南京农业大学学报 2026,49(5):1245-1258
Journal of Nanjing Agricultural University
http://nauxb.njau.edu.cn
DOI:10.7685/jnau.202605002

郭仁朋,刘政,姜雨萱,等. 细胞培养肉种子细胞研究进展[J]. 南京农业大学学报,2026,49(5):1245-1258.
Guo R P,Liu Z,Jiang Y X,et al. Research progress on seed cells for cultured meat[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(5):1245-1258.

特约综述

细胞培养肉种子细胞研究进展

郭仁朋[1*],刘政[1],姜雨萱[1],陈心怡[1],郑宇[1],丁世杰[2],李春保[1],周光宏[1]

(1.南京农业大学食品科学技术学院/肉品质量控制与新资源创制全国重点实验室,江苏 南京 211800;
2.南京周子未来食品科技有限公司,江苏 南京 211225)

摘要:细胞培养肉是利用可食用动物细胞生产肉类的技术,是新质蛋白研究领域的前沿方向。种子细胞是细胞培养肉产业化的源头材料,其高效获取、规模化扩增、安全性与稳定性决定着生产成本和产品品质。然而,原代种子细胞在长期传代中普遍存在细胞衰老与干性衰退问题,且难以适应无血清悬浮条件,是限制细胞培养肉工业化生产的关键瓶颈。本文综述了种子细胞的来源与分类,梳理了高效分离策略、体外长期扩增、无血清悬浮培养、分化调控与三维组织构建、质量安全评价等关键环节的研究进展与技术挑战。面向细胞培养肉规模化生产需求,本文明确了种子细胞应满足的质量标准,并提出通过性能优化、工艺提升与质控升级,构建覆盖细胞制备、扩增与评价的系统性技术方案,以期加快我国细胞培养肉产业化进程。

关键词:细胞培养肉;种子细胞;长期传代;规模化扩增;安全评价
中图分类号:TS251.1;Q813.1 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-2030(2026)05-1245-14

Research progress on seed cells for cultured meat

GUO Renpeng[1*],LIU Zheng[1],JIANG Yuxuan[1],CHEN Xinyi[1],ZHENG Yu[1],
DING Shijie[2],LI Chunbao[1],ZHOU Guanghong[1]

(1. College of Food Science and Technology/State Key Laboratory of Meat Quality Control and Cultured Meat Development, Nanjing Agricultural University,Nanjing 211800,China;2. Joes Future Food Technology Co.,Ltd.,Nanjing 211225,China)

Abstract:Cultured meat is a technology that produces meat using edible animal cells,representing a cutting-edge direction in the field of new quality protein. Seed cells serve as the fundamental starting material for the industrialization of cultured meat,and their efficient isolation,large-scale expansion,safety and stability directly determine production costs and product quality. However,primary seed cells commonly suffer from cellular senescence and stemness decline during long-term passaging,and struggle to adapt to serum-free suspension conditions,which has become the key bottleneck restricting the industrial production of cultured meat. This paper reviewed the sources and classification of seed cells,and summarized the research progress and technical challenges in key aspects including efficient isolation strategies,long-term *in vitro* expansion,serum-free suspension culture,differentiation regulation,three-dimensional tissue construction,and quality and safety assessment. To meet the demand for large-scale production of cultured meat,this paper defines the quality standards that seed cells should meet,and proposes to construct a systematic technical scheme covering cell preparation,expansion and evaluation through performance optimization,process improvement and quality control upgrading,aiming to accelerate the industrialization process of cultured meat in China.

Keywords:cultured meat;seed cells;long-term passaging;large-scale expansion;safety assessment

随着全球人口增长与资源环境约束加剧,传统畜牧业在满足日益扩大的高品质动物蛋白需求方面面临挑战。细胞培养肉作为一种基于动物细胞体外培养生产可食用肉类的前沿技术,因其生产周期短、资源消耗少、环境友好等优势,已成为新质蛋白领域的研究热点[1-2]。近十几年来,全球细胞培养肉行业在基础研究与技术转化层面取得长足进步:2013 年荷兰 Mark J. Post 教授制作出世界首块细胞培养牛肉汉堡,将理念变为现实;2019 年南京农业大学周光宏教授团队创制中国首块细胞培养猪肉[3];2025 年周子未来食品科技有限公司建成全球第一条年生产能力达到吨级的细胞培养猪肉生产线;截至 2026 年 4 月,新加

收稿日期:2026-05-06
基金项目:国家自然科学基金项目(32272468)
作者简介:郭仁朋,副教授,主要从事动物干细胞、细胞培养肉研究,E-mail:guorp@njau.edu.cn。*通信作者。

坡、美国、以色列、澳大利亚、英国已陆续批准 10 家企业的细胞培养肉产品上市销售，产业整体正处于从中试规模向万升级工业化生产跨越的关键阶段[4]。

种子细胞作为培养肉生产的源头材料，其增殖能力、培养适应性及安全稳定性直接决定了规模化生产路径、成本与产品品质。当前，基础研究普遍使用的肌肉干细胞等原代成体干细胞，虽然在分化能力方面具有天然优势，但在体外连续传代过程中会发生细胞衰老与干性衰退，难以支撑工业级生产的需求[5]。同时，多数种子细胞体外培养时呈贴壁性生长且依赖动物血清，对无血清与悬浮培养环境的适应能力较差，显著提升了成本、限制了大规模培养。因此，如何突破原代细胞增殖极限，维持体外长期扩增过程中的功能特性并实现由贴壁向悬浮生长模式的转变，已成为制约培养肉产业化落地的关键科学问题。近年来，研究者围绕上述问题从多个维度展开了系统探索。在细胞来源层面，不同物种、不同组织来源的种子细胞在增殖活性与分化效能上呈现显著差异，基于不同细胞特性建立了有效的分离纯化方法，为优质起始材料的获取提供了技术保障[6]。在扩增策略层面，自然突变驱动的连续细胞系以及基于靶向基因调控的工程化细胞系的建立，为实现种子细胞长期稳定传代开辟了新路径[7-8]。在培养体系层面，通过对细胞关键信号通路与营养代谢机制的干预，开发了化学成分明确的无血清培养基，有效提升了种子细胞的扩增能力并显著降低了成本[9]。在规模化放大层面，微载体悬浮培养与无载体悬浮驯化技术的迭代，正在推动种子细胞从传统贴壁培养向高密度悬浮培养的模式跃迁[10]。在分化调控与组织构建方面，种子细胞与支架材料的互作机制解析，有助于制备具有复杂肉类结构的高品质细胞培养肉产品[11]。在质量安全评价方面，业界已建立起系统性评估种子细胞功能维持、染色体与基因组稳定、成瘤风险的技术体系，且新兴技术手段如深度学习预测正逐步应用[12]，有望显著提升种子细胞评估的智能化水平。

本文围绕种子细胞在培养肉生产中的基础性作用，从高效分离获取、体外长期扩增、无血清悬浮培养及质量安全评价等方面，系统梳理国内外研究进展、技术挑战与解决路径（图 1）。在此基础上，提出面向细胞培养肉规模化生产，种子细胞需满足的质量标准和达成路径，以期为我国细胞培养肉产业的规模化、低成本、标准化发展提供参考。

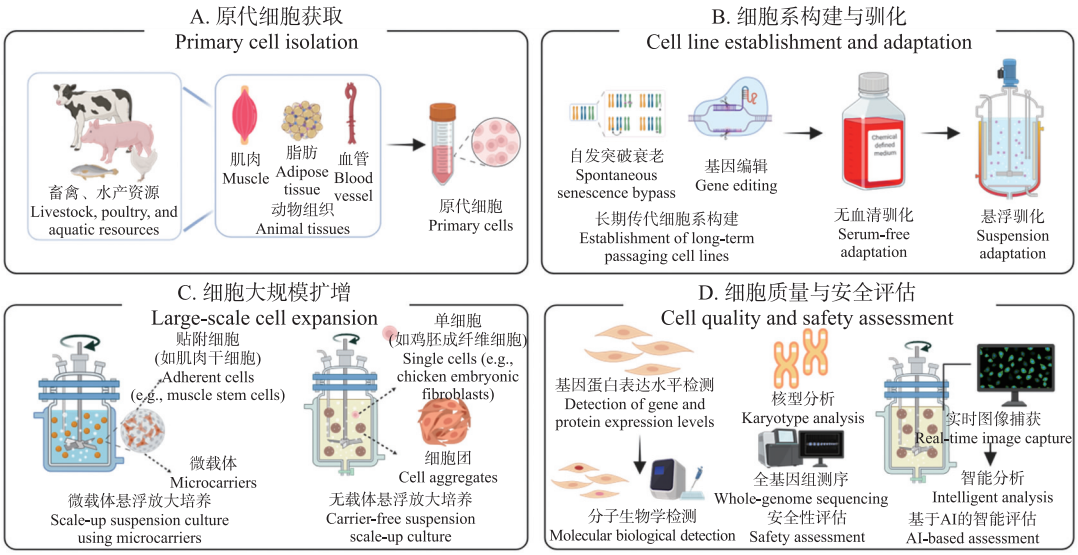

图 1 面向细胞培养肉产业化的种子细胞制备、扩增与评价的技术流程图

Fig. 1 Technical flowchart of seed cell preparation, expansion and evaluation for cultured meat industrialization

1 种子细胞来源与分类

目前用于培养肉研究和生产的种子细胞来源广泛，主要类型包括成体干细胞、多能干细胞以及长期传代细胞系，不同的种子细胞在获取方法、增殖能力、分化潜能以及监管接受度方面存在显著差异[5]。成体干细胞是存在于动物体特定器官和组织中未分化的细胞，具备有限的自我更新能力和特定谱系分化潜能，培养肉研发中使用较多的有肌肉干细胞、成纤维-脂肪祖细胞、脂肪前体细胞等。多能干细胞具备无限自我更新能力和多谱系分化潜能，包括胚胎干细胞、诱导多能干细胞等。长期传代细胞系是指通过自发突变或人为干预，可以突破衰老阻滞，具有持续增殖能力的细胞系。

从物种来源看,培养肉涉及的种子细胞类型已从最初的牛、猪等传统家畜,扩展至禽类和鱼类。牛源种子细胞的研究体系构建最早,牛肌肉干细胞、脂肪前体细胞相关的研究为培养肉领域贡献了大量有价值的科学发现,并提供了有力的技术支撑[13-14],使用牛多能干细胞生产培养牛排的技术路线已通过监管审批。猪源种子细胞是中国的优势与特色方向,南京农业大学细胞培养肉研究团队基于猪肌源性细胞,建立起了覆盖基础研究、技术开发、规模化生产与营养安全评价的培养肉产业化路径[3,11,15-16]。鸡源种子细胞来源丰富、较易分离,代表性的鸡胚成纤维细胞易于长期传代且适应无血清悬浮培养[7],其在产业化进程中具有独特优势,目前已有至少 5 种基于鸡源种子细胞的培养肉产品通过审批。相比之下,羊源种子细胞研究较少,相关报道集中于肌肉干细胞的分离培养[17]。鱼源种子细胞虽研究起步较晚,已逐步建立起肌肉干细胞和脂肪前体细胞的分离纯化、干性维持、定向分化与规模化培养体系[18]。

1.1　肌肉干细胞

肌肉干细胞又称为肌卫星细胞,是位于肌纤维膜和基底膜之间的成体干细胞,主要负责肌肉损伤修复与再生[19]。由于肌肉干细胞天然具有成肌特性,无需复杂条件即可分化形成肌纤维,使其成为培养肉研究中最经典的种子细胞[20]。不同物种、不同年龄以及不同解剖部位获得的肌肉干细胞,在增殖速率、干性维持能力和分化潜力方面存在较大差异[21]。通常幼龄动物来源的细胞活性更高,部分代谢旺盛或再生能力较强的肌肉部位也更有利于获得状态较好的细胞群体[22]。肌肉组织中含有多种细胞类型,基于不同细胞的贴壁特性与特异性表面标志物,可分离分选获得高纯度的原代肌肉干细胞[6]。肌肉干细胞在体外传代过程中存在干性衰退现象,表现为增殖减慢、成肌因子表达下降、分化能力降低甚至丧失[14],限制了其在细胞培养肉产业化中的应用。目前,针对肌肉干细胞的研究逐步从分离培养扩展到长期传代细胞系构建、无血清培养体系优化、微载体适配与三维组织构建,希望通过细胞工程、生物工艺和组织工程的协同,突破其体外扩增能力不足的局限,建立起基于成肌细胞的培养肉生产路径。

1.2　成纤维–脂肪祖细胞与脂肪前体细胞

成纤维–脂肪祖细胞是存在于骨骼肌间质中的一类具有双向分化潜能的祖细胞群体,在特定诱导条件下可分化为脂肪细胞或成纤维细胞。脂肪前体细胞主要包括脂肪组织中的前脂肪细胞及部分具有成脂倾向的基质细胞[23]。这 2 类细胞虽在组织来源上有所区别,但均具备高效成脂分化潜能,经体外定向诱导后可形成富含脂滴的成熟脂肪细胞[24]。面向细胞培养肉产业化,成脂细胞能够为产品提供脂肪组分,模拟传统肉类大理石花纹与质构特征,同时显著提升培养肉的特征风味与多汁口感[25]。同时,肌脂细胞共培养与协同分化是提升培养肉质构与营养品质的重要路径。然而,成肌与成脂的谱系分化路径和诱导条件存在固有差异,如何在共培养体系中实现 2 类细胞的同步维持与有序分化,仍面临细胞间复杂互作与培养基选择的双重挑战[26]。此外,成脂细胞虽然在体外培养过程中同样面临干性衰退的问题,但成脂特性较易获得,通过自发诱导、转分化等非基因操作手段可建立稳定成脂细胞系,且在无血清悬浮条件下有较好的适应性[7,27]。

1.3　多能干细胞

来自早期胚胎或经重编程获得的多能干细胞,如胚胎干细胞、上胚层干细胞、诱导多能干细胞,能够自我更新且具有分化形成成体所有细胞类型的潜能,在培养肉领域有较好的应用前景。得益于生物育种与大动物干细胞研究的积累,猪、牛、羊来源的多能干细胞能够为多组织、营养可控细胞培养肉的制备提供稳定的种子细胞来源[28]。Zhu 等[29]基于前期建立的能够长期维持多能性状态的猪上胚层干细胞系,构建了多能干细胞向肌肉、脂肪及血管内皮细胞的多谱系分化系统,并结合无支架悬浮培养体系,实现了一种细胞来源的多组织细胞培养肉的制备[30]。在细胞培养肉产业化背景下,多能干细胞面临一些技术挑战:1)细胞获取难度较大,胚胎干细胞、上胚层干细胞的分离建系有一定的技术门槛,诱导多能干细胞可能因引入外源因子而提升生物安全风险;2)扩大培养有挑战,多能干细胞倾向于结团生长,大规模培养的效率与稳定性需进一步探究;3)定向分化需优化,由多能干细胞分化成为特定功能细胞往往需要经历较长的分化周期和较为复杂的诱导过程,未来需关注如何简化流程、提升效率、降低成本。

1.4　长期传代细胞系

长期传代细胞系是通过自发突变或基因工程干预突破细胞衰老阻滞获得无限增殖能力的细胞群体,为解决原代细胞体外传代干性衰退、扩增能力有限的产业化瓶颈提供了重要解决方案。根据获得方式不同,长期传代细胞系可分为自发连续细胞系和基因工程细胞系,二者在技术路径和应用前景上存在显著差

异。代表性的长期传代细胞系见表 1。

表 1 细胞培养肉长期传代细胞系概况

Table 1 Overview of long-term passaging cell lines for cultured meat

物种 Species	细胞类型/细胞系 Cell type/cell line	构建方法 Establishment method	关键特征 Key characteristics	参考文献 Reference
牛 Cattle	肌肉干细胞/iBSCs Muscle stem cells/iBSCs	*TERT*/*CDK4* 共表达 Co-expression of *TERT*/*CDK4*	可长期增殖并保持成肌分化能力 Capable of long-term proliferation while retaining myogenic differentiation potential	[31]
	成纤维细胞 Fibroblasts	自发连续 Spontaneous immortalization	长期扩增后获得稳定增殖能力,已实现无血清悬浮培养 Stable proliferative capacity acquired after long-term expansion; serum-free suspension culture has been achieved	[32]
猪 Pig	肌肉干细胞 Muscle stem cells	CRISPR/Cas9 敲除 *CDKN2A*/*p16* CRISPR/Cas9-mediated knockout of *CDKN2A*/*p16*	可长期稳定传代,已建立无血清扩增与成肌分化体系 Capable of stable long-term passaging; serum-free expansion and myogenic differentiation systems have been established	[15]
	肌源性细胞系/PM166 Myogenic cell line/PM166	*TERT*/*CDK4* 共表达 Co-expression of *TERT*/*CDK4*	可长期稳定传代,已建立无血清扩增和成肌分化体系 Capable of stable long-term passaging; serum-free expansion and myogenic differentiation systems have been established	[8]
	间充质干细胞/FaTTy Mesenchymal stem cells/FaTTy	自发连续 Spontaneous immortalization	成脂效率接近 100%,可在二维和三维体系中分化,已建立无血清成脂分化体系 Adipogenic efficiency approaches 100%; capable of differentiation in two-dimensional and three-dimensional systems; a serum-free adipogenic differentiation system has been established	[33]
鸡 Chicken	胚胎成纤维细胞 Embryonic fibroblasts	自发连续 Spontaneous immortalization	长期扩增后获得稳定增殖能力,已实现无血清悬浮培养 Stable proliferative capacity acquired after long-term expansion; serum-free suspension culture has been achieved	[7]
鱼 Fish	褐点石斑鱼肌肉干细胞系/EfMS Brown-marbled grouper muscle stem cell line/EfMS	自发连续 Spontaneous immortalization	可长期传代,保持成肌分化和成脂转分化能力 Capable of long-term passaging while retaining myogenic differentiation and adipogenic transdifferentiation potential	[27]
	虹鳟肌肉干细胞系/RTMS Rainbow trout muscle stem cell line/RTMS 脂肪来源干细胞系/RTADS Adipose-derived stem cell line/RTADS	自发连续 Spontaneous immortalization	RTMS 可维持肌源性分化能力至 56 代,RTADS 可维持成脂分化能力至 34 代 RTMS maintains myogenic differentiation potential up to passage 56, while RTADS maintains adipogenic differentiation potential up to passage 34	[34]
	大西洋鲑连续肌肉细胞系/SsMCs Atlantic salmon continuous muscle cell line/SsMCs	自发连续 Spontaneous immortalization	具有稳定增殖、成肌分化和成脂转分化能力 Exhibits stable proliferation, myogenic differentiation, and adipogenic transdifferentiation potential	[35]

细胞在体外长期培养和筛选过程中,通过染色体重排与表观遗传重塑等遗传性改变,有一定概率获得持续增殖能力[36]。禽类与鱼类细胞表现出较强的自发长期增殖倾向。Pasitka 等[7]研究发现鸡胚成纤维细胞可在无基因修饰条件下实现长期稳定扩增,且能够在无血清培养基中实现高密度悬浮培养。Xue 等[27]从褐点石斑鱼分离并成功建立了可连续传代的肌肉干细胞系,该细胞系同时具有成脂转分化潜力,可制备含有脂肪组织的细胞培养鱼肉。Li 等[34]从虹鳟肌肉组织和脂肪组织中分别建立了连续肌肉干细胞系 RTMS 和脂肪来源干细胞系 RTADS,RTMS 可维持肌源性分化能力至 56 代,RTADS 可维持成脂分化能力至 34 代,可用于构建具有大理石纹的细胞培养鱼肉。此外,Wei 等[35]建立的大西洋鲑连续成肌细胞系也兼具成肌分化和脂肪转分化能力,为调控细胞培养鱼肉的脂质组成提供了新的细胞模型。在哺乳动物中,自发连续细胞系研究逐渐取得进展,Pasitka 等[32]发现牛成纤维细胞在长期扩增后出现具有自我更新能力的亚群,形成了稳定传代细胞系。猪源间充质干细胞可在形成自发连续细胞系后保持较强的成脂分化能力,为培养脂肪生产提供了新的细胞来源[33]。由于不涉及基因操作,自发连续细胞系在食品监管与消费者接受度方面具有优势,但其发生概率低、周期长且不可控,细胞系获取高度依赖于长期筛选与偶然捕获。

基因工程细胞系通过人为调控细胞周期或端粒维持相关机制而建立,常见方法包括表达端粒酶逆转录酶(TERT)、细胞周期依赖性激酶 4(CDK4)等细胞周期因子,或通过基因编辑沉默细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A/p16(CDKN2A/p16)、肿瘤抑制蛋白 53(p53)、视网膜母细胞瘤蛋白(RB)等细胞周期负调节因子[37]。Liu 等[8]在原代猪肌肉干细胞中通过过表达 *TERT* 和 *CDK4*,成功建立了能够长期稳定传代、保持成肌分化潜能且适应无血清培养的肌源性细胞系 PM166,该细胞系基因组稳定,无成瘤风险。同时,Guo 等[15]使用 CRISPR/Cas9 系统敲除了猪肌肉干细胞中的 *CDKN2A/p16* 基因,成功建立了能够高效稳定扩增的基因编辑细胞系。然而,基因操作带来的生物安全风险和监管审批难度,仍是基因工程细胞系产业化应用的主要障碍。

2　种子细胞高效分离策略

获得高纯度、高活性的种子细胞是细胞培养肉生产的前提。肌肉干细胞作为经典种子细胞,对其分离纯化策略的研究较为系统。骨骼肌由肌细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、免疫细胞、脂肪细胞等共同构成,组织解离后如果缺乏有效的分离纯化步骤,后续培养中贴壁速率更快、增殖能力更强的成纤维细胞等非目标细胞会迅速成为优势群体,导致肌肉干细胞比例下降甚至被完全替代[38]。因此,完整的肌肉干细胞分离流程包括组织解离和细胞纯化 2 个阶段。组织解离阶段需将肌肉组织尽可能温和而充分地分散为单细胞,通用方法是机械法与酶解法联合使用,通过胶原酶、分散酶、胰蛋白酶等适度消化结合机械裂解,可获得产量高活性好的单细胞悬液[39]。目前,肌肉干细胞的纯化技术可分为 4 大类:预贴壁法、密度梯度离心法、荧光激活细胞分选和磁激活细胞分选(图 2),不同方法在操作难度、耗时与成本、收获的细胞纯度方面存在显著差异,可根据不同试验目的灵活选择[40]。

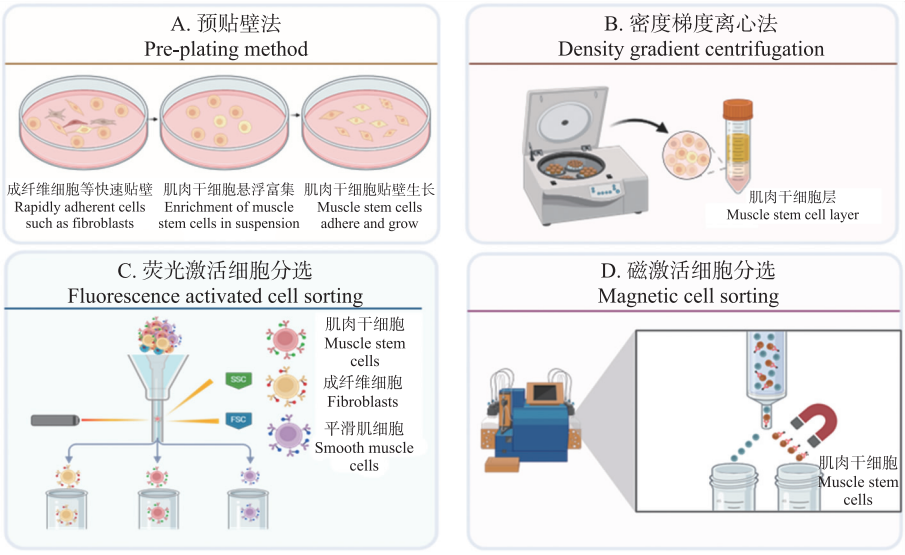

图 2　肌肉干细胞分离纯化策略示意图

Fig. 2　Schematic diagram of the isolation and purification strategy for muscle stem cells

2.1　预贴壁法

预贴壁法是利用不同细胞贴壁速度的差异进行初步分离。成纤维细胞、上皮细胞等贴壁速度快,而肌肉干细胞贴壁较慢,通过短时间预贴壁并转移上清液,可以初步富集肌肉干细胞[41]。Messmer 等[42]在猪肌肉干细胞分离中发现 0.5 h 预铺板可获得最高的细胞产量和最好的成肌分化效果。Kim 等[43]在鸡肌卫星细胞的预贴壁法中增加摇晃步骤,可提高干细胞分离效率。预贴壁法操作简便、成本低廉、无需特殊设备且对细胞活性影响较小,但其分离纯度有限,干细胞最佳贴壁时间受物种和组织来源等因素影响,难以建立标准化操作流程。

2.2　密度梯度离心法

密度梯度离心法基于不同细胞类型的密度差异实现分离,常用介质包括 Percoll(胶体硅-聚乙烯吡咯烷酮包被颗粒)、Ficoll(聚蔗糖聚合物)和 Histopaque(聚蔗糖-泛影葡胺混合物)[44]。其中 Percoll 可在生理条件下形成连续稳定的密度梯度,且细胞毒性低,对细胞活性影响小,因此在肌肉干细胞分离中应用最为广泛。研究表明,经 Percoll 梯度离心后猪肌肉干细胞的结蛋白(Desmin)阳性率可达 95%[44]。然而,该方法存在明显局限:难以区分密度相近的细胞亚群,分离效果高度依赖组织类型及梯度设计,且目标层收集依靠操作经验,批间重复性差,还存在介质残留风险。

2.3　荧光激活细胞分选

荧光激活细胞分选是基于流式细胞术的单细胞高精度分选技术,通过荧光素标记抗体识别细胞表面特异性标志物实现多参数分离。猪、牛肌肉干细胞的经典分选策略采用阴性排除联合阳性富集的模式:先通过 CD31(内皮细胞标志物)和 CD45(造血细胞标志物)去除杂细胞,再经 CD56 和 CD29 富集目标细胞,所得 PAX7 阳性细胞比例可达 94%[45]。近年来又开发出了新的标志物策略,即通过 CD31、CD45、JAM1

(连接黏附分子 1)阴性选择,结合 ITGA5(整合素 α5)和 ITGA7(整合素 α7)阳性标记,将细胞群体进一步细分:ITGA5$^+$/ITGA7$^-$为成纤维-脂肪祖细胞,ITGA5$^+$/ITGA7$^+$为平滑肌/间质细胞,ITGA5$^-$/ITGA7$^+$为肌肉干细胞[6]。Hu 等[46]的研究表明,新的分选标志物组合策略显著提高了猪肌肉干细胞纯度和传代稳定性。荧光激活细胞分选是目前最有效的高纯度分选技术,具有灵活性强且可同时基于多个参数进行复杂分离的优势。但其设备昂贵,荧光抗体成本高,操作复杂,分选通量低,且抗体孵育、激光照射和流体剪切力可能造成细胞损伤[47]。

2.4 磁激活细胞分选

磁激活细胞分选同样依赖于细胞表面标志物,将细胞与磁珠标记抗体孵育后,置于磁场中的分选柱,标记细胞被滞留,未标记细胞流出,从而实现细胞的分离纯化。磁激活细胞分选在区分复杂细胞亚群方面不及荧光激活细胞分选,但其优势在于设备简单、操作相对快速,在特定细胞群体的快速富集方面表现突出,目前已成功应用于猪、牛肌肉干细胞的分选[48]。

3 种子细胞体外长期扩增

原代种子细胞体外扩增的核心瓶颈是细胞衰老与干性衰退。端粒长度缩短引发复制性衰老,同时氧化应激、DNA 损伤及代谢紊乱加速衰老进程[49]。肌肉干细胞、脂肪前体细胞等种子干细胞还伴随干性标志物表达下调、分化潜能丧失的问题[50]。这导致需反复从动物组织中分离细胞,增加成本与伦理风险,难以满足工业化生产需求。因此,阐明细胞衰老与干性维持机制,开发高效安全的长期扩增技术,是细胞培养肉产业化亟待解决的关键问题。

3.1 细胞增殖与干性维持的分子调控机制

基础生命科学研究从细胞周期、信号通路、转录调控、表观遗传及细胞代谢等多维度,系统揭示了动物细胞体外培养过程中增殖衰老与干性维持的复杂调控网络,为种子细胞稳定扩增提供了理论依据。细胞周期调控方面,细胞周期蛋白与相应的周期蛋白依赖性激酶(CDK)家族协同驱动细胞周期进程,而 p16INK4a、p21CIP1 等 CDK 抑制因子通过视网膜母细胞瘤蛋白-E2F 转录因子(RB-E2F)和 p53 通路介导 G1 期检查点阻滞,是复制性衰老的核心分子开关[51]。端粒缩短通过激活共济失调毛细血管扩张突变基因/共济失调毛细血管扩张与 Rad3 相关蛋白(ATM/ATR)激酶通路进一步强化 p53 介导的细胞周期停滞[52]。信号通路方面,成纤维细胞生长因子/丝裂原活化蛋白激酶(FGF/MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)等通路协同调控细胞增殖与能量代谢[53],Notch 通路通过 Hes/Hey 转录因子维持干细胞干性[54],Wnt/β-catenin 通路则在干细胞自我更新与命运决定中发挥关键作用[55]。转录因子方面,配对盒蛋白 7(PAX7)作为肌肉干细胞的核心调控因子,直接激活生肌因子 5(*MYF5*)、成肌分化因子(*MYOD*)等成肌基因表达,其表达水平与细胞干性维持高度相关[56]。上述机制研究为实现种子细胞体外长期稳定扩增提供了明确的干预靶点。

3.2 外源因子调控种子细胞增殖与干性维持

外源因子调控是提升种子细胞扩增能力并维持干性状态的重要策略之一,具有操作简便、安全性高的优势,被广泛用于种子细胞培养体系的优化。

小分子化合物通过靶向关键信号通路或代谢节点调节细胞命运。在猪、牛肌肉干细胞中,适度抑制 p38α/β MAPK 通路活性,可在长期传代中维持 PAX7$^+$干细胞的表型[14,45]。研究发现,YAP 通路抑制、Notch 通路激活是导致猪肌肉干细胞在高密度培养条件下增殖变缓的重要因素,通过小分子化合物调节相应通路的活性可显著提升肌肉干细胞的增殖效能[57-58]。维生素 C 是功能活性广泛的食源性小分子,可通过清除细胞内活性氧、延缓细胞衰老、激活 PI3K/Akt/mTOR 通路等多重机制,显著增强猪肌肉干细胞的长期扩增能力和成肌分化潜能[3,59]。尽管化学干预能显著提升种子细胞增殖分化效能,但无法从根本上解决复制性衰老难题,需结合基因工程等手段,从分子层面突破衰老限制。

除化学小分子外,生长因子也是种子细胞扩增体系中的核心调控成分,主要通过模拟体内干细胞微环境中的旁分泌信号,参与细胞活化、增殖和干性维持。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,也称 FGF2)是肌肉干细胞体外培养中常用的促增殖因子,可驱动细胞周期进入,增强细胞扩增能力,并在一定程度上抑制过早分化[14]。表皮生长因子(EGF)是无血清培养体系中常用的促增殖生长因子,可通过与表皮生长因子受体(EGFR)结合激活下游信号通路,参与细胞增殖、存活与代谢调控,提高细胞在无血清条件下的适应

性和扩增效率[15]。血小板衍生生长因子(PDGF)是一类主要由血小板释放的生长因子家族,其中 PDGF-BB 亚型应用最为广泛,可促进细胞扩增和迁移,并参与组织修复与细胞外基质重塑[60]。除上述因子外,胰岛素样生长因子 1(IGF-1)和肝细胞生长因子(HGF)也常用于肌源性细胞的体外培养,前者促进成肌细胞增殖与分化[61],后者兼具促增殖与抗凋亡功能[62]。血管内皮生长因子(VEGF)主要参与血管生成和内皮细胞功能调控,在共培养体系和改善工程化组织营养供应能力方面具有潜在应用价值[30]。值得注意的是,单一生长因子往往难以支持细胞的长期稳定扩增,多种生长因子的协同作用对于维持细胞增殖与干性至关重要[63]。

3.3　基因编辑实现种子细胞长期稳定扩增

自发突变虽可使少数细胞突破衰老阻滞获得长期增殖能力,但该过程发生概率低、周期长且易出现表型漂移和分化能力的丧失,而精准可控的基因编辑技术能够为种子细胞长期稳定扩增提供可行的技术路径。目前基因编辑主要通过端粒酶激活和细胞周期调控 2 类策略突破复制性衰老限制:前者通过过表达 *TERT* 延长端粒长度、维持染色体稳定,后者通过沉默细胞周期负调控因子解除 G1 期阻滞[37]。Stout 等[31]通过 *TERT* 与 *CDK4* 共表达构建了牛肌肉干细胞系,可稳定传代超过 120 次群体倍增。Upside Foods 公司通过靶向敲除 *CDKN2A/p16* 与 *CDKN2B/p15* 基因显著提升细胞增殖速率,并结合 *TERT* 过表达构建了适合大规模生产的基因工程细胞系。CRISPR/Cas9 介导的全基因组筛选技术拓展了靶点发现空间,Zirman 等[64]在牛骨髓间充质干细胞中筛选鉴定出 *p53* 和 *PTEN* 2 个关键增殖调控基因,单基因敲除即可显著延缓细胞衰老。此外,国内的猪源种子细胞基因工程改造也取得了一系列进展:通过过表达内源性猪 *YAP* 基因、增强型 *YAP* 突变体,显著提升猪肌肉干细胞在高密度条件下的增殖活力[57];通过 *TERT* 与 *CDK4* 过表达建立了猪肌源性细胞系 PM166,可稳定传代超过 200 次群体倍增,倍增时间小于 24 h,保持成肌分化能力且适应无血清培养[8];利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *CDKN2A/p16* 基因,构建了可在无血清条件下长期稳定扩增的猪肌肉干细胞系[15]。这些研究为细胞培养肉工业化生产提供了技术支撑与细胞资源。未来,随着基因编辑技术的精准性持续提升、全链条生物安全评估体系的日趋完善,以及全球基因编辑监管框架的逐步建立与开放,基因工程细胞系的产业化应用障碍有望逐步消除,为细胞培养肉大规模低成本生产提供新的技术选项。

4　种子细胞无血清悬浮培养

种子细胞的规模化生产是细胞培养肉产业化的关键环节,而无血清培养与悬浮放大是突破成本与规模瓶颈的必由之路。无血清培养通过替代动物血清成分,为实现标准化、可控化生产奠定了基础。悬浮培养突破了二维贴壁培养的空间限制,极大地提升了单位体积细胞产量,是工业化生产的前提。

4.1　种子细胞无血清培养基开发

培养基是种子细胞增殖的营养基础,占培养肉生产成本的 70%以上。传统胎牛血清成分复杂、价格昂贵、批次不稳定、存在病原污染风险及伦理争议,因此开发成分明确、成本可控的无血清培养基已成为行业共识。无血清培养基通常由基础培养基和功能添加因子 2 部分组成,其开发方法已从早期的“自上而下”逐步替代法,发展为“自下而上”的理性设计法,并结合试验设计(DOE)、代谢流分析及人工智能等技术降低成本、提升效能[65]。目前,国内外已针对牛、猪、鸡等主要物种的种子细胞开发了多种无血清培养基配方。Kolkmann 等[60]通过逐步优化因子组合,建立了首个化学成分明确的牛成肌细胞无血清培养基,其维持细胞增殖的效果与含血清培养基相当。Stout 等[9]基于人多能干细胞培养基 B8,开发了添加人重组白蛋白的简单高效配方 Beefy-9,并进一步用油菜籽分离蛋白替代白蛋白,推出了成本更低的 Beefy-R 培养基[66]。Guo 等[15]针对猪肌肉干细胞,开发了无血清增殖培养基 A19,该培养基能有效支持原代细胞与 *CDKN2A/p16* 基因敲除细胞系的增殖,同时维持其良好的成肌分化潜能。Lu 等[67]针对牛肌肉干细胞,通过功能性小分子化合物筛选与协同优化,建立了 Beefy-F+S 无血清增殖培养基,其支持细胞扩增的效能达到了含血清培养基水平并且维持了细胞分化潜能。

当前,无血清培养基仍面临成本较高、效能不足等挑战。未来,无血清培养基的发展将聚焦以下方向:开发食品级甚至饲料级原料替代药品级成分,大幅降低成本;利用合成生物学技术规模化生产关键生长因子与重组蛋白;结合人工智能与高通量筛选技术,快速优化多组分配方;建立培养基成分监测与循环利用体系,进一步降低生产成本同时提高效能。

4.2 种子细胞大规模悬浮培养

传统二维贴壁培养存在空间利用率低、难以规模化等固有缺陷,悬浮培养技术通过构建立体化生长环境,可大幅提升种子细胞生长密度与细胞产量。目前,悬浮培养主要分为微载体悬浮培养与无载体悬浮培养 2 种模式。微载体悬浮培养利用球形微载体为种子细胞提供附着表面,将贴壁生长与悬浮培养结合起来,可实现肌肉干细胞等难悬浮细胞的大规模培养[68]。微载体通常由明胶、海藻酸盐、壳聚糖等天然或合成高分子材料制成,具有高比表面积、良好的生物相容性和可降解性[69]。该技术已应用于猪、牛、鸡等种子细胞的扩增。但其存在明显局限:细胞在微载体表面的附着与剥离过程会造成显著的细胞损失;微载体本身增加了生产成本与后续分离纯化的难度;能够达到的细胞密度显著低于无载体悬浮。

无载体悬浮培养无须依托附着性材料,细胞直接在培养液中以单细胞或细胞团形式生长,能够简化工艺、降低成本、提升产物纯度。种子细胞的无载体悬浮生长,本质上是通过适应性驯化或定向调控,使细胞克服失巢凋亡并重塑细胞-基质相互作用、细胞骨架结构与代谢模式。Yao 等[30]基于猪上胚层干细胞系建立了可扩展的 3D 悬浮培养平台,无需外源支架材料,细胞可依靠自身分泌的细胞外基质自发组装形成组织样聚合球体,从而实现多组织细胞培养肉的构建。Pasitka 等[7]从多个鸡品种中获得了长期稳定传代的胚胎成纤维细胞系,在无血清培养基中成功驯化为单细胞悬浮生长状态,连续培养下细胞密度每毫升可达 1.08×10^8 个。在此基础上,切向流过滤灌注式连续培养技术进一步优化了生产方案,降低了生产成本。研究人员采用该技术在无动物源培养基中实现了鸡细胞 20 d 以上的连续培养与多次收获,细胞密度最高每毫升达 1.3×10^8 个[10]。然而,细胞悬浮适应的分子机制长久以来不清晰,限制了该技术向更多物种的拓展。Pan 等[70]建立了鸡胚成纤维细胞系 DF-1 的无载体悬浮培养体系,发现长期悬浮细胞的基因表达模式更接近原始贴壁细胞,而非短期悬浮细胞,悬浮培养主要富集细胞周期、细胞外基质-受体相互作用及 PPARγ 信号通路,且悬浮细胞的成脂能力、代谢活性与胶原分泌能力均得到增强。后续研究进一步验证了上述结果,并揭示了 DF-1 细胞悬浮适应的分子机制[71]。未来,需进一步探明驱动种子细胞悬浮驯化的关键信号通路和调控基因,结合基因编辑技术等开发高效的细胞悬浮驯化方法。

5 种子细胞分化与三维组织构建

种子细胞定向分化的科学基础源于对肌源性、脂源性细胞命运调控网络的系统解析。种子细胞分化为成熟肌管、脂肪细胞等功能性细胞,并借助三维组织构建技术强化细胞间及细胞与微环境的相互作用,能够促进肌肉结构蛋白的大量合成与风味前体物质的积累,赋予细胞培养肉接近天然肉类的质构特性、口感层次与营养价值。

5.1 种子细胞分化调控机制

成肌与成脂分化是细胞培养肉生产中最核心的 2 个分化过程,分别由保守的转录因子网络精准调控。成肌分化依赖 MyoD、肌细胞生成素(MyoG)、肌球蛋白重链(MyHC)等肌源性转录因子的时序性表达,驱动单核成肌细胞退出细胞周期、融合形成多核肌管并逐步成熟[72]。成脂分化则以过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(PPARγ)和 CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP)为核心转录枢纽,调控细胞内脂滴的形成与积累[25]。基于这些机制,研究者建立了多维度分化调控策略,并构建了无血清分化体系。Messmer 等[42]通过转录组分析鉴定出牛肌肉干细胞成肌分化早期显著上调的信号通路受体,补充对应配体实现了无血清条件下的高效分化。基于单细胞测序揭示的未分化细胞亚群的分子特征,靶向调控 MEK/ERK、Notch 等信号通路能够促进肌肉干细胞同步退出细胞周期,使肌管融合指数接近 100%,显著提升成肌分化均一性与成熟度[73]。物理刺激如机械拉伸、电刺激能够模拟体内肌肉生长的力学环境,促进肌管的成熟与肌纤维的有序排列[74]。无血清成脂诱导体系通常通过胰岛素、糖皮质激素类诱导剂、环磷酸腺苷(cAMP)通路激活剂、PPARγ 激动剂以及脂肪酸供体等成分协同促进脂肪细胞形成。其中,胰岛素可促进葡萄糖摄取、脂质合成和细胞代谢活性,地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)、吲哚美辛、罗格列酮等诱导因子可通过调节 C/EBPβ、C/EBPδ 和 PPARγ 等通路推动成脂程序启动[25]。Mitić 等[75]开发了跨物种适用的简化型无血清成脂培养基,发现胰岛素和罗格列酮是无血清条件下诱导成脂的关键组分,该体系可用于牛、羊、猪和小鼠来源细胞,并支持三维培养中的成熟脂肪细胞形成。

5.2 种子细胞参与三维组织构建

三维组织构建通过支架材料为种子细胞提供生长微环境,引导细胞有序分化形成功能性组织。理想

的支架材料应具备细胞黏附支持、生物相容性、三维结构维持、可食用性及规模化制备潜力。目前,动物源蛋白、植物源蛋白、多糖类材料、真菌来源材料及其复合体系均已被用于细胞培养肉研究[76]。动物源蛋白材料具有较好的细胞相容性,但受来源、成本与食品监管限制,植物源及其他非动物源材料逐渐受到关注。Jeong 等[77]构建的玉米醇溶蛋白包覆海藻酸盐纤维可促进成肌细胞增殖与肌管有序排列,显示出植物蛋白-多糖复合支架在结构化培养肉中的应用潜力。此外,Ogawa 等[78]以食用菌丝体作为可食用支架,证明其能够支持 C2C12 成肌细胞和牛卫星细胞黏附、增殖与成肌分化,并可直接整合进入最终产品。因此,未来支架材料开发应更加注重非动物源、低成本、可食用等特征。

种子细胞并非被动依附于支架生长,而是通过特异性的分子识别与信号传导,主动响应支架的理化特性,并通过自身分泌的细胞外基质成分重塑微环境,这一互作过程促进细胞的黏附增殖分化[76]。种子细胞与支架的互作首先体现在分子识别上。细胞表面的整合素受体能够特异性识别支架材料中的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)等细胞黏附序列,触发黏着斑激酶的磷酸化激活,启动 PI3K/Akt、MAPK 等下游信号通路,调控细胞骨架的重排与细胞周期进程[79]。例如,富含 RGD 序列的明胶、大豆蛋白支架能够显著促进肌肉干细胞的黏附与铺展,上调 MyoD 等成肌转录因子的表达,加速肌管融合[80]。支架的力学硬度、微观拓扑结构等会通过机械传导影响种子细胞的命运:YAP/TAZ 作为核心的机械信号传感器,能够响应支架硬度的变化在细胞核与细胞质之间穿梭,较硬的支架会促进 YAP/TAZ 入核,激活成肌相关基因的表达,诱导肌肉干细胞向肌管分化;较软的支架更有利于脂肪干细胞的成脂分化,促进脂滴的形成与积累[81-82]。此外,支架的定向多孔或纤维结构能够诱导肌细胞有序排列,显著提升 MyHC 等肌肉蛋白的表达量,形成与天然肌肉高度相似的平行肌纤维束[83]。在三维培养过程中,平滑肌细胞等通过分泌细胞外基质成分,增强细胞与支架材料的结合强度[84]。当前块状结构化细胞培养肉生产仍面临大尺寸组织营养传递不足、肌脂细胞协同分化调控困难等挑战。未来研究将重点解析种子细胞与支架材料的互作机制,优化两者的适配性,并结合血管化策略解决营养传递难题,逐步实现整块肌肉组织的工业化制备。

6　种子细胞质量安全评价

种子细胞的基因组稳定性及表型一致性是细胞培养肉全链条安全评价的关键一环。在长期扩增、无血清及大规模悬浮培养过程中,细胞易发生基因组改变、表型漂移与功能衰退,导致生产效率下降,且可能引入潜在的食品安全风险。因此,建立覆盖种子细胞遗传安全、生长特性与分化能力的质量安全评价体系,有助于实现细胞培养肉规模化、标准化生产。

6.1　种子细胞安全性评价

种子细胞安全性评价聚焦于染色体完整性、基因组稳定性、致瘤风险、潜在病原等。对于自发连续细胞系与基因工程细胞系,需重点评估其长期传代过程中的基因组稳定性与非恶性转化表型。在鸡胚成纤维细胞系的安全性评价中,研究者通过转录组测序、核型分析与全基因组变异检测发现:长期传代的贴壁细胞与悬浮细胞虽存在少量特征性染色体拷贝数变异,但在超过 600 次群体倍增中核型整体保持稳定;关键抑癌基因 *p53* 的突变均为种系来源,无致癌性突变;彗星试验表明其 DNA 损伤修复能力与原代细胞相当;基于隐马尔可夫模型的功能分析工具(FATHMM)预测显示其突变谱与原代细胞无显著差异,无人类癌症相关突变富集;软琼脂克隆形成试验阴性,无成瘤风险;朊病毒相关基因与淀粉样纤维相关基因表达与原代细胞相比显著下调[7]。之后,Pasitka 等[32]对长期传代牛成纤维细胞系的安全性评价验证了上述体系的普适性:核型分析显示细胞存在有限的特征性染色体变异;*p53* 仅存在种系突变与 1 个无功能新发突变,DNA 修复能力未受影响;FATHMM 与癌症特异性体细胞突变(CScape)预测均未发现致病性突变;软琼脂克隆形成试验阴性,无致瘤潜能;线粒体功能在稳定传代后部分恢复,无持续氧化应激与有害代谢产物积累。Liu 等[8]对猪肌源性基因工程细胞系 PM166 进行了安全性检测。核型分析表明细胞在 150 次传代中保持正常二倍体核型(38 条染色体),85%以上细胞为整倍体;全基因组测序结果显示,长期传代的 PM166 细胞与原代细胞的单核苷酸多态性(SNP)与插入缺失(Indel)图谱高度一致,且无致癌突变积累,*p53*、*RB1*、*PTEN* 等 8 个关键肿瘤相关基因位点完整无变异;软琼脂克隆形成试验未观察到细胞集落,证实 PM166 细胞无恶性转化特征,为其应用奠定了安全性基础。

6.2　种子细胞质量及稳定性评价

种子细胞质量及稳定性评价旨在评估细胞在长期传代与规模化培养条件下的生长特性、分化能力与

表型一致性。传统评价方法主要包括分子标志物检测、生长动力学分析与分化能力评估。对于成肌细胞而言,分子标志物检测以肌源性转录因子网络为核心,通过定量 PCR、免疫荧光与 Western blot 检测关键成肌因子的表达水平。生长动力学分析则通过测定倍增时间、累计群体倍增数与细胞活力,评估细胞增殖能力。分化能力通过肌管融合指数、肌纤维成熟度等进行量化。传统评价方法存在耗时久、无法实时在线监控的局限性,难以满足大规模生物反应器的动态调控需求。基于人工智能与计算机视觉的智能化形态学评价技术正在兴起。细胞形态是其内部力学稳态与干性潜能的外在表现,通过高通量显微成像系统提取细胞面积、周长、纵横比、圆度等几何参数,结合随机森林或深度学习算法,可建立形态特征与细胞倍增时间、融合指数的定量关联模型[85]。例如,高干性猪肌肉干细胞呈现典型的“米粒状”梭形形态,而衰老或分化细胞则趋于拉长或扁平化[12]。未来,结合多组学技术与多模态人工智能模型,可构建覆盖种子细胞获取、扩增、分化全流程的智能化质量评价体系,提升培养肉生产的标准化与可控性。

7 总结与展望

细胞培养肉作为新质蛋白领域的前沿技术,正处于从中试验证向工业化生产跨越的关键阶段,种子细胞作为产业化的源头材料,其高效获取、规模化扩增、安全性与稳定性决定着生产成本与产品品质。本文梳理了细胞培养肉种子细胞的研究进展,对比分析了成体干细胞、多能干细胞与长期传代细胞系的技术特点与应用前景,阐述了不同分离纯化技术的优劣,探讨了通过外源干预与基因编辑实现种子细胞长期稳定扩增的不同路径。同时,剖析了无血清培养基开发与悬浮培养技术的最新进展,分析了种子细胞分化调控及其与支架的互作规律,探讨了建立涵盖遗传安全、生长特性与分化潜能的种子细胞质量安全评价体系的可行性。

从国内外发展格局来看,长期传代细胞系、低成本无血清培养基和大规模悬浮培养仍是种子细胞产业化应用的核心技术壁垒。国外在鸡源和牛源种子细胞方面起步较早,已在鸡胚成纤维细胞长期传代、无血清高密度悬浮培养,以及牛卫星细胞长期传代细胞系构建等方面形成一定优势。相比之下,我国在猪源种子细胞方面已形成坚实研究基础,已建立长期传代肌源性细胞系、无血清成肌与成脂分化体系,并在悬浮放大和中试生产方面取得进展。诚然,我国在种子细胞产业化方面仍存在明显短板:1)不同物种、不同组织类型和适用于不同产品形态的食品级长期传代细胞系仍然不足,特别是鸡源和牛源种子细胞;2)培养基成本仍是制约产业化的核心因素,当前种子细胞扩增和分化体系仍依赖重组生长因子等高价值组分,食品级低成本替代方案仍需系统开发。未来应加快构建多物种食品级种子细胞库,重点突破培养基降本、细胞悬浮适应机制、生物反应器放大和食品安全评价标准等关键环节,从而为我国细胞培养肉种子细胞体系的构建和规模化应用提供支撑。

面向万升级工业化生产需求,种子细胞需满足如下一系列质量标准(图 3):1)遗传安全稳定,维持染色体与基因组稳定,无有害突变积累、无致瘤风险;2)增殖能力优异,具备超过 100 次的稳定群体倍增能力,倍增时间不高于 24 h;3)培养适应性强,能够完全适应无血清培养基,生长与功能特性无显著改变;4)悬浮性能良好,可实现单细胞悬浮培养,无明显细胞聚集,在生物反应器中高密度生长;5)分化潜能稳定,保持稳定的分化效率,能够形成成熟的功能性细胞;6)代谢特性优良,葡萄糖消耗与乳酸、氨积累速率处

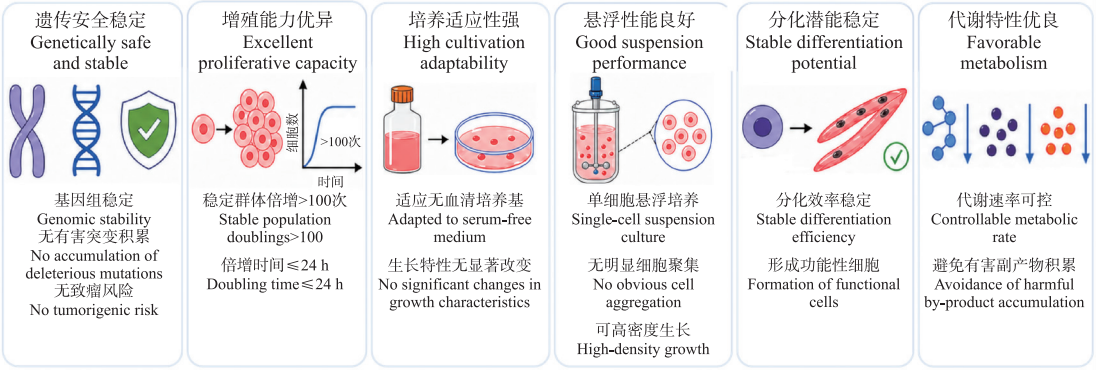

图 3 符合细胞培养肉规模化生产要求的种子细胞质量标准

Fig. 3 The quality standards of seed cells that meet the requirements for large-scale production of cultured meat

于可控范围,避免有害代谢副产物积累。为了实现上述质量目标,未来需从分子机制解析、工艺体系适配与智能质控升级 3 个维度协同发力,构建覆盖种子细胞全生命周期的系统性技术方案。

7.1　从分子调控机制入手优化种子细胞性能

种子细胞领域一些尚待解决的关键科学问题:细胞衰老与干性维持的分子机制,特别是长期传代过程中表观遗传修饰的动态变化规律;无血清培养条件下信号通路与细胞代谢的重塑机制;种子细胞悬浮适应的分子机制;种子细胞与三维支架材料的互作机制。未来,应整合多组学技术手段,系统绘制种子细胞增殖衰老、悬浮适应及与材料互作的分子图谱,确定关键调控靶点。在此基础上,面向产业化需求开展种子细胞定向优化。基于低监管风险的基因编辑策略,提高细胞长期传代稳定性、无血清适应性和悬浮扩增能力,同时综合考虑遗传稳定性、悬浮耐受性和终产品安全评价需求,为中试放大和规模化应用提供支撑。

7.2　结合工艺适配实现无血清悬浮培养

当前无血清培养基存在成本较高、效能不足等问题,悬浮培养技术在稳定性与效率方面也有较大优化空间。无血清培养基开发方面,可利用代谢流分析技术解析种子细胞的营养需求规律,结合高通量筛选与人工智能技术,快速优化多组分配方。同时,大力开发食品级甚至饲料级原料替代药品级成分,通过工程化微生物实现关键生长因子的规模化生产。悬浮培养技术方面,应针对不同种子细胞特性,开发差异化悬浮驯化策略,同时推进无载体悬浮培养技术研究,结合生物工艺优化,实现种子细胞的高密度、长周期、连续化生产。

7.3　借助智能质控手段保障细胞质量与安全性

未来应结合我国新食品原料管理和食品安全评价需求,建立覆盖细胞来源、细胞库构建、传代历程、基因修饰信息、培养基组分、生产工艺和终产品特征的全链条质量评价体系。在安全性评价方面,应整合全基因组测序、转录组分析、表观遗传检测等多组学技术,建立种子细胞遗传稳定性的综合评估方法。开发生物信息学预测与非动物试验评估手段。在质量稳定性评价方面,应建立标准化的种子细胞库管理体系,实现细胞来源、冻存批次、传代次数、培养条件和质量检测结果的全程记录。同时,引入机器视觉与深度学习的智能化评价技术,结合多模态传感器与人工智能算法,实现对培养过程中种子细胞状态、代谢产物浓度等参数的实时监测与智能控制,提升细胞培养肉生产的标准化与可控性。未来,智能质控体系还应与监管申报要求相衔接,将细胞质量数据、工艺参数和安全评价结果转化为可用于产品备案、审评和标准制定的数据基础。通过将质量评价前置到种子细胞筛选、培养基开发和工艺放大阶段,可降低后续产业化转化的不确定性,推动种子细胞稳定安全地应用于细胞培养肉生产。

参考文献 References:

[1] 丁世杰,李春保,周光宏. 细胞培养肉技术及产业化进展与挑战[J]. 中国食品学报,2022,22(12):33-41.
Ding S J,Li C B,Zhou G H. Progress and challenge of cultured meat technology and industrialization[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2022,22(12):33-41(in Chinese).

[2] Caputo V,Sun J Y,Staples A J,et al. Market outlook for meat alternatives:challenges,opportunities,and new developments[J]. Trends in Food Science & Technology,2024,148:104474.

[3] Zhu H Z,Wu Z Y,Ding X,et al. Production of cultured meat from pig muscle stem cells[J]. Biomaterials,2022,287:121650.

[4] Xie Y T,Ding S J,Wang J,et al. Technological advances and the challenges for large-scale cultured meat production[J]. Annual Review of Food Science and Technology,2026,17:417-438.

[5] Muller Q,Matsusaki M. Comparative analysis of cultivated meat cell sources and cell type usage across species:functional roles and engineering potential[J]. Trends in Food Science & Technology,2026,169:105524.

[6] Messmer T,Dohmen R G J,Schaeken L,et al. Single-cell analysis of bovine muscle-derived cell types for cultured meat production[J]. Frontiers in Nutrition,2023,10:1212196.

[7] Pasitka L,Cohen M,Ehrlich A,et al. Spontaneous immortalization of chicken fibroblasts generates stable,high-yield cell lines for serum-free production of cultured meat[J]. Nature Food,2023,4(1):35-50.

[8] Liu Z,Pan Y J,Tang C B,et al. Engineering a genomically stable porcine myogenic cell line for serum-free cultured meat production[J]. Food Research International,2026,236:119134.

[9] 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,2022,5:466.

[10] Pasitka L,Wissotsky G,Ayyash M,et al. Empirical economic analysis shows cost-effective continuous manufacturing of cultivated chicken using animal-free medium[J]. Nature Food,2024,5(8):693-702.

[11] Ding X, Zhuge W T, Zhang Y, et al. Microfluidic generation of bioinspired core-shell structured microfibers for cultured meat[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 478: 147467.

[12] Wang J L, Ding S J, Da C Y, et al. Morphology-based prediction of proliferation and differentiation potencies of porcine muscle stem cells for cultured meat production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(47): 18613-18621.

[13] Dohmen R G J, Hubalek S, Melke J, et al. Muscle-derived fibro-adipogenic progenitor cells for production of cultured bovine adipose tissue[J]. npj Science of Food, 2022, 6: 6.

[14] 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.

[15] Guo R, Wu Z, Lu M, et al. Serum-free long-term expansion and functional maintenance of pig satellite cells via targeted genetic engineering for cultured meat[J]. Food Materials Research, 2025, 5(1): e007.

[16] Xie Y T, Ding S J, Wang J, et al. Cultured meat protein has significantly higher digestibility and more potential bioactive peptides than traditional animal and plant proteins[J]. Food Chemistry, 2026, 502: 147659.

[17] Wan S L, Pan Q Q, Wei J B, et al. Isolation, culture and identification of sheep skeletal muscle satellite cells[J]. Czech Journal of Animal Science, 2022, 67(10): 416-423.

[18] Zhou X, Zheng H W, Wu Y C, et al. Scalable production of muscle and adipose cell-laden microtissues using edible macroporous microcarriers for 3D printing of cultured fish fillets[J]. Nature Communications, 2025, 16: 1740.

[19] Yin H, Price F, Rudnicki M A. Satellite cells and the muscle stem cell niche[J]. Physiological Reviews, 2013, 93(1): 23-67.

[20] Guan X, Zhou J W, Du G C, et al. Bioprocessing technology of muscle stem cells: implications for cultured meat[J]. Trends in Biotechnology, 2022, 40(6): 721-734.

[21] Skrivergaard S, Krøyer Rasmussen M, Sahebekhtiari N, et al. Satellite cells sourced from bull calves and dairy cows differs in proliferative and myogenic capacity-implications for cultivated meat[J]. Food Research International, 2023, 173: 113217.

[22] Lee J, Park J, La H, et al. Optimizing muscle satellite cell sources for cultured meat: anatomical origin influences cellular properties and quality attributes[J]. npj Science of Food, 2026, 10: 56.

[23] Molina T, Fabre P, Dumont N A. Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis, regeneration and diseases[J]. Open Biology, 2021, 11(12): 210110.

[24] Song W J, Liu P P, Meng Z Q, et al. Identification of porcine adipose progenitor cells by fluorescence-activated cell sorting for the preparation of cultured fat by 3D bioprinting[J]. Food Research International, 2022, 162: 111952.

[25] Lee Y S, Lee H J, Jo C. Integrative adipogenic engineering of cultured fat for cell based meat[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2026, 25: e70338.

[26] Guan X, Wang L Y, Sun W Q, et al. Creating cell-based hybrid noodles for sustainable and nutrient-balanced diets via a serum-free and animal-free 3D co-differentiation system[J]. Advanced Science, 2026, 13(16): e19916.

[27] Xue T, Zheng H W, Zhao Y Q, et al. A spontaneously immortalized muscle stem cell line (EfMS) from brown-marbled grouper for cell-cultured fish meat production[J]. Communications Biology, 2024, 7: 1697.

[28] Zhou X Y, Gao C, Zhao W X, et al. Advances in the study of pluripotent stem cells in livestock[J]. Cell Proliferation, 2025, 58(8): e70008.

[29] Zhu G X, Gao D F, Li L Z, et al. Generation of three-dimensional meat-like tissue from stable pig epiblast stem cells[J]. Nature Communications, 2023, 14: 8163.

[30] Yao Y X, Zhu G X, Zhi M L, et al. Generation of multitissue cell-cultivated meat via multidirectional differentiation of stable porcine epiblast stem cells[J]. Nature Communications, 2026, 17: 3347.

[31] Stout A J, Arnett M J, Chai K, et al. Immortalized bovine satellite cells for cultured meat applications[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(5): 1567-1573.

[32] Pasitka L, Cohen M, Regenbaum S, et al. Spontaneous immortalization of bovine fibroblasts following long-term expansion offers a non-transformed cell source for cultivated beef[J]. Nature Food, 2025, 6(11): 1079-1094.

[33] Thrower T, Riley S E, Lee S, et al. A unique spontaneously immortalised cell line from pig with enhanced adipogenic capacity[J]. npj Science of Food, 2025, 9: 52.

[34] Li Y R, Xue T, Wang S, et al. Establishment of two continuous adult stem cell lines from muscle and adipose tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for marbled fish meat production[J]. Aquaculture Reports, 2025, 43: 102913.

[35] Wei Y X, Song D Y, Teng J R, et al. Establishment of a continuous Atlantic salmon muscle cell line for cell-cultured fish meat and characterization of its adipogenic transdifferentiation induced by n-3 and n-6 fatty acids[J]. Food Research International, 2025, 221: 117610.

[36] Fridman A L, Tainsky M A. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling[J]. Oncogene, 2008, 27(46): 5975-5987.

[37] Riquelme-Guzmán C, Stout A J, Kaplan D L, et al. Unlocking the potential of cultivated meat through cell line engineering[J]. iScience, 2024, 27(10): 110877.

[38] Xu Z, Wu J J, Li Y J, et al. A single-cell atlas of porcine skeletal muscle reveals mechanisms that regulate intramuscular adipogenesis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(23): 12935.

[39] Miersch C, Stange K, Röntgen M. Effects of trypsinization and of a combined trypsin, collagenase, and DNase digestion on liberation and *in vitro*

function of satellite cells isolated from juvenile porcine muscles[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal,2018,54(6):406-412.

[40] Lee J H,Kim T K,Kang M C,et al. Methods to isolate muscle stem cells for cell-based cultured meat production:a review[J]. Animals,2024,14(5):819.

[41] Yoshioka K,Kitajima Y,Okazaki N,et al. A modified pre-plating method for high-yield and high-purity muscle stem cell isolation from human/mouse skeletal muscle tissues[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology,2020,8:793.

[42] Messmer T,Klevernic I,Furquim C,et al. A serum-free media formulation for cultured meat production supports bovine satellite cell differentiation in the absence of serum starvation[J]. Nature Food,2022,3(1):74-85.

[43] Kim S H,Kim C J,Lee E Y,et al. Optimal pre-plating method of chicken satellite cells for cultured meat production[J]. Food Science of Animal Resources,2022,42(6):942-952.

[44] Miersch C,Stange K,Röntgen M. Separation of functionally divergent muscle precursor cell populations from porcine juvenile muscles by discontinuous Percoll density gradient centrifugation[J]. BMC Cell Biology,2018,19:2.

[45] 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.

[46] Hu Z,Liu Z,Guo R,et al. Isolation and purification of different high-purity cell populations from pig muscle tissue[J]. Food Materials Research,2025,5(1):e002.

[47] Sutermaster B A,Darling E M. Considerations for high-yield,high-throughput cell enrichment:fluorescence versus magnetic sorting[J]. Scientific Reports,2019,9:227.

[48] Choi K H,Kim M,Yoon J W,et al. Purification of pig muscle stem cells using magnetic-activated cell sorting(MACS)based on the expression of cluster of differentiation 29(CD29)[J]. Food Science of Animal Resources,2020,40(5):852-859.

[49] Wiley C D,Campisi J. The metabolic roots of senescence:mechanisms and opportunities for intervention[J]. Nature Metabolism,2021,3(10):1290-1301.

[50] Yuen J S K,Saad M K,Xiang N,et al. Aggregating *in vitro*-grown adipocytes to produce macroscale cell-cultured fat tissue with tunable lipid compositions for food applications[J]. eLife,2023,12:e82120.

[51] Mademtzoglou D,Relaix F. From cyclins to CDKIs:cell cycle regulation of skeletal muscle stem cell quiescence and activation[J]. Experimental Cell Research,2022,420(1):113275.

[52] Chakravarti D,LaBella K A,DePinho R A. Telomeres:history,health,and hallmarks of aging[J]. Cell,2021,184(2):306-322.

[53] Chen H X,Guo R P,Zhang Q,et al. Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2015,112(44):E5936-E5943.

[54] Gioftsidi S,Relaix F,Mourikis P. The Notch signaling network in muscle stem cells during development,homeostasis,and disease[J]. Skeletal Muscle,2022,12:9.

[55] Brack A S,Conboy I M,Conboy M J,et al. A temporal switch from Notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis[J]. Cell Stem Cell,2008,2(1):50-59.

[56] von Maltzahn J,Jones A E,Parks R J,et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2013,110(41):16474-16479.

[57] Liu Z,Lin L,Zhu H Z,et al. YAP promotes cell proliferation and stemness maintenance of porcine muscle stem cells under high-density condition[J]. Cells,2021,10(11):3069.

[58] Qin G Y,Liu Z,Lu H,et al. Notch signaling modulation enhances porcine muscle stem cell proliferation and differentiation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2025,752:151456.

[59] Fang J H,Li M,Zhang G Q,et al. Vitamin C enhances the *ex vivo* proliferation of porcine muscle stem cells for cultured meat production[J]. Food & Function,2022,13(9):5089-5101.

[60] 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.

[61] Li X,Cao Y,Liu Y,et al. Effect of IGF1 on myogenic proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells through PI3K/AKT signaling pathway[J]. Genes,2024,15(12):1494.

[62] Zhu C H,Mouly V,Cooper R N,et al. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4:consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies[J]. Aging Cell,2007,6(4):515-523.

[63] Lei Q Z,Li M,Du G C,et al. An effective cytokine combination for *ex vivo* expansion of porcine muscle stem cells[J]. Food Bioscience,2022,46:101571.

[64] Zirman A,Abed El-Nabi M,Samuel E,et al. Pooled CRISPR screens identifies key regulators of bovine stem cell expansion for cultured meat[J]. Communications Biology,2025,8:1313.

[65] Liu Y L,Sun Y H,et al. Serum-free media for cultivated meat:from cellular mechanisms to cost-effective bioprocess design[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,2026:1-30.

[66] Stout A J,Rittenberg M L,Shub M,et al. A Beefy-R culture medium:replacing albumin with rapeseed protein isolates[J]. Biomaterials,2023,296:122092.

[67] Lu H,Liu Z,Liu X Y,et al. A small molecule strategy with forskolin and p38 inhibitor for serum-free muscle stem cell expansion[J]. npj Science of Food,2026,10:81.

[68] Derakhti S, Safiabadi-Tali S H, Amoabediny G, et al. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: a comprehensive review[J]. Materials Science and Engineering: C, 2019, 103: 109782.
[69] Yin H W, Wang L, Hur S J, et al. Cell-cultured fish meat *via* scale-up expansion of *Carassius auratus* skeletal muscle cells using edible porous microcarriers and quality evaluation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(29): 16475-16483.
[70] Pan Y J, Zhang Y M, Lu H, et al. Molecular dynamics of immortalized chicken fibroblasts from adherent cultivation to carrier-free suspension culture[J]. Food Bioscience, 2025, 73: 107716.
[71] Contreras E J, Nagarajan A, Bromberg B H, et al. Comparative transcriptomics of adherent and suspension chicken fibroblast cell lines for the optimization of cultivated meat processes[J]. Food Research International, 2026, 229: 118368.
[72] Chal J, Pourquié O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*[J]. Development, 2017, 144(12): 2104-2122.
[73] Melzener L, Schaeken L, Fros M, et al. Optimisation of cell fate determination for cultivated muscle differentiation[J]. Communications Biology, 2024, 7: 1493.
[74] Cheng H, Huang Y, Yue H Q, et al. Electrical stimulation promotes stem cell neural differentiation in tissue engineering[J]. Stem Cells International, 2021, 2021: 6697574.
[75] Mitić R, Cantoni F, Börlin C S, et al. A simplified and defined serum-free medium for cultivating fat across species[J]. iScience, 2023, 26(1): 105822.
[76] Li L Z, Zhang Y J, Xu Z P, et al. Engineering scaffold-cell interactions for cultured meat: mechanisms, materials, and emerging AI-driven strategies[J]. Trends in Food Science & Technology, 2025, 165: 105362.
[77] Jeong D, Jang G, Jung W K, et al. Stretchable zein-coated alginate fiber for aligning muscle cells to artificially produce cultivated meat[J]. npj Science of Food, 2024, 8: 13.
[78] Ogawa M, Kermani A S, Huynh M J, et al. Edible *Mycelium* as proliferation and differentiation support for anchorage-dependent animal cells in cultivated meat production[J]. npj Science of Food, 2024, 8: 23.
[79] Lee S H, Choi J. Three-dimensional scaffolds, materials, and fabrication for cultured meat applications: a scoping review and future direction[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 152: 109881.
[80] 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.
[81] Silver J S, Günay K A, Cutler A A, et al. Injury-mediated stiffening persistently activates muscle stem cells through YAP and TAZ mechanotransduction [J]. Science Advances, 2021, 7(11): eabe4501.
[82] Dong D L, Jin G Z. YAP and ECM stiffness: key drivers of adipocyte differentiation and lipid accumulation[J]. Cells, 2024, 13(22): 1905.
[83] Chen Y C, Zhang W H, Ding X, et al. Programmable scaffolds with aligned porous structures for cell cultured meat[J]. Food Chemistry, 2024, 430: 137098.
[84] Zheng Y Y, Chen Y, Zhu H Z, et al. Production of cultured meat by culturing porcine smooth muscle cells *in vitro* with food grade peanut wire-drawing protein scaffold[J]. Food Research International, 2022, 159: 111561.
[85] Kusumoto D, Lachmann M, Kunihiro T, et al. Automated deep learning-based system to identify endothelial cells derived from induced pluripotent stem cells[J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(6): 1687-1695.

责任编辑: 范雪梅

郭仁朋, 南京农业大学食品科学技术学院副教授, 硕士生导师, 食品营养与健康系主任。博士毕业于南开大学, 2018 年 8 月入职南京农业大学, 2024 年 9 月—2025 年 9 月借调至农业农村部科学技术司。目前主要研究方向为动物干细胞与细胞培养肉, 围绕制约培养肉产业化的关键共性难题, 开展种子细胞干性维持、无血清培养基开发、细胞大规模培养、安全性评价等研究。近五年, 以项目负责人身份主持国家自然科学基金面上项目及青年项目、江苏省自然科学基金青年项目、江苏省农业科技自主创新项目等; 以项目骨干身份参与国家重大科技项目农业农村部重点专项、教育部优秀青年团队项目等。以第一作者或通信作者在 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*、*Nature Communications* 等期刊发表论文 20 余篇。担任 *Food Materials Research* 期刊青年编委, *Food Research International*、*Food Bioscience* 等期刊审稿专家。入选江苏省青年科技人才托举工程。