



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114796604 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 202110647530.5

B33Y 10/00 (2015.01)

(22) 申请日 2021.06.08

B33Y 70/00 (2020.01)

B33Y 80/00 (2015.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114796604 A

审查员 郑森

(43) 申请公布日 2022.07.29

(73) 专利权人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路92号

(72) 发明人 刘文广 何彬彬

(74) 专利代理机构 天津创智睿诚知识产权代理

有限公司 12251

专利代理师 张静

(51) Int. Cl.

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

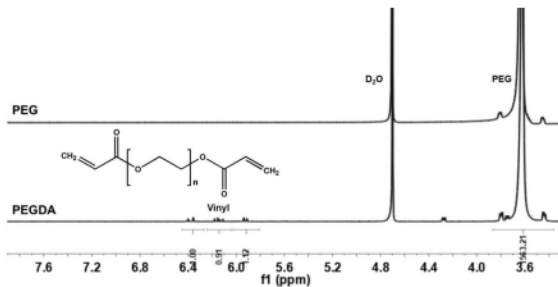
权利要求书1页 说明书7页 附图7页

(54) 发明名称

一种用于角膜再生的3D打印墨水及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种用于角膜再生的3D打印墨水及其制备方法和应用,使用磷酸缓冲溶液配置聚乙二醇二丙烯酸酯溶液和甲基丙烯酰化明胶溶液,并将聚乙二醇二丙烯酸酯溶液、甲基丙烯酰化明胶溶液、光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐和阻光剂柠檬黄通过0.22 μm 滤膜进行滤菌,在37℃环境下,将聚乙二醇二丙烯酸酯溶液、甲基丙烯酰化明胶溶液、光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐和阻光剂柠檬黄进行混合,得到3D打印墨水。本发明制备方法简单,材料来源广泛,实用性强。



1. 一种用于角膜再生的3D打印墨水,其特征在于:使用磷酸缓冲溶液(PBS)配置聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液和甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液,并将聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液、光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)和阻光剂柠檬黄(UVabsorber)通过0.22 $\mu$ m滤膜进行滤菌,在37 $^{\circ}$ C环境下,将聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液、光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)和阻光剂柠檬黄(UVabsorber)进行混合,得到3D打印墨水,其中,聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液的浓度为10、15、20wt%,甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液浓度为5wt%,苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)的浓度为0.25wt%,柠檬黄(UVabsorber)的浓度为0.05wt%,聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)、苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)和柠檬黄(UVabsorber)的质量比为(2-4):1:0.05:0.01。

2. 一种用于角膜再生的3D打印墨水的制备方法,其特征在于:使用磷酸缓冲溶液(PBS)配置聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液和甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液,并将聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液、光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)和阻光剂柠檬黄(UVabsorber)通过0.22 $\mu$ m滤膜进行滤菌,在37 $^{\circ}$ C环境下,将聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液、光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)和阻光剂柠檬黄(UVabsorber)进行混合,得到3D打印墨水,其中,聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液的浓度为10、15、20wt%,甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液浓度为5wt%,苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)的浓度为0.25wt%,柠檬黄(UVabsorber)的浓度为0.05wt%,聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)、苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)和柠檬黄(UVabsorber)的质量比为(2-4):1:0.05:0.01。

3. 利用权利要求1所述的一种用于角膜再生的3D打印墨水打印得到的打印产物(PEGDA-GelMA)在角膜再生支架材料上的应用,其特征在于:将3D打印墨水置于DLP3D打印机中,设置好打印参数,打印参数:曝光时间为20-80s,打印层高为20-60 $\mu$ m,打印温度为37 $^{\circ}$ C,打印完成后从基台上剥离即得到打印产物(PEGDA-GelMA)。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于:打印产物(PEGDA-GelMA)的拉伸强度、拉伸模量和断裂伸长率分别为82-83kPa,77-78kPa和100-104%;在550nm波长处,利用一种用于角膜再生的3D打印墨水打印得到的打印产物(PEGDA-GelMA)的透光率为82-91%,均大于天然角膜71.1%的透光率。

5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于:在不带细胞的情况下,打印角膜的条件为:曝光时间为40s,柠檬黄浓度为0.15wt%。

6. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于:在带细胞的情况下,打印角膜的条件为:曝光时间为80s,柠檬黄浓度为0.1wt%。

## 一种用于角膜再生的3D打印墨水及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医用材料技术领域,更具体地说涉及一种用于角膜再生的3D打印墨水及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 角膜是眼球表面一个透明、多层的结构,它的主要功能是聚集光线到晶状体上,然后将光线引向视网膜。其由角膜上皮、角膜基质、角膜内皮层所组成,上皮层由分层的上皮细胞构成,上皮细胞由角膜缘干细胞分化而来,其允许氧气和必需的营养物质渗入,并阻碍病原体和灰尘进入眼睛。基质层构成了角膜厚度的90%,由高度正交排列的胶原纤维所构成,其间含有角膜基质细胞。最内层是角膜内皮层,由一层内皮细胞所构成,再生能力较差。

[0003] 当角膜受到损伤的时候就有可能形成角膜疾病,如今,角膜疾病已经成为了致盲的主要原因之一。据统计,每年有将近一千万的角膜疾病患者,但是由于供体的缺乏,只有少于20万的患者可以进行角膜移植手术。因此,研究人工角膜替代物已经迫在眉睫。

[0004] 目前已经应用于角膜移植手术中的包括波士顿人工角膜,AlphaCor人工角膜等,尽管其成功地改善了许多患者的视力,但是随之而来的并发症,比如青光眼、眼内炎的风险增加,难以达到理想角膜替代物的要求。

[0005] 组织工程技术为角膜患者带来了福音,而作为组织工程三要素中的关键部分,支架材料的选择尤为关键。水凝胶是富含水的交联高分子网络的溶胀体,由于其具有良好的生物相容性,高孔隙率,高含水量和适宜的粘弹性,故有望应用于角膜再生中的支架材料。如今已有多种高分子材料及其复合物被用于制备水凝胶,比如天然高分子中的胶原,明胶,壳聚糖,丝素等,以及合成高分子中的聚乙二醇(PEG),聚己内酯(PCL)、聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)等,天然高分子通常具有优异的生物相容性,但是其机械性能难以达到要求,合成高分子可以通过改善合成工艺达到理想的性质,但是其生物活性较低,难以支持细胞的黏附、增殖,从而难以与自身组织融合达到再生的目的。因此,发展一种既具有足够生物相容性又具有足够机械性能的生物支架材料是非常重要的。

[0006] 3D生物打印技术是创造具有适宜细胞生长微环境的、用于组织工程和再生医学的支架材料的有效途径之一。在过去的几年中,数字光处理技术(DLP)作为一种光辅助3D打印技术受到了越来越多研究者的青睐,它可以解决在喷墨打印和挤出打印方式中的一些缺点,如挤出过程中细胞容易受到剪切力的损伤,对墨水粘度的高要求,打印时间过长导致的细胞活力下降等等。DLP利用分层打印、逐层光固化的方法可以制备出多种形状的产物,并且其墨水来源广泛,相较于传统紫外光引发,DLP的光源使用405nm波长,属于可见光波段,因此对细胞的损伤小。

### 发明内容

[0007] 本发明克服了现有技术中的不足,现有的角膜再生支架材料存在机械性能差,生物活性低,难以支持细胞的黏附、增殖,进而难以与自身组织融合达到再生的目的,提供了

一种用于角膜再生的3D打印墨水及其制备方法和应用,3D打印墨水主要由聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)和甲基丙烯酰化明胶(GelMA)组成,甲基丙烯酰化明胶(GelMA)能够增强凝胶的生物相容性,聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)能够增强凝胶的力学性能,利用数字光处理技术(DLP)3D打印技术制备出具有角膜形状的水凝胶,并对其光学性质,流变性质,力学性能,降解溶胀性质以及细胞相容性进行了测试,初步证明其在角膜再生的应用潜能。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案予以实现。

[0009] 一种用于角膜再生的3D打印墨水及其制备方法,使用磷酸缓冲溶液(PBS)配置聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液和甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液,并将聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液、光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)和阻光剂柠檬黄(UV absorber)通过0.22 $\mu$ m滤膜进行滤菌,在37 $^{\circ}$ C环境下,将聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液、光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)和阻光剂柠檬黄(UV absorber)进行混合,得到3D打印墨水,其中,聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液的浓度为10-20wt%,甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液浓度为5-10wt%,苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)的浓度为0.25-0.5wt%,柠檬黄(UV absorber)的浓度为0.05-0.15wt%,聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)、苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)和柠檬黄(UV absorber)的质量比为(1-5):(1-2):0.05:0.01,在DLP 3D打印机中设置好打印参数,打印参数:曝光时间为20-80s,打印层高为20-60 $\mu$ m,打印温度为37 $^{\circ}$ C,打印完成后从基台上剥离即得到打印产物(PEGDA-GelMA)。

[0010] 聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)溶液的浓度为10、15、20wt%,甲基丙烯酰化明胶(GelMA)溶液浓度为5wt%,苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)的浓度为0.25wt%,柠檬黄(UV absorber)的浓度为0.05wt%。

[0011] 聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)、苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)和柠檬黄(UV absorber)的质量比为(2-4):1:0.05:0.01。

[0012] 打印参数:曝光时间为20s,打印层高为50 $\mu$ m,打印温度为37 $^{\circ}$ C。

[0013] 聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)的制备方法:取聚乙二醇(PEG)(分子量为8000)溶于二氯甲烷中,得到聚乙二醇(PEG)溶液,然后向聚乙二醇(PEG)溶液中加入三乙胺,冰浴,待其冷却后,得到混合溶液,在恒压滴液漏斗中加入二氯甲烷和丙烯酰氯,以5s/滴的速度向上述混合溶液缓缓滴入二氯甲烷和丙烯酰氯的混合溶液,室温20-25 $^{\circ}$ C下反应24h后,将上述溶液逐滴滴入到冰乙醚中,沉降、过滤、烘干后,得到聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA),其中,聚乙二醇(PEG)、三乙胺、二氯甲烷和丙烯酰氯的质量比为10:1:70:0.6。

[0014] 甲基丙烯酰化明胶(GelMA)的制备方法:在40 $^{\circ}$ C下,将明胶溶于水中得到明胶水溶液,向上述明胶水溶液中加入氢氧化钠(NaOH),搅拌溶解后再加入N,N'-二甲基甲酰胺(DMF),待搅拌澄清后再加入甲基丙烯酸酐,40 $^{\circ}$ C下反应2h后,将上述溶液快速倒入无水乙醇中,沉降得到沉淀物,将沉淀物剪碎后继续加入到无水乙醇中洗涤,最后使用超纯水在37 $^{\circ}$ C的烘箱中将沉淀溶解、透析三天、冻干后,即得到甲基丙烯酰化明胶(GelMA),其中,明胶、氢氧化钠(NaOH)、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)和甲基丙烯酸酐的质量比为4:0.1:132:0.6。

[0015] 利用一种用于角膜再生的3D打印墨水打印得到的打印产物(PEGDA-GelMA)的拉伸强度、拉伸模量和断裂伸长率分别为82-83kPa,77-78kPa和100-104%。

[0016] 在550nm波长处,利用一种用于角膜再生的3D打印墨水打印得到的打印产物(PEGDA-Ge1MA)的透光率为82-91%,均大于天然角膜71.1%的透光率。

[0017] 在水凝胶的体外细胞毒性测试中,利用一种用于角膜再生的3D打印墨水打印得到的打印产物(PEGDA-Ge1MA)的细胞存活率相较于对照组均在90%以上,说明此打印产物(PEGDA-Ge1MA)的细胞相容性更好,且细胞与打印产物(PEGDA-Ge1MA)共培养1-3天后,细胞均能保持正常形态,存活率高。

[0018] 在不带细胞的情况下,打印角膜的条件为:曝光时间为40s,柠檬黄浓度为0.15wt%,而在带细胞的情况下,打印角膜的条件为:曝光时间为80s,柠檬黄浓度为0.1wt%。

[0019] 本发明的有益效果为:3D打印墨水主要由聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)和甲基丙烯酸酐化明胶(Ge1MA)组成,甲基丙烯酸酐化明胶(Ge1MA)能够增强凝胶的生物相容性,聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)能够增强凝胶的力学性能,利用数字光处理技术(DLP)3D打印技术制备出具有角膜形状的水凝胶,并对其光学性质,流变性质,力学性能,降解溶胀性质以及细胞相容性进行了测试,初步证明其在角膜再生的应用潜能,本发明制备方法简单,材料来源广泛,实用性强。

## 附图说明

[0020] 图1是聚乙二醇(PEG)与聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)的核磁图;

[0021] 图2是明胶与甲基丙烯酸酐化明胶(Ge1MA)的核磁图;

[0022] 图3A是聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、甲基丙烯酸酐化明胶(Ge1MA)、打印产物(PEGDA-Ge1MA-20-5)的XRD图,图3B是聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)与甲基丙烯酸酐化明胶(Ge1MA)的红外谱图;

[0023] 图4是甲基丙烯酸酐化明胶(Ge1MA)水凝胶,打印产物(PEGDA-Ge1MA)的拉伸图;

[0024] 图5是甲基丙烯酸酐化明胶(Ge1MA)水凝胶,打印产物(PEGDA-Ge1MA)的压缩图

[0025] 图6A是打印产物(PEGDA-Ge1MA)在PBS中的溶胀度,图6B是打印产物(PEGDA-Ge1MA)在I型胶原酶中的降解图,图6C是打印产物(PEGDA-Ge1MA)的透光率,图6D是天然角膜、打印角膜以及打印片状的透明度展示图,图6E是打印产物(PEGDA-Ge1MA)的频率扫描图,图6F是打印产物(PEGDA-Ge1MA)的模量统计图;

[0026] 图7是L929细胞在打印产物(PEGDA-Ge1MA)上的黏附与存活率,其中,(A)为水凝胶表面的细胞明场照片,(B)为水凝胶表面的细胞活死染色荧光照片,(C)为体外细胞毒测试,(D,E)为细胞与水凝胶共培养1,3天后的活死染色图,对照组为不加凝胶的空白对照;

[0027] 图8A是兔角膜上皮细胞(SIRC)与打印产物(PEGDA-Ge1MA)共培养1,3,5天的活死染色图,图8B是SIRC细胞与聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、甲基丙烯酸酐化明胶(Ge1MA)溶液、打印产物(PEGDA-Ge1MA)共培养1,3,5天的MTT测试数据,对照组为不加细胞的空白对照,图8C是光引发剂(LAP)与柠檬黄(UV absorber)的体外细胞毒测试;

[0028] 图9A和图9B是SIRC细胞在打印产物(PEGDA-Ge1MA)表面迁移的活死染色图以及对应的迁移率,图9C和图9D是SIRC细胞在打印产物(PEGDA-Ge1MA)表面黏附的活死染色图以及增殖数据;

[0029] 图10是SIRC细胞在打印产物(PEGDA-Ge1MA-20-5)中培养3天后的活死染色图。

## 具体实施方式

[0030] 下面通过具体的实施例对本发明的技术方案作进一步的说明。

[0031] 聚乙二醇二丙烯酸酯 (PEGDA) 的制备: 首先称取10g PEG ( $M_w=8k$ ) 于250mL圆底烧瓶中, 使用50mL二氯甲烷作为溶剂将其搅拌溶解, 然后向圆底烧瓶中加入1mL三乙胺, 冰浴30min, 在恒压滴液漏斗中加入20mL二氯甲烷和0.6mL丙烯酰氯, 以5s一滴的速度缓缓滴下以上溶液, 室温反应24h。将反应结束的溶液逐滴加入到大量的冰乙醚中, 进行沉降, 过滤, 烘干得到产物PEGDA。

[0032] 甲基丙烯酰化明胶 (GelMA) 的制备: 首先将4g明胶加入200mL水中, 在40℃下搅拌溶解, 待其溶解后, 加入几粒氢氧化钠 (NaOH), 搅拌溶解后加入132mL N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF), 待搅拌澄清加入290 $\mu$ L甲基丙烯酸酐, 等待10min, 再次加入292 $\mu$ L甲基丙烯酸酐, 40℃反应2h。将反应结束的溶液快速倒入大量无水乙醇中进行沉降, 将沉淀剪碎后继续加入无水乙醇中洗涤, 10min后使用180mL超纯水在37℃烘箱中将沉淀溶解, 透析三天, 冻干得到产物GelMA。

[0033] 实施例1

[0034] 3D打印墨水和打印产物 (PEGDA-GelMA) 的制备: 使用PBS配置一定浓度PEGDA溶液 (10wt%) 和GelMA溶液 (5wt%) 并通过0.22 $\mu$ m滤膜滤菌, 在37℃环境下向其中加入一定量的无菌光引发剂苯基 (2,4,6-三甲基苯甲酰基) 磷酸锂盐 (LAP, 0.25wt%) 以及阻光剂柠檬黄 (UV absorber, 0.05wt%), 在DLP 3D打印机中设置好打印参数, 曝光时间20s, 层高50 $\mu$ m, 打印温度37℃。

[0035] 实施例2

[0036] 3D打印墨水和打印产物 (PEGDA-GelMA) 的制备: 使用PBS配置一定浓度PEGDA溶液 (15wt%) 和GelMA溶液 (5wt%) 并通过0.22 $\mu$ m滤膜滤菌, 在37℃环境下向其中加入一定量的无菌光引发剂苯基 (2,4,6-三甲基苯甲酰基) 磷酸锂盐 (LAP, 0.5wt%) 以及阻光剂柠檬黄 (UV absorber, 0.1wt%), 在DLP 3D打印机中设置好打印参数, 曝光时间10s, 层高20 $\mu$ m, 打印温度37℃。

[0037] 实施例3

[0038] 3D打印墨水和打印产物 (PEGDA-GelMA) 的制备: 使用PBS配置一定浓度PEGDA溶液 (20wt%) 和GelMA溶液 (5wt%) 并通过0.22 $\mu$ m滤膜滤菌, 在37℃环境下向其中加入一定量的无菌光引发剂苯基 (2,4,6-三甲基苯甲酰基) 磷酸锂盐 (LAP, 0.25wt%) 以及阻光剂柠檬黄 (UV absorber, 0.05wt%), 在DLP 3D打印机中设置好打印参数, 曝光时间30s, 层高60 $\mu$ m, 打印温度37℃。

[0039] 对打印产物 (PEGDA-GelMA) 的表征:

[0040] (1) 对合成的PEGDA和GelMA进行核磁与红外的结构表征, 如图1所示, 图中显示在5.5-6.5ppm处出现了明显的双键峰, 说明丙烯酰氯已成功与PEG两端的羟基反应生成双键, 证明了PEGDA的成功合成, 如图2所示, 图中显示在5.0-6.0ppm处出现了明显的双键峰, 说明双键已成功接枝到明胶侧链上, ~3.0ppm处是明胶赖氨酸亚甲基上的峰, 通过积分可以计算得到GelMA的双键取代度为75%, 使用X射线衍射仪对PEGDA, GelMA以及打印产物 (PEGDA-GelMA) 进行结晶结构的表征, 如图3所示, GelMA无明显衍射峰, 但PEGDA与水凝胶均在2 $\theta$ 为19和23°处出现了衍射峰, 证明水凝胶内部含有由PEGDA引起的结晶结构, PEGDA中本应有的

羟基峰消失,而在 $1726\text{cm}^{-1}$ 出现了酯键的吸收峰,Ge1MA在 $3300\text{cm}^{-1}$ 出现了由于氢键导致的包峰,可能是因为羟基和酰胺键的存在,在 $1643\text{cm}^{-1}$ 处出现了酰胺I带的峰,以上结果再次说明PEGDA与Ge1MA的成功合成。

[0041] (2) 对不同比例的打印产物(PEGDA-Ge1MA)进行力学测试:首先打印出1mm厚的片状水凝胶,用压片机压出哑铃形状,或者打印出 $5*5*5\text{mm}$ 的圆柱状水凝胶,使用万能拉力机分别对其进行拉伸和压缩测试,如图4所示,结果表明,引入PEGDA可以提高Ge1MA的拉伸强度和拉伸模量,断裂伸长率也有一定程度的提高,这可能是由于PEGDA的长链赋予了水凝胶一定的韧性,其结晶结构也能有效提高水凝胶的强度。其中PEGDA-Ge1MA-20-5水凝胶的拉伸强度,拉伸模量和断裂伸长率分别可以达到 $82.2\text{kPa}$ , $77.2\text{kPa}$ 和 $101\%$ ,如图5所示,引入PEGDA对Ge1MA的压缩模量提高较少,但是对于压缩强度和韧性有所提高,在压缩展示图中,用手轻压Ge1MA凝胶,凝胶出现了碎裂,但是轻压PEGDA-Ge1MA-20-5水凝胶,其可快速恢复形状而不碎裂。

[0042] (3) 对不同比例的打印产物(PEGDA-Ge1MA)进行溶胀和降解测试:首先打印出 $5*5*5\text{mm}$ 的圆柱状水凝胶,称取质量,将不同比例的水凝胶浸泡在PBS中,于1,2,3,5,7,9,11,14天再次称取质量,用增加的质量比计算溶胀度。将打印的柱状水凝胶烘干称取质量,或者放置于胶原酶中,于7,14,28后拿出并烘干称取质量,计算剩余质量比,如图6A-D所示,打印产物(PEGDA-Ge1MA)能在1天之内达到溶胀平衡,并且PEGDA的含量越多,溶胀度越小,在一个月的时间内,三种比例凝胶的质量均有不同程度的减小,说明此材料在酶的作用下可以降解,其中PEGDA-Ge1MA-20-5水凝胶最后可剩余 $41\%$ 的质量,PEGDA-Ge1MA-10-5水凝胶由于强度较低,在降解过程中逐渐变软,因此只测到了7天的质量。

[0043] (4) 对不同比例的打印产物(PEGDA-Ge1MA)进行透光率和流变测试。首先打印出1mm厚的片状水凝胶,切割成适宜的形状并置于比色皿中,使用PBS作为空白对照,测试 $400-800\text{nm}$ 处的透光率。切割 $25\text{mm}$ 直径的圆片并置于流变仪的载物台上,进行频率扫描测试,扫描范围 $0.1-10\text{Hz}$ ,应变 $1\%$ ,温度 $37^\circ\text{C}$ ,如图6E-F所示,在 $550\text{nm}$ 波长处,PEGDA-Ge1MA-10,15,20-5水凝胶分别可以达到 $90.7$ , $86.3$ , $82.5\%$ 的透光率,均大于天然角膜的透光率( $71.1\%$ ),随着PEGDA的含量增加,水凝胶的储能模量和损耗模量均有一定程度的增加,其中PEGDA-Ge1MA-20-5水凝胶的储能模量与天然角膜的储能模量( $\sim 4\text{kPa}$ )接近。

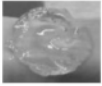
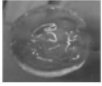
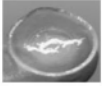
[0044] (5) 对打印产物(PEGDA-Ge1MA)进行小鼠成纤维细胞(L929)的体外细胞黏附以及毒性测试:对于黏附测试,首先打印 $10\text{mm}$ 直径,1mm厚度的圆片水凝胶并置于24孔板中,以 $5*10^4$ 细胞/孔的浓度接种L929细胞。培养48h后,使用显微镜拍照。为了更加清晰的观察细胞形态,使用活细胞/死细胞染色剂(Calcein-AM/PI)对细胞染色,最后使用倒置荧光显微镜拍照,如图7A-B所示,由于Ge1MA中具有细胞黏附位点,L929细胞可黏附在此PEGDA-Ge1MA水凝胶表面,并且保持正常的细胞形态和活性;对于细胞毒性测试,首先打印若干 $5\text{mm}$ 直径,1mm厚度的圆片水凝胶,将L929细胞以 $2*10^4$ 细胞/孔的浓度接种到96孔板中,培养24h,每孔加入以上水凝胶,共培养1天,3天之后加入新鲜培养基,继续培养24h,之后每孔加入 $20\mu\text{L}$  $5\text{mg/mL}$ 的3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)溶液以及 $180\mu\text{L}$ 新鲜培养基,培养4h,加入N,N'-二甲基亚砜(DMSO),在酶标仪中震荡3min,并测量 $570\text{nm}$ 处的吸光度,使用未加水凝胶的细胞作为对照组,通过吸光度的比值计算细胞存活率。在使用MTT定量测定细胞存活率的同时,使用以上活死染色法对细胞进行染色,并使用倒置荧光显微镜进行

拍照,如图7C-D所示,细胞存活率相较于对照组均在90%以上,说明此水凝胶的细胞相容性较好,细胞与水凝胶共培养1,3天后,细胞均能保持正常形态,存活率高。

[0045] (6) 使用兔角膜上皮细胞 (SIRC) 对打印产物 (PEGDA-Ge1MA) 的细胞相容性进行评价。使用上述细胞毒性测试方法,将不同浓度的PEGDA溶液 (10,15,20wt%),Ge1MA溶液 (5wt%),不同比例的打印产物 (PEGDA-Ge1MA) 与SIRC细胞共培养1天,3天,5天后进行MTT和活死染色测试。同时为了评价光引发剂LAP (0.25wt%) 以及阻光剂柠檬黄 (0.05wt%) 的细胞毒性,将其与SIRC细胞共培养1天,2天,3天后使用MTT法测试细胞存活率。对细胞在凝胶表面的迁移能力进行测试,将细胞以 $5 \times 10^4$ 细胞/孔的浓度接种于24孔板中,当细胞愈合度达到80%左右的时候,使用200 $\mu$ L的枪头在每孔中间部位划痕,之后在其上贴附一层水凝胶,培养1天,3天后对其进行活死染色,拍照并计算细胞迁移率。对细胞在凝胶表面的黏附以及增殖能力进行测试,将打印的凝胶圆片置于24孔板中,以 $5 \times 10^4$ 细胞/孔的浓度接种上SIRC细胞,培养2天,4天,6天后对其进行活死染色并拍照,并利用细胞增殖试剂盒 (CCK-8) 对细胞在凝胶表面的增殖进行测试,如图8所示,SIRC细胞与PEGDA-Ge1MA水凝胶共培养1,3,5天后,与对照组相比,SIRC细胞可以保持正常的细胞增殖能力,形态和代谢活力,且光引发剂 (LAP) 与柠檬黄 (UV absorber) 的体外细胞毒测试中,细胞存活率均在80%以上,无明显细胞毒性;如图9所示,SIRC细胞在水凝胶表面可以迁移,SIRC细胞可以在水凝胶上黏附,增殖,再次证明了此水凝胶有望应用于组织工程再生领域。

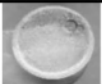
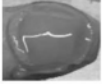

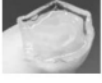

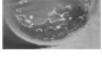
[0046] (7) 对打印产物 (PEGDA-Ge1MA) 包细胞打印角膜进行探究。固定PEGDA,Ge1MA的浓度分别为20,5wt%,LAP的浓度为0.25wt%,打印层高50 $\mu$ m,改变曝光时间和柠檬黄的浓度进行打印。首先对角膜建模,转换为stl格式并输入打印机中。通过调整曝光时间和柠檬黄的浓度,打印出具有不同形态的角膜,从角膜的厚度,强度对其进行评价并筛选出最佳的打印参数,具体数据详见表1和表2:

[0047] 表1不带细胞打印角膜结果展示

序号	曝光时间(s)	柠檬黄浓度 (wt%)	是否有产物	打印照片
1	10	0.05	×	—
2	20	0.05	√	
[0048] 3	20	0.1	×	—
4	40	0.1	√	
5	40	0.15	√	



[0049] 表2带角膜上皮细胞打印角膜结果展示

	序号	曝光时间(s)	柠檬黄浓度 (wt%)	是否有产物	打印照片
	1	40	0.05%	√	
[0050]	2	40	0.15%	√	
	3	60	0.1%	√	
	4	60	0.15%	√	
	5	70	0.15%	√	
[0051]	6	80	0.1%	√	

[0052] 从表1和表2可以得到,在不带细胞的情况下,使用40s的曝光时间,0.15wt%的柠檬黄浓度可以打出较好形状的角膜,而在带细胞的情况下,使用80s的曝光时间,0.1wt%的柠檬黄浓度可以打出较好形状的角膜。

[0053] 将打印得到的角膜放置于专用培养基中培养3天,进行活死染色,并利用倒置荧光显微镜拍照,如图10所示,细胞在水凝胶内部也具有较高的存活率。

[0054] 以上对本发明做了示例性的描述,应该说明的是,在不脱离本发明的核心的情况下,任何简单的变形、修改或者其他本领域技术人员能够不花费创造性劳动的等同替换均落入本发明的保护范围。

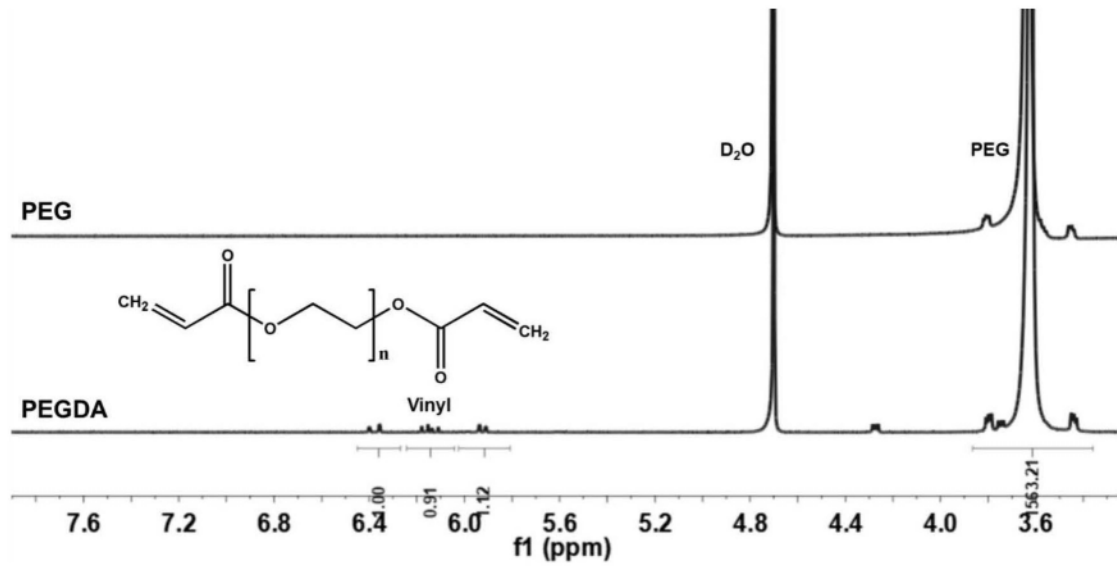


图1

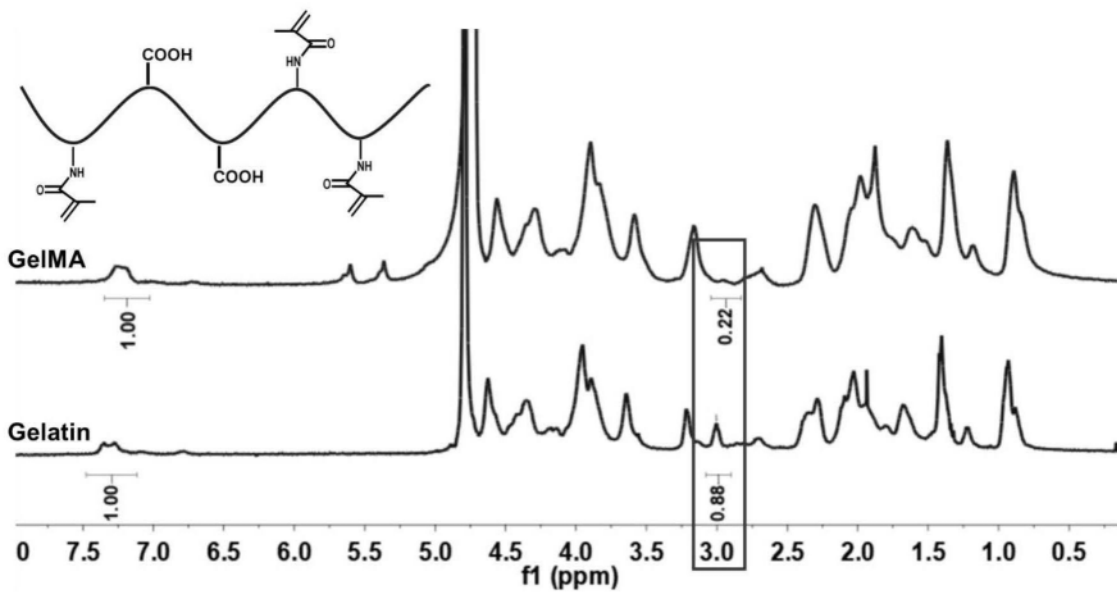


图2

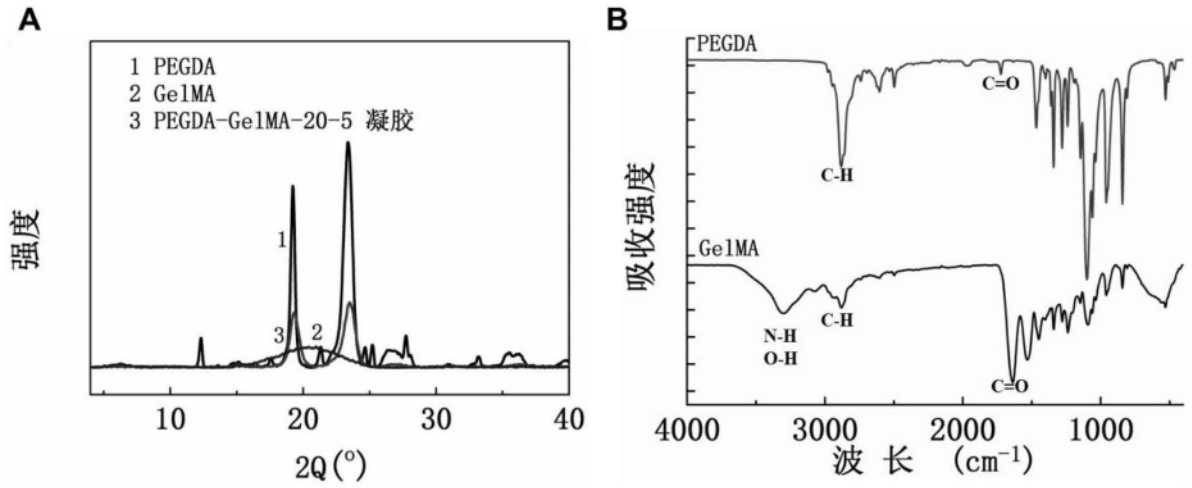


图3

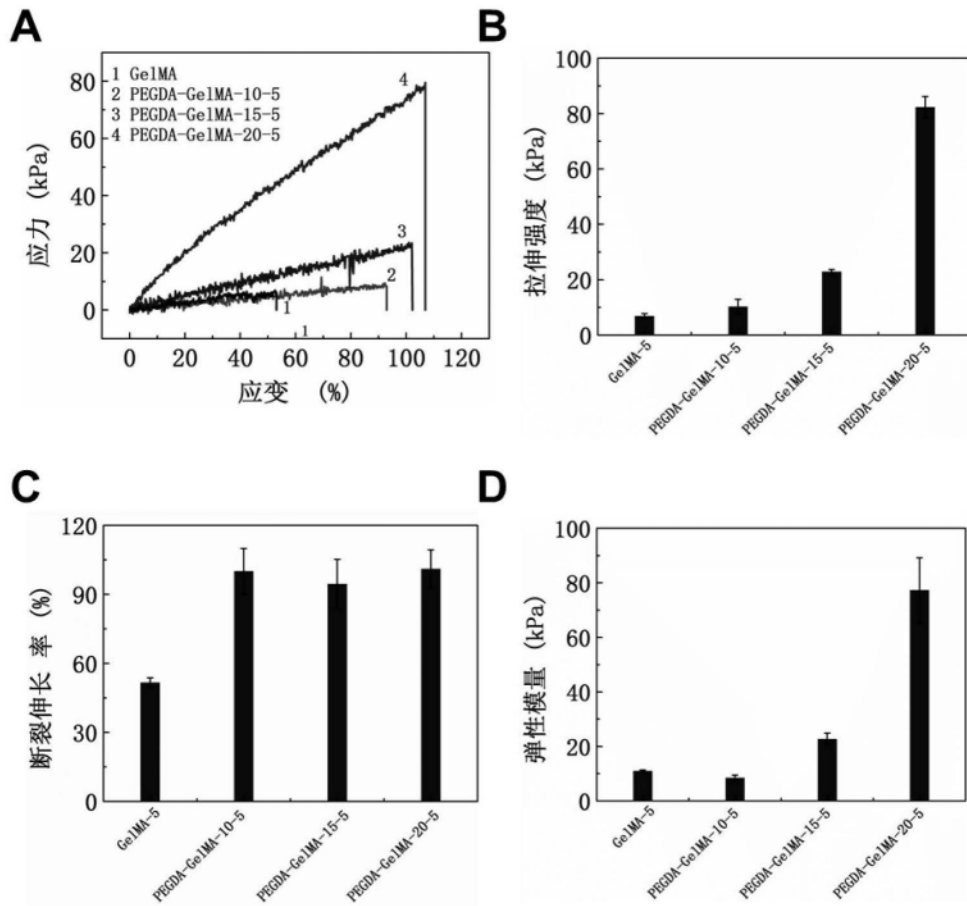


图4

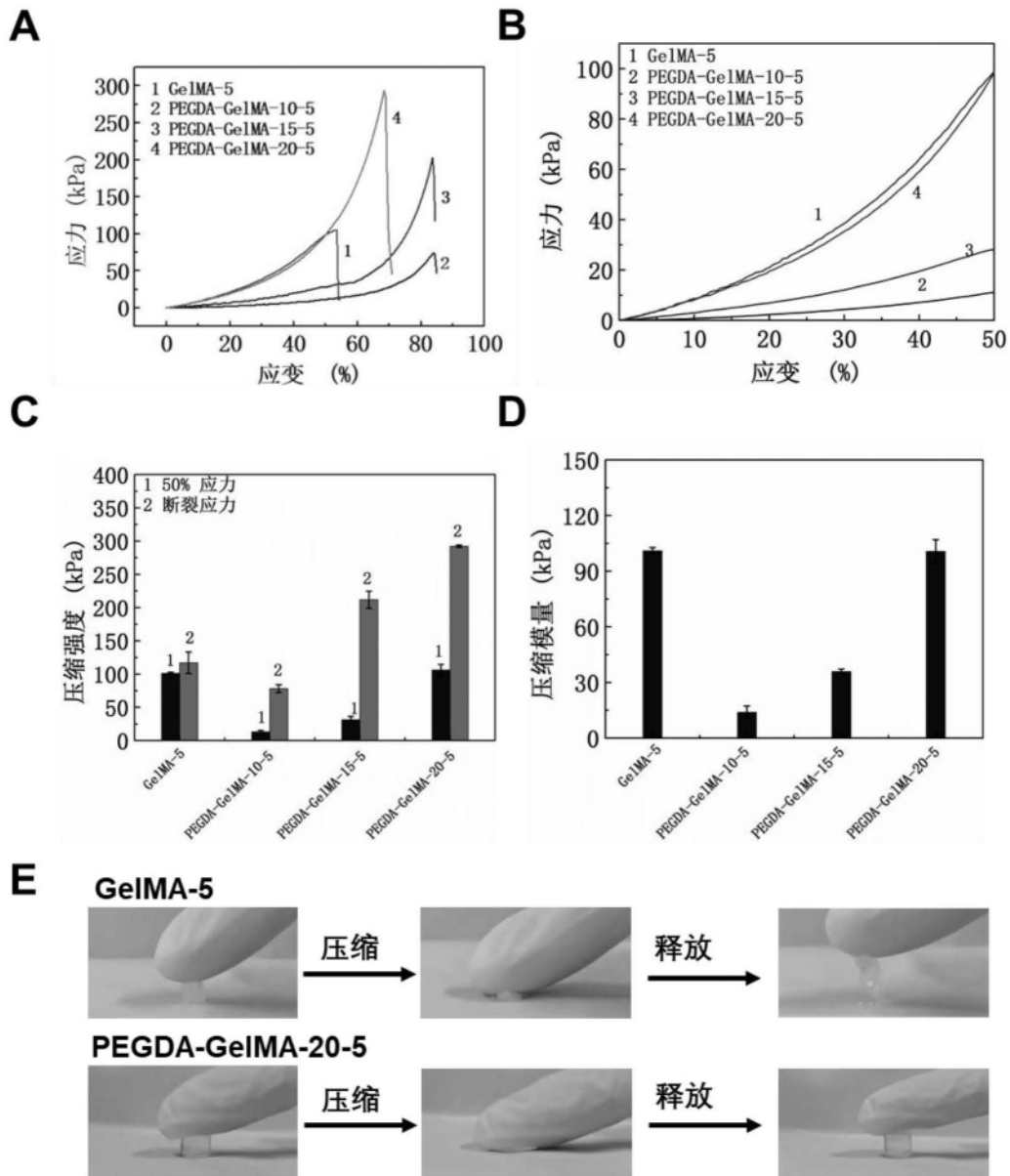


图5

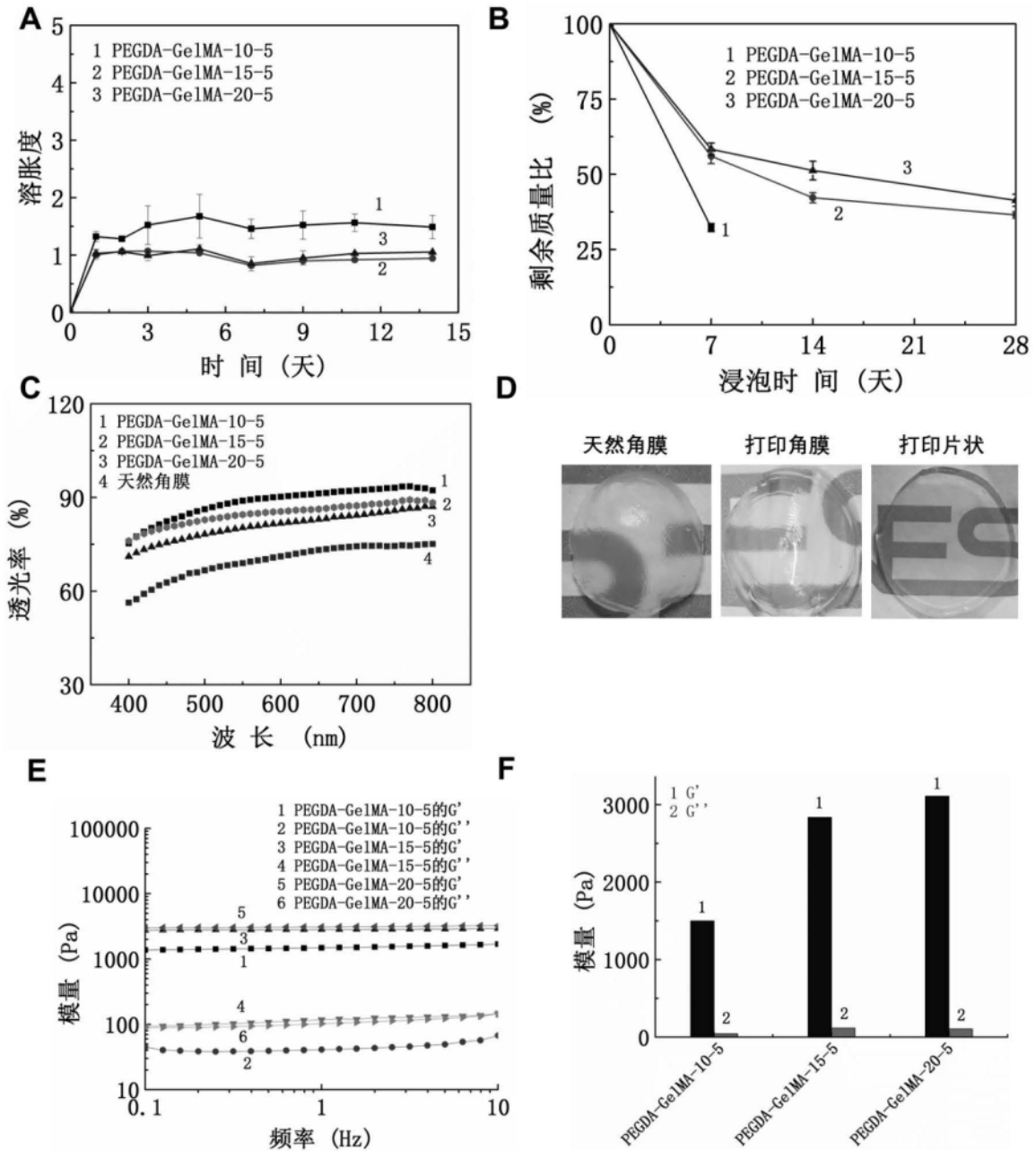


图6

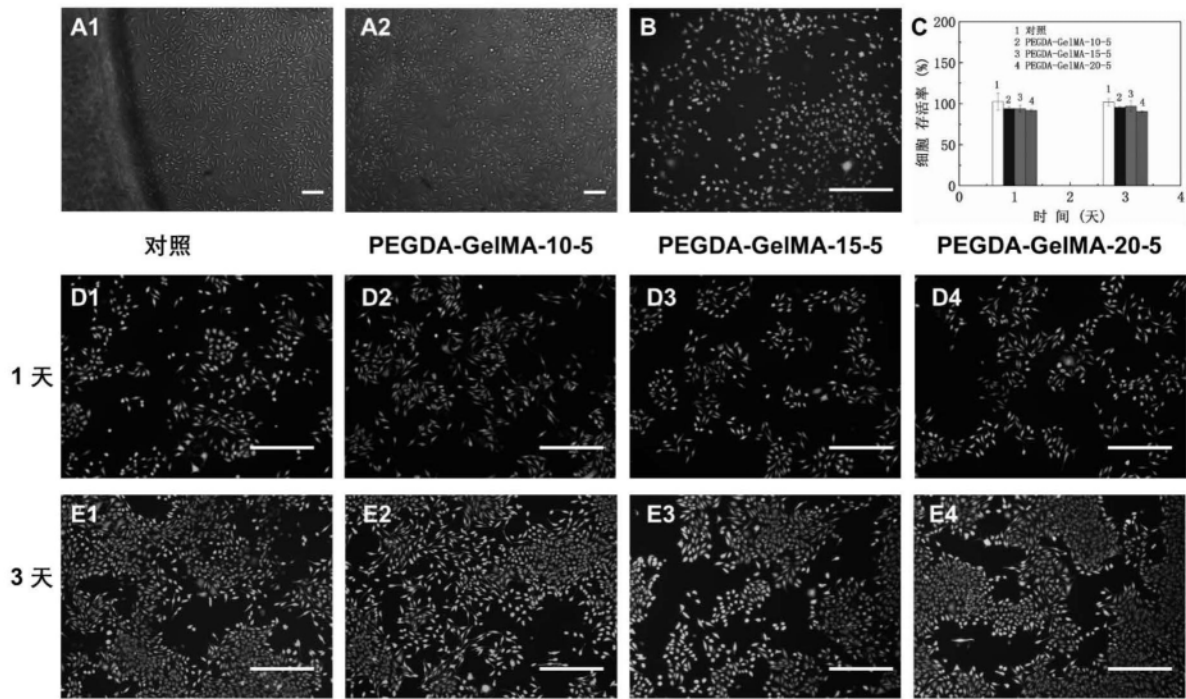


图7

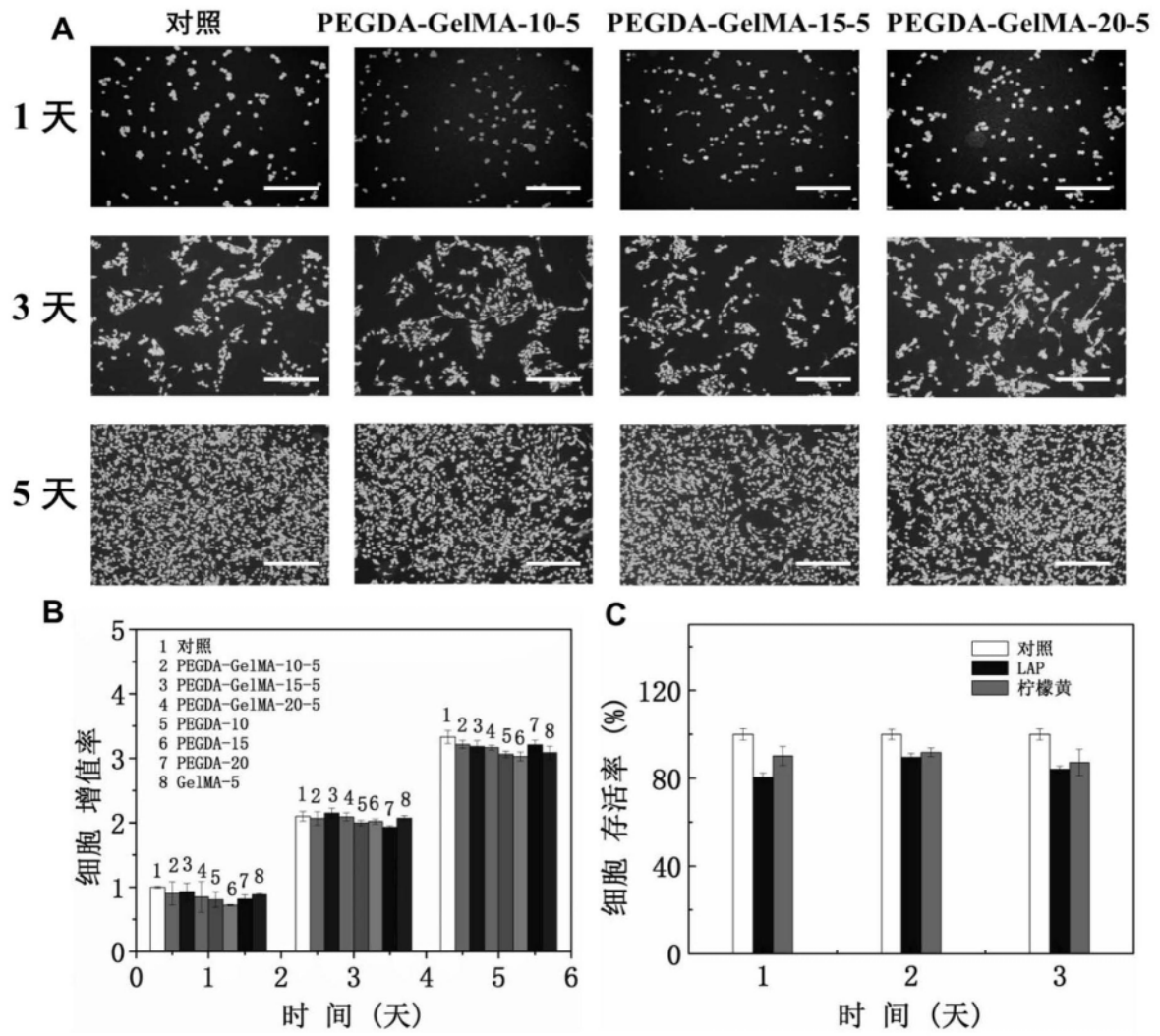


图8

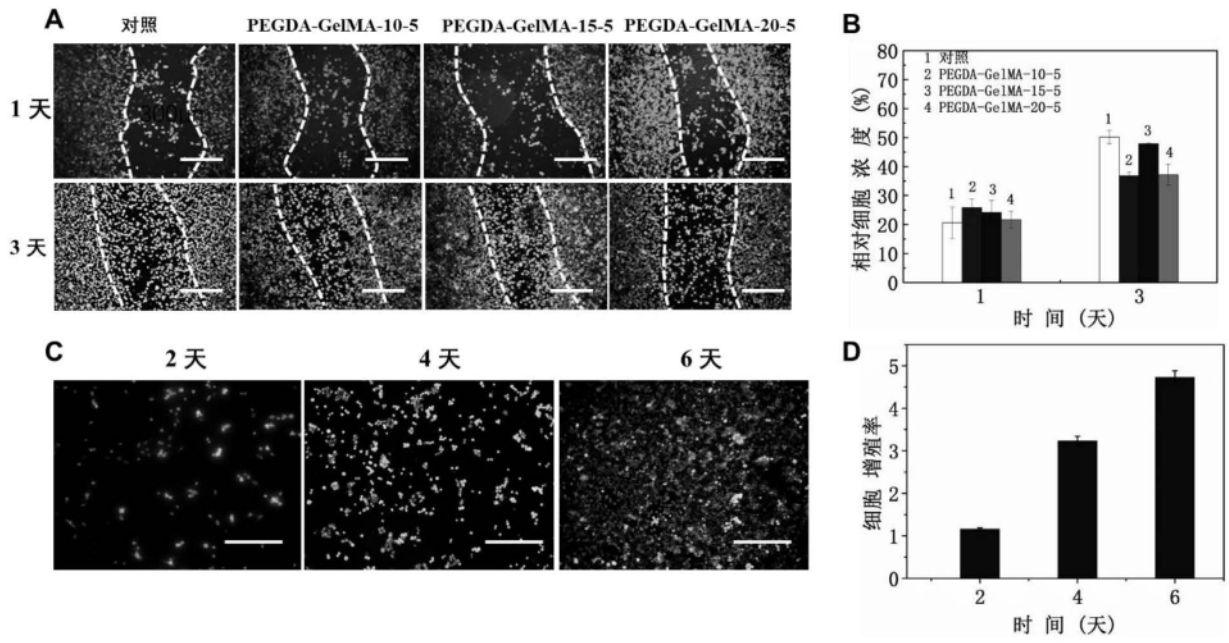


图9

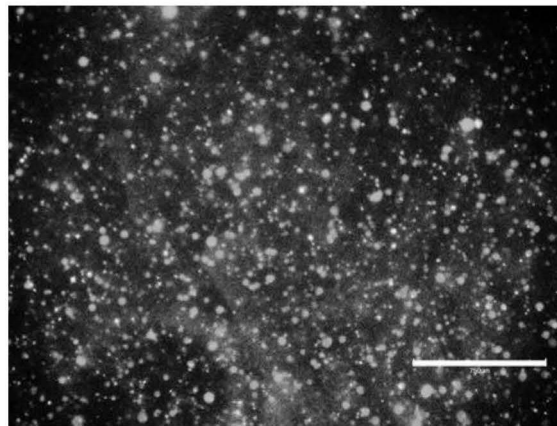


图10