

基于3D打印新型细胞支架构建及在细胞培育肉中的应用

郭翔¹, 王守伟^{2,3}, 李莹莹^{2,3}, 孔保华^{1*}

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (2. 中国肉类食品综合研究中心, 北京 100068)
(3. 肉类加工技术北京市重点实验室, 北京 100068)

摘要: 3D 打印技术作为一种新兴的制造工艺, 通过逐层沉积的方式可以快速生成与天然组织类似的人工组织构造。然而, 用于构建细胞培育肉的 3D 打印支架鲜有报道且亟待开发。因此, 基于可食用材料的支架亟待开发, 同时支架的可塑型及高效性等问题亟需进一步优化。该研究基于可食用蛋白材料开发了 3D 打印墨水并制备了支架。首先分析优化了 3D 打印性能和打印参数, 进一步基于吸水性和降解率研究支架的机械稳定性, 最后通过细胞增殖培养、活/死细胞染色研究及组学分析阐明支架的生物相容性及与细胞的互作关系。结果表明: 4.00 mm³/s 挤出速度结合 6.00 mm/s 打印速度制备的支架在均一性和可塑性及精度方面显著高于其他组合组别; 在交联时间方面, 10 min 交联时间的支架在生物相容性上显著高于其他组别, 同时具备更好的机械稳定性及支撑性。此外, 10 min 交联时间的支架在细胞贴附、增殖和迁移能力显著优于其他组别; 细胞增殖曲线进一步揭示了支架在细胞培养中的优异性能; 研究阐明了支架与细胞的互作关系, 为细胞培育肉制造提供了新的方法和思路。

关键词: 3D 打印支架; 细胞培养; 转录组学; 细胞培育肉

文章编号: 1673-9078(2025)05-174-183

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0417

Construction of New Cell Scaffolds by 3D Printing and Their Application in Cell-cultured Meat

GUO Xiang¹, WANG Shouwei^{2,3}, LI Yingying^{2,3}, KONG Baohua^{1*}

(1. School of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(2. China Meat Research Center, Beijing Academy of Food Sciences, Beijing 100068, China)

(3. Beijing Key Laboratory of Meat Processing Technology, Beijing 100068, China)

Abstract: The emerging manufacturing process, 3D printing, can rapidly generate artificial tissue structures resembling natural tissues through layer-by-layer deposition. However, 3D-printed scaffolds for constructing cell-cultured meat have been rarely reported. Therefore, edible material-based scaffolds should be developed without delay, and issues such as the plasticity and efficiency of such scaffolds need further optimization. In this study, 3D printing ink was developed using edible

引文格式:

郭翔,王守伟,李莹莹,等.基于3D打印新型细胞支架构建及在细胞培育肉中的应用[J].现代食品科技,2025,41(5): 174-183.

GUO Xiang, WANG Shouwei, LI Yingying, et al. Construction of new cell scaffolds by 3D printing and their application in cell-cultured meat [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 174-183.

收稿日期: 2024-04-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD2100102); 国家自然科学基金青年项目(22005019)

作者简介: 郭翔(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 细胞培育肉中 3D 生物打印墨水及支架的研发, E-mail: 312043403@qq.com

通讯作者: 孔保华(1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 畜产品加工, E-mail: kongbh@163.com

protein materials to prepare scaffolds. First, the 3D printing performance and parameters were analyzed and optimized. Further, the mechanical stability of the scaffolds was assessed based on water absorption and degradation rates. Finally, the biological compatibility of the scaffolds and their interaction with cells were clarified through cell proliferation culture, live/dead cell staining, and omics analysis. The results show that scaffolds prepared with an extrusion speed of 4.00 mm³/s and a printing speed of 6.00 mm/s exhibit significantly higher uniformity, plasticity, and accuracy than those printed using other settings. Scaffolds with a 10-minute cross-linking time demonstrate significantly higher biological compatibility than those with a different cross-linking time, along with better mechanical stability and support. Furthermore, scaffolds with a 10-minute cross-linking time exhibit significantly better cell adhesion, proliferation, and migration capabilities than those with a different cross-linking time. Cell proliferation curves further reveal the excellent performance of these scaffolds in cell culture. The study clarified the interaction between scaffolds and cells and provided new methods and ideas for producing cell-cultured meat.

Key words: 3D printing scaffold; cell culture; transcriptomics; cell-cultured meat

随着全球肉类需求的不断增长和可持续发展的迫切需求,细胞培育肉作为一种创新的替代品备受关注^[1]。然而,在体外模拟细胞生长的微环境并构建具有肉类质感的肌肉组织仍是重大挑战^[2]。近年来,随着科技的发展,3D打印技术作为一种新兴的制造工艺引起了广泛的关注^[3,4]。通过3D打印设备,能够设计和制备具有微观结构的支架,为细胞提供类似于体内三维生长微环境。同时,制备的3D打印支架可以模拟自然的组织结构^[5],为细胞的附着、分化和生长提供更好的支持^[6]。尽管3D打印支架在制造人造组织的构建方面显示出巨大的前景,但制备支架的稳定性、生物相容性以及3D打印参数的选择对最终产品的质量和性能至关重要。因此,选择合适的生物相容性材料以及交联方式制备具有优异稳定性和生物相容性的支架对于制造理想人工组织至关重要。

当前3D打印中所使用的生物墨水已得到了广泛研究,其材料主要包括海藻酸盐^[7]、胶原^[8]、壳聚糖^[9]、明胶^[10]、透明质酸^[11]和丝素蛋白^[12]等。在3D打印过程中,墨水以逐层沉积的方式制备3D构建体,并通过物理或化学交联以稳定打印结构。然而,当前研究中开发的墨水无法满足可打印性、生物活性所需的标准,更重要的是,当前墨水多为不可食用的材料,无法在生物培育肉中进行工业化应用。蛋清作为一种天然的蛋白质,由多种球状蛋白(卵清蛋白、卵转铁蛋白和卵类粘蛋白等)组成,具有较好的生物相容性^[13,14]。同时,卵清蛋白或卵类粘蛋白可以改善支架上的细胞粘附和增殖^[15]。因此,蛋清是3D打印墨水制备的可用材料。然而,由于蛋清水分含量高不具备可直接打印能力,需要

与其它成分混合使用。明胶是从动物的结缔组织中提取的天然胶原蛋白,也被广泛认为是生物相容性极高的材料^[16,17]。此外,明胶作为温敏性材料,其凝胶化的温度通常在25℃到35℃^[18]。这一温度区间允许明胶基墨水在3D打印过程中以液体形式进行注射或挤出,并在打印后迅速形成凝胶以支持所需的结构。当温度升高到35℃以上时,明胶从凝胶转变为溶液。这种性质对于支架的结构稳定性产生严重的影响^[19]。因此,通过物理或化学方法进行交联以提高明胶基支架的稳定性是必要的。

为了开发应用于细胞培育肉的可食用支架,研究通过明胶溶液与蛋清混合制备一种新兴的复合墨水,通过3D打印制备支架。之后,使用戊二醛作为交联剂进一步增强支架稳定性。首先通过调整3D打印参数使墨水达到均匀挤出的状态,以期提高打印支架的精准度和整体打印效果。通过打印性能的评估优化3D打印参数。进一步通过吸水率和降解率评估不同交联时间支架的机械稳定性。通过细胞增殖及活力评估不同交联时间对支架生物相容性的影响。最后,通过细胞培养、组学分析和实时荧光定量PCR研究支架与细胞的相互作用,为细胞培育肉的实验室研究和工业化制造提供创新性的支架并为其制造提供一种潜在新方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与细胞系

试剂:戊二醛溶液,中国阿拉丁有限公司;高糖培养基(DMEM)、胰酶消化液、CCK-8试剂盒、PBS缓冲液(PBS)、组织细胞固定液、曲拉通X-100、

FITC 标记荧光染料、DAPI 荧光染料 (DAPI)、钙黄绿素乙酰氧基甲酯 (Calcein-AM) / 碘化丙啉 (PI), 中国索莱宝生物有限公司; 胎牛血清 (FBS), 美国 Thermo Fisher 公司; TRIzol 试剂, 美国 Life Technologies 公司。

细胞系: 本实验使用的细胞为鸡成肌细胞, 成肌细胞取自 18 d 日龄的鸡胚腿部肌肉组织, 通过酶解获得。

1.2 仪器与设备

BSA224S 分析天平, 德国 Sartorius 公司; 1300-A2 生物安全柜、Heracell VIOS 160i 细胞培养箱、NanoDrop One 微量紫外分光光度计、ST8R 台式离心机, 美国 Thermo Fisher 公司; SUNP BIOMAKER 2i 生物打印机, 中国上普生物科技有限公司; SMZ1270 体式显微镜、ECLIPSE Ti2 荧光倒置显微镜, 日本 Nikon 公司; LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Roche 公司; SU8020 扫描电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; Synergy™ H4 多探测器酶标仪, 美国 Bio Tek 公司。

1.3 方法

1.3.1 3D打印墨水的制备

当地食品超市中随机购买新鲜褐色壳鸡蛋 (50~60 g), 将蛋清与蛋黄小心分离。称取一定量的明胶粉末, 在 40 °C 的水中溶解配置成质量分数为 10% 的明胶溶液。将分离好的蛋清加入到明胶溶液中混合均匀以制备打印墨水, 其中蛋清和明胶的体积比为 1:1, 制备完成的墨水放置 4 °C 保存并用于 3D 打印。

1.3.2 支架微观结构观察

为了表征交联前后支架的微观形态, 对样品进行冷冻干燥, 并在真空条件下对干燥后的样品进行镀金处理, 然后使用扫描电子显微镜在 15 kV 的工作电压下对样品进行观察。

1.3.3 打印性能测试

对打印性能 (Pr) 进行了评估, 以确定用墨水印刷结构体的形状保真度, 打印性能计算公式 (1) 如下:

$$Pr = \frac{L^2}{16A} \quad (1)$$

式中:

L —孔隙的周长, cm;

A —孔径的面积, cm^2 。

为了进行分析, 使用体视显微镜随机获取每个印刷构建体的光学图像。随机选取图像进行打印性能分析。打印结构的均匀性是通过光学图像中测量线股尺寸大小进行分析。

1.3.4 吸水率测定

支架制备完成后, 用 PBS 缓冲液清洗样品 10 min, 然后用分析天平称量支架湿重 (M_w), 记录冷冻干燥后的干重 (M_d), 并根据公式 (2) 计算样品的吸水率 (WHC):

$$B = \frac{M_w - M_d}{M_d} \quad (2)$$

式中:

B —吸水率 (WHC)。

M_w —支架湿重, g;

M_d —冷冻干燥后的干重, g。

1.3.5 降解率测定

将制备的样品放入 6 孔板中, 每孔含 3 mL PBS 缓冲液, 在 37 °C 下恒温浸泡不同时间 (1、5、10、15、20、30、40、50 d) 后称重。降解率 (R) 由公式 (3) 计算得出:

$$R = \frac{W_o - W_t}{W_o} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

R —降解率, %;

W_o —未浸泡 PBS 的支架质量, g;

W_t —浸泡过 PBS 的支架质量, g。

1.3.6 细胞接种及培养

将支架放置于每毫升 1×10^5 个的细胞悬液中, 37 °C 静置 2 h, 随后补充培养基至没过支架并进行细胞培养, 每 24 h 更换培养基。

1.3.7 细胞增殖测定

使用 CCK-8 试剂盒评估细胞增殖。将接种细胞后的支架放置在 37 °C、体积分数为 5% 的 CO_2 环境中培养, 在第 1、2、3、4、5、6 和 7 天进行 CCK-8 检测, 以确定支架中细胞的增殖情况。在培养后的相应天数取出平板, 加入 10 μL CCK-8 溶液。孵育 4 h 后, 取出 100 μL 相应的溶液, 最后使用多探测器酶标仪在 450 nm 波长下测量吸光度。

1.3.8 免疫荧光染色

用 Calcein-AM 和 PI 染色法进行活 / 死细胞检测。将培养 7 d 带有细胞的支架材料切成 1 cm \times 1 cm

的正方形，放入 6 孔板中，加入 2 mL PBS 缓冲液和 Calcein-AM/PI 溶液（1 μL 和 3 μL ）染色支架。用 PBS 冲洗支架，并在荧光显微镜下观察。

用 PBS 清洗支架并在室温下用多聚甲醛溶液固定 10 min。然后，用 Triton X-100 处理支架 5 min 使其通透。去除液体，加入 FITC 进行细胞骨架染色 30 min。最后加入 DAPI 染色细胞核 15 min。取出溶液并用 PBS 冲洗支架 3 次，然后置于显微镜下观察。

1.4 转录组测序

1.4.1 RNA提取、定量和鉴定

根据 TRIzol Reagent 的使用说明书提取总 RNA。使用微量紫外分光光度计测量 RNA 浓度和纯度。使用 Agilent Bioanalyzer 2100 系统 (Agilent Technologies, CA, USA) 的 RNA Nano 6000 检测试剂盒评估 RNA 的完整性。

1.4.2 转录组测序文库制备及测序

每个样品起始建库的总量为 1 μg 。根据制造商提供的说明，使用 HiSeq NGS Ultima Dual-mode mRNA Library Prep Kit for Illumina (Yeasen Biotechnology, China) 生成测序文库，并将 index 添加到每个样本的序列中。简而言之，使用带有 oligo (DT) 的磁珠从总 RNA 中调取 mRNA。合成第一链 cDNA，随后进行第二链 cDNA 合成。末端突出端通过外切核酸酶和聚合酶活性进行修复转化为平末端。DNA 片段 3' 末端腺苷酸化后，连接具有发夹环结构的 NEBNext 接头。使用 AMPure XP 磁珠 (Beckman Coulter, Beverly, USA) 对文库片段进行纯化。然后加入 3 μL USER Enzyme (NEB, USA) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15 min，在 PCR 前在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min。之后用高保真 DNA 聚合酶、通用 PCR 引物和 index (X) 引物进行 PCR。最后，纯化 PCR 产物 (AMPure XP 磁珠) 并在 Agilent Bioanalyzer 2100 系统上评估文库质量。据制造商的说明，在 Illumina NovaSeq 平台上对文库进行测序，生成 150 bp 的双末端序列。

1.4.3 数据分析

原始读数使用生物信息学分析平台 BMKCloud (www.biocloud.net) 进一步处理。Fastq 格式的原始数据 (Raw data) 首先通过内部 perl 脚本进行处理。在这一步中，通过从原始数据中删除包含接头的序列、包含 ploy-N 的序列和低质量的序列来获得

有效数据 (Clean data)。同时计算 Q20、Q30、GC 含量和序列重复水平。所有下游分析均基于高质量的 Clean data。基因功能通过序列比对基于以下数据库进行注释：KO (KEGG Ortholog database)；GO (Gene Ontology)。使用 edgeR 对两个样本进行差异表达分析。将 FDR < 0.01 和 Fold Change \geq 4 设置为显著差异表达的阈值。再对差异表达基因进行 GO、KEGG 功能分析。

1.4.4 实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 分析

使用 PrimeScriptTM RT 试剂盒 (TaKaRa, Japan) 将 RNA 反转录为 cDNA，并保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的储存器中。使用 PrimeScript RT 试剂盒 (TaKaRa, Japan) 在 10 μL 反应体积中加入 5 μL 2 \times SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, Japan)、1 μL cDNA 和 0.5 μL 引物，进行定量反转录 PCR (qRT-PCR)。反应在 Real-Time PCR 仪 (LightCycler 480 II, USA) 检测系统上进行评估。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法显示结果，并以 *Gapdh* 作为管家基因进行归一化。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量PCR引物

Table 1 Real-time PCR primers

Gene	Primer sequence	Product length/bp	TM/ $^{\circ}\text{C}$
<i>Gapdh</i>	F: GGAGAAACCAGCCAAGTAT	117	55.43
	R: CCATTGAAGTCACAGGAGA		54.08
<i>Col3a1</i>	F: TCCTGGTTTCCGTGGCTTAC	148	60.04
	R: CATCTTGACCACGGTCTCCC		60.04
<i>Bmp7</i>	F: TCCGCGAACGCTTCGATAAT	106	60.04
	R: GCCCAGATGGTTCTGGAGTC		59.89
<i>Bmp4</i>	F: TTATGCCAAGTCCTGCTGGG	123	60.03
	R: TTCATGGCTTTGGGCAGAGT		59.89

1.5 统计学分析

本研究所得实验数据均为三次重复测定的平均值，结果表示为平均值 \pm 标准差。使用 GraphPad Prism 10 软件进行统计分析，使用 Image J 进行图像分析。采用 Tukey-Kramer 检验的单因素方差分析方法评估各组之间的显著差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 支架微观结构

使用扫描电子显微镜 (SEM) 研究支架的表面和内部形态。如图 1 所示，与戊二醛交联后，所有支架的表面形态均呈现稳定的单层片状结构，支架

内部呈现多孔结构。如图 1b 所示，支架内部不规则孔径大小的直径约为 60~150 μm ，这种多孔结构可以促进营养物质交换，从而有助于细胞增殖和迁移^[20]。此外，鸡成肌细胞的大小通常在 30~100 μm 左右，因此所制备的支架可以满足细胞贴附、迁移和增殖所需的空间，有利于维持支架内细胞的生存和功能。同时，戊二醛溶液交联可以保持支架的形状和结构，提高支架在细胞培养中的机械稳定性。

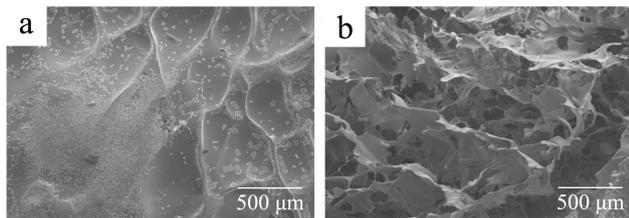


图 1 3D 打印支架的微观结构

Fig.1 Microstructure of 3D printed scaffolds

注: a 为表面结构, b 为内部结构。

2.2 3D打印参数

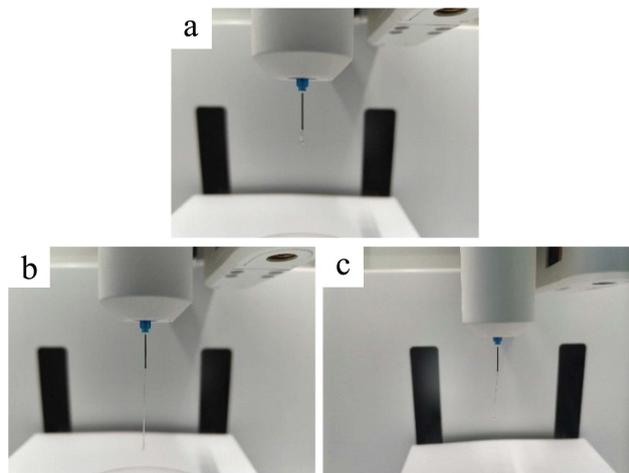


图 2 不同挤出速度的打印线股

Fig.2 Printed wire strands at different extrusion speeds

注: a 为 2 mm^3/s , b 为 4 mm^3/s , c 为 6 mm^3/s 。

为了提高打印支架的塑形精准度和整体打印效果，研究通过调整挤出速度探索打印过程中线股可以连续且均匀的打印参数^[21]。如图 2 所示，当挤出速度为 2 mm^3/s 时墨水不能形成线股而是在喷头处聚集形成椭圆形液滴，不能进行 3D 打印结构的构建。当挤出速度为 4 mm^3/s 时墨水形成的线股可以连续且均一挤出，这有助于在三维空间中精确定位和堆叠墨水，从而在打印过程中实现对复杂结构和形状的精准备制。当挤出速度达到 6 mm^3/s 时，由于挤出压力的增加导致墨水在流动过程中引起形变

不均导致均一度降低，影响打印结构的一致性。综上所述，选择挤出速度为 4 mm^3/s 的打印参数进行后续支架的制备及表征。

2.3 3D打印支架的制备和表征

2.3.1 3D打印性能

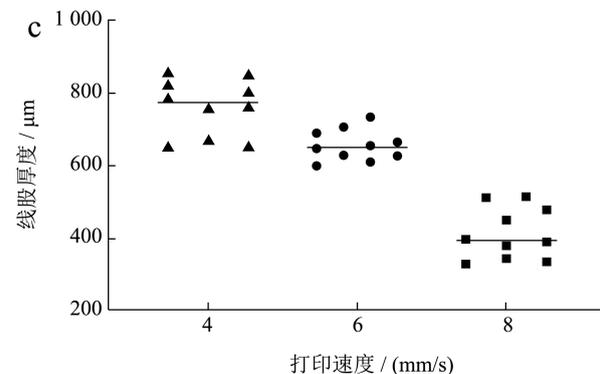
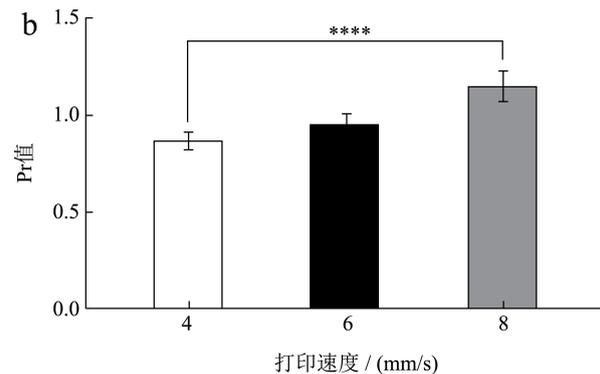
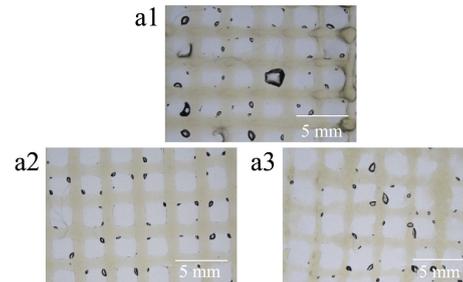


图 3 不同打印速度制备的 3D 打印支架

Fig.3 3D printed scaffolds prepared at different printing speeds

注: (a) 支架的显微镜照片; (b) 印刷性能; (c) 线股厚度。a1 为 4 mm^3/s , a2 为 6 mm^3/s , a3 为 8 mm^3/s 。统计学显著性设定为 **** $P < 0.0001$ 。

线股和孔隙的均匀性是 3D 打印支架的重要参数，对制备均匀且稳定的细胞生长环境及营养物质和氧气的输送具有重要意义^[22]。因此研究评估在不同打印速度下的墨水打印性能和线股均一性。如图 3a 所示，使用墨水通过挤压式 3D 打印机

构建三维结构，并以三维结构为基础进一步分析打印性能。打印性能 (Pr) 定义为打印方形网格结构中孔隙周长与孔隙面积的比率。计算得到的 Pr 值接近 1 表明适用于 3D 打印，有助于创建复杂细致的结构^[23]。相反，Pr 值低于或高于 1 则表示打印效果不佳。如图 3b 所示，随着打印速度的增加，打印结构的 Pr 值从 0.86 逐渐增加到 1.14。值得注意的是，在 6 mm/s 打印速度下的 Pr 值接近 1，这表明打印速度在一定程度上对提高打印性能具有积极影响且有利于构建均匀的孔隙结构。此外，研究测量了所有支架的线股厚度分布，以确定打印构建物的均一性。如图 3c 所示，墨水打印线股的厚度随着打印速度的提高而下降。6 mm/s 打印速度下的线股显示出更均匀的分布，有助于实现更高的打印质量。总之，研究结果表明，在 6 mm/s 打印速度下墨水表现出更好的打印性能可以创建复杂细致的结构。

2.3.2 戊二醛交联对支架机械性能的影响

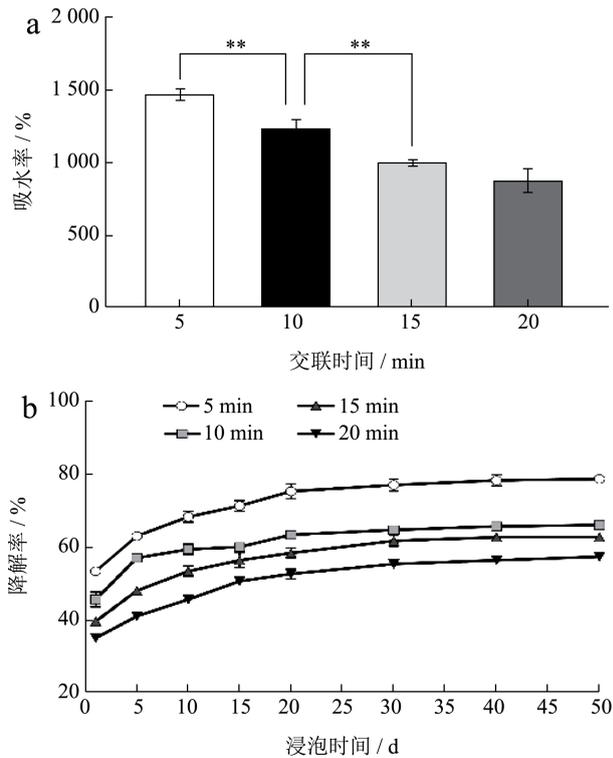


图 4 不同交联时间支架的机械性能 (a) 支架吸水率; (b) 支架降解率

Fig.4 Mechanical energy of scaffolds with different cross-linking times (a) scaffold water absorption rate; (b) scaffold degradation rate

注：交联时间 5、10、15、20 min 的支架分别为组 1、组 2、组 3、组 4，图 5 和图 6 同。统计学显著性设定为 $**P < 0.01$ 。

吸水性在水溶性物质交换、细胞活力和新陈代谢过程中起着关键作用，因此研究评估了不同交联时间对支架的吸水性的影响。如图 4a 所示，所有支架都表现出优异的吸水性能。随着时间交联增加，吸水率逐渐降低，推测由于交联时间的增加导致支架内部的多孔结构减少从而影响支架的吸水性。此外，为了研究支架为细胞提供微环境的状态，研究评估了支架的稳定性和持续性。如图 4b 所示，研究对支架在 PBS 缓冲液中的降解性进行评价。在最初的 5~10 d 内，支架降解速率显著高于 10 d 之后，而在 10~50 d 内，质量损失速度趋势降低。值得注意的是，组 1 在 PBS 中的结构完整性显著低于其他组别，而组 4 在 50 d 前的结构完整性显著高于其他组别。这些结果表明，随着交联的时间增加支架交联的程度越大且具有更好的机械稳定性。

2.3.3 支架生物相容性测试

为了评估 3D 打印支架的生物相容性，研究通过 Calcein-AM/PI 染色检测了接种细胞并孵育 7 d 后支架上的细胞活力。如图 5 所示，组 1 和组 2 的细胞数量明显高于组 3 和组 4。此外，组 3 和组 4 的细胞形态多为圆形，细胞尚未伸展和迁移，表明支架可能对细胞产生了不利影响阻碍了细胞增殖，主要归因于戊二醛交联时间过长导致细胞黏附位点减少进而影响细胞黏附。同时，戊二醛交联导致支架内多孔结构的减少不利于细胞迁移。值得注意的是，组 1 和组 2 上的细胞分布均匀，同时在细胞形态方面呈现梭形和纤维形态，显著优于其他组别，推测具有高亲水性和持水能力的支架可以增强细胞粘附和提供更好的迁移条件^[24]。此外，组 2 的细胞数量明显高于组 1，推测细胞增殖能力在一定程度上与降解率呈负相关^[25]，较高的降解率可能导致细胞粘附位点的减少从而影响细胞增殖行为。

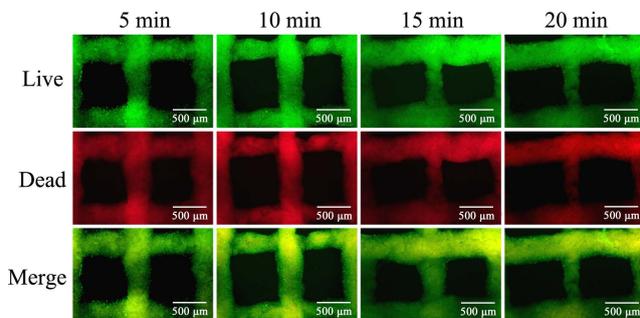


图 5 第 7 天 Calcein-AM/PI 染色的支架荧光显微照片

Fig.5 Fluorescence micrographs of Calcein-AM/PI-stained scaffolds on day 7

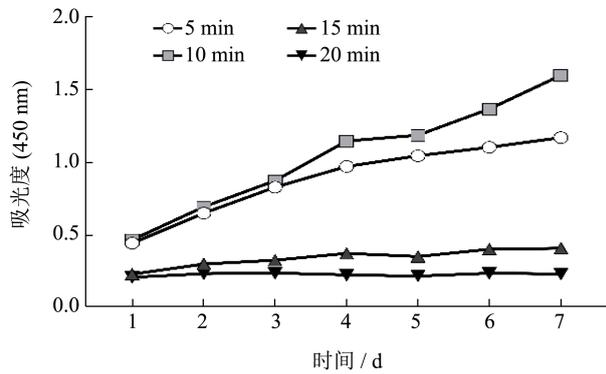


图 6 细胞增殖曲线

Fig.6 Cell proliferation profile

为了进一步研究打印支架对细胞增殖的影响, 研究使用 CKK-8 检测法监测了支架上细胞从第 1 天到第 7 天的增殖情况。如图 6 所示, 24 h 内组 1 和组 2 的细胞贴附效率显著高于组 3 和组 4。并且根据细胞增殖时间发现, 组 2 内的细胞在第 3 天就实现了细胞倍增, 并在第 4 天进入细胞增殖的指数生长期, 与正常细胞增殖曲线基本保持一致。相比之下, 组 3 和组 4 在整个细胞培养阶段增殖曲线并未发生显著变化, 表明细胞在支架上并未增殖或停滞增殖, 这与上述结果一致。值得注意的是, 组 1 的细胞在 1~4 d 中由潜伏期向指数增长期过渡, 但未形成显著的指数增长便进入平台期, 细胞增殖速率降低, 推测细胞迁移和增殖程中受到支架的限制。综上所述, 组 2 (交联时间为 10 min 的支架) 表现出更优异的生物相容性、细胞增殖行为和机械稳定性。基于这些结果, 研究选择交联时间为 10 min 的支架作为后续细胞培养支架。

2.4 3D细胞培养

为了更好的模拟细胞在体内的持续生长过程以及构建细胞培育肉模型, 研究通过连续培养进一步研究动态细胞命运。如图 7 所示, 7 d 内支架上细胞快速增殖以及迁移, 在第 10 天时, 支架孔径边缘出现细胞与支架连接的细胞群; 第 13 天时支架边缘的细胞连接形成线状细胞群; 第 16 天时整个支架被细胞充分覆盖。总之, 支架内细胞在前期进行大量的细胞增殖及迁移, 中期细胞在支架孔径中继续增殖, 最终在支架孔径中完成全部增殖过程并形成块状类组织结构的细胞培育肉模型。

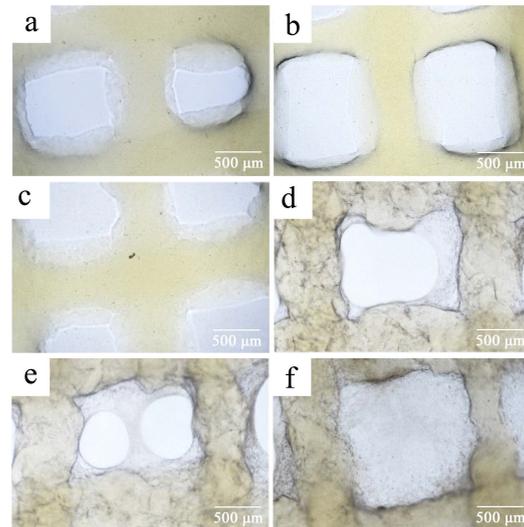


图 7 支架接种细胞后连续培养的明场显微照片

Fig.7 Bright-field micrographs of continuous culture after scaffold inoculation of cells

注: a~f 分别为培养 1、4、7、10、13、16 d 的显微照片。

2.5 2D和3D细胞培养的差异

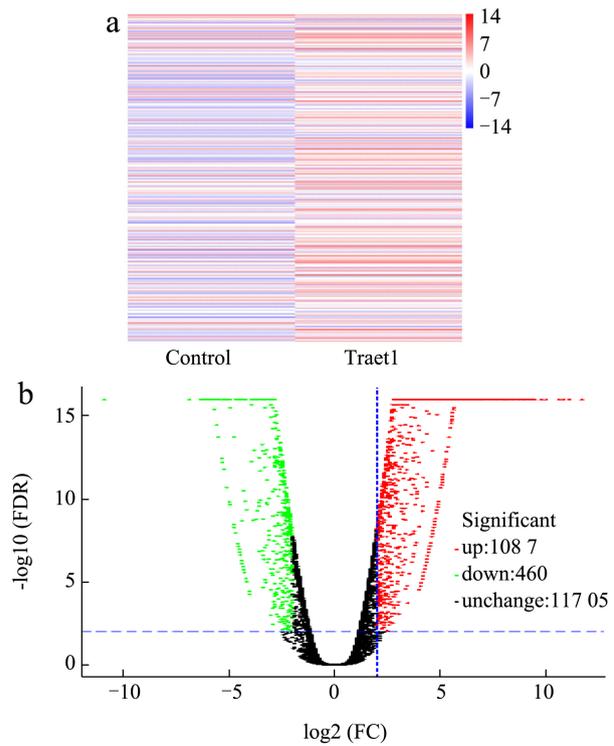


图 8 2D 和 3D 细胞培养转录组学数据分析

Fig.8 2D and 3D cell culture transcriptomics data analysis

注: a 为基因聚类图分析, b 为差异表达基因火山图分析。

a 中 2D 细胞培养为 Control 组, 3D 细胞培养为 Traet1 组。b 中每个点代表一个基因, 红色点表示显著上调的基因, 蓝色点表示显著下调的基因, 黑色点表示差异不显著基因。

为了更深入的了解 2D 和 3D 细胞培养之间的差异，研究对两类样本进行转录组测序并对数据进行挖掘，对基因表达进行差异对比分析。进一步的进行了基因聚类分析，结果表明：如图 8a 所示，揭示了不同表达谱的差异基因。如图 8b 所示，通过支架培养的细胞显著上调的差异基因有 1 087 个，显著下调的差异基因 460 个。其中高表达基因有 *Bmp7*、*Lrrc3b*、*Cdh20*、*Chad*、*Bmp4*、*Col3a1*、*Gpnmb*、*Lama4*、*Cd36*、*Figf* 等，*Cd36* 和 *Lama4* 基因在细胞黏附中发挥作用^[26, 27]，*Bmp7* 主要参与细胞增殖过程^[28]。此外，*Cdh20* 和 *Col3a1* 分别编码钙黏附蛋白和胶原蛋白类型 III，主要参与细胞迁移过程以及调控细胞结构和组织发育^[29,30]。由此推测，上述基因的高表达对细胞迁移、粘附和增殖起着关键作用。进一步揭示了基于支架进行细胞培养过程中细胞的主要功能及分子调控机制。

2.5.1 差异表达基因GO功能富集分析

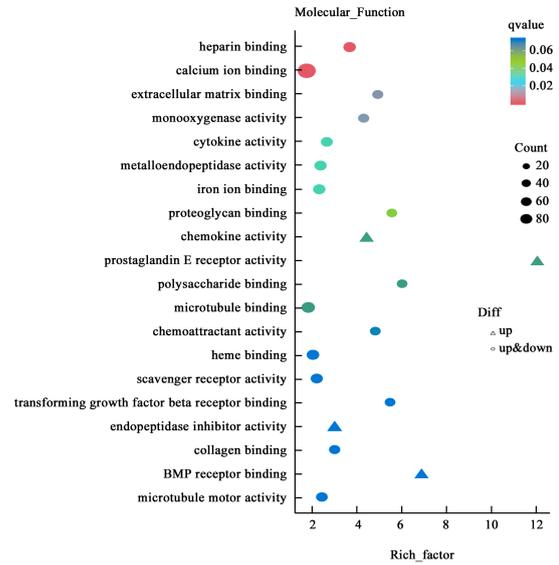
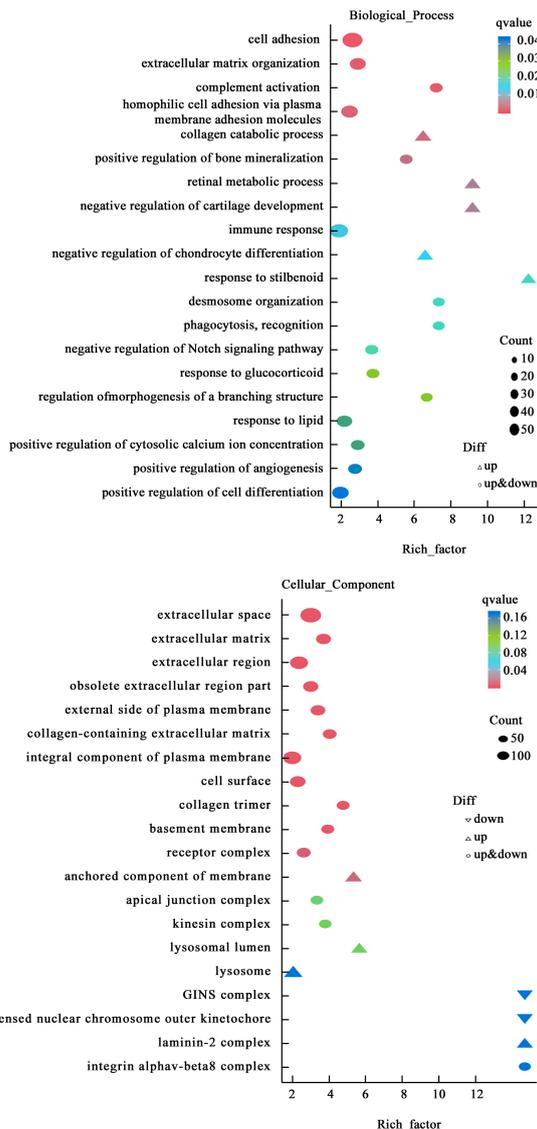


图 9 差异表达基因 GO 富集分析

Fig.9 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

为了系统性的理解差异表达基因集合的功能和生物学意义，研究使用 ClusterProfiler 超几何检验方法分别对生物学过程、分子功能和细胞组分进行富集分析。如图 9 所示，富集结果显示，在生物学过程方面，细胞外基质组织、胶原代谢、细胞间连接的形成和细胞间相互作用等显著富集，这对细胞贴附和细胞增殖的生物学过程中起着重要作用。细胞组分中涉及细胞骨架（如微管）和基质相互作用等，这表明细胞内部结构的动态变化和促进细胞迁移的可能性。对于分子功能方面，钙离子结合、铁离子结合、趋化因子活性和细胞因子活性等显著富集表明 3D 细胞培养更有利于细胞增殖。综上所述，这些功能在生物过程中发挥着维持细胞形态、细胞运动、细胞内物质运输、细胞粘附等作用。这表明 3D 细胞培养可以促进细胞黏附、增殖和迁移等生物学过程。

2.5.2 差异表达基因KEGG信号通路富集分析

为了系统阐述基因的相关功能与作用通路，研究通过 KEGG 通路富集分析明确差异表达基因参与的关键代谢和信号转导途径。如图 10 所示，粘附信号通路被显著富集，同时 *Chad*、*LAMA4*、*FIGF* 等基因的显著高表达促进细胞粘附形成黏附结构，此外细胞粘附关键基因同时参与细胞的迁移过程，使细胞能够沿基质表面移动并且与细胞的生长和增殖密切相关，影响细胞的生物学活动^[31]。表明在 3D 细胞培养中可以促进细胞的黏附和迁移，这与上述结果一致。同时 PPAR 信号通路、视黄醇代谢、细胞因子-细胞因子受体相互作用和类固醇激素生物合成等信号

通路的显著富集也表明 3D 细胞培养中信号传导、能量调控和细胞相互作用等方面具有正相关关系。

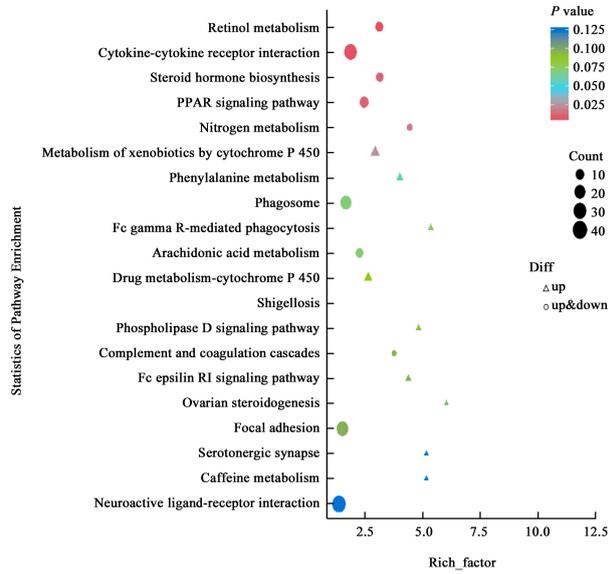


图 10 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig.10 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

2.5.3 差异表达基因qRT-PCR验证

为了验证转录组数据的可靠性和准确性，选择与对照组相比差异表达显著的基因，进行 qRT-PCR 定量分析。结果如图 11 所示，3D 细胞培养中 *Col3a1*、*Bmp7* 和 *Bmp4* 的表达量显著高于对照组，与转录组结果一致。其中 *Col3a1* 编码的胶原蛋白 III α 1 链是一种结构性蛋白，参与细胞与基质的贴附，此外胶原蛋白是细胞外基质的重要组成部分，可以提供细胞贴附所需的结构支持。*Col3a1* 也与细胞运动相关，在组织修复和再生过程中，胶原蛋白的排列和变化可以影响细胞的迁移和定向性运动。因此在 3D 细胞培养中 *Col3a1* 的高表达可以促进细胞的贴附和运动。这与 GO 富集结果一致。此外，*Bmp4* 属于骨形成蛋白家族，是一种细胞外信号蛋白，它在生物体内的多种过程中发挥关键作用。与 *Bmp4* 类似，*Bmp7* 也是骨形成蛋白家族的成员，具有多方面的生物学功能。*Bmp4* 和 *Bmp7* 的高表达可以影响细胞表面受体的表达，调节细胞对基质组分的识别和黏附，从而影响细胞的贴附过程^[32]。同时 *Bmp4* 和 *Bmp7* 在细胞迁移和运动方面也发挥作用。它们参与调控细胞内信号通路，影响细胞的极性、运动和方向性迁移，对组织的形成和维持具有重要作用，这与转录组富集分析结果一致。综上所述，3D 细胞培养对细胞贴附、增殖和迁移具有正调控作用。同时，两种培养方式在细胞增殖、贴附和运动等面

存在显著差异。

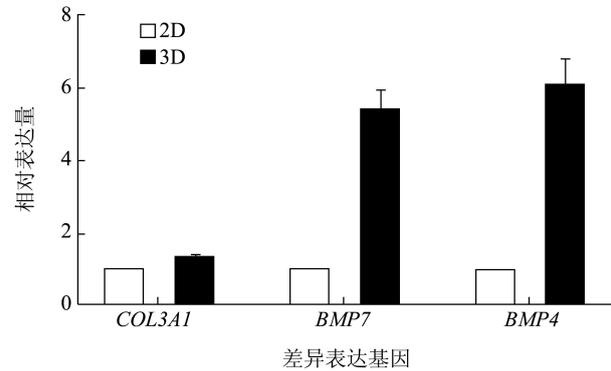


图 11 转录组测序中差异表达基因 qRT-PCR 验证
Fig.11 Validation of differentially expressed genes in RNA-seq by qRT-PCR

3 结论

研究开发了用于细胞培育肉的 3D 打印支架，研究了由蛋清和明胶溶液组成的新型复合墨水，制备了 3D 打印支架。优化出 4.00 mm³/s 挤出速度和 6.00 mm/s 打印速度的关键打印参数，制备的支架具有更好的均匀性和塑形精度。开发了具有优异生物相容性和更好的机械稳定的支架交联时间。更进一步的探索了促进细胞贴附、增殖和迁移的支架开发条件，细胞增殖曲线进一步揭示了 3D 打印支架在细胞培养中的显著优势。最后通过转录组学阐明了支架在细胞培养中增殖的生物过程、细胞迁移与支架的互作关系及细胞培养过程的信号途径，为细胞培育肉制造提供了新的组织化培养方法的新思路。总的来说，这项研究揭示了一种通过 3D 打印支架制造细胞培育肉的新方法，为细胞培育肉开发提供了全新的思路。

参考文献

- [1] POST M J, LEVENBERG S, KAPLAN D L, et al. Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat [J]. Nature Food, 2020, 1(7): 403-415.
- [2] JANG J, YI H G, CHO D W. 3D printed tissue models: present and future [J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2016, 2(10): 1722-1731.
- [3] K HANDRAL H, HUA TAY S, WAN CHAN W, et al. 3D Printing of cultured meat products [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(1): 272-281.
- [4] YAN Q, DONG H, SU J, et al. A review of 3D printing technology for medical applications [J]. Engineering, 2018, 4(5): 729-742.
- [5] YANG G-H, KIM M, KIM G. A hybrid PCL/collagen scaffold consisting of solid freeform-fabricated struts

- and EHD-direct-jet-processed fibrous threads for tissue regeneration [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, 450: 159-167.
- [6] WANG W, CAETANO G, AMBLER W S, et al. Enhancing the hydrophilicity and cell attachment of 3D printed PCL/graphene scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Materials*, 2016, 9(12): 992.
- [7] LIN Z, WU M, HE H, et al. 3D printing of mechanically stable calcium-free alginate-based scaffolds with tunable surface charge to enable cell adhesion and facile biofunctionalization [J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(9): 1808439.
- [8] RHEE S, PUETZER J L, MASON B N, et al. 3D bioprinting of spatially heterogeneous collagen constructs for cartilage tissue engineering [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016, 2(10): 1800-1805.
- [9] YADAV L R, CHANDRAN S V, LAVANYA K, et al. Chitosan-based 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 183: 1925-1938.
- [10] HUANG J, HUANG Z, LIANG Y, et al. 3D printed gelatin/hydroxyapatite scaffolds for stem cell chondrogenic differentiation and articular cartilage repair [J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(7): 2620-2630.
- [11] OUYANG L, HIGHLEY C B, RODELL C B, et al. 3D printing of shear-thinning hyaluronic acid hydrogels with secondary cross-linking [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016, 2(10): 1743-1751.
- [12] WEI L, WU S, KUSS M, et al. 3D printing of silk fibroin-based hybrid scaffold treated with platelet rich plasma for bone tissue engineering [J]. *Bioactive Materials*, 2019, 4: 256-260.
- [13] DONG X, ZHANG Y Q. An insight on egg white: From most common functional food to biomaterial application [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2021, 109(7): 1045-1058.
- [14] HUANG K, HOU J, GU Z, et al. Egg-white-/eggshell-based biomimetic hybrid hydrogels for bone regeneration [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, 5(10): 5384-5391.
- [15] CARPENA N T, ABUEVA C D, PADALHIN A R, et al. Evaluation of egg white ovomucin-based porous scaffold as an implantable biomaterial for tissue engineering [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2017, 105(7): 2107-2117.
- [16] KIM H, YANG G H, CHOI C H, et al. Gelatin/PVA scaffolds fabricated using a 3D-printing process employed with a low-temperature plate for hard tissue regeneration: Fabrication and characterizations [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 119-127.
- [17] KUO C C, QIN H, CHENG Y, et al. An integrated manufacturing strategy to fabricate delivery system using gelatin/alginate hybrid hydrogels: 3D printing and freeze-drying [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 111: 106262.
- [18] TAN J J Y, LEE C P, HASHIMOTO M. Preheating of gelatin improves its printability with transglutaminase in direct ink writing 3D printing [J]. *International Journal of Bioprinting*, 2020, 6(4): 296.
- [19] LIU Y, WENG R, WANG W, et al. Tunable physical and mechanical properties of gelatin hydrogel after transglutaminase crosslinking on two gelatin types [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 405-413.
- [20] LI X, YUAN Y, LIU L, et al. 3D printing of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffold with hierarchical porous structure for bone regeneration [J]. *Bio-Design and Manufacturing*, 2020, 3: 15-29.
- [21] ZHANG B, CRISTESCU R, CHRISEY D B, et al. Solvent-based extrusion 3D printing for the fabrication of tissue engineering scaffolds [J]. *International Journal of Bioprinting*, 2020, 6(1): 211.
- [22] FERLIN K M, PRENDERGAST M E, MILLER M L, et al. Influence of 3D printed porous architecture on mesenchymal stem cell enrichment and differentiation [J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 32: 161-169.
- [23] IM S, CHOE G, SEOK J M, et al. An osteogenic bioink composed of alginate, cellulose nanofibrils, and polydopamine nanoparticles for 3D bioprinting and bone tissue engineering [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 205: 520-529.
- [24] KALVA S N, DALVI Y B, KHANAM N, et al. Air-jet spun PHBV/PCL blend tissue engineering scaffolds exhibit improved mechanical properties and cell proliferation [J]. *Results in Materials*, 2023, 19: 100415.
- [25] SUNG H J, MEREDITH C, JOHNSON C, et al. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(26): 5735-5742.
- [26] SILVERSTEIN R L, FEBBRAIO M. *CD36*, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior [J]. *Science Signaling*, 2009, 2(72): re3-re.
- [27] SHAN N, ZHANG X, XIAO X, et al. Laminin $\alpha 4$ (*LAMA4*) expression promotes trophoblast cell invasion, migration, and angiogenesis, and is lowered in preeclamptic placentas [J]. *Placenta*, 2015, 36(8): 809-820.
- [28] QING W, GUANG X C, LIN G, et al. The osteogenic study of tissue engineering bone with *BMP2* and *BMP7* gene-modified rat adipose-derived stem cell [J]. *Biomed Research International*, 2012, 2012: 410879.
- [29] CHARRASSE S, COMUNALE F, DE ROSSI S, et al. *Rab35* regulates cadherin-mediated adherens junction formation and myoblast fusion [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2013, 24(3): 234-245.
- [30] QIU F, SUN R, DENG N, et al. miR-29a/b enhances cell migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma progression by regulating *SPARC* and *COL3A1* gene expression [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0120969.
- [31] PARSONS J T, MARTIN K H, SLACK J K, et al. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement [J]. *Oncogene*, 2000, 19(49): 5606-5613.
- [32] YUAN S, PAN Q, FU C J, et al. Effect of growth factors (*BMP-4/7* & *bFGF*) on proliferation & osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. *The Indian Journal of Medical Research*, 2013, 138(1): 104.