암 연구에서 생체 인쇄의 적용

중앙대학교병원 비뇨기과

조민지* · 지병훈* · 김명주 · 황영미 · 장인호

Application of Bioprinting to Cancer Research

Min Ji Cho*, Byung Hoon Chi*, Myeong Joo Kim, Young Mi Whang, In Ho Chang

Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, Seoul, Korea

Three-dimensional (3D) printing is an additive manufacturing process by which precursor materials are deposited layer by layer to form complex 3D geometries from computer-aided designs, and bioprinting offers the ability to create 3D architecture living cells. Bioprinting methods have been developed rapidly pattern living cells, biological macromolecules, and biomaterials, and an advantage of the 3D microenvironment over traditional 2-dimensional cell culture is the ability to obtain more accurate and reliable data from model about tumor formation, progression, and response to anticancer therapies. This review focuses on recent advances in the use of bioprinting technologies for cancer research, bioprinting physiologically relevant testing platforms for anticancer drug development, and computational modeling for improvement bioprinting technique. (Korean J Urol Oncol 2018;16:52-57)

Key Words: Cancer · Microenvironment · Bioprinting

서론

2-dimensional (2D) 암 모델은 암 연구에 널리 사용되며 암 생물학에 대한 기본 지식을 제공하여 왔으며, 2D 배양은 암 발병과 관련하여 많은 결과를 제공하였지만, 세포-세포

상호작용 및 세포-기질 상호작용에 대한 연구가 아직 부족하다는 한계를 보이고 있다. 암의 기원과 진행을 더 깊이 이해하기 위해서는 생체 내 종양 미세 환경을 밀접하게 모방하는 보다 복잡하고 생리적인 구현이 가능한 3-dimensional (3D) 암 모델이 필요하다. 이러한 도전에 비추어 보았을 때 바이오 프린팅은 고도로 제어 가능한 암 조직 모델을 형성할 수 있는 능력을 제공하며 암 연구를 크게 가속화할 수 있는 잠재력을 보여준다. 따라서 3D 모델을 이용한 암 연구는 암의 조기 진단 및 치료 전략을 개발하는데 결정적인 역할을 하는 세포의 공간적 분포가 조절되는 종양 미세 환경 및 생물학적 행동 측면에서 암 조직을 보다 정확하게 구현할 수 있는 방향으로 연구가 진행되고 있으며, 그 중 3D 바이오 프린팅은 전구체 물질을 층별로 증착하여 컴퓨터가 지원하는 설계를 기반으로 복잡한 3D 모델을 구성하는 방법으로 각광받고 있다.¹⁻³ 3D 프린팅의 주목할만한 장점은 복잡한 규모의 건축물을 산업용 스케일이나 데스크탑 스케일로 효율성과 맞춤형으로 인쇄할 수 있다는 것이며, 3D 바이오 프린팅은 생체 세포, 세포 외 기질

Received July 18, 2018, Revised August 3, 2018,
Accepted August 8, 2018

Corresponding Author: In Ho Chang

Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, 102 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul 06973, Korea

E-mail: caucih@cau.ac.kr

Tel: +82-2-6299-1785, Fax: +82-2-6294-1406

ORCID code: <https://orcid.org/0000-0003-0240-1310>

*These authors contributed equally to this study and should be considered co-first authors.

• This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology, Republic of Korea (2017R1D1A1B03031514), and the Korea Health Technology R&D Project (HI17C0710).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2018 © Copyright The Korean Urological Oncology Society and The Korean Prostate Society. All Rights Reserved.

(extracellular matrix, ECM) 성분, 생체 적합 물질 및 생화학적 인자가 수용 기관 또는 액체 저장소상에 인쇄되는 바이오 프린팅 공정으로 최근 개발되고 있다.^{4,7}

3D 바이오 프린팅의 장점으로서는 생존 가능한 세포,^{5,6,8} 효율성, 저렴한 비용,⁹ 높은 처리량,¹⁰ 정확한 재현성⁵이 있으며, 특히 누구나 제작이 가능하다는데 있으며, 인쇄를 위해 다양한 ‘바이오 잉크’를 사용하여 서로 다른 셀 유형 또는 ECM 구성 요소의 공간적 패턴화가 가능하다.¹¹ 이러한 독특한 장점으로 인해 바이오 프린팅은 생화학 표면 패턴링(biochemical surface patterning) 및 상처 치료용 생체 재료의 현장에서의 인쇄는 물론 기본 연구, 재생 의학, 질병 모델링 또는 제약 연구를 위한 3D 조직 구성을 설계하는 등 광범위한 응용 분야에서 사용 가능하다. 이 논문에서는 암 연구를 위한 바이오 프린팅 기술의 사용, 항암제 개발을 위한 생리학적으로 적절한 테스트 플랫폼의 최근 발전에 초점을 두었다. 뿐만 아니라, 잉크젯, 마이크로 엑스레이 및 레이저 기술을 기반으로 한 바이오 프린팅 방법을 검토하고 3D 압 모델과 2D 압 모델을 비교하였다. 또한 암 병리, 항암제 스크리닝 및 암 치료 개발에 대한 보다 깊이 있는 이해를 위해 플랫폼을 제공하여 종양의 미세 환경을 모방한 생체 인쇄 모델을 논의하고자 한다.

3D 종양 모델에 적용된 바이오 프린팅 기술

바이오 프린팅 분야에는 잉크젯 기반,^{12,13} 미세압출,¹⁴⁻¹⁷ 레이저 보조 바이오 프린팅¹⁸⁻²²으로 구분할 수 있다(Table 1). 잉크젯 기반의 바이오 프린팅은 히터 또는 압전 액추에이터(piezoelectric actuator) 중 하나가 지원하는 프린트 헤드에서 바이오 잉크액을 방울방울 흘려주는 방식이다. 미세

압출 바이오 프린팅은 공기의 힘¹⁴⁻¹⁷ 또는 기계적(피스톤 또는 스크류 구동) 힘²³⁻²⁵을 사용하여 연속적인 바이오 잉크 흐름을 압출하는 방식이다. 레이저 보조 바이오 프린팅은 레이저 유도(laser guided) 또는 레이저 보조(laser induced) 두 가지 방법으로 수행할 수 있다. 레이저 유도 직접 셀 프린팅 방법은 레이저 빔이 직접 세포 현탁액으로 분출되는 방식이며,^{18,26} 레이저 보조 생체 프린팅 방법은 도너 필름으로 사용되는 레이저 흡수층 아래에 세포가 담긴 하이드로겔이 평행하게 놓여 빔을 전달받는 방식이다.^{20,22,27,28}

1. 2단계 바이오 프린팅(2-step biofabrication)

바이오 프린팅의 한가지 방법으로 스캐폴드를 3D 인쇄한 후 세포를 특정 수만큼 삽입하는 방법으로 조절 가능한 구조적 특징과 조성을 갖는 세포를 배양하기 위한 정확한 생체 적합성 스캐폴드를 생성하는데 사용될 수 있다. 정상 유방 상피 세포와 형질 전환된 발암 세포를 스캐폴드 위에 일정량을 깔아 세포 이동 패턴을 연구하였을 때, 2D배양 세포는 강성이 다른 물질에 대해 이동성이 통계적인 차이를 보이지 않았으나, 3D상의 세포는 스캐폴드 강성과 종양 유전자의 존재에 따라 다양한 변위, 속도 및 직진도를 보였다.²⁹ 이러한 결과는 암 세포 이동에 관한 추가 연구가 3D 시스템에서 수행되어야 함을 시사한다.²⁹

2. 1단계 바이오 프린팅(1-step biofabrication)

2단계 바이오 프린팅과 달리 1단계 바이오 프린팅 방법은 하이드로 겔과 세포의 혼합물을 인쇄하여 사용자가 일하는 단계를 줄임으로써 3D 조직 모델을 보다 효율적으로 제작할 수 있다.³⁰ 최근의 바이오 프린팅 기술은 세포 밀도와 세포-세포 간의 거리 측면에서 미세 환경에 대한 3D 복잡성과

Table 1. Comparison of common bioprinting technologies

Performance	Microextrusion bioprinting	Laser-assisted bioprinting	Inkjet bioprinting
Throughput	Medium	Low to medium	High
Droplet size	5 μ m to millimeters wide	>20–80 μ m	50–300 μ m
Spatial resolution	Medium	Medium to high	Medium
Single-cell encapsulation control	Medium	Medium to high	Low
Cell viability	40%–80%	>95%	>85%
Cell density	High	Medium, 10^8 cells/mL	Low, < 10^6 cells/mL
Material/hydrogel viscosity	30 mPa.s to >600 kPa.s	1–300 mPa.s	<10 mPa.s
Gelation method	Chemical, ionic, enzymatic, photocrosslinking, shear thinning, thermal, pH	Ionic	Ionic, enzymatic, photocrosslinking, thermal
Gelation speed	Medium	High	High
Print/fabrication speed	High	Low	Medium
Printer cost	Medium	High	Low

공간 제어로 Matrigel을 사용하여 인간 난소 암(OVCAR-5) 세포와 정상 섬유 아 세포의 3D 패턴링(patterning)을 가능하게 하였다.³¹ 이 방법은 이중 추출기가 있는 자동화된 XYZ 스테이지를 사용하여 기관에 사전 정의된 위치에 세포 캡슐화 방울을 배치하여 높은 처리량으로 높은 생존력을 제공하며, 세포-세포의 상호작용을 체계적으로 조사하기 위한 암 공존 모델의 제작을 가능하게 해준다.

바이오 프린팅 3D 종양 모델은 암의 원인과 약물 검사에 관한 연구의 질을 향상시킬 수 있다. 시험관 내 자궁 경부 종양 모델을 구축하기 위해 HeLa 세포를 젤라틴, 알지네이트 및 피브리노겐과 하이드로 젤을 혼합하여 3D 바이오 프린팅을 이용하여 캡슐화시킨 연구에서 HeLa 세포를 종래의 2D 모델에서 배양된 대조군과 비교하기 위해 ECM 물질로 3D 인쇄했다.³² 3D 바이오 프린팅 모델에서 90% 이상의 세포 생존력이 달성되었으며 세포는 2D 배양에서보다 높은 속도로 증식하였다. 3D의 HeLa 세포는 2D 배양에서 형성된 단층 세포 시트와 달리 3D 세포 회전 타원체(cellular spheroids)를 형성하였다. 이러한 차이는 3D 세포 배양 조건에서 나타나는 세포-세포와 세포-기질 간의 상호작용에 기인할 수 있다. HeLa 세포에서의 matrix metalloproteinase (MMP) 단백질 발현은 3D 인쇄된 모델에서 더 높게 나타났으며, 이는 ECM 분해에서 MMP의 기능성 때문인 것으로 보인다. 3D로 인쇄된 구조물에서의 세포는 2D 배양에서의 세포와 비교하여 볼 때 파클리탁셀(paclitaxel) 치료에 대해 더 높은 화학요법에 대한 저항성을 보였다. 3D 바이오 프린팅 기술을 사용한 시험 관내 종양 모델 구축은 종양 형성, 진행 및 항암 치료에 대한 반응을 정확히 분석하는데 유용한 방법으로 생각한다.³²

3. 세포 생존력의 최적화(optimizing cell viability)

3D 바이오 프린팅 후 세포 생존율은 적용 압력, 노즐 직경 및 온도, 현탁 매질의 점도 및 환경 조건과 같은 인쇄 매개 변수를 조정하여 최적화할 수 있다.^{32,33} 세포 캡슐화 방울의 변형, 표면 장력 및 기질의 소수성/친수성과 같은 다른 매개 변수도 계산 시뮬레이션 및 모델링을 통해 평가될 수 있으며, 이를 활용하여 생존력을 높이고 있다. 추가적으로 한 가지 중요한 매개 변수는 바이오 프린팅 프로세스의 지속 가능한 시간인데, 세포 생존력은 (1) 제조 중 예비 젤 바이오 잉크(pre-gel bio-ink) 내에서의 세포의 대기 시간; (2) 배양 전에 제조하는 동안 증착된 구조물 내의 세포의 대기 시간; (3) 이들 외부 스트레스에 대한 세포 유형의 민감성에 의해 영향을 받는다.³³

바이오 프린팅을 이용한 암 치료법 조사

1. 종양 이형성(tumor heterogeneity)

종양 미세 환경의 이질성과 복잡성은 서로 다른 세포 유형, ECM 및 생체 분자를 가진 바이오 잉크를 coprinting하여 구현할 수 있다.¹¹ 종양 세포, 내피 세포 및 대식 세포를 함유하는 이중 구조물은 바이오 프린팅 기술을 이용해 생체 관련 세포-세포 상호작용을 복제하는 고도의 공간 제어로 제조될 수 있으며, 초기 세포 밀도는 종양의 높은 세포 밀도를 유사하게 모방하고 암 세포 행동에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 세포-세포 간의 신호 전달을 구현할 수 있다.³¹ 또한 종양 세포 및 혈관 세포가 coprinting된 3D 모델은 종양 세포의 혈관 침범 및 암 전이 과정을 실시간으로 모니터링할 수 있으며, 다양한 종류의 암 유형은 암 세포 유형과 주변 세포의 수 많은 조합을 인쇄하여 다양한 조직 유형의 암 전이 모델을 제작할 수 있게 해준다. 또한 주화성(chemotaxis) 및 암 전이에 중요한 역할을 담당하는 생체 분자 변화는 3D 바이오 프린팅을 이용하여 생화학 신호전달의 기전을 연구하는데 이용되고 있다.^{30,34,35}

2. 혈관 신생 및 종양 혈관계(angiogenesis and tumor vasculature)

최근 3D 바이오 프린팅을 이용한 혈관 세포, 암 세포 및, 정상 세포를 이용한 생체모방 미세구조의 개발이 진행되고 있는데 3D 바이오 프린팅을 통한 혈관화는 쥐의 모세 혈관을 마이크로 컴퓨터 단층촬영 스캔한 것을 기반으로 프린팅하였으며, 약물에 대한 정상 및 암 세포 반응의 차이를 시험하는데 사용될 수 있다.³⁶ 정상혈관에 비하여 구멍이 있거나 조직화가 잘 되지 않은 혈관 형성은 암 혈관의 독특한 특징인데 이러한 차이가 조직에서의 약물 전달에 영향을 미치므로 약물 전달에 필요한 항암제의 입자 크기와 투여량을 최적화하기 위해 3D 바이오 프린팅을 이용하여 암 혈관 모델을 개발하여 활용 중에 있다.^{37,38}

3. 종양 스페로이드 형성

유방암의 스페로이드를 형성하고 유지하는 오목한 polyethylene glycol 구조를 생성하기 위해 3D 바이오 프린팅을 이용하여 비선형 자외선 광 및 원형 오목 노출 패턴을 통한 3D 오목 구조물을 생성하였다.³⁹ BT474 유방암 세포를 이들 구조물에 뿌리면, 스페로이드는 평평한 배양에 비해 크기가 좁은 분포로 형성되는데, 이 스페로이드는 저산소증에 대한 바이오 마커인 HIF-1 α 의 발현이 높은 중심에 피사를 나타냈으며 이는 이전에 종양 스페로이드에서 관찰된 결과

와 일치하였다. 이 3D 바이오 프린팅 플랫폼은 장기간의 배양에서 스페로이드를 유지할 수 있는 능력으로 종양의 진행, 이동 및 혈관 신생을 연구하기 위한 재현성이 뛰어나고 비용이 저렴하여 종양 모델의 역할을 할 수 있다.

4. 항암제 개발을 위한 바이오 프린팅

약물의 효능 평가를 위한 3D 모델을 만들기 위해 바이오 프린팅을 이용하여 세포 함유 matrigel 구조물을 인쇄하고 이러한 구조물을 마이크로 유체 장치에 연결하여 모델을 제작하였는데, 이는 장, 간, 신장 등의 장기와 유사하게 제작하여 약물이 활성화하기 전 전구 약물의 형태부터 이의 변환, 효과, 및 대사 연구에 초점을 두었다.⁴⁰ 제조 방법은 pre-gel (예: Matrigel 및 콜라겐)을 사전 제작된 polydimethylsiloxane 기판으로 온도제어 바이오 프린팅 기술을 이용하는 것에 기반을 두었으며, 이는 생리학적인 유사 3D 인간 암 종양 모델을 만들어 항암제 개발에 사용되고 있다.^{32,40,41}

일반적으로 신약의 개발에 필수적으로 수행하는 동물 모델 테스트의 결과는 중간 차이에 의한 인체 테스트 결과를 정확하게 예측하지 못할 수 있으며,⁴² 이는 임상 시험 단계에서 많은 약물이 실패하게 만드는 원인이다. 게다가 동물 시험은 윤리적인 우려를 불러일으키며, 윤리적인 틀은 과학 연구를 위한 동물의 사용을 통제하기 위해 밀접하게 규제되어 있다.⁴³ 따라서 3D 바이오 프린팅 기반 종양 모델은 인간 임상 시험 전에 동물 실험을 대체하거나 보완할 우수한 후보이며, 바이오 프린팅으로 시험의 반복성, 인간과 유사함 및 높은 효율의 모델 제조 능력을 가능하게 한다. 결국 3D 바이오 프린팅 기반 종양 모델은 동물 또는 사람의 시험 전에 *in vitro* 암 모델을 사용하여 중합체 미세구 및 약물 방출 동력과 같은 약물 운반체의 생분해성을 시험할 수 있다.^{38,44} 또한 생체 내 약물 치료의 효능도 이 모델에 미치는 영향을 알아보는 시험을 통해 예측할 수 있으며, 다양한 암 모델의 개발에 응용이 가능한 장점이 있다.⁴⁵

결론 및 향후 전망

전통적인 2D 세포 배양에 비해 3D 미세 환경 모델의 장점은 보다 정확하고 신뢰할 수 있는 데이터를 얻을 수 있으며, 보다 큰 세포 생존력과 생리학적으로 관련이 있는 단백질 발현 프로파일, 높은 증식률, 항암제에 대한 더 높은 저항성 및 실제 종양의 특성을 보여준다. 3D에서 이중 세포의 바이오 프린팅은 높은 생존력과 세포의 공간 분포에 대한 3D 제어로 종양 미세 환경의 시험 관내 모델링을 향상시킬 수 있다. 높은 효율을 가진 이러한 모델은 종양 형성, 진행

및 항암 요법에 대한 반응을 특성화하는 데 훨씬 도움이 된다.³²

동물 모델은 인간의 유전학과 생리학 사이에 직접적인 상관관계가 없기 때문에 암 세포가 인간에게 어떻게 작용하는지에 대한 이해가 제한적이다. 인간 세포에서 생명공학을 이용하여 제작된 살아있는 마이크로 구조물은 질병 모델을 만드는 데 있어 보다 현실적이다. 효과적인 항암 치료법을 개발하기 위해서는 충분한 양의 정보가 발견되어야 하며, 이러한 연구는 바이오 프린팅된 암 모델을 사용하여 가속화될 수 있다. 암 연구를 위한 현재의 바이오 프린팅 응용 프로그램은 암 생물학에서 새로운 발견을 추구하거나 또는 임상 치료법을 시험하기 위해 3D 암 모델 제작을 위한 새로운 실험 절차를 수립하는 데 유망하다. 따라서 바이오 프린팅에 대한 더 많은 연구는 암 진행의 기본 메커니즘을 밝히고, 암 세포 행동을 연구하고, 약물 검사와, 효과적인 임상 치료법 개발을 위한 3D 암 모델의 높은 효율 구조물 제조를 가능하게 할 것이다.

이해관계(Conflict of Interest)

저자들은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

REFERENCES

1. Kruth JP. Material increment manufacturing by rapid prototyping techniques. CIRP Annals - Manuf Technol 1991;40:603-14.
2. Heller TB, Hill RM, Saggal AF, Inventors; Quadrax Corp., assignee. Method of and apparatus for forming a solid three-dimensional article from a liquid medium. French patent Fr. WO1991012120A1. 1991 Aug 22.
3. Freedman DH. Layer by layer. MIT Technol Rev 2012;115: 50-3.
4. Demirci U, Montesano G. Single cell epitaxy by acoustic picolitre droplets. Lab Chip 2007;7:1139-45.
5. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends Biotechnol 2003;21:157-61.
6. Moon S, Hasan SK, Song YS, Xu F, Keles HO, Manzur F, et al. Layer by layer three-dimensional tissue epitaxy by cell-laden hydrogel droplets. Tissue Eng Part C Methods 2010;16:157-66.
7. Xu F, Moon SJ, Emre AE, Turali ES, Song YS, Hacking SA, et al. A droplet-based building block approach for bladder smooth muscle cell (SMC) proliferation. Biofabrication 2010; 2:014105.
8. Mironov V, Kasyanov V, Drake C, Markwald RR. Organ

- printing: promises and challenges. *Regen Med* 2008;3:93-103.
9. Hamid Q, Snyder J, Wang C, Timmer M, Hammer J, Guceri S, et al. Fabrication of three-dimensional scaffolds using precision extrusion deposition with an assisted cooling device. *Biofabrication* 2011;3:034109.
 10. Tasoglu S, Demirci U. Bioprinting for stem cell research. *Trends Biotechnol* 2013;31:10-9.
 11. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 2013;501:346-54.
 12. Boland T, Xu T, Damon B, Cui X. Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol J* 2006;1:910-7.
 13. Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, et al. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. *Tissue Eng* 2005;11:1658-66.
 14. Fedorovich NE, Swennen I, Girones J, Moroni L, van Blitterswijk CA, Schacht E, et al. Evaluation of photocrosslinked Lutrol hydrogel for tissue printing applications. *Biomacromolecules* 2009;10:1689-96.
 15. Chang CC, Boland ED, Williams SK, Hoying JB. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011;98:160-70.
 16. Khalil S, Sun W. Biopolymer deposition for freeform fabrication of hydrogel tissue constructs. *Mater Sci Eng C* 2007;27:469-78.
 17. Chang R, Nam J, Sun W. Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing. *Tissue Eng Part A* 2008;14:41-8.
 18. Odde DJ, Renn MJ. Laser-guided direct writing for applications in biotechnology. *Trends Biotechnol* 1999;17:385-9.
 19. Nahmias Y, Schwartz RE, Verfaillie CM, Odde DJ. Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2005;92:129-36.
 20. Guillotin B, Souquet A, Catros S, Duocastella M, Pippenger B, Bellance S, et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials* 2010;31:7250-6.
 21. Gaebel R, Ma N, Liu J, Guan J, Koch L, Klopsch C, et al. Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials* 2011;32:9218-30.
 22. Barron JA, Ringeisen BR, Kim H, Spargo BJ, Chrisey DB. Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films* 2004;453-454:383-7.
 23. Cohen DL, Malone E, Lipson H, Bonassar LJ. Direct freeform fabrication of seeded hydrogels in arbitrary geometries. *Tissue Eng* 2006;12:1325-35.
 24. Jakab K, Damon B, Neagu A, Kachurin A, Forgacs G. Three-dimensional tissue constructs built by bioprinting. *Biorheology* 2006;43:509-13.
 25. Visser J, Peters B, Burger TJ, Boomstra J, Dhert WJ, Melchels FP, et al. Biofabrication of multi-material anatomically shaped tissue constructs. *Biofabrication* 2013;5:035007.
 26. Nahmias Y, Odde DJ. Micropatterning of living cells by laser-guided direct writing: application to fabrication of hepatic-endothelial sinusoid-like structures. *Nat Protoc* 2006;1:2288-96.
 27. Colina M, Duocastella M, Fernández-Pradas JM, Serraa P, Morenza JL. Laser-induced forward transfer of liquids: study of the droplet ejection process. *J Appl Phys* 2006;99:7.
 28. Kattamis NTea. Laser direct write printing of sensitive and robust light emitting organic molecules. *Appl Phys Lett* 2009;94:084909.
 29. Soman P, Kelber JA, Lee JW, Wright TN, Vecchio KS, Klemke RL, et al. Cancer cell migration within 3D layer-by-layer microfabricated photocrosslinked PEG scaffolds with tunable stiffness. *Biomaterials* 2012;33:7064-70.
 30. Dababneh AB, Ozbolat IT. Bioprinting technology: a current state-of-the-art review. *J Manuf Sci Eng* 2014;136:061016.
 31. Xu F, Celli J, Rizvi I, Moon S, Hasan T, Demirci U. A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. *Biotechnol J* 2011;6:204-12.
 32. Zhao Y, Yao R, Ouyang L, Ding H, Zhang T, Zhang K, et al. Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro. *Biofabrication* 2014;6:035001.
 33. Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv Mater* 2014;26:3124-30.
 34. Keenan TM, Folch A. Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip* 2008;8:34-57.
 35. Weiss LE, Amon CH, Finger S, Miller ED, Romero D, Verdinelli I, et al. Bayesian computer-aided experimental design of heterogeneous scaffolds for tissue engineering. *Comput Aided Des* 2005;37:1127-39.
 36. Huang TQ, Qu X, Liu J, Chen S. 3D printing of biomimetic microstructures for cancer cell migration. *Biomed Microdevices* 2014;16:127-32.
 37. Chauhan VP, Stylianopoulos T, Martin JD, Popović Z, Chen O, Kamoun WS, et al. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nat Nanotechnol* 2012;7:383-8.
 38. He Z, Xiong L. Fabrication of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres and degradation characteristics in vitro. *J Macromol Sci Part B: Phy* 2011;50:1682-90.
 39. Hribar KC, Finlay D, Ma X, Qu X, Ondeck MG, Chung PH, et al. Nonlinear 3D projection printing of concave hydrogel microstructures for long-term multicellular spheroid and embryoid body culture. *Lab Chip* 2015;15:2412-8.
 40. Snyder JE, Hamid Q, Wang C, Chang R, Emami K, Wu H, et al. Bioprinting cell-laden matrigel for radioprotection study

- of liver by pro-drug conversion in a dual-tissue microfluidic chip. *Biofabrication* 2011;3:034112.
41. Unger C, Kramer N, Walzl A, Scherzer M, Hengstschläger M, Dolznig H. Modeling human carcinomas: physiologically relevant 3D models to improve anti-cancer drug development. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;79-80:50-67.
42. Runge A, Hu J, Wieland M, Bergeest JP, Mogler C, Neumann A, et al. An inducible hepatocellular carcinoma model for pre-clinical evaluation of antiangiogenic therapy in adult mice. *Cancer Res* 2014;74:4157-69.
43. Festing S, Wilkinson R. The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research. *EMBO Rep* 2007;8:526-30.
44. Singh M, Morris CP, Ellis RJ, Detamore MS, Berkland C. Microsphere-based seamless scaffolds containing macroscopic gradients of encapsulated factors fortissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 2008;14:299-309.
45. Demirbag B, Huri PY, Kose GT, Buyuksungur A, Hasirci V. Advanced cell therapies with and without scaffolds. *Biotechnol J* 2011;6:1437-53.