

# 气动阀控式微米按需液滴喷射过程对细胞活性的影响

王志海<sup>1</sup>, 王梦<sup>2</sup>, 王璨<sup>2</sup>, 王飞<sup>1</sup>, 聂志雄<sup>1</sup>, 陈曦<sup>3</sup>, 桂晋刚<sup>3</sup>

(1. 北京工业大学信息学部, 北京 100124; 2. 北京工业大学激光工程研究院, 北京 100124;  
3. 首都医科大学附属北京儿童医院北京儿科研究所, 北京 100035)

**摘要:** 为了提高气动阀控式微液滴产生装置打印过程中的细胞活性, 利用自建气动阀控式微米按需液滴(drop-on-demand, DOD)产生装置, 在10~70 Hz微液滴产生频率下对2种人体活细胞做喷射实验。2种细胞分别是人外周血单个核细胞(hPBMCs, 直径10~15 μm)和人支气管上皮细胞(hBECs, 直径50~70 μm)。该喷射装置的喷嘴直径为100 μm, 微液滴直径180~200 μm。实验中, 将未经喷射细胞悬液记为对照组, 每种频率下向加有磷酸盐缓冲液的样品管中喷射大约6 000滴细胞液。随后以7-AAD试剂进行荧光抗体染色, 并用流式细胞仪进行细胞活性检测。结果显示, hPBMCs和hBECs喷射后的细胞相对成活率分别为 $0.991 \pm 0.009$ 和 $0.996 \pm 0.014$ 。经分析, 喷射频率对细胞活性无显著影响。气动阀控式打印后的细胞活性较高, 归因于打印的细胞悬液黏度较低, 细胞喷射过程中产生的剪切应力较小。气动阀控微液滴产生技术有望应用在生物细胞打印领域, 并为实现体外构建组织器官提供参考。

**关键词:** 气动按需液滴喷射; 细胞活性; 喷射频率; 人外周血单个核细胞; 人支气管上皮细胞

中图分类号: R 319

文献标志码: A

文章编号: 0254-0037(2019)07-0631-07

doi: 10.11936/bjtxb2017110050

## Impacts of Pneumatic Microdrop-on-demand Jetting Process on Cell Viability

WANG Zhihai<sup>1</sup>, WANG Meng<sup>2</sup>, WANG Can<sup>2</sup>, WANG Fei<sup>1</sup>, NIE Zhixiong<sup>1</sup>, CHEN Xi<sup>3</sup>, GUI Jingang<sup>3</sup>

(1. Faculty of Information Technology, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;

2. Institute of Laser Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;

3. Beijing Pediatric Research Institute, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100035, China)

**Abstract:** To study the impact of printing process on the cell viability, two types of human living cells, human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs, 10–15 μm in diameter) and human bronchial epithelial cells (hBECs, 50–70 μm in diameter), were printed at several jetting frequencies from 10 Hz to 70 Hz. The printing device was a home-made pneumatic drop-on-demand generator with a diameter nozzle, and producing micro-droplet with size of 180–200 μm. Non-ejected cell suspension was taken as control group, while in experimental groups about 6000 drops of cell suspension were delivered to sample tube containing phosphate buffered saline (PBS) for each jetting frequency. Then 7-AAD dye and cytometry method were utilized to evaluate the cell viability. The relative viabilities of hPBMCs and hBECs are  $0.991 \pm 0.009$  and  $0.996 \pm 0.014$ , respectively. The experimental analysis shows that the jetting

收稿日期: 2017-11-29

基金项目: 北京市教育委员会资助项目(PXM2017\_014204\_500034); 国家自然科学基金资助项目(61376049); 北京市自然科学基金资助项目(4172009)

作者简介: 王志海(1975—), 男, 教授, 主要从事微流控、3D打印、成像和光谱方面的研究, E-mail: wangzhihai@bjut.edu.cn

frequency has no significant effect on cell viability, and the pneumatic printing device can reach high cell viability that may result from the low viscosity of printing cell-load suspension and low shear stress during the cell printing process. The pneumatic printing can be successfully applied in the fields of bioprinting.

**Key words:** pneumatic droplet-on-demand; cell viability; jetting frequency; human peripheral blood mononuclear cell; human bronchial epithelial cell

微滴产生 (micro-droplet generation) 作为一种生成轨迹可控、大小均匀的微米尺寸单液滴的方法,已被广泛应用于细胞打印<sup>[1-2]</sup>、单细胞水平下粒子封装分析和分选<sup>[3]</sup>等多个生物医学领域中。近年来,细胞打印技术作为体外构建仿生组织器官最具潜力的方法之一,是国内外学者们研究的热点。细胞打印过程中要求种子细胞、生物支架材料、细胞活性因子按照一定的空间结构进行排列,打印后细胞需保持生物活性并正常发挥生物功能<sup>[4]</sup>。基于微滴喷射的细胞喷墨打印技术具有出众的空间定位能力和按需精确施加极小“生物墨滴”的能力,可实现喷射后较高细胞活性<sup>[5-6]</sup>,完全符合生物细胞 3D 打印的要求。细胞喷墨打印的具体过程是通过液体内部换能器或外部激励对腔内“生物墨水”产生较大的脉冲驱动,将“墨水”挤出微米大小的喷嘴形成“墨滴”,并通过计算机控制喷头和移动平台在成型槽中形成 2D 细胞图案,层层叠加最终形成 3D 组织器官结构<sup>[7-8]</sup>。

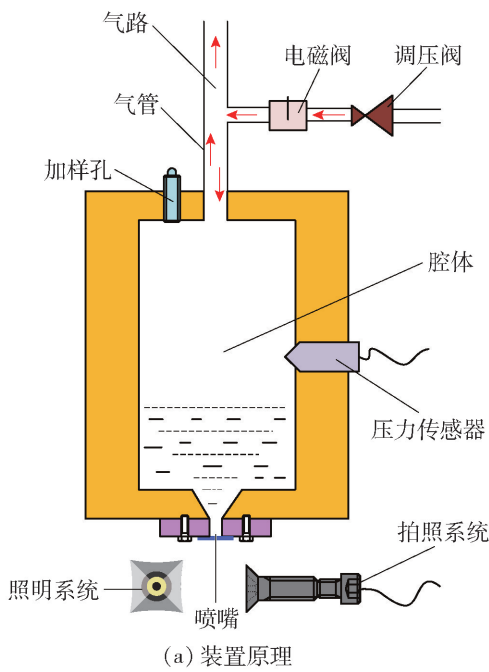
常见的喷墨打印系统,如热泡喷墨、压电喷墨打印系统<sup>[9]</sup>,已成功应用在活细胞及生物相容性材料的微滴喷射成型中<sup>[9-10]</sup>,但实际应用过程中仍存在一些问題。例如,Wilson 等<sup>[10]</sup>和 Boland 等<sup>[11]</sup>借用改装的惠普公司热喷墨打印机虽成功喷射牛主动脉内皮细胞与平滑肌细胞系,并且发现打印后细胞成活率大于 90%,但工作时打印喷头产生的局部高温及较大剪切应力对细胞造成一定损伤<sup>[12]</sup>。Nishiyama 等<sup>[13]</sup>利用静电式商用打印头实现了血管内皮细胞和水凝胶包裹细胞的打印,但是细胞成活率仅达到 70%。此外,改装商用打印头还存在喷口易堵塞、无菌化处理困难等不足<sup>[12]</sup>。也有研究人员采用专门的单喷头按需液滴产生装置实现了细胞打印。最常见的喷头是基于压电驱动的<sup>[5]</sup>,可以实现极高的喷射频率(高达 30 kHz),但容易产生卫星滴<sup>[14]</sup>,影响打印分辨率。另一种常见的单喷头是基于螺线圈驱动的微阀 (microvalve),也可以实现较高的喷射频率(可以高达几百至 1 000 Hz),但是微阀

喷头产生的微液滴尺寸较大,限制了打印分辨率<sup>[15]</sup>。细胞成活率可以达到 90%<sup>[16]</sup>,但是作为运动部件的微阀在储液腔内部,并在喷口附近反复高速挤压载有细胞的“生物墨水”。

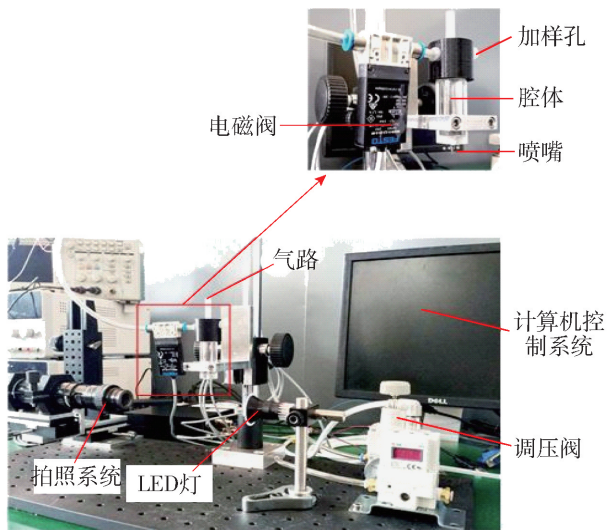
与微阀式微液滴产生装置类似,气动阀控式微液滴产生的驱动力同样为高压气源。所不同的是,气动阀控式的喷口始终开启,喷口的疏水性保证“墨水”不会渗漏。将高速阀门移到储液腔外,通过阀门的快速开启和关闭对腔体内液体施加气压脉冲,迫使液体从喷孔喷出形成液滴。气动阀控产生的微液滴小于微阀式,可实现更高的打印分辨率。气动阀控式系统工作稳定,操作简单,可喷射液体的黏度范围比较广<sup>[17]</sup>。为研究气动喷墨打印过程对细胞活性的影响,本课题组前期设计并搭建了一套气动阀控式微液滴产生装置。在喷射频率为 15 Hz 时,通过 100  $\mu\text{m}$  直径喷口产生直径约 180  $\mu\text{m}$  的微液滴。喷射直径 10 ~ 15  $\mu\text{m}$  的人外周血单个核细胞 (hPBMCs) 的成活率达到 99% 以上<sup>[18]</sup>。实现高成活率的原因包括与细胞直径相比喷口直径较小、喷射频率低等。尽管该装置实现了极高的细胞打印成活率,但气动阀控式微液滴产生频率过低将限制其进一步的应用。为使喷射与常规电动平移台匹配,液滴喷射频率应达到 50 ~ 100 Hz。在前面工作中,作者通过优化腔体结构和电磁阀电压控制时序,已将自建气动阀控式微液滴产生装置的最大液滴产生频率从 25 Hz 大幅提升至 80 Hz。在此基础上,在更大液滴产生频率范围内 (10 ~ 70 Hz) 研究了对 hPBMCs (直径 10 ~ 15  $\mu\text{m}$ ) 与 hBECs (直径为 50 ~ 70  $\mu\text{m}$ , 远大于 hPBMCs, 并与 100  $\mu\text{m}$  喷口直径接近) 2 种细胞的打印成活率。实验进一步证实了气动阀控式技术在远高于之前文献中液滴产生频率的条件下,实现了 2 种不同尺寸细胞打印的高活性。

## 1 装置结构及原理介绍

本文实验使用的气动阀控式微液滴产生装置的设计及搭建在文献[18]中进行了详细描述。图 1 为实验装置原理图及实物图。该装置的主要部件包括



(a) 装置原理



(b) 装置实物

图1 实验装置

Fig. 1 Experiment apparatus

储液腔体, 喷嘴直径为 100  $\mu\text{m}$ 、以高速电磁阀和放气管为核心的气路以及用来监测液滴喷射状态、记

录液滴下落轨迹的液滴拍照系统. 液滴产生装置的工作原理是, 高速电磁阀快速开启, 随后关闭, 高压气体沿气路冲入储液腔产生正压强脉冲, 促使液体从喷孔喷出形成液带. 随后腔内高压气体迅速从放气管排出并在腔内形成短暂的负压强, 该负压有助于液带断裂形成液滴, 并促使未断裂液带重新返回储液腔. 图 2 是在喷射频率为 15 Hz 时所测的一个周期内单液滴形成的全过程. 被喷射液体为去离子水. 从图中可以清楚看到, 液体从喷孔挤出形成“凸月形”, 之后形成一条长液带, 该液带断裂为前端和后端两部分, 最终形成单液滴. 这与文献[19]中液滴的形成过程一致. 液滴下落速度根据下降距离随时间的变化关系确定<sup>[18]</sup>. 实验观察到液滴尺寸大约为 200  $\mu\text{m}$ , 这与 Cheng 等<sup>[20]</sup>的研究结果以及理论分析基本一致.

## 2 实验

作为前述工作<sup>[18]</sup>的延续, 首先在一系列更高频率下喷射人外周血单个核细胞 hPBMCs, 并采用流式细胞术检测细胞活性. 取人抗凝外周血一份, 以密度梯度离心法分离 hPBMCs, 用 15 mL 培养基重悬细胞, 取 1 mL 加入样品管作为对照组, 细胞个数为  $1 \times 10^6$ , 再取 5 mL 加入腔内. 喷嘴内径为 100  $\mu\text{m}$ , 分别在频率 10、20、30、40、50、60、70 Hz 下向加有 0.5 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的①~⑦号样品管中喷射大约 6 000 滴, 随后各加入 1  $\mu\text{L}$  7-AAD (7-amino-actinomycinD) 进行荧光抗体染色, 静置 15 min 后用流式细胞仪 (BD FACSCalibur) 进行流式检测, 流式细胞实验计数结果如图 3 所示. hPBMCs 对照组的成活率为 99.1%, 采用 10~70 Hz 不同频率喷射后 hPBMCs 的成活率 (流式成活率) 分别为 99.3%、98.2%、98.2%、97.8%、98.7%、97.4% 和 98.0%. 经计算, hPBMCs 相对成活率 (相对成活率 = 流式成活率/对照组成活率) 分别为 1.000、0.991、0.991、

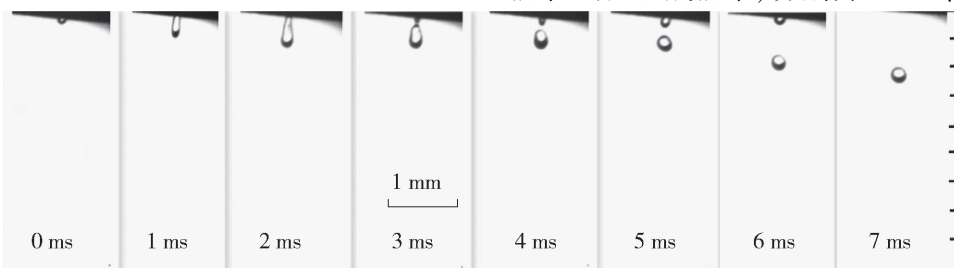


图2 液滴喷射过程

Fig. 2 Process of droplet generation



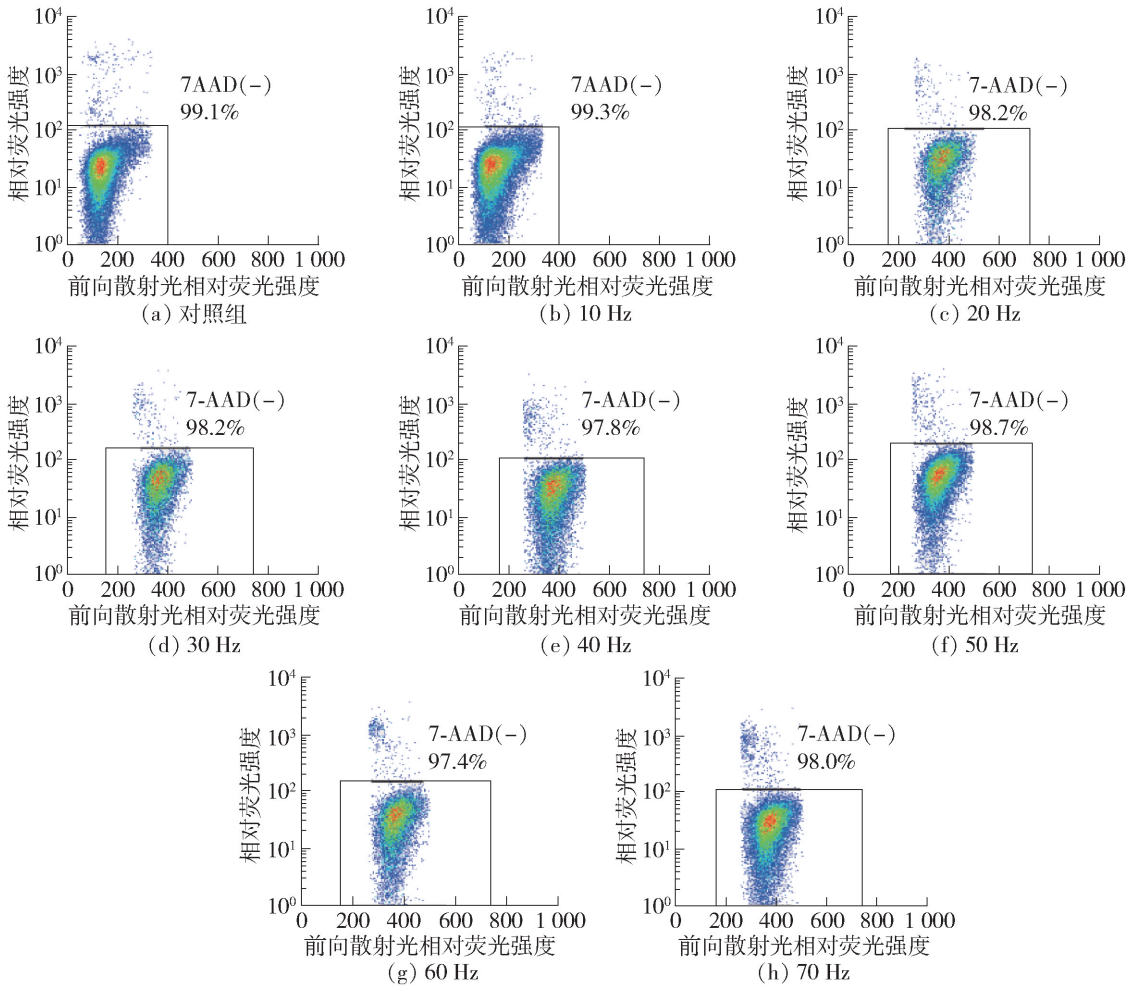


图3 hPBMCs经7-AAD染色后的相对荧光强度

Fig. 3 Relative fluorescence intensity of hPBMCs after 7-AAD staining

0.987、0.996、0.983和0.989,喷射后细胞相对成活率为 $0.991 \pm 0.009$ 。不难发现,喷射后hPBMCs的相对成活率接近100%,且与喷射频率无明显单调变化关系。

接下来,选择人支气管上皮细胞hBECs作为研究对象。hBECs直径为 $50 \sim 70 \mu\text{m}$ ,远大于hPBMCs且更加接近喷嘴直径( $100 \mu\text{m}$ )。通过重复上述实验,一方面进一步对上述喷射频率依赖性结论进行验证,另一方面研究细胞与喷嘴相对尺寸对细胞活性可能的潜在影响。取hBECs细胞一份,以10 mL DMEM完全培养基重悬细胞,细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取1 mL细胞悬液加入样品管作为对照组,另取5 mL加入腔内。实验喷嘴内径( $100 \mu\text{m}$ )不变,分别在频率10、30、50、70 Hz下向加有0.5 mL磷酸盐缓冲液(PBS)的对应样品管中喷射大约6000滴,随后各加入 $1 \mu\text{L}$  7-AAD试剂进行荧光抗体染色,静置15 min,用流式细胞仪检测细胞成活率。该实验重复

4次,依次记为实验A~实验D,测得流式细胞成活率如表1所示。计算得hBECs相对成活率如表2所示,喷射后细胞相对成活率为 $0.996 \pm 0.014$ 。对实验结果进行单因素试验方差分析,结果见表3。从表3可看出,所得 $F$ 统计量的观测值为0.312。在显著性水平 $\alpha = 0.05$ 下, $F_{\text{crit}} = 3.49$ ,由于 $F_{0.05}(3, 12) = 3.490 > 0.312$ ,所以喷射频率对hBECs细胞活性影响无统计学意义。

细胞打印过程中,细胞活性受静水压力、剪切应力共同影响。Parkkinen等<sup>[21]</sup>研究发现,液体静压低于5 MPa且持续2 h对细胞活性没有显著影响。有文献研究细胞打印过程对细胞活性的影响机制,认为液滴形成过程及液滴碰撞基底时在液滴内产生的应力对细胞活性有影响<sup>[22-23]</sup>。液滴形变时,内部剪切应力场分布并不均匀,同时由于无法确切细胞在液滴内的位置,所以本文讨论中仅仅做半定量地估计<sup>[24]</sup>;假设培养基为牛顿流体,其应力与形变速度

表1 不同喷射频率下 hBECs 的流式成活率

Table 1 hBECs flow cytometry viability under different frequencies

%

实验组	对照组	喷射频率/Hz			
		10	30	50	70
实验 A	98.8	98.8	97.2	98.3	97.2
实验 B	98.1	96.0	96.8	97.3	98.1
实验 C	98.3	98.0	98.4	98.3	98.7
实验 D	98.3	98.9	98.6	98.8	98.3

表2 不同喷射频率下 hBECs 的相对成活率

Table 2 hBECs relative viability under different frequencies

实验组	喷射频率/Hz			
	10	30	50	70
实验 A	1.000	0.984	0.995	0.984
实验 B	0.979	0.987	0.992	1.000
实验 C	0.997	1.000	1.000	1.000
实验 D	1.010	1.000	1.010	1.000
平均值	0.997	0.993	0.999	0.996

表3 不同喷射频率下 hBECs 的相对成活率方差分析

Table 3 Relative viability variance analysis of hBECs under different frequencies

方差来源	平方和	自由度	均方	F	F 比
因素	$8.52 \times 10^{-5}$	3	$2.84 \times 10^{-5}$	0.312	3.490
误差	$1.09 \times 10^{-3}$	12	$9.12 \times 10^{-5}$		
总和	$1.18 \times 10^{-3}$	15			

满足线性关系,以液滴碰撞基底的情况为例. 根据如图4所示的液滴撞击基底的高速摄像,可粗略估计剪切速度量级为 $(100 \mu\text{m}/1 \text{ms})/100 \mu\text{m} = 1000 \text{s}^{-1}$ . 假设培养基的黏性系数为 $1 \times 10^{-3} \text{Pa}\cdot\text{s}$ ,可知由液滴变形产生的剪切应力为1 Pa 的量级. 液滴从喷口挤出过程中同样会产生剪切应力. 为估计其量级,采用实际测量与模拟计算相结合的方法. 实验中由压强传感器测得单个液滴产生过程中储液腔内气体压强随时间周期振荡、幅值逐渐衰减,其中振荡

周期约3 ms,峰值约4 kPa,喷口直径 $100 \mu\text{m}$ . 通过COMSOL 软件的多物理场模拟<sup>[25]</sup>计算,与实验条件相当的液滴产生过程中喷口附近剪切速度平均值在 $1 \sim 2 \times 10^4 \text{s}^{-1}$ ,对应的剪切应力为10~20 Pa. 剪切应力作用时间约0.5 ms,远短于液滴碰撞基底时剪切应力的作用时间(3~5 ms). 缩小喷口直径、增加液体黏度时,产生液滴需要更大的外部气压驱动,会使液滴产生时的剪切应力增大.

剪切应力的强度和应力作用的持续时间会对细

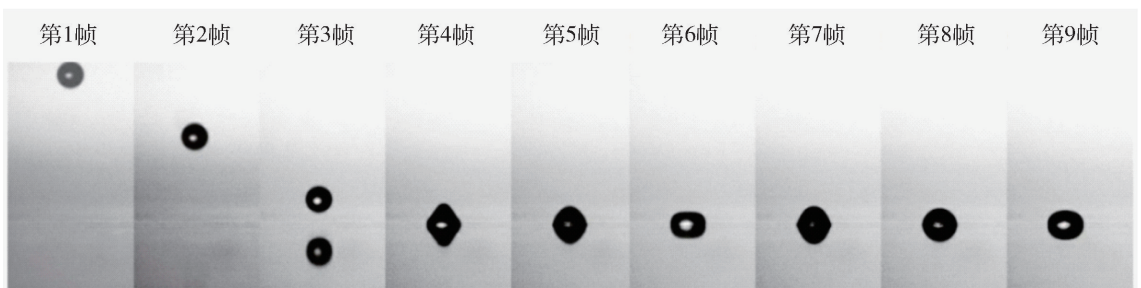


图4 高速相机(帧率:815 帧/s)记录的液滴与基底的相互作用过程

Fig. 4 Interaction process of a droplet hitting a substrate pictured by a high-speed camera (815 frames/s)

胞活性产生影响<sup>[26-30]</sup>. 在几种主流细胞打印技术中,基于微阀的细胞打印方式产生液滴的时间是 ms 量级,与本文采用的气动阀控技术类似. 因此,与之前基于微阀技术的细胞打印研究对照分析有助于理解本文结果. Blaeser 等<sup>[31]</sup>打印了海藻酸钠包裹人间充质干细胞,并分析液滴产生时剪切应力对细胞活性的影响. 当剪切应力约小于 5 kPa 时,细胞活性几乎不受影响;当剪切应力进一步加大,细胞活性逐渐下降. Li 等<sup>[32]</sup>用海藻酸钠分别包裹施旺细胞和 3T3 成纤维细胞,并用流变仪研究了剪切应力和应力持续时间对细胞活性的影响. 发现在剪切应力小于 400 Pa,应力持续时间少于 60 s 时,细胞受损几乎为零. 本文的气动阀控喷射细胞实验中产生的最大剪切应力在 10 ~ 20 Pa,应力持续时间在 ms 量级,推测细胞处于相对安全的剪切应力和应力持续时间范围内. 另外,本文喷射的细胞悬液以 DMEM 培养基为主,相比 Blaeser 等<sup>[31]</sup>和 Li 等<sup>[32]</sup>研究中使用海藻酸钠包裹细胞,液体黏度约低 2 个量级. 本实验中采用低黏度细胞悬液,所需气压驱动低,液滴产生时剪切应力很小,且液滴速度低,液滴撞击基底时的剪切应力也很小.

文献[33]也得出类似实验结果. 虽然未在正文中展示,笔者在实验中发现喷嘴直径分别为 300、200  $\mu\text{m}$  时喷射过程对 hBECs 细胞活性的影响同样可以忽略,并将这一结果归因于剪切应力远远低于损害细胞的阈值. 此外,喷射频率从 10 Hz 增加至 70 Hz 并未显著影响液滴产生的气压驱动. 可以推测液滴产生时剪切应力仍然远低于细胞损伤阈值,这与文中实验结果一致.

综上所述,本文中气动阀控实现高细胞成活率,以及喷嘴直径和喷射频率对细胞活性影响甚微的实验结果归因于喷射细胞悬液黏度较低,打印过程中产生的剪切应力远低于细胞损伤阈值. 与基于微阀液滴产生的细胞打印技术相比,气动阀控液滴产生因储液腔内无运动部件,可避免微阀反复开闭对喷嘴附近细胞的潜在影响,进一步的对照研究将有助于得到更确切的结果.

### 3 结论

1) 本文重点探讨了采用气动阀控式微滴产生装置喷射细胞过程中,液滴产生频率对 2 种直径差异明显的细胞(hPBMCs、hBECs)活性的影响. 经细胞荧光染色和流式细胞术检测,结果表明,喷射频率对细胞成活率的影响可忽略不计. 打印后细胞极高

的成活率归因于微液滴在喷嘴处和液滴撞击基板时的剪切应力较小.

2) 接下来的工作,将使用气动阀控微液滴喷射装置打印较高黏度细胞悬液,并研究打印过程对细胞活性的影响,进而更好地评估基于气动阀控式液滴产生技术用于生物细胞打印及进一步的 3D 组织器官制造的可行性.

### 参考文献:

- [1] BEYER C. Strategic implications of current trends in additive manufacturing [J]. *Journal of Manufacturing Science & Engineering*, 2014, 136(6): 064701.
- [2] GUILLOTIN B, GUILLEMOT F. Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication [J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(4): 183-190.
- [3] JO Y, SHEN F, HAHN Y, et al. Magnetophoretic sorting of single cell-containing microdroplets [J]. *Micromachines*, 2016, 7(4): 56.
- [4] 付明福, 杨影, 陈伟才, 等. 喷墨打印技术同步打印细胞和生物支架材料及在组织工程中的应用 [J]. *中国组织工程研究*, 2011, 15(42): 7892-7896.  
FU M F, YANG Y, CHEN W C, et al. Application of inkjet printing to simultaneous printing of biomaterials and cells and tissue engineering [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2011, 15(42): 7892-7896. (in Chinese)
- [5] XU T, JIN J, GREGORY C, et al. Inkjet printing of viable mammalian cells [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(1): 93-99.
- [6] XU C, CHAI W, HUANG Y, et al. Scaffold-free inkjet printing of three-dimensional zigzag cellular tubes [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2012, 109(12): 3152-3160.
- [7] MURPHY S V, ATALA A. 3D bioprinting of tissues and organs [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(8): 773-785.
- [8] 周丽宏, 陈自强, 黄国友, 等. 细胞打印技术及应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(12): 95-104.  
ZHOU L H, CHEN Z Q, HUANG G Y, et al. Cell bioprinting technology and application [J]. *China Biotechnology*, 2010, 30(12): 95-104. (in Chinese)
- [9] SAUNDERS R E, GOUGH J E, DERBY B. Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(2): 193-203.
- [10] WILSON W C, BOLAND T. Cell and organ printing 1: protein and cell printers [J]. *Anatomical Record Part A- Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary*

- Biology, 2003, 272A(2): 491-496.
- [11] 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.
- [12] CUI X, DEAN D, RUGGERI Z M, et al. Cell damage evaluation of thermal inkjet printed Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2010, 106(6): 963-969.
- [13] NISHIYAMA Y, NAKAMURA M, HENMI C, et al. Development of a three-dimensional bioprinter: construction of cell supporting structures using hydrogel and state-of-the-art inkjet technology [J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2009, 131(3): 035001.
- [14] MORRISON N F, HARLEN O G. Viscoelasticity in inkjet printing [J]. *Rheologica Acta*, 2010, 49(6): 619-632.
- [15] NG W L, LEE J M, YEONG W Y, et al. Microvalve-based bioprinting process, bio-inks and applications [J]. *Biomaterials Science*, 2017, 5(4): 632-647.
- [16] GUDAPATI H, DEY M, OZBOLAT I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: past, present and future [J]. *Biomaterials*, 2016, 102: 20-42.
- [17] CHOI I H, KIM Y K, LEE S, et al. A pneumatic drop-on-demand printing system with an extended printable liquid range [J]. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 2015, 24(4): 768-770.
- [18] 王志海, 聂志雄, 王梦, 等. 自建气动阀式微米按需液滴喷射系统及对细胞活性的影响 [J]. *北京工业大学学报*, 2017, 43(4): 496-501.  
WANG Z H, NIE Z X, WANG M, et al. Homemade pneumatic microdrop-on-demand system and impacts of jetting process on cell viability [J]. *Journal of Beijing University of Technology*, 2017, 43(4): 496-501. (in Chinese)
- [19] 卢凌锋. 气动阀控式喷头微滴喷射仿真分析与实验研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015.  
LU L F. Simulation analysis and experimental study on micro-droplet jetting system of pneumatic valve control jet head [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2015. (in Chinese)
- [20] CHENG S, CHANDRA S. A pneumatic droplet-on-demand generator [J]. *Experiments in Fluids*, 2003, 34(6): 755-762.
- [21] PARKKINEN J J, LAMMI M J, INKINEN R, et al. Influence of short-term hydrostatic pressure on organization of stress fibers in cultured chondrocytes [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 1995, 13(4): 495-502.
- [22] LEVERETT L B, HELLUMS J D, ALFREY C P, et al. Red blood cell damage by shear stress [J]. *Biophysical Journal*, 1972, 12(3): 257-273.
- [23] WANG W, HUANG Y, GRUJICIC M, et al. Study of impact-induced mechanical effects in cell direct writing using smooth particle hydrodynamic method [J]. *Journal of Manufacturing Science & Engineering*, 2008, 130(2): 020601.1-024503.5.
- [24] KUNDU P K, COHEN I M, DOWLING R. *Fluid mechanics* [M]. 6th ed. New York: Academic Press, 2015: 1-48.
- [25] COMSOL Group. Inkjet application [CP/OL]. [2018-03-27]. <https://cn.comsol.com/model/inkjet-et-1445>.
- [26] KOO Y, KIM G. New strategy for enhancing in situ cell viability of cell-printing process via piezoelectric transducer-assisted three-dimensional printing [J]. *Biofabrication*, 2016, 8(2): 025010.
- [27] CHANG R, NAM J, SUN W. Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing [J]. *Tissue Engineering Part A*, 2008, 14(1): 41-48.
- [28] LI M G, TIAN X Y, CHEN X B. A brief review of dispensing-based rapid prototyping techniques in tissue scaffold fabrication: role of modeling on scaffold properties prediction [J]. *Biofabrication*, 2009, 1(3): 032001.
- [29] ZHANG H, KAY A, FORSYTH N R, et al. Gene expression of single human mesenchymal stem cell in response to fluid shear [J]. *Journal of Tissue Engineering*, 2012, 3(1): 2041731412451988.
- [30] GRIGIONI M, DANIELE C, MORBIDUCCI U, et al. The power-law mathematical model for blood damage prediction: analytical developments and physical inconsistencies [J]. *Artificial Organs*, 2015, 28(5): 467-475.
- [31] BLAESER A, DUARTE C D F, PUSTER U, et al. Controlling shear stress in 3D bioprinting is a key factor to balance printing resolution and stem cell integrity [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2016, 5(3): 326-333.
- [32] LI M, TIAN X, ZHU N, et al. Modeling process-induced cell damage in the biodepositing process [J]. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2010, 16(3): 533-542.
- [33] NAIR K, GANDHI M, KHALIL S, et al. Characterization of cell viability during bioprinting processes [J]. *Biotechnology Journal*, 2009, 4(8): 1168-1177.