

DOI: 10.3901/JME.2023.19.237

生物 3D 打印研究进展：动物、植物及微生物细胞的增材制造

李佩锡^{1,2} 周德志¹ 杨长明¹ 饶玮祎^{1,3} 林峰¹ 欧阳礼亮¹

(1. 清华大学机械工程系 北京 100084;
2. 清华大学未央书院 北京 100084;
3. 清华大学探微书院 北京 100084)

摘要：生物有机体的仿生制造对人类探索和运用生命机制具有重要意义。生物 3D 打印基于计算机三维模型，精准控制活细胞、生物材料、生化因子等物质的空间位置，可以模拟人体的组织结构，制造具有复杂异质性的仿生生物组织，并应用于基础研究和临床转化。近年来，生物 3D 打印技术还拓展到了植物细胞培养以及微生物合成发酵等领域，展现出巨大的应用潜力。本文将介绍生物 3D 打印技术的基本原理及最新进展，并从动物、植物和微生物细胞打印三方面综述应用现状及挑战，以期对广义生物 3D 打印的技术发展及应用趋势进行全面梳理。

关键词：生物 3D 打印；动物细胞打印；植物细胞打印；微生物细胞打印

中图分类号：TG156

Advances in 3D Bioprinting: Additive Manufacturing of Living Cells from Animal, Plant, and Microbe

LI Peixi^{1,2} ZHOU Dezhi¹ YANG Changming¹ RAO Weiyi^{1,3} LIN Feng¹
OUYANG Liliang¹

(1. Department of Mechanical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084;
2. Weiyang College, Tsinghua University, Beijing 100084;
3. Tanwei College, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: The bionic manufacturing of biological organisms is of great significance to the exploration and exploitation of life mechanisms. Based on computer-aided design and control, 3D bioprinting can spatially manipulate living cells, biomaterials, biochemical factors, and other substances. It can produce biological tissue constructs that mimic the structural complexity and component heterogeneity of native tissues for fundamental research in life science and clinical translation in medicine. In recent years, 3D bioprinting technology has also been used in plant cell culture and microbial synthesis with great potential. This paper will introduce the basic principles and recent advances of 3D bioprinting technologies, and overview the applications of bioprinting animal, plant, and microbial cells by providing the most recent examples. This paper will also discuss the challenges and opportunities and aims to provide a vision for the trends in the field.

Key words: 3D bioprinting; animal cell printing; plant cell printing; microbial cell printing

0 前言

生物有机体的结构复杂性和成分异质性是其仿生制造的两个主要难题。增材制造基于“自下

而上”的单元沉积原理，能够实现自由成形制造，有望满足生物组织仿生制造的复杂性和异质性要求。基于此，生物 3D 打印应运而生，它指的是基于增材制造思想，使用活细胞、生物材料、生化因子等成分为原材料，按照仿生形态学及生物体功能的要求，制造生物体组织及其模型的一类技术^[1]。通常意义上的生物 3D 打印以活细胞为基

本原材料之一，而载细胞的打印原材料则被称为生物墨水^[2]。应当明确，本文所指的生物 3D 打印或细胞增材制造并非利用增材制造技术构建细胞，而是以细胞为原材料采用增材制造技术构建生物体组织及其模型。

早在 2003 年，研究者就尝试了将活细胞悬液装载到改装后的喷墨打印机中进行打印，取得了较高的细胞存活率^[3]。2004 年至 2005 年，中美研究者各自独立发表了挤出式细胞打印的研究工作，验证了打印载细胞三维结构的可能性^[4-7]。在随后的十余年中，细胞打印蓬勃发展，在打印制造能力、生物墨水材料以及生物医学应用等方面取得了显著进展^[8-9]。生物 3D 打印早期被当作组织工程的一类新兴使能技术，目标是构建具有生理功能的组织和器官，应用于病损组织的移植修复。近年来，生物 3D 打印也被用于构建仿生的体外组织模型，应用于病理学研究、药物筛选等方面，还被应用于人造肉的生产。上述研究主要围绕动物细胞，特别是哺乳动物细胞展开，这也是目前生物 3D 打印的主要研究内容。近年来，这种活细胞的增材制造技术也被其他领域所关注，已有大量研究报道了包括植物细胞打印、微生物细胞打印在内的生物 3D 打印。3D 打印与植物细胞培养结合，有望能解决细胞固定化以及个性化结构制造的难题；而 3D 打印与微生物制造的结合，则有望更高效地生产微生物代谢产物。此外，还有研究者尝试了不同界类的活细胞共打印，构建跨界共生系统。

本文基于 Web of Science 数据库整理了上述不同类型细胞的生物 3D 打印研究工作(不包括综述论文，统计时间截止到 2023 年 2 月 8 日)，统计出各领域每年的研究论文发表数量如图 1 所示。由图 1 可知，生物 3D 打印发展距今近 20 年，自 2012 年开始，动物细胞 3D 打印的研究论文呈现指数型增长趋势，在 2022 年已突破 600 篇。在动物细胞 3D 打印领域，挤出式打印占比接近 80%，光投影式打印的研究论文数目也随着打印技术的改进而逐年增多。植物细胞 3D 打印起步较晚，于 2017 年首次报道^[10]，截止 2022 年只有不到 10 篇的研究论文发表，它们全部采用挤出式打印方法。值得注意，本文在统计过程中并未将藻类细胞的打印归类为植物细胞打印，而将其归类为微生物细胞打印。微生物细胞 3D 打印的出现早于植物细胞 3D 打印^[11]，2011 年首次报道利用了液滴喷射式进行细菌打印，但后续发表的相关研究工作仍以挤出式打印为主，累计研究论文体量在 20 篇左右。

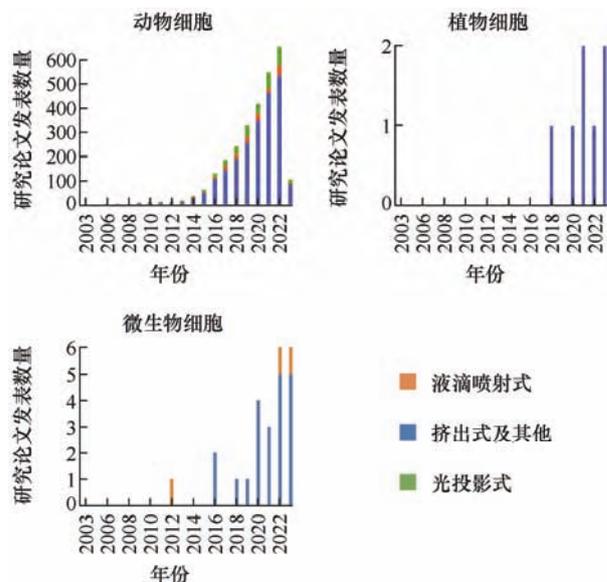


图 1 不同类型细胞的生物 3D 打印研究论文发表数量统计

目前，尚缺少系统性综述论文，对上述前沿研究进展进行整理。本论文将立足广义的生物 3D 打印，系统介绍动物细胞、植物细胞以及微生物细胞增材制造的最新进展和应用现状。

1 生物 3D 打印技术研究进展

3D 打印技术主要分为液滴喷射式、挤出式、光投影式三大类。本节将对三类技术的基本原理及近年来代表性技术突破进行简要介绍。

1.1 基本原理

液滴喷射式生物打印(Droplet-based bioprinting)指的是以微小液滴作为打印的基本结构单元，通过按需式喷墨打印等方法将液滴喷射到基板上的打印方式。该方式通过控制喷射速度、三维运动平台的运动以实现不同的二维或三维结构打印。

微丝挤出式生物打印(Extrusion bioprinting)指的是通过气动、机械推动等驱动方式，将流体状生物材料挤出并沉积在基板上的打印方式。该方式通过控制挤出速度、三维运动平台的运动以实现定制化的三维结构打印，打印沉积过程类似于热塑性材料的熔融沉积过程。

光投影式生物打印(Vat polymerization bioprinting)，也统称为液缸聚合生物打印，指的是利用光固化材料的光引发固化特性，将光束按需投影到材料的前驱体溶液中，以实现材料按需固化的打印方式。该方式通过控制光束的投影位置和投影时间以实现不同三维结构的制造。

综上，液滴喷射式和微丝挤出式分别实现零维液滴和一维微丝的产生与增材式沉积，而光投影式

则通过对液相材料空间选择性光固化实现固相结构的增材式制造。

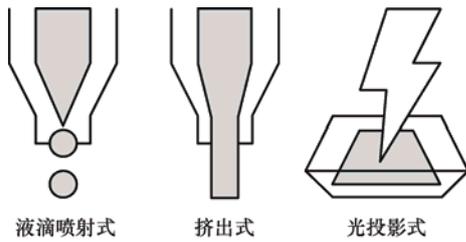


图2 液滴喷射式、挤出式、光投影式三类生物3D打印技术示意图

1.2 技术挑战及代表性突破

实现仿生生物有机体的结构复杂性和成分异质性,是生物3D打印的两大技术难点,上述三种打印方式在这方面面临不同的挑战并在近年来取得了相应的突出进展。

(1) 结构复杂性。

液滴喷射式打印可以产生体积小至皮升级的液滴,在精细的二维图案化打印方面具有显著优势。然而,这类载细胞的液滴一般粘度较低,如果在沉积过程中无法得到及时交联,则容易流失并显著影响打印精度和结构复杂度。以喷墨打印为例,目前研究可以完成简单多层载细胞水凝胶结构的打印,但三维仿生复杂结构的构建存在较大困难。针对该挑战,CHRISTENSEN等^[12]采用喷墨打印方法,将含成纤维细胞的海藻酸生物墨水打印在氯化钙交联溶液中,成功打印出了具有水平和垂直分叉的血管样结构,实现了中空管状结构的构建。然而,上述尝试仍面临效率较低、结构较为简单等问题。可见,液滴喷射式打印构建复杂三维结构模型仍具有较大的局限性。

挤出式打印以挤出的载细胞生物材料微丝为单元,微丝直径一般在100 μm以上,通常认为精度不如液滴喷射式方法。但是,挤出式打印的硬件装置结构简单、材料适用性广泛,能够较快地实现大尺寸复杂结构的成形。挤出式打印通常在一个平面上进行层层堆积成形,对于悬臂梁及内部空腔等结构特征的实现依然存在较大难度。为了进一步提高复杂结构成形能力,近年来衍生出了悬浮挤出式生物打印技术。例如,HINTON等^[13]通过使用具有热可逆、剪切变稀以及良好生物相容性的颗粒状水凝胶作为支撑浴,将载细胞水凝胶墨水打印在其中,后续通过去除支撑材料,得到复杂的三维类组织结构。该方法有效解决了软材料打印以及悬臂梁等结构缺少支撑的问题,且能实现小至20 μm微丝的挤出打

印,提高了结构的打印精度和复杂度。

光投影式打印的显著优点是三维成形能力强、精度高,经典的立体光刻(SLA)和数字光投影(DLP)技术能实现生物水凝胶数十微米级的打印精度,而双光子打印方法则能构造微米尺度的细胞外基质结构^[14]。然而,光刺激以及液缸中必要的光吸收剂和引发剂会显著影响墨水中细胞的活性。对此,GRIGORYAN等^[15]筛选到一种生物相容性良好的光吸收剂,实现了高度复杂的水凝胶管腔状结构的打印,并证明了良好的细胞相容性。SLA和DLP打印方法基于经典的层层堆积成形原理,需要打印承接平台的支持以及层与层切换时液缸中墨水的流动填充,而对于悬臂和中空结构,一般则需要同步打印出支撑结构。近年来,体积光投影打印技术也被运用到细胞打印中来,如BERNAL等^[16]反向应用医学断层成像的原理,按照待制造物体沿着环向多个旋转角的投影进行曝光,从而使感光聚合物交联,得到了高密度细胞负载的复杂组织结构。这种方法不需要打印支撑,也显著地提高了成形速度。

(2) 成分异质性。

对于液滴喷射式和挤出式这两类基于材料单元沉积的技术,实现打印结构的成分异质性的主要手段是使用多墨盒/喷头,或在打印过程中采用多通道微流控进行多墨水控制。对于液滴喷射式打印,LEE等^[17]使用多喷墨盒的喷墨打印机,分别对含成纤维细胞、角质形成细胞的生物墨水进行打印,产生相邻的内成纤维细胞层和外角质形成细胞层,成功构建了分层的皮肤组织。DEMIRCI^[18]通过将微流控系统集成到液滴喷射的喷射器中,实现在同一个平台上同时打印多种生物材料,如活细胞、细胞外基质蛋白、营养物质、治疗药物和生长因子。

多喷头联动打印是挤出式生物打印中发展较早的针对多材料打印而衍生出的打印手段^[19],其在构造成分异质性方面展现出了较大潜力。例如,KANG等^[20]开发了一种集成的多喷头生物3D打印机,通过将载细胞的水凝胶、牺牲性水凝胶以及可生物降解的聚合物共同打印,实现了力学性能优异的个性化三维组织植入物的构建。目前,市面上商业化的挤出式生物3D打印机也大都提供多喷头联动的模块,满足多材料打印需求。此外,通过采用同轴、多通道合一等特制喷头,并结合微流控等流体控制技术,可以实现多种材料可控程序化沉积,实现打印结构中更灵活的成分异质性。例如,LIU等^[21]采用七通道合一的喷头进行打印,通过控制各通道的开闭而仅用一个喷头完成不同成分墨水的打印,使

得打印结构的成分可变性大大提升。近年来,研究者也试图在微丝成形单元内部进行异质性的设计,以期同步提高成形精度和异质性。例如,微凝胶球或细胞团簇被用来和其他载细胞水凝胶溶液混合,构建复合生物墨水,打印构建局部含有异质组分或孔隙的三维结构^[22-23]。

光投影式打印方法只能在液缸中添加一种墨水成分,极大限制了这类技术的异质性成形能力。在 DLP 工艺中,通过改变每一层掩膜图案的灰度或光强,可以改变不同层墨水的光交联程度,得到在 Z 轴方向上具有异质性交联程度和力学性能的结构。更直接地,研究者可以将成形平台在装有不同墨水的液缸之间切换,以实现不同材料或细胞的切换。例如, KHATRI 等^[24]开发了一个多材料光固化成型系统(MMSL),该系统通过软件控制底板在三个装有不同材料的液缸中切换,并控制单次固化的形状,成功实现了多材料光固化成型。在切换不同液缸时,一个重要问题是如何清洗结构上残余的未交联墨水,目前通常采用液体清洗、吹气冲刷以及离心力甩脱等方法^[25]。为了节省不同缸之间切换的时间和简化操作, HAN 等^[26]在投影微立体光刻(Projection micro-stereolithography)工艺中加入了动态液流控制装置,将不同的墨水材料可控地递送到成形位置,实现更加灵活的多材料异质组分的成形。

2 动物细胞 3D 打印研究进展

动物细胞 3D 打印主要以哺乳动物细胞,特别是人源细胞为原材料,进行生物墨水的配制,制造三维仿生组织结构,应用于组织修复再生、体外模型构建以及人造肉生产等领域。

2.1 组织修复再生

组织与器官的损伤显著影响着人们的生命健康,当组织缺损的程度超过自身修复能力范围时,一般需要移植组织替代物进行修复再生。传统的自体移植和异体移植存在着供体源短缺的问题,而异种移植则面临免疫排斥、伦理道德等风险。工程化组织移植是应对该困境重要的方式,而生物 3D 打印技术则为组织器官再造提供了使能技术,为再生医学注入了新的活力。目前生物 3D 打印在组织修复再生领域的使用,既涉及到结构、成分相对简单的组织,如皮肤、骨、软骨,也涵盖结构较为复杂、成分异质性程度较高的复杂器官,如心脏、肝脏等。

生物 3D 打印应用于组织器官构建的显著优势是个性化制造。例如,在皮肤修复临床实践中,常

规的组织工程真皮替代物一般是标准化的产品,很难定制大小和形状,难以适应不同深度或形状的伤口。生物 3D 打印技术的引入为改善创面皮肤再生提供了新的方法。2017 年, POURCHET 等^[27]利用无支架生物打印技术构建了皮肤贴片,其打印速度以及真皮的分化效率相较于传统皮肤组织工程方法具有显著优势。2019 年, ALBANNA 等^[28]结合扫描成像与喷墨式细胞打印技术,构建出一个可移动的原位皮肤生物打印系统。该系统能够利用扫描成像技术快速成像,并生成创伤模型与打印模型,再通过喷墨打印技术快速高精度地沉积生物材料和细胞,精确地将合适的细胞类型输送到伤口的特定区域。类似地,生物 3D 打印技术的引入为原位骨、软骨组织修复提供了新的发展契机,有望应对紧急事故中这类组织的个性化修复等临床挑战^[29-31]。

再造具有功能性的可移植器官是再生医学的一大难题,其原因在于很多复杂重大器官的结构高度复杂、成分高度异质。面对该挑战, NOOR 等^[32]利用人体多能干细胞分化产生的心肌细胞和内皮细胞作为墨水组分,分别混合水凝胶进行打印,构建了具有人体实质心脏组织和血管的心脏补片。该补片完全匹配心脏的解剖结构,并且在移植后无免疫排斥,无需进行免疫抑制治疗。更进一步, LEE 等^[33]采用悬浮挤出式打印方法,成功打印出了左心室模型,其组织修复效果有待验证。此外, DUIN 等^[34]通过挤出式生物打印技术进行胰岛移植体的封装。该团队打印出装载有胰岛细胞的精细、大孔格栅结构,在保持胰岛细胞活力、形态和功能的同时有效避免了免疫系统对移植体的攻击。该工作建立起了一套利用水凝胶封装移植体,以保护其免受免疫系统攻击的有效方案,为未来器官移植克服免疫反应提供了借鉴。

综上,生物 3D 打印在复杂异质性结构构造上的优势,使其在组织修复领域得到广泛应用;其个性化、高效性与即时性等特点对组织修复与再生具有极高的临床应用价值。生物 3D 打印技术应用于组织修复再生是一个结构由简单到复杂,成分由单一走向多元的过程。虽然生物 3D 打印技术目前仍不能完成人体复杂脏器的完整再造,但伴随着打印技术、生物材料、干细胞技术等突破,打印构建出可移植使用的复杂组织/器官有望在可见的未来成为现实。

2.2 体外模型

仿生体外模型在研究疾病发生机理、药物筛选等方面具有重要作用,传统的体外培养方法难以实现复杂功能性的组织模型制造。生物 3D 打印可提

供一个高自由度和高标准化的平台技术, 且具备高通量、可异质化等优势, 在构建体外模型方面得到了广泛的应用(图3)^[33, 35-36]。

(1) 器官模型。

生物3D打印技术应用于复杂器官体外模型的构建也是一个结构由简单到复杂, 成分由单一到多元的过程。2019年, LEE等^[33]采用悬浮挤出式打印方法, 以胶原蛋白作为生物墨水的主要成分, 结合高密度心肌细胞进行打印, 成功打印出了左心室模型。在28天的培养过程中, 心室内、外壁胶原结构完整性较高, 保持了心室模型原始的几何形状; 心室收缩跳动明显, 且出现室壁增厚现象, 表明了心肌基础功能的实现。此外, 该研究探索了微尺度毛细血管的打印, 以多孔微结构促进内皮细胞和血管周围细胞生成自组装血管网络(图3a)。该研究证明了生物3D打印技术构建复杂器官模型的可行性, 为后续研究奠定了坚实的基础。

(2) 体外微生理系统。

体外微生理系统可以在体外模拟和研究药物与细胞、细胞与细胞、器官与器官之间的相互作用, 而生物3D打印技术可以极大地满足微生理系统对微组织结构精度的要求。PARK等^[35]建立了3D血管化气管模型, 他们使用来源于猪气管粘膜的脱细胞胞外基质搭载内皮细胞(ECs)和成纤维细胞(Fbs)作为生物墨水, 在聚己内酯(PCL)框架内进行封装和打印。该模型集成了体外气道与血管, 能够模拟气道上皮和血管网络之间的功能(图3b)。MA等^[37]采用基于数字光处理的生物3D打印技术构建了体外肝组织模型, 为了模拟肝脏的天然结构, 他们将装载有hiPSC衍生的肝细胞以及其他支持细胞的水凝胶打印成模拟肝小叶结构的六边形的互补图案。结果表明该模型能够促进hiPSC衍生的肝细胞的体外成熟并维持其功能, 显示了用作发育学、生理学等研究模型的巨大潜力。

(3) 疾病模型与药物筛选。

体外疾病模型在研究疾病的生理特征、蛋白质组学、基因组学等方面具有重要作用。以肿瘤组织为例, 当前生物3D打印技术已被广泛应用于构建体外肿瘤模型, 以研究肿瘤微环境、肿瘤-基质相互作用以及肿瘤-免疫相互作用。ZHAO等^[38]首次实现了肿瘤细胞的3D打印, 并验证了三维肿瘤模型相比于传统二维模型的优势。NEUFELD等^[39]使用载有胶质母细胞瘤细胞, 人小胶质细胞等细胞的纤维蛋白-明胶肿瘤生物墨水和由普朗尼克组成的牺牲性血管墨水进行多组分打印。该团队利用生物墨水

和普朗尼克交替打印成型, 并在交联后去除普朗尼克, 留下互连的微通道, 生成了覆盖有内皮细胞和周细胞的血管腔, 实现了动态可灌注血管化肿瘤模型的构建。HAKOBYAN等^[40]利用激光辅助生物打印技术构建了大鼠胰腺细胞团阵列模型, 该模型能够重现胰腺导管腺癌的初始阶段及其发展过程。

新药研发的过程往往需要进行一系列的药物测试, 而体外疾病模型的建构恰恰为药物测试提供了新的手段。传统的动物实验除了涉及伦理学问题外, 还难以避免因种属差异导致的结果偏差。生物3D打印制造的同物种细胞来源的3D组织模型可以较好地避免物种差异和伦理问题, 因此被广泛用作药物筛选模型。SWAMINATHAN等^[41]将人类乳腺细胞系预先形成球形团簇, 再将其与海藻酸钠混合后制成生物墨水进行打印。他们借助打印的模型定量测定了紫杉醇对乳腺上皮细胞和内皮细胞活力的影响。TANG等^[42]用包含胶质母细胞瘤干细胞、巨噬细胞、星形胶质细胞和神经干细胞的体外3D胶质母细胞瘤模型作为药物测试的平台, 证明药物可以有效地渗透进3D肿瘤模型, 而且与细胞团簇培养相比, 胶质母细胞瘤干细胞在3D模型中的耐药性更强。

2.3 人造肉生产

近年来, 出于对道德、环境、公共卫生等方面的考量, 人造肉引起了极大的关注^[43]。植物基肉类替代品因为其营养含量和口感与真正的肉类有很大差异, 替代肉制品的能力有限。随着体外细胞扩增培养技术以及干细胞技术的发展, 生物3D打印作为一种可生产大规模动物组织的技术, 被引入到人造肉的生产中。

JEONG等^[44]采用基于DLP的打印技术, 使用含成纤维细胞的生物墨水制造厘米尺度的水凝胶支架。经基因工程改造的成纤维细胞在之后的培养中可以诱导分化为肌肉和脂肪细胞, 且在分化过程中可以控制肌肉与脂肪的比例。这项研究为使用生物3D打印生产人造肉提供了概念验证。然而, 细胞打印所制造的人造肉在精度与相似度方面仍有一些不足, 例如, 制造与真正的牛排具有相似的组成和结构的人造牛排, 仍然面临较大挑战。KANG等^[36]开发了一种新的肌腱-凝胶集成生物打印技术。将从牛组织中纯化出的卫星细胞和脂肪干细胞, 分别打印在支持浴中形成细胞纤维, 再分化成具有纤维结构的肌肉、脂肪和血管组织。最后模仿实际牛排的组织学结构, 组装分化的细胞纤维以构建人造牛排。特别地, 他们将细胞纤维打印在两层基于胶原蛋白凝胶的肌腱组织之间, 肌腱组织可

以在细胞分化过程中承受细胞牵引力,从而获得良好的纤维结构及其细胞排列(图 3c)。

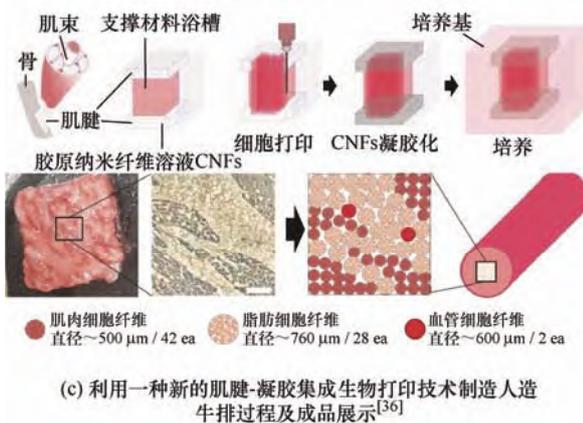
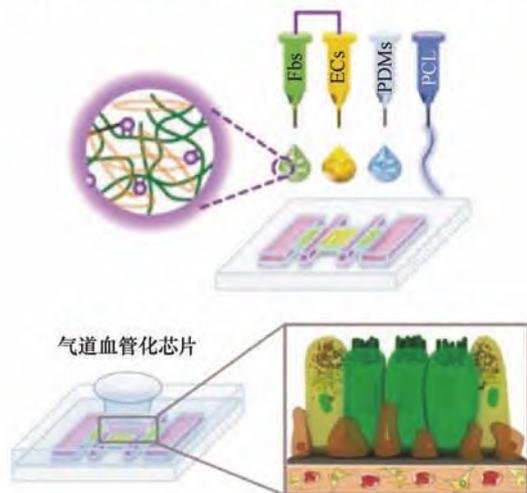
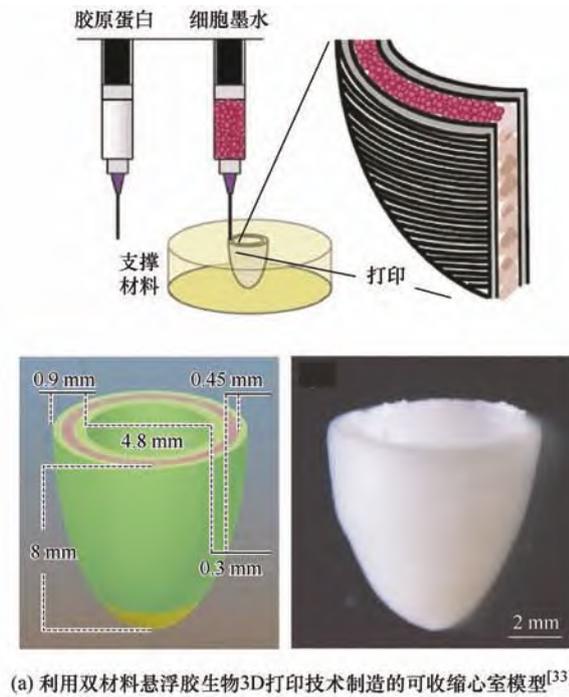


图 3 动物细胞 3D 打印在不同领域的应用举例

值得注意的是,使用细胞打印技术制造人造肉时需要特别考虑材料及交联方式的毒性,因此有必要开展食品安全问题的研究。此外,还要重点考虑细胞源的获取以及经济成本问题。

3 植物细胞 3D 打印研究进展

植物细胞 3D 打印是生物打印与植物细胞培养交叉融合的方向,旨在利用植物活细胞制成生物墨水进行打印,以探究细胞与细胞、细胞与生长环境之间的交互作用^[10, 45-46],在医药生产^[47]、食物制造^[48-49]、特殊材料生产^[50]等领域具有广阔的应用前景。现有研究中,植物仿生结构的打印及植物非细胞成分的打印也受到广泛的关注和研究。例如,DEROSI 等^[51]进行了模拟苹果组织微结构的打印工作,以小麦粉、面粉等植物原料作为墨水主要成分进行打印,旨在生产一种谷物类零食。PARK 等^[52]将番石榴叶、绿茶叶等植物原料磨成粉末后制成墨水进行打印,旨在探究不同材料用作食物打印原料的可行性。受篇幅限制,本文着重强调以植物细胞作为原材料直接进行打印,从打印方法到实际应用对植物细胞打印领域现状进行综述。

3.1 植物细胞培养基础研究及药物生产

在传统植物细胞培养生产次生代谢产物的过程中,植物细胞生长过于缓慢,剪切敏感性较高以及不受控制的聚集和粘附是植物细胞培养过程所面临的重大挑战^[53-54]。细胞固定化是稳定植物细胞、可控化生产的有效手段^[55]。然而,细胞固定化对于植物细胞生长代谢的影响尚未得到量化评估。基于此,2017年,SEIDEL 等^[10]利用罗勒愈伤组织细胞进行打印,这是最早进行高等植物细胞打印的工作之一(图 4a)。该研究开发了一种基于海藻酸盐、琼脂糖以及甲基纤维素的墨水,论证了打印过程中细胞损伤与墨水粘度之间的关系,并通过定量分析打印后细胞的活性与代谢,验证了植物细胞打印的可能性。作者采用生物打印技术以期获得细胞固定化后在时间和空间两个维度上的存活、生长、代谢等数据,以此研究细胞与细胞、细胞与环境间的交互作用。

2020年,EMMERMACHER 等^[45]利用罗勒叶细胞进行了挤出式打印物理机理的研究。该研究着重研究“挤出”这一物理过程,利用罗勒叶细胞的打印检验其理论模型,探索了细胞大小和形状对挤出

时墨水流动的影响以及挤出过程所产生的剪切力对细胞存活率的影响,为植物细胞挤出式生物打印的墨水优化和工艺参数优化提供了借鉴。

2022年, BROECK等^[46]以拟南芥根细胞以及黄豆细胞的原生质体(除去细胞壁后的细胞)混合基于琼脂糖的水凝胶作为生物墨水进行打印。该团队在打印后定量分析了细胞分裂、微型愈伤组织形成以及细胞分化的过程,验证了植物细胞打印应用于诸如细胞分化、细胞识别以及细胞重编程等细胞学基础研究的可能性,进一步推动了植物细胞打印在植物细胞培养基础研究领域的应用与发展。

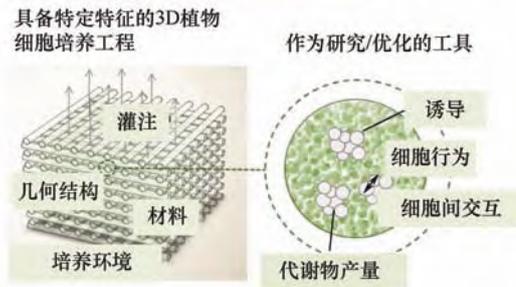
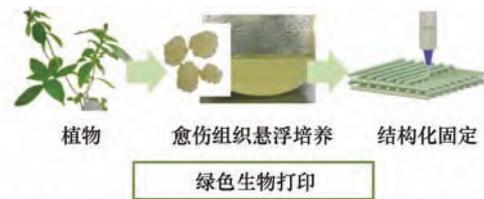
在传统植物细胞培养用于药物生产的过程中,转基因植物细胞培养最主要的方式为悬浮培养。然而,植物细胞生长缓慢、细胞易聚集等特点会导致生产效率低、产物难以分离等问题,给药物生产带来巨大挑战^[56]。生物3D打印技术为此提供了新的思路。2021年, VARMA等^[47]将能够代谢生产重组乙酰胆碱酯酶(BChE)的转基因水稻与聚乙二醇水凝胶混合后培养,探究了细胞存活率与代谢活力等多项指标,并检测产物含量。结果证明了悬浮培养以及打印培养条件下两组细胞的生长与糖消耗趋势相近,且打印组的细胞产生的活性BChE可分泌到培养基中,有利于次生代谢物的分离。在该研究中,生物打印技术不仅可实现定制化结构的制造,所构建的微小孔隙还可以使培养溶液与细胞更加充分地接触,从而优化培养基流入、代谢产物随培养基流出等一系列物质交换与能量传递过程。此外,高密度的细胞打印和细胞固定化培养方式有助于构建集成化生物反应器,实现快速、可重复的植物细胞产品分离、收集和连续生产。

综上,植物细胞打印在植物细胞培养的发展和应用中能够协助进行植物学基础研究,促进药物生产生物反应器及生产流程的开发,在植物细胞培养的发展和应用上具有重大潜力。

3.2 食品生产

3D打印技术可以改造食品的结构与口感,实现不同群体对食品种类和营养具有定制化需求的食品生产^[57-58]。而植物细胞打印的出现极大地提高了打印食品的结构复杂度,其中植物组织细胞间的微小孔隙以及其独有的膨压特性带来的微观结构或许会带来全新的口感^[59],为食品生产创新提供了新的手段。

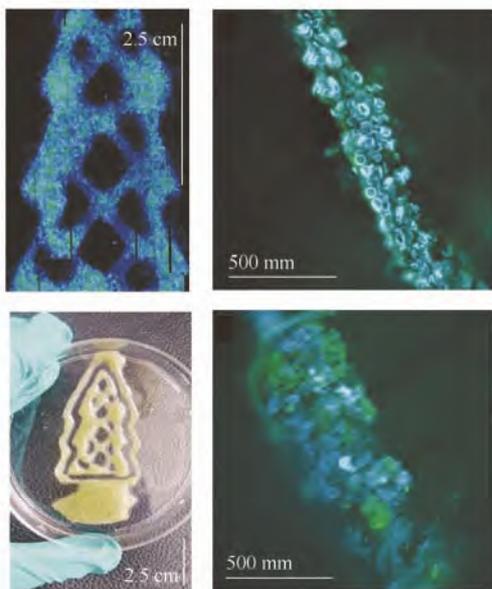
2019年, VANCAUWENBERGHE等^[49]运用莴苣叶细胞混合果胶水凝胶进行打印,将植物打印的应用领域首次拓宽至食物制造。该团队开发出一种基于低甲氧基果胶的水凝胶生物墨水,并在墨水中添加牛血清白蛋白以控制凝胶基质中的空气含量,并检验了打印结构的力学强度、细胞存活率,发现生物墨水的粘度会随着果胶含量的增加而增加,并降低细胞打印后的存活率。此实验虽证明了植物细胞打印运用于食品生产的可能性,但如何实现高密度细胞墨水的打印仍有待探究。2020年, PARK等^[48]运用胡萝卜愈伤组织细胞混合基于海藻酸盐的水凝胶进行打印,探究愈伤组织的植物打印方法在食物制造领域中的可能性,证明了打印过程中细胞的数量会影响打印结构的精度,并筛选出了较为理想的细胞装载含量(图4b)。上述两项研究均在食品3D打印生产的领域中引入了全新的打印材料——植物活细胞,拓宽了3D打印食品生产的边界,与动物细胞打印运用于人造肉生产遥相呼应,共同推动了食品生产与生物打印交叉领域的发展。



(a) 利用基于海藻酸盐、琼脂糖以及甲基纤维素的墨水装载罗勒愈伤组织细胞进行打印^[10]



(b) 运用胡萝卜愈伤组织细胞混合海藻酸盐水凝胶进行打印^[48]



(c) 使用结冷胶(Gelzan)水凝胶以及秀丽根草叶细胞混合制成的生物墨水进行打印^[50]

图 4 植物细胞 3D 打印在不同领域应用举例。

综上,目前植物打印在食品的应用中仍处于早期探索阶段,在重建植物组织的过程中,细胞间粘附以及细胞的微结构研究较少,对植物组织发育的控制是实现天然植物组织仿生的关键点之一。

3.3 定制化木质材料生产

木质材料已被广泛运用于人们的生产生活中。然而,森林砍伐、森林火灾和土地用途的改变每年会造成多达 153 亿棵树的净损失^[60]。研究人员预测,按目前的消耗率,世界上所有的森林可能会在 100 到 200 年内消失^[61]。而植物打印的应用则有望实现定制化木质材料的加工和生产,从而减少自然界树木的消耗。

2022 年, BECKWITH 等^[50]通过打印秀丽根草细胞,开创了一种实验室生产高密度植物材料的方法,有望解决天然植物材料供给所带来的种种问题(图 4c)。该团队使用结冷胶水凝胶以及秀丽根草叶细胞混合制成的生物墨水进行打印,并在 3 个月后将培养打印的结构进行了力学和微结构方面的量化评估,阐明了细胞水平特征(微观尺度)与材料特性(宏观尺度)之间的关系。该关系表明细胞生长与分化在时间上的先后顺序将影响植物组织生长的形态与结构(例如细胞间孔隙、细胞密度等),进而改变材料物理性质(例如密度、机械性能等)。由此,该团队通过改变培养基配方以控制细胞水平的发育,进而为可控参数的木质材料打印生产提供了借鉴。该工作以秀丽根草为模型验证了高密度木质材料在实验室生产的可能性,并提出了工艺参数优化方案,为后续植物细胞打印在定制化木质材料生产中奠定

了可行性基础。

作为生物打印与植物细胞培养的结合,植物细胞打印利用植物活细胞作为原料进行打印,在不断优化和适配的过程中创立了一系列与植物细胞特性相匹配的墨水、打印、评价体系,为植物细胞行为探索、第二产物(代谢产物、药物)生产、食物制造和定制化木质材料生产等应用奠定了技术和理论基础。同时,植物细胞打印也面临着基础研究(如细胞行为)不完善,组织发育可控性不高,墨水性质(如可打印性和细胞相容性)尚待优化等问题。总体而言,与哺乳类动物细胞打印相比,植物细胞打印仍处于研究发展的初期阶段,亟需在生物学意义上更进一步的深入探索。

4 微生物细胞 3D 打印研究进展

微生物细胞 3D 打印是指利用含细菌、真菌、藻类、病毒等微生物的生物墨水,通过不同的生物 3D 打印技术制造复杂的三维结构。微生物的固定化是其原位发挥作用的前提,而个性化、定制化的 3D 打印制造技术在实现微生物固定的基础上,进一步拓宽了其应用场景,应用于例如医药健康和食品生产、微生物合成制造、微生物相互作用机制探索、环境修复等领域。

4.1 医药健康和食品生产

微生物与人类医药健康和食品生产息息相关。实现快速成形、定制化复杂结构构建是微生物细胞 3D 打印技术为这两个领域带来的新发展动力。常驻口腔微生物群的变化常导致口腔疾病的发生,益生菌和致病菌之间的平衡决定了个体的口腔健康。DODOO 等^[62]用喷墨打印技术制备了含唾液链球菌的木糖醇分散膜,并对变形链球菌(一种引起龋齿的微生物)进行了抗菌测试。结果显示,该分散膜可有效减少变形链球菌数量,表明生物打印的益生菌分散膜有望应用于治疗龋齿。类似地, SHEN 等^[63]将噬菌体装载至海藻酸盐水凝胶中制备成生物墨水,通过 3D 打印制造多孔伤口敷料结构,缓慢释放噬菌体,从而有效抑制细菌生长(图 5a)。此外,3D 打印的微生物结构可针对特定刺激在体内实现靶向药物的可控释放,使其可能作为新兴的替代剂型应用于阴道内递送益生菌以治疗细菌性阴道疾病^[64]。

益生菌是一种有益于宿主健康的菌群,益生菌与 3D 打印相结合有望改善人们的饮食习惯和健康状况^[65-66]。LIU 等^[67]使用土豆泥和益生菌(动物双歧杆菌亚种)作为生物墨水,探究了该墨水的流变特

性、挤出打印成形性以及益生菌活性。结果显示, 较小的打印喷嘴(直径 0.6 mm)和较高的打印温度(55 °C)会降低打印结构中益生菌的活性。优化参数后, 打印样品中的益生菌在低温(5 °C)储存 12 d 后活性仍保持在较高水平, 表明了生物 3D 打印用于制造富含益生菌功能性食品的潜力。

综上, 生物打印塑造的空间结构, 进一步拓展了微生物的可应用场景, 进一步发挥微生物的应用价值, 如上述的益生菌分散膜、噬菌体多孔伤口敷料、益生菌功能性食品, 展现出了微生物细胞 3D 打印在医药健康与食品生产领域中的应用前景。

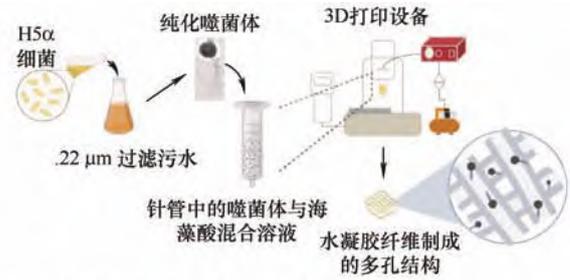
4.2 微生物合成制造

以微生物催化为基础的生物合成已成为生产生物活性大分子(例如多糖、蛋白质和维生素)的一种有效方法。一般来说, 靶分子的生物合成流程主要包含在营养培养基中大量培养微生物, 培养完成后, 对含有微生物及其代谢产物的培养基混合物进行分离和纯化, 以获得最终产物。然而, 这种密集培养的方式存在整体合成效率不佳、微生物难以重复利用等问题。

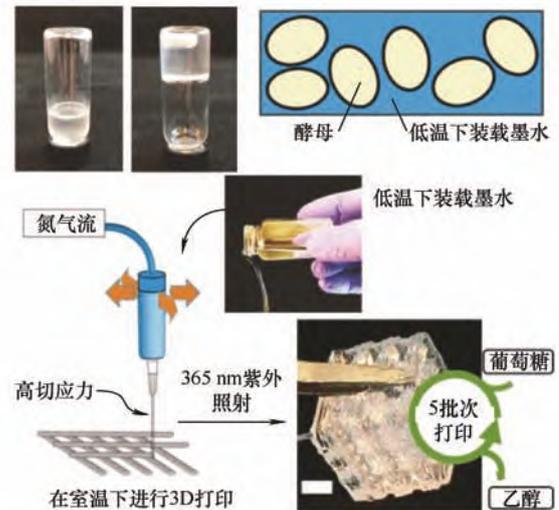
对此, CUI 等^[68]利用生物 3D 打印技术和明胶基水凝胶, 制备了一系列负载透明质酸发酵菌的三维网格水凝胶支架发酵体系。与具有实心水凝胶固定结构和无支架发酵条件的发酵体系相比, 打印的三维网格水凝胶支架获得了更高的透明质酸产量, 在提取完产物后, 能够回收保存和重复使用该支架进行多次生产。SAHA 等^[69]则以普朗尼克-二甲基丙烯酸酯为基质开发了载酵母细胞的生物墨水。该墨水具有剪切变稀以及显著的温敏特性, 打印的三维水凝胶结构具有较好的弹性。该酵母支架在打印后的两周内, 连续进行了 5 个批次的反复发酵, 均保持了较高的葡萄糖发酵效率(葡萄糖转化为乙醇的平均效率为 90%)(图 5b)。在另一个研究中, QIAN 等^[70]使用冻干的贝克酵母制备了质量百分比高达 42.8%的生物墨水, 打印具有高催化效率的大尺寸三维结构。结果表明, 该结构发酵葡萄糖生成乙醇和 CO₂ 的延迟时间很短, 与相应体积的薄膜结构相比, 打印结构中的细丝和大孔隙有助于物质的快速传递, 使其乙醇产量提高了三倍。此外, 打印结构中的酵母细胞代谢活性可保持长达 4 个月。

生物 3D 打印也可以利用其他转基因酵母生产有价值的化学品, 例如, 工程化大肠杆菌可在由普朗尼克-双氨基甲基丙烯酸酯水凝胶打印的三维结构中产生 L-3,4-二羟基苯丙氨酸(一种有效的抗帕金森病药物成分)^[71]。由此可见, 微生物 3D 打印技术为个性化、高传质效率活性材料的制造, 以及可持续、可重复的生物合成生产提供了有效的解决途径。

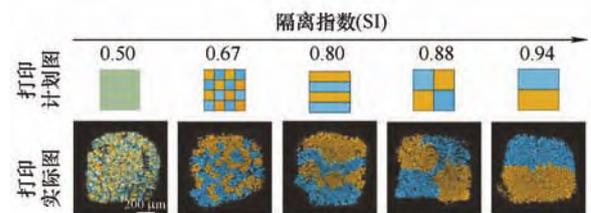
森病药物成分)^[71]。由此可见, 微生物 3D 打印技术为个性化、高传质效率活性材料的制造, 以及可持续、可重复的生物合成生产提供了有效的解决途径。



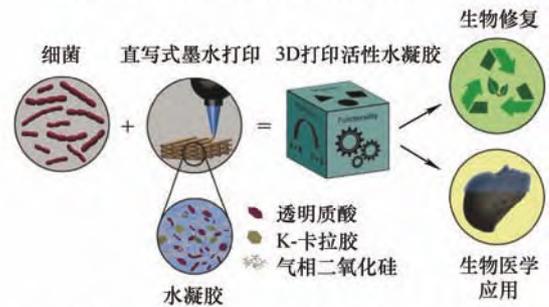
(a) 利用3D打印的水凝胶结构控制释放所载游离噬菌体纳米颗粒, 用作抗菌伤口敷料^[63]



(b) 采用挤出式3D打印技术打印富含酵母细胞的水凝胶三维结构, 用于乙醇的连续发酵生产^[69]



(c) 基于液滴打印, 将不同基因型的大肠杆菌打印成亚毫米阵列, 揭示了微米级结构对细菌生态的重要性^[72]



(d) 恶臭假单胞菌菌株被固定在3D打印的水凝胶网格支架中, 用于降解溶液中的苯酚^[74]

图5 微生物细胞3D打印在不同领域的应用举例

综上,与植物细胞 3D 打印类似,生物 3D 打印支架中引入的通孔结构不仅有助于营养物质的快速渗透以保证微生物存活及功能,同时允许固定微生物的前提下,实现微生物可溶性产物的快速分离,使得微生物产品的重复使用变得便捷。因此,在微生物合成制造领域中引入 3D 打印,能够保证微生物产品质量的同时有效提高产率,针对性地解决了整体合成效率不佳、微生物难以重复利用等问题,推动可持续、可重复生产的发展。

4.3 微生物相互作用机制探索

微生物之间具有共生、竞争和捕食等不同的物种间和物种内相互作用关系,此外,微生物可以在基因水平转移从周围环境中获得的遗传物质,从而改变它们适应新环境的能力。探究微生物之间的相互作用关系,对于理解微生物在空间上的分布如何影响微生物之间的合作和竞争表型有着重要意义,生物 3D 打印的自由成形特点使其可构建定制化的异质组分模型,有望应用于揭示微生物的互作关系。

CHOI 等^[11]利用喷墨打印研究了多细菌细胞之间的通讯,经过前期对细菌细胞悬液墨水的打印条件优化,打印了固定图案化的基因工程细菌细胞。研究表明,打印间距和细胞接种的初始数量是控制细胞间通讯的主要因素,此外,细胞的打印时间(不同工程细菌细胞的打印先后顺序)和打印模式(阵列形或者线条形)也是重要的影响因素。KRISHNA KUMAR 等将包含大肠杆菌细胞(约 10^8 /mL)、熔融琼脂糖(1.5% w/v)和肉汤培养基的定制生物墨水逐行打印到 37 °C 的油/磷脂溶液中,形成液滴阵列,最终得到细菌群落。研究表明,打印后的大肠杆菌菌株仍具有利用蛋白质毒素相互竞争的特性,并且通过控制菌株的空间分布,实现易感菌株和产毒菌株的共存或灭亡,这对后续研究微生物的生态屏障形成具有重要的借鉴作用^[72](图 5c)。在另外一个工作中,KOSINA 等^[73]通过打印重叠菌落模型,鉴定了与菌落适应性相关的基因,研究旋氏假单胞菌和其他假单胞菌土壤分离株之间的形态、抑制和侵袭作用。上述研究工作验证了微生物打印技术在研究微生物空间分布对其相互作用方面的可行性和潜力。

综上,得益于定制化异质结构制造能力,生物 3D 打印技术可以对不同的微生物细胞进行精确的空间排列以构建不同的微生物群落模型。从而使研究者能够更加全面、定量地对微生物相互作用机制进行探索和研究。3D 打印技术的引入为微生物相互作用机制的研究提供了新的契机。

4.4 环境修复

一些微生物能够有效吸收、吸附或降解包括重金属和油类在内的污染物,因而被用来进行废水的生物处理。与单一的微生物处理方法相比,生物材料的引入可以增强微生物的降解修复能力。同时,生物 3D 打印的支架结构也可使具备降解能力的微生物循环多次使用成为可能。SCHAFFNER 等^[74]提出了负载苯酚降解菌(恶臭假单胞菌)3D 打印水凝胶结构提高生物降解修复效率的方法。在 3D 打印支架中恶臭假单胞菌能够稳定增殖并保持代谢活性,其降解苯酚的速度与悬浮培养具有同样的效率(图 5d)。此外,OU 等^[75]构建了“核-壳”结构的微凝胶单元,将小球藻和需氧枯草芽孢杆菌封装在粘性核相中,同时运用水凝胶壳提供支撑,彼此共价键形成微凝胶支架从而将微生物与壳结构分离,为微生物生长提供有利的环境,并将其应用于含甲基橙或阿莫西林的废水处理。微生物资源库的不断丰富和基因工程技术的发展为基于微生物的修复技术的发展提供了更多选择。

综上,基于微生物细胞 3D 打印技术的环境修复研究尚处在发展初期,但与其他制造技术相比,微生物细胞 3D 打印技术具有个性化异质结构制造能力和制造过程中的良好细胞相容性,因此,该技术有望被用到不同的环境中。未来更多具有降解污染物能力的菌株的使用及其与新型 3D 打印技术的结合,将为环境修复提供更多可行方案。

4.5 构建仿生结构和材料

在上述应用之外,有研究者提出将微生物的生命力与 3D 打印技术的成形能力相结合,以此创造具有适应环境特性的功能性生命材料。2023 年,GANTENBEIN 等^[76]以搭载了真菌灵芝的水凝胶作为生物墨水,利用挤出式生物打印将其制造成网格多孔结构。该结构的连通孔隙为菌丝生长提供了充足的养分,基于菌丝能够在土壤颗粒缝隙中生长的天然特性,该团队发现,这种利用真菌菌丝制造出的复合材料能够自我修复、再生并适应环境。

真菌水凝胶 3D 打印结构这种自我修复、再生的特性,为创建功能性菌丝体活材料提供了契机,这类可生长的微生物材料有望成为未来新型的 4D 材料,为工程材料注入生命力,并可能激发其他创新工程策略,如自适应结构开发,活体机器人等。

5 跨界多细胞共培养 3D 打印研究进展

跨界共生是一种常见的自然现象,自然界的

生态系统存在着不同种类生物之间的彼此供给关系。对于生物 3D 打印而言, 将不同类型的生物活细胞共打印在一起, 有望构建工程化的共生系统。

蓝藻或植物能够为生态系统提供氧气, 将这类细胞与哺乳动物细胞共打印, 有望解决动物组织构建中氧气供给的问题。LODE 将莱茵衣藻添加到海藻酸盐/甲基纤维素混合物中制备成生物墨水, 通过挤出式 3D 打印, 构建了生物支架。他们先验证了莱茵衣藻在生物支架中能够正常增殖与代谢, 之后应用多材料打印, 将含有人成骨肉瘤细胞 SaOS-2 和莱茵衣藻的水凝胶交替打印组合在一个支架内。在该研究所使用的培养条件下, 发现存活的 SaOS-2 细胞数量随时间减少, 而藻类细胞在培养 6 天后仍然存活, 作者认为有必要进一步优化动物细胞和藻类细胞共培养的条件, 以实现理想的共生培养^[77]。MAHARJAN 使用基于羧甲基纤维素钠的牺牲性生物墨水对莱茵衣藻与 HepG2 细胞进行生物 3D 打印。莱茵衣藻在肝组织构建体中充当天然的光合作用氧气发生器, 支持周围基质中 HepG2 细胞的活力和功能^[78]。为了筛选适合的作为光合作用氧气发生器的微藻, DANI 在悬浮培养和 3D 生物打印支架中分别培养了 4 种耐热微藻菌株(小球藻、卵囊形腔菌、星空藻和栅藻), 评估共培养条件(红光照明, 37 °C 培养)下这些微藻菌株的活力和光合作用活性。结果显示, 栅藻在设定条件下表现最佳, 并且可以固定在基于藻酸盐的生物支架中。同时, 该工作也验证了哺乳动物细胞培养所需的抗生素氨基青霉素和有机碳源葡萄糖的存在对栅藻的生长, 活力和光合活性没有影响^[79]。此外, 微生物细胞还能为哺乳动物细胞提供生长、分化所需的生物大分子。例如, WITTE 利用微流控技术制备了包裹不同数量的缺乏乳酸脱氢酶的乳酸链球菌和人骨髓间充质干细胞的单分散海藻酸盐水凝胶, 水凝胶内的细乳酸链球菌表达粘附片段(人纤维连接蛋白 III₇₋₁₀ 片段)用于整合素结合, 同时分泌生长因子(重组人骨形态发生蛋白-2)诱导人骨髓间充质干细胞的成骨分化^[80]。

综上, 在跨界多细胞共培养 3D 打印体系中, 由于大部分微生物具有出色的光合自生产的功能, 因此目前的尝试多以微生物作为主要行使产物供给的对象, 以促进哺乳动物细胞更好的生长或分化。这为未来探索跨界多细胞的复杂生命系统运作的机制以及人造生物空间的构建提供了一种可能的思路。

6 结论与展望

生物 3D 打印在近 20 年的发展过程中, 逐渐形成了三类主流技术(图 6)。挤出式打印因设备简单、材料选择范围广、可打印复杂结构等优势受到广泛的应用与发展, 也因打印精度低、打印时间长而面临挑战; 喷墨式打印的高精度与高通量优点有助于提高生产效率, 但也存在材料适用性小、难以打印复杂三维结构的挑战; 光投影式打印作为新兴的细胞打印方式, 因其精度高、可打印复杂结构等优势而受到青睐, 但其也存在装置复杂、难以打印多组分结构, 光固化过程对细胞的潜在影响等问题。

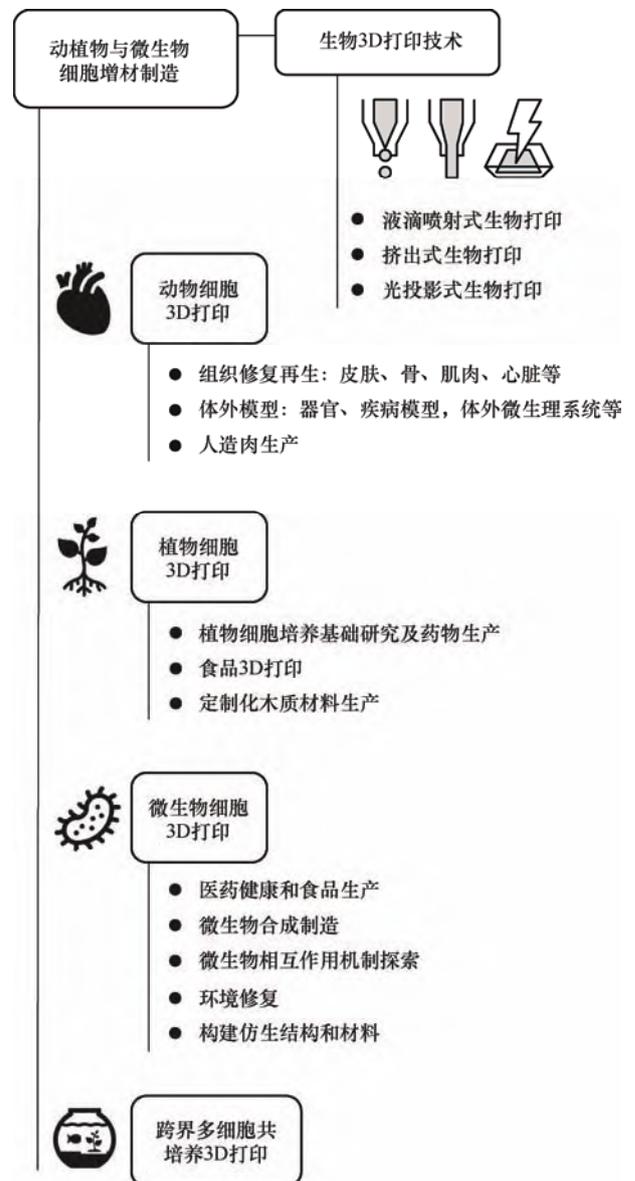


图 6 生物 3D 打印技术及应用概览

基于上述三类主流的打印方式,生物 3D 打印领域按照墨水所装载的细胞种类分类,发展出了多个研究领域,最具代表性的是动物细胞打印、植物细胞打印以及微生物细胞打印(图 6)。

动物细胞打印主要以哺乳动物细胞为原材料,面向组织修复再生、体外模型建立以及人造肉生产等应用领域。其中,组织修复再生面向医学临床应用的诸多挑战与需求,主要致力于研究包括皮肤、骨、软骨、肌肉、心脏、胰岛等组织的修复与再生过程;体外模型建立则面向基础医学、药学展开探索,致力于建立体外微生理系统、疾病模型,并辅助药物筛选;人造肉生产则转为面向动物福利与道德问题,期待以体外细胞扩增培养以及干细胞技术的发展为契机生产大规模动物组织,以应对当今肉类食品在道德、环境、公共卫生等方面所面临的困境与挑战。

植物细胞打印是生物打印与植物细胞培养交叉融合的发展方向,利用植物活细胞制成生物墨水进行打印,以探究细胞与细胞、细胞与生长环境之间的交互作用,并在医药生产、食物制造、定制化木质材料生产等方向具有广阔的应用前景。在植物细胞培养基础研究及药物生产模块,传统植物细胞培养生产次生代谢产物以及药物过程中面临着细胞生长过于缓慢、高剪切敏感性以及难以控制的聚集和粘附等问题,有望通过引入打印技术解决;在食品 3D 打印方面,植物细胞打印的引入为食品口感的创新提供动力;在木质材料生产方面,植物细胞打印的应用使实验室生产木材成为可能,有望大幅减少自然界树木的消耗。

微生物细胞打印是以细菌、真菌、藻类等微生物为原材料进行 3D 打印,并制造、加工和培养微生物的活组织,应用于包括医药健康、微生物制造、微生物相互作用机制探索、环境修复等研究方向。在医药健康应用方向,益生菌的打印研究为抗菌药物研发以及饮食习惯改善提供了全新路径;在微生物合成制造方向,各种生物大分子的合成生产可通过打印三维结构提高了生产效率以及生产连续性;在微生物相互作用机制探索方向,生物打印的引入为探索微生物之间表现出的共生、竞争和捕食等不同的物种间和物种内相互作用关系以及微生物与环境的关系提供了新的技术手段,推进该方向研究的发展;在环境修复方向,生物打印结构有助促进微生物吸收、吸附或降解包括重金属和油类在内污染

物的效率,提升生物处理法的发展潜能;在跨界多细胞共培养方向,不同类型的生物活细胞打印共培养,有望构建工程化的共生系统。

综上,动物细胞打印的发展相对更早,植物细胞以及微生物细胞打印则处于发展初期(图 1)。三者都涉及到制造科学、生物学、医学乃至社会科学问题,生物 3D 打印技术在其中的应用和发展需要不同学科研究人员的密切合作。同时,生物 3D 打印作为一种制造技术,其自身也在与时俱进、不断发展。

参 考 文 献

- [1] GUILLEMOT F, MIRONOV V, NAKAMURA M. Bioprinting is coming of age: Report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09)[J]. *Biofabrication*, 2010, 2(1): 010201.
- [2] GROLL J, BURDICK J A, CHO D W, et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks[J]. *Biofabrication*, 2018, 11(1): 013001.
- [3] BOLAND T, MIRONOV V, GUTOWSKA A, et al. Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels[J]. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 2003, 272A(2): 497-502.
- [4] YAN Y N, WANG X H, PAN Y Q, et al. Fabrication of viable tissue-engineered constructs with 3D cell-assembly technique[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(29): 5864-5871.
- [5] YAN Y N, WANG X H, XIONG Z, et al. Direct construction of a three-dimensional structure with cells and hydrogel[J]. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2005, 20(3): 259-269.
- [6] SMITH C M, STONE A L, PARKHILL R L, et al. Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs[J]. *Tissue Engineering*, 2004, 10(9-10): 1566-1576.
- [7] KHALIL S, NAM J, SUN W. Multi-nozzle deposition for construction of 3D biopolymer tissue scaffolds[J]. *Rapid Prototyping Journal*, 2005, 11(1): 9-17.
- [8] OUYANG L. Pushing the rheological and mechanical boundaries of extrusion-based 3D bioprinting[J]. *Trends Biotechnol*, 2022, 40(7): 891-902.
- [9] FU Z Q, OUYANG L L, XU R Z, et al. Responsive

- biomaterials for 3D bioprinting: A review[J]. *Mater Today*, 2022, 52: 112-132.
- [10] SEIDEL J, AHLFELD T, ADOLPH M, et al. Green bioprinting: extrusion-based fabrication of plant cell-laden biopolymer hydrogel scaffolds[J]. *Biofabrication*, 2017, 9(4): 045011.
- [11] CHOI W S, HA D, PARK S, et al. Synthetic multicellular cell-to-cell communication in inkjet printed bacterial cell systems[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(10): 2500-2507.
- [12] CHRISTENSEN K, XU C, CHAI W, et al. Freeform inkjet printing of cellular structures with bifurcations[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(5): 1047-1055.
- [13] HINTON T J, JALLERAT Q, PALCHESKO R N, et al. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels[J]. *Sci Adv*, 2015, 1(9): e1500758.
- [14] OVSIANIKOV A, GRUENE M, PFLAUM M, et al. Laser printing of cells into 3D scaffolds[J]. *Biofabrication*, 2010, 2(1): 014104.
- [15] GRIGORYAN B, PAULSEN S J, CORBETT D C, et al. Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels[J]. *Science*, 2019, 364(6439): 458-464.
- [16] BERNAL P N, DELROT P, LOTERIE D, et al. Volumetric Bioprinting of Complex Living-Tissue Constructs within Seconds[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(42): 1904209.
- [17] LEE W, DEBASITIS J C, LEE V K, et al. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(8): 1587-1595.
- [18] DEMIRCI U. Acoustic picoliter droplets for emerging applications in semiconductor industry and biotechnology[J]. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 2006, 15(4): 957-966.
- [19] OZBOLAT I T, HOSPODIUK M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting[J]. *Biomaterials*, 2016, 76: 321-343.
- [20] KANG H W, LEE S J, KO I K, et al. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 312-319.
- [21] LIU W, ZHANG Y S, HEINRICH M A, et al. Rapid Continuous Multimaterial Extrusion Bioprinting[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(3): 1604630.
- [22] AHRENS J H, UZEL S G M, SKYLAR-SCOTT M, et al. Programming cellular alignment in engineered cardiac tissue via bioprinting anisotropic organ building blocks[J]. *Advanced Materials*, 2022, 34(26): 2200217.
- [23] HUEBSCH N, LIPPENS E, LEE K, et al. Matrix elasticity of void-forming hydrogels controls transplanted-stem-cell-mediated bone formation[J]. *Nature Materials*, 2015, 14(12): 1269-1277.
- [24] KHATRI B, FREY M, RAOUF-FAHMY A, et al. Development of a multi-material stereolithography 3D printing device[J]. *Micromachines*, 2020, 11(5): 532.
- [25] MATTE C D, PEARSON M, TROTTIER-COURNOYER F, et al. Automated storage and active cleaning for multi-material digital-light-processing printer[J]. *Rapid Prototyping Journal*, 2019, 25(5): 864-874.
- [26] HAN D, YANG C, FANG N X, et al. Rapid multi-material 3D printing with projection micro-stereolithography using dynamic fluidic control[J]. *Additive Manufacturing*, 2019, 27: 606-615.
- [27] POURCHET L J, THEPOT A, ALBOUY M, et al. Human skin 3D bioprinting using scaffold-free approach[J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(4): 27976537.
- [28] ALBANNA M, BINDER K W, MURPHY S V, et al. In situ bioprinting of autologous skin cells accelerates wound healing of extensive excisional full-thickness wounds[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1856.
- [29] XIE M, SHI Y, ZHANG C, et al. In situ 3D bioprinting with bioconcrete bioink[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3597.
- [30] KERIQUEL V, OLIVEIRA H, RÉMY M, et al. In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1778.
- [31] FREEDMAN B R, MOONEY D J. Biomaterials to mimic and heal connective tissues[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(19): e1806695.
- [32] NOOR N, SHAPIRA A, EDRI R, et al. 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and

- hearts[J]. *Advanced Science*, 2019, 6(11): 1900344.
- [33] LEE A, HUDSON A R, SHIWARSKI D J, et al. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart[J]. *Science*, 2019, 365(6452): 482-487.
- [34] DUIN S, SCHÜTZ K, AHLFELD T, et al. 3D Bioprinting of functional islets of langerhans in an alginate/methylcellulose hydrogel blend[J]. *Adv. Healthc. Mater.*, 2019, 8(7): e1801631.
- [35] PARK J Y, RYU H, LEE B, et al. Development of a functional airway-on-a-chip by 3D cell printing[J]. *Biofabrication*, 2019, 11(1): 015002.
- [36] KANG D H, LOUIS F, LIU H, et al. Engineered whole cut meat-like tissue by the assembly of cell fibers using tendon-gel integrated bioprinting[J]. *Nat. Commun.*, 2021, 12(1): 5059.
- [37] MA X, QU X, ZHU W, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A*, 2016, 113(8): 2206-2211.
- [38] ZHAO Y, YAO R, OUYANG L, et al. Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro[J]. *Biofabrication*, 2014, 6(3): 035001.
- [39] NEUFELD L, YEINI E, REISMAN N, et al. Microengineered perfusable 3D-bioprinted glioblastoma model for in vivo mimicry of tumor microenvironment[J]. *Sci. Adv.*, 2021, 7(34): 34407932.
- [40] HAKOBYAN D, MÉDINA C, DUSSERRE N, et al. Laser-assisted 3D bioprinting of exocrine pancreas spheroid models for cancer initiation study[J]. *Biofabrication*, 2020, 12(3): 035001.
- [41] SWAMINATHAN S, HAMID Q, SUN W, et al. Bioprinting of 3D breast epithelial spheroids for human cancer models[J]. *Biofabrication*, 2019, 11(2): 025003.
- [42] TANG M, XIE Q, GIMPLE R C, et al. Three-dimensional bioprinted glioblastoma microenvironments model cellular dependencies and immune interactions[J]. *Cell Res.*, 2020, 30(10): 833-53.
- [43] CHRIKI S, HOCQUETTE J F. The myth of cultured meat: A review[J]. *Front Nutr.*, 2020, 7: 32118026.
- [44] JEONG D, SEO J W, LEE H G, et al. Efficient myogenic/adipogenic transdifferentiation of bovine fibroblasts in a 3D bioprinting system for steak-type cultured meat production[J]. *Adv. Sci. (Weinh)*, 2022: e2202877.
- [45] EMMERMACHER J, SPURA D, CZIOMMER J, et al. Engineering considerations on extrusion-based bioprinting: Interactions of material behavior, mechanical forces and cells in the printing needle[J]. *Biofabrication*, 2020, 12(2): 025022.
- [46] VAN DEN BROECK L, SCHWARTZ M F, KRISHNAMOORTHY S, et al. Establishing a reproducible approach to study cellular functions of plant cells with 3D bioprinting[J]. *Science advances*, 2022, 8(41): eabp9906.
- [47] VARMA A, GEMEDA H B, MCNULTY M J, et al. Immobilization of transgenic plant cells towards bioprinting for production of a recombinant biodefense agent[J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(10): 2100133.
- [48] PARK S M, KIM H W, PARK H J. Callus-based 3D printing for food exemplified with carrot tissues and its potential for innovative food production[J]. *Journal of Food Engineering*, 2020, 271: 109781.
- [49] VANCAUWENBERGHE V, MBONG V B M, VANSTREELS E, et al. 3D printing of plant tissue for innovative food manufacturing: Encapsulation of alive plant cells into pectin based bio-ink[J]. *Journal of Food Engineering*, 2019, 263: 454-464.
- [50] BECKWITH A L, BORENSTEIN J T, VELASQUEZ-GARCIA L F. Physical, mechanical, and microstructural characterization of novel, 3D-printed, tunable, lab-grown plant materials generated from *Zinnia elegans* cell cultures[J]. *Mater Today*, 2022, 54: 27-41.
- [51] DEROSI A, PAOLILLO M, VERBOVEN P, et al. Extending 3D food printing application: Apple tissue microstructure as a digital model to create innovative cereal-based snacks[J]. *Journal of Food Engineering*, 2022, 316: 110845.
- [52] PARK Y-E, KIM J, KIM H W, et al. Rheological, textural, and functional characteristics of 3D-printed cheesecake containing guava leaf, green tea, and barley sprout powders[J]. *Food Bioscience*, 2022, 47: 101634.

- [53] KIERAN P M, MACLOUGHLIN P F, MALONE D M. Plant cell suspension cultures : Some engineering considerations[J]. *Journal of Biotechnology*, 1997, 59(1-2): 39-52.
- [54] DORAN P M. Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors[J]. *Biotechnology Progress*, 1999, 15(3): 319-335.
- [55] BRODELIUS P. The potential role of immobilization in plant-cell biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 1985, 3(11): 280-285.
- [56] SCHILLBERG S, RAVEN N, SPIEGEL H, et al. Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 720.
- [57] LIPTON J I, CUTLER M, NIGI F, et al. Additive manufacturing for the food industry[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2015, 43(1): 114-123.
- [58] WEGRZYN T F, GOLDING M, ARCHER R H. Food Layered Manufacture: A new process for constructing solid foods[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, 27(2): 66-72.
- [59] OEY M L, VANSTREELS E, DE BAERDEMAEKER J, et al. Effect of turgor on micromechanical and structural properties of apple tissue : A quantitative analysis[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, 44(3): 240-247.
- [60] CROWTHER T W, GLICK H B, COVEY K R, et al. Mapping tree density at a global scale[J]. *Nature*, 2015, 525(7568): 201-205.
- [61] BOLOGNA M, AQUINO G. Deforestation and world population sustainability : A quantitative analysis[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 7631.
- [62] DODOO C C, STAPLETON P, BASIT A W, et al. The potential of *Streptococcus salivarius* oral films in the management of dental caries : An inkjet printing approach[J]. *Int. J. Pharm.*, 2020, 591: 119962.
- [63] SHEN H-Y, LIU Z-H, HONG J-S, et al. Controlled-release of free bacteriophage nanoparticles from 3D-plotted hydrogel fibrous structure as potential antibacterial wound dressing[J]. *J. Control Release*, 2021, 331: 154-163.
- [64] CHANDRASHEKHAR P, MINOOEI F, ARREGUIN W, et al. Perspectives on existing and novel alternative intravaginal probiotic delivery methods in the context of bacterial vaginosis infection[J]. *AAPS J.*, 2021, 23(3): 33973067.
- [65] YUAN Y, YIN M, ZHAI Q, et al. The encapsulation strategy to improve the survival of probiotics for food application : From rough multicellular to single-cell surface engineering and microbial mediation[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022: 36168909.
- [66] GU Q, YIN Y, YAN X, et al. Encapsulation of multiple probiotics, synbiotics, or nutraceuticals for improved health effects : A review[J]. *Adv. Colloid. Interface Sci.*, 2022, 309: 102781.
- [67] LIU Z, BHANDARI B, ZHANG M. Incorporation of probiotics (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*) into 3D printed mashed potatoes: Effects of variables on the viability[J]. *Food Res Int.*, 2020, 128: 108795.
- [68] CUI Z, FENG Y, LIU F, et al. 3D Bioprinting of Living Materials for Structure-Dependent Production of Hyaluronic Acid[J]. *ACS Macro Letters*, 2022, 11(4): 452-459.
- [69] SAHA A, JOHNSTON T G, SHAFRANEK R T, et al. Additive manufacturing of catalytically active living materials[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(16): 13373-80.
- [70] QIAN F, ZHU C, KNIPE J M, et al. Direct writing of tunable living inks for bioprocess intensification[J]. *Nano Lett.*, 2019, 19(9): 5829-5835.
- [71] JOHNSTON T G, YUAN S-F, WAGNER J M, et al. Compartmentalized microbes and co-cultures in hydrogels for on-demand bioproduction and preservation[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 563.
- [72] KRISHNA KUMAR R, MEILLER-LEGRAND T A, ALCINESIO A, et al. Droplet printing reveals the importance of micron-scale structure for bacterial ecology[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 857.
- [73] KOSINA S M, RADEMACHER P, WETMORE K M, et al. Biofilm Interaction Mapping and Analysis (BIMA) of Interspecific Interactions in *Pseudomonas* Co-culture Biofilms[J]. *Front Microbiol.*, 2021, 12: 757856.
- [74] SCHAFFNER M, RÜHS P A, COULTER F, et al. 3D printing of bacteria into functional complex materials[J]. *Sci. Adv.*, 2017, 3(12): eaao6804.

- [75] OU Y, CAO S, ZHANG Y, et al. Bioprinting microporous functional living materials from protein-based core-shell microgels[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 322.
- [76] GANTENBEIN S, COLUCCI E, KAECH J, et al. Three-dimensional printing of mycelium hydrogels into living complex materials[J]. Nature Materials, 2022, 22: 128-134.
- [77] LODE A, KRUIJATZ F, BRUGGEMEIER S, et al. Green bioprinting : Fabrication of photosynthetic algae-laden hydrogel scaffolds for biotechnological and medical applications[J]. Engineering in Life Sciences, 2015, 15(2): 177-183.
- [78] MAHARJAN S, ALVA J, CÁMARA C, et al. Symbiotic photosynthetic oxygenation within 3D-bioprinted vascularized tissues[J]. Matter, 2021, 4(1): 217-240.
- [79] DANI S, WINDISCH J, VALENCIA GUERRERO X M, et al. Selection of a suitable photosynthetically active microalgae strain for the co-cultivation with mammalian cells[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 994134.
- [80] WITTE K, RODRIGO-NAVARRO A, SALMERON-SANCHEZ M. Bacteria-laden microgels as autonomous three-dimensional environments for stem cell engineering[J]. Mater Today Bio, 2019, 2: 100011.

作者简介: 李佩锡, 男, 2002 年出生。主要研究方向为生物 3D 打印, 生物增材制造。

E-mail: lipx21@mails.tsinghua.edu.cn

周德志, 男, 1994 年出生, 博士研究生。主要研究方向为生物 3D 打印, 心肌组织工程, 植物细胞打印。

E-mail: zhouz20@mails.tsinghua.edu.cn

欧阳礼亮(通信作者), 男, 1989 年出生, 博士, 助理教授, 博士研究生导师。主要研究方向为生物 3D 打印, 生物制造, 体外生命系统工程。

E-mail: ouy@tsinghua.edu.cn