

## 述評

# 體外培養肉類生產

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

### 前言

儘管肉類一直是人們比較喜歡的一種食物,但越來越多的消費者開始對肉類消費和生產的某些後果感到擔憂。這些後果包括與營養有關的疾病、食物源性疾病、資源利用和污染、農場動物的利用等。我們在此綜述了用組織工程技術在體外生產可食用動物肌肉(即肉類)的可能性。與傳統的肉類相比,“培養的肉類”有許多健康和環保方面的優勢,由於生產培養肉所需要的技術也不是遙不可及。對於組織工程人員來說,這是一個十分有意義的課題,因為培養肉生產只是應用組織工程學原理而已,這些原理的技術性難題可能比許多臨床應用的難題要容易得多。

### 培養肉生產

大多數可食用動物肉是由骨骼肌組成。早在七十多年前<sup>1</sup>,人們就萌發了將骨骼肌組織工程技術用於可食用肉類生產的想法,但只有三個研究小組認真開展了這方面的研究。他們的研究可大致分為支架型和自組型技術。

支架型技術是將胚胎成肌細胞或成年骨骼肌衛星細胞增殖後固定在一個支架或載體(如膠原網或微珠載體)上,然後在一個靜止或旋轉生物反應器中用一種培養基灌註。通過引入某些環境影響因素,這些細胞可融合成為肌管,然後再分化成為肌肉纖維<sup>2</sup>。生產的肌肉纖維然後就可以作為肉類予以采集、烹飪和食用。

van Eelen、van Kooten和Westerhof等人持有生產培養肉一般方法的荷蘭專利<sup>3</sup>。但Catts和Zurr似乎是首先採用這種方法實際生產出肉類的人<sup>4</sup>。

支架型技術可能適合於生產處理過的(絞碎、無骨)肉類,如漢堡包或香腸。但不適合於生產具有較多結構的肉類,如肉排。欲生產這種肉需要一種更加雄心勃勃的方法,即在體外生產如自組型結構的結構性肌肉,或使既有肌肉增殖<sup>5</sup>。

自組型技術首先由Benjaminson、Gilchrist和Lorenz用於組織工程學,以便生產肉類<sup>6</sup>。他們將來自金魚(紅鯽)的骨骼肌移植物放置在多種培養基中培養七天。結果發現移植物表面面積有所增加,增加程度為5.2%至13.8%。將移植物放置在含有分離的鯽魚骨骼肌細胞的培養基中後,移植物表面面積增加79%。

移植物的優勢在於,其含有構成肌肉的所有細胞,且這些細胞按比例存在,從而非常接近在體內的結構。但由於缺乏血液供應,被分離的細胞脫離營養後如果超過0.5 mm就會死亡,因此這些移植物不可能有實質性生長<sup>5</sup>。

培養肉領域的今後研究將必須確保培養細胞、支架、培養基和生產因子不僅可以食用而且價格適中,從而解決目前技術所面臨的問題。

1 荷蘭Wageningen。

2 美國南達科他州Brookings南達科他州立大學動物歸類學系。

3 美國南卡羅來納州Charleston南卡羅來納州醫科大學細胞生物學和解剖學系。

4 美國馬裏蘭州College Park馬裏蘭大學農業和資源經濟學系。

## 細胞

骨骼肌是一種由多種細胞類型組成的組織。骨骼肌纖維由胚胎成肌細胞經過增殖、分化和融合等過程生成。在新生動物體內，衛星細胞可形成較大的多核合胞體<sup>7</sup>。如果試圖強迫骨骼肌纖維增殖通常會適得其反，因為大多數肌纖維核仍然處於有絲分裂期後狀態<sup>2</sup>。胚胎幹細胞儘管有較高的增殖和分化潛能，但也有一些不足，必須格外努力才能迫使它們分化，能夠采集到的細胞數量有限。另外，目前尚不清楚，如果迫使胚胎幹細胞朝向骨骼細胞發展後，這些幹細胞是否會有胚胎幹細胞的增殖特性，或無法與成肌細胞區分開。鑒此，生產培養肉的最實用細胞來源可能是胚胎成肌細胞或新生/新孵骨骼肌細胞（衛星細胞）。

現已從肉雞、火雞、肉豬、羊羔和牛體內分離出具有較高增殖潛能的衛星細胞，並已了解衛星細胞的特征<sup>8-12</sup>。對於以上每種動物，研究人員都採用了培養基，以便於細胞增殖和分化，在培養基內形成尚不成熟的肌肉纖維（肌管）。

最簡單的培養肉系統是采用動物的一種肌肉細胞或與脂肪細胞一起培養。培養和采集後，即可制備細胞，作為處理肉類食用。復制未處理肉類的口感和質感將是更加雄心勃勃的下一個目標，因為這需要血管細胞和成纖維細胞才能生成結締組織。另外，這些細胞需要適當組合，以便生成立體結構。必須在適當的生長因子要素指導下，才能形成具有一定結構的骨骼肌組織。

目前尚不知一個細胞能生產多少培養肉。據信，培養基中的細胞經過一定次數的倍增，這被稱之為海弗利克極限。農場動物肌肉祖細胞的海弗利克極限尚不十分清楚。有研究表明，以火雞雞胸肉克隆的衛星細胞表達為端粒酶<sup>13</sup>。此發現提示，某些家養動物的衛星細胞可能會生成足量的子代細胞，以便形成大量培養肉。（例如，粗略計算表明，一個海弗利克極限為75的母代細胞理論上將就可滿足目前全球的肉類需求）。對於其它物種，有必要在分化為成肌細胞之前，在培養基中增殖出足量的幹細胞，或有必要使用具有較高海弗利克極限的端粒酶基因轉染細胞。

## 各種場

研究發現，力場、電磁場、重力場和液流場可以影響成肌細胞的增殖和分化<sup>2,14</sup>。Powell 等人發現，反復伸展和放鬆（程度為長度的 10%）成肌細胞，每小時六次，可以促進其分化為肌管<sup>15</sup>。

\* 我們茲此感謝匿名審稿人的建議。

Yuge和Kataoka 將磁性微顆粒植入成肌細胞，然後將這些細胞放置在磁場中誘導分化，但未添加任何生長因子或培養基<sup>6</sup>。電刺激也可促進分化和既成肌管內的肌小節形成<sup>2,14</sup>。

## 支架

成肌細胞必須依附後才能生長，即必須為其提供一個根基或支架後才能增殖和分化<sup>17</sup>。對於培養肉來說，支架及其副產品必須可以食用，且可以取自非動物來源。另外一種難題是制成一個可以機械性伸展附著細胞的支架，以刺激分化。還需要一個柔韌的根基，以防止生成的肌管分離。肌管通常會自發性收縮。

Cytodex 3微珠載體已被在旋轉生物反應器中用做支架。但這微珠不具有伸展潛能。用來機械性伸展成肌細胞的一種方法是使用可食用的刺激敏感性多孔微球。這種微球由纖維素、海藻、殼聚糖或膠原制成，在溫度或pH值發生輕微改變後，其表面面積至少變化10%。成肌細胞一旦附著在微球上後，既可以定期伸展。目前尚不知溫度或pH值改變，或者球面彎曲度施加在細胞上的不同機械性應變對細胞增殖、粘著和生長有何影響。

理論上講，可以在薄膜上或窄間隔列陣上培養大張的肌肉組織薄膜。可以通過最小的伸展運動誘導肌管排成列，從機械性能使肌肉組織薄膜處於適宜狀態。可以從肉中抽取薄膜或纖維（例如，使用熱反應性聚合物，和以溫度改變從基質中分離出來的肌肉生物膜）。也可以用可食用材料制成薄膜或纖維。

分離的薄膜然後可以被折疊成一定厚度，並予以處理\*。為未處理肉類制造支架有很多技術性難度，因為支架需要血管化。也許可以用可食用的彈性多孔材料制成分支性網絡，以便於營養物質通過。成肌細胞和其它類型隨後可以附著在網絡上。研究人員已提出制造這類網絡的方法，以滿足組織工程學目的。根據這種方法，需先建立一個管型，然後將膠原溶液或生物兼容性聚合物噴灑在管型上。

固化後，最初材料會被溶解，只留下一個帶有微型管道的分支網絡。此網絡可以彼此重疊，形成一個立體網絡<sup>18</sup>。但此方法無法批量生產。

另外，有人試圖不用支架制造有結構的肉類。Benjaminson、Gilchrist 和 Lorenz 等人提出，可以通過控制移植物的血管生成的方法解決血管化問題<sup>6</sup>。

## 培養基和生長因子

為獲得優於常規肉類生產的種種潛在優勢，培養肉類需要採用一種價格適中的培養基系統。這種培養基必須含有必需的營養成份，並須以自由形式適用於成肌細胞和隨附細胞，因為此處不涉及消化系統。市售細胞培養基成份的改進提高了我們成功培養多種動物細胞的能力。

McFarland等人研發了一種無血漿培養基，此培養基可有助於火雞衛星細胞在培養基中增殖<sup>8</sup>。Kosnik、Dennis和Vandenburgh引用了Allen等人、Dollenmeier等人和Ham等人研發的無血漿培養基<sup>2</sup>。Benjaminson等人成功地採用了來自舞茸提取物的無血漿培養基。與胚胎牛血漿培養基比較，此培養基顯著提高了生長速度<sup>6</sup>。研究發現，諸如鞘氨醇磷酸酯的脂類可以取代血漿，用於支持培養組織移植物的生長和分化（南卡羅來納州大學W.S. Argraves的2004年5月22日個人信函）。

除要為生長中的肌肉細胞提供適當營養外，還必須提供一系列適當的生長因子。生長因子有肌肉細胞合成和釋放，組織內的其它細胞也在局部性（旁分泌效應）和全身性（內分泌效應）提供生長因子。肝臟是循環性胰島素樣生長因子I的主要來源。可以研發適當的共同培養系統，以便肝臟細胞能夠為培養肉類生產提供必需的生長因子。

研究人員通常通過降低促有絲分裂的生長因子水平來啟動分化和融合過程。分化中的細胞然後會開始合成胰島素樣生長因子II，此生長因子回引起多核肌管的分化和形成<sup>19</sup>。因此，成功的培養系統必須能夠改變培養基中的生長因子構成。

## 生物反應器

已有研究討論了生物反應器的設計對組織工程學的重要性<sup>20,21</sup>。培養肉生產可能需要新型生物反應器，此反應器應能保持較低的剪切力和均勻的大容量灌註。許多骨骼肌組織工程學研究採用NASA旋轉式生物反應器。

這些反應器的主要優點是，細胞處於近乎連續懸浮狀態，液體剪切力最低，懸浮有利於組織形成最多1 cm直徑。這些反應器保持生物量濃度高達每毫升108個細胞。研究用尺寸的旋轉式生物反應器（10至250 mL）已增加至3 L。在理論上講，增加至工業規模不應該會影響系統的物理性能。現已有工業規模的低剪切力顆粒性生物膜反應器，生物量濃度高達每立方米30公斤。

## 結論

與常規肉類比較，培養肉類有以下優勢：可以更好地控制培養肉類的飽和與多不飽和脂肪酸比率；可以顯著降低食物源性疾病的發病率；可以更有效地利用資源，因為不再需要運動和繁殖所需的生物學結構。培養肉類是否在經濟上切實可行是另外一個問題。許多組織工程學人員已就其前景作出預測和估計<sup>23</sup>。

從技術上將，培養肉類是可行的，至少採用支架型技術的培養肉類是這樣。但在大規模生產培養肉類之前，還有許多重要難題有待克服。總體來說，大多數難題與骨骼肌組織工程學所共有的難題。促進肌肉纖維發育所需的環境影響因素尚不十分清楚，而且尚不知哪些影響因素對培養肉類生產是必需的。但是，可以安全地說，大多數肌肉組織工程學臨床應用的功能性水平已超過生產培養肉類所需要的水平，以便使培養肉類在營養學和美觀方面與常規肉類足夠地接近。這樣，培養肉類所面臨的技術性難題就少於以工程方法制造功能性肌肉的難題。如果能側重於適用於處理肉類制品的支架型技術和支持這些技術的價格適中的無血漿培養基，未來的研究將更加富有成果。

## 參考文獻

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 Vandeburgh, 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](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 Vandeburgh, 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.

如欲單印，請聯絡：

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

Department of Agricultural and Resource  
Economics

University of Maryland

6843 Eastern Avenue

College Park, MD 20912

電子郵件地址: [jmatheny@jhsph.edu](mailto:jmatheny@jhsph.edu)