DOI:10.12441/spyswjs.20230420003 [文章编号] 1673-1689(2025)03-0033-11

用于细胞培养肉支架的水凝胶性质研究

费卓成 关 欣 严其洋 周景文 堵国成*

(江南大学未来食品科学中心,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】构建可应用于制备高品质块状细胞培养肉的兼具优良机械性能和细胞适配性的水凝胶支架。**【方法】**选取3种生物源蛋白质凝胶材料明胶(gelatin,GEL)、胶原蛋白(collagen,COL)、纤维蛋白原(fibrinogen,FIB)和3种多糖凝胶材料海藻酸钠(sodium alginate,SA)、壳聚糖(chitosan,CS)、结冷胶(gellan gum,GG),通过单一材料交联或两类材料复配,制备单网络(single network,SN)水凝胶和双网络(double network,DN)水凝胶。采用硬度、弹性和降解率评价其物理性能,通过表面细胞黏附率、增殖率和分化率表征其生物学性能,采用肌肉干细胞三维培养验证水凝胶的支架功能。**【结果】**DN水凝胶兼具较高的硬度和弹性,较慢的生物降解率,优于SN水凝胶的物理性能。DN水凝胶中添加SA会阻碍细胞黏附、增殖和分化,其作为第一网络材料时表现出最低的细胞相容性。与此相反,以CS为第一网络材料的DN水凝胶生物相容性较高,其中COL与CS复配制备的DN水凝胶能够有效促进肌肉干细胞的三维增殖与分化。该水凝胶中,肌肉干细胞展现出最佳的铺展形态、最高的增殖率及肌球蛋白重链(myosin heavy chain,MyHC)蛋白表达水平。**【结论】**该研究以高细胞相容性为导向筛选了适用于三维培养猪肌肉干细胞的DN水凝胶材料,COL与CS复配制备的DN水凝胶可作为支架材料应用于高品质块状细胞培养肉的制备。

关键词:细胞培养肉;猪肌肉干细胞;双网络水凝胶;三维培养

Study on the Properties of Hydrogels as Scaffolds for Cultured Meat

*FEI Zhuocheng GUAN Xin YAN Qiyang ZHOU Jingwen DU Guocheng**

(Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to construct hydrogel scaffolds with both excellent mechanical properties and cell suitability for preparing high-quality structured cultured meat. [**Method**] Three biogenic protein gel materials (gelatin, collagen, and fibrinogen) and three polysaccharide gel materials (sodium alginate, chitosan, and gellan gum) were selected to construct single network (SN) hydrogels and double network (DN) hydrogels by cross-linking a single material or two materials of different categories. The physical properties (hardness, elasticity, and degradation rate) of the prepared hydrogels were characterized. Moreover, the biological properties of the prepared hydrogels were characterized in terms of cell adhesion, proliferation, and differentiation rates on the hydrogel surface. The scaffold function of the prepared hydrogels was then verified by three-dimensional culture of muscle stem cells. [**Result**] DN hydrogels demonstrated high hardness, high elasticity, and slow biodegradation, with the physical properties superior to those of SN hydrogels. In DN hydrogels, the addition of sodium alginate impeded the adhesion, proliferation, and differentiation of cells, and thus the biocompatibility of DN hydrogels with sodium alginate as the first network material was the lowest. DN hydrogels with chitosan as the first network material had high biocompatibility. In particular, the DN hydrogels with collagen and chitosan promoted the three-dimensional proliferation and differentiation of muscle stem cells, in which the cells showed the highest spreading and proliferation rates, as well as the highest expression of

基金项目:国家自然科学基金项目(32102132);浙江大学上海高等研究院繁星科学基金项目(SN-ZJU-SIAS-0013)。

通信作者:堵国成(1965—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事发酵工程和食品生物技术研究。E-mail:gcdu@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-04-20 **修回日期:**2023-06-12

myosin heavy chain. [**Conclusion**] The material suitable for three-dimensional culture of porcine muscle stem cells are selected for the preparation of DN hydrogels based on high cell compatibility. The DN hydrogels with collagen and chitosan can be used as a scaffold material for preparing high-quality structured cultured meat.

Keywords: cultured meat; porcine muscle stem cells; double network hydrogel; three-dimensional culture

随着社会发展和经济水平的提高，肉制品的市场需求量持续增长。基于传统畜牧业养殖的肉制品生产效率较低，其引发的生态环境恶化问题日益凸显。近期，细胞培养肉技术作为一种高效、环保的替代方案，获得广泛关注[1]。该技术基于细胞生物学和组织工程技术，从动物组织中分离提取干细胞，在生物反应器中进行大规模扩增，诱导分化产生肌纤维、脂肪细胞等构成肌肉组织的终末细胞，从而生产可替代传统肉制品的产品[2]。例如，从新鲜动物肌肉组织中分离获取具有肌源性分化能力的肌肉干细胞，经体外增殖和分化后形成多核肌纤维，并表达特有的肌球蛋白[3]。

目前，细胞培养肉的主要产品形式分为糜状和块状两大类。相比之下，块状细胞培养肉需要在细胞诱导分化阶段使用三维培养技术，以获得与真实肌肉组织接近的厚度和组织结构[4]。在这一过程中，细胞支架起到了关键作用[5]。三维支架的设计旨在模拟动物组织中的细胞外基质（extracellular matrix，ECM），为体外细胞的生长、增殖和分化提供立体空间和环境条件[6]。ECM主要由COL、弹性蛋白、纤维蛋白和蛋白多糖等成分组成，这些成分在组织中由成纤维细胞等多种类型的细胞分泌并沉积形成[7]。水凝胶是由水和亲水聚合物组成的一类材料，可经酶、热、光或离子交联等固化方式包埋细胞[8]，其交联形成的微孔结构对氧气和营养素具有良好的渗透性[9]。因此，水凝胶成为最有潜力实现体外三维细胞培养的支架材料。生物源蛋白质凝胶材料（如COL[10]、GEL[11-12]和FIB[13]等）具有良好的细胞相容性，已广泛应用于医药领域。然而，这些材料交联形成的SN水凝胶由低密度的单一聚合物网络组成，具有较低的机械性能、硬度和弹性，难以模拟真实肌肉组织的质地和口感。另一方面，多糖凝胶材料（如SA、CS和GG等）具有良好的机械性能和低廉成本，常作为食品添加剂被广泛应用于食品加工领域。但这类材料交联形成的SN水凝胶与细胞的相容性较差，难以直接作为细胞培养肉的支架。因此，通过将两种不同性质的材料复配形成互穿网络结构的DN水凝胶，兼具高机械性和细胞适配性[14]，对细胞培养肉的组织塑形和品质提升具有十分重要的意义。

作者选取3种生物源蛋白质凝胶材料（COL、GEL、FIB）和3种多糖凝胶材料（SA、CS、GG），制备SN水凝胶和DN水凝胶。通过细胞毒性测试、物理学性能（硬度、弹性、降解率）及生物学性能（细胞黏附率、增殖效率和分化效率）的综合分析，研究细胞三维培养过程中水凝胶生物降解率、细胞铺展及增殖、分化效率，明确各类水凝胶应用于猪肌肉干细胞三维培养的可行性，探索最佳的水凝胶材料复配组合，为块状细胞培养肉的开发提供理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

GEL、COL、FIB、SA、GG、凝血酶、基质胶：上海Sigma-Aldrich贸易有限公司；TG酶：泰兴东圣生物科技有限公司；三聚磷酸钠、CS（脱乙酰度≥95%）：上海阿拉丁生化科技有限公司；胰酶、胎牛血清、马血清（HS）、DMEM培养基、青霉素/链霉素（P/S）、Triton X-100、预制胶、电泳液：美国赛默飞世尔科技有限公司；二甲基亚砜（DMSO）、封闭液、BCA蛋白质定量试剂盒、RIPA细胞裂解液：广州碧云天生物技术有限公司；MTT：北京索莱宝科技有限公司；牛血清白蛋白：上海生工生物工程股份有限公司；多聚甲醛、无水氯化钙：上海国药集团化学试剂有限公司；GAPDH一抗、鬼笔环肽、DAPI、荧光标记二抗：美国莱恩生物科技有限公司；MyHC一抗：上海圣克鲁斯生物技术有限公司；阿尔玛蓝细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒：江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.2 仪器与设备

二氧化碳培养箱：FORMA型，美国赛默飞世尔科技有限公司；生物安全柜：1300A2型，美国赛默飞世尔科技有限公司；细胞计数仪：Countess 3型，美国赛默飞世尔科技有限公司；倒置显微镜：MF52-N型，广州明美科技有限公司；涡旋振荡器：DLAB MX-S型，北京大龙仪器有限公司；小型高速离心机：5425R型，德国艾本德有限公司；物性分析仪：TA.XT Plus型，英国Stable Micro System公司；多功能酶标仪：Cytation3型，美国伯腾仪器有限公司；电泳仪：PowerPac HC型，美国BIO-RED公司；转膜

仪：Trans-Blot SD型，美国BIO-RED公司；电子天平：JB5374-91型，常州梅特勒托利多公司；凝胶成像系统：4200SF型，美国BIO-RED公司。

1.3　试验方法

1.3.1　猪肌肉干细胞来源

使用细胞为江南大学未来食品科学中心关欣课题组分离和纯化的猪肌肉干细胞[15]。

1.3.2　水凝胶材料的交联固化

使用水凝胶材料及其交联剂质量浓度见表1。将相应质量浓度的GEL、COL、FIB溶入DMEM培养基后，加入相应质量浓度的交联剂，于37 ℃静置60~90 min交联固化制备蛋白质SN水凝胶。将相应质量浓度的SA、CS、GG溶于DMEM培养基，而后加入相应质量浓度的交联剂，于37 ℃静置5 min交联固化制得多糖SN水凝胶。以DMEM培养基为溶剂，将蛋白质凝胶材料、多糖凝胶材料、TG酶和凝血酶单独按表1所示质量浓度的3倍配制溶液。将一种蛋白质凝胶溶液、该蛋白质凝胶材料对应的交联剂溶液和一种多糖凝胶溶液以体积比1∶1∶1混合均匀，置于37 ℃下静置60~90 min进行第一次交联固化。随后加入该多糖凝胶材料对应的交联剂溶液，使水凝胶完全浸没，静置5 min后进行第二次交联固化，最终制得DN水凝胶。

表1　水凝胶材料的质量浓度及其交联剂

Table 1　Mass concentration of hydrogel materials and their crosslinking agents

水凝胶材料		质量浓度/(mg/mL)	交联剂及其质量浓度
蛋白质凝胶材料	GEL	50	TG酶50 mg/mL
	COL	15	TG酶50 mg/mL
	FIB	4	凝血酶4 mg/mL
多糖凝胶材料	SA	6	氯化钙10 mg/mL
	CS	3	三聚磷酸钠2.5 mg/mL
	GG	5	氯化钙10 mg/mL

注：蛋白质凝胶材料、多糖凝胶材料、蛋白质凝胶材料对应交联剂的质量浓度均为该溶质质量与交联固化后的水凝胶体积比；多糖凝胶材料对应交联剂的质量浓度为该溶质质量与溶剂DMEM的体积比。

1.3.3　细胞毒性试验

根据GB/T 16886.5—2017，样品按照浸提用液与样品以1 mL∶1 cm^3的浸提比例浸泡于完全培养基中，于37 ℃浸提24 h后收集浸提液。将猪肌肉干细胞接种于96孔板中，待细胞完全贴壁后吸去培养液，分别加入浸提液（试验组）或完全培养基（空白对照组），于37 ℃培养24 h后吸去浸提液或培养基，加入MTT工作液，于37 ℃孵育4 h后吸去工作液，加入DMSO，于37 ℃摇床振荡培养15 min，使用酶标仪于570 nm波长处测定光密度。细胞存活率按式（1）计算。

$$R_1 = D_{570e}/D_{570b} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

R_1——细胞存活率，%；

D_{570e}——试验组的光密度；

D_{570b}——空白对照组的光密度。

1.3.4　硬度和弹性测定

选择物性分析仪的全质构分析模式，使用P/0.5探头，测前速度为2 mm/s，测试速度为1 mm/s，测后速度为2 mm/s，触发力为5 g，形变量为75%。取直径20 mm，厚度10 mm的圆柱形水凝胶样品进行2次压缩试验，2次压缩间隔为5 s，记录样品质构特性中的硬度和弹性数据。

1.3.5　降解率测定

将已交联固化的水凝胶称质量，记为M_0，按照浸提用液与样品以比1 mL∶1 cm^3的浸提比例浸泡于完全培养基中，并遵循细胞培养每24 h更换一次培养基的频率，分别在3、7、14、21 d的浸提时间点吸净完全培养基并称质量，记为M_n。降解率按式（2）计算。

$$D = (M_0 - M_n)/M_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中：

D——降解率，%；

M_0——浸泡前水凝胶的质量，g；

M_n——浸泡第n天时水凝胶的质量，g。

1.3.6　细胞黏附率、增殖率测定

1）水凝胶表面细胞黏附率测定：将猪肌肉干细胞接种于水凝胶包埋的24孔板中，设置无水凝胶包埋的24孔板为阴性对照组（Ctrl），设置基质胶包埋的24孔板为阳性对照组。接种细胞6 h后

吸去培养基，使用PBS缓冲液冲洗3次洗去未黏附细胞，加入阿尔玛蓝工作液，于细胞培养箱中培养4 h。吸取上清液置于96孔板中，使用酶标仪测定荧光强度，计算阿尔玛蓝还原率，读取对应细胞数量。细胞黏附率按式(3)计算。

$$R_2 = N/N_+ \times 100\% \quad (3)$$

式中：

R_2——细胞黏附率，%；

N——试验组和阴性对照组细胞数量，个；

N_+——阳性对照组细胞数量，个。

2)水凝胶表面细胞增殖率测定：将猪肌肉干细胞接种于水凝胶包埋的24孔板中，设置无水凝胶包埋的24孔板为阴性对照组(Ctrl)。于细胞培养箱中培养6 h后吸去培养基，使用PBS缓冲液冲洗3次洗去未黏附细胞，补充完全培养基继续培养66 h后吸去原培养基，加入阿尔玛蓝工作液，于细胞培养箱中培养4 h。吸取上清液置于96孔板中，使用酶标仪测定荧光强度，通过换算得到培养72 h的总细胞数量。表面细胞增殖率按式(4)计算。

$$R_3 = (N_{72}/N_6 - 1) \times 100\% \quad (4)$$

式中：

R_3——水凝胶表面细胞增殖率，%；

N_6——试验组和阴性对照组培养6 h的黏附细胞数量，个；

N_{72}——试验组和阴性对照组培养72 h的总细胞数量，个。

3)水凝胶三维培养细胞增殖率测定：猪肌肉干细胞与水凝胶混合悬液加入24孔板中并完成交联固化后，加入完全培养基，于细胞培养箱中培养72 h后吸去培养基，加入阿尔玛蓝工作液，于细胞培养箱中培养4 h。吸取上清液置于96孔板中，使用酶标仪测定荧光强度，通过换算得到培养72 h的总细胞数量。细胞增殖率按式(5)计算。

$$R_4 = (N_{72b}/30\,000 - 1) \times 100\% \quad (5)$$

式中：

R_4——水凝胶三维培养细胞增殖率，%；

N_{72b}——水凝胶三维培养试验组培养72 h的总细胞数量，个。

1.3.7 低圆形度细胞占比测定

水凝胶包埋的24孔板中接种猪肌肉干细胞，培养2 h后吸去培养基，加入水凝胶液包埋细胞并交联固化后，补充完全培养基，培养24 h。而后通过多聚甲醛固定及Triton X-100缓冲液处理，使用鬼笔环肽工作液对F-肌动蛋白染色，加入DAPI溶液对细胞核染色。在荧光显微镜(20倍镜)下拍摄细胞，使用Image J软件对圆形度低于0.4的细胞计数，计算其占比。

1.3.8 细胞分化率测定

将猪肌肉干细胞接种于水凝胶包埋的24孔板中，设置接种猪肌肉干细胞的无水凝胶包埋的24孔板为阴性对照组(Ctrl)。诱导细胞增殖24 h后，加入分化培养基(体积分数2%的HS、体积分数1%的P/S、体积分数97%的DMEM)培养72 h。使用MyHC一抗对样品进行免疫荧光染色，在荧光显微镜(10倍镜)下拍摄细胞，使用Image J软件对已分化的细胞计数，计算细胞分化率。

1.3.9 免疫印迹分析

将猪肌肉干细胞接种于水凝胶包埋的24孔板中，设置无水凝胶包埋的24孔板为阴性对照组。诱导细胞增殖48 h后，加入分化培养基培养14 d。提取样品蛋白质，使用MyHC及GAPDH抗体对样品蛋白质进行免疫印迹，使用Image J软件获取各样品免疫印迹的灰度值，分析MyHC蛋白相对表达量。

1.4 数据分析

所有试验均进行3次重复，结果表示为平均值±标准差。使用GraphPad Prism 9和IBM SPSS Statistics软件进行One-Way ANOVA统计和差异性分析，图表中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 细胞毒性试验结果

体外细胞毒性试验是材料生物学评价中的关键初步测试。若试验组细胞存活率高于空白对照组的70%，即认为该样品无潜在细胞毒性[16]。各SN水凝胶试验组均采用预估无细胞毒性的交联方式固化，即溶胶-凝胶转变法。生物源蛋白质凝胶材料GEL、COL和FIB使用酶法交联。GEL和COL均通过TG酶催化谷氨酰胺和赖氨酸残基交联形成凝胶[17]，FIB在凝血酶的催化作用下由单体聚合形成纤维蛋白凝胶[18]。多糖凝胶材料SA、CS和GG使用物理和化学交联。SA在Ca^{2+}存在下通过离子交换使羧基部位交联形成凝胶[19]；CS的氨基和羟基与三聚磷酸钠通过离子成键交联形成凝胶[20]；GG溶胶在低于40 ℃的环境中，GG分子与水分子结合的氢键将断裂，GG分子间结合形成氢键，从而生成凝胶[21]，且Ca^{2+}等金属阳离子可在成键过程中起桥联作用，进一步促进分子链的聚合[22]。由表2可知，试验组水凝胶浸提液培养细

胞 24 h后，细胞存活率均高于空白对照组的 70%，且与空白对照组无显著差异，表明该研究使用的水凝胶材料及其交联固化方式均无细胞毒性。

表 2　使用不同水凝胶浸提液培养细胞的细胞存活率

Table 2　Cell survival rate of cultured cells with different hydrogel extract solutions

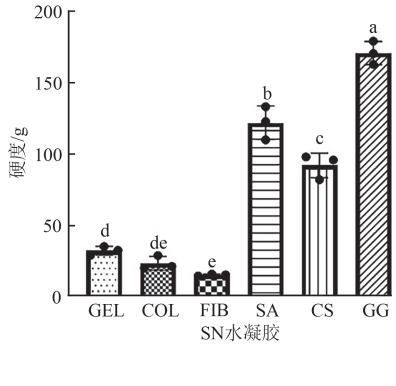
组别	细胞存活率/%	组别	细胞存活率/%
空白对照组	100	SA	91.4±4.4
GEL	94.8±9.1	CS	87.2±4.3
COL	86.4±6.1	GG	94.3±10.6
FIB	91.0±6.5		

2.2　物理学性能表征

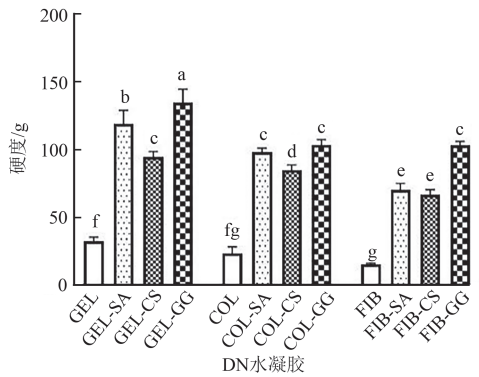
水凝胶作为高含水量固液组合材料，其内部网状结构可为细胞提供合适的生长空间，且具备良好的氧气和营养素渗透性。水凝胶的物理学性能与其网络结构直接相关。例如，硬度、弹性等机械性能可直观地反映水凝胶微观结构的交联程度[23]，降解率可评估水凝胶材料是否能经受长时间的培养基浸没。

2.2.1　硬度和弹性

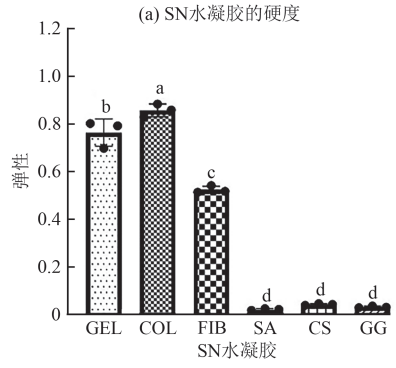
由图 1(a)可知，6 组 SN 水凝胶中，蛋白质凝胶材料 GEL、COL、FIB 制备的水凝胶硬度分别为 32.3、23.4、15.3 g，而多糖凝胶材料 SA、CS、GG 制备的水凝胶硬度分别为 122.3、92.2、171.2 g。蛋白质凝胶材料制备的水凝胶的硬度均远低于多糖凝胶材料。将 2 类材料复配制成 DN 水凝胶，结果见图 1(b)。与单一蛋白质凝胶材料制成的 SN 水凝胶相比，硬度显著提高，增幅为 184.2%~578.2%。由图 1(c)可知，蛋白质凝胶材料 GEL、COL 和 FIB 制备的水凝胶弹性分别为 0.767、0.860 和 0.526，而多糖凝胶材料 SA、CS 和 GG 制备的水凝胶弹性分别为 0.021、0.042 和 0.031。结果表明，蛋白质凝胶材料水凝胶的弹性均远高于多糖凝胶材料。如图 1(d)所示，将 2 类材料复配制备成 DN 水凝胶后，与单一蛋白质凝胶材料制成的 SN 水凝胶相比，弹性依旧能保持较高水平。因此，多糖凝胶材料 SA、CS 和 GG 具备作为 DN 水凝胶第一网络的刚性，蛋白质凝胶材料 GEL、COL 和 FIB 具备作为第二网络的韧性，2 类材料复配制得的水凝胶可兼具良好的硬度和弹性。



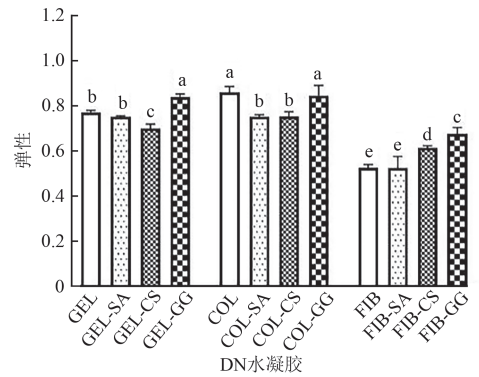
图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。
(a) SN水凝胶的硬度



图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。
(b) DN水凝胶的硬度



图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。
(c) SN水凝胶的弹性



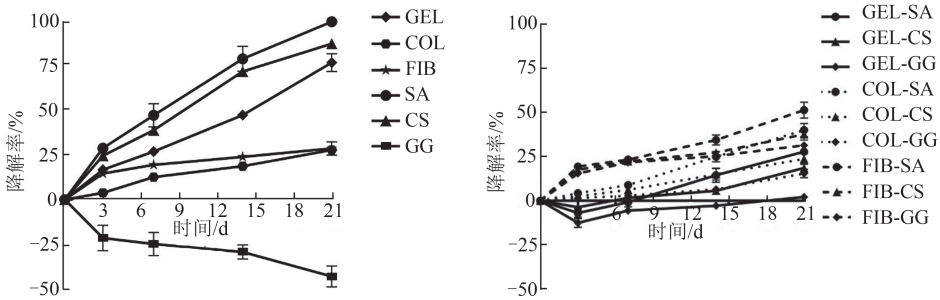
图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。
(d) DN水凝胶的弹性

图 1　SN 水凝胶与 DN 水凝胶的硬度和弹性

Fig. 1　Hardness and springiness of SN hydrogels and DN hydrogels

2.2.2 降解率

由图 2 可知，在完全培养基中浸没 21 d 后，COL 和 FIB 水凝胶的降解率分别为 28.0% 和 28.8%，能较为完整地保持水凝胶结构。GEL 水凝胶具备溶胀特性，其 21 d 的降解率为−41.2%。而 3 种多糖凝胶材料均无法在 21 d 的浸没过程中保持原有结构，SA、CS 和 GG 的降解率分别高达 100.0%、87.7% 和 77.1%。将 2 类材料复配制备成 DN 水凝胶后，其降解曲线表现出较高的稳定性。除 FIB-SA 组外，其余组别的 DN 水凝胶在 21 d 降解率均低于 40%。其中 GEL 与多糖凝胶材料复配的 DN 水凝胶，显著改善了 GEL 原有的高溶胀特性。这是由于水凝胶的溶胀特性与其微观网络结构直接相关[24]，在双网络结构中，刚性的第一网络限制了 GEL 分子网络的吸水溶胀。结合 SN 水凝胶与 DN 水凝胶的降解曲线可知，DN 水凝胶具有较高稳定性，有利于包埋细胞进行长期培养。



(a) SN水凝胶的降解率曲线　(b) DN水凝胶的降解率曲线

图 2　SN 水凝胶与 DN 水凝胶的降解率曲线

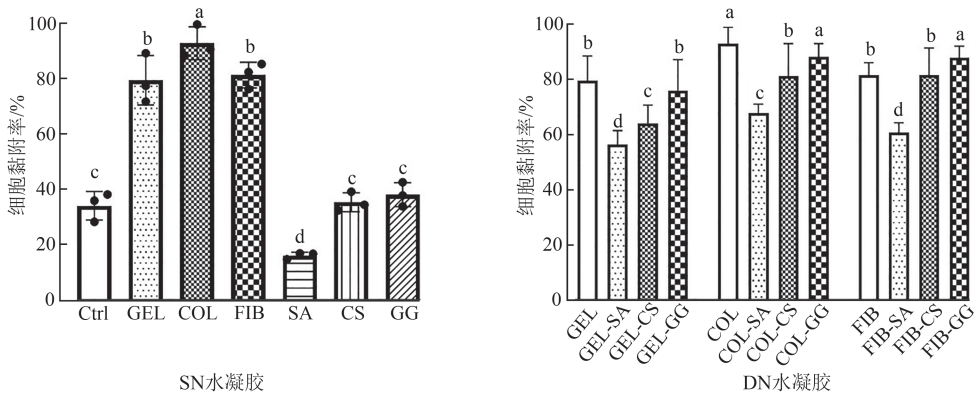
Fig. 2　Degradation rate curve of SN hydrogels and DN hydrogels

2.3　生物学性能表征

水凝胶作为模拟自然组织中细胞外基质的材料，不仅具有良好的物理学特性，还需保持较高的生物相容性。作为 DN 水凝胶第二网络的蛋白质凝胶材料，GEL、COL 和 FIB 含有许多支持细胞黏附、维持细胞铺展以及信号转导的天然分子表位[25-26]，故该类材料本身具有极高的生物相容性。但与多糖凝胶材料复配后制得的 DN 水凝胶的生物相容性仍需验证。

2.3.1 细胞黏附率

由图 3 可知，6 组 SN 水凝胶中，GEL、COL 和 FIB 水凝胶表面的细胞黏附率分别为 79.7%、93.1% 和 81.5%，SA、CS 和 GG 水凝胶的细胞黏附率分别为 16.2%、35.5% 和 38.2%。蛋白质凝胶材料 SN 水凝胶的细胞黏附率均显著高于多糖凝胶材料组和无水凝胶包埋的阴性对照组，表明蛋白质凝胶材料可促进猪肌肉干细胞的黏附。多糖凝胶材料中 CS 和 GG 组的细胞黏附率与阴性对照组无显著差异，而 SA 组表面细胞黏附率显著低于阴性对照组，表明 SA 不利于猪肌肉干细胞的黏附。将 GEL、COL 和 FIB 分别与 SA、CS 和 GG 复配形成 DN 水凝胶后



SN水凝胶
图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。
(a) SN水凝胶表面的细胞黏附率

DN水凝胶
图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。
(b) DN水凝胶表面的细胞黏附率

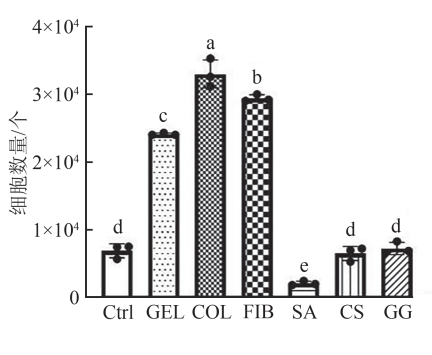
图 3　SN 水凝胶和 DN 水凝胶表面的细胞黏附率

Fig. 3　Cell adhesion rate on SN hydrogels and DN hydrogels

检测细胞黏附率，SA的添加显著降低了GEL、COL和FIB形成的水凝胶表面的细胞黏附率。

2.3.2　细胞增殖率

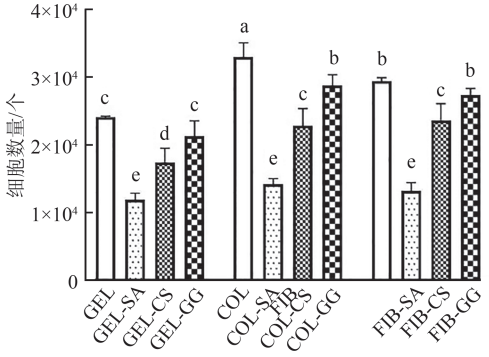
细胞在水凝胶表面增殖的数量会受其黏附率的影响，因此分别在细胞接种水凝胶表面后的6 h和72 h检测细胞的绝对数量，通过72 h时增殖细胞数量与6 h时黏附细胞数量的比值计算细胞增殖率。由图4可知，培养72 h后，6组SN水凝胶中，GEL、COL、FIB水凝胶表面的细胞绝对数量分别为2.4×10^4个、3.3×10^4个、2.9×10^4个，细胞增殖率分别为205.5%、255.3%、262.0%；SA、CS和GG水凝胶表面细胞数量分别为2.0×10^3个、6.5×10^3个、7.2×10^3个，细胞增殖率分别为26.3%、82.6%、89.8%。结果显示，72 h增殖后，蛋白质凝胶材料水凝胶表面的细胞数量显著高于多糖凝胶材料，与细胞黏附率的结果一致。而蛋白质凝胶材料水凝胶的细胞增殖率也显著高于多糖凝胶材料和阴性对照组，进一步验证了其较高的生物相容性，对猪肌肉干细胞的增殖具有促进作用。而SA组的细胞增殖率低于阴性对照组，CS组和GG组的细胞增殖率与阴性对照组无显著差异，说明多糖凝胶材料无法促进细胞的增殖。将DN水凝胶与相应蛋白质凝胶材料制得SN水凝胶对比，SA的添加显著降低了水凝胶的细胞数量和细胞增殖率，CS和GG的添加也使细胞增殖后的数量和增殖率有所降低。这表明多糖凝胶材料的添加对DN水凝胶的生物相容性具有一定的负面影响。需要通过三维培养进一步验证各组DN水凝胶的生物相容性，从而筛选出最适合作为第一网络的多糖凝胶材料。



SN水凝胶

图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。

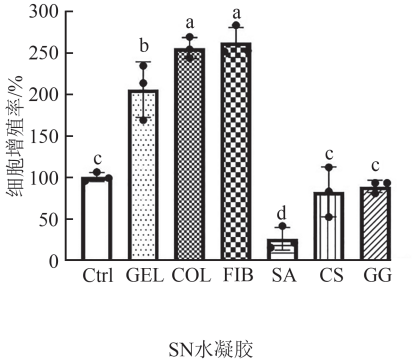
(a) SN水凝胶表面细胞增殖后的细胞数量



DN水凝胶

图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。

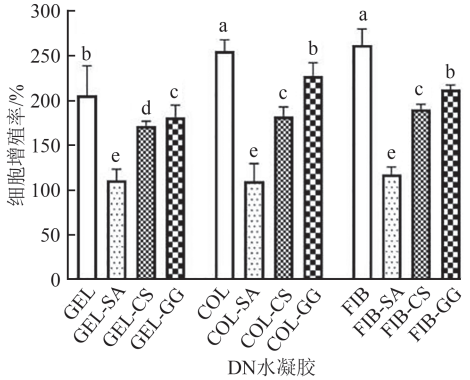
(b) DN水凝胶表面细胞增殖后的细胞数量



SN水凝胶

图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。

(c) SN水凝胶表面的细胞增殖率



DN水凝胶

图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。

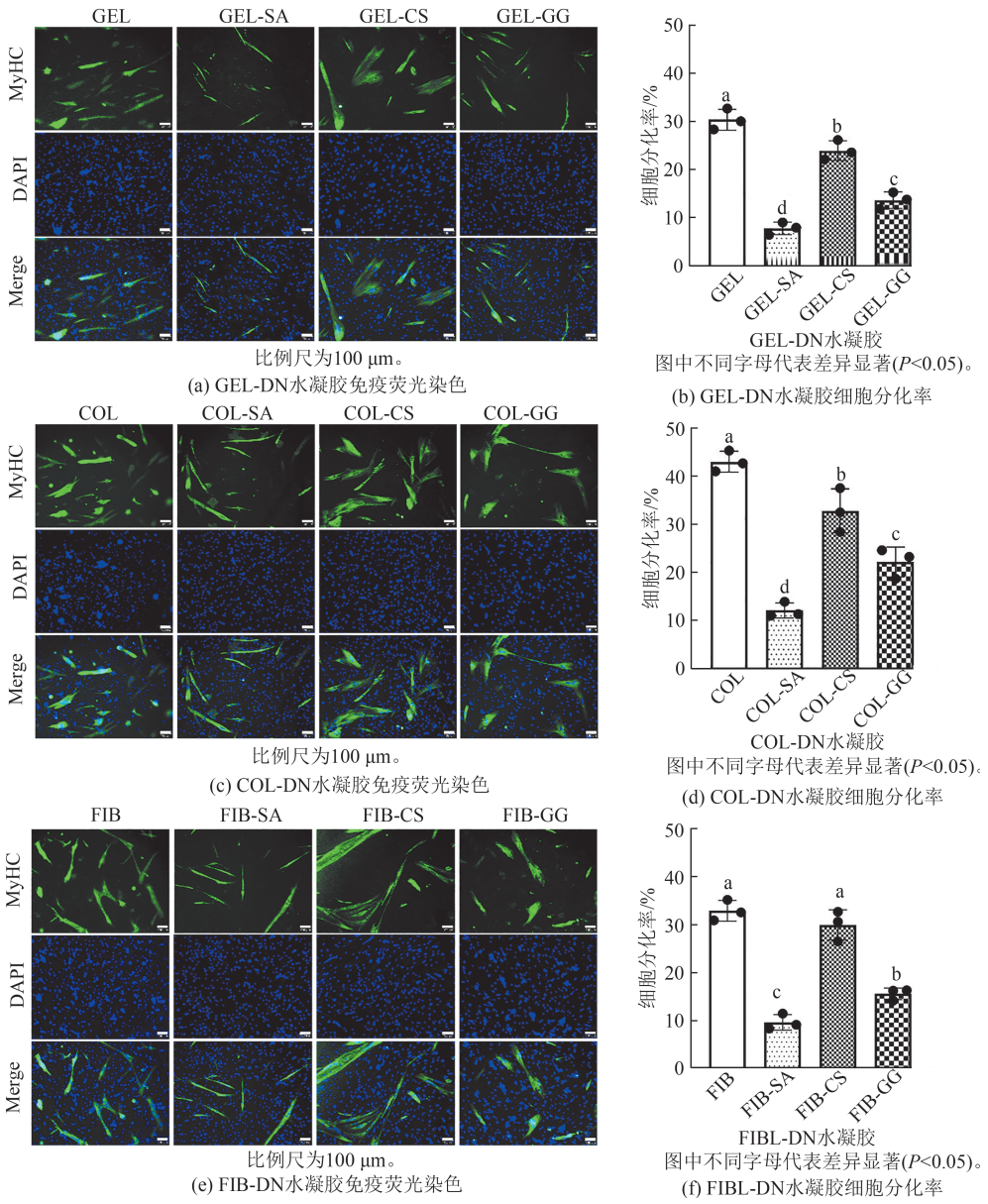
(d) DN水凝胶表面的细胞增殖率

图4　SN水凝胶和DN水凝胶表面细胞增殖后的细胞数量和增殖率

Fig. 4　Cell number and proliferation rate on SN hydrogels and DN hydrogels

2.3.3　细胞分化率

MyHC仅在成肌分化后的细胞中表达，因此常作为成肌分化的标志蛋白质。对水凝胶表面分化的细胞进行MyHC免疫荧光染色，结果见图5。在所有组中均观察到不同大小和数量的多核肌管出现，表明DN水凝胶可能具备承载细胞分化的介质条件。DN水凝胶中以CS为第一网络材料的组细胞分化率高于SA组和GG组，仅次于对应的SN水凝胶组，其中GEL-CS组、COL-CS组、FIB-CS组的细胞分化率分别达到24.0%、32.8%、30.1%，且



比例尺为100 μm。
(a) GEL-DN水凝胶免疫荧光染色
图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。
(b) GEL-DN水凝胶细胞分化率
比例尺为100 μm。
(c) COL-DN水凝胶免疫荧光染色
图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。
(d) COL-DN水凝胶细胞分化率
比例尺为100 μm。
(e) FIB-DN水凝胶免疫荧光染色
图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。
(f) FIBL-DN水凝胶细胞分化率

图 5　不同 DN 水凝胶表面的细胞分化率

Fig. 5　Cell differentiation rate on different DN hydrogels

出现多核融合的较大肌管。以 GG 为第一网络材料的组中同样出现较大肌管，但细胞分化率相对较低。而以 SA 为第一网络材料的组不仅细胞分化率低，且形成的肌管呈细长梭状。可初步判断，SA 的添加会阻碍细胞的分化，这可能是由其本身不利于细胞黏附和增殖所致。

2.4　三维培养

与二维培养不同，细胞在水凝胶等三维环境中会释放部分基质降解酶以改变并适应该环境，从而进行黏附铺展、增殖、分化等细胞活动[27-28]。该研究通过测定水凝胶的生物降解率，评估所制备水凝胶的抗收缩降解能力，并测定包埋于水凝胶中细胞的低圆形度细胞占比、增殖率和 MyHC 表达量，进一步表征水凝胶的生物相容性。

2.4.1　水凝胶的生物降解率

将细胞包埋于水凝胶中，通过交联固化处理，测定水凝胶样品的生物降解率曲线，以量化水凝胶在细胞培养过程中收缩和降解程度。生物降解率越高，说明水凝胶的收缩和降解程度越高。由图 6 可知，以 GEL、COL、FIB 制得的 SN 水凝胶分别在第 21 天、第 14 天和第 7 天完全降解，在培养过程中均出现收缩脱水现象，无法为细胞提供持续的生长环境。然而添加 SA、CS 或 GG 作为第一网络材料形成 DN 水凝胶能有效改善这一现象。这可能是

由于具有高机械性能的多糖凝胶材料网络限制了水凝胶的过度收缩脱水过程。因此，DN水凝胶相较于SN水凝胶具有更低的生物降解率，显示出在细胞长期三维培养中的应用潜力。

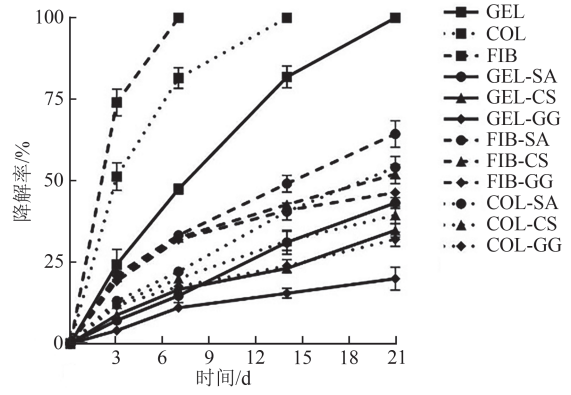
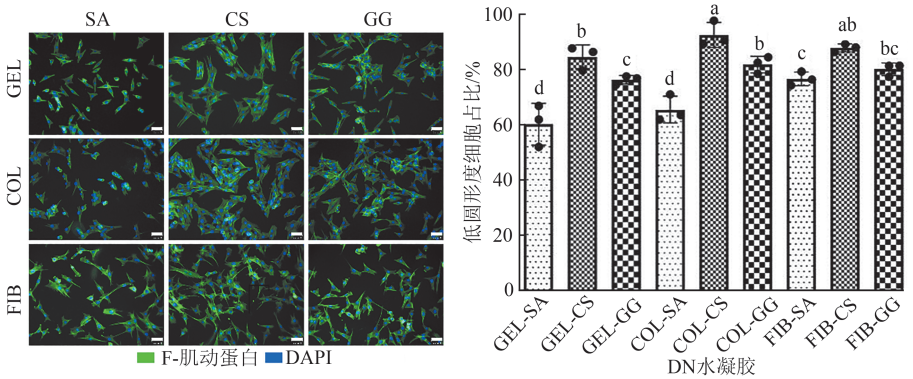


图 6　应用于三维培养细胞的水凝胶生物降解率曲线

Fig. 6　Biodegradation rate curve of hydrogels applied to three-dimensional cultured cells

2.4.2　细胞铺展情况及低圆形度细胞占比

当细胞处于水凝胶包埋的三维环境中，其初始形态为未铺展的球形。培养过程中，细胞通过表面受体感知所处三维环境，并调整其肌动蛋白骨架形态而适当铺展，以适应该环境[29]。对包埋水凝胶内的细胞进行免疫荧光染色，见图7。使用荧光显微镜观察其骨架形态，并通过圆形度低于0.4的细胞占比量化其铺展情况。低圆形度细胞占比越高，说明在水凝胶中顺利铺展的细胞占比越高。以CS为第一网络材料的各组中低圆形度细胞占比显著高于SA和GG组，表明CS网络结构有助于细胞的黏附和伸展。这可能是因为CS作为带有阳离子的聚合物，对表面分布负电荷的猪肌肉干细胞等哺乳动物细胞具有吸附作用[30]，从而促进了细胞的黏附和伸展。以SA为第一网络材料的各组中低圆形度细胞占比较低，这进一步说明了SA的生物相容性较低，与表面细胞黏附率的结果一致。



图中比例尺为50 μm。
(a) 水凝胶中细胞的铺展情况

图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。
(b) 低圆形度细胞占比

图 7　DN水凝胶中细胞铺展情况和低圆形度细胞占比

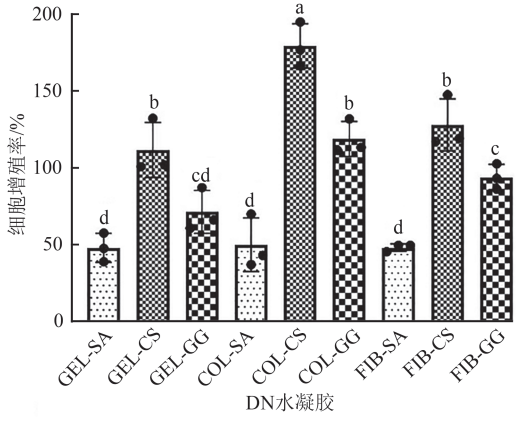
Fig. 7　Cell extension and proportion of low circularity cells in DN hydrogels

2.4.3　三维培养细胞增殖率

测定包埋于水凝胶中的细胞增殖率，结果见图8。以SA为第一网络材料的各组，细胞增殖率较低，表明三维培养体系中，细胞的铺展可能影响其增殖率。以CS为第一网络材料的各组，细胞增殖率显著高于SA组和GG组，其中COL-CS组的细胞增殖率高于GEL-CS组和FIB-CS组。该结果表明COL-CS可能是最适合猪肌肉干细胞三维培养的DN水凝胶。

2.4.4　三维培养细胞分化率

进一步通过免疫印迹检测三维分化14 d样品的MyHC蛋白相对表达量，见图9。以SA为第一网络材料的各组，MyHC蛋白相对表达量极

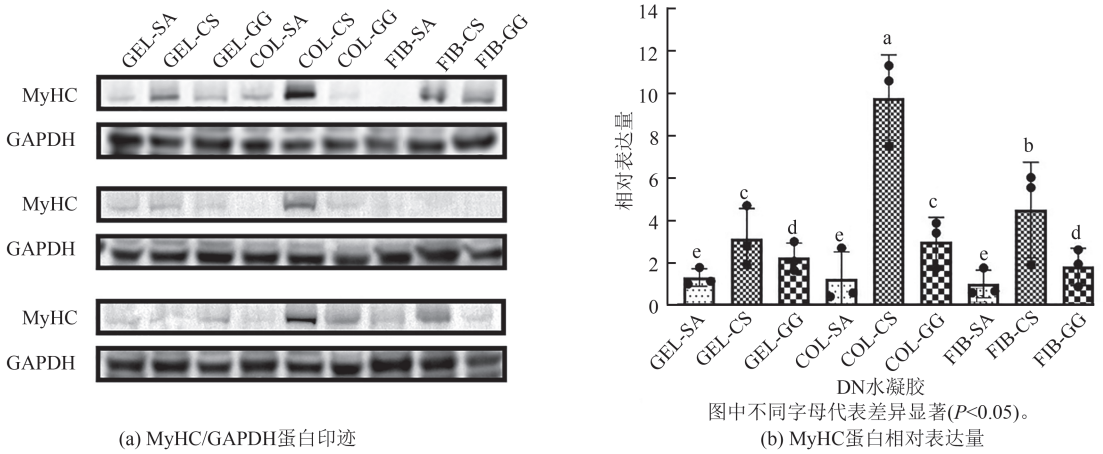


图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。

图 8　DN水凝胶中三维培养细胞增殖率

Fig. 8　Cell proliferation rate in DN hydrogels

低。已有研究表明MyHC的表达与细胞成肌融合程度相关[31]，SA的网络结构阻碍了细胞的伸展，进而影响了细胞融合。其中，FIB-SA组MyHC蛋白相对表达量最低，COL-CS组MyHC蛋白相对表达量最高，为FIB-SA组的9.8倍；FIB-CS组次之，为FIB-SA组的4.5倍。因此，CS是最适合作为DN水凝胶第一网络的材料，而第二网络可选择COL和FIB。该结果与二维培养细胞的增殖率、分化率以及三维培养细胞的增殖率结果较为一致。



(a) MyHC/GAPDH蛋白印迹

图中不同字母代表差异显著(P<0.05)。

(b) MyHC蛋白相对表达量

图9 DN水凝胶中细胞分化后MyHC蛋白相对表达量

Fig. 9 Relative expressionof MyHC protein in DN hydrogels after cell differentiation

3 结论

该研究选用广泛应用于细胞培养肉的生物源蛋白质凝胶材料GEL、COL、FIB，以及常用的多糖凝胶材料SA、CS、GG，复配形成具有双网络结构的DN水凝胶。结果表明，DN水凝胶兼具高硬度和高弹性，且生物降解率较慢，能够承受细胞长期培养过程。分别在二维和三维培养条件下对DN水凝胶进行生物学性能分析，发现由COL与CS复配交联制得的DN水凝胶具有最优的生物学特性，在三维培养条件下能够有效支持猪肌肉干细胞的铺展、增殖和分化。研究结果为构建兼具优良机械性能和细胞适配性的水凝胶支架及制备高品质块状细胞培养肉提供参考与借鉴。

参考文献

[1] 关欣，周景文，堵国成，等. 细胞培养肉产业技术发展态势及建议[J]. 中国工程科学，2023，25(3)：251-262.
GUAN X，ZHOU J W，DU G C，et al. Technological trend and suggestions for cultured meat industry[J]. Strategic Study of CAE，2023，25(3)：251-262.(in Chinese)

[2] 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.

[3] FORCINA L，MIANO C，PELOSI L，et al. An overview about the biology of skeletal muscle satellite cells[J]. Current Genomics，2019，20(1)：24-37.

[4] 关欣，汪丹丹，方佳华，等. 细胞培养肉技术：研究进展与未来展望[J]. 中国食品学报，2022，22(12)：1-13.
GUAN X，WANG D D，FANG J H，et al. Cultured meat technology：advances and future perspectives[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2022，22(12)：1-13.(in Chinese)

[5] 周景文，张国强，赵鑫锐，等. 未来食品的发展：植物蛋白肉与细胞培养肉[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(10)：1-8.
ZHOU J W，ZHANG G Q，ZHAO X R，et al. Future of food：plant-based and cell-cultured meat[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(10)：1-8.(in Chinese)

[6] CAI S X，WU C X，YANG W G，et al. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors[J]. Nanotechnology Reviews，2020，9(1)：971-989.

[7] ZHANG Y S，YUE K，ALEMAN J，et al. 3D bioprinting for tissue and organ fabrication[J]. Annals of Biomedical Engineering，2017，45(1)：148-163.

[8] OSADA Y，OKUZAKI H，HORI H. A polymer gel with electrically driven motility[J]. Nature，1992，355(6357)：242-244.

[9] EROL O，PANTULA A，LIU W Q，et al. Transformer hydrogels：a review[J]. Advanced Materials Technologies，2019，4(4)：1900043.

[10] PEREZ-PUYANA V，WIERINGA P，YUSTE Y，et al. Fabrication of hybrid scaffolds obtained from combinations of PCL with gelatin or collagen *via* electrospinning for skeletal muscle tissue engineering[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A，2021，109(9)：1600-1612.

[11] HICKEY R J，MODULEVSKY D J，CUERRIER C M，et al. Customizing the shape and microenvironment biochemistry of biocompatible macroscopic plant-derived cellulose scaffolds [J]. ACS Biomaterials Science & Engineering，2018，4(11)：3726-3736.

[12] GRIBOVA V，LIU C Y，NISHIGUCHI A，et al. Construction and myogenic differentiation of 3D myoblast tissues fabricated by fibronectin-gelatin nanofilm coating [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications，2016，474(3)：515-521.

[13] FURUHASHI M，MORIMOTO Y，SHIMA A，et al. Formation of contractile 3D bovine muscle tissue for construction of millimetre-thick cultured steak[J]. NPJ Science of Food，2021，5(1)：6.

[14] CHEN Q，CHEN H，ZHU L，et al. Fundamentals of double network hydrogels [J]. Journal of Materials Chemistry B，2015，3(18)：3654-3676.

[15] LI M，WANG D D，FANG J H，et al. An efficient and economical way to obtain porcine muscle stem cells for cultured meat production [J]. Food Research International，2022，162(Pt B)：112206.

[16] 徐玉茵，韩颖，田林奇，等. GB/T 16886.5—2017中体外细胞毒性试验的比较与分析[J]. 医疗卫生装备，2019，40(7)：74-77.
XU Y Y，HAN Y，TIAN L Q，et al. Comparison of several *in vitro* cytotoxicity assays in GB/T 16886.5—2017[J]. Chinese Medical Equipment Journal，2019，40(7)：74-77.(in Chinese)

[17] GASPAR A L C，DE GÓES-FAVONI S P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins：a review[J]. Food Chemistry，2015，171：315-322.

[18] 高霞丽. 兼具止血和促伤口修复的纤维蛋白凝胶的制备、表征及生物学评价[D]. 成都：西南交通大学，2018.

[19] LEE K Y，MOONEY D J. Alginate：properties and biomedical applications [J]. Progress in Polymer Science，2012，37(1)：106-126.

[20] SURESHKUMAR M K，DAS D，MALLIA M B，et al. Adsorption of uranium from aqueous solution using chitosan-tripolyphosphate (CTPP) beads[J]. Journal of Hazardous Materials，2010，184(1/2/3)：65-72.

[21] 周涛涛. 超声作用对结冷胶流变及凝胶特性的影响[D]. 杭州：浙江工商大学，2020.

[22] OLIVEIRA S M，FASOLIN L H，VICENTE A A，et al. Printability，microstructure，and flow dynamics of phase-separated edible 3D inks[J]. Food Hydrocolloids，2020，109：106120.

[23] GONG J P，KATSUYAMA Y，KUROKAWA T，et al. Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength[J]. Advanced Materials，2003，15(14)：1155-1158.

[24] 王云萍. 明胶-透明质酸复合双网络水凝胶及其在3D打印组织工程支架材料中的应用[D]. 北京：北京协和医学院，2022.

[25] YIN J，YAN M L，WANG Y C，et al. 3D bioprinting of low-concentration cell-laden gelatin methacrylate (GelMA) bioinks with a two-step cross-linking strategy [J]. ACS Applied Materials & Interfaces，2018，10(8)：6849-6857.

[26] PERETTI G M，RANDOLPH M A，ZAPOROJAN V，et al. A biomechanical analysis of an engineered cell-scaffold implant for cartilage repair[J]. Annals of Plastic Surgery，2001，46(5)：533-537.

[27] KOBAYASHI T，KIM H，LIU X D，et al. Matrix metalloproteinase-9 activates TGF-β and stimulates fibroblast contraction of collagen gels [J]. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology，2014，306(11)：L1006-L1015.

[28] CHEN L W，WU Y S，WU Y，et al. The inhibition of EZH2 ameliorates osteoarthritis development through the Wnt/β-catenin pathway[J]. Scientific Reports，2016，6：29176.

[29] VERNEREY F J，LALITHA SRIDHAR S，MURALIDHARAN A，et al. Mechanics of 3D cell-hydrogel interactions：experiments，models，and mechanisms [J]. Chemical Reviews，2021，121(18)：11085-11148.

[30] 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.

[31] GROSSI A，YADAV K，LAWSON M A. Mechanical stimulation increases proliferation，differentiation and protein expression in culture：stimulation effects are substrate dependent[J]. Journal of Biomechanics，2007，40(15)：3354-3362.

（责任编辑：张馨文）