

述评

体外培养肉类生产

P.D. EDELMAN, M.Sc.,¹ D.C. McFARLAND, Ph.D.,² V.A. MIRONOV, Ph.D., M.D.,³
和 J.G. MATHENY, M.P.H.⁴

前言

尽管肉类一直是人们比较喜欢的一种食物,但越来越多的消费者开始对肉类消费和生产的某些后果感到担忧。这些后果包括与营养有关的疾病、食物源性疾病、资源利用和污染、农场动物的利用等。我们在此综述了用组织工程技术在体外生产可食用动物肌肉(即肉类)的可能性。与传统的肉类相比,“培养的肉类”有许多健康和环保方面的优势,由于生产培养肉所需要的技术也不是遥不可及。对于组织工程人员来说,这是一个十分有意义的课题,因为培养肉生产只是应用组织工程学原理而已,这些原理的技术性难题可能比许多临床应用的难题要容易得多。

培养肉生产

大多数可食用动物肉是由骨骼肌组成。早在七十多年前¹,人们就萌发了将骨骼肌组织工程技术用于可食用肉类生产的想法,但只有三个研究小组认真开展了这方面的研究。他们的研究可大致分为支架型和自组型技术。

支架型技术是将胚胎成肌细胞或成年骨骼肌卫星细胞增殖后固定在一个支架或载体(如胶原网或微珠载体)上,然后在一个静止或旋转生物反应器中用一种培养基灌注。通过引入某些环境影响因素,这些细胞可融合成为肌管,然后再分化成为肌肉纤维²。生产的肌肉纤维然后就可以作为肉类予以采集、烹饪和食用。

van Eelen、van Kooten和Westerhof等人持有生产培养肉一般方法的荷兰专利³。但Catts和Zurr似乎是首先采用这种方法实际生产出肉类的人⁴。

支架型技术可能适合于生产处理过的(绞碎、无骨)肉类,如汉堡包或香肠。但不适合于生产具有较多结构的肉类,如肉排。欲生产这种肉需要一种更加雄心勃勃的方法,即在体外生产如自组型结构的结构性肌肉,或使既有肌肉增殖⁵。

自组型技术首先由Benjaminson、Gilchrist和Lorenz用于组织工程学,以便生产肉类⁶。他们将来自金鱼(红鲫)的骨骼肌移植物放置在多种培养基中培养七天。结果发现移植物表面面积有所增加,增加程度为5.2%至13.8%。将移植物放置在含有分离的鲫鱼骨骼肌细胞的培养基中后,移植物表面面积增加79%。

移植物的优势在于,其含有构成肌肉的所有细胞,且这些细胞按比例存在,从而非常接近在体内的结构。但由于缺乏血液供应,被分离的细胞脱离营养后如果超过0.5 mm就会死亡,因此这些移植物不可能有实质性生长⁵。

培养肉领域的今后研究将必须确保培养细胞、支架、培养基和生产因子不仅可以食用而且价格适中,从而解决目前技术所面临的问题。

1 荷兰Wageningen。

2 美国南达科他州Brookings南达科他州立大学动物归类学系。

3 美国南卡罗来纳州Charleston南卡罗来纳州医科大学细胞生物学和解剖学系。

4 美国马里兰州College Park马里兰大学农业和资源经济学系。

细胞

骨骼肌是一种由多种细胞类型组成的组织。骨骼肌纤维由胚胎成肌细胞经过增殖、分化和融合等过程生成。在新生动物体内，卫星细胞可形成较大的多核合体⁷。如果试图强迫骨骼肌纤维增殖通常会适得其反，因为大多数肌纤维核仍然处于有丝分裂期后状态²。胚胎干细胞尽管有较高的增殖和分化潜能，但也有一些不足，必须格外努力才能迫使它们分化，能够采集到的细胞数量有限。另外，目前尚不清楚，如果迫使胚胎干细胞朝向骨骼细胞发展后，这些干细胞是否会有胚胎干细胞的增殖特性，或无法与成肌细胞区分开。鉴此，生产培养肉的最实用细胞来源可能是胚胎成肌细胞或新生/新孵骨骼肌细胞（卫星细胞）。

现已从肉鸡、火鸡、肉猪、羊羔和牛体内分离出具有较高增殖潜能的卫星细胞，并已了解卫星细胞的特征⁸⁻¹²。对于以上每种动物，研究人员都采用了培养基，以便于细胞增殖和分化，在培养基内形成尚不成熟的肌肉纤维（肌管）。

最简单的培养肉系统是采用动物的一种肌肉细胞或与脂肪细胞一起培养。培养和采集后，即可制备细胞，作为处理肉类食用。复制未处理肉类的口感和质感将是更加雄心勃勃的下一个目标，因为这需要有血管细胞和成纤维细胞才能生成结缔组织。另外，这些细胞需要适当组合，以便生成立体结构。必须在适当的生长因子要素指导下，才能形成具有一定结构的骨骼肌组织。

目前尚不知一个细胞能生产多少培养肉。据信，培养基中的细胞经过一定次数的倍增，这被称之为海弗利克极限。农场动物肌肉祖细胞的海弗利克极限尚不十分清楚。有研究表明，以火鸡鸡胸肉克隆的卫星细胞表达为端粒酶¹³。此发现提示，某些家养动物的卫星细胞可能会生成足量的子代细胞，以便形成大量培养肉。（例如，粗略计算表明，一个海弗利克极限为75的母代细胞理论上将就可满足目前全球的肉类需求）。对于其它物种，有必要在分化为成肌细胞之前，在培养基中增殖出足量的干细胞，或有必要使用具有较高海弗利克极限的端粒酶基因转染细胞。

各种场

研究发现，力场、电磁场、重力场和液流场可以影响成肌细胞的增殖和分化^{2,14}。Powell等人发现，反复伸展和放松（程度为长度的10%）成肌细胞，每小时六次，可以促进其分化为肌管¹⁵。

* 我们兹此感谢匿名审稿人的建议。

Yuge和Kataoka将磁性微颗粒植入成肌细胞，然后将这些细胞放置在磁场中诱导分化，但未添加任何生长因子或培养基¹⁶。电刺激也可促进分化和既成肌管内的肌小节形成^{2,14}。

支架

成肌细胞必须依附后才能生长，即必须为其提供一个根基或支架后才能增殖和分化¹⁷。对于培养肉来说，支架及其副产品必须可以食用，且可以取自非动物来源。另外一种难题是制成一个可以机械性伸展附着细胞的支架，以刺激分化。还需要一个柔韧的根基，以防止生成的肌管分离。肌管通常会自发性收缩。

Cytodex 3微珠载体已被在旋转生物反应器中用做支架。但这微珠不具有伸展潜能。用来机械性伸展成肌细胞的一种方法是使用可食用的刺激敏感性多孔微球。这种微球由纤维素、海藻、壳聚糖或胶原制成，在温度或pH值发生轻微改变后，其表面面积至少变化10%。成肌细胞一旦附着在微球上后，既可以定期伸展。目前尚不知温度或pH值改变，或者球面弯曲度施加在细胞上的不同机械性应变对细胞增殖、粘着和生长有何影响。

理论上讲，可以在薄膜上或窄间隔阵列上培养大张的肌肉组织薄膜。可以通过最小的伸展运动诱导肌管排成列，从机械性能使肌肉组织薄膜处于适宜状态。可以从肉中抽取薄膜或纤维（例如，使用热反应性聚合物，和以温度改变从基质中分离出来的肌肉生物膜）。也可以用可食用材料制成薄膜或纤维。

分离的薄膜然后可以被折叠成一定厚度，并予以处理*。为未处理肉类制造支架有很多技术性难度，因为支架需要血管化。也许可以用可食用的弹性多孔材料制成分支性网络，以便于营养物质通过。成肌细胞和其它类型随后可以附着在网络上。研究人员已提出制造这类网络的方法，以满足组织工程学目的。根据这种方法，需先建立一个管型，然后将胶原溶液或生物相容性聚合物喷洒在管型上。

固化后，最初材料会被溶解，只留下一个带有微型管道的分支网络。此网络可以彼此重叠，形成一个立体网络¹⁸。但此方法无法批量生产。

另外，有人试图不用支架制造有结构的肉类。Benjaminson、Gilchrist和Lorenz等人提出，可以通过控制移植物的血管生成的方法解决血管化问题⁶。

培养基和生长因子

为获得优于常规肉类生产的种种潜在优势，培养肉类需要采用一种价格适中的培养基系统。这种培养基必须含有必需的营养成份，并须以自由形式适用于成肌细胞和随附细胞，因为此处不涉及消化系统。市售细胞培养基成份的改进提高了我们成功培养多种动物细胞的能力。

McFarland等人研发了一种无血浆培养基，此培养基可有助于火鸡卫星细胞在培养基中增殖⁸。Kosnik、Dennis和Vandenburgh引用了Allen等人、Dollenmeier等人和Ham等人研发的无血浆培养基²。Benjaminson等人成功地采用了来自舞茸提取物的无血浆培养基。与胚胎牛血浆培养基比较，此培养基显著提高了生长速度⁶。研究发现，诸如鞘氨醇磷酸酯的脂类可以取代血浆，用于支持培养组织移植物的生长和分化（南卡罗来纳州大学W.S. Argraves的2004年5月22日个人信函）。

除要为生长中的肌肉细胞提供适当营养外，还必须提供一系列适当的生长因子。生长因子有肌肉细胞合成和释放，组织内的其它细胞也在局部性（旁分泌效应）和全身性（内分泌效应）提供生长因子。肝脏是循环性胰岛素样生长因子I的主要来源。可以研发适当的共同培养系统，以便肝脏细胞能够为培养肉类生产提供必需的生长因子。

研究人员通常通过降低促有丝分裂的生长因子水平来启动分化和融合过程。分化中的细胞然后会开始合成胰岛素样生长因子II，此生长因子回引起多核肌管的分化和形成¹⁹。因此，成功的培养系统必须能够改变培养基中的生长因子构成。

生物反应器

已有研究讨论了生物反应器的设计对组织工程学的重要性^{20,21}。培养肉生产可能需要新型生物反应器，此反应器应能保持较低的剪切力和均匀的大容量灌注。许多骨骼肌组织工程学研究采用NASA旋转式生物反应器。

这些反应器的主要优点是，细胞处于近乎连续悬浮状态，液体剪切力最低，悬浮有利于组织形成最多1 cm直径。这些反应器保持生物量浓度高达每毫升108个细胞。研究用尺寸的旋转式生物反应器（10至250 mL）已增加至3 L。在理论上讲，增加至工业规模不应该会影响系统的物理性能。现已有工业规模的低剪切力颗粒性生物膜反应器，生物量浓度高达每立方米30公斤。

结论

与常规肉类比较，培养肉类有以下优势：可以更好地控制培养肉类的饱和与多不饱和脂肪酸比率；可以显著降低食物源性疾病的发病率；可以更有效地利用资源，因为不再需要运动和繁殖所需的生物学结构。培养肉类是否在经济上切实可行是另外一个问题。许多组织工程学人员已就其前景作出预测和估计²³。

从技术上讲，培养肉类是可行的，至少采用支架型技术的培养肉类是这样。但在大规模生产培养肉类之前，还有许多重要难题有待克服。总体来说，大多数难题与骨骼肌组织工程学所共有的难题。促进肌肉纤维发育所需的环境影响因素尚不十分清楚，而且尚不知哪些影响因素对培养肉类生产是必需的。但是，可以安全地说，大多数肌肉组织工程学临床应用的功能性水平已超过生产培养肉类所需要的水平，以便使培养肉类在营养学和美观方面与常规肉类充分地接近。这样，培养肉类所面临的技术性难题就少于以工程方法制造功能性肌肉的难题。如果能侧重于适用于处理肉类制品的支架型技术和支持这些技术的价格适中的无血浆培养基，未来的研究将更加富有成果。

参考文献

1. Churchill, W. Fifty years hence. In: Thoughts and Adventures. London: Thornton Butterworth, 1932, pp. 24 - 27.
2. Kosnik, P.E., Dennis, R.G., and Vandenberg, H.H. Tissue engineering skeletal muscle. In: Guilak, F., ed. Functional Tissue Engineering. New York: Springer-Verlag, 2003, pp. 377 - 392.
3. van Eelen, W. F., van Kooten, W. J., and Westerhof, W. Industrial scale production of meat from *in vitro* cell cultures. Patent description, 1999. Available at URL http://12.espacenet.com/espacenet/viewer?PN_WO9931222 (accessed February 2005).
4. Catts, O., and Zurr, I. Growing semi-living sculptures: The tissue culture & art project. Leonardo **35**, 365, 2002.
5. Dennis, R.G., and Kosnik, P.E. Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered *in vitro*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. **36**, 327, 2000.
6. Benjaminson, M., Gilchrist, J., and Lorenz, M. *In vitro* edible muscle protein production system (MPPS): Stage 1, fish. Acta Astronaut. **51**, 879, 2002.
7. McFarland, D.C. Influence of growth factors on poultry myogenic satellite cells. Poultry Sci. **78**, 747, 1999.
8. McFarland, D.C., Pesall, J.E., Norberg, J.M., and Dvoracek, M.A. Proliferation of the turkey myogenic satellite cell in a serum-free medium. Comp. Biochem. Physiol. **99A**, 163, 1991.
9. McFarland, D.C., Gilkerson, K.K., Pesall, J.E., Wellenreiter, R.H., Ferrin, N.H., Ye, W.V., Yun, Y., and Vander Wal, L.S. Comparison of the growth factor receptors and metabolic characteristics of satellite cells derived from the biceps femoris and pectoralis major muscles of the turkey. Gen. Comp. Endocrinol. **105**, 114, 1997.
10. Blanton, J.R., Grant, A.L., McFarland, D.C., Robinson, J.P., and Bidwell, C.A. Isolation of two populations of myoblasts from porcine skeletal muscle. Muscle Nerve **22**, 43, 1999.
11. Dodson, M.V., McFarland, D.C., and Martin, E.L. Isolation of satellite cells from bovine muscles. J. Tissue Culture Methods **10**, 233, 1986.
12. Dodson, M.V., Martin, E.L., Brannon, M.A., Mathison, B.A., and McFarland, D.C. Optimization of bovine satellite cell-derived myotube formation *in vitro*. Tissue Cell **19**, 159, 1987.
13. Mozdziak, P.E., McFarland, D.C., and Schultz, E. Telomeric profiles and telomerase activity in turkey satellite cell clones with different growth rates. Biochim. Biophys. Acta **1492**, 362, 2000.
14. De Deyne, P.G. Formation of sarcomeres in developing myotubes: Role of mechanical stretch and contractile activation. Am. J. Physiol. Cell Physiol. **279**, C1801, 2000.
15. Powell, C.A., Smiley, B.L., Mills, J., and Vandenberg, H.H. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. Am. J. Physiol. Cell Physiol. **283**, C1557, 2002.
16. Yuge, L., and Kataoka, K. Differentiation of myoblasts accelerated in culture in a magnetic field. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. **36**, 383, 2000.
17. Stoker, M., O'Neil, C., Berryman, S., and Waxman, V. Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. Int. J. Cancer **3**, 683, 1968.
18. Borenstein, J.T., Terai, H., King, K.R., Weinberg, E.J., Kaazempur-Mofrad, M.R., and Vacanti, J.P. Microfabrication technology for vascularized tissue engineering. Biomed. Microdevices **4**, 167, 2002.
19. Florini, J.R., Magri, K.A., Ewton, D.Z., James, P.L., Grindstaff, K., and Rotwein, P.S. Spontaneous differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. J. Biol. Chem. **266**, 15917, 1991.
20. Martin, I., Wendt, D., and Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. Trends Biotechnol. **22**, 80, 2004.
21. Freed, L.E., and Vunjak-Novakovic, G. Tissue engineering bioreactors. In: Lanza, R.P., Langer, R., and Vacanti, J., eds. Principles of Tissue Engineering, 2nd Ed. San Diego, CA: Academic Press, 2000, pp. 143 - 156.
22. Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C., and Heijnen, S.J. Particle-based biofilm reactor technology. Trends Biotechnol. **18**, 312, 2000.
23. Wolfson, W. Raising the steaks. New Scientist **176**, 60, 2002.

如欲单印, 请联系:

J.G. Matheny, M.P.H.

Department of Agricultural and Resource
Economics

University of Maryland

6843 Eastern Avenue

College Park, MD 20912

电子邮件地址: jmatheny@jhsph.edu