http://pmse.scu.edu.cn

聚己内酯掺杂竹荪多糖的3D打印工艺及性能

卢 山[1]，何 莹[2]，马泽宇[1]，刘建波[1]，秦立果[1]，董光能[1]，张雅利[2]
（1. 西安交通大学 机械工程学院；2. 西安交通大学 生命科学与技术学院，陕西 西安 710049）

摘要：3D打印技术在组织工程领域的应用日益受到重视，但聚己内酯（PCL）由于其亲水性和韧性的问题在此领域的应用受到了限制。为此，文中用竹荪提取的多糖物质对PCL进行复合改性，制备了多糖/PCL 3D打印支架，旨在改善其力学性能并提高其生物学性能以促进组织工程应用。通过拉伸试验表明，添加多糖后的PCL韧性明显提升且弹性模量更接近于骨组织。接触角试验表明，添加多糖后提高了表面的润湿性，接触角从92°降低至76°。经过体外细胞培养验证，添加多糖后生物相容性有所提高。研究表明，添加1%多糖后的改性支架表现出最优异的亲水性、韧性和生物相容性，且显著增强了成骨细胞的附着。

关键词：聚己内酯；竹荪多糖；3D打印；组织工程支架
中图分类号：TP391.73 **文献标识码：**A **文章编号：**1000-7555（2024）08-0078-07

由于软骨组织缺乏血管、淋巴和神经末梢，导致成骨细胞在软骨中的迁移、增殖和分化变得困难。因此，当软骨组织受损时，自身的组织再生修复能力受到限制[1]。软骨损伤通常是由剧烈运动或长期过度活动等慢性劳损所致，导致软骨严重磨损和病变。组织工程是近年来新兴的人体组织再生手段，其方法包括将各种分离的自体骨细胞（如成骨细胞、软骨细胞或骨髓基质干细胞等）经体外培养扩增后植入特定支架，然后将支架植入骨缺损部位。在生物材料、细胞和因子治疗的协同作用下，种植的骨细胞不断增殖，促进新的功能性骨再生，从而实现修复骨组织缺损的目的[2]。在美国，每年有数十万人需要接受软骨手术治疗，但仅有2%的患者接受异体支架移植[3]，这主要是受到支架材料的生物相容性和力学性质等方面的限制。

3D打印是一种增材制造技术，其制备过程是通过逐层累加的方式进行[4,5]。在组织工程领域，孔隙尺寸对于细胞的黏附和增殖至关重要，通常在100～600 μm范围内。由于3D打印可以根据不同损伤区域的要求自由调节孔隙尺寸，因此是一种非常适合组织工程制备的工具。常用于组织工程3D打印的高分子材料有聚乳酸[6]、胶原蛋白[7]、聚己内酯（PCL）[8]等。其中，PCL是一种被美国食品与药品监督管理局认证的生物相容性聚合物材料[9]，具有优秀的制备性能，较低的熔点以及可控的降解速率。然而，PCL的亲水性和韧性较差，通常需添加羟基磷灰石[10,11]、镁离子[12,13]、锌离子[14]等以获取所需的亲水性和力学性能，从而促进细胞增殖分化，提高抗菌能力等功能。

虽然添加离子的方法可以改善PCL的性能，但需要对浓度进行精确控制，以确保其对材料性能的影响在可控范围内，过高或者过低的添加量都可能导致材料性能不稳定或不可预测。相比之下，添加生物体内提取的物质进行改性具有更好的生物相容性和精确调节性，并有助于提高材料的亲水性、韧性和生物活性，从而增强其在软骨组织再生工程中的

doi: 10.16865/j.cnki.1000-7555.2024.0155
收稿日期：2023-09-22
基金项目：国家自然科学基金面上项目（52375298，51975458）；陕西省重点研发计划（2022SF-069 ）
通讯联系人：秦立果，主要从事高端装备可靠性、表面防护及润滑增效设计研究，E-mail: liguoqin@xjtu.edu.cn；
张雅利，主要从事食品营养学、糖生物学、天然产物功能研究，E-mail: yar.lee@mail.xjtu.edu.cn

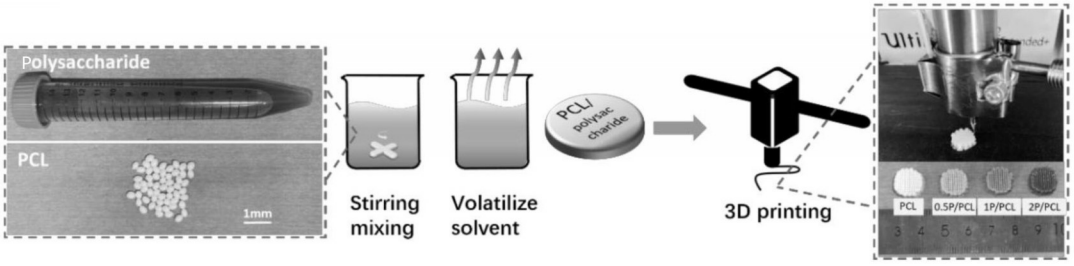


Fig. 1 Material preparation and 3D printing stent flow chart

应用潜力。本文利用之前从竹荪中提取的多糖对PCL进行改性[15]，旨在提高PCL的亲水性、韧性和生物相容性。研究了改性前后材料的润湿性能、力学性能的变化。对改性后材料的3D打印参数进行了探索，研究了打印温度、打印压力对打印过程的影响。通过体外细胞培养，对其生物相容性进行了探究，并对结果进行了展望。

1　实验部分

1.1　试剂与仪器

PCL颗粒：相对分子质量8×10^4，麦克林；乙酸乙酯：国药化学试剂有限公司；多糖粉末：由西安交通大学生命学院提供；MC3T3-E1：中国科学院上海细胞库；α-DMEM培养液、0.25％胰蛋白酶：Hyclone；MTT：SIGMA；胎牛血清、青链霉素：Gibco。

挤出式3D打印机：Ultimaker 2 Extended+，根据材料性质进行加热熔融喷头改装；钨灯丝扫描电镜：EVO10，德国蔡司。

1.2　材料制备

制备3种不同糖浓度的PCL基支架(质量分数0.5%，1%和2%)及纯PCL支架（对照组）。首先将10 g PCL颗粒溶于100 mL乙酸乙酯中，室温搅拌2 h，至颗粒全部溶解，溶液呈澄清透明。加入(质量分数0.5%，1%和2%)的糖颗粒，搅拌15 min以确保均匀混合。最后，置于通风橱中24 h待乙酸乙酯溶剂挥发，形成适用于挤出式3D打印的支架材料。

1.3　打印参数测量

PCL是一种挤出后膨胀材料，对以上不同浓度糖含量的PCL进行打印参数测量。针头直径600 μm，探索在挤出气压(15 psi, 30 psi, 45 psi, 60 psi, 75 psi和90 psi)和打印温度(80 ℃，90 ℃，100 ℃及110 ℃)双变量下的打印速度，绘制不同材料在不同挤出气压、打印温度时打印速度的云图；同时对打印出的24条线材直径进行膨胀率(α)测量，去除2个最大值、2个最小值，取平均值。

$$\alpha=\frac{D_{\text{print}}-D_{\text{nozzle}}}{D_{\text{nozzle}}} \tag{1}$$

将材料置于3D打印机中，选择不同打印温度和挤出气压，控制打印速度为1 mm/min，打印尺寸为φ13×4.3支架用于体外细胞培养[13]。

1.4　支架特性分析

为了评价所打印的支架质量，对不同多糖含量的PCL支架的表面形貌进行SEM观察。首先对支架进行喷金处理，喷金功率为20 mA，120 s。喷好后置于扫描电镜室，电子加速电压为15 kV。

利用ZQ990型拉伸试验机对多糖掺杂后PCL的力学性能变化进行测试。测试温度(23±2) ℃，加载速率5 mm/min，通过所连接的电脑记录应力-应变曲线，每组取3个样品进行测试。力学性能的测试按照国标GB/T 1040.2-2006进行，样条尺寸为标准5A型样条，具体尺寸为总长度150 mm、有效长度20 mm、宽度4 mm、厚度2 mm。

使用Nicolet iS50傅里叶变换红外光谱仪对分子的结构和化学键的变化进行定性分析，扫描范围600 ~4000 cm^{-1}，扫描32次，分辨率为4 cm^{-1}.

利用JC2000D2A接触角测量仪对材料的润湿性进行测定。通过接触角测量仪中在表面滴2 μL的去离子水，拍摄并测量液滴与表面所形成的角度。

1.5　体外细胞试验

1.5.1　小鼠前成骨细胞系（MC3T3-E1）培养：使用含10％胎牛血清的α-MEM培养基(含100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素)培养MC3T3-E1细胞，倒置显微镜观测细胞的生长状况，当细胞融合度约为90%且生长状况良好时以0.25％的胰酶消化传代。

于37 ℃，5%CO_2的培养箱中培养，平均每2～3 d传代1次，取对数生长期细胞用于实验。

1.5.2 MC3T3-E1细胞增殖的测定（MTT法）：分别将纯PCL支架以及不同糖浓度的PCL支架(质量分数0.5%，1%和2%)浸泡在75% 乙醇中2 h，无菌PBS清洗后置于24孔板中，纯PCL为对照组，每组3次重复。将对数期生长的MC3T3-E1细胞以5×10^4个/孔接种于24孔板中，分别在48 h和72 h后加入MTT，酶标仪测定波长450 nm处的吸光光度值检测细胞增殖情况。

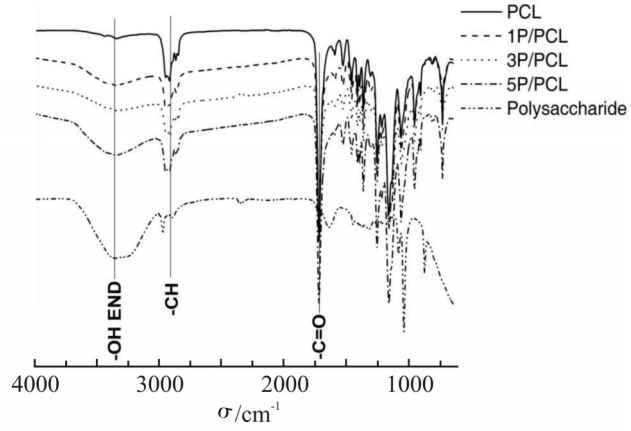


Fig. 2 Infrared spectra of different materials

2 结果与讨论

2.1 红外光谱分析

Fig.2为纯PCL、多糖溶液以及添加不同含量多糖后的PCL红外光谱图。在纯PCL中，734 cm^{-1}处为亚甲基—CH_2的弯曲振动特征吸收峰，1163 cm^{-1}为PCL中环内酯部分的伸缩振动特征吸收峰，1724 cm^{-1}为酯羰基—C=O伸缩振动特征吸收峰。竹荪多糖在3356 cm^{-1}附近的宽峰代表糖上特有的—OH特征吸收峰。在添加多糖后的PCL中，随多糖含量的增加，—OH的峰强度逐渐增强。

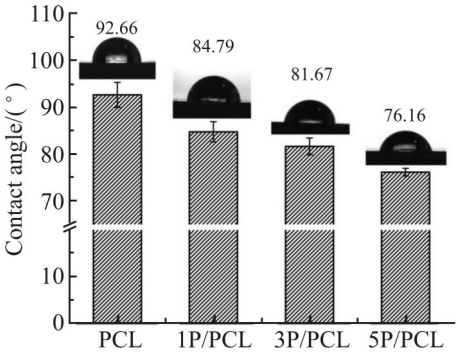


Fig. 3 Contact angle of polysaccharides added PCL

2.2 接触角分析

Fig.3为纯PCL以及添加不同含量多糖后的接触角。未添加多糖的PCL显示92.66°的接触角，为疏水材料（>90°）。添加了多糖后，随多糖浓度的提高接触角逐渐降低，转变为亲水状态。在2%浓度多糖时，接触角降为70.25°。这是由于多糖具有非常多的亲水基团—OH，增加了材料与水之间的亲和力，致使接触角降低。增加材料的亲水性有助于细胞在材料上增殖铺展，提高材料的生物相容性。

2.3 力学性能分析

Fig.4为多糖添加的PCL力学性能测试。从Fig.4(a)中可以看到，不同含量间的PCL力学性能差别很大。通过计算，将各材料的弹性模量、屈服强度和屈服计算列在了Fig.4(b)和Fig.4(c)中。在添加多糖后，材料的弹性模量逐渐降低。其中纯PCL为111.13 MPa，远高于关节软骨的弹性模量（15~59 MPa）。添加1%多糖后弹性模量为61.88 MPa，添加2%后弹性模量为44.83 MPa，二者与真实软骨组织弹性模量相当，可以有效减小模量不匹配所导致的

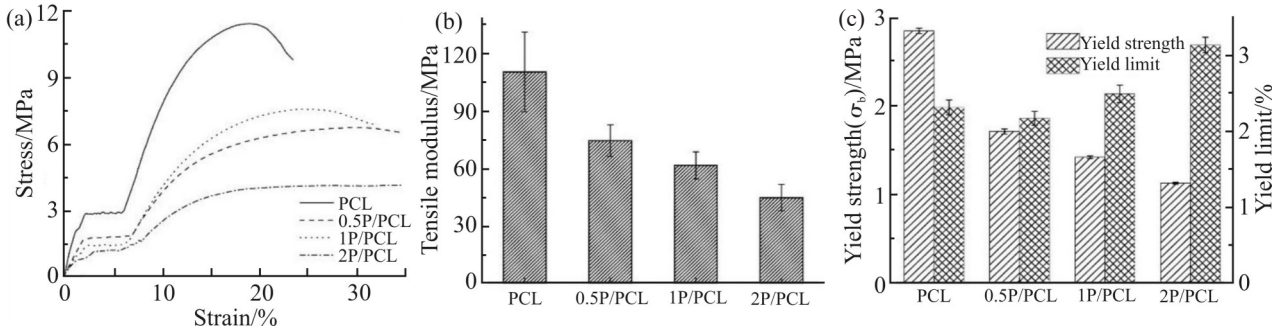


Fig. 4 Mechanical properties of PCL supplemented with polysaccharides

(a): stress-strain curve; (b): tensile modulus of different materials; (c): yield strength and yield limit of different materials

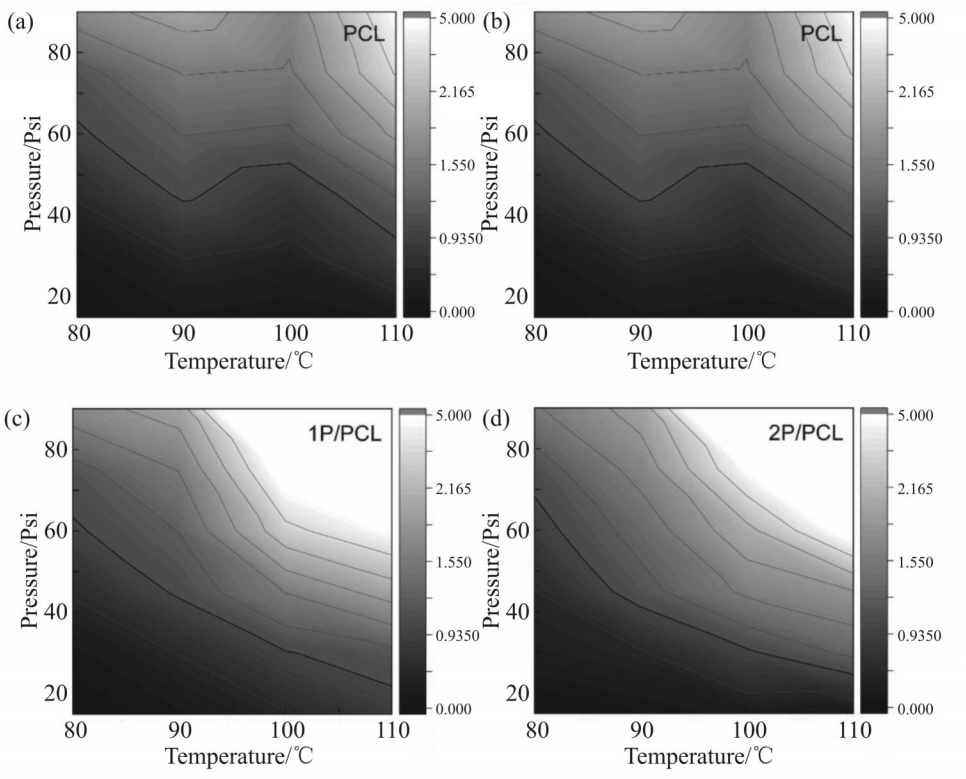


Fig. 5 Cloud map of print speed
(a): PCL; (b): 0.5P/PCL; (c): 1P/PCL; (d) 2P/PCL

应力屏蔽现象。同时二者的屈服极限相较于纯PCL有明显的提高，材料的韧性得到提高。

2.4　打印速度评价

打印速度是3D打印过程中重要的参数，在本文所采用的气动挤出式打印过程中，气动压力和温度是影响挤出速度的主要因素。本文绘制了打印速度随气动压力和温度的云图（Fig.5），白色区域表示较低的打印速度，而黑色区域表示较高的打印速度。由图可见，随着温度的升高，印刷速度也随之提高。随着挤压压力的增加，可以看到相同的结果。但是，较高的温度可能破坏多糖的结构，较低的气压可能不稳定，于是选择印刷速度为1 mm/s(图中加粗等高线)，此时温度不太高，气压较高且稳定。

2.5　挤出膨胀评价

Fig.6为打印后的膨胀率。纯PCL的膨胀率约为12%~15%。添加0.5%和1%的多糖时，膨胀率明显降低，约为9%~12%，可形成较好的成型精度。当多糖添加量为2%时，其膨胀率高于纯PCL。挤出膨胀是聚合物中的一种常见现象，这是因为熔融的聚合物在喷嘴中被流动定向，而PCL分子在离开喷嘴后降温会重新折叠。添加0.5%和1%的多糖可能会占据再折叠空间，从而抑制物质再折叠，但由于添加过多的多糖侵占了PCL的空间，因此PCL选择新的空间进行再折叠，导致膨胀率较高[16,17]。

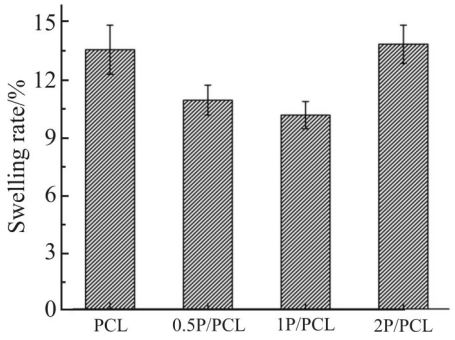


Fig. 6 Expansion rate after extrusion

2.6　支架形貌

Fig.7显示了多糖/PCL支架的宏观、微观和表面形态。宏观形貌(Fig.7(a1~d1))显示，多糖/PCL支架纤维直径为600 μm，孔径为400 μm，支架孔隙率约为40%。平均孔径在100~ 600 μm之间，孔隙率接近50%，适合细胞增殖、组织再生和骨愈合。此外，由于PCL和2P/PCL的膨胀率较大，可以看到打印后的支架有一些扭曲情况发生。从表面形貌观(Fig.7(a3~d3))看，1P/PCL表面出现了很多微孔，导致表面

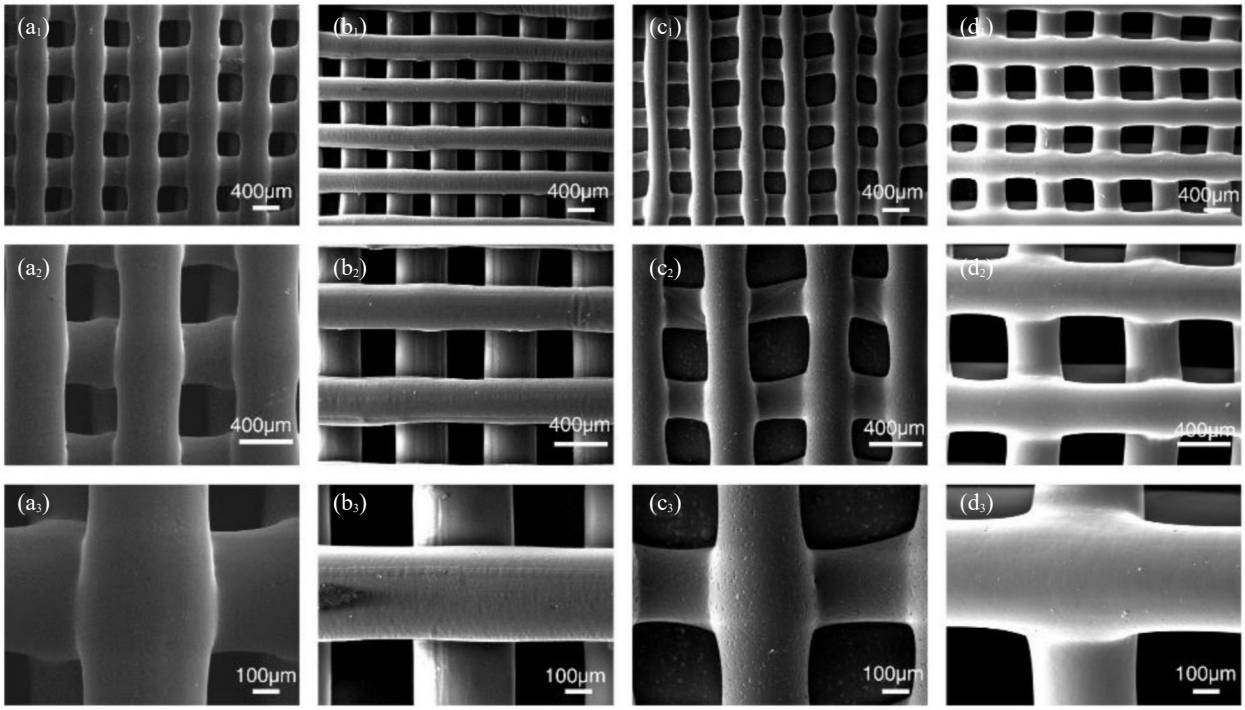


Fig. 7 SEM morphologies of different scales of scaffolds
(a): PCL; (b): 0.5P/PCL; (c): 1P/PCL; (d): 2P/PCL

粗糙度增加，这种尺度的凹坑更有利于细胞的增殖。

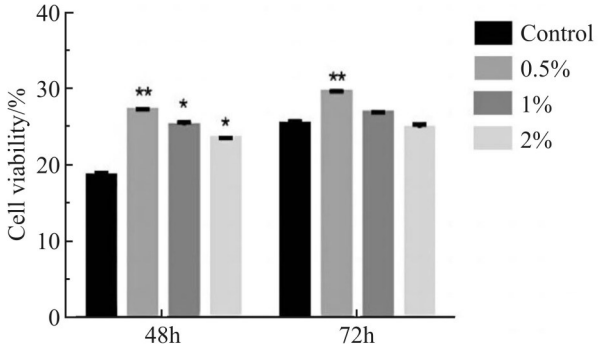


Fig. 8 Biocompatibility evaluation of PCL after polysaccharide addition

2.7 生物相容性评价

为研究不同糖浓度处理后PCL支架对细胞增殖的影响，将MC3T3-E1细胞种植在不同支架表面,并在48 h,72 h利用MTT法分析细胞在支架表面的生长情况。如Fig. 8所示,随着培养时间的延长，各组材料上细胞数量均逐渐增加，在48 h，0.5%，1%和2%细胞增殖率均明显提高；72 h内仅0.5%增殖效果明显，但其他浓度也显示细胞增殖上升趋势。本实验初步证明经多糖处理后的PCL支架利于MC3T3-E1增殖，具有良好的细胞相容性。

3 结论

本研究利用竹荪提取的多糖物质与PCL进行复合改性，制备了多糖/PCL 3D打印支架，以改善其力学性能并提高生物学性能，从而促进组织工程应用。在1%添加量下，PCL的弹性模量与真实软骨组织相近，有利于细胞在材料表面增殖。对不同多糖含量添加的PCL进行了3D打印参数测定，得出了该类材料打印速度与温度、挤出气压之间的关系。通过测量挤出后的膨胀率来确保打印精度，并通过扫描电子显微镜进行观察。对所打印支架进行了生物相容性测试，将MC3T3-E1细胞接种在支架上并利用MTT法进行分析，结果显示，添加多糖后的PCL生物相容性明显增强，其中0.5%多糖添加浓度表现出最佳的生物相容性。这项研究为PCL在组织工程中的进一步应用提供了重要参考，同时也拓宽了生物多糖在组织工程上的应用。本研究为改善生物材料的力学性能、生物相容性以及细胞附着提供了有益的思路和方法。

参考文献：

[1] Spiller K L, Maher S A, Lowman A M. Hydrogels for the repair of

articular cartilage defects[J]. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2011, 17: 281-299.

[2] Wang C, Huang W, Zhou Y, *et al*. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds[J]. Bioactive Materials, 2020, 5: 82-91.

[3] McCormick F, Harris J D, Abrams G D, *et al.* Trends in the surgical treatment of articular cartilage lesions in the united states: an analysis of a large private-payer database over a period of 8 years[J]. Arthroscopy: the Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2014, 30: 222-226.

[4] 向声燚, 焦志伟, 苗剑飞, 等. 聚己内酯3D打印成型工艺研究及力学性能分析[J]. 中国塑料, 2018, 32(4): 74-78.
Xiang S Y, Jiao Z W, Miao J F, *et al*. Research of 3D printing molding process of PCL and its mechanical analysis[J]. Chinese Plastics, 2018, 32(4): 74-78.

[5] 孙江涛, 张净凯, 毛贻椗, 等. 吸热墨水喷射3D打印高分子材料的研究现状与发展趋势[J]. 高分子材料科学与工程, 2023, 39(3): 181-190.
Sun J T, Zhang J K, Mao Y W, *et al*. Progress on heat-absorbing ink jetting 3D printing of polymers[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2023, 39(3): 181-190.

[6] Albanés-Ojeda E A, Calderón-Olvera R M, García-Hipólito M, *et al.* Physical and chemical characterization of PLA nanofibres and PLA/ZrO_2 mesoporous composites synthesized by air-jet spinning [J]. Indian Journal of Fibre & Textile Research, 2020, 45: 20121 .

[7] Wang C C, Wang C H, Chen H C, *et al.* Combination of resveratrol- containing collagen with adipose stem cells for craniofacial tissue- engineering applications[J]. International Wound Journal, 2018, 15: 660-672.

[8] Jiang N, Chen H, Zhang J, *et al.* Decellularized- disc based allograft and xenograft prosthesis for the long- term precise reconstruction of temporomandibular joint disc[J]. Acta Biomaterialia, 2023, 159: 173-187.

[9] 王浩宇, 李文倩, 张奇男, 等. 聚己内酯增强生物基聚酯弹性体[J]. 高分子材料科学与工程, 2021, 37(10): 62-69.
Wang H Y, Li W Q, Zhang Q N, *et al.* Polycaprolactone strengthening bio- based polyester elastomer[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2021, 37(10): 62-69.

[10] Lee H J, Kim S E, Choi H W, *et al*. The effect of surface-modified nano- hydroxyapatite on biocompatibility of poly(ε-caprolactone)/hydroxyapatite nanocomposites[J]. European Polymer Journal, 2007, 43: 1602-1608.

[11] Chong L H, Hassan M I, Sultana N. Electrospun polycaprolactone (PCL) and PCL/ nano- hydroxyapatite (PCL/ nHA)- based nanofibers for bone tissue engineering application [C]. Kota Kinabalu, Malaysia: 2015 10th Asian Control Conference (ASCC), 2015.

[12] Makkar P, Kang H J, Padalhin A R, *et al*. Development and properties of duplex MgF_2/PCL coatings on biodegradable magnesium alloy for biomedical applications[J]. Plos One, 2018, 13: e0193927.

[13] Dong Q, Zhang M, Zhou X, *et al*. 3D-printed Mg-incorporated PCL-based scaffolds: A promising approach for bone healing[J]. Materials Science and Engineering: C, 2021, 129: 112372.

[14] Wang S, Gu R, Wang F, *et al*. 3D-Printed PCL/Zn scaffolds for bone regeneration with a dose-dependent effect on osteogenesis and osteoclastogenesis[J]. Materials Today Bio, 2022, 13: 100202.

[15] Yang H, Qin L, Zhao W, *et al.* Eco- friendly polysaccharide coatings for antifouling and drag- reduction and potential application for marine devices[J]. Friction, 2023.

[16] 张晗, 马万珍, 刘守纪. ABS挤出过程中流变性能的测试[J]. 工程塑料应用, 2005, 33(12): 41-43.
Zhang H, Ma W Z, Liu S J. Test for rheological behavior of ABS in extrusion molding[J]. Engineering Plastics Application, 2005, 33(12): 41-43.

[17] 丁治豪, 杨伟涛, 高宇晨, 等. 喷头流道结构参数对高黏度含能材料直写成型3D打印挤出过程稳定性影响[J]. 含能材料, 2024, 32(4): 377-386.
Ding Z H, Yang W T, Gao Y C, *et al*. Influence of nozzle structure parameters on the stability of DIW 3D printing extrusion process[J]. Chinese Journal of Energetic Materials, 2024, 32(4): 377-386.

3D Printing Technology of Dictyophora Polysaccharide Doped Polycaprolactone and Properties

Shan Lu[1], Ying He[2], Zeyu Ma[1], Jianbo Liu[1], Liguo Qin[1], Guangneng Dong[1], Yali Zhang[2]

(*1. School of Mechanical Engineering, Xi'an Jiaotong University; 2. School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China*)

ABSTRACT: The application of 3D printing technology in tissue engineering has become increasingly important. However, the use of polycaprolactone (PCL) in this field is limited due to its hydrophilicity and toughness constraints. Therefore, in this study, polysaccharides extracted from bamboo fungus were combined with PCL to prepare polysaccharide/PCL 3D printed scaffolds, aiming to improve their mechanical properties and enhance their biological performance for tissue engineering applications. The tensile test show that the toughness of PCL is significantly improved after the addition of polysaccharides, and the elastic modulus approaches that of bone tissue. The contact angle test indicates that the surface wettability is increased after polysaccharide addition, with the contact angle decreasing from 92° to 76° . In vitro cell culture validation demonstrates improved biocompatibility after polysaccharide addition. The experiments show that the modified scaffold with 1% polysaccharides exhibits optimal hydrophilicity, toughness, and biocompatibility, and can significantly enhanced the attachment of osteoblasts. This study provided an important foundation and guidance for further application of PCL in tissue engineering.

Keywords: polycaprolactone; dictyophora polysaccharide; 3D printing; tissue engineering scaffold