂,将 3 种不同结构铸造成一个整体结构具有相当的困难。在增材制造技术出现之前,已有多种不同方案构建含界层结构关节骨软骨支架研究报道,如分层构建再进行层间交联[16,46];或通过无缝过渡技术模仿天然 CCZ 界面,以创建结构连续的关节骨软骨支架;如 HARLEY 等[47]通过冻干矿化和非矿化的Ⅰ型胶原糖胺聚糖悬浮液,设计制备了含有 CCZ 界面的关节骨软骨支架;ZHAI 等[48]用“两次冷冻干燥”技术构建了高浓度壳聚糖/明胶溶液的致密隔离层。然而,研究者们均面临着一个问题——天然关节骨软骨组织单元的最佳仿生构建!

CCZ 作为关节软骨与软骨下骨之间的界层结构,与毗邻之间的连接精密复杂,成分过渡自然,发挥着力学传递、应力吸收与转换及生理屏障等功能与作用。由于其组分构成、形态学特征及其生理学功能等最基本的科学问题目前尚未完全阐释清楚,所以出现了采用各种不同材料进行“直接过渡”“间接连接”等骨软骨支架构建方案,而无统一的支架构建金标准。因此,通过对关节骨软骨组织单元及其界层结构的基本科学问题的深入解析,才能为含界层结构关节骨软骨复合组织支架的 3D 打印制造指明道路和方向。

4.2 生物 3D 打印技术的提升

现有的诸多 3D 打印技术均可以用于关节骨软骨支架的制备,然而每种技术均有其各自的优势和局限性,以及适配的打印材料。在材料选择上,截至目前尚无证据表明某种材料一定比另一种材料要好。一般来说,水凝胶多被用于打印 AC;生物陶瓷、透明质酸、TCP、金属材料[49]更适合打印 SB;而生物相容性、可塑性、可修饰性更好的新材料研发,也是未来亟待解决的问题之一。

在多种 3D 打印技术方案中,ME 具有广泛可用性、材料多功能性及低成本的优势特点,因而最为常用。MEW 和 ES 也被经常选用,但主要用于软骨相,且可实现的支架厚度有限,而这种所谓的“缺陷”,使其适用于制造薄而致密的界层结构,但其技术潜能尚需进一步开发。由于 CCZ 与毗邻结构精细的连接方式赋予了整个关节骨软骨单元良好的力学性能,为实现其最大限度的仿生,这种连接方式的仿制也应作为一个重点考虑的方向。所以,更高精度生物 3D 打印技术应是未来需要重点攻克的难题。

4.3 利于组织生长的支架构建

3D 打印技术可构建出关节骨软骨细胞外基质仿生支架,为种子细胞黏附增殖分化提供必要的场所空间,最终在体内持续发挥生物学功能。要使支架内的细胞能够良好生长,首要的是控制支架的设计参数,例如孔径、孔隙率、表面拓扑结构等。支架植入细胞的时机主要有两种方案,一种是将细胞直接添加到打印原料中,另一种则是只打印支架,而不添加细胞,目前尚未对这两种方案的优劣做出定论,而且不同研究中添加的细胞数量和种类不尽相同,甚至同一个研究不同支架层添加的细胞也不一定相同。

作为组织工程的种子细胞,需要适宜的生长环境和土壤肥料(生长因子)。生长环境方面,包括如何控制氧含量,选择培养基类型[50],需要进行怎样的物理刺激,如力学刺激、磁场等,尚无统一的金标准;生长因子方面,促进软骨形成与骨形成的生长因子种类繁多,如何调节支架各层之间生长因子的添加时机、种类与比例,使得种子细胞向着各自所需的方向分化,目前同样面临着巨大挑战。

4.4 走向临床转化应用

实现最新研发技术的临床转化应用,安全有效地解决患者的伤病痛苦,是一项技术和一项基础研究的最终目标。然而,每一项研发技术从实验室走向临床的道路十分漫长,制度规范要求严格,经费与人力成本高昂。令人遗憾的是,目前尚无采用 3D 打印技术的

骨软骨支架修复关节骨软骨缺损的临床试验应用,少数组织工程骨软骨支架的临床试验应用则是通过非3D打印技术制造的。与其他组织工程方案相比,3D打印技术的个性化定制能力最为吸引人。通常关节骨软骨缺损均为不规则形状,其他支架制造技术构建圆柱形、长方体形支架相对容易,而很难构建不规则形状的支架。这种"千篇一律"的支架很难与患者缺损部位相匹配,无论临时修缮支架以适配缺损,还是扩大患者病损范围以适配支架,均非最优选择。而3D打印技术则能够在患者病损MRI、CT扫描数据基础上,预先构建与缺损部位几何形貌相匹配的支架,甚至为一个患者不同缺损部位定制不同的个性化支架。此外,基于这些数据,还能应用3D打印技术制作出虚拟模型,在体外行模拟手术,从而提高手术治疗效果,减少患者的痛苦。

总之,随着3D打印技术的发展进步,关节骨软骨界层结构研究的深入进行,以及广大研究人员与医务人员的通力合作,一定能够克服前述各种困难与问题。通过3D打印技术构建含界层结构关节骨软骨仿生支架的不断拓展应用,必将提升各类伤病所致关节骨软骨缺损的再生治疗水平,并最终造福广大骨关节伤病患者。

参考文献:

[1] ZHOU X C, CAO H, YUAN Y, *et al*. Biochemical signals mediate the crosstalk between cartilage and bone in osteoarthritis[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 5720360. DOI:10.1155/2020/5720360.

[2] ANDERSON D E, ROSE M B, WILLE A J, *et al*. Arthroscopic mechanical chondroplasty of the knee is beneficial for treatment of focal cartilage lesions in the absence of concurrent pathology[J]. Orthop J Sports Med, 2017, 5(5): 2325967117707213. DOI:10.1177/2325967117707213.

[3] YASUI Y, WOLLSTEIN A, MURAWSKI C D, *et al*. Operative treatment for osteochondral lesions of the talus: biologics and scaffold-based therapy[J]. Cartilage, 2017, 8(1): 42-49. DOI:10.1177/1947603516644298.

[4] GOBBI A, LANE J G, DALLO I. Editorial commentary: cartilage restoration—what is currently available? [J]. Arthrosc J Arthrosc Relat Surg, 2020, 36(6): 1625-1628. DOI:10.1016/j.arthro.2020.04.001.

[5] ASSENMACHER A T, PAREEK A, REARDON P J, *et al*. Long-term outcomes after osteochondral allograft: a systematic review at long-term follow-up of 12.3 years[J]. Arthrosc J Arthrosc Relat Surg, 2016, 32(10): 2160-2168. DOI:10.1016/j.arthro.2016.04.020.

[6] KOK A C, VAN BERGEN C J A, TUIJTHDF G J M, *et al*. Macroscopic ICRS poorly correlates with O'Driscoll histological cartilage repair assessment in a goat model[J]. Clin Res Foot Ankle, 2015, 3(2): 1-7. DOI:10.4172/2329-910x.1000173.

[7] GALPERIN A, OLDINSKI R A, FLORCZYK S J, *et al*. Integrated bi-layered scaffold for osteochondral tissue engineering[J]. Adv Healthc Mater, 2013, 2(6): 872-883. DOI:10.1002/adhm.201200345.

[8] FERGUSON V L, BUSHBY A J, BOYDE A. Nanomechanical properties and mineral concentration in articular calcified cartilage and subchondral bone[J]. J Anat, 2003, 203(2): 191-202. DOI:10.1046/j.1469-7580.2003.00193.x.

[9] ZHANG Y, WANG F Y, TAN H B, *et al*. Analysis of the mineral composition of the human calcified cartilage zone[J]. Int J Med Sci, 2012, 9(5): 353-360. DOI:10.7150/ijms.4276.

[10] 王富友, 杨柳, 段小军, 等. 人体正常膝关节钙化软骨层组成成分研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(8): 687-690. DOI:10.3321/j.issn:1000-5404.2008.08.008.
WANG F Y, YANG L, DUAN X J, *et al*. Study on the components of calcified cartilage zone in the normal human knee joint[J]. J Third Mil Med Univ, 2008, 30(8): 687-690. DOI:10.3321/j.issn:1000-5404.2008.08.008.

[11] SUN L, CHEN C, YIN L, *et al*. Probing the elasticity of calcified cartilage zone using nano-indentation[J]. J Biomater Tissue Eng, 2017, 7(7): 556-560. DOI:10.1166/jbt.2017.1599.

[12] ARKILL K P, WINLOVE C P. Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2008, 16(6): 708-714. DOI:10.1016/j.joca.2007.10.001.

[13] PAN J, ZHOU X Z, LI W, *et al*. In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage[J]. J Orthop Res, 2009, 27(10): 1347-1352. DOI:10.1002/jor.20883.

[14] POURAN B, ARBABI V, BLEYS R L, *et al*. Solute transport at the interface of cartilage and subchondral bone plate: effect of micro-architecture[J]. J Biomech, 2017, 52: 148-154. DOI:10.1016/j.jbiomech.2016.12.025.

[15] HUANG Y, CHEN C, WANG F Y, *et al*. Observation of solute transport between articular cartilage and subchondral bone in live mice[J]. Cartilage, 2021, 13(2_suppl): 398S-407S. DOI:10.1177/1947603520951627.

[16] HUANG Y, FAN H Q, GONG X Y, *et al*. Scaffold with natural calcified cartilage zone for osteochondral defect repair in minipigs[J]. Am J Sports Med, 2021, 49(7): 1883-

1891. DOI:10.1177/03635465211007139.

[17] BAJPAYEE A G, GRODZINSKY A J. Cartilage-targeting drug delivery: can electrostatic interactions help? [J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(3): 183-193. DOI:10.1038/nrrheum.2016.210.

[18] O'CONNELL C, REN J X, POPE L, *et al*. Characterizing bioinks for extrusion bioprinting: printability and rheology [J]. Methods Mol Biol, 2020, 2140: 111-133. DOI:10.1007/978-1-0716-0520-2_7.

[19] SODUPE ORTEGA E, SANZ-GARCIA A, PERNIA-ESPINOZA A, *et al*. Efficient fabrication of polycaprolactone scaffolds for printing hybrid tissue-engineered constructs [J]. Materials (Basel), 2019, 12(4): E613. DOI:10.3390/ma12040613.

[20] O'CONNELL C D, KONATE S, ONOFRILLO C, *et al*. Free-form co-axial bioprinting of a gelatin methacryloyl bio-ink by direct *in situ* photo-crosslinking during extrusion[J]. Bioprinting, 2020, 19: e00087. DOI: 10.1016/j.bprint.2020.e00087.

[21] LI G Y, WANG L, PAN W, *et al*. *In vitro* and *in vivo* study of additive manufactured porous Ti_6Al_4V scaffolds for repairing bone defects[J]. Sci Rep, 2016, 6: 34072. DOI: 10.1038/srep34072.

[22] GONG L, LI J, ZHANG J W, *et al*. An interleukin-4-loaded bi-layer 3D printed scaffold promotes osteochondral regeneration[J]. Acta Biomater, 2020, 117: 246-260. DOI:10.1016/j.actbio.2020.09.039.

[23] GINESTRA P, PANDINI S, CERETTI E. Hybrid multi-layered scaffolds produced *via* grain extrusion and electrospinning for 3D cell culture tests[J]. Rapid Prototyp J, 2019, 26(3): 593-602. DOI: 10.1108/rpj-03-2019-0079.

[24] KILIAN D, AHLFELD T, AKKINENI A R, *et al*. 3D Bioprinting of osteochondral tissue substitutes—*in vitro*-chondrogenesis in multi-layered mineralized constructs[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 8277. DOI:10.1038/s41598-020-65050-9.

[25] DILOKSUMPAN P, DE RUIJTER M, CASTILHO M, *et al*. Combining multi-scale 3D printing technologies to engineer reinforced hydrogel-ceramic interfaces[J]. Biofabrication, 2020, 12(2): 025014. DOI:10.1088/1758-5090/ab69d9.

[26] CHEN L, DENG C J, LI J Y, *et al*. 3D printing of a lithium-calcium-silicate crystal bioscaffold with dual bioactivities for osteochondral interface reconstruction[J]. Biomaterials, 2019, 196: 138-150. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.005.

[27] GAO F, XU Z Y, LIANG Q F, *et al*. Direct 3D printing of high strength biohybrid gradient hydrogel scaffolds for efficient repair of osteochondral defect[J]. Adv Funct Mater, 2018, 28(13): 1706644. DOI: 10.1002/adfm.201706644.

[28] SAIDY N T, WOLF F, BAS O, *et al*. Biologically inspired scaffolds for heart valve tissue engineering *via* melt electrowriting[J]. Small, 2019, 15(24): e1900873. DOI: 10.1002/smll.201900873.

[29] O'CONNELL C D, BRIDGES O, EVERETT C, *et al*. Electrostatic distortion of melt-electrowritten patterns by 3D objects: quantification, modeling, and toolpath correction [J]. Adv Mater Technol, 2021, 6(11): 2100345. DOI: 10.1002/admt.202100345.

[30] HEJAZI F, BAGHERI-KHOULENJANI S, OLOV N, *et al*. Fabrication of nanocomposite/nanofibrous functionally graded biomimetic scaffolds for osteochondral tissue regeneration [J]. J Biomed Mater Res A, 2021, 109(9): 1657-1669. DOI:10.1002/jbm.a.37161.

[31] WORTMANN M, FRESE N, SABANTINA L, *et al*. New polymers for needleless electrospinning from low-toxic solvents[J]. Nanomaterials (Basel), 2019, 9(1): E52. DOI:10.3390/nano9010052.

[32] SAIDY N T, SHABAB T, BAS O, *et al*. Melt electrowriting of complex 3D anatomically relevant scaffolds[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 793. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00793.

[33] WUNNER F M, WILLE M L, NOONAN T G, *et al*. Melt electrospinning writing of highly ordered large volume scaffold architectures[J]. Adv Mater, 2018, 30(20): e1706570. DOI:10.1002/adma.201706570.

[34] CUI Z W, WRIGHT L D, GUZZO R, *et al*. Poly(d-lactide)/poly(caprolactone) nanofiber-thermogelling chitosan gel composite scaffolds for osteochondral tissue regeneration in a rat model[J]. J Bioact Compatible Polym, 2013, 28(2): 115-125. DOI: 10.1177/0883911512472278.

[35] STANSBURY J W, IDACAVAGE M J. 3D printing with polymers: challenges among expanding options and opportunities[J]. Dent Mater, 2016, 32(1): 54-64. DOI:10.1016/j.dental.2015.09.018.

[36] DERAKHSHANFAR S, MBELECK R, XU K G, *et al*. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: a review of recent trends and advances[J]. Bioact Mater, 2018, 3(2): 144-156. DOI:10.1016/j.bioactmat.2017.11.008.

[37] KUMAR H, SAKTHIVEL K, MOHAMED M G A, *et al*. Designing gelatin methacryloyl (GelMA)-based bioinks for visible light stereolithographic 3D biofabrication [J]. Macromol Biosci, 2021, 21(1): 2170001. DOI:10.1002/

mabi.202170001.

[38] SCHOONRAAD S A, FISCHENICH K M, ECKSTEIN K N, *et al*. Biomimetic and mechanically supportive 3D printed scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering using photopolymers and digital light processing [J]. Biofabrication, 2021, 13(4). DOI:10.1088/1758-5090/ac23ab.

[39] ZHU S A, CHEN P F, CHEN Y, *et al*. 3D-printed extracellular matrix/polyethylene glycol diacrylate hydrogel incorporating the anti-inflammatory phytomolecule honokiol for regeneration of osteochondral defects[J]. Am J Sports Med, 2020, 48(11): 2808-2818. DOI:10.1177/0363546520941842.

[40] DENG C J, LIN R C, ZHANG M, *et al*. Micro/nanometer-structured scaffolds for regeneration of both cartilage and subchondral bone[J]. Adv Funct Mater, 2019, 29(4): 1806068. DOI:10.1002/adfm.201806068.

[41] KHADER A, ARINZEH T L. Biodegradable zinc oxide composite scaffolds promote osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Biotechnol Bioeng, 2020, 117(1): 194-209. DOI:10.1002/bit.27173.

[42] LIU X M, WEI Y Q, XUAN C K, *et al*. A biomimetic biphasic osteochondral scaffold with layer-specific release of stem cell differentiation inducers for the reconstruction of osteochondral defects [J]. Adv Healthc Mater, 2020: e2000076. DOI:10.1002/adhm.202000076.

[43] ZHU M, HE X, XIN C, *et al*. 3D printing of an integrated triphasic MBG-alginate scaffold with enhanced interface bonding for hard tissue applications[J]. J Mater Sci Mater Med, 2020, 31(12): 113. DOI:10.1007/s10856-020-06459-6.

[44] MANCINI I A D, VINDAS BOLAÑOS R A, BROMMER H, *et al*. Fixation of hydrogel constructs for cartilage repair in the equine model: a challenging issue[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2017, 23(11): 804-814. DOI:10.1089/ten.TEC.2017.0200.

[45] MANCINI I A D, SCHMIDT S, BROMMER H, *et al*. A composite hydrogel-3D printed thermoplast osteochondral anchor as example for a zonal approach to cartilage repair: *in vivo* performance in a long-term equine model [J]. Biofabrication, 2020, 12(3): 035028. DOI:10.1088/1758-5090/ab94ce.

[46] 段小军, 王富友, 杨柳, 等. 应用凝胶接种技术体外分层构建工程化骨软骨复合组织的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(20): 1969-1972. DOI:10.3321/j.issn:1000-5404.2009.20.013.
DUAN X J, WANG F Y, YANG L, *et al*. Preparation of laminated construction of engineered osteochondral tissue with proteic-gel technology *in vitro*[J]. J Third Mil Med Univ, 2009, 31(20): 1969-1972. DOI:10.3321/j.issn:1000-5404.2009.20.013.

[47] HARLEY B A, LYNN A K, WISSNER-GROSS Z, *et al*. Design of a multiphase osteochondral scaffold Ⅲ: Fabrication of layered scaffolds with continuous interfaces [J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 92(3): 1078-1093. DOI:10.1002/jbm.a.32387.

[48] ZHAI C J, FEI H, HU J Z, *et al*. Repair of articular osteochondral defects using an integrated and biomimetic trilayered scaffold[J]. Tissue Eng A, 2018, 24(21/22): 1680-1692. DOI:10.1089/ten.tea.2018.0086.

[49] 杨柳, 王富友. 医学 3D 打印多孔钽在骨科的应用[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(19): 1859-1866. DOI:10.16016/j.1000-5404.201908136.
YANG L, WANG F Y. Progress of 3D printed porous tantalum in orthopedics[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(19): 1859-1866. DOI:10.16016/j.1000-5404.201908136.

[50] TETTEH E S, BAJAJ S, GHODADRA N S. Basic science and surgical treatment options for articular cartilage injuries of the knee[J]. J Orthop Sports Phys Ther, 2012, 42(3): 243-253.

(**收稿**:2021-12-23;**修回**:2022-05-19)

(编辑 张 维)