

三维微流道支架直接压印成形方法

王烨, 贺健康, 刘亚雄, 庞师坤, 张文友, 李涤尘

(西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 针对软质生物材料支架内部三维微结构成形难题,提出了结合分层制造、微压印与冷冻干燥技术的三维微流道支架直接压印成形方法. 通过开发自动化成形设备,实现了材料溶液填充、微结构压印、结构预冻、层间黏结等工艺过程的可控化,从而解决了传统手工操作所造成的结构重复性差、成形效率低等问题. 研究了模具表面等离子处理、亲水物质添加、改变溶液填充方式等工艺对自动化成形过程中微结构复型性能的影响. 结果表明,向材料溶液中添加微量亲水物质并辅助溶液填充引导,可实现软质水溶性天然生物材料内部复杂微流道结构的精确三维压印成形. 通过工艺装备保证了成形过程的自动化和稳定性,从而实现了支架微结构制造的可重复性与可控性.

关键词: 三维微流道; 压印成形; 分层制造; 组织工程

中图分类号: Q811.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2012)10-0116-05

Direct Imprinting of Three-Dimensional Microfluidic Scaffolds

WANG Ye, HE Jiankang, LIU Yaxiong, PANG Shikun, ZHANG Wenyong, LI Dichen

(State Key Laboratory for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: Focusing on constructing complex internal microstructures in soft biomaterials, a novel method is presented to directly fabricate three-dimensional microfluidic scaffolds by combining layer-by-layer fabrication, microimprinting and freeze drying techniques. An automatic fabrication device is developed to realize the controllable processes containing solution casting, microstructure imprinting, freezing and layer binding, to make up poor repeatability and low efficiency in the traditional manual operations. The effects of mold treatment, surfactant addition in material solution as well as solution types on the microstructural replication are investigated. The results demonstrate that combining surfactant addition and guided casting process facilitate the precision fabrication of complex internal microfluidic channels in soft biomaterials. The presented scaffold fabrication process ensures the controllability and reproducibility of predefined microstructures.

Keywords: three-dimensional microchannel; imprinting; layer-by-layer fabrication; tissue engineering

组织工程结合了工程科学与生物科学的原理和方法,制造出具有生物活性的人工替代物,用以恢复、维持或改善组织、器官的功能. 自 20 世纪 80 年代以来,国内外围绕种子细胞、支架材料与结构、体外组织构建等方面开展了大量的研究工作,目前在

皮肤、膀胱、软骨等简单组织与器官再造方面已进入临床或临床实验阶段^[1-4],但是在肝脏、肺等重要器官的再造方面至今未取得突破性进展,其难点之一在于如何能够模拟自然器官内部的血管系统,制造出具有复杂三维微流道系统的支架,从而为支架内

收稿日期: 2012-05-10. 作者简介: 王烨(1987—),男,硕士生;刘亚雄(通信作者),男,副教授. 基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(2009AA043801);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(XJJ2011067, XJTU-HRT-002).

网络出版时间: 2012-07-05

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1069.T.20120705.1028.001.html>

部细胞的生存提供所需的营养。

先进制造技术为制造复杂微流道支架提供了可能。Huang 等^[5]采用选择性激光烧结技术,用聚己内酯(PCL)材料制造出包含多级分枝流道的肝组织支架;Stephen 等^[6]结合三维印刷技术和盐析法,用乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA)制造出用于肝细胞培养的、内含网状相连的管道化支架。但是,这些方法多适用于机械强度与加工性能较好的人工合成生物材料,无法直接用于成形与自然器官细胞外基质接近的水溶性天然生物材料,如胶原、明胶、壳聚糖、丝素蛋白等。在水溶性天然生物材料支架内构建复杂的三维微流道系统,虽有研究提出先构建单层支架结构,然后手动叠加或卷裹形成三维结构的制造方法^[7-8],但是其结构可控性与重复性较差、效率较低。为此,本文面向天然可降解生物材料,提出了一种能够直接成形包含复杂空间微流道的三维器官支架的工艺方法,研制开发了相应的软硬件系统,实现了组织工程支架制作的自动化、规范化。

1 成形原理与工艺方法

快速成型技术是基于分层制造原理发展起来的一种新的材料增材制造方法,是在计算机的控制下,通过二维结构逐层叠加实现三维实体的可控制造。由于在宏观外形与微观内部结构一体化制造方面的优势,利用快速成型技术制造具有复杂结构的组织工程支架逐渐被重视。但是,目前的快速成型技术(如熔融沉积、光固化、三维打印等)要求材料具有特定的属性(如光交联或成形过程需要较高温度、使用黏结剂)才能实现材料成形,这极大地限制了生物材料的使用,特别是具有优异生物相容性、加工性能差的水溶性天然生物材料。为此,本研究借鉴快速成型的分层制造原理,结合微压印与冷冻干燥技术,提出了适合水溶性天然生物材料微结构成形的原理与工艺方法。该成形方法主要是利用水溶性材料在低温下的凝固特性实现单层冰冻结构成形,当已成形的冰冻结构和待成形的材料溶液接触时,一方面材料溶液会使冰冻结构表面局部融化,另一方面冰冻结构作为冷源使材料溶液快速冷冻凝固,从而实现层间牢固粘结。

该成形方法的具体工艺过程如图 1 所示。首先向模具中加入支架溶液,将溶液压印出带有结构的单层支架,同时利用干冰将溶液完全冷冻后脱模;然后采用分层制造技术,制作下一层支架,通过温度传递将下层支架溶液冷冻,逐层叠加,直到层数达到要

求;最后对冷冻的三维结构进行冷冻干燥,得到三维微流道支架。

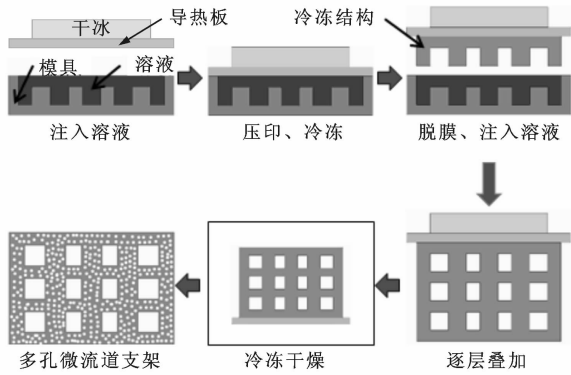


图 1 生物材料微结构成形工艺流程

2 实验平台构建

通过和陕西恒通智能机器有限公司合作,开发出 CIS250A 型三维压印快速成形机,如图 2 所示。它主要由以下几个部分组成:注射泵,模具,干冰盒,溶液盒及 X、Y、Z 3 个方向的移动平台。注射泵带动注射器实现溶液的吸取或注射操作,干冰盒用来盛放干冰,溶液盒内可以盛放两种溶液,以实现不同材料的成形。移动平台 X、Y 方向的运动改变注射器的 X、Y 方向以及干冰盒 Y 方向的位置。Z 工作平台有两个作用:一是固定模具以及溶液盒;二是上下移动,配合注射器的位置实现注射器进入溶液盒内吸取溶液或注射器到达模具上方向模具内注射溶液,同时也执行压印和脱模动作。

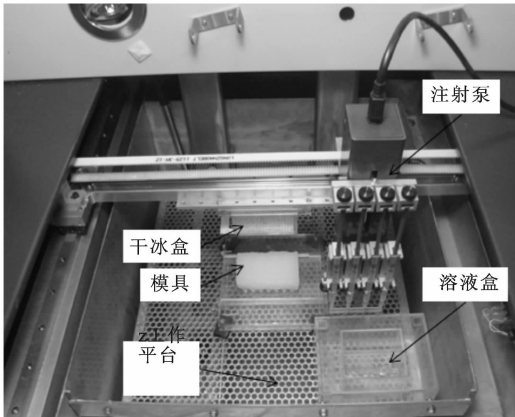


图 2 三维压印快速成形实验平台

3 工艺实验

3.1 实验材料及设备

实验材料:生蚕丝、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、

表面活性剂 Triton X-100、干冰。

实验设备: CIS250A 型压印成形机、VFD2000 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)、等离子清洗机(Harrick Plasma, 美国)。

3.2 模具制备

利用 Pro/Engineer 软件设计出具有微流道结构的支架 CAD 模型, 将 CAD 模型导出 STL 数据格式, 将 CAD 模型加工成树脂支架实体。将树脂支架有规律地粘在具有平整底面的容器内, 将 PDMS 与固化剂以 100:1.5 的质量比混合均匀, 真空条件下灌入容器内, 在室温下放置 12 h 使 PDMS 完全固化, 脱模后即可获得包含支架结构负型的 PDMS 模具。

3.3 溶液制备

丝素蛋白溶液的配备分为 3 个过程^[9]: ①脱胶, 将蚕丝置于浴比 5:100、 $w(\text{Na}_2\text{CO}_3)$ 为 0.21% 的液中煮沸 30 min, 然后将熟丝放入到蒸馏水中, 一次搅拌 20 min, 搅拌两次, 再用蒸馏水冲洗 3 次后置于烘箱(50 °C)中烘干; ②透析, 将完全脱胶的蚕丝在 60 °C 的溴化锂溶液中浸泡 4 h 使其完全溶解, 用截流分子量为 3 500D 的透析袋浸泡在纯净水中透析 3 d, 每天早中晚各换一次水, 得到丝素蛋白水溶液; ③离心, 将其放到离心机上离心 30 min(5 000 r/min, 4 °C)得到丝素蛋白水溶液, 最后调整溶液的质量分数为 5%。

3.4 溶液填充

3.4.1 亲水性处理 PDMS 具有易加工、物理化学特性稳定等特点, 但是疏水性很强, 为了获得更佳的复模精度, 在使用前有必要对其表面进行改性。常用的一些改性方法有: 等离子体清洗、臭氧紫外辐射、表面活性剂处理等^[10]。本实验采用等离子体清洗和表面活性剂 Triton X-100 处理。为了验证亲水性处理的必要性以及哪种处理方法中更具有优越性, 对两种方法进行了对比。实验分 3 组: 不做任何亲水性处理, 用等离子处理 PDMS 模具, 向溶液中加入质量分数为 1.0% 的 Triton X-100。

首先研究等离子处理时间对 PDMS 模具亲水性的影响。处理时间分别为 0、30、60、120、150、200 s, 然后使用光学接触角测量仪测量静态接触角, 每组实验取 5 个点测量, 结果取平均值, 接触角与处理时间的关系如图 3 所示。从图 3 可以看出, 当处理时间小于 60 s 时, PDMS 模具的接触角呈快速递减趋势, 当处理时间大于 60 s 时, 接触角并没有随着时间的延长而出现明显变化。因此, 后续实验将 PDMS

的处理时间定为 60 s。

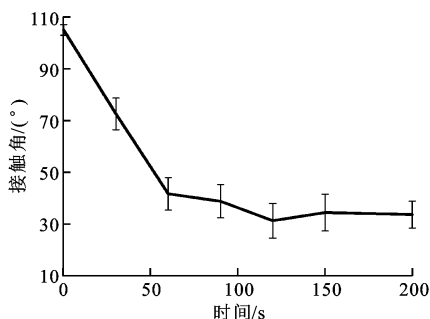
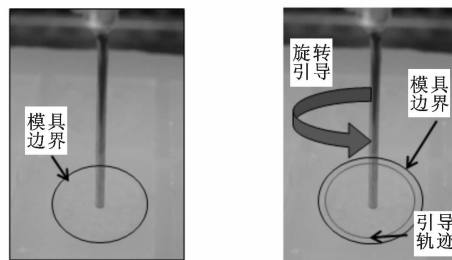


图3 接触角与等离子处理时间的变化关系

3.4.2 溶液的添加方式 除了采用亲水性处理, 本文还研究了溶液的添加方式对溶液表面平整度及复形精度的影响。设计了两种溶液添加方式(如图 4 所示): 方式一是将注射器置于模具中心正上方, 调整好注射头和模具面的距离, 定点注射; 方式二是在方式一的基础上, 增加引导动作, 即待溶液注射完成后, 注射器沿模具边缘旋转 2 圈。

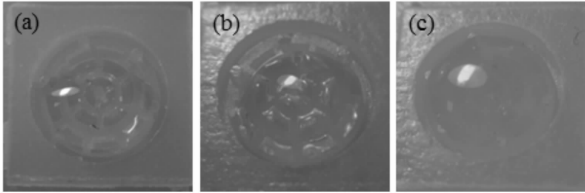


(a) 方式一: 定点填充 (b) 方式二: 定点填充后旋转引导

图4 溶液的添加方式

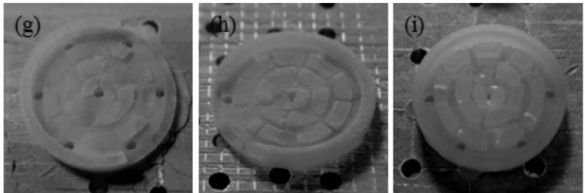
将 3.4.1 小节中的 3 组实验分别采用上述两种添加方式进行, 形成 6 个实验小组, 向同一个模具加入相同量的溶液, 观察溶液在模具中的分布情况, 实验结果如图 5 所示。从图 5 可以看出, 无论采取哪种添加方式, 空白对照组、等离子处理组以及 Triton X-100 组溶液在模具中铺开的面积逐渐增大。无论采用哪种亲水性处理方式, 方式二溶液在模具中铺开的效果都要好于方式一。使用方式二添加溶液, 采用不同的亲水性处理方式, 溶液冷冻后观察支架的结构。对比图 5g 和图 5h 发现, 用等离子处理模具的效果并不显著, 溶液并没有进入到模具的结构内部, 使得支架结构内部的深度明显不足, 原因可能是等离子对 PDMS 模具内部结构无法进行有效的处理。加 Triton X-100 的实验组(见图 5i), 结构内部深度较另两个实验组有明显的提高, 所以后续的实验中将

亲水性处理方式定为向溶液中加入表面活性剂 Triton X-100,将溶液的添加方式定为方式二.



(a)无处理, 方式一 (b)等离子处理, 方式一 (c)加 Triton X-100, 方式一

(d)无处理, 方式二 (e)等离子处理, 方式二 (f)加 Triton X-100, 方式二



(g)无处理,方式二下的冷冻结构 (h)等离子处理,方式二下的冷冻结构 (i)加 Triton X-100,方式二下的冷冻结构

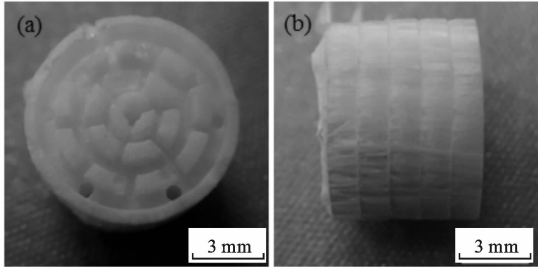
图 5 亲水性处理和溶液添加方式对支架成形的影响

3.5 工艺实验结果

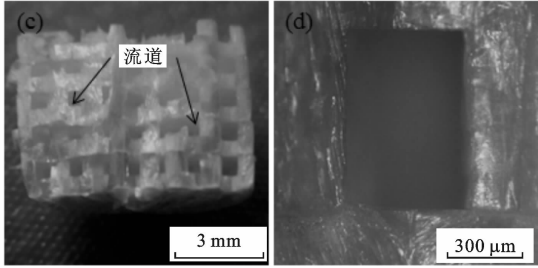
将水溶液和丝素蛋白溶液(Triton X-100 的质量分数为 1.0%)分别倒入溶液盒 1、2,将干冰切成块状放入干冰盒,打开计算机软件,设置每层冷冻的时间、每层溶液的添加量、单层支架的厚度,支架制作开始.使用冷冻干燥机将上述过程冷冻的三维结构冻干,制作完成的支架如图 6 所示.从图 6 可以看出,支架的正面结构清晰,外表虽然有层与层叠加的痕迹,但是并没有断开.沿支架中轴线切开后的剖面如图 6c 所示,层与层之间的流道并没有在压印的时候被溶液填充,且形状保持良好.以上结果表明,用该方法制作三维微流道支架是完全可行的.

4 讨 论

组织工程支架的作用是为细胞的生长提供模板和载体,同时通过其内部的多孔与管道结构为细胞供给营养.为了尽可能地模仿自然器官内复杂的血



(a) 支架正面 (b) 支架侧面



(c) 支架剖面 (d) 支架内部流道

图 6 三维微流道支架

管网络,三维微流道支架的制造成为当前生物制造领域的研究重点.与传统的组织工程支架制造方法相比,快速成型技术采用分层制造原理,具有明显的优势. Huang 等^[5]采用选择性激光烧结技术(SLS)制造出的包含多级分支流道的 PCL 肝组织支架,孔径为 100~200 μm ,孔隙率为 89%,将 HepG2 细胞种植在此支架上培养了 9 d,和没有流道的支架相比,该支架更有利于细胞的生长及功能的表达. Tseng 等^[11]采用光固化的方法,用光固化聚合物制造了含有微结构的三维支架,为了更好地让细胞贴附在支架表面,用 I 型胶原蛋白对支架表面进行修饰,将原代肝细胞在支架上培养了 6 d,与单层细胞贴壁培养相比,该支架更有利于保持肝细胞功能.但是,这些制作支架的方法要求材料具有较好的加工特性,从而限制了水溶性天然生物材料的应用. Papenburg 等^[8]先制作多孔的片层微流道支架,然后通过手工叠加或卷裹的方法制作三维支架,将 C2C12 前成肌细胞和 A4-4 细胞种植在支架片层上,在动态培养条件下,营养物通过流道运输到各层,提高了各层细胞的生长状况,但是支架制作效率低,结构可控性差.

本文提出的支架制作方法在制作过程中将溶液冷冻成形,不会改变材料的性质,有利于保持活性因子的活性,同时对使用的材料没有特殊的要求,因此可使用的材料范围广,既可以使用天然生物材料如

胶原、水凝胶、丝素蛋白等,又可以使用人工合成高分子材料如 PCL、PLGA 等. 支架的结构由模具的结构决定,所以如果模具的结构变小,理论上制造出来的支架结构也会更小,流道网络更丰富. 制作过程由计算机进行控制,从而解决了传统手工操作造成的结构重复性差、成形效率低等问题.

虽然采用本研究构建的三维压印平台能够用水溶性天然生物材料制造三维微流道支架,但是还有许多工艺需要进行深入的研究. 例如:通过优化溶液的体积或压印的位移量来增强层间黏结强度;通过理论分析与实验相结合的方式,分析每层溶液冷冻时的温度场分布,优化每层溶液的冷冻时间,进一步提高支架制造效率;对支架的生物学性能进行评测等.

5 结 论

针对天然软质生物材料内部三维微结构成形难题,本文提出了结合分层制造、微压印与冷冻干燥技术的三维微流道支架直接压印成形方法. 研制了 CIS250A 型三维压印快速成形平台,实现了材料溶液填充、微结构压印、层间黏结、结构预冻等工艺过程的自动化. 研究了模具表面等离子处理、亲水物质添加、改变溶液填充方式等工艺对自动化成形过程中微结构复型性能的影响. 结果表明,向材料溶液中添加微量亲水物质并辅助溶液填充引导,可实现软质水溶性天然生物材料内部复杂微流道结构的精确三维压印成形. 该工艺装备保证了成形过程的自动化和稳定性,从而实现了用水溶性天然生物材料制作三维微流道支架的可重复性与可控性.

参考文献:

- [1] FUCHS J R, NASSERI B A, VACANTI J P. Tissue engineering; a 21st century solution to surgical reconstruction [J]. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2001, 72(2): 577-591.
- [2] ATALA A, BAUER S B, SOKER S, et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty [J]. *Lancet*, 2006, 367(9518): 1241-1246.
- [3] GROEBER F, HOLEITER M, HAMPEL M, et al. Skin tissue engineering; in vivo and in vitro applications [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, 63(4/5): 352-366.
- [4] PAVESIO A, ABATANGELO G, BORRIONE A, et al. Hyaluronan-based scaffolds(hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects; preliminary clinical findings [J]. *Novartis Found Symp*, 2003, 249(2): 203-241.
- [5] HUANG H Y, OIZUMI S, KOJIMA N, et al. Avicidin-biotin binding-based cell seeding and perfusion culture of liver-derived cells in a porous scaffold with a three-dimensional interconnected flow-channel network [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(26): 3815-3823.
- [6] STEPHEN S K, HIROFUMI U, JOHN A K, et al. Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels [J]. *Ann Surg*, 1998, 228(1): 8-13.
- [7] 赵倩,刘亚雄,高琨,等. 肝组织工程支架的仿生设计与有限元分析[J]. *西安交通大学学报*, 2011, 45(8): 108-112.
- ZHAO Qian, LIU Yaxiong, GAO Kun, et al. Bionics design and finite-element analysis for liver tissue engineering scaffold [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University*, 2011, 45(8): 108-112.
- [8] PAPPENBURG B J, LIU Jun, HIGUERA G A, et al. Development and analysis of multi-layer scaffolds for tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(31): 6228-6239.
- [9] ROCKWOOD D N, PREDA R C, YUCEL T, et al. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin [J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(10): 1612-1631.
- [10] ZHOU Jinwen, ELLIS A V, VOELCKER N H. Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices [J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(1): 2-16.
- [11] TSENG Ming Hsieh, CHIEN Wei Benjamin Ng, KARTHIKEYAN Narayanan, et al. Three-dimensional microstructured tissue scaffolds fabricated by two-photon laser scanning photolithography [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(30): 7648-7652.

(编辑 杜秀杰)