

农业动物干细胞研究进展

王冰源, 牟玉莲, 李奎, 刘志国

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

摘要: 干细胞技术是近年来被广泛应用于生命科学领域的重要技术。获取具有无限增殖能力和分化能力的干细胞系主要有 3 种途径: (1)从胚胎分离胚胎干细胞; (2)从成体组织分离成体干细胞; (3)通过体外诱导体细胞重编程为诱导多能干细胞。在农业领域中, 畜禽干细胞的分离、培养、建系有望显著提升体细胞克隆和细胞水平基因修饰的效率; 干细胞体外诱导配子技术能够极大简化基因编辑畜禽的制备流程, 提升制备效率。同时, 通过结合基因编辑、显微注射、干细胞移植、胚胎移植等技术, 干细胞技术在基因编辑动物的生产、组织和器官的供体制备、体外配子诱导及遗传重组胚胎制备、疾病治疗靶点的筛选, 以及新药药理研究等方面都具有极大的应用潜力, 对农业动物的遗传改良、疾病防治具有重要意义。本文综述了干细胞相关研究在农业动物包括猪(*Sus scrofa*)、牛(*Bos taurus*)、鸡(*Gallus gallus*)、山羊(*Capra hircus*)和绵羊(*Ovis aries*)中的新进展, 以期对农业动物干细胞领域的相关研究提供参考。

关键词: 猪; 牛; 鸡; 山羊; 绵羊; 干细胞

Research progress of stem cells in agricultural animals

Bingyuan Wang, Yulian Mu, Kui Li, Zhiguo Liu

Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: As an important biological technology, stem cell technology has been being widely used in the life sciences for a long time. There are three major ways to obtain stem cells with unlimited proliferation and differentiation capabilities, including 1) isolating embryonic stem cells (ESCs) from embryos, 2) isolating adult stem cells from adult tissues, and 3) *in vitro* reprogramming of differentiated somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs). In the field of agriculture, the efficient purification, culture and establishment of livestock and poultry stem cell lines are expected to significantly improve the efficiency of somatic cell cloning and genetic modification of cells. The technology of stem cell induced-gamete production will greatly simplify the generation process, and consequently improve the generation efficiency of genetically modified animals. In addition, by combining with gene editing, microinjection, stem cell transplantation, and embryo transfer, stem cell technology has great potential in the production of genetically modified animals, tissue and organ

收稿日期: 2020-06-16; 修回日期: 2020-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31702083) 和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号: 2020-YWF-YB-06) 资助

[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31702083), and Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (No. 2020-YWF-YB-06)]

作者简介: 王冰源, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: wangbingyuan@caas.cn

通讯作者: 刘志国, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: liuzhiguo@caas.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.20-180

网络出版时间: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20201028.1052.001.html>

URI: 2020/10/28 14:54:51

donors, *in vitro* induced gametes and genetically reconstructed embryos, in the screening of disease treatment targets, and in the research of new drug pharmacology, which is of great significance to the genetic improvement, disease prevention and treatment for agricultural animals. In this review, we summarize the current research progress of stem cells in agricultural animals, including pig (*Sus scrofa*), cattle (*Bos taurus*), chicken (*Gallus gallus*), goat (*Capra hircus*) and sheep (*Ovis aries*), to provide information for the studies in the field of stem cells in agricultural animals.

Keywords: pig; cattle; chicken; goat; sheep; stem cell

干细胞是一类具有自我更新和分化能力的细胞,在一定条件下可以分化为多种功能的细胞。根据干细胞在体内所处的发育阶段可将其分类为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和成体干细胞^[1,2]。而通过向体外培养的体细胞中转染重编程因子可诱导体细胞重编程为多能干细胞,即诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), iPSCs 的出现极大地丰富了干细胞的来源^[3,4]。干细胞具有体外可操作性、能够减少实验动物的使用数量、提供有效和持久的疾病治疗方法以及丰富的实验素材等优点。在干细胞的体外培养过程中,通过基因编辑等操作获得稳定传代的基因编辑干细胞系,能够用以制备基因编辑动物、定向诱导组织修复或器官生成、诱导配子生成、筛选治疗靶点以及研究新药药理等^[5,6],因此具有广阔的应用前景。

近几十年来畜禽胚胎干细胞系的建立进展十分缓慢,直至近些年猪(*Sus scrofa*)、山羊(*Capra hircus*)、绵羊(*Ovis aries*)和鸡(*Gallus gallus*)的 ESCs 研究才获得初步进展^[7-9]。而相比其他农业动物,猪的干细胞相关研究更加丰富,涉及猪 ESCs、iPSCs、精原干细胞、肠道干细胞、牙胚干细胞、胰腺干细胞、骨髓间充质干细胞和皮肤干细胞等。牛(*Bos taurus*)、山羊、绵羊和鸡的相关研究主要集中在 ESCs、iPSCs、间充质干细胞和生殖干细胞等。因此,本文总结了猪、牛、山羊、绵羊和鸡等农业动物 ESCs、iPSCs 以及成体干细胞的相关研究进展,重点综述了猪干细胞的研究进展,以期对相关理论和应用研究提供参考。

1 猪干细胞研究进展

1.1 猪胚胎干细胞

对畜禽干细胞进行基因编辑可用于制备基因编

辑农业动物,从而获得具有生长快、抗病力强、高产等优良性状的畜禽品种。尽管已经能够成功分离一些农业动物的 ESCs,但由于这些 ESCs 缺乏种系嵌合能力,即难以形成包括生殖系在内的嵌合体,并且在经过有限的传代后很容易分化或死亡,使得农业动物干细胞建系相较模式动物进展缓慢^[7-9]。此外,在将干细胞疗法应用于人类之前,有必要用可接受的动物模型验证这些方法的安全性和有效性。而猪被用作临床前实验动物模型,日益受到关注,因此迫切需要建立猪胚胎干细胞系。近年来,猪 ESCs 的相关研究取得了一定的进展。2009 年, Yang 等^[7]通过电穿孔转染策略,将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)转入第 44 代猪胚胎干细胞系,获得了稳定表达 GFP 并能持续体外增殖 90 代的 GFP-ESCs。这些 GFP-ESCs 具有正常的核型和胚胎干细胞的典型特征,包括表达标志基因 *OCT4*、碱性磷酸酶阳性、能够形成类胚体、诱导条件下能够分化为神经细胞和心肌细胞谱系。2012 年, Haraguchi 等^[10]将猪内细胞团在添加 *GSK-3 β* 抑制剂和 *MAPKK1* 抑制剂的人 ESCs 培养基中扩大培养,获得了连续培养 100 多代的猪 ESCs。这些 ESCs 具有碱性磷酸酶活性,表达标志基因 *OCT4* 和 *NANOG*,多次传代后未发生形态改变。此后, Siriboon 等^[11]尝试使用高质量克隆猪囊胚的内细胞团分离 ESCs,在培养过程中发现这些囊胚具有更好的附着力、生长能力和原始克隆形成能力。分离培养出的细胞经过 25 次传代未发生分化,表达 ESCs 标志基因 *OCT4*、*NANOG*、*SOX2* 和 *REX1*,能体外分化为表达三胚层标志基因的类胚体。综上所述,猪 ESCs 的相关研究仍处于探索能够获得长期稳定传代培养的建系阶段,亟需加快猪 ESCs 的分化和生殖系嵌合等技术及理论的相关研究。

1.2 猪诱导多能干细胞

近 10 年, 猪 iPSCs 的相关研究取得了较大的进展。2009 年, Esteban 等^[12]将小鼠(*Mus musculus*) *OCT4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* 或人 *OCT4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* 通过逆转录病毒载体转入藏猪的成纤维细胞中, 成功诱导出 iPSCs。这些藏猪 iPSCs 具有和人 ESCs 相似的形态, 核型正常, 碱性磷酸酶阳性, 表达 ESCs 标志基因 *NANOG*、*REX1*、*LIN28* 和 *SSEA4*, 并能够分化为具有三胚层的畸胎瘤。Chakritbud-sabong 等^[13]使用人源的 *OCT4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* 和 *LIN28* 通过逆转录病毒转导方法将猪的胚胎成纤维细胞诱导为 iPSCs, 这些猪 iPSCs 经碱性磷酸酶染色呈阳性, 表达干细胞标志基因 *OCT4*、*SOX2*、*NANOG* 和 *SSEA1*, 能够分化形成类胚体和畸胎瘤。进一步向心肌方向诱导分化后, 产生了持续跳动并表达标志基因心脏肌钙蛋白 T 的心肌细胞。Gallegos-Cdsabong 等^[14]将猪 iPSCs 分化为神经玫瑰状细胞, 模拟人 iPSCs 的神经分化, 为人类神经细胞疗法提供相关数据。此后, Webb 等^[15]证明了猪 iPSCs 分化得到的神经玫瑰状细胞可以进一步分化为神经嵴细胞和与周围神经系统相关的其他类型细胞。该研究用骨形态发生蛋白 4 或胎牛血清处理神经玫瑰状细胞可使其进一步分化为 *BRN3A* 阳性的感觉细胞, 利用这些分化获得的猪的感觉神经细胞来检测其对有害刺激、镇痛药和修复机制的反应, 可平行比较人和猪的感觉神经细胞的相似性。同时, 猪感觉神经元的体外分化为神经细胞亚型的形成提供了一个新的模型系统, 也为再生疗法的研究提供了一个新的平台。此外, Liao 等^[16]将猪 iPSCs 诱导分化为成骨样细胞, 将这些成骨样细胞移植到兰屿猪的左胫骨后可显著改善移植部位的小梁骨结构, 证实了猪 iPSCs 来源的成骨样细胞的治疗潜力。而 Talbot 等^[17,18]将猪 iPSCs 诱导分化为肝脏干细胞系, 此细胞系能在无饲养层条件下持续培养, 并能够在体外分化为胆管或单层肝细胞。2019 年 Xu 等^[19]将猪的周细胞通过逆转录病毒载体转染 *OCT4*、*SOX2*、*KLF4* 和 *c-MYC* 诱导产生 iPSCs, 将 iPSCs 培养在含重组人 LIF、CHIR 99021、(S)-(+)-马来酸二甲苄酯((S)-(+)-dimethindene maleate)和盐酸米诺环素(minocycline hydrochloride)

的基础培养基中, 这些 iPSCs 表达标志基因 *OCT4*、*SOX2* 和 *NANOG*, 核型正常, 能够分化为类胚体并表达外胚层、中胚层和内胚层这 3 个胚层的标志基因。最重要的是, 这些带有 GFP 的 iPSCs 显微注射到猪核移植胚胎 4~8 细胞中并培养至囊胚期后, 内细胞团和滋养外胚层细胞均有绿色 GFP 的表达。进一步将注射了 GFP-iPSCs 的核移植胚胎移植到代孕母猪后, 在胚胎 25~30 天产生了 4 只存活的胎儿, 尽管荧光显微镜下未见绿色的 GFP, 但在胚胎和胚外组织中通过巢式 PCR 可以检测到 GFP 序列的表达。综上所述, 近年来猪 iPSCs 的研究取得了较大进展, 也为猪 ESCs 的相关研究提供了技术参考。

1.3 猪精原干细胞

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)能够自我更新并分化为成熟的功能性精子, 是雄性哺乳动物体内唯一可以将遗传信息传递给下一代的成体干细胞。猪 SSCs 在制备基因编辑猪及建立用于再生医学的模型猪方面均具有重要价值。但一直以来, 由于猪 SSCs 数量少以及缺乏理想的培养体系, 猪 SSCs 的相关研究和应用受到了极大的阻碍。然而, 令人激动的是, 2020 年, Zheng 等^[20]将表达猿猴病毒 40(SV40)大 T 抗原的质粒通过慢病毒转导到猪的原代 SSCs 中, 建立了具有猪 SSCs 属性的永生化细胞系。这些永生化细胞表达 SSCs 和生殖细胞的标志基因, 对视黄酸处理有分化反应, 在移植后能够定植于受体小鼠睾丸而无肿瘤形成。同时, 这些细胞具有无限的增殖潜能, 体外培养 7 个多月, 传 35 代以上, 仍未出现形态异常, 标志着首次建立了猪 SSCs 细胞系。而猪 SSCs 细胞系的成功建立, 能够为猪 SSCs 相关研究提供丰富的细胞来源, 促进猪 SSCs 培养体系的开发及其在畜牧业中的应用。

1.4 猪其他类型成体干细胞

猪间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源广泛, 具有增殖和多种分化潜能, 且与人的 MSCs 具有很高的相似性, 因此具有重要的研究和应用价值。Huang 等^[21]分离获得猪骨髓 MSCs 和脐带 MSCs 后, 首次发现猪骨髓 MSCs 相比脐带 MSCs 具有更强的迁移能力。进行蛋白质组比较分析, 发

现了 95 个差异蛋白, 其中 VIMENTIN 具有正向调控 MSCs 迁移的作用。随后的研究还发现半乳糖凝集素 3 通过抑制 RhoA-GTP 活性而促进猪骨髓 MSCs 的迁移^[22]。猪胰腺干细胞在 II 型糖尿病的移植治疗中具有重要价值, Han 等^[23]建立了动态表达 WNT3A 的猪胰腺干细胞系, 并发现 WNT3A 能够促进猪胰腺干细胞的增殖潜力, 为进一步研究猪胰腺干细胞的发育和分化提供了重要的工具。牙齿来源的干细胞作为组织再生的一种新来源, 其优势为非侵入性的收集过程, 以及在获得和使用方面不涉及伦理问题。Gurel 等^[24]从 6 月龄猪的下颌第三磨牙牙胚中分离出牙胚干细胞, 这是首次报道的猪牙胚干细胞分离和鉴定研究。此外, Lermen 等^[25]首次分离扩增了成年猪皮肤来源的干细胞样细胞, 在体外维持超过 120 天的增殖活性, 表达多能因子 SOX2 和 OCT4, 并能向神经、肌肉和脂肪样细胞分化。肠道干细胞位于 Lieberkek 隐窝的底部, 负责体内稳态和损伤后的肠道修复。Stieler 等^[26]报道了一种从肠道缺血环中分离肠道干细胞及培养的方法, 可用于研究肠道干细胞在体外进行的上皮修复过程。综上所述, 猪的各类成体干细胞的分离和培养的成功, 为体外相关机理的研究提供了丰富的实验材料, 也为组织修复及器官生成提供了素材, 在农业和医学领域具有重要的应用价值。

2 其他农业动物干细胞研究进展

2.1 牛干细胞

牛 ESCs 的相关研究也处于建立稳定长期传代的胚胎干细胞系阶段。Bogliotti 等^[27]使用含有成纤维细胞生长因子 2 和经典 Wnt 信号通路抑制剂的培养系统, 获得了形态稳定、表达多能性标记基因并具有表观遗传学特征的牛 ESCs。这些 ESCs 可快速建立克隆(3~4 周)且易于增殖传代。当用作核移植的供体时, 能获得与对照组相似的囊胚率。牛 MSCs 因其再生潜力和可塑性, 受到了广泛关注。同时, MSCs 易于分离并且具有抗炎和血管生成能力。在分离培养或复苏培养后, 可将 MSCs 用于自体或同种异体治疗, 使得干细胞治疗在临床上更具吸引力。

目前已知牛 MSCs 的标志基因包括 CD29、CD166、CD105、CD73、CD44 和 CD90 等。牛 MSCs 可从骨髓、脂肪组织、脐带、胎盘、子宫和肺等组织分离获得。MSCs 疗法在生产中可应用到乳腺炎、繁殖、骨损伤、关节损伤、糖尿病等疾病^[28], 可见牛 MSCs 具有广阔的应用前景。

将动物体细胞重编程为 iPSCs 的机制并不是高度保守的, Pillai 等^[29]在诱导牛 iPSCs 形成的过程中发现, 优化的小鼠和人的 iPSCs 诱导条件并不能有效诱导牛体细胞产生 iPSCs, 使用能够改进小鼠和人体细胞重编程效率的方法也对诱导牛体细胞产生 iPSCs 没有影响。尽管使用编码牛 OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC 和 NANOG 的逆转录病毒载体似乎能诱导成纤维细胞产生 iPSCs 样细胞, 但这些克隆不能维持生长, 说明牛 iPSCs 的培养条件和重编程还不完全, 仍需进一步的改进。

牛奶是新生儿发育、营养和免疫保护所需的重要且复杂的液态物质。Pipino 等^[30]试图分离牛奶中潜在的多能干细胞样细胞群体, 并研究其特征。发现分离出的牛奶干细胞表达典型的间充质表面抗原(CD90、CD73 和 CD105)、干细胞标记基因(SOX2 和 OCT4), 并能分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞。这些结果提示牛奶也可以作为分化为多种细胞谱系的多能干细胞来源, 进一步丰富了牛成体干细胞的来源。

2.2 山羊和绵羊干细胞

Pawar 等^[8]从体外受精的山羊囊胚中分离出内细胞团, 并培养出了 ESCs 样细胞, 这些细胞中碱性磷酸酶和 OCT4 的表达均为阳性。此后, De 等^[31]对体外生产的处于桑椹胚、囊胚和孵化囊胚期的山羊胚胎进行干细胞分离培养, 发现孵化囊胚分离效率相对更高。获得的克隆保持未分化状态培养至第 15 代, 且具有干细胞形态特征、正常核型, 并表达干细胞特异性标志基因。长时间培养后能分化成神经元样和上皮样细胞。很快, Garg 等^[32]也从体外受精的山羊胚胎分离了 ESCs, 使用饲养层和 LIF 培养至第 22 代仍保持未分化状态。诱导分化后形成类胚胎, 并在 30 天后观察到心肌细胞的节律性跳动。雄性生殖干细胞的自我更新与分化之间的平衡对于哺

乳动物精子发生的启动和维持至关重要, 对山羊雄性生殖干细胞的研究发现 miR-544 通过靶向早幼粒细胞白血病锌指蛋白(promyelocytic leukemia zinc finger, PLZF)来调节奶山羊雄性生殖系干细胞的自我更新^[33]。对来自同一个供体绵羊的 MSCs 包括牙周膜 MSCs、牙髓 MSCs 和骨髓 MSCs 等进行蛋白质组分析, 获得的差异蛋白为相应组织的生长发育提供了分子基础^[34]。Fadel 等^[35]通过比较不同的分离和培养方法, 初步获得了脐带血和肾周脂肪组织来源的 MSCs。目前的研究现状提示山羊和绵羊的干细胞相关研究仍需进一步深入。

2.3 鸡干细胞

鸡 ESCs 和 SSCs 相关研究近年来也取得了较大进展。Zhang 等^[9]从 X 期的鸡胚中分离获得 ESCs, 这些 ESCs 经碱性磷酸酶染色呈阳性并表达干细胞标志基因 *SSEA1*, 通过优化电转染方法、孵化方法、显微注射方法将其注射到鸡胚腔后获得了 2 只生殖系嵌合鸡。用 DF-1 成纤维细胞做饲养层, 在基础培养基中添加人类碱性成纤维细胞生长因子(human basic fibroblast growth factor, hbFGF)、小鼠干细胞因子(mouse stem cell factor, mSCF)和人白血病抑制因子(human leukaemia inhibitory factor, hLIF)后, 体外培养的鸡 ESCs 能够长期维持干细胞样特性, 即具有典型的 ESCs 形态、表达干细胞标志基因、具有相对稳定的增殖速率和端粒酶活性, 可体外诱导分化为心肌细胞、平滑肌细胞、神经细胞、成骨细胞和脂肪细胞。用该培养体系培养了 25 代的鸡 ESCs 能够制备出嵌合体鸡, 提示 DF-1 成纤维细胞是鸡 ESCs 能长期培养优选饲养层细胞, hbFGF 是维持鸡 ESCs 多能性的重要因素^[36]。

因 SSCs 可体外获取, 并不涉及伦理问题等优势, 已日益成为体外干细胞研究的热点。经过改进酶消化、差速贴壁、流式或磁珠富集等现有的鸡 SSCs 分离和纯化方法, 在添加生长因子并覆以饲养层细胞的培养基中培养, 可获得体外培养的鸡 SSCs^[37]。同时, 利用建系的鸡 ESCs 诱导分化为 SSCs, 也为 SSCs 的获得提供了新途径。在鸡 ESCs 向 SSCs 分化的研究中发现, CRISPR/Cas9 介导的 *CIEIS* 缺失抑制鸡 ESCs 分化为 SSCs 样细胞^[38]; WNT 通路通过 *WNT5A* 促进鸡 ESCs 向 SSCs 分化^[39]; 成纤维细

胞生长因子 8 (fibroblast growth factor 8, *FGF8*)通过动态调控生殖细胞自我更新和分化进而负向调控鸡 ESCs 向 SSCs 分化^[40]; 3 β 羟基类固醇脱氢酶 2 (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase2, *HSD3B2*)则通过调节类固醇激素合成途径正向调控鸡 ESCs 向 SSCs 分化^[41]; 作为鸡 SSCs 的特异性标记, *LBC* 基因通过转录因子 *HOXA5* 促进鸡 ESCs 向 SSCs 分化^[42]。综上所述, 鸡 ESCs 和 SSCs 的相关研究已进入新的阶段, 即建系后的机理研究和分化研究阶段, 可为其他农业动物干细胞提供方法和理论参考。

3 结语与展望

自开展农业动物干细胞相关研究以来, 虽然对多种畜禽干细胞的认识和利用取得了很大的进步, 但在分离、培养、建系、分化以及应用等方面仍存在许多未知的问题。因此, 对品种改良、生产基因编辑动物、研制新兽药、研发疾病新疗法以及组织修复和器官移植等应用, 都需要对畜禽干细胞进行更多更深的探索和研究, 同时也需要长时间的不懈努力。目前, 猪已经成为生物医学研究中最受欢迎的大型动物模型之一, 亦被认为是比啮齿类动物模型更好的选择。在进行人体实验之前, 使用猪的干细胞及其衍生物进行研究可作为评价药物或治疗的安全性和有效性的实验平台。

阐明如何将干细胞分化成精子样和卵母细胞样细胞, 将这些精子样和卵母细胞样细胞进行体外受精, 以创建拥有新的遗传组合的重构胚胎, 再通过这些重构胚胎分离出更多的干细胞。即可以利用这种“干细胞-精子样和卵母细胞样细胞-重构胚胎-干细胞”循环, 在体外快速获得大量具有特定遗传效应的胚胎, 进行胚胎移植后获得特定个体(图 1)。该策略能够实现缩短世代间隔和加速改善后代性状的目的, 也意味着等待动物妊娠的时间变短, 同时被消耗的动物变少, 因此具有广阔的应用前景。综上所述, 干细胞技术是未来农业科技快速进步不可缺少的重要技术, 畜禽干细胞的成功和发展有望显著提高动物克隆和基因编辑的效率, 畜禽干细胞成功诱导分化成配子将极大简化畜禽基因工程和合成生物技术, 为畜禽种质创新技术提供重要支撑。

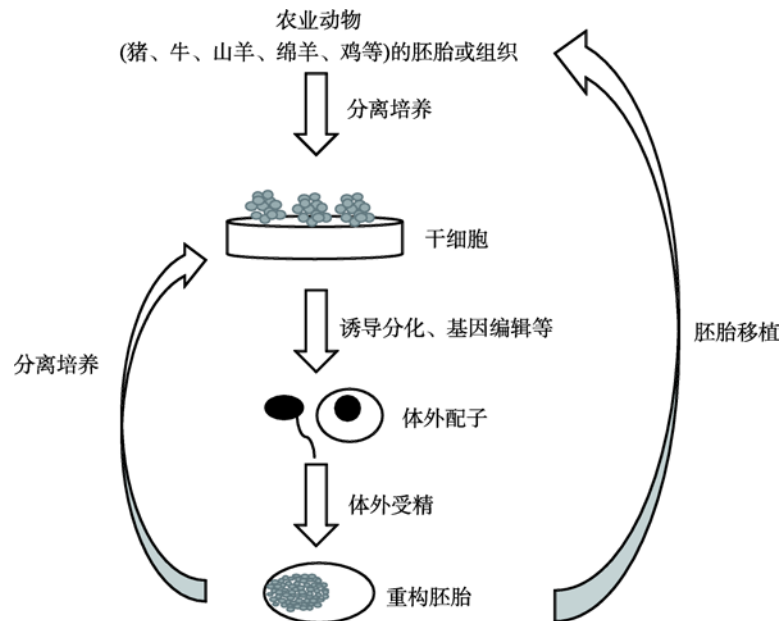


图 1 农业动物干细胞技术展望

Fig. 1 Perspectives on stem cell technology in agricultural animals

建立猪、牛、山羊、绵羊、鸡等农业动物来源的“干细胞-精子样和卵母细胞样细胞-重构胚胎-干细胞”循环，可快速高效地获得具有特定基因或目标性状的个体。

参考文献(References):

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819): 154–156. [\[DOI\]](#)
- [2] Labat ML. Stem cells and the promise of eternal youth: embryonic versus adult stem cells. *Biomed Pharmacother*, 2001, 55(4): 179–185. [\[DOI\]](#)
- [3] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676. [\[DOI\]](#)
- [4] Qin T, Miao XY. Current progress and application prospects of induced pluripotent stem cells. *Hereditas (Beijing)*, 2010, 32(12): 1205–1214.
秦彤, 苗向阳. iPS 细胞研究的新进展及应用. *遗传*, 2010, 32(12): 1205–1214. [\[DOI\]](#)
- [5] Goszczynski DE, Cheng H, Demyda-Peyrás S, Medrano JF, Wu J, Ross PJ. *In vitro* breeding: application of embryonic stem cells to animal production†. *Biol Reprod*, 2019, 100(4): 885–895. [\[DOI\]](#)
- [6] Pieri NCG, de Souza AF, Botigelli RC, Machado LS, Ambrosio CE, Dos Santos Martins D, de Andrade AFC, Meirelles FV, Hyttel P, Bressan FF. Stem cells on regenerative and reproductive science in domestic animals. *Vet Res Commun*, 2019, 43(1): 7–16. [\[DOI\]](#)
- [7] Yang JR, Shiue YL, Liao CH, Lin SZ, Chen LR. Establishment and characterization of novel porcine embryonic stem cell lines expressing hrGFP. *Cloning Stem Cells*, 2009, 11(2): 235–244. [\[DOI\]](#)
- [8] Pawar SS, Malakar D, De AK, Akshey YS. Stem cell-like outgrowths from *in vitro* fertilized goat blastocysts. *Indian J Exp Biol*, 2009, 47(8): 635–642. [\[DOI\]](#)
- [9] Zhang YN, Yang HY, Zhang ZT, Shi QQ, Wang D, Zheng MM, Li BC, Song JZ. Isolation of chicken embryonic stem cell and preparation of chicken chimeric model. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(3): 2149–2156. [\[DOI\]](#)
- [10] Haraguchi S, Kikuchi K, Nakai M, Tokunaga T. Establishment of self-renewing porcine embryonic stem cell-like cells by signal inhibition. *J Reprod Dev*, 2012, 58(6): 707–716. [\[DOI\]](#)
- [11] Siriboon C, Lin YH, Kere M, Chen CD, Chen LR, Chen CH, Tu CF, Lo NW, Ju JC. Putative porcine embryonic stem cell lines derived from aggregated four-celled cloned embryos produced by oocyte bisection cloning. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118165. [\[DOI\]](#)
- [12] Esteban MA, Xu JY, Yang JY, Peng MX, Qin DJ, Li W, Jiang ZX, Chen JK, Deng K, Zhong M, Cai JL, Lai LX, Pei DQ. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*, 2009, 284(26): 17634–17640. [\[DOI\]](#)

- [13] Chakritbudsabong W, Sariya L, Pamonsupornvichit S, Pronarkngver R, Chaiwattananrungruengpaisan S, Ferreira JN, Sethhawong P, Phakdeedindan P, Techakumphu M, Tharasanit T, Rungarunlert S. Generation of a pig induced pluripotent stem cell (piPSC) line from embryonic fibroblasts by incorporating LIN28 to the four transcriptional factor-mediated reprogramming: VSMUi001-D. *Stem Cell Res*, 2017, 24: 21–24. [DOI]
- [14] Gallegos-Cárdenas A, Webb R, Jordan E, West R, West FD, Yang JY, Wang K, Stice SL. Pig induced pluripotent stem cell-derived neural rosettes developmentally mimic human pluripotent stem cell neural differentiation. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(16): 1901–1911. [DOI]
- [15] Webb RL, Gallegos-Cárdenas A, Miller CN, Solomotis NJ, Liu HX, West FD, Stice SL. Pig induced pluripotent stem cell-derived neural rosettes parallel human differentiation into sensory neural subtypes. *Cell Reprogram*, 2017, 19(2): 88–94. [DOI]
- [16] Liao YJ, Tang PC, Chen YH, Chu FH, Kang TC, Chen LR, Yang JR. Porcine induced pluripotent stem cell-derived osteoblast-like cells prevent glucocorticoid-induced bone loss in Lanyu pigs. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202155. [DOI]
- [17] Talbot NC, Blomberg LA, Garrett WM, Caperna TJ. Feeder-independent continuous culture of the PICM-19 pig liver stem cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010, 46(9): 746–757. [DOI]
- [18] Talbot NC, Caperna TJ. A feeder-cell independent subpopulation of the PICM-19 pig liver stem cell line capable of long-term growth and extensive expansion. *Cytotechnology*, 2014, 66(1): 1–7. [DOI]
- [19] Xu JJ, Yu LQ, Guo JX, Xiang JZ, Zheng Z, Gao DF, Shi BB, Hao HY, Jiao DL, Zhong L, Wang Y, Wu J, Wei HJ, Han JY. Generation of pig induced pluripotent stem cells using an extended pluripotent stem cell culture system. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 193. [DOI]
- [20] Zheng Y, Feng TY, Zhang PF, Lei PP, Li FY, Zeng WX. Establishment of cell lines with porcine spermatogonial stem cell properties. *J Anim Sci Biotechnol*, 2020, 11: 33. [DOI]
- [21] Huang L, Niu CG, Willard B, Zhao WM, Liu L, He W, Wu TW, Yang SL, Feng ST, Mu YL, Zheng LM, Li K. Proteomic analysis of porcine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and umbilical cord: implication of the proteins involved in the higher migration capability of bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 77. [DOI]
- [22] Gao Q, Xia Y, Liu L, Huang L, Liu Y, Zhang X, Xu K, Wei JL, Hu YQ, Mu YL, Li K. Galectin-3 enhances migration of minature pig bone marrow mesenchymal stem cells through inhibition of RhoA-GTP activity. *Sci Rep*, 2016, 6: 26577. [DOI]
- [23] Han W, He X, Zhang MZ, Hu SX, Sun F, Ren LP, Hua JL, Peng S. Establishment of a porcine pancreatic stem cell line using T-RExTM system-inducible Wnt3a expression. *Cell Prolif*, 2015, 48(3): 301–310. [DOI]
- [24] Gurel Pekozer G, Ramazanoglu M, Schlegel KA, Kok FN, Torun Kose G. Role of STRO-1 sorting of porcine dental germ stem cells in dental stem cell-mediated bone tissue engineering. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(3): 607–618. [DOI]
- [25] Lermen D, Gorjup E, Dyce PW, von Briesen H, Müller P. Neuro-muscular differentiation of adult porcine skin derived stem cell-like cells. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8968. [DOI]
- [26] Stieler Stewart A, Freund JM, Blikslager AT, Gonzalez LM. Intestinal stem cell isolation and culture in a porcine model of segmental small intestinal ischemia. *J Vis Exp*, 2018, (135): 57647. [DOI]
- [27] Bogliotti YS, Wu J, Vilarino M, Okamura D, Soto DA, Zhong CQ, Sakurai M, Sampaio RV, Suzuki K, Izpisua Belmonte JC, Ross PJ. Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(9): 2090–2095. [DOI]
- [28] Hill ABT, Bressan FF, Murphy BD, Garcia JM. Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 44. [DOI]
- [29] Pillai VV, Kei TG, Reddy SE, Das M, Abratte C, Cheong SH, Selvaraj V. Induced pluripotent stem cell generation from bovine somatic cells indicates unmet needs for pluripotency sustenance. *Anim Sci J*, 2019, 90(9): 1149–1160. [DOI]
- [30] Pipino C, Mandatori D, Buccella F, Lanuti P, Preziuso A, Castellani F, Grotta L, Di Tomo P, Marchetti S, Di Pietro N, Cichelli A, Pandolfi A, Martino G. Identification and characterization of a stem cell-like population in bovine milk: a potential new source for regenerative medicine in veterinary. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(22): 1587–1597. [DOI]
- [31] Kumar De A, Malakar D, Akshey YS, Jena MK, Dutta R. Isolation and characterization of embryonic stem cell-like cells from *in vitro* produced goat (*Capra hircus*) embryos. *Anim Biotechnol*, 2011, 22(4): 181–196. [DOI]
- [32] Garg S, Dutta R, Malakar D, Jena MK, Kumar D, Sahu S, Prakash B. Cardiomyocytes rhythmically beating generated

- from goat embryonic stem cell. *Theriogenology*, 2012, 77(5): 829–839. [DOI]
- [33] Song WC, Mu HL, Wu J, Liao MZ, Zhu HJ, Zheng LM, He X, Niu BW, Zhai YX, Bai CL, Lei AM, Li GP, Hua JL. miR-544 Regulates dairy goat male germline stem cell self-renewal via targeting PLZF. *J Cell Biochem*, 2015, 116(10): 2155–2165. [DOI]
- [34] Mrozik KM, Zilm PS, Bagley CJ, Hack S, Hoffmann P, Gronthos S, Bartold PM. Proteomic characterization of mesenchymal stem cell-like populations derived from ovine periodontal ligament, dental pulp, and bone marrow: analysis of differentially expressed proteins. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(10): 1485–1499. [DOI]
- [35] Fadel L, Viana BR, Feitosa MLT, Ercolin ACM, Roballo KCS, Casals JB, Pieri NCG, Meirelles FV, Martins DDS, Miglino MA, Ambrósio CE. Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep. *Acta Cir Bras*, 2011, 26(4): 267–273. [DOI]
- [36] Zhang L, Wu YN, Li X, Wei S, Xing YM, Lian Z, Han HB. An alternative method for long-term culture of chicken embryonic stem cell *in vitro*. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 2157451. [DOI]
- [37] Farzaneh M, Attari F, Mozdziaik PE, Khoshnam SE. The evolution of chicken stem cell culture methods. *Br Poult Sci*, 2017, 58(6): 681–686. [DOI]
- [38] Zuo QS, Jin K, Wang YJ, Song JZ, Zhang YN, Li BC. CRISPR/Cas9-mediated deletion of C1EIS inhibits chicken embryonic stem cell differentiation into male germ cells (*Gallus gallus*). *J Cell Biochem*, 2017, 118(8): 2380–2386. [DOI]
- [39] He NN, Wang YL, Zhang C, Wang M, Wang YJ, Zuo QS, Zhang YN, Li BC. Wnt signaling pathway regulates differentiation of chicken embryonic stem cells into spermatogonial stem cells via Wnt5a. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 1689–1701. [DOI]
- [40] Wang M, Zhang C, Huang CL, Cheng SZ, He NN, Wang YL, Ahmed MF, Zhao RF, Jin J, Zuo QS, Zhang YN, Li BC. Regulation of fibroblast growth factor 8 (FGF8) in chicken embryonic stem cells differentiation into spermatogonial stem cells. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 2396–2407. [DOI]
- [41] Zhang C, Wang M, He NN, Ahmed MF, Wang YL, Zhao RF, Yu XJ, Jin J, Song JZ, Zuo QS, Zhang YN, Li BC. Hsd3b2 associated in modulating steroid hormone synthesis pathway regulates the differentiation of chicken embryonic stem cells into spermatogonial stem cells. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 1111–1121. [DOI]
- [42] Jin J, Zhao RF, Chen C, Zhou J, Lu ZY, Jin K, Zhang C, Wang M, Sun CH, Wang YJ, Zhang WH, Li TT, Zuo QS, Zhang YN, Chen GH, Li BC. The Lbc gene promotes differentiation of chicken embryo stem cell into spermatogonial stem cells via the regulation of transcriptional factor Hoxa5. *J Cell Biochem*, 2019, doi: 10.1002/jcb.27760. [DOI]

(责任编辑: 李明洲)