

3D 打印壳聚糖水凝胶的设计制备及其在生物医学中的应用

雷秀雪, 吕永乐, 王磊*

(北京科技大学 材料科学与工程学院, 北京 100083)

摘要:壳聚糖水凝胶具有良好的生物相容性和生物降解性能,被广泛的应用于生物医学领域。壳聚糖水凝胶通常是壳聚糖溶液通过凝胶化过程形成交联结构。具有复杂结构的壳聚糖水凝胶不能通过传统方式制备,进而限制了它在生物医学中的应用。3D 打印技术是一种先进的制造技术,可以通过设计模型和调整打印参数制备具有个性化的水凝胶支架和具有高度复杂几何结构的水凝胶,这种水凝胶可以负载细胞和药物,以加速组织再生。壳聚糖水凝胶与 3D 打印结合在生物医学领域具有广阔的前景。综述了 3D 打印壳聚糖水凝胶的最新研究进展,根据交联策略的不同,从物理交联壳聚糖水凝胶和化学交联壳聚糖水凝胶两个方向分析了壳聚糖水凝胶的形成机理,讨论了常用的 3D 打印技术原理,包括喷墨式 3D 打印、挤出式 3D 打印以及光固化 3D 打印(立体光固化成型和投影式光固化成型),介绍了 3D 打印壳聚糖水凝胶在皮肤伤口愈合、骨组织工程、神经组织工程和药物递送系统中的应用,并对 3D 打印壳聚糖水凝胶在生物医学中的应用进行展望。

关键词:3D 打印技术;壳聚糖水凝胶;物理交联;化学交联;组织工程;药物递送系统

中图分类号:R318.08 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)07-0038-12

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0068

Design and Preparation of 3D Printed Chitosan Hydrogels and Its Application in Biomedicine LEI Xiu-xue, LV Yong-le, WANG Lei* (School of Materials Science and Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: Chitosan hydrogels have been widely used in biomedical applications because of their good biocompatibility and biodegradability properties. Chitosan hydrogels are usually prepared from chitosan solutions, which form a solid structure through a gelation process. Chitosan hydrogels with complex structure cannot be prepared by traditional methods, which limits its application in biomedicine field. 3D printing is an advanced manufacturing technology that allows for the preparation of hydrogels with personalized scaffolds and highly complex geometries by adjusting the printing parameters. These hydrogels can be loaded with cells and drugs to accelerate tissue regeneration. These hydrogels can be loaded with cells and drugs to accelerate tissue regeneration. The combination of chitosan hydrogels and 3D printing has a broad prospect in the biomedical field. This paper reviewed recent research progress on 3D printed chitosan hydrogels, discussed different crosslinking strategies such as physical and chemical crosslinking, explored common 3D printing technologies including inkjet, extrusion, and light-curing, and examines applications of 3D printed chitosan hydrogels in skin wound healing, bone tissue engineering, neural tissue engineering, and drug delivery systems. Future prospects for the use of 3D printed chitosan hydrogels in biomedicine were also outlined.

Key words: 3D printing technology; chitosan hydrogels; physical crosslinking; chemically crosslinking; tissue engineering; drug delivery systems

目前,修复组织损伤和治疗功能障碍仍然是全球医疗保健系统的巨大挑战。组织工程是将细胞生物学与材料科学结合起来,进行体外或体内构建组织或器官的新兴学科,它已被作为再生和替代人体组织和器官的方法。组织工程的目的是通过仿生支架再生受损组织。在这个过程中,制备出理想的功能性结构十分重要,它可以促进细胞的粘附、增殖与分化,以替代受损组织^[1]。

水凝胶是一类亲水的三维网络结构凝胶,它在水中迅速溶胀而不溶解。根据合成材料的不同,水凝胶可以分为人工合成高分子水凝胶和天

然高分子水凝胶。人工合成高分子材料主要有聚

收稿日期:2024-01-30;网络首发日期:2024-04-28

基金项目:国家自然科学基金项目(52003028);国家重点研究发展计划项目(2021YFB3800800)。

作者简介:雷秀雪(1999-),女,蒙古族,河北承德人,硕士生,主要研究方向为生物医用水凝胶。

共同第一作者:吕永乐(1999-),男,河南濮阳人,硕士生,主要研究方向为导电水凝胶。

通讯作者:王磊, E-mail: lei_wang@ustb.edu.cn。

引用本文:雷秀雪,吕永乐,王磊.3D 打印壳聚糖水凝胶的设计制备及其在生物医学中的应用[J].化学试剂,2024,46(7):38-49。

丙烯酸、聚甲基丙烯酸和聚丙烯酰胺等,天然高分子材料主要有壳聚糖、透明质酸、海藻酸、明胶等。壳聚糖水凝胶由于具有较好的生物相容性、生物降解性、抗菌性、低细胞毒性和与天然细胞外基质的特征相似性等优点,被广泛的用于组织工程、药物筛选和药物递送^[2]。

3D 打印是一种先进的制造技术,使用计算机辅助设计生成 3D 模型。最常用的 3D 打印技术有喷墨式、挤压式和光固化打印^[3]。3D 打印可以制造具有特异性结构的水凝胶,特异性的结构可以促进细胞的粘附、增殖和分化。3D 打印技术为组织工程和再生医学开辟了新的快速发展机会。本文主要总结了利用 3D 打印技术制备壳聚糖水凝胶以及在组织工程和药物递送中的应用。

1 壳聚糖水凝胶

1.1 壳聚糖

甲壳素是自然界中第二大生物资源,它在自然界的储量仅次于纤维素。螃蟹、虾的外壳,鱿鱼、乌贼的软骨和表皮,蘑菇和木耳等真菌类的细胞壁是甲壳素的主要来源^[4]。甲壳素是由 N-乙酰-2-氨基-2-脱氧-D 葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键形成多糖,即 N-乙酰-D-葡萄糖胺的聚糖。甲壳素中的大分子之间存在氢键,导致甲壳素一般不溶于水 and 有机溶剂,化学性质非常稳定,这限制它在生物医学中的应用。因此,研究者通过对其进行脱乙酰化、羧甲基化和硫酸化来增强甲壳素在水和有机溶剂中的溶解度^[5]。壳聚糖是甲壳素上的乙酰基脱乙酰化的产物^[6]。在脱乙酰化的过程中,乙酰基被去除并产生一个氨基。壳聚糖的脱乙酰度、分子量以及乙酰基的分布是决定壳聚糖特性和应用的主要因素,例如:脱乙酰度越大,拉伸强度和弹性模量越大;脱乙酰度越小,延伸率越好^[7]。

壳聚糖是一种亲水的、生物相容的、抗菌的多糖,它的化学结构如图 1 所示。壳聚糖有 3 种活性官能团:氨基(C-2, 2 号位置的碳)、一级羟基(C-3)和二级羟基(C-6)。壳聚糖是一种带有正电荷的多糖类聚合物。壳聚糖的正电荷可以与细菌细胞膜上的负电荷相互作用,使细胞内物质运输受阻,渗透压增加且细胞裂解,最终导致细菌的死亡。壳聚糖还可以作为止血剂与带有负电荷的血细胞表面相互作用,促进血栓的形成。除此之外,壳聚糖还可以与细胞因子和生长因子相互作

用,从而调节细胞增殖过程。壳聚糖可以应用于组织工程、药物递送、涂层、伤口愈合与敷料等多领域。

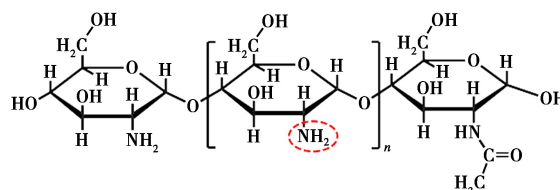


图 1 壳聚糖的化学结构

Fig.1 Chemical structure of chitosan

1.2 壳聚糖水凝胶

基于天然聚合物的水凝胶一般具有亲水性、良好的生物相容性和生物降解性^[8]。壳聚糖水凝胶属于多糖类水凝胶,相比于蛋白质类水凝胶,它的交联速度相对快些,这使得它具有一定的可打印能力。壳聚糖及其复合水凝胶可以利用 3D 打印技术制备内部具有特殊结构的水凝胶并应用于生物医学领域。

1.3 3D 打印壳聚糖墨水的设计

用于制备生物医用材料的聚合物主要分为天然聚合物与人工合成聚合物,可用于 3D 打印的常见人工合成聚合物主要包括聚己内酯、聚乳酸和聚乳酸-乙醇酸,它们具有良好的可打印性和机械性能,但是这些聚合物在制备生物墨水时需要添加一些有机溶剂。这些有机溶剂可能会降低材料的生物相容性,进而限制了人工合成聚合物在 3D 打印生物医学领域的应用^[9]。常用于 3D 打印的天然聚合物主要有壳聚糖、海藻酸盐、明胶以及透明质酸,相比于人工合成聚合物,天然聚合物具有更加优异的生物相容性,但是它们在机械强度和耐用性方面存在不足,所以开发出一种既可以满足生物学要求又可以满足机械性能和可打印性的生物墨水是一项具有挑战性的工作^[1]。

壳聚糖是一种天然多糖,它具有优异的生物相容性和生物降解性能。它可以用于制备多种生物材料,例如:伤口敷料、组织工程支架、药物递送载体等。根据患者的特定需求,壳聚糖可以利用 3D 打印技术制备具有复杂结构的水凝胶。不同的打印技术对生物墨水的要求不同,尤其是挤出式 3D 打印与光固化 3D 打印。挤出式墨水的关键特征主要是粘度与剪切变稀行为^[10],而光固化墨水的关键特征主要是可光固化与流动性^[11]。一种合适的生物墨水应具有优异的生物相容性、机械性能、可打印性、可生物降解以及可促进细胞

的粘附、增殖、迁移等性能。优异的可打印性可以提高模型的精度与结构的稳定性,但是具有优异的可打印性生物墨水通常会降低生物相容性。因此,开发具有优异的可打印性、高可用性和经济效益的新型墨水将迅速推动 3D 打印的进步。壳聚糖生物墨水的设计如图 2 所示^[12]。

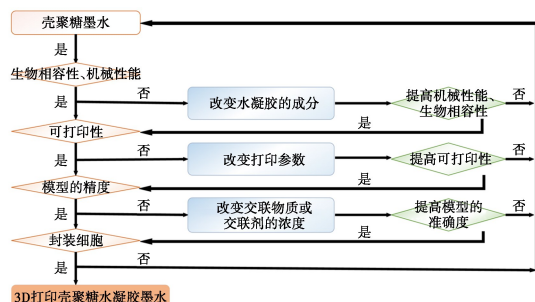


图 2 壳聚糖墨水的研制流程^[12]

Fig.2 Flowchart of developing a chitosan-based ink^[12]

2 3D 打印壳聚糖墨水交联策略

2.1 3D 打印壳聚糖墨水的物理交联

一般物理交联壳聚糖生物墨水的凝胶方式主要通过碱性或中性环境触发离子凝胶过程,以及通过氢键、疏水作用以及范德华力引发交联^[12]。不同物理相互作用产生的壳聚糖水凝胶网络示意图,如图 3 所示。

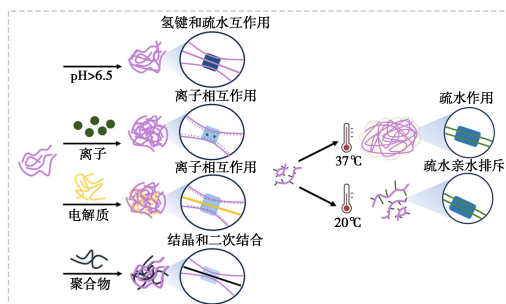


图 3 不同物理相互作用产生的壳聚糖水凝胶网络示意图

Fig.3 Schematic representation of chitosan hydrogel networks resulting from different physical interactions

壳聚糖的溶解度是由氨基之间的排斥力、分子链之间的氢键和疏水相互作用决定的^[3,13]。在酸性环境中,壳聚糖表面的氨基质子化,从而溶于酸性溶液。离子交联的壳聚糖水凝胶主要通过调节壳聚糖溶液 pH 形成。壳聚糖溶液 pH > 6.5 时会促进壳聚糖分子链上的伯胺基团去质子化,氢键以及疏水相互作用,导致水凝胶的快速形成^[14]。离子交联的壳聚糖水凝胶也可以通过与

带有负电荷的小分子或离子交联形成,例如有负电荷的小分子或离子(三聚磷酸钠和三聚磷酸盐)^[15]。当三聚磷酸盐溶液与壳聚糖溶液混合时,三聚磷酸根和氢氧根都会与质子化的氨基反应,从而降低三聚磷酸根与壳聚糖的交联度^[16]。当壳聚糖溶液 pH < 6.5 时,壳聚糖溶液中的质子化氨基与三聚磷酸根形成静电相互作用,生成水凝胶的三维网络^[17]。

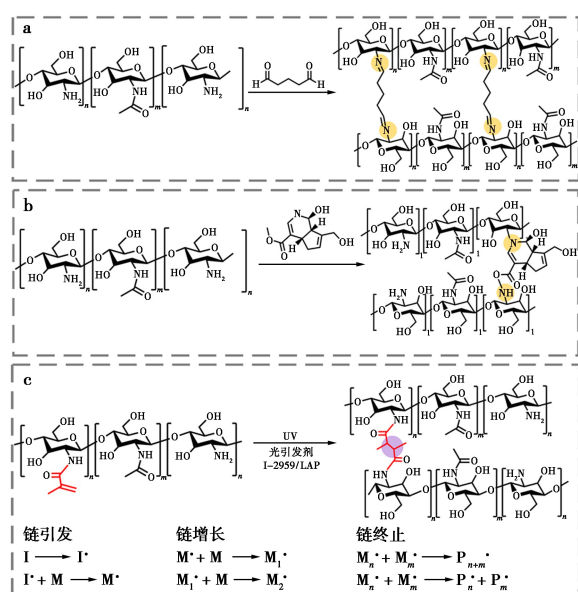
壳聚糖是一种阳离子聚合物,在酸性环境中表面的氨基质子化后与阴离子聚合物反应形成聚电解质配合物^[18]。壳聚糖与其他水溶性非离子型聚合物以结晶或二次结合的方式连接在一起,链与链之间的相互作用作为壳聚糖水凝胶的交联点^[19]。

物理交联壳聚糖水凝胶除了通过以上的方法制备,还可以通过改变周围环境的温度形成。温度敏感型水凝胶是随着周围环境温度的变化而产生刺激响应性的智能材料^[20]。温度敏感型壳聚糖水凝胶结构中含有许多疏水和亲水基团,温度的变化可以影响这些基团的疏水作用和分子链间的氢键,从而改变水凝胶的三维网络结构。温度低于临界转变温度时,水凝胶材料会经历亲水-疏水的转变以及分子间氢键的形成,促进水凝胶三维网络的形成^[21]。基于这一特点,温度敏感型水凝胶在药物递送领域成为一种具有潜力的功能性材料^[22]。

2.2 3D 打印壳聚糖墨水的化学交联

化学交联壳聚糖水凝胶相比于物理交联具有可调节共价交联网络的优势。共价交联网络密度主要受交联剂的类型、交联剂的浓度、交联点的数量和活性以及交联方式影响^[23,24]。壳聚糖墨水的化学交联主要是通过壳聚糖上的氨基或羟基与交联剂或改性后的壳聚糖与引发剂之间共价相互作用形成的。应用于 3D 打印的化学交联方式主要有非光交联和光交联两种方式。常见的交联剂交联机理如图 4 所示。

非光交联壳聚糖水凝胶主要是通过添加交联剂形成。壳聚糖分子链中含有大量的氨基和羟基,壳聚糖可以通过希夫碱反应、酰化反应与交联剂连接在一起,形成三维网络结构,常见的交联剂主要是戊二醛和京尼平^[25]。戊二醛两端的醛基和壳聚糖的氨基反应生成碳氮双键将壳聚糖分子连接起来,形成壳聚糖水凝胶^[26],交联机理如图 4a 所示。京尼平除了具有抗炎、抗菌的作用,也



a. 戊二醛相互作用机理; b. 席尼平相互作用机理;
c. 光交联相互作用机理

图 4 不同化学相互作用产生的壳聚糖水凝胶

Fig.4 Chitosan hydrogels resulting from different chemical interactions

常用于壳聚糖水凝胶形成^[25,27,28], 交联机理如图 4b 所示, 壳聚糖分子链上的氨基与二氢吡喃环上的氧进行亲核反应, 将其接到壳聚糖分子链上, 另一端上的酯基与聚糖分子链的氨基进行反应, 将两条壳聚糖分子链连接在一起形成三维网络^[29]。

非光交联壳聚糖水凝胶的强度低, 在打印过程中模型会发生形变, 而光交联可以增加壳聚糖水凝胶的强度使得在打印过程中模型不会发生形变。光交联壳聚糖水凝胶主要通过带有特定官能团(如碳碳双键)的壳聚糖溶液中加入光引发剂, 通过可见光或紫外光的照射诱导自由基聚合形成水凝胶。常用的引发剂主要有光引发剂 2959^[30] 和 LAP(苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐)^[11], LAP 是一种水溶性光引发剂, 其生物相容性优于光引发剂 2959。交联机理如图 4c 所示, 自由基聚合通常包括引发、增长和终止 3 个阶段。首先, 光引发剂在光辐照下裂解形成自由基。生成的自由基攻击壳聚糖链上的不饱和碳碳双键, 形成聚合物自由基。在增长阶段, 这些聚合物自由基会继续与烯基壳聚糖链反应, 导致自由基链的增长。最终, 自由基通过偶联、歧化或链转移消失, 增长过程终止, 最终形成光固化的壳聚糖水凝胶。

3 壳聚糖墨水的 3D 打印技术

3D 打印是一种先进的制造技术, 使用计算机

辅助设计(CAD、SOLIDWORKS、3D MAX 等三维建模软件)生成 3D 模型, 然后将其转化为 STL 格式的文件。STL 格式的文件导入切片软件, 将三维立体模型数据转化二维片层数据, 然后使用 3D 打印机将墨水逐层沉积在基板上。生物 3D 打印技术主要有喷墨式、挤出式和光固化打印^[31]。

3.1 喷墨式 3D 打印

喷墨式 3D 打印主要分为热喷墨式和压电式 3D 打印, 如图 5a 所示^[32]。热感应式喷墨 3D 打印技术是利用一个薄膜电阻器, 在墨水喷出区中将 <0.5% 的墨水加热, 形成一个气泡, 如图 5a₁ 所示。该气泡快速扩展, 将墨滴从喷嘴中喷出。气泡继续扩展几微秒后在电阻器上消失后喷嘴中的墨水便缩回去。然后表面张力会产生吸力, 将新的墨水补充到墨水喷出区。机器重复以上过程, 直到模型打印完成。热感应式喷墨 3D 打印技术具有打印速度快的优势。

微压电喷墨 3D 打印技术是将许多微小的压电陶瓷放置在喷嘴附近, 压电陶瓷在两端电压变化作用下会发生弯曲变形。计算机将图像信息电压加到压电陶瓷上时, 压电陶瓷的形状将随着图像信息电压的变化而变化, 使喷嘴能够均匀且准确的喷出墨水, 如图 5a₂ 所示。压电式喷墨 3D 打印技术难以将多个喷嘴集中到一个打印头上从而降低打印速度, 并且当喷头堵塞时需要浪费大量的墨水清洗墨头^[31]。

3.2 挤出式 3D 打印

挤出式 3D 打印根据使用材料可以分为两类: 熔融沉积成型和墨水直写两类。墨水直写式挤压 3D 打印技术根据沉积机制分为气动和机械(活塞和螺旋杆)。挤出式 3D 打印是计算机根据三维模型的截面信息控制喷头沿 X 和 Y 轴运动, 将丝材或者墨水连续的沉积在打印平台上, 直至三维模型打印完成^[33]。

熔融沉积成型技术(FDM)是一种将各种热熔性的丝状材料送进喷嘴, 在喷嘴内被加热至熔融状态, 喷嘴根据三维模型的截面信息做平面运动, 由喷嘴挤出的材料均匀地平铺一层后, 这层材料可以在短时间内进行冷却, 并且和上一层固化的材料粘结在一起, 层层堆积, 直至三维模型打印完成。熔融沉积成型技术具有低成本、运行稳定、适用材料范围广等特点, 但是它只适用于中小型模型的制作, 并且有在制备时成型速度慢、效率低、成型精度低等缺点。熔融沉积成型技术在制

备模型时需要使用热塑性丝状材料,在熔化材料时温度很高,不能容纳包裹细胞和生物活性物质的材料,这阻碍了熔融沉积成型技术在生物医学领域的应用。

墨水直写式挤压 3D 打印技术根据沉积机制分为气动和机械(活塞和螺旋杆)。沉积机制为气动的挤出式 3D 打印技术是使用气体压力将墨水从喷嘴种挤压出来^[34],如图 5b 所示。机械挤出式 3D 打印技术是使用线性移动(图 5c)^[35]和旋转螺旋(图 5d)^[36]的活塞将墨水从喷嘴中挤压出来。与沉积机制为气动的 3D 打印技术相比,基于机械的 3D 打印技术可以更加精确的控制沉积质量^[37],这是因为通过压缩气体体积来增加压强时会出现延迟。基于旋转螺旋杆的 3D 打印在挤出墨水时,驱动力较大,在打印过程中可能会破坏生物墨水中的细胞。挤出式墨水材料一般要满足以下 3 个特点:具有良好的稳定性^[37];各组分之间不会发生化学反应;具有一定的黏弹性和剪切变稀特性^[38]。

3.3 光固化 3D 打印技术

光固化 3D 打印技术是利用紫外光或可见光启动光敏材料进行交联反应的打印技术,将其逐层固化形成由三维建模软件设计的三维模型^[39]。

光固化 3D 打印技术相比于喷墨式 3D 打印技术和挤出式 3D 打印技术具有精度高和打印速度快等优势^[24]。光固化 3D 打印技术广泛的应用于医学、工业、建筑业以及设计领域。光固化 3D 打印主要分为立体光固化成型技术和投影式光固化成型技术^[40]。

3.3.1 立体光固化成型

立体光固化成型技术(SLA)最早是由美国加州大学的 Charles W. Hull 发明的。随着科学技术的进步,SLA 技术逐渐成熟,并且越来越多行业也开始应用这项技术,从而进一步的促进 SLA 技术的发展。SLA 技术的工作原理是将液态的光敏性高分子材料通过逐层堆积的方式加工成三维模型^[41]。SLA 技术具有制备速度快和精度高的特点,可以制造出具有复杂结构、高精度的零部件与模型。SLA 技术的工作原理如图 5e 所示。

SLA 技术在制造完整的三维模型时,主要经过以下几个步骤:模型的设计、选择合适的光敏性高分子材料并且倒入液槽中、模型进行切片处理、开始打印、取出模型、后处理。首先使用计算机设计需要制备的三维模型并选择合适墨水。其次,将模型数据导入切片软件中,使其转换成许多二维片层数据。将数据导入 SLA 打印机中,在数

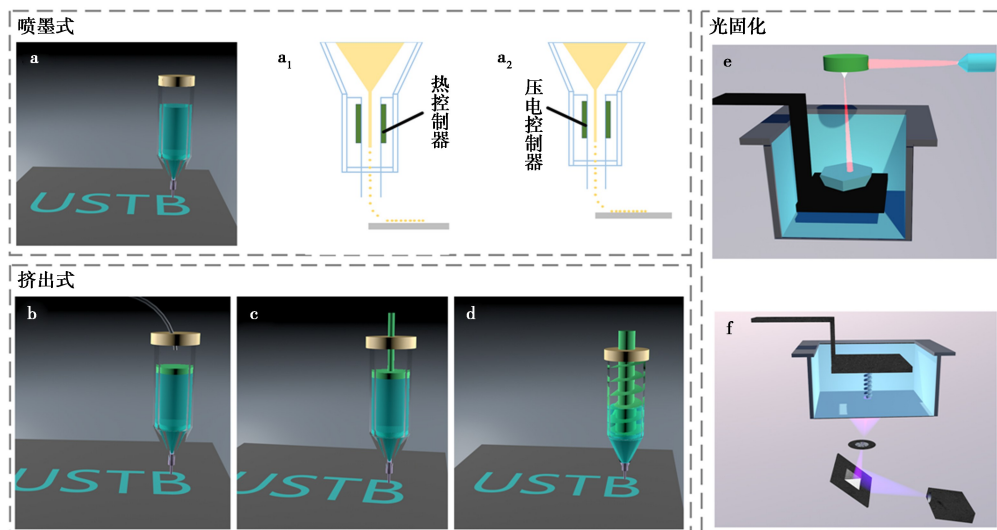


图 5 a.喷墨式 3D 打印技术的示意图(a₁:热感应式喷墨;a₂:压电式喷墨);b.气动挤出式 3D 打印技术机理示意图;c.活塞挤出式 3D 打印技术机理示意图;d.螺旋挤出式 3D 打印技术机理示意图^[36];e.立体光固化成型技术的示意图;f.数字光处理成型技术的示意图

Fig.5 a.Schematic diagram of inkjet 3D printing technology (a₁: thermal inkjet; a₂: piezoelectric inkjet); b.Schematic diagram of the mechanism of pneumatic extrusion 3D printing technology; c.Schematic diagram of the mechanism of piston extrusion 3D printing technology; d.Schematic diagram of the mechanism of spiral extrusion 3D printing technology^[36]; e.Schematic diagram of stereolithography technology; f.Schematic diagram of digital light processing and forming technology

字信号的控制下,激光束按照模型的片层和轮廓信息聚焦到光敏性高分子材料表面的每个点上,进行照射,使其逐层固化,固化一层后,打印平台沿 Z 轴往下降一定高度,然后刮刀将树脂刮平、保证每层打印的厚度相同,逐层重复这个过程,直到整个模型制造完成。三维模型制造完成后、将模型从液态的光敏性高分子材料中取出并放在合适的清洗剂中进行清洗,使其将表面或内部复杂结构上残留的光敏性高分子材料清洗干净,否则,残留的光敏性高分子材料可能会对零部件造成破坏。清洗完成后,对其进行去除支撑结构、烘干、添加颜色等操作。

立体光固化打印技术是使用紫外光的单光子聚合过程,它的精度受光学衍射极限的限制,难以满足高精度微观结构的制备。相比于传统的 SLA 打印技术,双光子聚合技术(TPP)采用近红外飞秒脉冲激光作为光源,它可以打破光学衍射极限的限制,制备纳米尺寸的三维模型^[42]。

TPP 在制备三维模型时,以飞秒激光作为激发光源并在光路中安装快门和衰减器用来调整曝光时间和光强。光束经过扩束镜后由物镜聚焦到待加工的光敏性高分子材料,利用三维移动系统控制激光在光敏性高分子材料中按照片层以及轮廓信息进行扫描^[42]。制备完成后,将模型放在合适溶液(无水乙醇)中洗去残留的光敏性高分子材料。

3.3.2 投影式光固化成型技术

数字光处理成型技术(DLP)是通过投影仪发射紫外线或可见光来逐层固化光敏性高分子材料,从而快速的制备出三维模型的一种快速成型技术^[11]。近几年,DLP 成型技术快速发展,并已广泛的应用于生物医学领域^[11]。到目前为止,已经设计出各种适合生物医学的可光固化高分子墨水并用于 DLP,DLP 工作原理如图 5f 所示。

DLP 技术主要由投影部分、液槽成型部分、Z 轴移动部分以及其它框架构成。其中投影部分最为重要,它由光源、数字投影仪、液晶屏和反射镜组成^[40]。DLP 技术在打印模型时,首先三维模型在计算机的辅助下获取片层信息,然后将模型的片层信息导入 DLP 打印机中,投影仪将片层数字信息转换为光信号,通过 DMD 芯片还原片层的原始图像^[1]。投影仪发射出来特定波长的紫外光照射到液槽底部,通过光强度和图形的控制,固化具有一定厚度和形状的薄层。随后,模型成型

台在升降系统的控制下沿 Z 轴向上移动一层,投影仪继续将下一层的图像信息投影到液槽底部并且固化,如此循环,直到三维模型打印结束。三维模型制备完成后进行后处理,将表面与内部结构残余的光敏性高分子材料清洗干净,并对其进行去除支撑结构、烘干、喷漆等操作。

DLP 技术采用逐层固化的方式进行打印,打印过程中是一个不连续的过程,不断重复复位、打印、分离和等待 4 个步骤,直至模型打印完成^[43]。打印一层需要几秒或几十秒的时间,此外 DLP 在打印三维模型中存在明显的阶梯效应,片层厚度越厚,阶梯效应越大,同时力学性能越差且各向异性越明显。DLP 打印技术的打印速度与打印质量成反比关系,无法实现快速高质量打印^[44]。相比于传统的 DLP 技术,连续液面成型 3D 打印技术(CLIP)在打印速度和打印质量上都得到了大幅度的提升,在一定程度上突破了传统 DLP 技术在打印速度和打印质量上相互制约的限制。CLIP 3D 打印技术只有复位与打印两个步骤,只需复位一次就可以连续打印^[45]。CLIP 技术是将氧气对自由基光敏性高分子材料在光固化过程中的阻聚作用(氧阻聚效应)应用到 3D 打印工艺中^[46]。在固化截面上安装一层透氧膜,这层透氧膜可以同时允许光线和氧气的通过,氧气可以起到抑制某些区域高分子材料固化的作用,光线会固化没有暴露在氧气里的高分子材料区域。由于氧气的进入并覆在材料表面,形成一层因氧气溶解度达到阻聚阈值而始终保持液态的“盲区”层。“盲区”层中存在部分已固化的高分子材料,已固化的部分在液槽中拉出时会产生负压,负压使周围的树脂不断补充进来,保证了打印过程的连续性。尽管 CLIP 3D 打印技术很大程度上提高了光固化成型速度,但是由于该成型技术利用了氧阻聚效应,它只能使用丙烯酸酯类的光敏性高分子材料,而不能使用环氧类光敏性高分子材料。同时对打印材料的流动性有更高的要求,保证材料能及时的填充固化反应区域,所以该技术还需要进一步的优化。

3D 打印技术是一种先进的制备技术,它可以制备具有复杂结构的三维模型。3D 打印技术能够根据不同患者的需要,可以快速精确制备适合不同患者的个性化医疗设备,并能同时对医疗设备的微观结构进行精确控制。因此,这种生物 3D 打印制备技术在生物医学应用,尤其是在组织工

程应用中具有独特的优势。应用于生物医学领域的 3D 打印技术主要有喷墨式、挤出式以及光固化打印技术。各种 3D 打印技术都有各自的优缺点,如表 1 所示。

表 1 用于壳聚糖墨水的 3D 打印技术的比较
Tab.1 Comparison of 3D printing technologies for chitosan ink

方法	墨水粘度/ (mPa·s)	精度	优势	局限性
挤出	6~30×10 ⁷	50~1000 μm	材料来源广发;易操作;成本低;可多材料制备	打印速度慢;喷嘴堵塞
喷墨	2~10	10~500 μm	高精度;高速度;多材料制备;多尺寸制造	纵向质量差;喷嘴堵塞
立体光固化	无特别要求	30~500 μm	高精度;无堵塞问题	可打印材料少;浪费墨水
双光子聚合	无特别要求	65 nm~1 cm	高精度;无堵塞问题;耗时短	可打印材料少
数字光处理	无特别要求	1~100 μm	高精度;打印速度快;无堵塞问题	可打印材料少;浪费墨水;不可连续打印
连续液面成型	无特别要求	30,75~162 μm	高精度;打印速度快;无断层	可打印材料少

4 3D 打印壳聚糖水凝胶在组织工程和药物递送中的应用

水凝胶具有优异的亲水性和三维网络结构使其不仅与组织有良好的亲和性,还能为组织工程提供微环境,为药物等小分子提供载体。壳聚糖水凝胶具有优异的生物相容性和生物降解性。3D 打印是一种先进的制造技术,它可以制备负载细胞或药物且具有高度复杂几何形状的特异性壳聚糖水凝胶支架,从而促进组织的修复与再生或药物的递送。

4.1 3D 打印壳聚糖水凝胶在组织工程中的应用

组织工程旨在通过植入细胞和生长因子的支架来支持和促进受损或病变组织的再生。壳聚糖(Chitosan,CS)的结构类似于糖胺聚糖(ECM 的重要组成部分),这使得 3D 打印 CS 水凝胶成为组织工程中理想的支架材料,如皮肤、骨和神经等,可以提供复杂几何形状的结构以及适当的物理化学和力学性能,以增强细胞的粘附、增殖和分化,最终实现新组织的再生。

4.1.1 皮肤伤口愈合

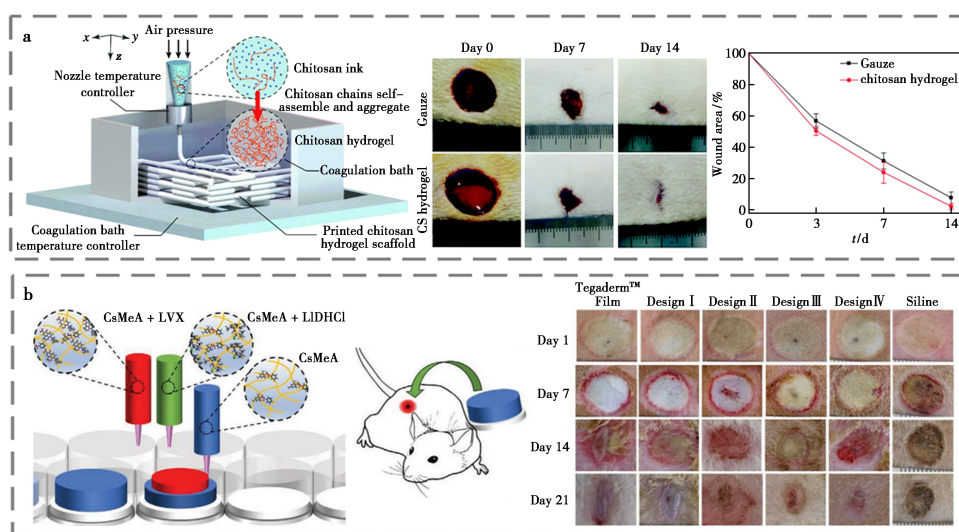
在一些意外事故和自然灾害中,皮肤会受到不同程度的损伤,伤口不能及时的处理往往会发生感染造成不必要的伤亡^[47]。皮肤缺损处具有形状不规则特征,生物 3D 打印技术可以制备含有成纤维细胞或角化细胞的不规则形状壳聚糖水凝胶,这种水凝胶可以促进皮肤组织的再生。

3D 打印壳聚糖水凝胶不仅可以为皮肤缺损处提供支撑和微环境,起到保护伤口、防止感染和刺激的作用,还可以提供适当的机械支撑和透气性,促进受损组织的再生和修复。Zhou 等^[48]设计了一种不需要有机溶剂的壳聚糖墨水,该墨水

具有温度响应特性,通过浸没式高温凝固方法进行打印,如图 6a 所示。该墨水制备的壳聚糖水凝胶具有优异的力学性能,并支持人脐静脉内皮细胞(HUVECs)在打印的壳聚糖水凝胶支架中生长和增殖。在小鼠皮肤缺损处验证负载 HUVECs 的壳聚糖水凝胶支架,表明该水凝胶可以促进皮肤再生,并在 14 d 伤口面积接近于 0。Teoh 等^[49]基于光交联设计了一种甲基丙烯酸酯壳聚糖墨水,该墨水制备的水凝胶可以负载药物并促进 NIH/3T3 细胞的生长与增殖,如图 6b 所示,负载特定药物的水凝胶组在小鼠伤口缺损第 21 d 伤口闭合率最高,伤口闭合率在 90% 以上。Alizadehgiashi 等^[50]基于纤维素纳米晶体和甲基丙烯酸酯壳聚糖设计了一种用于挤出式 3D 打印技术的墨水。该墨水可以与特定药物相组合,通过小鼠伤口缺损模型验证了由该墨水制备的壳聚糖水凝胶可以促进皮肤缺损处肉芽组合和血管形成,进而促进皮肤组织的修复与再生。Shahriar 等^[47]在疏水电纺层上打印羧甲基壳聚糖和接枝儿茶酚的氧化海藻酸盐水凝胶支架。该复合材料的功能层通过物理化学交联制造,可以模仿皮肤的真皮层,背层是含镓的静电纺丝层以模仿皮肤的表皮,为皮肤缺损处提供保护作用。通过小鼠的体内感染伤口模型验证该材料可以抗菌并且促进血管的形成和角质形成细胞的增殖与迁移,进而促进伤口的愈合。

4.1.2 骨组织工程

骨组织损伤是骨组织的结构完整性被破坏,主要由突发性事故、感染、肿瘤手术以及各种先天性疾病导致^[51]。由于骨组织损伤的程度和面积形状不同,这给骨组织修复带来了巨大挑战。3D 打印技术可以制备具有复杂结构不规则形状的多



a. 利用浸没式高温凝固方法进行打印^[48]; b. 光交联打印技术制备可负载药物的个性化支架^[49]

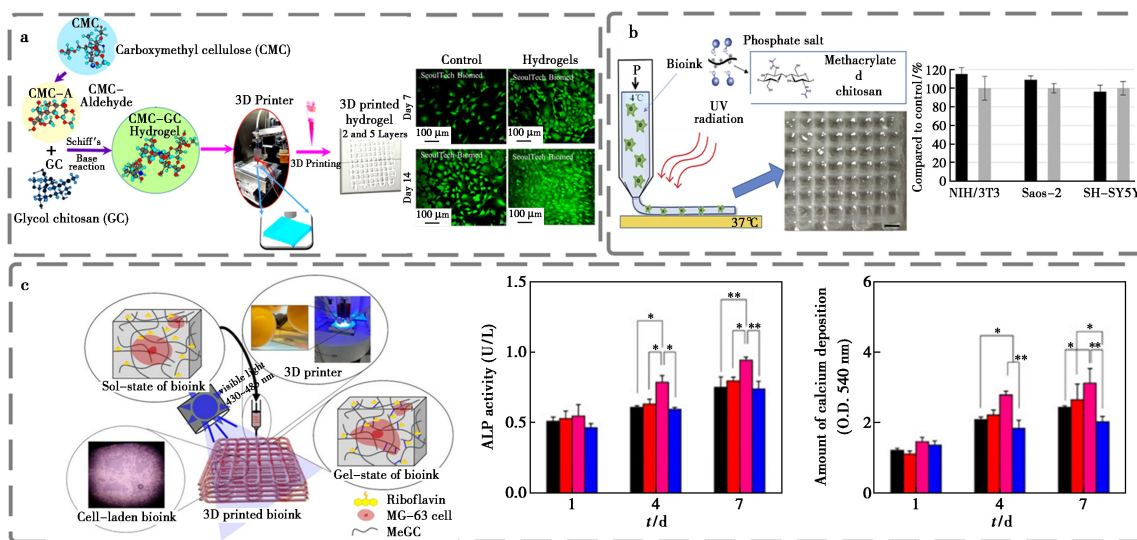
图 6 3D 打印壳聚糖水凝胶在皮肤组织工程中的应用

Fig.6 Application of 3D printed chitosan hydrogel in tissue engineering

孔水凝胶支架,并负载成骨细胞或骨髓间充质干细胞的水凝胶支架填充至骨缺损处,从而促进骨缺损处的修复。Gopinathan 等^[52]利用希夫碱反应和离子相互作用将乙二醇壳聚糖和羧甲基纤维素混合得到一种可用于骨组织工程的生物墨水,通过挤出式打印技术制备具有多孔的支架,如图 7a 所示。乙二醇壳聚糖-羧甲基纤维素水凝胶的三维网络具有较高稳定性。负载乳铁蛋白的复合水凝胶在 PBS 溶液中缓释长达 21 d,并显示出更

高的生物相容性(>80%)。Tonda 等^[53]开发了一种可光响应和热响应的双交联生物墨水,如图 7b 所示,不仅可以实现高分辨率结构的制备它还可以与细胞混合,在温度升高和紫外线照射下形成水凝胶。该水凝胶对成纤维细胞、成骨细胞和神经元细胞无细胞毒性作用。

Chang 等^[54]设计了一种光固化乙二醇壳聚糖(MeGC)生物墨水,如图 7c 所示。MeGC-70 由 3% 预聚体溶液光固化 70 s 形成,MG-63 细胞在



a. 混合墨水制备用于骨组织缺损的多孔支架^[52]; b. 可光响应和热响应的双交联生物墨水制备个性化支架^[53];

c. 可光响应生物墨水制备可促进骨组织再生的个性化支架^[54], * < 0.5, ** < 0.01

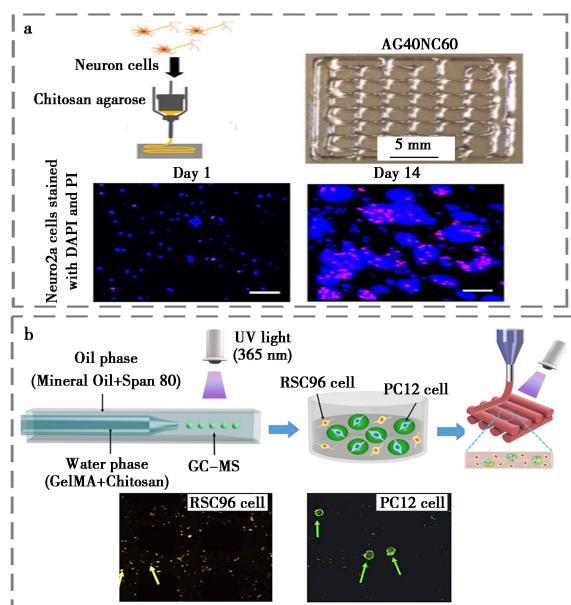
图 7 用于骨组织工程的 3D 打印壳聚糖支架

Fig.7 3D printed chitosan scaffolds for bone tissue engineering

MeGC 水凝胶支架中的 ALP 活性升高。其中, MeGC-70 中的细胞 ALP 活性最高。在整个培养过程中, MeGC 水凝胶支架中的钙沉积量也逐渐增加。MeGC-70 产生了显著的钙沉积。3D 打印壳聚糖水凝胶在骨组织应用中具有很多潜在优势, 但其仍处于研究和开发阶段, 需要进一步的临床验证和安全性评估。

4.1.3 神经组织工程

由于缺乏细胞外基质的支撑, 移植干细胞在脊髓等中枢神经损伤部位很难专一地神经元分化。3D 打印技术可以构建具有脊髓等中枢神经损伤部位仿生结构的水凝胶作为神经干细胞的载体, 从而提高移植神经干细胞在中枢神经损伤处的治疗效果。Butler 等^[55]将不同成分的 N, O-羧甲基壳聚糖和琼脂糖混合制备成用于挤出式 3D 打印的生物墨水, 如图 8a 所示, 40% 琼脂糖和 60% N, O-羧甲基壳聚糖的墨水在生物相容性和印刷性方面是最合适的生物墨水, 可促进神经细胞增殖。Huang 等^[56]利用微流控技术将壳聚糖微球和甲基丙烯酸酯化明胶为载体制备神经组织复合支架, 如图 8b 所示。该支架可以模仿神经网络, 呈现三维分层结构, 不仅可以为细胞提供三维微环境, 还可以为雪旺细胞增殖和神经细胞组织再生提供微环境。



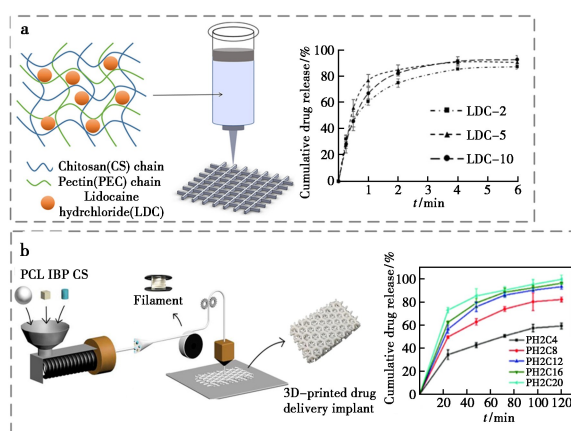
a. N, O-羧甲基壳聚糖和琼脂糖混合墨水制备个性化支架^[55];
b. 壳聚糖微球和甲基丙烯酸酯化明胶制备神经组织复合支架^[56]

图 8 3D 打印壳聚糖水凝胶在神经组织工程中的应用

Fig.8 Application of 3D printed chitosan hydrogel in neural tissue engineering

4.2 3D 打印壳聚糖水凝胶在药物递送系统中的应用

传统的药物递送系统主要是通过静脉注射和口服药物控制药物释放的方式与剂量, 在稳定性和降解方面存在不足。3D 打印技术可以根据要求制备具有复杂结构和特定尺寸的孔隙壳聚糖水凝胶^[36], 可以通过设计孔径尺寸, 实现灵活和精准的药物释放, 可以缓解疼痛并逐渐降解为体内可吸收的物质。例如, Long 等^[57]基于壳聚糖和果胶的物理交联设计出一种用于挤出式打印的墨水用于负载盐酸利多卡因药物, 如图 9a 所示。体外药物释放实验表明负载各种剂量药物的水凝胶均在 1 h 内迅速释放, 并在后面的 4 h 持续释放, 盐酸利多卡因药物组负载 100 mg/mL 的释放率最终达到了 94%。Yang 等^[58]基于聚乙内酯和水溶性壳聚糖设计出一种可用于熔融沉积成型技术的载药系统, 如图 9b 所示。以布洛芬作为模型药物, 可通过控制壳聚糖的含量影响药物的释放剂量。随着壳聚糖含量从 4% 的增加到 20%, 药物释放从 55% 增加到 100% 并可持续释放 120%。



a. 壳聚糖和果胶的混合墨水制备载药支架^[57];

b. 聚乙内酯和水溶性壳聚糖制备载药支架^[58]

图 9 3D 打印壳聚糖水凝胶在药物递送中的应用

Fig.9 Application of 3D printed chitosan hydrogels in drug delivery

以上壳聚糖进行药物递送主要依靠壳聚糖的降解, 这种方法并不能很好的控制药物释放的开始, 剂量与速度, Bozuyuk 等^[59]基于壳聚糖设计了一种具有光触发药物释放能力的磁性驱动的双螺旋微型游泳器。该游泳器由甲基丙烯酸酯化壳聚糖和超顺磁性氧化铁纳米颗粒使用双光子 3D 打印技术制备。叠氮化物修饰的阿霉素是一种化疗药物, 被用作光触发药物释放的模型治疗药物。作

为可光裂解的连接分子,同时具有 N-羧基琥珀酰亚胺酯(NHS)和炔烃的邻硝基苄基衍生物。NHS 末端与微型游泳器中壳聚糖的游离氨基相连,而炔烃末端附着在药物上。以阿霉素药物为模型,该游泳器在波长 365 nm 的紫外光的照射下,5 min 内释放 60% 的阿霉素。

5 总结与展望

本文总结了关于 3D 打印壳聚糖墨水的设计、交联策略和 3D 打印技术,其中喷墨式 3D 打印、挤出式 3D 打印、立体光固化成型以及投影式光固化成型在制备个性化支架方面展现出了巨大潜力。3D 打印壳聚糖水凝胶在打印后可保持其结构完整性,以创建仿生微环境,并提供活性氨基和羟基,以支持细胞粘附和生长,此外可通过水凝胶固有的转运特性携带药物并控制其释放。因此,3D 打印壳聚糖水凝胶已被广泛应用于皮肤伤口愈合、骨组织工程、神经组织工程和药物递送等生物医学领域。

随着 3D 打印技术的发展,可以根据需求设计出具有不同结构的水凝胶,从而满足不同应用环境的需求,但仍存在许多不足,挤出式和喷墨式的 3D 打印技术在精度和打印速度还需要进一步的优化,未来可通过引入点击化学反应提高交联速度。其次,基于光交联的打印技术制备的多层结构可能会导致细胞活力降低,长波长光源引发光交联避免紫外光的细胞毒性,以及引入生物活性序列可促进细胞生长,实现药物和生长因子的控制释放。此外,为满足不同打印技术和其他生物医学领域对材料的要求,迫切需要开发一种新型的多功能 3D 打印壳聚糖体系,例如 4D 打印壳聚糖水凝胶可使水凝胶对外部刺激敏感,3D 打印导电壳聚糖水凝胶应用于神经系统,以及通过加入促进壳聚糖降解的溶菌酶等提高水凝胶的降解速度等。

参考文献:

- [1] ZHANG Q, BEI H P, ZHAO M, et al. Shedding light on 3D printing: Printing photo-crosslinkable constructs for tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2022, **286**: 121-156.
- [2] EIVAZZADEH K R, NORUZI E B, MEHRBAN S F, et al. Review: The latest advances in biomedical applications of chitosan hydrogel as a powerful natural structure with eye-catching biological properties[J]. *J. Mat. Sci.*, 2022, **57**(6): 3 855-3 891.
- [3] WU Q H, MAIRE M, LEROUGE S, et al. 3D printing of microstructured and stretchable chitosan hydrogel for guided cell growth[J]. *Adv. Biosyst.*, 2017, **1**(6): 1 700-1 708.
- [4] 吴燕, 寇先勇, 王峭姿, 等. 天花粉粗多糖壳聚糖复合水凝胶促进小鼠皮肤伤口愈合[J]. *化学试剂*, 2023, **45**(12): 26-32.
- [5] 黄欣瑜, 何李浩, 姜佳妙, 等. 星点设计-效应面法优化羧甲基壳聚糖包覆纳米粒处方工艺[J]. *化学试剂*, 2022, **44**(2): 239-244.
- [6] ANITHA A, SOWMYA S, SUDHEESH-KUMAR P T, et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications[J]. *Prog. Polym. Sci.*, 2014, **39**(9): 1 644-1 667.
- [7] LIU R R, SHI Q Q, MENG Y F, et al. Biomimetic chitin hydrogel via chemical transformation[J]. *Nano. Res.*, 2023, **17**: 771-777.
- [8] 丁梓译, 金浩天, 马晓帆, 等. 纳米纤维素基水凝胶的制备及其在传感器中的应用进展[J]. *化学试剂*, 2023, **45**(6): 61-68.
- [9] ALIZADEH-OSGOUEI M, LI Y, WEN C, et al. A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications[J]. *Bioact. Mater.*, 2019, **4**: 22-36.
- [10] RAMEZANI H, MOHAMMAD M S, HE Y. Simulations of extrusion 3D printing of chitosan hydrogels[J]. *Appl. Sci.*, 2022, **12**(15): 7 530.
- [11] SHEN Y, TANG H, HUANG X, et al. DLP printing photocurable chitosan to build bio-constructs for tissue engineering[J]. *Carbohydr. Polym.*, 2020, **235**: 115-170.
- [12] RAJABI M, MCCONNELL M, CABRAL J, et al. Chitosan hydrogels in 3D printing for biomedical applications[J]. *Carbohydr. Polym.*, 2021, **260**: 117-168.
- [13] LIN H Y, HUANG H Y, SHIUE S J, et al. Osteogenic effects of inductive coupling magnetism from magnetic 3D printed hydrogel scaffold[J]. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2020, **504**(15): 166-180.
- [14] MAIZ F S, PEREZ A L, SILVAN U, et al. pH-Induced 3D printable chitosan hydrogels for soft actuation[J]. *Polymers-basel.*, 2022, **14**(3): 650.
- [15] MENG W, SUN H, MU T, et al. Chitosan-based pickering emulsion: A comprehensive review on their stabilizers, bioavailability, applications and regulations[J]. *Carbohydr. Polym.*, 2023, **304**: 120-149.
- [16] POUREGHBAL Y, RAHIMI M, AKBARI M. Ionic gelation of chitosan with sodium tripolyphosphate using a novel combined nebulizer and falling film system[J]. *Can. J. Chem. Eng.*, 2021, **100**(7): 1 547-1 557.
- [17] TAMO A K, TRAN T A, DOENCH I, et al. 3D printing of cellulase-Laden cellulose nanofiber/chitosan hydrogel

- composites: Towards tissue engineering functional biomaterials with enzyme-mediated biodegradation [J]. *Materials*, 2022, **15**(17): 6 039.
- [18] ZOLFAGHARIAN A, KAYNAK A, KHOO S Y, et al. Polyelectrolyte soft actuators: 3D printed chitosan and cast gelatin [J]. *3D Print. Add. Manuf.*, 2018, **5**(2): 138-150.
- [19] JANARTHANAN G, TRAN H N, CHA E, et al. 3D printable and injectable lactoferrin-loaded carboxymethyl cellulose-glycol chitosan hydrogels for tissue engineering applications [J]. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.*, 2020, **113**: 111 008.
- [20] CHE Q T, CHAROENSRI K, SEO J W, et al. Triple-conjugated photo-temperature-pH-sensitive chitosan with an intelligent response for bioengineering applications [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2022, **298**(15): 120 066.
- [21] SUO H, ZHANG J, XU M, et al. Low-temperature 3D printing of collagen and chitosan composite for tissue engineering [J]. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.*, 2021, **123**: 111 963.
- [22] MU M, LI X, TONG A, et al. Multi-functional chitosan-based smart hydrogels mediated biomedical application [J]. *Expert. Opin. Drug. Del.*, 2019, **16**(3): 239-250.
- [23] WISDOM K M, INDANA D, CHOU P E, et al. Covalent cross-linking of basement membrane-like matrices physically restricts invasive protrusions in breast cancer cells [J]. *Matrix. Biol.*, 2020, **85/86**: 94-111.
- [24] LIM K S, GALARRAGA J H, CUI X, et al. Fundamentals and applications of photo-cross-linking in bioprinting [J]. *Chem. Rev.*, 2020, **120**(19): 10 662-10 694.
- [25] MAINARDI J C, REZWAN K, MAAS M. Genipin-crosslinked chitosan/alginate/alumina nanocomposite gels for 3D bioprinting [J]. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 2022, **45**(1): 171-185.
- [26] MOHANDESNEZHAD S, MONFARED M H, SAMANI S, et al. 3D-printed bioactive chitosan/alginate/hardystonite scaffold for bone tissue engineering: Synthesis and characterization [J]. *J. Non.-Crys. Solids*, 2023, **609**(1): 122 261.
- [27] HAFEZI F, SCOUTARIS N, DOUROUMIS D, et al. 3D printed chitosan dressing crosslinked with genipin for potential healing of chronic wounds [J]. *Int. J. Pharmaceut.*, 2019, **560**(5): 406-415.
- [28] FISCHETTI T, CELIKKIN N, CONTESSI N N, et al. Triphosphate-crosslinked chitosan/gelatin biocomposite ink for 3D printing of uniaxial scaffolds [J]. *Front. Bioeng. Biotech.*, 2020, **8**: 400.
- [29] VORON'KO N G, DERKACH S R, KUCHINA Y A, et al. The chitosan-gelatin (bio) polyelectrolyte complexes formation in an acidic medium [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2016, **138**: 265-272.
- [30] ZHANG M, WAN T, FAN P, et al. Photopolymerizable chitosan hydrogels with improved strength and 3D printability [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, **193**(PA): 109-116.
- [31] DERAKHSHANFAR S, MBELECK R, XU K, 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.
- [32] SAYGILI E, DOGAN G A A, YESIL C O, et al. 3D bioprinting: A powerful tool to leverage tissue engineering and microbial systems [J]. *Bioprinting*, 2020, **18**: e00 071.
- [33] MATURAVONGSADIT P, NARAYANAN L K, CHANSORIA P, et al. Cell-laden nanocellulose/chitosan-based bioinks for 3D bioprinting and enhanced osteogenic cell differentiation [J]. *ACS Appl. Bio. Mater.*, 2021, **4**(3): 2 342-2 353.
- [34] ZANON M, CHIAPPONE A, GARINO N, et al. Microwave-assisted methacrylation of chitosan for 3D printable hydrogels in tissue engineering [J]. *Mater. Adv.*, 2022, **3**(1): 514-525.
- [35] ABDOLLAHIYAN P, BARADARAN B, GUARDIA M D L, et al. Cutting-edge progress and challenges in stimuli responsive hydrogel microenvironment for success in tissue engineering today [J]. *J. Control. Release*, 2020, **328**: 514-531.
- [36] AGARWAL T, CHIESA I, COSTANTINI M, et al. Chitosan and its derivatives in 3D/4D (bio) printing for tissue engineering and drug delivery applications [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2023, **246**: 125 669.
- [37] LIU Y, WONG W, CHANG S W, et al. An injectable, self-healing phenol-functionalized chitosan hydrogel with fast gelling property and visible light-crosslinking capability for 3D printing [J]. *Acta. Biomater.*, 2021, **122**: 211-219.
- [38] HAO F, MAIMAITIYIMING X. Fast 3D printing with chitosan/polyvinyl alcohol/graphene oxide multifunctional hydrogel ink that has ultrastretch property [J]. *ChemistrySelect.*, 2022, **7**(10): e202 200 201.
- [39] QUAN H, ZHANG T, XU H, et al. Photo-curing 3D printing technique and its challenges [J]. *Bioact. Mater.*, 2020, **5**(1): 110-115.
- [40] YU C, SCHIMELMAN J, WANG P, et al. Photopolymerizable biomaterials and light-based 3D printing strategies for biomedical applications [J]. *Chem. Rev.*, 2020,

- 120(19)** : 10 695-10 743.
- [41] ZHANG X N, ZHANG Q, WU Z L. Recent advances in 3D printing of tough hydrogels: A review [J]. *Compos. Part. B-Eng.*, 2022, **238**: 109 895.
- [42] XING J F, ZHENG M L, DUAN X M. Two-photon polymerization microfabrication of hydrogels: An advanced 3D printing technology for tissue engineering and drug delivery [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44(15)** : 5 031-5 039.
- [43] LEE B J, HSIAO K, LIPKOWITZ G, et al. Characterization of a 30 microm pixel size CLIP-based 3D printer and its enhancement through dynamic printing optimization [J]. *Addit. Manuf.*, 2022, **55**: 102 800.
- [44] BITTNER S M, GUO J L, MELCHIORRI A, et al. Three-dimensional printing of multilayered tissue engineering scaffolds [J]. *Mater. Today*, 2018, **21(8)** : 861-874.
- [45] HUANG B, HU R, XUE Z, et al. Continuous liquid interface production of alginate/polyacrylamide hydrogels with supramolecular shape memory properties [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2020, **231**: 115 736.
- [46] KUNWAR P, XIONG Z, ZHU Y, et al. Hybrid laser printing of 3D, multiscale, multimaterial hydrogel structures [J]. *Adv. Opt. Mater.*, 2019, **7(21)** : 1 900 656.
- [47] SHAHRIAR K M, SATTAR M, CAO R, et al. Angiogenesis, hemocompatibility and bactericidal effect of bioactive natural polymer-based bilayer adhesive skin substitute for infected burned wound healing [J]. *Bioact. Mater.*, 2023, **29**: 177-195.
- [48] ZHOU L, RAMEZANI H, SUN M, et al. 3D printing of high-strength chitosan hydrogel scaffolds without any organic solvents [J]. *Biomater. Sci.*, 2020, **8(18)** : 5 020-5 028.
- [49] TEOH J H, MOZHI A, SUNIL V, et al. 3D printing personalized, photocrosslinkable hydrogel wound dressings for the treatment of thermal burns [J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2021, **31(48)** : 2 105 932.
- [50] ALIZADEHGIASHI M, NEMR C R, CHEKINI M, et al. Multifunctional 3D-printed wound dressings [J]. *ACS Nano*, 2021, **15(7)** : 12 375-12 387.
- [51] LAVANYA K, CHANDRAN S V, BALAGANGADHARAN K, et al. Temperature- and pH-responsive chitosan-based injectable hydrogels for bone tissue engineering [J]. *Mater. Sci. Eng. C*, 2020, **111**: 110 862.
- [52] GOPINATHAN J, HAO T N, CHA E, et al. 3D printable and injectable lactoferrin-loaded carboxymethyl cellulose-glycol chitosan hydrogels for tissue engineering applications [J]. *Mater. Sci. Eng. C*, 2020, **113**: 111 008.
- [53] TONDA T C, CARMAGNOLA I, CHIAPPONE A, et al. Photocurable chitosan as bioink for cellularized therapies towards personalized scaffold architecture [J]. *Bio-printing*, 2020, **18**: e00 082.
- [54] CHANG H K, YANG D H, HA M Y, et al. 3D printing of cell-laden visible light curable glycol chitosan bioink for bone tissue engineering [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2022, **287**: 119 328.
- [55] BUTLER H M, NASERI E, MACDONALD D S, et al. Investigation of rheology, printability, and biocompatibility of N,O-carboxymethyl chitosan and agarose bioinks for 3D bioprinting of neuron cells [J]. *Materialia*, 2021, **18**: 101 169.
- [56] CHEN J, HUANG D, WANG L, et al. 3D bioprinted multiscale composite scaffolds based on gelatin methacryloyl (GelMA)/chitosan microspheres as a modular bioink for enhancing 3D neurite outgrowth and elongation [J]. *J. Colloid Interface Sci.*, 2020, **574**: 162-173.
- [57] LONG J, ETXEBERRIA A E, NAND A V, et al. A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery [J]. *Mater. Sci. Eng. C*, 2019, **104**: 109 873.
- [58] YANG Y, WU H, FU Q, et al. 3D-printed polycaprolactone-chitosan based drug delivery implants for personalized administration [J]. *Mater. Design*, 2022, **214**: 110 394.
- [59] BOZUYUK U, YASA O, YASA I C, et al. Light-triggered drug release from 3D-printed magnetic chitosan microswimmers [J]. *ACS Nano*, 2018, **12(9)** : 9 617-9 625.