

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 3 月 24 日 (24.03.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/041238 A1

(51) 国际专利分类号:
A61F 2/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/089769

(22) 国际申请日: 2014 年 10 月 29 日 (29.10.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201410473055.4 2014 年 9 月 16 日 (16.09.2014) CN

(71) 申请人: 清华大学 (TSINGHUA UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国北京市海淀区 100084 信箱 82 分箱清华大学专利办公室, Beijing 100084 (CN)。

(72) 发明人: 王小红 (WANG, Xiaohong); 中国北京市海淀区 100084 信箱 82 分箱清华大学专利办公室, Beijing 100084 (CN)。周新伟 (ZHOU, Xinwei); 中国北京市海淀区 100084 信箱 82 分箱清华大学专利办公室, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京鸿元知识产权代理有限公司 (BEIJING GRANDER IP LAW FIRM); 中国北京市朝阳区光华路 7 号汉威大厦东区 18A6 室, Beijing 100004 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,

[见续页]

(54) Title: METHOD AND DEDICATED DEVICE FOR PREPARING TISSUE AND ORGAN BY USING SPIN ACCUMULATION METHOD

(54) 发明名称: 利用旋转堆积法制备组织器官的方法及专用设备

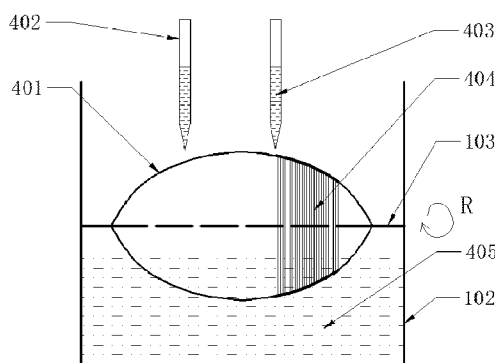


图 4 / Fig.4

(57) Abstract: A dedicated device for preparing a tissue and an organ by using a spin accumulation method comprises a supporting apparatus, a multi-nozzle assembly, a motion mechanism, a shaping apparatus, and a control system. In the method for preparing a tissue and an organ by using a spin accumulation method, based on a core dissolving technology and a cell assembly technology, various cell growth factors, inhibitors or medicines are compounded into a cross-linkable/polymerized hydrogel material; filamentous hydrogel extruded from nozzles is crosslinked/polymerized and compositely synthesized into a polymer solution, is washed by a culture solution and then is wound and accumulated on a rotary inner core; the hydrogel containing various types of seed cells and the hydrogel to which endothelial cells and nerve cells are adhered separately form a main body part, a blood vessel and a nerve system; and the inner core is dissolved after completion of forming and the tissue and organ with spiral blood vessels and nerves are obtained after being cultured for a period of time. The method is simple and is easy to form a blood vessel and a nerve system, and is especially suitable for forming a tissue and organ with a lumen that is difficult to be formed by using existing tissue engineering.

(57) 摘要:

[见续页]



WO 2016/041238 A1



IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

一种利用旋转堆积法制备组织器官的专用设备，包括支撑装置、多喷头组件、运动机构、成形装置以及控制系统。利用该设备制备组织器官的方法基于溶芯技术和细胞组装技术，将各种细胞生长因子、抑制因子或药物复合到可交联/聚合的水凝胶材料中，从喷头中挤出的丝状水凝胶经交联/聚合、合成高分子复合、培养液洗涤处理后缠绕堆积在旋转内芯上，含不同类型种子细胞的水凝胶和粘附内皮细胞、神经细胞的水凝胶分别形成主体部分和血管、神经系统，成形完毕后溶除内芯并培养一段时间后得到具有螺旋状血管和神经的组织器官。该制备方法简单且易于成形血管和神经系统，特别适用于成形传统组织工程难以成形的具有内腔的组织器官。

利用旋转堆积法制备组织器官的方法及专用设备

技术领域

本发明涉及利用旋转堆积法制备组织器官的方法及专用设备，属于组织工程领域。

背景技术

人体病损组织和器官的修复和替代是本世纪令人瞩目的科学前沿，也是一项亟需解决的科学难题。由于活体组织器官移植存在供体短缺以及免疫排斥风险大等固有弊端，难以成为解决该问题的有效途径。据此，以提高此类疾患治疗水平为目的的组织工程（Tissue Engineering）应运而生，组织工程旨在体外构建细胞和材料的三维结构体，通过适当的培养和训练后发展成具有和天然组织类似结构和功能的可移植替代物。近年来，组织工程一直是国内外研究的热点，发展迅速并取得了诸多成果，但就其产品应用领域而言，目前主要集中在结构相对简单的骨组织工程和皮肤组织工程等少数几个领域。究其原因，很重要的一点就是，现有的组织工程结构体的体外构建方法（如电纺丝、模铸法等）难以构建具有天然组织类似的复杂的血管网络结构，致使结构体内部的细胞存活率低，因此难以实现大块组织的构建。

传统的组织工程遵循“细胞-支架复合”的“自上而下”的构建思路，即先成形支架，再把细胞种植到支架上。但是，当支架尺寸和复杂度提高到一定程度时，支架成形和细胞复合的难度将大大增加。细胞三维受控组装技术(Wang X H, Yan Y N, Zhang R J. Rapid prototyping as a tool for manufacturing bio-artificial livers. Trends in Biotechnology, 2007, 25(11):505-513.)，即细胞 3D 打印技术，遵循“支架-细胞”一体化构建的思路。在细胞打印过程中，细胞（或细胞聚集体）与溶胶（水凝胶的前驱体）同时置于或者含细胞的培养液单独置于打印机的喷头中，由计算机控制含细胞液滴的沉积位置，在指定的位置逐点打印，在打印完一层的基础上继续打印另一层，层层叠加形成三维多细胞-凝胶体系。细胞打印技术的特点是可以保证细胞密度和分布的均匀性，并且可以实现多种细胞的共同组装和定点排布。但是氧气和营养物质的有效输送问题，即“血管化问题”仍然是该方法构建可移植复杂组织器官的瓶颈问题。

现有的通过细胞 3D 打印成形的组织器官都是按照一层一层的平面堆积而成的，因其成形的固有特点，微通道（血管）的成形依赖于成形精度及材料的性质。而且对于具有内腔结构

组织器官的成形，依靠平面堆积的细胞打印技术在其成形过程中不可避免地需要增加支架或者转动成形台或喷头方位，大大增加了设计和成形的难度，有时甚至还无能为力。

中国专利文献 CN1654028 提出一种利用溶芯法制造管网状支架的方法，先利用水溶性、无生物毒性的材料制造支架的内芯，然后将生物相容性材料涂覆在支架内芯上，经风干后用蒸馏水溶除支架内芯。该方法只能成形结构较简单的管网状支架，对于具有复杂血管的组织器官的成形无能为力。

发明内容

本发明的目的在于克服传统的组织工程中难以构建具有复杂血管和神经结构的空腔类组织器官，提供一种基于旋转堆积法制备组织器官的方法及专用设备。该方法在细胞受控组装技术和溶芯技术的基础上，目的在于提供一种新的组织器官的制备方法，便于制备具有螺旋网状血管和神经的组织器官，特别适用于制备具有内腔结构的组织器官。

本发明的技术方案如下：

利用旋转堆积法制备组织器官的工艺方法，其特征在于本发明的专用设备包括支撑装置、多喷头组件、运动机构、成形装置以及控制系统；所述支撑装置包括支撑腿和底板；所述运动机构采用导轨-滑块机构，包括 X 向导轨、X 向滑块、Y 向导轨、第一 Y 向滑块、第二 Y 向滑块、Z 向导轨、Z 向滑块，所述 X 向导轨设在底板上，Z 向导轨固接在 X 向滑块上，Y 向导轨固接在 Z 向滑块上；所述多喷头组件至少含有六个喷头，包括至少两个挤压式喷头和四个喷洒式喷头，两个挤压式喷头的喷嘴内径分别为 $200\ \mu\text{m}\sim 1\text{mm}$ 和 $50\ \mu\text{m}\sim 500\ \mu\text{m}$ ，喷洒式喷头喷嘴的网孔直径为 $50\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ ，喷头分两组分别安装在第一 Y 向滑块和第二 Y 向滑块上；所述成形装置包括成形容器、支架和电机，成形容器安装在底板上并处于喷头组件的下部，支架安装在成形容器内并与电机输出轴相连。

本发明所述专用设备其特征在于：所述支架的结构为两端呈圆柱状、中间为棱柱状，材料为不锈钢或者钛合金。

本发明所述专用设备其特征在于：所述第一 Y 向滑块和第二 Y 向滑块上分别开有与 Y 向导轨平行的第一小导轨和第二小导轨，第一小导轨和第二小导轨上分别安装第一小滑块和第二小滑块，第一小滑块和第二小滑块上开有可固定喷头的孔。

利用旋转堆积法制备组织器官的方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

1) 材料制备：

制备 $0.2\sim 20\%$ (w/v) 水凝胶溶液、 $1\sim 10\%$ (w/v) 交联剂/聚合液、 $0.1\sim 10\%$ (w/v) 合

成高分子溶液、0.2~10% (w/v) 明胶溶液和细胞培养液；分离或者诱导种子细胞，种子细胞密度为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL，将种子细胞与水凝胶溶液按 1~9: 9~1 体积比混合制成含种子细胞的水凝胶溶液；分离或者诱导神经细胞和内皮细胞，并制成细胞悬液，神经细胞悬液和内皮细胞悬液密度均为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 个/mL；

2) 内芯制备

当制备具有内腔的组织器官时，根据所要制备组织器官的内腔形状，用三维绘图软件设计其三维模型，用快速成形法制作具有此内腔结构的模具，当成形实体的组织器官时，模具是直径厚 8~10mm 的圆柱；将支架放入模具中央，往模具中加入明胶溶液后降低温度至 8~10℃ 使明胶固化，打开模具得到中心带支架的组织器官内芯，在带支架的组织器官内芯外涂覆水凝胶，并用交联剂/聚合液进行交联/聚合；

3) 成形

将含种子细胞的水凝胶溶液和不含细胞的水凝胶溶液分别装入第一挤压式喷头和第二挤压式喷头中，交联剂/聚合液、神经细胞悬液、内皮细胞悬液以及合成高分子溶液分别装入第四喷洒式喷头、第二喷洒式喷头、第一喷洒式喷头和第三喷洒式喷头中，在成形容器内装入细胞培养液，将支架安装在成形容器内并与电机输出轴相连，将待成形组织器官的模型导入控制系统后，启动成形设备，开始堆积成形；在成形过程中，支架绕 Y 负向做旋转运动，喷头做平移运动，当成形组织器官的主体部分时，第一挤压式喷头运动到指定位置挤出含种子细胞的水凝胶缠绕在内芯上，同时装有交联剂/聚合液的第四喷洒式喷头运动到第一挤压式喷头的正后方喷洒出交联剂/聚合液对其进行交联/聚合；当成形血管时，第二挤压式喷头运动到指定位置挤出不含细胞的水凝胶缠绕在内芯上，同时第四喷洒式喷头运动到第二挤压式喷头正后方，第一喷洒式喷头和第三喷洒式喷头分别运动到第二挤压式喷头正前方，在旋转的内芯带动下，新缠绕的水凝胶依次运动至第四喷洒式喷头下进行交联/聚合，经过培养液进行洗涤，至第一喷洒式喷头、第三喷洒式喷头下进行喷洒内皮细胞和复合合成高分子溶液；当成形神经时，第二挤压式喷头运动到指定位置挤出不含细胞的水凝胶缠绕在内芯上，同时第四喷洒式喷头运动到第二挤压式喷头正后方，第二喷洒式喷头和第三喷洒式喷头分别运动到第二挤压式喷头正前方，在旋转的内芯带动下，新缠绕的水凝胶依次运动至第四喷洒式喷头下进行交联/聚合，经过培养液进行洗涤，至第二喷洒式喷头、第三喷洒式喷头下进行喷洒神经细胞和复合合成高分子；如此反复缠绕堆积直至形成含内芯的组织器官前体；

4) 后续处理

将含内芯的组织器官前体置于恒温箱中培养，溶除内芯后取出支架，经培养后形成回转头状组织器官，神经和血管以螺旋状贯穿其中。

本发明所述制备组织器官的方法，其特征在于：所述的种子细胞为具有分化能力的干细胞或具有生理活性的成体细胞；所述的干细胞为脂肪干细胞、胚胎干细胞、血液干细胞、骨髓干细胞、诱导型多功能干细胞，所述成体细胞为脂肪细胞、肝细胞、膀胱细胞、淋巴细胞、心肌细胞或肾细胞；所述水凝胶为复合了明胶、胶原、基质胶、卡拉胶、壳聚糖、琼脂、透明质酸、弹性蛋白和层粘连素中一种或多种的海藻酸钠或纤维蛋白原溶液；所述的水凝胶中可复合各种细胞冻存剂、细胞生长因子、药物和抗凝血剂；细胞冻存剂为二甲基亚砜（DMSO）、甘油和右旋糖中的一种或多种复合物；所述的细胞生长因子为血管内皮生长因子（VEGF）、碱性成纤维细胞生长因子（b-FGF）、肝细胞生长因子（HGF）、人血小板衍生生长因子（PDGF-BB）和转化生长因子 $\beta 1$ （TGF- $\beta 1$ ）中的一种或多种复合物；所述的药物为抗肿瘤药物，该抗肿瘤药物为黄芪多糖、顺式二氨基二氯络铂（DDP）、丝裂霉素（MMC）、5-氟尿嘧啶（5-FU）、抗过敏药物、抗生素、病毒疫苗中的一种或多种复合物；所述的抗凝血因子为肝素、紫杉醇中的一种或多种复合物；所述合成高分子溶液的溶质为聚氨酯、聚己内酯、聚碳酸酯、聚乙二醇、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、聚酯和聚羟基酸酯中的一种或者多种，溶剂为四乙二醇或 1,4-二氧六环。

本发明与现有技术相比，有以下优点及突出性的技术效果：

①本发明将溶芯法和 3D 打印方法结合起来，能成形传统 3D 打印方法难以成形的具有内腔的组织器官；

②多喷头的使用可实现多种细胞非均质成形以及表面复合处理，满足天然组织器官对多种细胞的要求；

③在水凝胶表面喷洒内皮（神经）细胞的血管（神经）形成方式能成形具有复杂结构的血管（神经），合成高分子溶液形成的薄膜提高了水凝胶表面粘附的内皮（神经）细胞数目，有效促进血管（神经）的形成；

④成形过程中细胞培养液既能为细胞提供营养物质又可以洗涤凝胶表面的交联剂/聚合液及合成高分子中的有机溶剂，减小其对细胞的损伤。

附图说明

图 1 为本发明的专用设备三维结构简图。

图 2 为第一 Y 向滑块的三维结构简图。

图 3 为本发明的组织器官成形过程示意图。

图 4 为本发明的组织器官成形工艺流程图。

图 5a 为不含细胞的水凝胶；图 5b 为喷上内皮（神经）细胞后的水凝胶；图 5c 为喷洒合成高分子溶液后的水凝胶。

图 6 为本发明的组织器官的结构示意图。

图中：101-底板；102-成形容器；103-支架；104-第一喷洒式喷头；105-第二喷洒式喷头；106-Z 向滑块；107-Y 向导轨；108-第三喷洒式喷头；109-第一小滑块；110-第一小导轨；111-第一 Y 向滑块；112-第二 Y 向滑块；113-第一挤压式喷头；114-第二挤压式喷头；115-第四喷洒式喷头；116-第二小滑块；117-第二小导轨；118-Z 向导轨；119-旋转电机；120-X 向滑块；121-X 向导轨；401-内芯；402-喷头组件；403-材料；404-水凝胶丝；405-培养液；601-主体部分；602-血管（神经）；603-内腔。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

图 1 是本发明提供的利用旋转堆积法制备组织器官的专用设备，该设备包括多喷头组件、运动机构、成形装置以及控制系统（未画）。所述运动机构由滑块—导轨（槽）实现，包括 X 向导轨 121 和 X 向滑块 120、Y 向导轨 107 和第一 Y 向滑块 111、第二 Y 向滑块 112、Z 向导轨 118 和 Z 向滑块 106 以及第一小滑块 109、第二小滑块 116 和第一小导轨 110、第二小导轨 117；所述 X 向导轨 121 设在底板 101 上；所述 Z 向导轨 118 固接在 X 向滑块 120 上；所述 Y 向导轨 107 固接在 Z 向滑块 106 上；所述第一小导轨 110 和第二小导轨 117 分别安装在第一 Y 向滑块 111 和第二 Y 向滑块 112 上；所述多喷头组件至少含有六个喷头，包括至少两个挤压式喷头和四个喷洒式喷头，分两组分别固定在两个平行的 Y 向滑块上，第一喷洒式喷头 104、第二喷洒式喷头 105 和第三喷洒式喷头 108 安装在第一 Y 向滑块 111 上，其中第一喷洒式喷头 104 和第二喷洒式喷头 105 安装在第一 Y 向滑块 111 上的喷头固定槽中，第三喷洒式喷头 108 安装在第一小滑块 109 的喷头固定槽上；第四喷洒式喷头 115 和至少两个挤压式喷头，第一挤压式喷头 113 和第二挤压式喷头 114，安装在第二 Y 向滑块 112 上，其中第一挤压式喷头 113 和第二挤压式喷头 114 固定在第二 Y 向滑块 112 的喷头固定槽上，第四喷洒式喷头 115 安装在第二小滑块 116 的喷头固定槽上，第一挤压式喷头 113 和第二挤压式喷头 114 的喷嘴内径分别为 $200\mu\text{m}$ - 1mm 和 $50\mu\text{m}$ - $500\mu\text{m}$ ，四个喷洒式喷头喷嘴的网孔直径为 $50\mu\text{m}$ - $100\mu\text{m}$ ；所述成形装置包括成形容器 102、支架 103 以及电机 119，成形容器 102 安装在

底板 101 上喷头组件的正下方，可拆卸的支架 103 安装在成形容器 102 内并与电机 119 的输出轴相连，所述支架 103 为具有一定力学强度的对细胞无毒性的固体材料，如不锈钢或者钛合金；所述控制系统负责控制喷头组件的三维平移运动和支架的旋转运动。

图 2 为第一 Y 向滑块的三维结构简图，所述第一 Y 向滑块上开有两个用来固定喷头的孔和一个能让喷头运动的大孔，大孔两边设有第一小导轨 110，第一小滑块 109 可沿小导轨运动，带动其上的第三喷洒式喷头 108 轮流为第一喷洒式喷头 104 第二喷洒式喷头 105 工作，第二 Y 向滑块结构与第一 Y 向滑块类似。

图 3 为本发明的利用旋转堆积法成形组织器官的流程图，主要包括成形前的准备工作、组织器官前体成形以及后续操作等三大主要步骤。

成形前的准备工作包括材料的制备和内芯的制作，制备 0.2~20% (w/v) 水凝胶溶液、1~10% (w/v) 交联剂/聚合液、0.1~10% (w/v) 合成高分子溶液、0.2~10% (w/v) 的明胶溶液和细胞培养液；根据所要成形的组织器官的类型，从病人身上分离具有分化能力的自体干细胞，如脂肪干细胞、胚胎干细胞、血液干细胞、骨髓干细胞、诱导型多功能干细胞，或具有生理活性成体细胞，如脂肪细胞、肝细胞、膀胱细胞、淋巴细胞、心肌细胞或肾细胞作为种子细胞，并制成细胞悬液，种子细胞密度为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 个/mL，将种子细胞悬液与灭菌后的水凝胶溶液按体积比为 1~9: 9~1 均匀混合，制备成含种子细胞的水凝胶混合物；所述水凝胶为可复合明胶、胶原、基质胶、卡拉胶、壳聚糖、琼脂、透明质酸、基质胶、弹性蛋白、层粘素中一种或多种的海藻酸钠或纤维蛋白原溶液，所述的水凝胶中可复合各种细胞冻存剂、细胞生长因子、药物、抗凝血剂。细胞冻存剂为二甲基亚砷 (DMSO)、甘油、右旋糖中的一种或多种复合物。所述的细胞生长因子为内皮细胞生长因子 (如血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (b-FGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、人血小板衍化生长因子

(PDGF-BB)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 中的一种或多种复合物。所述的药物为抗肿瘤药物 (如黄芪多糖、顺式二氨基二氯铂 (DDP)、丝裂霉素 (MMC)、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、抗过敏药物、抗生素 (如青霉素、赤霉素、四环素)、病毒疫苗中的一种或多种复合物。所述的抗凝血因子为肝素、紫杉醇中的一种或多种复合物；所述合成高分子溶液的溶质具体为聚氨酯 (PU)、聚己内酯 (PCL)、聚碳酸酯、聚乙二醇、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA)、聚酯和聚羟基酸酯中的一种或者多种，溶剂为四乙二醇或 1,4-二氧六环；取出成形容器 102 上的支架 103 并进行灭菌处理，当成形具有内腔的组织器官时，根据所要成形的组织器官内腔的结构特点，用三维绘图软件设计其三维模型，用快速成形法制作具有此内腔结构的模具，将支

架 103 立入模具中，往模具中加入明胶溶液，降低温度至 10~12℃使明胶固化，得到中心带支架的组织器官内芯；当成形实体组织器官时，内芯为厚 5~6mm 的圆柱套筒；然后在带支架的组织器官内芯外涂覆一层水凝胶，并用交联剂/聚合液进行交联/聚合。

图 4 为本发明的旋转堆积成形过程示意图，将含种子细胞的水凝胶和不含细胞的水凝胶分别装入设备中第一挤压式喷头 113 和第二挤压式喷头 114 中，交联剂/聚合液、神经细胞悬液和内皮细胞悬液分别装入第四喷洒式喷头 115、第二喷洒式喷头 105 和第一喷洒式喷头 104 中，合成高分子溶液装入第三喷洒式喷头 108 中，将支架 103 安装在成形成容器 102 中并在成形成容器 102 内装入细胞培养液 405；将待成形组织器官的模型导入控制系统后，启动成形设备，开始堆积成形，在成形过程中，支架 103 绕 Y 负向做旋转运动，喷头做平移运动，当成形组织器官主体部分时，第一挤压式喷头 113 运动到指定位置挤出含种子细胞的水凝胶缠绕在内芯上，同时装有交联剂/聚合液的第四喷洒式喷头 115 运动到第一挤压式喷头 113 的正后方喷洒出交联剂/聚合液对其进行交联/聚合；当成形血管时，第二挤压式喷头 114 运动到指定位置挤出不含细胞的水凝胶缠绕在内芯上，同时第四喷洒式喷头 115 运动到第二挤压式喷头 114 正后方，第一喷洒式喷头 104 和第三喷洒式喷头 108 分别运动到第二挤压式喷头 114 正前方，在旋转的内芯带动下，新缠绕的水凝胶依次运动至第四喷洒式喷头 115 下进行交联/聚合，经过培养液进行洗涤，经过第一喷洒式喷头 104、第三喷洒式喷头 108 下进行喷洒内皮细胞和复合合成高分子；当成形神经纤维束时，第二挤压式喷头 114 运动到指定位置挤出不含细胞的水凝胶缠绕在内芯上，同时第四喷洒式喷头 115 运动到第一挤压式喷头 113 正后方，第二喷洒式喷头 105 和第三喷洒式喷头 108 分别运动到第二挤压式喷头 114 正前方，在旋转的内芯带动下，新缠绕的水凝胶依次运动至第四喷洒式喷头 115 下进行交联/聚合，经过培养液进行洗涤，经过第二喷洒式喷头 105、第三喷洒式喷头 108 下进行喷洒神经细胞和复合合成高分子，如此反复缠绕堆积，直至成形所需的组织器官。

图 5a 为不含细胞的水凝胶；图 5b 为喷上内皮（神经）细胞后的水凝胶；图 5c 为喷洒合成高分子溶液后的水凝胶；成形血管（神经）时，从喷头中喷出的不含细胞的水凝胶丝经交联/聚合和洗涤后，依次被喷上一层内皮（神经）细胞和合成高分子溶液，形成凝胶-细胞-薄膜结构，在后续培养过程中，水凝胶逐渐水解，内皮细胞或者神经细胞生长并相互联系，最终形成血管和神经结构。

图 6 为本发明提供的组织器官的结构示意图，所述组织器官为回转体或近回转体，由内腔 603 和外围实体组成；所述内腔 603 为圆柱状、球状或者由其他曲面围成的闭合曲面形状；

所述外围实体由含或者不含细胞的水凝胶丝缠绕堆积而成；含有种子细胞的水凝胶丝 602 缠绕形成主体结构，不含细胞的水凝胶丝 603 表面涂覆内皮细胞和合成高分子溶液形成血管系统，不含细胞的水凝胶表面涂覆神经细胞和合成高分子溶液形成神经系统。

下面举出几个具体的实施例，以进一步理解本发明：

实施例 1 心房的制备

(1) 材料制备

提取脂肪干细胞 (ADSCs)、内皮细胞 (ECs)、神经细胞、星状细胞和心肌细胞 (CMCs)，培养传代，得到细胞材料，内皮细胞和神经细胞浓度均为 8×10^7 个/mL，星状细胞和心肌细胞密度为 2×10^6 个/mL；取 2g 海藻酸钠和 7g 明胶置于 100mL 培养液中使其完全溶解，在该混合液中加入质量体积浓度 3% 的细胞冻存液 DMSO，灭菌处理得到明胶-海藻酸钠水凝胶材料；取 4g 明胶置于 100mL 培养液中使其完全溶解，灭菌处理得到明胶溶液；制备 0.05g/ml 的氯化钙水溶液作为其交联剂/聚合液；将可降解聚碳酸酯溶于四乙二醇中得到质量体积浓度为 2% 的合成高分子溶液，灭菌处理待用；制备细胞培养液 DMEM 和 1% 胶原溶液。将星状细胞和心肌细胞的混合液与水凝胶以体积比为 1:1 混合得到含心肌-星状细胞的水凝胶溶液。

(2) 内芯制备

根据心房内腔的形状结构特点，用三维绘图软件设计三维纺锤状模型，用快速成形法制作具有此内腔结构的模具，将灭菌后的支架立入模具中，往模具中加入明胶溶液，降低温度至 $10 \sim 12^\circ\text{C}$ 使明胶固化，形成中心带支架的心房内芯，并在带支架的心房内芯外涂覆一层胶原溶液，并使胶原固化形成一层不溶于水溶液的保护膜；

(3) 成形

将含心肌-星状细胞和 DMSO 的水凝胶和不含细胞的水凝胶分别装入第一挤压式喷头 113 和第一挤压式喷头 114，内皮细胞悬液和神经细胞悬液分别装入第一喷洒式喷头 104、第二喷洒式喷头 105，氯化钙水溶液装入第四喷洒式喷头 115，合成高分子溶液装入第三喷洒式喷头 108，将带明胶内芯的支架安装在成形容器 102 内并与电机输出轴相连，在成形容器 102 内装入 100mL 的细胞培养液，整个装置置于温度为 $8 \sim 10^\circ\text{C}$ 的环境中，将心房模型导入控制系统后启动成形装置，开始成形。

(4) 溶芯

成形完毕后，将含明胶内芯的心房前体置于液氮中长期保存或恒温箱中培养，融除内芯，取出支架，即得到带内腔的心房前体。

(5) 后期培养

将心房前体至于脉动生物培养器中进行培养，培养过程中，在应力场的多重作用下，促使细胞间建立连接并诱导生长，在不含细胞的凝胶丝周围的内皮（神经）细胞诱导分化形成内径约为 1mm 的血管（神经），在凝胶降解后，最终形成具有自主收缩能力的含有血管和神经的心房。此心房可直接贴附在病损心脏上，达到修复再生的目的。

实施例 2 肝脏前体的制备

(1) 材料制备

提取人体骨髓干细胞（BSCs）、脂肪干细胞（ADSCs）、内皮细胞（ECs）、神经细胞和肝细胞，培养传代，得到种子细胞；取 1 纤维蛋白原和 7g 明胶置于 100mL 培养液中使其完全溶解，其中加入 0.1% 的抗肿瘤药物黄芪多糖，灭菌处理得到纤维蛋白原-明胶-黄芪多糖水凝胶材料；取 4g 明胶置于 100mL 培养液中使其完全溶解，灭菌处理得到明胶溶液；制备 0.05g/ml 的凝血酶 PBS 聚合液；将 PU 溶于四乙二醇中得到质量体积浓度为 5% 的合成高分子溶液，灭菌处理待用；

将上述制备的骨髓干细胞-肝细胞与纤维蛋白原-明胶-黄芪多糖水凝胶材料混合得到脂肪干细胞和肝细胞的密度均为 1×10^6 个/mL 的含肝细胞-脂肪干细胞的水凝胶。内皮细胞、脂肪干细胞与 0.1% 肝素磷酸缓冲液（PBS）混合得到浓度均为 5×10^7 个/mL 的内皮-脂肪干细胞悬液。神经细胞和脂肪干细胞混合得到浓度均为 5×10^7 个/mL 的神经-脂肪干细胞悬液。

(2) 内芯制备

在灭菌后的支架表面涂一层厚度约为 5mm 的明胶，降低温度至 $10 \sim 12^\circ\text{C}$ 固化形成内芯，在带支架的肝脏前体内芯外涂覆水凝胶并交联聚合形成一层不溶于培养液的保护膜。

(3) 成形

将含肝细胞-骨髓干细胞的纤维蛋白原-明胶-黄芪多糖水凝胶和不含细胞的水凝胶分别装入第一挤压式喷头 113 和第一挤压式喷头 114，内皮-脂肪干细胞-肝素悬液和神经-脂肪干细胞悬液分别装入第一喷洒式喷头 104 和第二喷洒式喷头 105，凝血酶聚合液装入第四喷洒式喷头 115，合成高分子装入第三喷洒式喷头 108。将带明胶内芯的支架安装在成形成容器 102 内并与电机输出轴相连，并在成形成容器内装入 100mL 的细胞培养液。整个装置置于温度为 10°C 的环境中，导入肝脏前体模型后启动成形装置开始成形。

(4) 溶芯

成形完毕后，将含明胶内芯的肝脏前体置于约 37℃ 的恒温环境中，使明胶内芯“融化”，取出支架，即得到肝脏前体。

(5) 后期培养

将肝脏前体置于培养箱中培养，培养过程中，细胞间建立连接并增殖生长，不含细胞的凝胶丝周围的内皮（神经）细胞和脂肪干细胞诱导分化形成内径约为 1mm 的血管（神经），在凝胶降解后，最终形成肝脏。

实施例 3 膀胱前体的制备

(1) 材料制备

提取人体脂肪干细胞（ADSC）、内皮细胞（EC）、神经细胞和膀胱细胞，培养传代，得到细胞材料；取 1g 海藻酸钠、1g 壳聚糖和 1g 明胶置于 100mL 培养液中使其完全溶解，灭菌处理得到海藻酸钠-壳聚糖-明胶水凝胶材料；制备 0.05g/ml 的氯化钙水溶液作为其交联剂；取 2g 葡萄糖和 2g 右旋糖置于 100mL 培养液中使其完全溶解，灭菌处理得到葡萄糖-右旋糖溶液；将 PLGA 溶于四乙二醇中得到体积浓度为 5% 的溶液，灭菌处理待用；

将上述制备的脂肪干细胞-膀胱细胞与海藻酸钠-壳聚糖-明胶水凝胶材料混合得到脂肪干细胞和膀胱细胞的密度均为 1×10^6 个/mL 的含膀胱细胞-脂肪干细胞的水凝胶；内皮细胞和脂肪干细胞混合得到浓度均为 5×10^7 个/mL 的内皮-脂肪干细胞悬液；神经细胞和脂肪干细胞混合得到浓度均为 5×10^7 个/mL 的神经细胞-脂肪干细胞悬液。

(2) 内芯制备

根据膀胱内腔的形状结构特点，用三维绘图软件设计椭球状结构，用快速成形法制作具有此内腔结构的模具。将灭菌后的支架立入模具中，往模具中加入适量的明胶溶液，降低温度至 10~12℃ 使明胶固化，形成中心带支架的组织器官内芯，在带支架的肝脏前体内芯外涂覆水凝胶并交联聚合形成一层不溶于培养液的保护膜。

(3) 成形

将含膀胱细胞-脂肪干细胞的海藻酸钠-壳聚糖-明胶水凝胶和不含细胞的水凝胶分别装入第一挤压式喷头 113 和第一挤压式喷头 114，内皮细胞-脂肪干细胞悬液和神经细胞-脂肪干细胞悬液分别装入第一喷洒式喷头 104 和第二喷洒式喷头 105，氯化钙交联剂装入第四喷洒式喷头 115，合成高分子装入第三喷洒式喷头 108。将带明胶内芯的支架安装在成形成器 102 内并与电机输出轴相连，并在成形成器内装入 100mL 的细胞培养液。整个装置置于温度为 8~10℃ 的环境中，在计算机中导入膀胱模型后启动成形装置，开始成形。

(4) 溶芯

成形完毕后，将含明胶内芯的膀胱前体置于恒温箱中培养，去除内芯，取出支架，即得到带内腔的膀胱前体。

(5) 后期培养

将膀胱前体置于恒温箱中进行培养，培养过程中，细胞间建立连接并增殖生长，在不含细胞的凝胶丝周围的内皮（神经）细胞和脂肪干细胞诱导分化形成血管（神经），在凝胶降解后，最终形成具有神经和血管的膀胱。

实施例 4 肾前体的制备

(1) 材料制备

提取人体血液干细胞、内皮细胞（EC）、神经细胞和肾细胞，培养传代，得到细胞材料；取 1g 海藻酸钠和 1g 透明质酸置于 100mL 培养液中使其完全溶解，灭菌处理得到海藻酸钠-透明质酸水凝胶材料；制备 0.05g/ml 的氯化钙水溶液作为其交联剂；取 4g 明胶置于 100mL 培养液中使其完全溶解，灭菌处理得到明胶溶液；将合成高分子 PU 溶于四乙二醇中得到质量体积浓度为 5% 的合成高分子溶液，灭菌处理待用；

将上述制备的血液干细胞-肾细胞与海藻酸钠-透明质酸水凝胶材料混合得到血液干细胞和肾细胞的密度均为 1×10^6 个/mL 的含肾细胞-血液干细胞的水凝胶。内皮细胞和血液干细胞混合得到浓度均为 4×10^7 个/mL 的内皮细胞血液干细胞悬液。神经细胞和血液干细胞混合得到浓度均为 4×10^7 个/mL 的神经细胞-血液干细胞悬液。

(2) 内芯制备

在支架表面涂一层厚约 5mm 的明胶，降低温度至 $10 \sim 12^\circ\text{C}$ 固化形成内芯，在带支架的肝脏前体内芯外涂覆水凝胶并交联聚合形成一层不溶于培养液的保护膜。

(3) 成形

将含肾细胞-血液干细胞的水凝胶和不含细胞的水凝胶分别装入第一挤压式喷头 113 和第二挤压式喷头 114，内皮细胞-血液干细胞溶液和神经细胞-血液干细胞溶液分别装入第一喷洒式喷头 104 和第二喷洒式喷头 105，氯化钙交联剂/聚合液装入第四喷洒式喷头 115，合成高分子装入第三喷洒式喷头 108。将带明胶内芯的支架安装在成形成容器 102 内并与电机输出轴相连，并在成形成容器内装入 100mL 的细胞培养液。整个装置置于温度为 $8 \sim 10^\circ\text{C}$ 的环境中，导入肾模型后启动成形装置，开始旋转堆积成形。

(4) 溶芯

成形完毕后,将含明胶薄膜内芯的肾脏前体置于恒温箱中培养,使明胶薄膜内芯“融化”,取出支架,即得到肾脏前体。

(5) 后期培养

将肾前体置于培养箱中培养,培养过程中,细胞间建立连接并增殖生长,在不含细胞的凝胶丝周围的内皮(神经)细胞和血液干细胞诱导分化形成内径约为 1mm 的血管(神经),在凝胶降解后,最终形成具有血管和神经的肾脏。

实施例 5 人工乳房的制备

(1) 材料制备

提取人体脂肪干细胞(ADSC)、内皮细胞(EC)、神经细胞和淋巴细胞,培养传代,得到细胞材料;取 1g 海藻酸钠和 2g 明胶置于 100mL 培养液中使其完全溶解,灭菌处理得到海藻酸钠-明胶水凝胶材料;制备 0.05g/ml 的氯化钙水溶液作为其交联剂/聚合;取 2g 明胶置于 100mL 培养液中使其完全溶解,灭菌处理得到明胶溶液;将合成高分子 PU 溶于四乙二醇中得到质量体积浓度为 5%的合成高分子溶液,灭菌处理待用;

将上述制备的脂肪干细胞与海藻酸钠-明胶水凝胶材料混合得到脂肪干细胞密度均为 1×10^6 个/mL 的含脂肪干细胞的水凝胶。其中加入 1 μ M 胰岛素, 1 μ M 地塞米松, 50 u/mL 抑肽酶和 0.5 mmol/L 异丁基甲基化黄嘌呤衍生物。神经细胞和脂肪干细胞混合得到浓度均为 3×10^8 个/mL 的神经细胞-脂肪干细胞悬液。脂肪干细胞悬浮液中加入 50 ng/mL 内皮生长因子(VEGF)、3 ng/mL TGF- β 1 生长因子、10 ng/mL 成纤维细胞生长因子(b-FGF)。

(2) 内芯制备

在支架表面涂一层厚约 5mm 的明胶,降低温度至 10~12°C 固化形成内芯,在带支架的肝脏前体内芯外涂覆水凝胶并交联聚合形成一层不溶于培养液的保护膜。

(3) 成形

将含脂肪干细胞、胰岛素、地塞米松、抑肽酶和异丁基甲基化黄嘌呤衍生物的海藻酸钠-明胶水凝胶和不含细胞的水凝胶分别装入第一挤压式喷头 113 和第二挤压式喷头 114,内皮细胞-脂肪干细胞悬液和神经细胞-脂肪干细胞悬液分别装入第一喷洒式喷头 104 和第二喷洒式喷头 105,氯化钙交联剂装入第四喷洒式喷头 115,合成高分子装入第三喷洒式喷头 108。将带明胶内芯的支架安装在成形成容器 102 内并与电机输出轴相连,并在成形成容器内装入 100mL 的细胞培养液。整个装置置于温度为 10~12°C 的环境中,导入乳房模型后启动成形装置,开始成形。

(4) 溶芯

成形完毕后，将含明胶薄膜内芯的乳房前体置于恒温箱中培养，使明胶内芯“融化”，取出支架，即得到乳房前体。

(5) 后期培养

培养过程中，细胞间建立连接并增殖生长，在不含细胞的凝胶丝周围的内皮（神经）细胞和脂肪干细胞诱导分化形成内径约为 1mm 的血管（神经），在凝胶降解后，最终形成具有一定功能的乳房。

权利要求书

1、利用旋转堆积法制备组织器官的专用设备，包括支撑装置、多喷头组件、运动机构、成形装置以及控制系统；所述支撑装置包括支撑腿和底板（101）；所述运动机构采用导轨-滑块机构，包括X向导轨（121）、X向滑块（120）、Y向导轨（107）、第一Y向滑块（111）、第二Y向滑块（112）、Z向导轨（118）、Z向滑块（106）；所述X向导轨（121）设在底板（101）上，Z向导轨（118）固接在X向滑块（120）上，Y向导轨（107）固接在Z向滑块（106）上；其特征在于：所述多喷头组件至少含有六个喷头，分两组分别安装在第一Y向滑块和第二Y向滑块上；所述成形装置包括成形容器（102）、支架（103）和电机（119），成形容器（102）安装在底板（101）上并处于喷头组件的下方，支架（103）安装在成形容器（102）内并与电机（119）输出轴相连。

2、如权利要求1所述的利用旋转堆积法制备组织器官的专用设备，其特征在于：所述支架为两端呈圆柱状、中间为棱柱状结构。

3、如权利要求1所述的利用旋转堆积法制备组织器官的专用设备，其特征在于，所述支架的材料为不锈钢或者钛合金。

4、如权利要求1所述的利用旋转堆积法制备组织器官的专用设备，其特征在于：所述第一Y向滑块（111）和第二Y向滑块（112）上分别开有与Y向导轨平行的第一小导轨（110）和第二小导轨（117），第一小导轨和第二小导轨上分别安装第一小滑块（109）和第二小滑块（116），第一小滑块和第二小滑块上开有固定喷头的孔。

5、如权利要求1所述的利用旋转堆积法制备组织器官的专用设备，其特征在于：所述多喷头组件包括至少两个挤压式喷头和四个喷洒式喷头，两个挤压式喷头的喷嘴内径分别为 $200\mu\text{m}\sim 1\text{mm}$ 和 $50\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ ，喷洒式喷头喷嘴的网孔直径为 $50\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 。

6、一种利用旋转堆积法制备组织器官的方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

1) 材料制备：

制备0.2~20% (w/v) 水凝胶溶液、1~10% (w/v) 交联剂/聚合液、0.1~10% (w/v) 合成高分子溶液、0.2~10% (w/v) 明胶溶液和细胞培养液；分离或者诱导种子细胞，种子细胞密度为 $1\times 10^3\sim 1\times 10^6$ 个/mL，将种子细胞与水凝胶溶液按1~9: 9~1体积比混合制成含种子细胞的水凝胶溶液；分离或者诱导内皮细胞和神经细胞并制成细胞悬液，内皮细胞悬液和神经细胞悬液密度均为 $1\times 10^5\sim 1\times 10^8$ 个/mL；

2) 内芯制备

当制备具有内腔的组织器官时，根据所要制备组织器官的内腔形状，用三维绘图软件设计其三维模型，用快速成形法制作具有此内腔结构的模具，当成形实体的组织器官时，模具是直径厚 8~10mm 的圆柱；将支架（103）放入模具中央，往模具中加入明胶溶液后降低温度至 8~10℃使明胶固化，打开模具得到中心带支架（103）的组织器官内芯（401），在带支架的组织器官内芯（401）外涂覆一层水凝胶溶液，并用交联剂/聚合液交联/聚合；

3) 成形

将含种子细胞的水凝胶溶液和不含细胞的水凝胶溶液分别装入第一挤压式喷头（113）和第二挤压式喷头（114）中，交联剂/聚合液、神经细胞悬液、内皮细胞悬液以及合成高分子溶液分别装入第四喷洒式喷头（115）、第二喷洒式喷头（105）、第一喷洒式喷头（104）和第三喷洒式喷头（108）中，在成形容器内装入细胞培养液（405），将支架（103）安装在成形容器（102）内并与电机（119）输出轴相连，将待成形组织器官的模型导入控制系统后，启动成形设备，开始堆积成形；在成形过程中，支架（103）绕 Y 负向做旋转运动，喷头做平移运动，当成形组织器官的主体部分时，第一挤压式喷头（113）运动到指定位置挤出含种子细胞的水凝胶缠绕在内芯上，同时装有交联剂/聚合液的第四喷洒式喷头（115）运动到第一挤压式喷头（113）的正后方喷洒出交联剂/聚合液对其进行交联/聚合；当成形血管时，第二挤压式喷头（114）运动到指定位置挤出不含细胞的水凝胶缠绕在内芯上，同时第四喷洒式喷头（115）运动到第二挤压式喷头（114）正后方，第一喷洒式喷头（104）和第三喷洒式喷头（108）分别运动到第二挤压式喷头（114）正前方，在旋转的内芯带动下，新缠绕的水凝胶依次运动至第四喷洒式喷头（115）下进行交联/聚合，经过培养液进行洗涤，至第一喷洒式喷头（104）、第三喷洒式喷头（108）下进行喷洒内皮细胞和复合合成高分子溶液；当成形神经时，第二挤压式喷头（114）运动到指定位置挤出不含细胞的水凝胶缠绕在内芯上，同时第四喷洒式喷头（115）运动到第二挤压式喷头（114）正后方，第二喷洒式喷头（105）和第三喷洒式喷头（108）分别运动到第二挤压式喷头（114）正前方，在旋转的内芯带动下，新缠绕的水凝胶依次运动至第四喷洒式喷头（115）下进行交联/聚合，经过培养液进行洗涤，至第二喷洒式喷头（105）、第三喷洒式喷头（108）下进行喷洒神经细胞和复合合成高分子；如此反复缠绕堆积直至形成含内芯的组织器官前体；

4) 后续处理

将含内芯的组织器官前体置于恒温箱中培养，溶除内芯后取出支架，继续培养一段时间后形成回转状组织器官，神经和血管（502）以螺旋状贯穿其中。

7、如权利要求6所述的一种利用旋转堆积法制备组织器官的方法，其特征在于：所述的种子细胞为具有分化能力的干细胞或具有生理活性的成体细胞，所述干细胞为脂肪干细胞、胚胎干细胞、血液干细胞、骨髓干细胞或诱导型多功能干细胞，所述成体细胞为脂肪细胞、肝细胞、膀胱细胞、淋巴细胞、心肌细胞或肾细胞；所述水凝胶为复合了明胶、胶原、基质胶、卡拉胶、壳聚糖、琼脂、透明质酸、基质胶、弹性蛋白中层粘素中一种或多种的海藻酸钠或纤维蛋白原溶液；所述的水凝胶中复合各种细胞冻存剂、细胞生长因子、药物、抗凝血剂；细胞冻存剂为二甲基亚砜、甘油、右旋糖中的一种或多种复合物；所述的细胞生长因子为血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、肝细胞生长因子、人血小板衍化生长因子、转化生长因子 $\beta 1$ 中的一种或多种复合物；所述的药物为抗肿瘤药物，该抗肿瘤药物为黄芪多糖、顺式二氨基二氯络铂、丝裂霉素、5-氟尿嘧啶、抗过敏药物、抗生素和病毒疫苗中的一种或多种复合物；所述的抗凝血因子为肝素和紫杉醇中的一种或两种复合物；所述合成高分子溶液的溶质为聚氨酯、聚己内酯、聚碳酸酯、聚乙二醇、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、聚酯和聚羟基酸酯中的一种或者多种，溶剂为四乙二醇或1,4-二氧六环。

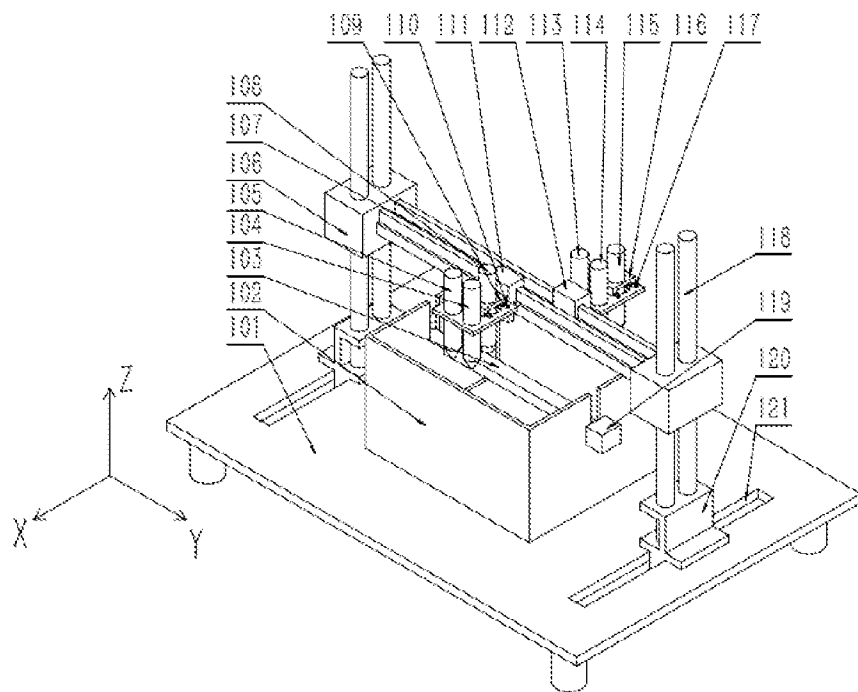


图 1

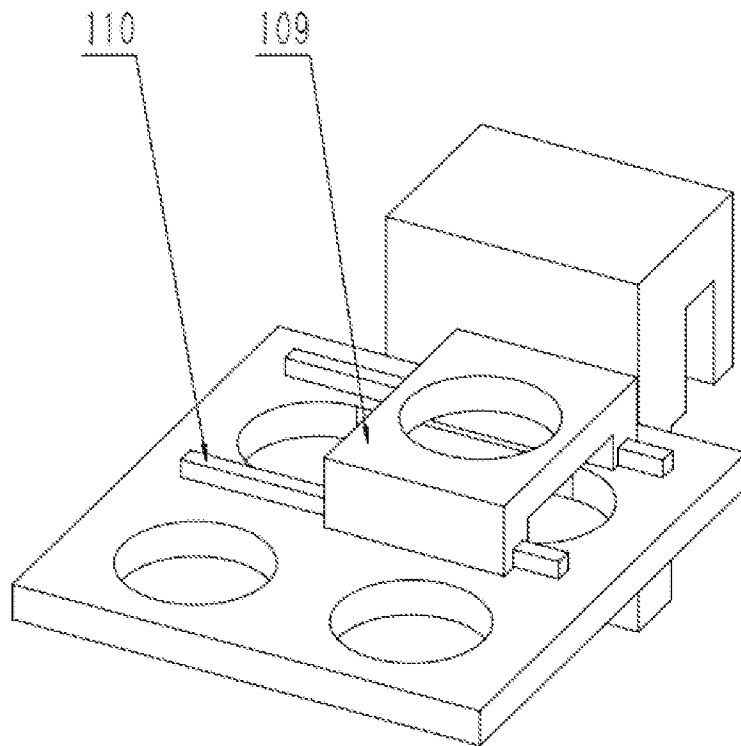


图 2

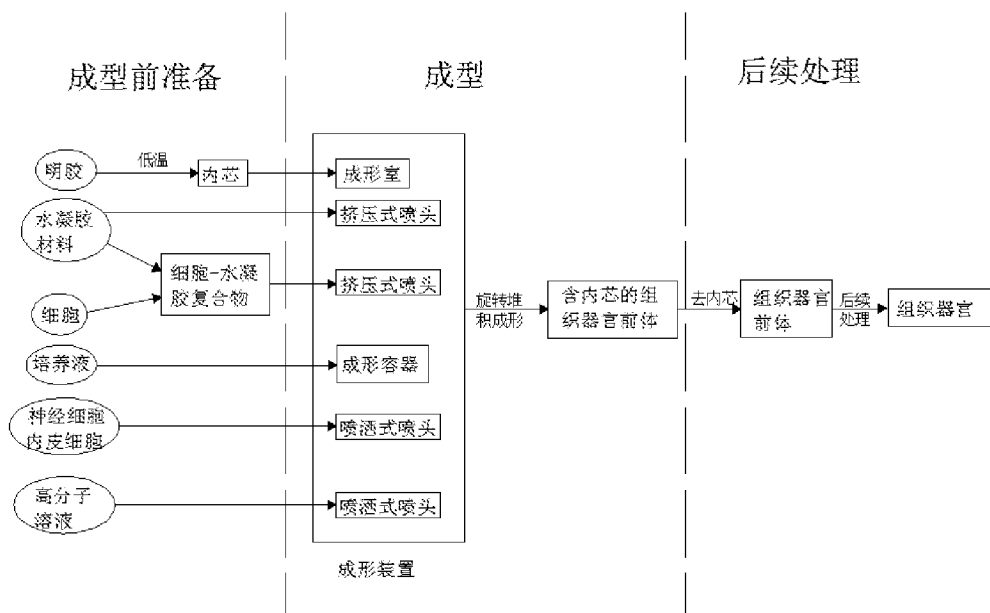


图 3

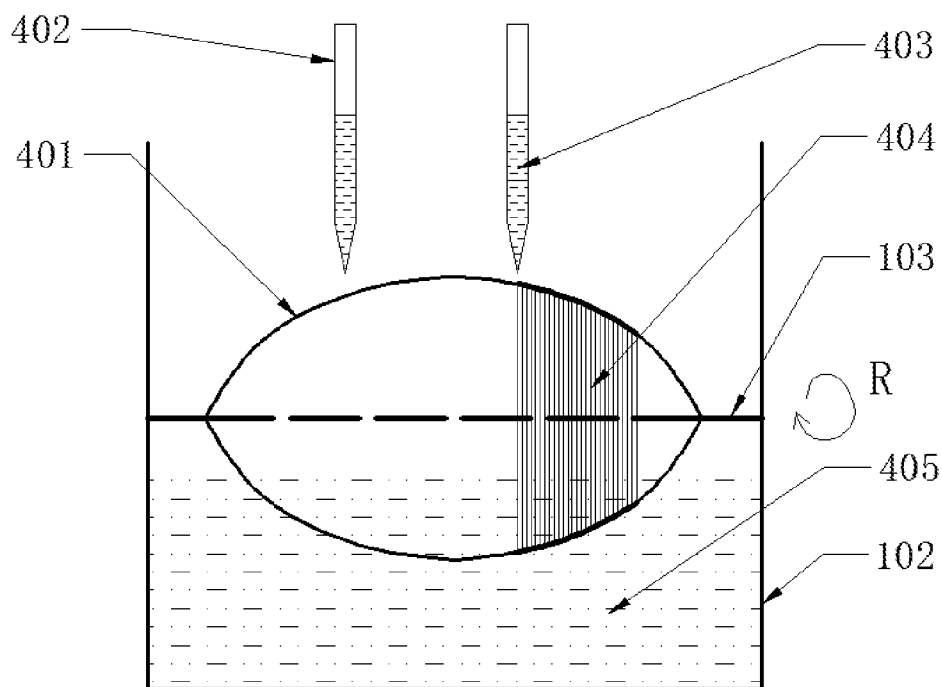
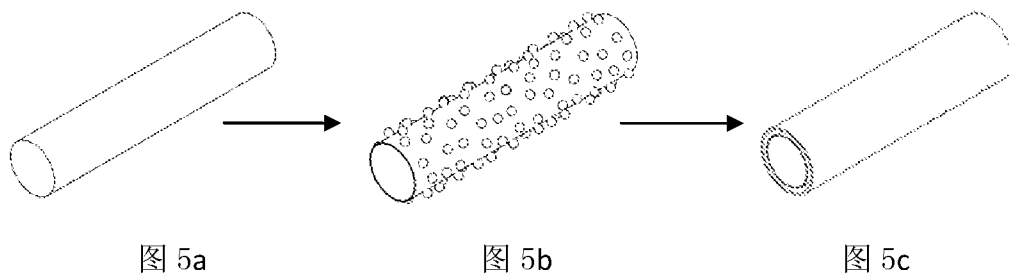


图 4



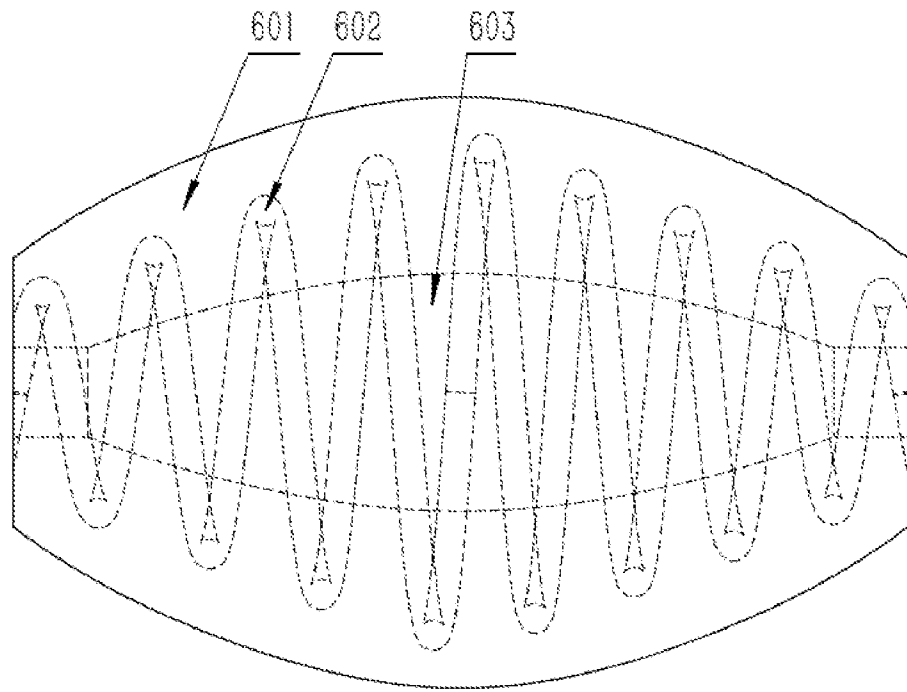


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/089769

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61F 2/02 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61F 2

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; VEN; CNKI: organ?, tissue?, nozzle?, inject+, muzzle?, rail?, slip+, print+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	CN 204072388 U (TSINGHUA UNIVERSITY) 07 January 2015 (07.01.2015) description, paragraphs[0018]-[0021], figures 1-4, and claims 1-4	1-5
A	CN 102755203 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 31 October 2012 (31.10.2012) description, paragraphs [0034]-[0062], and figures 1-4	1-7
A	CN 103948456 A (SHANGHAI UNIVERSITY) 30 July 2014 (30.07.2014) the whole document	1-7
A	CN 101692987 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 14 April 2010 (14.04.2010) the whole document	1-7
A	CN 103462725 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 25 December 2013 (25.12.2013) the whole document	1-7
A	US 2012089238 A1 (KANG HYUN-WOOK et al.) 12 April 2012 (12.04.2012) the whole document	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 03 June 2015	Date of mailing of the international search report 29 June 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer GUI, Lin Telephone No. (86-10) 62085615

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/089769

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 204072388 U	07 January 2015	None	
CN 102755203 A	31 September 2012	CN 102755203 B	21 January 2015
CN 103948456 A	30 July 2014	None	
CN 101692987 A	14 April 2010	CN 101692987 B	27 April 2011
CN 103462725 A	25 September 2013	None	
US 2012089238 A1	12 April 2012	US 2015119994 A1	30 April 2015

A. 主题的分类 A61F 2/02 (2006.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类																							
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) A61F 2 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) CNABS; VEN; CNKI: 清华大学, 组织, 器官, 喷头, 喷嘴, 成型, 喷射, 成形, 滑动, 滑轨, 滑块, 导轨, 打印, organ?, tissue?, nozzle?, inject+, muzzle?, rail?, slip+, print+																							
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E</td> <td>CN 204072388 U (清华大学) 2015年 1月 7日 (2015 - 01 - 07) 说明书第18-21段, 附图1-4, 权利要求1-4</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102755203 A (清华大学) 2012年 10月 31日 (2012 - 10 - 31) 说明书第34-62段, 附图1-6</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103948456 A (上海大学) 2014年 7月 30日 (2014 - 07 - 30) 全文</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101692987 A (清华大学) 2010年 4月 14日 (2010 - 04 - 14) 全文</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103462725 A (浙江大学) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 全文</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2012089238 A1 (KANG HYUN-WOOK 等) 2012年 4月 12日 (2012 - 04 - 12) 全文</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	E	CN 204072388 U (清华大学) 2015年 1月 7日 (2015 - 01 - 07) 说明书第18-21段, 附图1-4, 权利要求1-4	1-5	A	CN 102755203 A (清华大学) 2012年 10月 31日 (2012 - 10 - 31) 说明书第34-62段, 附图1-6	1-7	A	CN 103948456 A (上海大学) 2014年 7月 30日 (2014 - 07 - 30) 全文	1-7	A	CN 101692987 A (清华大学) 2010年 4月 14日 (2010 - 04 - 14) 全文	1-7	A	CN 103462725 A (浙江大学) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 全文	1-7	A	US 2012089238 A1 (KANG HYUN-WOOK 等) 2012年 4月 12日 (2012 - 04 - 12) 全文	1-7
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
E	CN 204072388 U (清华大学) 2015年 1月 7日 (2015 - 01 - 07) 说明书第18-21段, 附图1-4, 权利要求1-4	1-5																					
A	CN 102755203 A (清华大学) 2012年 10月 31日 (2012 - 10 - 31) 说明书第34-62段, 附图1-6	1-7																					
A	CN 103948456 A (上海大学) 2014年 7月 30日 (2014 - 07 - 30) 全文	1-7																					
A	CN 101692987 A (清华大学) 2010年 4月 14日 (2010 - 04 - 14) 全文	1-7																					
A	CN 103462725 A (浙江大学) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 全文	1-7																					
A	US 2012089238 A1 (KANG HYUN-WOOK 等) 2012年 4月 12日 (2012 - 04 - 12) 全文	1-7																					
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																							
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																							
国际检索实际完成的日期 2015年 6月 3日		国际检索报告邮寄日期 2015年 6月 29日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451		授权官员 桂林 电话号码 (86-10)62085615																					

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2014/089769

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	204072388	U	2015年 1月 7日	无	
CN	102755203	A	2012年 10月 31日	CN 102755203 B	2015年 1月 21日
CN	103948456	A	2014年 7月 30日	无	
CN	101692987	A	2010年 4月 14日	CN 101692987 B	2011年 4月 27日
CN	103462725	A	2013年 12月 25日	无	
US	2012089238	A1	2012年 4月 12日	US 2015119994 A1	2015年 4月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)