

组织工程技术在细胞培养肉上的应用进展

包立辉¹, 周凤¹, 王向东¹, 金岩^{2*}

(¹西安组织工程与再生医学研究所 西安 710032

²空军军医大学口腔医学院组织工程中心 西安 710032)

摘要 随着全球人口的增长,蛋白质供需矛盾逐渐凸显,传统畜牧业作为目前主要的动物蛋白供应方式,在满足市场消费的同时,也带来了温室气体排放、资源过度消耗、环境污染、人畜共患病流行、动物福利等一系列全球性的问题。鉴于传统畜牧业目前的弊端,细胞培养肉作为一种更加清洁、可持续、公正和健康的新型肉类生产方式被越来越多地关注。本文综述组织工程技术在细胞培养肉领域的应用进展。

关键词 细胞培养肉; 组织工程; 产业化; 应用进展

文章编号 1009-7848(2022)12-0025-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.12.003

根据联合国粮农组织的预测,预计到 2050 年,全世界对肉食产品的需求将增长 73%。这是由于世界各地人口增长、收入增加和城市化进程加快引起的对肉类消费需求的增加所致^[1]。全球日益增长的肉类消费需求,必然导致畜牧业生产规模的持续扩大,而牲畜肉类行业的这种指数增长对生态、资源和粮食生产系统的可持续性构成了巨大挑战。传统肉类生产系统对温室气体排放大量的二氧化碳、甲烷和一氧化二氮,同时,对土地资源占用、水和能源消耗产生了显著影响^[2]。另外,全球畜牧业的肉类生产能力趋于饱和状态,在未来,传统畜牧业的肉类产量可能难以满足日益增长的消费和营养需求^[1]。尽管素食主义者在各国人口中都占有一定比例,然而,在工业化社会中素食者的比例还很低,而且在过去 35 年中没有增加。另外,从全球庞大的且持续增长的人口基数以及人体饮食对优质动物蛋白的需求来看,通过放弃肉食消费,不太可能减少肉类需求^[3]。从动物福利及伦理角度来看,大量屠宰动物以满足人类的肉类消费行为,与当今高度发展的人类文明相悖。因此,一种基于细胞生物学及组织工程技术新型肉类替代品——细胞培养肉,逐渐成为当前肉类食品体系危机的潜在解决方案。细胞培养肉也被称为“试管肉”“离体肉”“细胞基人造肉”等,是采用动物来

源的细胞提取种子细胞,通过体外细胞培养的方式生产出的生物质。该技术来源于再生医学领域,其目标是利用体外培养的功能性组织恢复功能失调或器质受损的器官^[3]。

1 细胞培养肉的发展简况

早在 20 世纪 30 年代,温斯顿·丘吉尔(Winston Churchill)第 1 次提出细胞培养肉的畅想,几十年后,威廉·范·埃伦(Willem van Eelen)也提出同样的想法^[4]。在整个 20 世纪,关于细胞培养肉的想法一直处于人们所关注的重点之外,然而,随着传统肉类生产的弊端日益凸显,特别是给生态和资源造成的沉重负担以及动物福利,这一畅想正逐渐变为现实。对细胞培养肉的研究项目最先由美国国家航天局(NASA)发起,目的是为长距离太空航行提供肉类来源。而真正把细胞培养肉从预想变为现实的则是荷兰马斯特里赫特大学生理学系教授马克·波斯特(Mark Post),2013 年 8 月,马克·波斯特向媒体展示了一个细胞培养牛肉汉堡作为第 1 个“概念证明”,证明了这一想法的可行^[5]。随后,国内和国际细胞培养肉领域进入快速发展时期。从全球细胞培养肉企业数量来看,截止 2021 年,涉及细胞培养肉研发的初创企业数量达到 107 家,其中仅 2021 年新增的细胞肉风投企业数量就达到 21 家。国内细胞培养肉行业也出现诸多进展,继 2019 年有研究团队利用猪来源骨髓肌卫星细胞成功培养细胞培养猪肉以来,2021 年又发布细胞培养猪五花肉等产品^[6]。即便在细胞培养

收稿日期: 2022-11-29

第一作者: 包立辉,男,硕士,助理工程师

通信作者: 金岩 E-mail: yanjin@fmmu.edu.cn

肉领域越来越多标志性事件的出现预示着其快速发展的势头,然而,距离细胞培养来源的新蛋白出现在大众餐桌上仍有很长的路要走。

2 基于组织工程技术的细胞工程肉构建

组织工程(tissue engineering)技术是使用活细胞、生物相容材料和合适的生化(例如:生长因子)和物理(例如:搅拌式生物反应器)因素,产生组织样结构,用于修复或改善缺损组织、器官结构和功能的生物替代物的一门科学^[7]。我国的组织工程技术在国家的大力支持下,在基础研究方面取得了很大的成绩,研究的重点主要是组织工程皮肤、软骨、骨、肌腱、角膜、血管、微囊化细胞等。其中,金岩教授的团队研发的由成纤维细胞、表皮细胞和胶原膜构成的组织工程皮肤^[8]和基于脱细胞角膜基质的生物工程角膜^[9]已获得国家医疗器械产品注册证,获得了上市批准。在骨骼肌方面,最早在20世纪60年代 Konigsberg 等^[10]将原代鸡胚肌肉细胞在培养皿上分化为一个具有交叉横纹肌的纤维样细胞群。2013年,荷兰生物学家 Mark Post 用组织工程技术生产出有史以来的第1块人造肉,引起广泛的关注^[11]。随着三维细胞培养技术和各种新型生物支架材料的发展,使利用组织工程技术生产质量受控、无需饲养动物的肉类成为可能。而实现这一切的前提是动物细胞的有效扩增,更加廉价的生物材料,不同细胞合理排列的组织工程以及注重营养价值和感官特性的技术开发。

2.1 种子细胞

细胞培养肉的培养由多个环节组成,综合来看多种类型的细胞培养肉,首要环节是种子细胞的制备。从健康的供体动物提取组织,经原代培养后实现细胞体外扩增,对达到一定数量的细胞进行冻存形成种子细胞^[12]。这一环节主要是针对种子细胞库的建立,具备一定规模的种子细胞库可为细胞培养肉的规模化生产提供稳定的细胞供应,因此种子细胞的分离、培养及种子细胞库的建立是细胞培养肉必不可少的重要环节。本文下面阐述细胞培养肉中常用的几种细胞类型。

2.1.1 骨骼肌卫星细胞 骨骼肌卫星细胞是驻留在肌纤维基底膜下,生理条件下为静息状态,当肌

肉损伤发生时,骨骼肌卫星细胞能够分化成肌细胞,进一步形成多核肌管,填充到肌纤维中^[13-14],因此,骨骼肌卫星细胞是目前公认的细胞培养肉最适合的种子细胞来源^[15]。骨骼肌卫星细胞是肌肉中存在一种特异性的干细胞,随着骨骼肌卫星细胞的分化特性被发现,它能高效地再现肌肉生成过程,这为通过在体外培养动物肌肉组织提供了证据支持^[16]。目前已形成成熟的骨骼肌卫星细胞来源的细胞肉培养策略,包括用于细胞分离的肌肉组织取样、肌肉组织处理方法和骨骼肌卫星细胞分离、原代细胞培养、细胞传代培养、肌肉分化和成熟、肌肉组织收获^[17]。骨骼肌卫星细胞体外培养过程是:从供体动物组织样本中分离骨骼肌卫星细胞,将这些细胞置于含有多种因子的培养液中分别经过原代培养和传代扩增培养,肌卫星细胞逐渐成为增殖性成肌细胞,当细胞扩增至一定数量时,向培养液中添加具有定向诱导能的因子,使成肌细胞融合成不可增殖的肌细胞,这些肌细胞继续融合成多核肌管,随着细胞中蛋白质的合成和积累,多核肌管体积逐渐增大^[18-20]。自首个细胞培养牛肉汉堡饼是基于骨骼肌卫星细胞培养的报道以来,后续大多细胞数培养肉的研究主要集中于骨骼肌卫星细胞的体外培养和分化^[19]。虽然骨骼肌卫星细胞的研究是一个成熟的领域,但是这些步骤仍有待优化,以适应细胞培养肉规模化培养的要求。例如,在延长肌肉组织储存时间后,分离出的牛骨骼肌卫星细胞的增殖和肌源性分化特性的变化,将影响细胞培养肉生产中对组织样本验收标准的制定和肌肉组织样本储存方法的确定^[21]。

2.1.2 干细胞及诱导多能干细胞 虽然骨骼肌卫星细胞被较多地采用为细胞培养肉种子细胞,但是其属于单能干细胞,分化方向单一,不能分化为骨骼肌以外的组织,并且在培养中很难保持其干性,经历一定次数的传代后很容易自发分化为肌管和更成熟的肌原纤维^[22]。干细胞是一种未分化的细胞群,其特征是具有自我更新的能力,可在相当数量的细胞中保持未分化的状态,在一定诱导条件下分化为不同类型的细胞和组织。干细胞有多种来源,其效力各不相同。有几种干细胞已被鉴定并用于体外培养肉。根据发育来源不同,干细胞

分为两类：源自植入前胚胎的干细胞被称为胚胎干细胞，源自出生后组织的干细胞被称为成体干细胞。诱导多能干细胞是通过在体细胞中强制表达确定的转录因子而分化的特定细胞类型，例如，通过转录 Oct4、Sox2、KLF4 和 c-Myc 等特定转录因子，可以成功诱导小鼠成纤维细胞的多能性^[23]。干细胞和诱导多能干细胞被认为是细胞培养肉的另一种子细胞来源。虽然这两类细胞都具备向肌肉纤维分化的潜力，但是与肌肉卫星细胞不同的是：前者需在含有定向诱导分化剂的条件培养液作用下才能调动潜在的分化机制。因此，要寻找符合食品安全要求的干细胞分化诱导成分或者从植物中提取合适的天然成分以对其进行定向分化诱导。另外，由于涉及因子转录，诱导多能干细胞的安全性和在细胞培养肉大规模生产中的适用性尚未得到充分证实，因此在干细胞和诱导多能干细胞的成肌分化诱导过程中，非预期分化的可能性仍是需要重点关注的问题。

2.2 基于微载体的细胞工程肉规模化培养策略

无论是通过饲养动物生产的传统肉还是细胞培养肉，其产生的最基本的生理活动都离不开细胞的分裂增殖及其伴随的蛋白质与其它物质的合成。因此，细胞培养肉需要首先解决的问题是细胞如何在体外环境中实现规模化增殖。虽然细胞体外培养技术经过多年发展逐渐成为一项成熟的技术，在基础医学、制药、生物学等领域被广泛应用，但是这一细胞体外培养技术多采用平皿方式，其出发点是更多的为实验室研究提供所需要的细胞模型，从规模化可行性方面来讲其并不具备产业化落地转化的条件，因此在细胞培养肉的研发过程中仍需寻找一种可以在产业转化中适合规模放大的细胞体外生产方式。

三维培养系统的引入是细胞培养技术的一项重要进展，其中，基于微载体的细胞规模化培养是一种具有良好应用前景的方式^[24]。微载体细胞培养方式的本质是通过制备具有表面微结构的微球，为细胞黏附提供更多的表面积，而微载体本身可以在搅拌罐式生物反应器中实现悬浮，通过这种方式来提高细胞的增殖效率，同时微载体材料本身的生物相容性和机械特性也为细胞模拟出类似体内环境的体外扩增微环境^[25]。近年来，微载体

经历了多次修改和创新以适应多种细胞类型对基质的要求，目前已有多种商品化的微载体可从市场上购买。虽然细胞培养微载体已经发展到相对成熟的阶段，但是细胞培养肉的应用场景使其面临一系列特有的限制。例如，为了满足细胞培养肉的食品属性和规模化生产的要求，应用细胞培养肉中的支架材料在具备良好生物相容性的同时还需兼顾可食用、低成本及易批量制备等创新属性，这对新型材料的研发和原料的筛选带来了更多的挑战。若将这些考量融入微载体研发的初始设计阶段，则会显著缩短微载体的研发周期。

2.3 基于无血清条件培养液的细胞外基质自分泌

微载体技术解决了细胞工程肉构建所需的细胞数量问题，然而，通过分析传统肉的成分可以得知，传统肉的食用部分并不单独由细胞数量的叠加形成，而是通过一种复杂的空间排布形成传统肉的特殊纹理，由细胞分泌的细胞外基质填充在细胞间的空隙部位，这一生理结构赋予肉类特有的质感，而细胞外基质也是肉类芳香成分及多汁风味的重要来源。由于细胞外基质某些成分的改变会影响传统肉的感官品质^[26]，因此随着细胞在微载体黏附并增殖达到一定融合率时，细胞工程肉构建的重点将转变为微载体-细胞球基质的重塑。

2.3.1 无血清培养

培养基通常由水、葡萄糖、氨基酸、脂质、生长因子、维生素和无机盐和微量元素组成，为了维持培养液稳定的 pH，还会加入 pH 缓冲系统^[27]。此外，动物血清经常被添加到细胞培养液中，这是因为它含有许多细胞附着、生长和增殖所需的因子和其它营养成分^[28]。大多数细胞的传统培养方法依赖于动物血清，这些血清成分的确切性质尚不清楚，存在众所周知的弊端，包括成本高，供应不稳定，批次变化以及可能传播性疾病等^[28]。另外，从动物供体制备血清用于细胞培养肉，本质上是不可持续的，在动物福利问题和细胞肉“清洁”属性的问题上也是相悖的^[29]。因此，在细胞培养肉的研发和生产中，无血清培养基比动物血清更加符合对食品安全以及细胞培养肉中涉及动物福利的要求。随着这一问题被越来越多地关注，目前开发了用于多种细胞类型的无血清培养液和培养方法，这些培养液不含动物源成分，而是

采用重组蛋白或植物来源蛋白,如酵母、大米、大豆和其它植物和微生物材料的水解物(酶解物或酸消化物),作为氨基酸、肽、维生素和微量元素的补充来源添加到培养液中,替代原来的动物成分和有食品安全争议的成分。近期有研究^[30]报道一种用于多能干细胞的低成本无血清培养基被应用在牛骨骼肌卫星细胞的培养中,这种培养基通过添加单一组分在大米中表达的重组白蛋白,可以支持骨骼肌卫星细胞高效扩增,并且无血清培养的骨骼肌卫星细胞经多次传代仍能保持肌源性。天然来源的植物提取物也被建议用作细胞培养肉的血清替代物,如将1-磷酸鞘氨醇脂质和富含氨基酸的蘑菇提取物作为血清培养基^[27]。

2.3.2 细胞外基质重塑与组织再生 在肌肉再生过程中,组织中巨噬细胞的极化表型介导肌肉再生所需的免疫微环境。猪心脏脱细胞ECM支架材料和脐带来源的间充质干细胞混合物,通过调节肌肉再生中巨噬细胞的M2表型极化,为再生与修复过程介导了适宜的免疫微环境,这表明,在修复与再生过程中,细胞外基质的重塑与组织再生往往是伴随着密切相互作用的^[31]。天然脱细胞组织来源的细胞外基质支架材料,在模拟再生微环境方面表现出强大的天然优势,然而天然组织来源的脱细胞支架材料对于细胞培养肉来说是不可持续的,并且也与细胞培养肉的初衷相悖。因此,细胞膜片技术和细胞聚合体技术等无支架技术,以及细胞外囊泡介导的无细胞再生系统等同样在组织工程与再生医学领域展现出广泛的应用前景。富含血小板的血浆与牙周膜干细胞生物膜片的混合物,可显著增强骨再生部位的细胞外基质蛋白表达和细胞外基质的产生及沉积,为骨组织的修复提供了高度仿生的再生环境^[32]。钛+牙周膜干细胞膜片+羟基磷灰石的复合物促进牙周再生,钛纳米管的加入有效提高牙周膜干细胞的初始黏附和扩散,以及胶原的分泌^[33]。细胞外基质的产生改善了组织工程中种子细胞的黏附、迁移和增殖,并有助于种子细胞实现原生组织中的空间排布方式^[34]。无论在组织工程与再生医学领域还是细胞培养肉领域,细胞外基质为改善移植的种子细胞生态位的生物相容性发挥了关键的调节作用。然而,出于医疗或实验室研究目的的细胞外基质重

塑策略,可能不适合细胞培养肉对规模化放大的要求。采用可食用、易于大规模制备的且低成本的原料构建生物支架来还原天然细胞外基质微环境,将成为解决这一问题的关键途径。

2.3.3 构建生物支架材料,还原天然细胞外基质环境 在3D支架材料上接种细胞是许多现有和假设的细胞培养肉生物过程的关键步骤。细胞培养肉生物物质的体外形成,是基于种子细胞在三维空间下的增殖和细胞外基质的分泌与积累。支架材料对细胞间氧气和营养物质的转运及代谢产物的排出起着至关重要的作用,需要考虑支架材料对细胞的黏附性、生物相容性以及其本身的生物力学特性、机械强度和结构稳定性。组织培养支架材料控制着细胞培养肉生物物质的外部几何形状和生物物质内的细胞类型及分布,并对生物物质的结构和质地产生直接影响^[35-37]。在细胞培养肉支架材料研发的初始设计阶段,尽管支架材料技术在再生医学和组织工程领域的应用已十分广泛,然而,用于细胞培养肉的支架材料还面临着一系列的独有的限制。例如,为了满足细胞培养肉的食品属性和规模化生产的要求,应用在细胞培养肉中的支架材料在具备良好生物相容性的同时还需兼顾可食用、低成本及易批量制备等创新属性,这对新型材料的研发和原料的筛选工作带来更多的挑战。富含植物蛋白的多糖水凝胶支架已被用于细胞培养肉支架材料的研究中,如结冷胶和琼脂糖凝胶混合大豆和豌豆蛋白制备的支架材料,对C2C12成肌细胞系表现出良好的生物相容性和细胞分布,可在未来细胞培养肉工业中的细胞封装型支架材料领域表现出良好的应用前景^[37]。使用明胶和豆浆制备复合支架,对共培养的C2C12成肌细胞系和3T3-L1前脂肪细胞系表现出良好的生物相容性,通过层叠接种这两种细胞,形成了含有肌肉样层和脂肪样层的培养肉,表达肌球蛋白的肌样层和富含脂肪的脂肪样层被夹在中间以形成含脂肪的肌肉组织。这种支架材料为肌肉样质地的多汁细胞肉的开发提供了思路^[38]。纹理大豆蛋白作为可食用的多孔蛋白质基生物材料,可以支持牛骨骼肌细胞的附着和增殖,实现了基于细胞-支架材料的肌生成和ECM沉积的升高,并具备牛肉的风味和感官特性,这为工程化构建3D牛骨骼肌培养

肉提供了新的思路^[39]。采用花生拉丝蛋白作为支架材料体外培养平滑肌细胞,可以在花生拉丝蛋白上黏附,获取同时含有动物蛋白和植物蛋白的培养肉制品,从而形成具有丰富蛋白质组成的培养肉制品^[40]。大葱脱细胞支架材料具有适当的表面形貌,这一天然结构引导 C2C12 成肌细胞分化成排列的肌管的微结构。这为细胞培养肉提供了一种简单且低成本的基质^[41]。基于天然衍生生物聚合物的支架材料,如纤维蛋白、胶原蛋白、透明质酸等,在组织工程和再生医学领域被广泛研究和应用,这些材料不仅具有高度生物相容性,还具有支持细胞黏附的特性^[37,42]。然而,高昂的成本限制了这些聚合物在细胞培养肉中大规模应用的可能性。另一方面,这些能够更好模拟体内环境的聚合物材料,在小体积或者较薄的生物物质培养中能够实现营养灌注和细胞附着,然而,人工毛细血管往往是被忽略的重要环节,尤其是在大体积的细胞支架聚合物上^[36,43-44]。人工毛细血管可使培养液中的各种营养因子有效扩散至聚合物内部,滋养深层的细胞,同时也是代谢终产物去除的通道。缺乏毛细血管的聚合物将带来细胞新陈代谢的局限性,并最终阻碍细胞三维结构的形成。因此,未来细胞培养肉大块生物物质的支架材料设计中,细胞代谢通道的设计或者成管腔细胞共培养体系的加入是值得深入探究的方向。

2.4 组织工程技术对细胞培养肉质构的改善应用

由于细胞培养肉种子细胞来源于生产牲畜产品的相同动物,因此理论上可以在体外环境下创造出完全复制所有肉类特征的表型,包括在风味、外观、质地和营养价值方面。实际上,细胞培养肉在这些方面正处在与传统肉无限接近漫长进程中的起点位置。尽管有研究在尝试使用脂肪组织补充肌肉组织,并增强蛋白质的生产,特别是肌红蛋白和肌球蛋白及肌动蛋白^[5],然而,距离与传统肉具有类似质构和口感的细胞培养肉的产生还有很长的路要走。日本大阪大学构建了肌腱凝胶,并与肌细胞纤维形成连续连接,肌腱作为促进肌肉组织成熟的重要结构,通过这种肌腱凝胶集成生物打印系统形成的生物物质,具备诱导成为排列的成熟肌肉纤维的潜力^[45]。生物 3D 打印技术可以实

现种子细胞在固化后的生物墨水中的有序空间排布,这种排布高度还原了原生组织的自然状态,因此,生物 3D 技术可以作为提升细胞培养肉质构和口感的有效途径。另外,生物 3D 打印技术在组织工程与再生医学领域已被广泛的研究,如何实现这些技术在细胞培养肉领域的转化和大规模应用以及相应大型生物打印机的设计和建造,则是一项充满挑战的命题。

3 总结与展望

总之,细胞培养肉技术是一项具有巨大潜力的技术。细胞培养肉作为一种替代动物蛋白质的新来源,它能够缓解传统肉类生产中的相关动物福利、环境和公共健康问题,包括温室气体排放、土地和水的使用,抗生素耐药性,食物传播人畜共患疾病等。然而,这项技术仍处于起步阶段,面临着技术完善和社会认知的挑战。在技术层面,细胞培养肉行业最需要解决的问题是降低成本,消除与传统肉类的价格障碍,这需要多学科领域共同研究来解决。在社会层面,最重要和最艰巨的挑战是实现消费者对养殖肉类的接受。这涵盖了食物吸引力的不同方面,如外观、味道、营养价值、质地、口感等。由于这种食物的新颖性,因此需要更多的研究来弥补这些方面的空白。

组织工程技术在再生医学领域被广泛研究和应用,已有多种源于组织工程技术的医疗器械产品进入成熟的批量生产阶段并造福于人类健康。由于细胞培养肉的食品属性与医疗器械产品的医用属性之间的固有差异,利用组织工程技术实现细胞培养肉的规模化量产还面临着诸多挑战,然而,随着国家有关部门对细胞培养肉监管政策法规的出台以及未来的市场消费需求,势必会成为推动组织工程技术在细胞培养肉领域广泛研究并应用的重要推动力。

参 考 文 献

- [1] FAO. World Livestock 2011[M]// Livestock in Food Security. Rome: FAO, 2011: 5-10.
- [2] FAO. Livestock's long shadow - Environmental issues and options[M]. Rome: FAO, 2006: 22-26.

- [3] POST M J. Cultured beef: medical technology to produce food[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94(6): 1039–1041.
- [4] VAN DER WEELE C, TRAMPER J. Cultured meat: every village its own factory? [J]. *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(6): 294–296.
- [5] POST M J. An alternative animal protein source: cultured beef[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2014, 1328(1): 29–33.
- [6] ZHU H, WU Z, DING X, et al. Production of cultured meat from pig muscle stem cells[J]. *Biomaterials*, 2022, 287: 121650.
- [7] BERTHIAUME F, MAGUIRE T J, YARMUSH M L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges[J]. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2011, 2: 403–430.
- [8] BI H J, JIN Y. Current progress of skin tissue engineering: Seed cells, bioscaffolds, and construction strategies[J]. *Burns Trauma*, 2013, 1(2): 63–72.
- [9] LUO H I, LU Y B, WU T T, et al. Construction of tissue-engineered cornea composed of amniotic epithelial cells and acellular porcine cornea for treating corneal alkali burn[J]. *Biomaterial*, 2013, 34(28): 6748–6759.
- [10] KONIGSBERG I R. Cellular differentiation in colonies derived from single cells platings of freshly isolated chick embryo muscle cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1961, 47(11): 1868–1872.
- [11] POST M J. Cultured beef: medical technology to produce food[J]. *J Sci Food Agric*, 2014, 94(6): 1039–1041.
- [12] RAMANI S, KO D, KIM B, et al. Technical requirements for cultured meat production: a review[J]. *Journal of Animal Science and Technology*, 2021, 63(4): 681–692.
- [13] JOO S, CHOI J, HUR S, et al. A comparative study on the taste characteristics of satellite cell cultured meat derived from chicken and cattle muscles[J]. *Food Science of Animal Resources*, 2022, 42(1): 175–185.
- [14] 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.
- [15] TREICH N. Cultured meat: Promises and challenges [J]. *Environmental and Resource Economics*, 2021, 79(1): 33–61.
- [16] SEALE P, RUDNICKI M A. A new look at the origin, function, and ‘stem-cell’ status of muscle satellite cells[J]. *Dev Biol*, 2000, 218(2): 115–124.
- [17] BHAT Z F, MORTON J D, MASON S L, et al. Technological, regulatory, and ethical aspects of *in vitro* meat: A future slaughter-free harvest[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(4): 1192–1208.
- [18] MELZENER L, VERZIJDEN K E, BUIJS A J, et al. Cultured beef: from small biopsy to substantial quantity[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(1): 7–14.
- [19] HONG T K, SHIN D, CHOI J, et al. Current issues and technical advances in cultured meat production: A review[J]. *Food Science of Animal Resources*, 2021, 41(3): 355–372.
- [20] LEE S Y, KANG H J, LEE D Y, et al. Principal protocols for the processing of cultured meat [J]. *Journal of Animal Science and Technology*, 2021, 63(4): 673–680.
- [21] SKRIVERGAARD S, RASMUSSEN M K, THERKILDSEN M, et al. Bovine satellite cells isolated after 2 and 5 days of tissue storage maintain the proliferative and myogenic capacity needed for cultured meat production[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8376.
- [22] SHAIKH S, LEE E, AHMAD K, et al. Cell types used for cultured meat production and the importance of myokines[J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2318.
- [23] MIZUNO Y, CHANG H, UMEDA K, et al. Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells[J]. *The FASEB Journal*, 2010, 24(7): 2245–2253.
- [24] RAVI M, PARAMESH V, KAVIYA S R, et al. 3D cell culture systems: advantages and applications [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(1): 16–26.
- [25] DE SOURE A M, FERNANDES-PLATZGUMMER A, DA SILVA C L, et al. Scalable microcarrier-based manufacturing of mesenchymal stem/stromal cells[J]. *J Biotechnol*, 2016, 236: 88–109.
- [26] DUBOST A, MICOL D, LETHIAS C, et al. New insight of some extracellular matrix molecules in beef muscles. Relationships with sensory qualities[J].

- Animal, 2016, 10(5): 821–828.
- [27] SHARMA S, THIND S S, KAUR A. *In vitro* meat production system; why and how? [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52 (12): 7599–7607.
- [28] KOLKMANN A M, POST M J, RUTJENS M A M, et al. Serum-free media for the growth of primary bovine myoblasts[J]. Cytotechnology, 2020, 72(1): 111–120.
- [29] O'NEILL E N, COSENZA Z A, BAAR K, et al. Considerations for the development of cost effective cell culture media for cultivated meat production[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(1): 686–709.
- [30] STOUT A J, MIRLIANI A B, RITTENBERG M L, et al. Simple and effective serum-free medium for sustained expansion of bovine satellite cells for cell cultured meat[J]. Communications Biology, 2022, 5 (1): 466.
- [31] QIU X, LIU S, ZHANG H, et al. Mesenchymal stem cells and extracellular matrix scaffold promote muscle regeneration by synergistically regulating macrophage polarization toward the M2 phenotype[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 88.
- [32] XU Q, LI B, YUAN L, et al. Combination of platelet-rich plasma within periodontal ligament stem cell sheets enhances cell differentiation and matrix production[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11 (3): 627–636.
- [33] GAO H, LI B, ZHAO L Z, et al. Influence of nanotopography on periodontal ligament stem cell functions and cell sheet based periodontal regeneration[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 4009–4027.
- [34] GUO W, HE Y, TANG X, et al. Scaffold-free cell pellet transplantations can be applied to periodontal regeneration[J]. Cell Transplant, 2014, 23(2): 181–194.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] WOLLSCHLAEGER J O, MAATZ R, ALBRECHT F B, et al. Scaffolds for cultured meat on the basis of polysaccharide hydrogels enriched with plant-based proteins[J]. Gels, 2022, 8(2): 94.
- [38] LI C H, YANG I H, KE C J. The production of fat-containing cultured meat by stacking aligned muscle layers and adipose layers formed from gelatin-soymilk scaffold[J/OL]. Front Bioeng Biotechnol, 2022. (2022-04-12) [2022-11-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35497336/>.
- [39] 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.
- [40] ZHENG Y Y, SHI Y F, ZHU H Z, et al. Quality evaluation of cultured meat with plant protein scaffold[J]. Food Res Int, 2022, 161: 111818.
- [41] CHENG Y, SHIWARSKI D J, BALL R L, et al. Engineering aligned skeletal muscle tissue using decellularized plant-derived scaffolds [J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2020, 6(5): 3046–3054.
- [42] PAJČN I, KNEŽIĆ T, SAVIC AZOULAY I, et al. Bioengineering outlook on cultivated meat production [J]. Micromachines, 2022, 13(3): 402.
- [43] AHMAD K, LIM J, LEE E, et al. Extracellular matrix and the production of cultured meat [J]. Foods, 2021, 10(12): 3116.
- [44] LEE K, LOH H, WAN A. Systems for muscle cell differentiation: From bioengineering to future food[J]. Micromachines, 2022, 13(1): 71.
- [45] 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]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5059.

Application Progress of Tissue Engineering Technology in Cell Culture Meat

Bao Lihui¹, Zhou Feng¹, Wang Xiangdong¹, Jin Yan^{2*}

(¹Xi'an Institute of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Xi'an 710032

²State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Shaanxi International Joint Research Center for Oral Diseases, Center for Tissue Engineering, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract With the growth of global population, the contradiction between supply and demand of protein has become increasingly prominent. As the main animal protein supply mode at present, traditional animal husbandry has brought a series of global problems, such as greenhouse gas emissions, excessive consumption of resources, environmental pollution, zoonosis prevalence, animal welfare, etc., while meeting market consumption. In view of the drawbacks of traditional animal husbandry, cell culture meat as a more clean, sustainable, fair and healthy new meat production mode has been paid more and more attention. This paper reviews the application of tissue engineering technology in the field of cell culture meat.

Keywords cell cultured meat; tissue engineering; industrialization; application progress