

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-020

## 细胞培养肉用生物材料的设计

张璨<sup>1,2</sup>, 施李杨<sup>1,2</sup>, 戴建武<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup> 晨熙新创生物科技(镇江)有限公司, 江苏 镇江 212000; <sup>2</sup> 湖南大学生物学院, 湖南 长沙 410000; <sup>3</sup> 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

**摘要:** 细胞培养肉是通过体外培养动物细胞后制造出来的肉类。相比传统畜肉类, 其具有绿色可持续、营养可控、环境污染小等优势, 是近年兴起的“科技食品”。但是, 单纯依靠培养细胞得到的细胞培养肉并非真正意义上的肉, 仅仅能被称为肉糜, 其在外形、组织结构和口感上和传统肉类仍存在较大差距。近年, 随着组织工程技术发展, 生物材料在细胞培养肉生产中的应用也极大促进了该领域的发展, 并为制造更接近真实肉类的细胞培养肉提供了有效途径。基于此, 文章综述了细胞培养肉的优势和前景、细胞培养肉生产流程, 重点总结了用于细胞培养肉生物材料的要求及分类、用于细胞培养肉的高分子材料、细胞培养肉用生物支架的工程化制备, 并提出细胞培养肉未来发展的方向与挑战。旨在为细胞培养肉领域的技术发展提供参考。

**关键词:** 细胞培养肉; 细胞培养; 干细胞; 生物材料; 生物制造

中图分类号: Q813 文献标志码: A

## Cultured meat from biomaterials: challenges and prospects

ZHANG Can<sup>1,2</sup>, SHI Liyang<sup>1,2</sup>, DAI Jianwu<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>Chenxi Xinchuang Biological Technology Co., Ltd, Zhenjiang 212000, Jiangsu, China; <sup>2</sup>College of Biology, Hunan University, Changsha 410000, Hunan, China; <sup>3</sup>Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

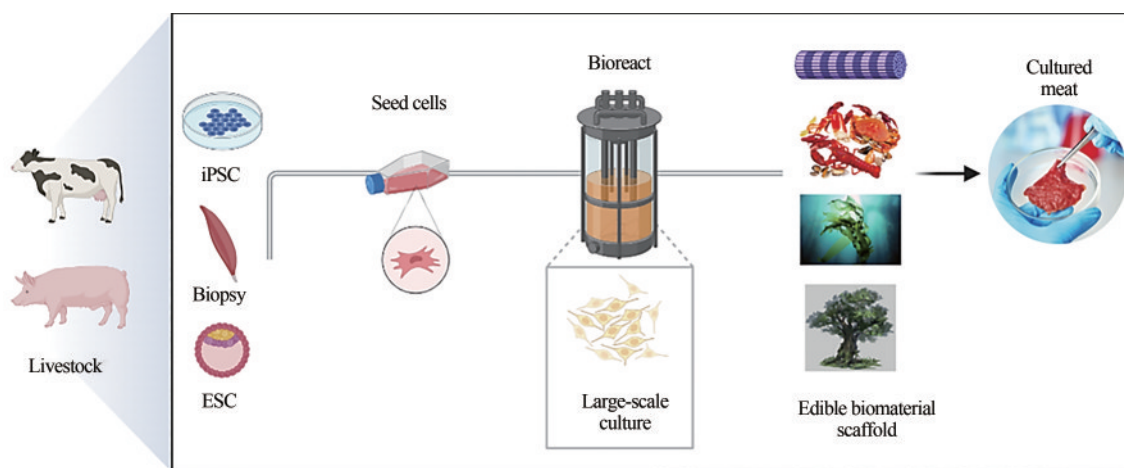
**Abstract:** Cultured meat technology aims to manufacture meat by *ex vivo* culture of animal cells, which has emerged as a promising alternative for livestock meat production. Raising animals for meat production have led to some negative effects like global public health, environmental pollution, energy consumption, and animal welfare concerns. Compared to conventional animal agriculture, cultured meat is more sustainable, environmentally friendly, nutrition precision, and it can lessen the animal welfare concerns in the future. Although cultured meat is considered to supple or even replace conventional meat, it is still in its early stages and faces many challenges which need to be resolved before being on the market. Muscle is a well-organized but also intrinsically complex tissue. Benefiting from the extensive research on tissue engineering, it has already been successfully used for generation of bio-artificial muscles to repair muscle injury, but it has never been used for generation of meat. To fully mimic conventional meat's texture, flavor and nutritional properties, applications of tissue engineering technology and biomaterials are required. This review details

收稿日期: 2022-04-08 修回日期: 2022-07-11

引用本文: 张璨, 施李杨, 戴建武. 细胞培养肉用生物材料的设计[J]. 合成生物学, 2022, 3(4): 676-689

Citation: ZHANG Can, SHI Liyang, DAI Jianwu. Cultured meat from biomaterials: challenges and prospects [J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(4): 676-689

the benefits and challenges of cultured meat with regard to isolation and purification of stem cells, long-term and large-scale culture of stem cells in an undifferentiated state, and efficient myogenic differentiation of stem cells. Given the vital important role that biomaterials play in fabricating muscle fibers, this review provides in-depth analysis of highlighting promising scaffold materials that can be applied to develop cultivated meat. Especially combining some precursors into edible synthetic scaffolds could create functional scaffolds that promote stem cell multilineage differentiation and thereby improve the flavor of the final meat product. Concluding remarks and future perspectives are also included for future research into scaffolds capable of supporting the growth of high-quality meat while minimizing production costs. In general, with increasing demand of meat and further development of technologies, cultured meat may ultimately act as a more healthy and sustainable choice.



**Keywords:** cultured meat; cell culture; stem cell; biomaterials; biomanufacturing

## 1 细胞培养肉

“人造肉”指借助生物技术手段在体外合成的非自然产生的肉类。目前根据制造原料的不同，可将“人造肉”分成“素肉”和“真肉”，即由大豆等植物蛋白加工而成的植物蛋白肉和通过培养动物细胞后制造出的细胞培养肉（cultured meat）<sup>[1]</sup>。植物蛋白肉发展较早，且由于植物蛋白来源广泛、加工工艺相对成熟，已经实现商业化生产。但与传统肉制品相比其在外观、风味、口感与营养等方面仍然存在较大差距。相比之下，细胞培养肉从外观、成分到口感都和真正的肉有很多相似之处。其源于动物细胞，含有多种植物蛋白所没有的必需氨基酸，且经过人工定向诱导，还可以精准控制营养成分，制造低脂、高蛋白、

低胆固醇和高钙肉制品，以满足不同人群的健康需求，因此亦是未来发展的主要方向。细胞培养肉的研究工作始于21世纪初，当时美国国家航空航天局（NASA）资助了一项以食用为目的的细胞培养肉研究，以解决未来太空飞行和空间站肉类的可持续供应问题<sup>[2]</sup>。

目前，大众可能对细胞培养肉存在很多困惑，一方面人们对新鲜事物保持谨慎怀疑态度，另一方面现有传统动物肉口感好且成本低，为什么要开发细胞培养肉呢？据统计，畜牧业和肉类加工业是温室气体排放的主要来源，其中二氧化碳、甲烷和一氧化二氮的排放量分别占总排放量的9%、39%和65%，排放量甚至超过了交通运输业<sup>[3]</sup>。而且依赖畜牧业的传统肉类生产会消耗大量土地、粮食作物、水和能源等自然资源<sup>[4]</sup>。现

阶段传统肉类产能已接近极值,然而据联合国粮食及农业组织(FAO)预测,随着全球人口数量持续增加,到2050年全球肉类需求和消费量将增长70%<sup>[5]</sup>,我国肉制品的供给缺口到2030年预计将达到3804万吨。肉类过度消耗还将造成动物福利缺失<sup>[6]</sup>。与此同时,伴随中产阶级的崛起和城市化水平提高,消费者开始追寻更健康的蛋白质食品。传统养殖业的肉类存在一定食品安全问题,例如沙门氏杆菌、大肠杆菌等细菌的污染以及禽流感、非洲猪瘟、疯牛病等动物疫病的感染<sup>[7]</sup>。因此,家禽养殖常涉及激素和抗生素等药物的使用,使人们可能遭受耐药菌的威胁,存在健康隐患。心血管疾病、糖尿病和结直肠癌也与过度食用红肉和加工肉类有关<sup>[8-9]</sup>。基于此现状,开发细胞培养肉可以有效降低传统畜牧业生产对环境的负面影响,缓解肉类消费的供求矛盾,减少人类对传统肉类的依赖,避免因肉制品摄入过多导致的潜在营养健康危害<sup>[10-11]</sup>。

基于细胞培养肉各方面的优势,使其未来拥有巨大的市场前景。根据美国市场调查咨询公司MarketsAndMarkets的调查报告,培养肉将以每年15.7%的复合年增长率增长,预计从2023年的64亿美元增长到2028年的100亿美元。然而,现阶段制造细胞培养肉的条件要求极为严苛,造成研制成本高昂,故大部仍停留在实验室阶段。2013年荷兰马斯特里赫特大学的Mark Post研发了全球第一个人造牛肉汉堡,并在英国伦敦进行试吃,引起大众的广泛关注。汉堡中的牛肉是研发人员经过3个月时间从牛肌肉中提取干细胞后培育得到的约5盎司肉饼,其成本造价超过32万美元(约200万人民币)<sup>[12]</sup>。随后经过2年的技术发展,人造汉堡肉饼成本已经由最初的32万美元降低到了11美元左右<sup>[13]</sup>。尽管现阶段细胞培养肉造价仍高于传统肉类,但得益于生物技术的快速发展,其生产成本仍有大幅降低的空间,倘若将来能提高性价比实现批量生产,提供口感逼真、营养丰富、卫生安全的科技培养肉,必将掀起一场食物革命,使其成为人们生活中的常态绿色食品<sup>[14]</sup>。近年随着组织工程技术、先进制造技术和大数据分析等技术的发展,也为培养肉行业发展带来新的契机。尤其在中国市场,受国内猪肉产能不足

等因素影响,2020年肉类进口量为991万吨<sup>[15]</sup>,因此我国细胞培养肉市场的发展空间巨大,发展细胞培养肉也对优化我国农业的综合利用率、促进肉类产品多元化、提升国人身体素质具有重要意义。

自2013年全球第一个人造牛肉汉堡公开试吃后,国内外已涌现出一批致力于细胞培养肉研发的公司,并取得了一系列突破性进展。如2019年3月,日本著名食品企业日清食品控股公司与东京大学合作,通过培养牛肌肉干细胞成功生产出约1 cm<sup>3</sup>的肌肉组织<sup>[16]</sup>。2019年11月,南京农业大学周光宏教授团队<sup>[17]</sup>通过培养猪肌肉干细胞20 d后,获得了中国第一块细胞培养肉。2021年8月,日本大阪大学研究团队<sup>[18]</sup>结合细胞培养和3D打印技术构建3种牛细胞纤维,成功制作出直径5 mm、长度10 mm的牛排。2020年,美国初创企业Eat Just公司的细胞培养鸡肉产品在新加坡获批上市,且该产品已在约1880家餐厅中使用,极大促进了细胞培养肉市场的发展。2021年6月,以色列食品公司Future Meat建立了世界上第一个工业细胞培养肉设施,并且开始商业化生产细胞培养肉<sup>[19]</sup>。现阶段,我国关于细胞培养肉的专利相对较少,但近年越来越多的公司和研究者加入细胞培养肉开发的行列。

## 2 细胞培养肉生产流程

根据肌肉细胞的发育生物学过程,通过细胞系或从动物身上提取原代干细胞,扩增后结合生物材料分化成肌肉细胞,然后融合形成肌管并进一步形成肌肉纤维就可以制造出培养肉。因此常规细胞培养肉的生产流程包括种子细胞分离、细胞大规模培养和细胞成肌分化几个阶段(图1)<sup>[20]</sup>。

### 2.1 种子细胞的分离

细胞培养肉生产的首要任务是选择并分离合适的种子细胞。理想的细胞培养肉种子细胞应该具备以下条件:易于获取,能在体外持续增殖,并有较高的肌肉分化效率。目前常用的种子细胞

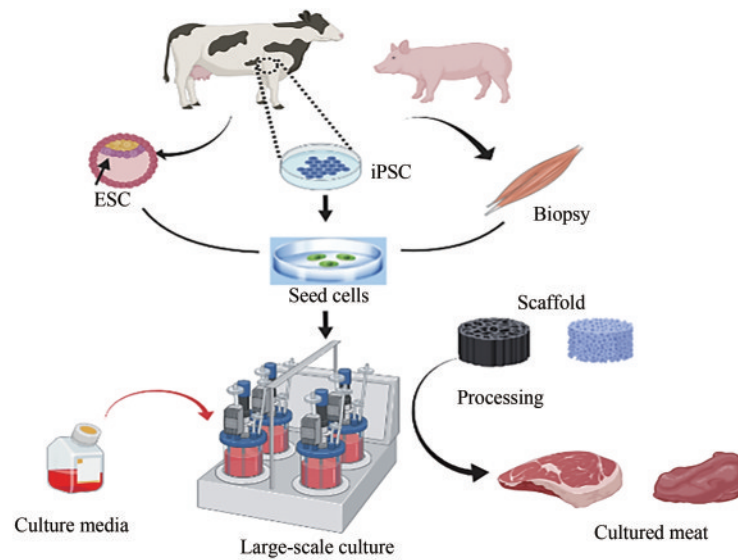


图1 细胞培养肉生产流程

Fig. 1 Production flow chart of cultured meat.

主要包括细胞系或原代细胞。细胞系一般指可连续传代的细胞，常通过基因工程或化学方法诱导细胞基因突变，使其具有无限增殖能力<sup>[21]</sup>。虽然基因改造可以提高细胞增殖能力，减少对组织样本的依赖。但细胞系遗传和表型的不稳定性等问题还需解决，并且在食品领域基因修饰细胞的使用也存在较大争议，在欧盟国家更是完全被禁止<sup>[22]</sup>。原代细胞通常是干细胞，包括胚胎干细胞、诱导多能干细胞和肌肉干细胞（也称肌卫星细胞）等，其中从肌肉组织中提取的肌卫星细胞应用最多。

肌卫星细胞位于肌纤维膜和基底膜之间，由于位置特殊，使得其很难从肌肉组织中分离出来，容易掺杂其他细胞，如成纤维细胞、内皮细胞和血细胞等。与医学研究中对细胞的纯度、代数等要求严苛不同，细胞培养肉作为一种食品而非医疗产品，其对细胞的纯度要求不像生物医学应用所需的那么高。目前常用的肌卫星细胞原代分离方法主要有3种：酶消化法、组织块法和单根肌纤维分离法。酶消化法，通常借助单一或混合的胶原酶、中性蛋白酶和蛋白酶K等消化酶对剪碎的肌肉组织进行消化，去除细胞外基质获得肌卫星细胞<sup>[23]</sup>。为了提高组织消化效率，酶消化法常需用多种酶混合作用，容易造成对细胞的损伤<sup>[24]</sup>。组织块法，通常是把肌肉剪成约1 mm<sup>3</sup>大小的组织块后将其贴附于培养皿底部，加入少量培养基后置于细胞培养箱中，几天后肌卫星细胞便会从组织块边缘爬出。此

种方法对材料和试剂要求低，成本低，但相对耗时，得到的细胞量较少，纯度相对较高。改良的组织块法则首先用酶消化肌肉得到分散的肌纤维后，再将肌纤维进行贴壁培养，几天后肌卫星细胞便会从肌纤维里爬出，此法相对更高效省时。单肌纤维分离法是1977年由Bekoff和Betz提出来的基于肌卫星细胞的自发迁移特性分离肌卫星细胞的方法<sup>[25]</sup>，此方法优势在于可以清楚观察卫星细胞自肌纤维中迁移、增殖的过程<sup>[26-27]</sup>。此法一般将肌肉组织剪成约1 cm<sup>2</sup>的小块后，利用胶原酶消化分离完整的单根肌纤维，而后将单根肌纤维贴附于培养皿底部待细胞从纤维中爬出并由圆形变为梭形开始大量增殖后，移除单根肌纤维，继续培养最终获得足量肌卫星细胞。

然而，无论以上哪种方法，都很难分离得到较纯的肌卫星细胞。早期研究常借助Percoll密度梯度离心法纯化肌卫星细胞，虽然在一定程度上可以实现肌卫星细胞的富集，但此方法体系的重复性和分离的细胞纯度仍存在较大的不稳定性<sup>[28]</sup>。与之相比，磁珠分选或者流式细胞分选则是根据肌卫星细胞特有的表面标志物将其从一群混合细胞中进行分离纯化，得到的细胞相对纯度较高，但成本也较高。此类方法的有效和可靠性很大程度上依赖于肌卫星细胞的表面标志物的发现和鉴定，比如人、猪和牛的心肌干细胞一般通过CD56、CD29阳性和CD31、CD45阴性组合进行富集分

选<sup>[29]</sup>。然而目前有许多种属动物的肌卫星细胞标志物尚待明确,而且抗体和磁珠价格昂贵,它们的使用对于规模化的细胞培养肉生产而言会导致成本显著增加。未来开发更经济有效的肌卫星细胞分离技术,制定特异性的分离条件,选择性地促进肌卫星细胞生长或者选择性地抑制其他类型的细胞生长将为细胞培养肉规模化生产提供坚实基础。

## 2.2 细胞大规模培养

细胞培养肉的生产需要大量分化的肌肉细胞来形成组织。因此,细胞大规模扩增是细胞培养肉商业化面临的重大挑战。发展高效、安全、规模化的细胞大规模扩增体系,有效降低细胞培养肉的生产成本显得尤为重要<sup>[30]</sup>。肌卫星细胞体外扩增培养需要同时维持细胞的增殖能力和肌肉分化能力,然而由于体外培养环境和体内生理环境存在差异,干细胞体外扩增过程中会出现细胞增殖能力减弱甚至衰老的现象。研究显示,即使在适宜的体外环境,经过三次传代培养Pax7阳性的肌卫星细胞也会从刚分离的接近100%迅速降低到只有30%~50%<sup>[31]</sup>。目前,研究人员已经开发了一系列小分子和合适细胞外基质环境等促进肌卫星细胞体外扩增表型维持。比如Xu等<sup>[32]</sup>通过筛选2400种化合物小分子,发现腺苷酸环化酶激活剂forskolin可通过提高环磷酸腺苷(cAMP)水平促进肌卫星细胞的增殖。Ding等<sup>[33]</sup>发现在牛肌卫星细胞体外增殖的过程中使用p38抑制剂(SB203580),可以提高牛肌卫星细胞增殖能力和PAX7表达,而且解除抑制后肌卫星细胞分化成肌肉细胞的能力也有改善。Judson等<sup>[34]</sup>还发现通过使用组蛋白甲基转移酶抑制剂(PFI-2)可以促进 $\beta$ -catenin入核并促进肌肉相关基因表达,维持人肌卫星细胞体外培养表型。此外,通过模拟肌肉生理的组织硬度,将肌卫星细胞培养在硬度合适的基质或水凝胶里也能显著增强肌卫星细胞的增殖活性并保持扩增过程中肌卫星细胞的表型<sup>[35-36]</sup>。

细胞大规模培养除了需要促进细胞增殖和维持表型外,采用低成本和安全的培养基也至关重要<sup>[37]</sup>。细胞培养常用培养基中都含有血清,而血

清售价极高,且其中的动物源成分复杂未知,批次间差异大,有病毒感染风险和监管难度大等问题,因此不适用于细胞培养肉的生产应用。无血清培养体系组分清晰明确、易于分离以及质控更为安全可靠,开发无动物源成分的培养基是保证细胞扩大培养过程可控的有效途径<sup>[38]</sup>。目前已有针对胚胎干细胞和间充质干细胞的无血清培养基<sup>[39-40]</sup>。针对如何开发无血清培养基,van der Valk等<sup>[41]</sup>曾提出了“金字塔”模型。在这个模型中,从底部往顶部分别包括基础培养基、基质包被的培养皿、生长因子、激素类物质、 $\beta$ -巯基乙醇、脂类和维生素等。底部一般是通用性强的成分,越往金字塔顶部,其作为无血清培养基成分的特异性越高。目前针对肌卫星细胞的无血清培养基的开发也提示适当浓度的睾酮激素和类胰岛素生长因子可以促进成肌细胞增殖<sup>[42-43]</sup>。有研究报道在F-12培养基中添加胎球蛋白、胰岛素和地塞米松后构建的无血清培养基对肌卫星细胞的增殖作用能够达到与传统10%马血清培养基相似的效果<sup>[44]</sup>。但对于细胞培养肉而言,使用无动物源的添加成分,并且将小鼠和人的无血清培养体系应用到畜禽动物细胞上,并进一步优化到食品生产领域,仍是巨大的挑战。最为理想的细胞培养肉培养基应该是无动物源、符合食品安全要求、满足成本效益、供应链稳定可靠且能保证细胞扩增性能维持、符合监管要求。

规模化生产中,除了需要提供合适的细胞培养环境和培养基外,生物反应器作为动物细胞大规模高密度培养的平台,也是细胞培养肉种子细胞扩增规模化、自动化必不可少的设备。传统二维培养因其比表面积较低,不能对培养条件进行实时监测,传代过程烦琐等一系列不足不适合用于细胞的扩大培养。生物反应器可以根据细胞的生长特性,模仿天然组织结构的生长环境,实时监控细胞状态,实现体外细胞规模化扩增。近年随着工程技术的发展,动物细胞培养的生物反应器种类越来越多,如搅拌式、鼓泡式、气升式,以及动物组织培养最常使用的三维支架+灌注式等<sup>[45]</sup>。搅拌式生物反应器因其结构简单、易于操作,是目前应用最广泛的一种生物反应器,但反应器内部流体的混合、剪切应力容易造成细胞早

衰或死亡<sup>[46]</sup>。减小灌流速度可以降低剪切力对细胞的损害，但也容易造成反应器内温度、pH和溶氧不均一，影响营养物质传输，并造成代谢废物局部累积<sup>[46]</sup>，因此不是最佳的细胞扩增系统。由于肌卫星细胞本身的贴壁生长特性，在利用生物反应器进行扩大培养时可结合三维支架或微载体。利用支架或载体表面积大、细胞承载量高、成本相对低廉等特点，与生物反应器联合应用，制造出填充床式细胞生物反应器，实现动物细胞的高密度培养<sup>[47]</sup>。填充床式细胞生物反应器的优点是对细胞剪切力小、细胞截留效率高，但在进行规模化放大时，由于载体被积压填入篮框内，使载体和细胞的分离困难，也不便中间取样观察，因此在实现工业化生产时仍有很多问题尚待解决<sup>[48]</sup>。有关生物材料用于细胞扩增相关内容，下文将更详细介绍。未来用于肌卫星细胞扩增的生物反应器需要具备自动化诱导培养、扩增、成像、下游分化等功能，提供细胞扩增时的过程数据、代谢变化、蛋白组数据等，在降低干细胞生产成本的同时提高细胞质量，尤其开发低剪切力、混合效率高的反应器也是重点之一。

### 2.3 细胞成肌分化

获得足够数量的种子细胞后，如何模拟动物肌肉组织生长环境，促进干细胞肌肉系分化，培养出复杂的肌肉组织是现阶段细胞培养肉生产的另一个挑战。一般来说，用低浓度的马血清培养肌卫星细胞可以促进其向肌肉细胞分化，但制备细胞培养肉则需要建立更经济有效且符合食品要求的肌肉分化体系。为了更好模拟真实肉类的组成，人们也尝试将肉类中含有的多种细胞（如脂肪细胞）共培养，因为脂肪含量对肉类的口感、风味、嫩度和紧实度等都有影响<sup>[49]</sup>。此外，某些特定的细胞因子也对干细胞的肌肉系分化起非常重要的作用。比如通过IGF-1配制的无血清分化培养基，可以通过PI3K/Akt信号通路促进干细胞体外肌肉系分化<sup>[43]</sup>。鸢尾素可以通过激活IL-6促进成肌细胞分化和肌管融合<sup>[50]</sup>。机械拉力和电刺激也能促进肌细胞分

化和肌管成熟<sup>[51]</sup>。而细胞培养肉生产的最终目标是在体外培养出与真实肌肉组织相同的肌肉组织，近年，随着组织工程的发展，为探索干细胞分化形成大块肌肉组织提供了有效手段<sup>[52]</sup>。通过模拟肌肉体内发育和生长环境，将种子细胞接种到能提供三维环境的支架材料上，使其生长、分化、发育成肌肉细胞，再通过肌肉细胞间的融合形成多核肌管，多核肌管进一步分化为肌纤维，就能得到类似肌肉形态和生理特征的人造肌肉组织<sup>[53]</sup>。

## 3 用于细胞培养肉生物材料支架的技术要求

从材料学的视角，肉是一种多组分、多层次结构、各向异性的复杂生物材料。因此从仿生学角度，借助生物支架开发形态结构与质地组织接近真实肉类的高质量细胞培养肉将是生产细胞培养肉的最佳选择。开发食品安全级、能降解、多孔隙的非动物来源或动物源的生物材料支架，是优化细胞培养肉形态结构和口感质地的关键<sup>[54]</sup>。目前，用于细胞培养肉生产的支架材料根据其成分的可食用性分为不可食用和可食用支架。不可食用支架的材料一般是具有特殊功能特性的生物材料，可促进细胞的增殖分化和蛋白合成等，但在细胞分化培养完成后需要与培养肉进行分离。而不可食用支架尚存在回收困难、成本高、稳定性不足等问题。可食用支架的组成一般是一些天然材料，具有可食用性，培养后无需去除，所以是目前细胞培养肉支架的研究热点。理想的细胞培养肉生物支架应具有合适的比表面积，为细胞提供足够的黏附和生长空间。具有类似肌肉生理状态下的平行拓扑结构，能辅助形成细胞组织纹理及微观结构，维持肌肉组织三维结构。由于肌肉细胞生理情况下具有自发收缩的特性，因此，支架材料应有一定的力学性能，可机械拉伸，能够在外界拉力的调控下为细胞分化提供适当力学刺激。此外，为了保证支架内的细胞有足够营养和氧气供给，支架需要疏松多孔，确保

培养基和氧气渗透。为了实现细胞培养肉的商业化生产，支架材料还要易获得，且成本低。

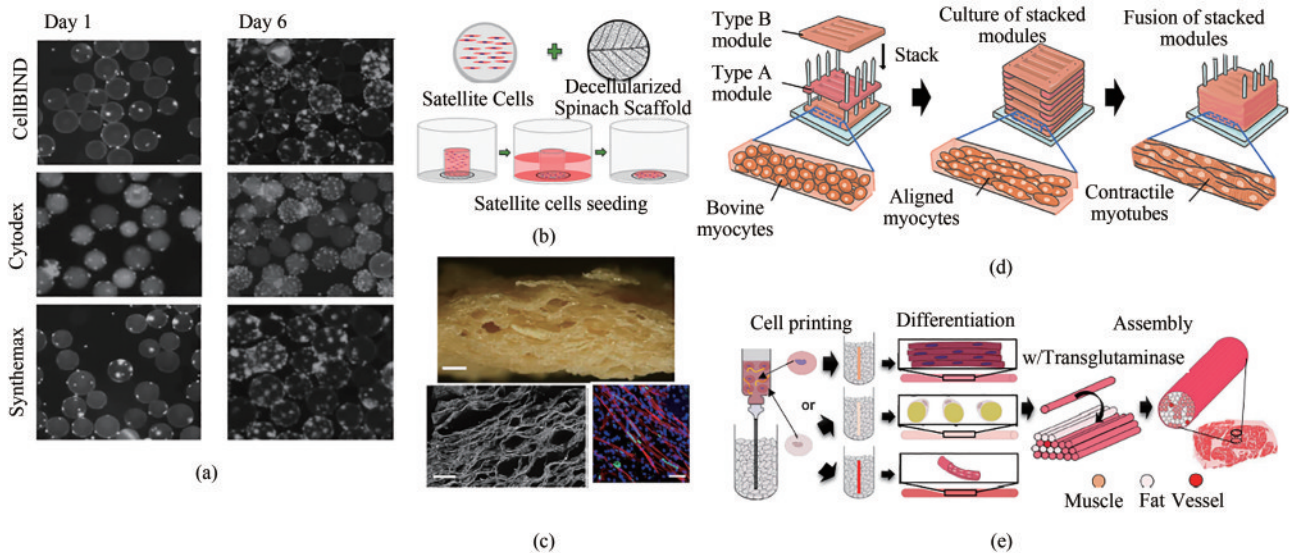
## 4 用于细胞培养肉的生物材料支架分类

肌卫星细胞和其他被用于细胞培养肉种子细胞都属贴壁细胞。生物支架能为种子细胞的黏附、增殖和分化提供空间结构，实现肌肉组织三维培养和制造，因此生物支架对具有组织结构的细胞培养肉产品（如肉排和肉块）的生产至关重要<sup>[55]</sup>。从形式分类，目前适用于细胞培养的生物支架主要包括微载体、多孔支架和水凝胶3类。

### 4.1 微载体

微载体是直径在60~250 μm的微球，早在20世纪60年代，van Wezel等<sup>[56]</sup>率先将贴壁细胞培养于DEAE-Sephadex A 50微球上。相较于传统单层细胞培养技术，微载体为贴壁细胞提供了更大的培养表面积，使细胞产量大大增加。多种类型微载体已被成功开发，并被用于包括成纤维细胞、

间充质干细胞、胚胎干细胞和诱导多能干细胞等不同类型的扩大培养。目前商业化微载体主要由各类天然和合成高分子制得，如葡聚糖（Cytodex 1/3）、明胶（Cultispher）、纤维素（Cytopore）、聚乙烯（Cytoline）、聚苯乙烯（Synthemax II、SoloHill、Hillex），以上微载体多应用于疫苗/药物开发和生物医用领域，且大部分高分子不可食用或来源于动物组织<sup>[57]</sup>。微载体可作为肌肉细胞黏附和增殖的临时性基质，虽然上述商业化微载体在不考虑成本的情况下可用于细胞培养肉产业，但需其能与处于不同加工阶段的肌肉细胞分离，在这种情况下微载体基质可为非食用型高分子。若微载体和细胞的分离有较大困难或分离成本过高，则需微载体在培养肉生物加工过程中能被降解或溶解，也可直接将含细胞微载体加工进入培养肉内，这种情况下需其具有可食用性<sup>[58]</sup>。荷兰马斯特里赫特大学的Post教授课题组<sup>[59]</sup>证实原代提取的牛成肌细胞可在3种微载体扩大培养，为商业化牛肉细胞培养奠定一定基础，但依赖酶消化技术将细胞和微载体分离价格昂贵，很难在利润空间有限的细胞培养肉行业推广[图2(a)]。Modern Meadow公司设计了基于果



**图2** (a) 成肌细胞在三种商业化微载体上的生长情况；(b) 脱细胞菠菜叶支架用于肌肉干细胞培养<sup>[60]</sup>；(c) 商业化大豆组织蛋白结构及肌肉细胞黏附<sup>[61]</sup>；(d) 凝胶纤维束结合电刺激制备具有高度整齐排列肌管的肌肉组织<sup>[62]</sup>；(e) 水凝胶结合悬浮生物打印技术成功组装人工牛排<sup>[18]</sup>

**Fig. 2** (a) Myoblasts seeded on three commercial microcarriers; (b) Decellularized spinach leaf scaffold for satellite cell culture<sup>[60]</sup>; (c) Structure of commercial textured soy protein scaffold and muscle cell adhesion<sup>[61]</sup>; (d) Fabrication of muscle tissues with highly aligned myotubes using hydrogel fiber together with electrical stimulation method<sup>[62]</sup>; (e) Hydrogel combining with suspension bioprinting technology successfully assembles artificial steak<sup>[18]</sup>

胶和卡豆素 A 的一种可食用型微载体，该公司致力于为生物医药和细胞培养肉领域提供非动物源性生物支架材料<sup>[63]</sup>。

## 4.2 多孔支架

多孔支架是指具有互相连通的微米级孔状结构生物材料，又称海绵支架，支架的多孔结构提供细胞黏附和增殖的空间，又能及时运输细胞生长所需养料和代谢废物<sup>[64]</sup>。多孔支架能提供种子细胞所需的力学支撑，为肌肉组织制造和细胞外基质沉积提供场所<sup>[65]</sup>。可食用的脱细胞菠菜叶多孔支架具有独特的微血管样结构，已被用于原代牛肌卫星细胞培养，14 d 的培养结果显示肌卫星细胞的存活率可达 99%，其中 25% 的细胞可表达肌球蛋白重链，以上结果表明菠菜叶脱细胞可作为细胞培养肉用三维支架，且具有成本低易获取等优点<sup>[60]</sup> [图 2(b)]。以色列理工学院的 Levenberg 教授课题组<sup>[61]</sup>以商业化大豆组织蛋白（一种大豆榨油剩下的脱脂油渣加工成型的产品），作为细胞培养肉多孔支架，可通过改变植物蛋白组分和加工工艺调控支架孔径、营养成分、质地和弹性性能以满足培养肉要求 [图 2(c)]。牛肌卫星细胞能在该支架上黏附和增殖，并可通过调控细胞培养基成分以及利用细胞共培养技术促进肌肉发生和细胞外基质的快速沉积。最近，渥太华大学的 Pelling 教授课题组<sup>[66]</sup>制备了一种多孔面包瓢支架材料，该面包支架在 4 周的细胞培养过程中结构完成，多种细胞可在该支架上黏附和增殖，无细胞毒性，细胞无显著氧化应激反应。此外，小鼠成肌细胞（C2C12）可在面包支架上分化，并逐步融合成肌肉纤维，说明面包支架具有用于细胞培养肉的巨大潜力，由于面包支架制备过程未使用酵母，可有效避免外源杂细胞对培养肉的污染。

## 4.3 水凝胶

水凝胶是亲水性高分子通过物理或/和化学交联形成的一种三维网络生物材料<sup>[67]</sup>。大部分肌肉组织细胞都存在于细胞外基质（ECM），水凝胶结构和 ECM 高度相似，因此水凝胶是一种非常理想的细胞培养肉支架材料。用于细胞培养的水凝胶

材料需具有良好的细胞相容性，且培养基中营养物质和信号分子可渗透过水凝胶到达细胞，可通过调节高分子浓度、活性交联点数量、交联方式等调节水凝胶的渗透动力学<sup>[68-70]</sup>。除以上水凝胶理化特点外，水凝胶的力学性能如刚度对细胞黏度、迁移、增殖和分化影响巨大，在设计细胞培养肉水凝胶支架时也需重点考虑<sup>[71-72]</sup>。东京大学 Takeuchi 教授课题组<sup>[62]</sup>将原代提取的牛肌细胞种植于胶原或 fibrin-matrigel 凝胶纤维束中结合电刺激进行 14 d 细胞培养，成功制备出具有长轴方向排列肌小管的三维培养肉，这是科学家第一次成功培育出具有高度整齐排列肌管的肌肉组织 [图 2(d)]。大阪大学科学家 Kang 等<sup>[18]</sup>使用肌腱凝胶结合悬浮生物打印技术成功制备了包括 42 根肌肉纤维、28 根脂肪组织、2 根毛细血管的牛排状肉组织，免疫组织染色结果显示该培养肉中肌纤有序排列 [图 2(e)]。

## 5 细胞培养肉用高分子材料

用于细胞培养肉的微载体、多孔材料和水凝胶等生物支架的主体结构为天然或合成高分子。与用于生物医药的生物支架要求相比，用于细胞农业的高分子需具有良好的细胞相容性、可食用性、易加工、可烹饪、成本低、可大规模生出等特点。在这一部分着重介绍能在细胞培养肉中能被使用的高分子原材料。

### 5.1 蛋白类高分子

胶原是一种是存在于动物结缔组织中的天然蛋白高分子，是 ECM 的主要组成成分，具有很强的伸展能力，已经在组织工程领域广泛应用，并被证实能促进肌肉细胞迁移、增殖和成肌分化<sup>[73]</sup>。大量文献证实胶原支架可用于生物人工肌肉的制备，并能实现肌肉收缩，而在合成高分子支架上则很难实现这一功能<sup>[10, 74-77]</sup>。因此，胶原蛋白可用于在实验室阶段细胞培养肉的前期研发，但胶原蛋白需从动物体内提取，在细胞培养肉大规模商业化阶段则被限制使用。最近，明胶（胶原蛋白水解产物）也被用于制备细胞培养肉，通过挤出-

交联成型技术制备明胶纤维，并将牛大动脉平滑肌细胞和兔骨骼肌成纤维细胞种植其上，虽然能重建部分肌肉组织形态，但缺乏成熟可收缩肌肉结构<sup>[78]</sup>。Jiang等<sup>[79]</sup>开发了一种无毒交联技术，制备了玉米朊纺丝纳米纤维支架，其能为成纤维细胞黏附和生长提供支持。

植物蛋白由于其价格低、易获取、易加工性等优点，将会成为细胞培养肉支架材料的重要来源。目前能被加工成生物支架的植物蛋白主要包括大豆蛋白和玉米朊。大豆蛋白具有较高的细胞相容性以及和ECM基质类似的生化特性，被用于细胞培养肉开发。前述Levenberg教授课题组即利用大豆蛋白材料制备可食用可烹饪的人造牛肉<sup>[61]</sup>。玉米朊是一种可溶于乙醇的植物蛋白，具有良好的细胞相容性，可被加工成多种类型的生物支架。Qu等<sup>[80]</sup>发现玉米朊多孔支架能促进人间充质干细胞的黏附、增殖以及成体外骨分化。以上研究都充分说明，玉米朊是一种非常有潜力的可用于细胞培养肉的高分子材料。植物源蛋白高分子通常缺乏足够的力学强度且易降解，可通过在加工过程中使用无毒交联剂或者向其中复合刚性强、降解时间长的其他高分子<sup>[81]</sup>。

## 5.2 多糖类高分子

多糖是由多个单糖分子脱水聚合形成的高分

子，以糖苷键连接而成，结构多为直链或者有分支的长链，可从动物、植物和微生物中提取获得。具有良好细胞相容性且已在组织工程大量应用的多糖分子主要包括糖胺聚糖、壳聚糖、海藻酸、纤维素等。在再生医学领域，透明质酸（一种可从细菌发酵获取的糖胺聚糖）已经开发成多种水凝胶支架，用于促进组织修复和包裹动物干细胞<sup>[82]</sup>。透明质酸分子缺乏和绝大多数动物细胞黏附受体，难以用于肌肉细胞的扩大培养，但可作为辅料用于细胞培养肉的后期加工。壳聚糖是一种从虾壳和螃蟹壳中获取的线性多糖，结构为氨基葡萄糖（脱乙酰单位）和N-乙酰葡萄糖胺（乙酰单位）随机分布，并通过 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)糖苷键组合而成。利用壳聚糖和胶原经电喷雾技术制备复合水凝胶微载体，C2C12细胞可在其上黏附并快速生长，由于壳聚糖/胶原微球具有可食性，可将载有细胞的微载体进行加工制成人造肉产品<sup>[83]</sup>。Park等<sup>[84]</sup>使用壳聚糖基多孔纳米纤维膜支架给C2C12细胞递送藻蓝素，可有效减少细胞培养肉制备中培养基中血清的使用，可大幅降低生产成本，为实现细胞培养的工业化奠定基础。从海藻中提取的海藻酸是一种自然界中含量巨大的可再生多糖高分子，当在二价阳离子（如 $\text{Ca}^{2+}$ ）存在下迅速形成物理交联凝胶。因为该凝胶是在非冷冻的低温条件下成形的，因此海藻酸尤其适用于烘肉卷、肉丸以及海鲜刺身的生产加工，且食品级海藻酸

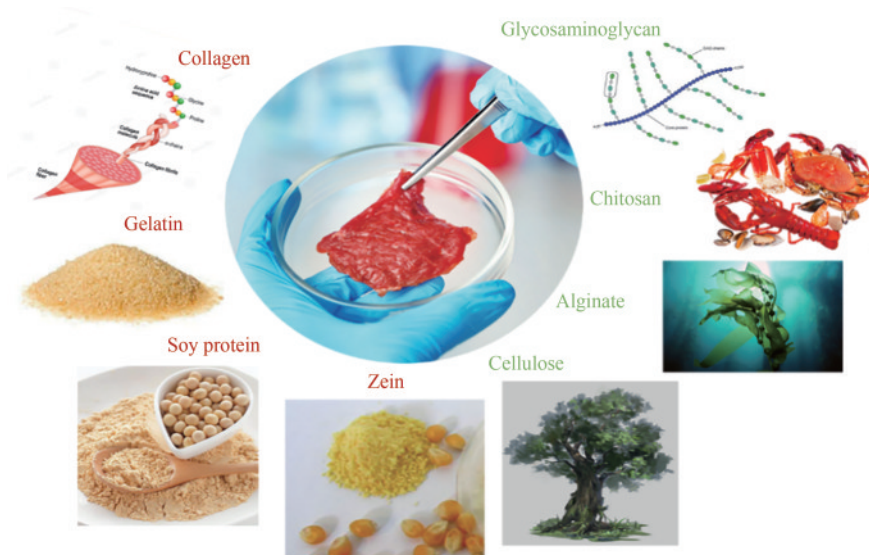


图3 细胞培养肉用高分子材料

Fig. 3 Polymer materials for cell culture meat

每公斤约10美元,满足细胞培养肉中生物材料的低成本要求<sup>[85]</sup>。Schuster等<sup>[86]</sup>制备了一种具有毛细管结构的海藻酸凝胶支架材料,可引导C2C12细胞的取向排列生长。纤维素是一种线性多糖,被认为是最可持续的高分子,来自于植物细胞壁,修饰和未修饰的纤维素支架被应用于细胞培养<sup>[87-88]</sup>。利用纤维素制备的商业化微载体材料(Cytopore)被用于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的扩大培养,在疫苗生产中已得到广泛使用,在肌肉细胞悬浮培养体系中可借用这一技术实现培养肉快速获得。Dugan等<sup>[89]</sup>通过硫酸水解法制备纤维素纳米晶须,利用旋转涂抹技术制备纳米晶须表面,并将C2C12细胞种植于纳米纤维素表面,结果显示细胞黏附于纤维素材料表面,取向纳米晶须表面可促进成肌分化。

## 6 细胞培养肉用生物支架的工程化设计

大规模哺乳动物细胞培养技术已在生物医药和细胞治疗领域得到应用,细胞培养肉面临着真正制造一块肌肉组织而不是一团细胞浆糊的挑战,在这一部分将重点讨论细胞培养用生物支架的设计与工程化制备思路,以期制造结构仿真的细胞培养肉。

### 6.1 细胞黏附

有些支架材料高分子具有天然的细胞黏附功能,例如胶原和明胶等。相反,另外一些高分子材料如糖胺聚糖、海藻酸、纤维素等则需通过理化修饰实现细胞黏附功能。最常用的促细胞黏附策略是在高分子材料上物理或者化学结合细胞黏附基序,以使细胞膜相关蛋白能识别高分子并黏附于其上。精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列是应用最广泛的细胞黏附单元,能与细胞膜上整合素蛋白 $\alpha V\beta 3$ 结合。修饰有RGD序列海藻酸水凝胶能促进C2C12细胞在支架上的黏附<sup>[90]</sup>。Chandler等<sup>[91]</sup>使用3T3-L1前体脂肪细胞证实,与对照组相比,修饰有RGD序列的海藻酸支架材料能增加平均细胞数量以及总细胞区域。RGD序列还可结合纤维素结合区域(CBD)用以增加特定

支架材料功能,例如,CBD-RGD复合物当加入到细菌纤维支架上后能增加人微血管内皮细胞和小鼠胚胎成纤维细胞的黏附和活性<sup>[92]</sup>。以上CBD序列可在参与纤维素降解和暴露纤维素底物催化基序的植物酶复合物中发现,通过将结构域与哺乳动物细胞黏附基序相结合,可用于改善植物源生物支架的功能。纤连蛋白结构域脯氨酸-组氨酸-丝氨酸-精氨酸-天冬酰胺序列(PHSRN)也被证明可以改善支架材料的黏合性能<sup>[93]</sup>。此外,使用层粘连蛋白衍生结构域,异亮氨酸-赖氨酸-缬氨酸-丙氨酸-缬氨酸序列(IKVAV)修饰透明质酸水凝胶材料,可促进小鼠肌原性祖细胞黏附及上调肌因子MyoD1和Pax7的表达<sup>[94]</sup>。

### 6.2 线性排列

体内的肌肉纤维通常以规则线性排列的模式存在,这种排列有助于肉的独特质地形成。除了纤维排列对肉纹理感知的直接影响外,排列还能影响肌肉细胞分化、成熟和基因表达。使用各向异性的三维支架或二维基底诱导肌纤维排列最为常见<sup>[95]</sup>。在肌肉组织工程领域,可通过各向异性生物材料诱导肌肉细胞线性排列,例如使用静电纺丝制备的取向纳米纤维可诱导肌肉细胞线性排列<sup>[96]</sup>。与随机取向的静电纺丝纤维相比,在取向排列的纤维支架上培养的肌肉细胞的肌管不仅能沿纤维方向排列,而且在分化培养基中形成肌管的长度也增加1倍<sup>[97]</sup>。支架纤维的长度对肌细胞排列至关重要,短(约20  $\mu\text{m}$ )纤维促进细胞的球形聚集,而较长(约1 cm)的纤维能够产生排列良好的组织<sup>[78]</sup>。和肌肉组织工程类似,在设计细胞培养肉用生物支架时需考虑生物支架的线性排列特点,但静电纺丝技术价格昂贵,且效率低,无法满足培养肉大规模生产要求。取向冷冻技术可大规模快速制备各向异性生物材料,值得科学家进行深入研究<sup>[98]</sup>。

## 7 展望

虽然动物来源肉类的生产经过几千年发展已基本能满足人们需求,但为消除畜牧业生产对环

境造成的污染,细胞培养肉的研发和生产仍越来越受到科研人员、企业家和政府部门的关注。本文从细胞培养肉技术出发,重点综述细胞培养肉的发展历程,细胞培养肉生产流程,可用于培养肉的生物材料支架的特点、类型、高分子材料以及工程化制备方法等内容。相较于组织工程支架,细胞培养肉支架的成本控制以及可食用性要求将被重点考虑,是细胞培养肉能否产业化的关键因素之一。利用微载体的超高比表面积可大规模培养种子细胞;多孔支架在模拟肌肉组织各向异性结构特点中起关键作用,能促进种子细胞向肌纤维分化;水凝胶具有和ECM相似的结构,可结合外界刺激和3D打印等技术构建肌肉组织的复杂结构。细胞培养肉产业最终目标是摆脱利用家畜制备肉类现状,利用可持续策略为人类提供优质替代蛋白,因此家畜来源的高分子如胶原和明胶制备的生物材料支架需要谨慎使用,未来科学家应重点开发基于植物源高分子(大豆蛋白、玉米蛋白、海藻酸、纤维素等)的生物材料支架。此外,结构仿真、营养可控和口感真实的细胞培养肉是该领域技术难点之一,组建跨材料、化学、细胞生物学、畜牧学和营养科学的多学科联合攻关团队有望解决以上挑战。

### 参 考 文 献

- [1] RUBIO N R, XIANG N, KAPLAN D L. Plant-based and cell-based approaches to meat production[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 6276.
- [2] BENJAMINSON M A, GILCHRIST J A, LORENZ M. *In vitro* edible muscle protein production system (MPPS): stage 1, fish[J]. *Acta Astronautica*, 2002, 51(12): 879-889.
- [3] CAPPER J L. The environmental impact of beef production in the United States: 1977 compared with 2007[J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(12): 4249-4261.
- [4] GODFRAY H C J, AVEYARD P, GARNETT T, et al. Meat consumption, health, and the environment[J]. *Science*, 2018, 361(6399): eaam5324.
- [5] GERBER P J, STEINFELD H, HENDERSON B. Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities[M]. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, 2013: 24-36.
- [6] TONSOR G T, OLYNK N J. Impacts of animal well-being and welfare media on meat demand[J]. *Journal of Agricultural Economics*, 2011, 62(1): 59-72.
- [7] JONES B A, GRACE D, KOCK R, et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(21): 8399-8404.
- [8] LARSSON S C, WOLK A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies[J]. *International Journal of Cancer*, 2006, 119(11): 2657-2664.
- [9] WOLK A. Potential health hazards of eating red meat[J]. *Journal of Internal Medicine*, 2017, 281(2): 106-122.
- [10] POST M J. Cultured meat from stem cells: challenges and prospects[J]. *Meat Science*, 2012, 92(3): 297-301.
- [11] TILMAN D, CLARK M, WILLIAMS D R, et al. Future threats to biodiversity and pathways to their prevention[J]. *Nature*, 2017, 546(7656): 73-81.
- [12] POST M J. Cultured beef: medical technology to produce food[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94(6): 1039-1041.
- [13] GAYDHANE M K, MAHANTA U, SHARMA C S, et al. Cultured meat: state of the art and future[J]. *Biomufacturing Reviews*, 2018, 3(1): 1-10.
- [14] DATAR I, BETTI M. Possibilities for an *in vitro* meat production system[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010, 11(1): 13-22.
- [15] 韩亮, 万俊毅. 人造肉对传统肉的可替代性:回顾与展望[J]. *新疆农垦经济*, 2021(12): 74-83.
- [15] HAN L, WAN J Y. The substitution of artificial meat for traditional meat: review and prospect[J]. *Xinjiang State Farms Economy*, 2021(12): 74-83.
- [16] 赵鑫锐, 王志新, 邓宇, 等. 人造肉生产技术相关专利分析[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(5): 299-305.
- [16] ZHAO X R, WANG Z X, DENG Y, et al. The analysis of patents related to the production of artificial meat[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(5): 299-305.
- [17] 周光宏, 丁世杰, 徐幸莲. 培养肉的研究进展与挑战[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(5): 1-11.
- [17] ZHOU G H, DING S J, XU X L. Progress and challenges in cultured meat[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(5): 1-11.
- [18] KANG D H, LOUIS F, LIU H, et al. Engineered whole cut meat-like tissue by the assembly of cell fibers using tendon-gel integrated bioprinting[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5059.
- [19] 李玉娟, 傅雄飞, 杜立. 细胞培养肉商业化的法律规范与监管:外国经验及对我国启示[J]. *合成生物学*, 2022, 3(1): 209-223.
- [19] LI Y J, FU X F, DU L. Regulating the commercialization of cell-cultured meat: practices in selected jurisdictions and their implications for China[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(1): 209-223.
- [20] GUAN X, ZHOU J W, DU G C, et al. Bioprocessing technolo-

- gy of muscle stem cells: implications for cultured meat[J]. Trends in Biotechnology, 2022, 40(6): 721-734.
- [21] RAMBOER E, DE CRAENE B, DE KOCK J, et al. Strategies for immortalization of primary hepatocytes[J]. Journal of Hepatology, 2014, 61(4): 925-943.
- [22] GERAGHTY R J, CAPES-DAVIS A, DAVIS J M, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research[J]. British Journal of Cancer, 2014, 111(6): 1021-1046.
- [23] CHOI K H, YOON J W, KIM M, et al. Muscle stem cell isolation and *in vitro* culture for meat production: a methodological review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(1): 429-457.
- [24] ISHII K, SUZUKI N, MABUCHI Y, et al. Technical advantage of recombinant collagenase for isolation of muscle stem cells[J]. Regenerative Therapy, 2017, 7: 1-7.
- [25] BEKOFF A, BETZ W. Properties of isolated adult rat muscle fibres maintained in tissue culture[J]. The Journal of Physiology, 1977, 271(2): 537-547.
- [26] PASUT A, JONES A E, RUDNICKI M A. Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle[J]. Journal of Visualized Experiments, 2013(73): e50074.
- [27] DI FOGGIA V, ROBSON L. Isolation of satellite cells from single muscle fibers from young, aged, or dystrophic muscles[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 916: 3-14.
- [28] GHARAIBEH B, LU A P, TEBBETS J, et al. Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique[J]. Nature Protocols, 2008, 3(9): 1501-1509.
- [29] DING S J, WANG F, LIU Y, et al. Characterization and isolation of highly purified porcine satellite cells[J]. Cell Death Discovery, 2017, 3: 17003.
- [30] ARSHAD M S, JAVED M, SOHAIB M, et al. Tissue engineering approaches to develop cultured meat from cells: a mini review[J]. Cogent Food & Agriculture, 2017, 3(1): 1320814.
- [31] GARCIA S M, TAMAKI S, LEE S, et al. High-yield purification, preservation, and serial transplantation of human satellite cells[J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(3): 1160-1174.
- [32] XU C, TABEBORDBAR M, IOVINO S, et al. A zebrafish embryo culture system defines factors that promote vertebrate myogenesis across species[J]. Cell, 2013, 155(4): 909-921.
- [33] DING S J, SWENNEN G N M, MESSMER T, et al. Maintaining bovine satellite cells stemness through p38 pathway[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 10808.
- [34] JUDSON R N, QUARTA M, OUDHOFF M J, et al. Inhibition of methyltransferase Setd7 allows the *in vitro* expansion of myogenic stem cells with improved therapeutic potential[J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(2): 177-190.e7.
- [35] GILBERT P M, HAVENSTRITE K L, MAGNUSSON K E G, et al. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture[J]. Science, 2010, 329(5995): 1078-1081.
- [36] BOONEN K J M, ROSARIA-CHAK K Y, BAAIJENS F P T, et al. Essential environmental cues from the satellite cell niche: optimizing proliferation and differentiation[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2009, 296(6): C1338-C1345.
- [37] WARNER R D. Review: analysis of the process and drivers for cellular meat production[J]. Animal, 2019, 13(12): 3041-3058.
- [38] BUTLER M. Serum and protein free media[M]// SCHWAMB S, PUSKEILER R, WIEDEMANN P. Animal cell culture. Springer, 2015: 223-236.
- [39] BEERS J, GULBRANSON D R, GEORGE N, et al. Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions [J]. Nature Protocols, 2012, 7(11): 2029-2040.
- [40] GOTTIPAMULA S, MUTTIGI M S, KOLKUNDKAR U, et al. Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells: a review[J]. Cell Proliferation, 2013, 46(6): 608-627.
- [41] VAN DER VALK J, BRUNNER D, DE SMET K, et al. Optimization of chemically defined cell culture media - replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods[J]. Toxicology in Vitro, 2010, 24(4): 1053-1063.
- [42] LINDA POWERS M, FLORINI J R. A direct effect of testosterone on muscle cells in tissue culture[J]. Endocrinology, 1975, 97(4): 1043-1047.
- [43] MCALEER C W, RUMSEY J W, STANCESCU M, et al. Functional myotube formation from adult rat satellite cells in a defined serum-free system[J]. Biotechnology Progress, 2015, 31(4): 997-1003.
- [44] FLORINI J R, ROBERTS S B. A serum-free medium for the growth of muscle cells in culture[J]. In Vitro, 1979, 15(12): 983-992.
- [45] GODARA P, MCFARLAND C D, NORDON R E. Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2008, 83(4): 408-420.
- [46] HIDALGO-BASTIDA L A, THIRUNAVUKKARASU S, GRIFFITHS S, et al. Modeling and design of optimal flow perfusion bioreactors for tissue engineering applications[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(4): 1095-1099.
- [47] 梅建国, 庄金秋, 王金良, 等. 动物细胞大规模培养技术的应用与进展[C]// 中国畜牧兽医学会兽医公共卫生学分会第三次学术研讨会. 中国畜牧兽医学会兽医公共卫生学分会, 2012.
- [48] 唐江伟, 吴振强. 新型生物反应器结构研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(5): 146-152.
- TANG J W, WU Z Q. Advances in bioreactor structure innovation and related studies[J]. China Biotechnology, 2007, 27(5): 146-152.
- [49] HOCQUETTE J F, GONDRET F, BAÉZA E, et al. Intramuscu-

- lar fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers[J]. *Animal*, 2010, 4(2): 303-319.
- [50] REZA M M, SUBRAMANIYAM N, SIM C M, et al. Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1104.
- [51] VANDENBURGH H, KAUFMAN S. *In vitro* model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle[J]. *Science*, 1979, 203(4377): 265-268.
- [52] DENNIS R G, KOSNIK P E. Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered *in vitro*[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 2000, 36(5): 327-335.
- [53] BAKER B M, CHEN C S. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues[J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(Pt 13): 3015-3024.
- [54] SPECHT E A, WELCH D R, REES CLAYTON E M, et al. Opportunities for applying biomedical production and manufacturing methods to the development of the clean meat industry[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 132: 161-168.
- [55] DAWSON E, MAPILI G, ERICKSON K, et al. Biomaterials for stem cell differentiation[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60(2): 215-228.
- [56] VAN HEMERT P, KILBURN D G, VAN WEZEL A L. Homogeneous cultivation of animal cells for the production of virus and virus products[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1969, 11(5): 875-885.
- [57] LI B Y, WANG X, WANG Y, et al. Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering[J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2015, 3(2): 51-57.
- [58] BODIOU V, MOUTSATSOU P, POST M J. Microcarriers for upscaling cultured meat production[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2020, 7: 10.
- [59] VERBRUGGEN S, LUINING D, VAN ESSEN A, et al. Bovine myoblast cell production in a microcarriers-based system[J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(2): 503-512.
- [60] JONES J D, REBELLO A S, GAUDETTE G R. Decellularized spinach: an edible scaffold for laboratory-grown meat[J]. *Food Bioscience*, 2021, 41: 100986.
- [61] BEN-ARYE T, SHANDALOV Y, BEN-SHAUL S, et al. Textured soy protein scaffolds enable the generation of three-dimensional bovine skeletal muscle tissue for cell-based meat[J]. *Nature Food*, 2020, 1(4): 210-220.
- [62] FURUHASHI M, MORIMOTO Y, AI S M, et al. Formation of contractile 3D bovine muscle tissue for construction of millimetre-thick cultured steak[J]. *Npj Science of Food*, 2021, 5: 6.
- [63] MARGA F S, PURCELL B P, FORGACS G, et al. Edible and animal-product-free microcarriers for engineered meat: US9752122[P]. 2017-09-05.
- [64] HOLLISTER S J. Porous scaffold design for tissue engineering[J]. *Nature Materials*, 2005, 4(7): 518-524.
- [65] WOLF M T, DEARTH C L, SONNENBERG S B, et al. Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 84: 208-221.
- [66] HOLMES J T, JABERANSARI Z, COLLINS W, et al. Homemade bread: repurposing an ancient technology for *in vitro* tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2022, 280: 121267.
- [67] SHI L Y, DING P H, WANG Y Z, et al. Self-healing polymeric hydrogel formed by metal-ligand coordination assembly: design, fabrication, and biomedical applications[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2019, 40(7): e1800837.
- [68] CALIARI S R, BURDICK J A. A practical guide to hydrogels for cell culture[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(5): 405-414.
- [69] MAITRA J, SHUKLA V K. Cross-linking in hydrogels - a review[J]. *American Journal of Polymer Science*, 2014, 4(2): 25-31.
- [70] JEON O, SONG S J, LEE K J, et al. Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 70(3): 251-257.
- [71] CAO Y, LEE B H, PELED H B, et al. Synthesis of stiffness-tunable and cell-responsive Gelatin-poly(ethylene glycol) hydrogel for three-dimensional cell encapsulation[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2016, 104(10): 2401-2411.
- [72] CHAUDHURI O. Viscoelastic hydrogels for 3D cell culture[J]. *Biomaterials Science*, 2017, 5(8): 1480-1490.
- [73] LIU X, GAO Y, LONG X, et al. Type I collagen promotes the migration and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts *via* the release of interleukin-6 mediated by FAK/NF- $\kappa$ B p65 activation[J]. *Food & Function*, 2020, 11(1): 328-338.
- [74] HINDS S, BIAN W N, DENNIS R G, et al. The role of extracellular matrix composition in structure and function of bioengineered skeletal muscle[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(14): 3575-3583.
- [75] VANDENBURGH H, SHANSKY J, BENESCH-LEE F, et al. Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle[J]. *Muscle & Nerve*, 2008, 37(4): 438-447.
- [76] SNYMAN C, GOETSCH K P, MYBURGH K H, et al. Simple silicone chamber system for *in vitro* three-dimensional skeletal muscle tissue formation[J]. *Frontiers in Physiology*, 2013, 4: 349.
- [77] BIAN W N, BURSAC N. Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(7): 1401-1412.
- [78] MACQUEEN L A, ALVER C G, CHANTRE C O, et al. Muscle tissue engineering in fibrous gelatin: implications for meat analogs[J]. *Npj Science of Food*, 2019, 3: 20.
- [79] JIANG Q R, REDDY N, ZHANG S M, et al. Water-stable electrospun collagen fibers from a non-toxic solvent and crosslinking system[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part*

- A, 2013, 101(5): 1237-1247.
- [80] QU Z H, WANG H J, TANG T T, et al. Evaluation of the zein/inorganics composite on biocompatibility and osteoblastic differentiation[J]. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4(5): 1360-1368.
- [81] SEAH J S H, SINGH S, TAN L P, et al. Scaffolds for the manufacture of cultured meat[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022, 42(2): 311-323.
- [82] GALLO N, NASSER H, SALVATORE L, et al. Hyaluronic acid for advanced therapies: promises and challenges[J]. *European Polymer Journal*, 2019, 117: 134-147.
- [83] ZERNOV A, BARUCH L, MACHLUF M. Chitosan-collagen hydrogel microparticles as edible cell microcarriers for cultured meat[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 129: 107632.
- [84] PARK S, JUNG S, HEO J, et al. Chitosan/cellulose-based porous nanofilm delivering C-phycoerythrin: a novel platform for the production of cost-effective cultured meat[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(27): 32193-32204.
- [85] NG S, KURISAWA M. Integrating biomaterials and food biopolymers for cultured meat production[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 124: 108-129.
- [86] SCHUSTER E, WALLIN P, KLOSE F P, et al. Correlating network structure with functional properties of capillary alginate gels for muscle fiber formation[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 72: 210-218.
- [87] TRACHE D, HUSSIN M H, HAAFIZ M K M, et al. Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(5): 1763-1786.
- [88] COURTENAY J C, JOHNS M A, GALEMBECK F, et al. Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering[J]. *Cellulose*, 2017, 24(1): 253-267.
- [89] DUGAN J M, COLLINS R F, GOUGH J E, et al. Oriented surfaces of adsorbed cellulose nanowhiskers promote skeletal muscle myogenesis[J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(1): 4707-4715.
- [90] ROWLEY J A, MOONEY D J. Alginate type and RGD density control myoblast phenotype[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 60(2): 217-223.
- [91] CHANDLER E M, BERGLUND C M, LEE J S, et al. Stiffness of photocrosslinked RGD-alginate gels regulates adipose progenitor cell behavior[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(7): 1683-1692.
- [92] ANDRADE F K, COSTA R, DOMINGUES L, et al. Improving bacterial cellulose for blood vessel replacement: functionalization with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and an adhesion peptide[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(10): 4034-4041.
- [93] DAYEM A A, WON J, GOO H G, et al. The immobilization of fibronectin- and fibroblast growth factor 2-derived peptides on a culture plate supports the attachment and proliferation of human pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Research*, 2020, 43: 101700.
- [94] SILVA GARCIA J M, PANITCH A, CALVE S. Functionalization of hyaluronic acid hydrogels with ECM-derived peptides to control myoblast behavior[J]. *Acta Biomaterialia*, 2019, 84: 169-179.
- [95] BOMKAMP C, SKAALURE S C, FERNANDO G F, et al. Scaffolding biomaterials for 3D cultivated meat: prospects and challenges[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(3): e2102908.
- [96] LUO B W, TIAN L L, CHEN N, et al. Electrospun nanofibers facilitate better alignment, differentiation, and long-term culture in an *in vitro* model of the neuromuscular junction (NMJ)[J]. *Biomaterials Science*, 2018, 6(12): 3262-3272.
- [97] CHOI J S, LEE S J, CHRIST G J, et al. The influence of electrospun aligned poly( $\epsilon$ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(19): 2899-2906.
- [98] RUBIO N R, FISH K D, TRIMMER B A, et al. *In vitro* insect muscle for tissue engineering applications[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, 5(2): 1071-1082.



**通讯作者:** 戴建武(1965—),男,研究员,博士生导师。研究方向为生物材料和再生医学等。

E-mail: jwdai@genetics.ac.cn



**第一作者:** 张臻(1990—),女,博士,副教授。研究方向为干细胞与再生医学

E-mail: zc420@hnu.edu.cn



**共同第一作者:** 施李杨(1991—),男,博士,副教授。研究方向为高分子生物材料与再生医学。

E-mail: liysh777@hnu.edu.cn