

才文道力玛,伊敏娜,王希生,等. 大动物多能干细胞建立研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 695-701.
Caiwendao Lima, Yiminna, Wang XS, et al. Research progress on the establishment of pluripotent stem cells in large animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 695-701.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.05.016

大动物多能干细胞建立研究进展

才文道力玛^{1,2}, 伊敏娜^{1,2}, 王希生^{1,2}, 神英超^{1,2}, 纳日嘎^{1,2}, 陶力^{1,2}
格日乐其木格^{1,2}, 芒来^{1,2*}

- (1. 内蒙古农业大学动物科学学院, 内蒙古自治区马属动物遗传育种与繁殖学重点实验室, 呼和浩特 010018;
2. 农业农村部马属动物遗传育种与繁殖科学观测实验站, 内蒙古农业大学马属动物研究中心, 呼和浩特 010018)

【摘要】 多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)是可以无限增殖更新并具有分化为各种组织细胞潜能的一类干细胞系。而其中的iPS细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)的建立更是进一步拉近了干细胞和临床疾病治疗的距离,并且对农业经济发展和动物医学领域具有巨大的潜在应用价值。然而目前干细胞深层次的机制与应用研究主要还是集中在小鼠和人类干细胞上,而对于农牧业与兽医学关系紧密的大动物干细胞的研究主要还在初步建立与应用尝试阶段。而本文通过归纳整理相关文献,简述了胚胎多能干细胞以及诱导多能干细胞在猪、牛、马等大动物中的建立研究现状。

【关键词】 多能干细胞;胚胎干细胞;诱导性多能干细胞;大动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 05-0695-07

Research progress on the establishment of pluripotent stem cells in large animals

Caiwendao Lima^{1,2}, Yiminna^{1,2}, WANG Xisheng^{1,2}, SHEN Yingchao^{1,2}, Nariga^{1,2}, Taoli^{1,2}

BOU Gerelchimeg^{1,2}, Manglai^{1,2*}

Corresponding author: Manglai. E-mail: dmanglai@163.com

【Abstract】 Pluripotent stem cells (PSCs) are a class of stem cell lines that can proliferate indefinitely and have the potential to differentiate into various tissue cells. The establishment of induced pluripotent stem cells (iPS cells) has further narrowed the distance between stem cells and clinical disease treatment, and has great potential value for applications in the fields of agricultural economic development and animal medicine. However, currently the thorough mechanism research and the application of stem cells are mainly focused on mouse and human stem cells, while the research on stem cells of large animals with a close relationship with agriculture, animal husbandry, and veterinary science is still at the preliminary establishment and application trial stage. By summarizing the relevant literature, this article briefly describes the establishment and research status of embryonic pluripotent stem cells and induced pluripotent stem cells in large animals such as pigs, cattle, and horses.

【Keywords】 pluripotent stem cells; embryonic stem cells; induced pluripotent stem cells; large animals

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家重点研发计划项目(2017YFE0108700), 国家自然科学基金(31860642), 内蒙古农业大学动物科学学院青年基金项目(QN201905), 内蒙古自治区应用技术与开发资金项目(2019GG242)。

Funded by National Key Research and Development Program of China (2017YFE0108700), National Natural Science Foundation of China (31860642), Youth Foundation Project of College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University (QN201905), Applied Technology Research and Development Fund Project of Inner Mongolia Autonomous Region (2019GG242).

【作者简介】 才文道力玛(1996—), 女, 硕士研究生。研究方向: 动物遗传育种与繁殖。Email: 1216048551@qq.com

【通信作者】 芒来(1960—), 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 马属动物种质资源创新与遗传改良研究。Email: dmanglai@163.com

多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)是一类能高度分化,具有体外无限自我更新和自我增殖,并且能够分化成三胚层多种细胞类型的一类干细胞。PSCs 可以起源于胚胎,生殖细胞或体细胞,并且处于不同的多能性状态:原始态(Naïve)和始发态(Primed)。PSCs 向外胚谱系(如原始内胚层和滋养外胚层)的分化能力虽然在干细胞领域的科学家中仍存在争议,但是其广泛地分化能力使多能性细胞系成为了研究哺乳动物发育生物学的重要工具,并使它们在移植细胞进行治疗的再生医学中具有巨大的应用前景。目前为止,虽然 PSCs 的研究主要集中在小鼠和人细胞模型上,然而,由于存在人类干细胞使用相关严格的规定及伦理上的限制,导致许多干细胞应用在临床试验之前必须进行动物实验,这一点要求相关动物模型的积极开发。而啮齿类动物,尤其是小鼠虽然是生物医学研究领域最经典的模式动物,但由于其个体大小、寿命和生理特性方面与人类及其他大动物的差别过于显著,使得其在很大一部分疾病中无法很好地模拟人类或者大动物的状况,促使着研究者们致力于开发更多样化的动物模型。其中马、猪等大型哺乳动物不仅在解剖学、生理学和遗传学上与人类有许多相似之处,还允许复杂的实验,以测试来源于 PSCs 的移植物的适用性、安全性和有效性等。其次,在农业经济方面 PSCs 还可以应用于开发转基因动物,其目的就是将新的或修饰的基因整合到其基因组中来改变动物及其后代的特征^[1]。如修饰生长激素的表达从而提高猪肉品质;敲出某些蛋白或基因生产出具有乳腺炎抗性的牛等。另外,PSCs 基本上是不增殖的,如果得到适当的保存与维持,它们具有很高的遗传稳定性,这使它们对保护稀有品种和物种,对产生可存活的卵母细胞和精子,从而实现体外受精(in vitro fertilization, IVF)和后代的产生也具有价值。此外,在兽医临床和人类医疗临床前实验等方面它们还可以为检测药物、潜在毒素和致畸物以及内分泌干扰物对发育的影响,甚至细胞移植提供实验室材料^[2]。也有学者对这些 PSCs 的另一种潜在用途,分化为骨骼肌,用于生产肉制品或移植组织等也抱有很大希望^[1]。简而言之,干细胞生物学的进步,结合生产转基因动物的有效方法以及我们对大型动物模型价值的日益了解,有望为临床研究治疗及动物生产上的应用提供更多的资源并大大加速人类医学及经济发展。

1 大动物 ESCs 的建立

1981 年,胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是英国剑桥大学 Evans 等^[3]首次通过体外培养从小鼠囊胚期胚胎的内部细胞群分离出来的具有多能性的细胞类型,其特征是呈现圆顶克隆,单细胞存活率高,依赖 JAK/STAT 信号,表达与糖酵解、脂质、囊泡生物学和代谢相关的基因。它具有无限增长,并且能够分化为所有三个胚层细胞的能力。当被注射到植入前胚胎中时,可以形成嵌合体,并参与生殖细胞的发育^[4],在雌性中包含重新激活的 X 染色体,并在多能性方面显示出高度的同质性。尽管不同克隆的增殖效率不同,但是小鼠胚胎干细胞通常是在含有白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF)和 ERK/MAPK 信号抑制剂的培养基中增殖的,例如 CHIR99021 和 PD0325901(也称为 2i 条件)。确定 ESC 系多能性的常用方法有干细胞相关基因和表面标志物的表达、在体外形成胚状体的能力以及其分化为代表三个胚层的特定细胞类型的能力、在动物体内多向分化的潜能,如移植到免疫缺陷动物体内是否可以形成畸胎瘤并含有三个胚层的组织和来源物种体内嵌合后代的产生、最高级别的黄金标准还有四倍体嵌合实验。而至今为止,从植入前的胚胎中建立的小鼠 ESCs 是满足所有这些多能性测量标准的唯一细胞类型。而与小鼠 ESCs 相比,猪、牛、马等大动物的 ESC 细胞系的建立和研究进展滞后很多,以下分别做概述。

1.1 猪胚胎干细胞

啮齿类动物小鼠因易饲养、妊娠期短等优势已成为医学研究最常见的哺乳动物模型,但是它无法很好地模拟一些人类疾病。而猪由于其寿命、器官大小和生理特性与人类相似,对于研究某些人类遗传疾病和异种器官移植方面比起其他大型动物更具有优势^[5]。目前猪胚胎干细胞可以从体外胚胎、孤雌激活和核移植等方法建立^[6-7]。这些细胞通常以扁平的多边形上皮样细胞在体外增殖,它具有碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)活性,可以在体外培养物中维持较长时间并形成胚状体,但仅分化为有限数量的细胞类型。同时,他们还显示了包括 OCT4、NANOG、SOX2 和 SSEA-1 等多能性标记物的表达^[8-10],可其中只有 2011 年 Telugu 等^[10]通过上调 KLF4 和 POU5F1 的表达,从猪胚泡内部细胞团

中获得的白血病抑制因子依赖性类似 naïve 型多能干细胞在免疫缺陷小鼠体内产生了畸胎瘤。而且除了少数^[9],能促成嵌合体但未观察到种系传播的细胞系外,他们中的大多数并不能促成嵌合体。与小鼠和人类相比,猪的植入前发育期延长,导致很难确定导出 ESC 的最佳胚胎阶段,也无法确定衍生和维持这些细胞的理想培养条件。迄今为止,仍然没有满足所有体内多能性标准,包括嵌合体产生以及种系贡献的猪胚泡来源胚胎干细胞系。

1.2 牛胚胎干细胞

奶牛因其生殖周期的相似性,成为研究女性卵巢功能、衰老对生育力的影响以及某些子宫疾病的重要动物模型^[11]。通过基因选择或基因编辑来生产具有遗传优势的牛可以有效减少奶牛乳房炎等疾病,从而提高奶制品和肉制品的营养价值改善人类健康,因此牛胚胎干细胞系的建立对生物学和农学应用都具有巨大的价值。已有许多方法产生牛胚胎干细胞系,如体外胚胎生产^[12-14]、孤雌生殖激活^[15]以及体细胞核移植法(somatic cell nucleus transplantation, SCNT)^[14]等,这些牛 ESC 样细胞系,具有高的 AP 活性,并表达了 OCT4、SOX2、NANOG、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81 等多能性标记物,并且有些可以形成畸胎瘤^[13-14]。虽然人们在改善培养基等方面做了许多工作,但由于收集胚胎较难及没有合适的体外培养系统等问题,尚未有报道关于可产生种系嵌合体的牛胚胎干细胞系。

1.3 马胚胎干细胞

马作为重要的运动动物,被认为是测试肌肉骨骼损伤,如软骨损伤或退化细胞疗法的理想动物模型,因为其承重肌腱结构和基质组成以及关节和肌腱损伤的性质与人类非常相似,因此对于同种异体肌腱细胞移植方面具有潜在应用价值^[15]。很多研究集中在马 ESC 分化为肌腱细胞和分化衍生物的免疫原性中,关于建立马胚胎干细胞的报道寥寥无几。在马匹中,最初 Saito 等^[16]描述了从脐带来源的牛成纤维细胞饲养层上培养的冷冻和解冻的胚泡中分离出的具有正常核型的马 ESC 样细胞,这些细胞系维持超过 50 代并表达了多能性标记 SSEA-1、STAT3、OCT4 和碱性磷酸酶以及体外分化为神经祖细胞和造血或内皮细胞谱系的能力。之后分别有两个小组^[17-18]报道了从内细胞团(inner cell mass, ICM)建立的马 ESC 样细胞,并在补充 LIF 的培养基中维持培养 20 代以上。后者发现马 ESC 样

细胞具有干细胞特异性基因的独特表达特征,与人和小鼠的 ESC 不同,从马胚胎中分离的 ES 样细胞表达了 OCT4、AP、SSEA-1、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81。小鼠 ESC 仅表达 SSEA-1,人类 ESC 则表达 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81,不表达 SSEA-1。这些所获得的细胞它们的形态类似典型上皮样,并能够分化为所有三个胚层,但是当被注入裸鼠时既没有形成畸胎瘤,也没有检测到嵌合体的产生。另外,2011 年的一项研究使用了克隆的和孤雌性激活的胚泡进行马 ESC 系的分离^[19]。然而,由于该物种卵母细胞和胚胎的缺乏以及其体外胚胎生产系统的缺乏,马胚胎干细胞的分离受到阻碍,因此关于马胚胎干细胞系的描述还很模糊,有关研究也很有限。

以上对三类家养物种 ESC 的现状总结表明,建立稳定的家畜胚胎干细胞仍然是个问题,因此使用重编程的体细胞提供了一个很好的选择。2006 年,诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)是由 Takahashi 等^[20]通过采用导入外源基因的方法使体细胞发生重编程而获得的,可以无限增殖更新并具有分化为各种组织细胞潜能的一类干细胞系。他们证明了四种关键转录因子 OCT4、SOX2、KLF4 和 C-MYC(Yamanaka 因子或 OSKM)的诱导表达能够将小鼠体细胞重新编程成与 ESC 细胞具有相似多潜能特征的细胞。它们可以由任何类型的细胞产生,因此可以选择供体的表型,而不会造成使用 ESC 所产生的伦理困境。从那以后,人们做了很多努力来获取和鉴定家畜的 iPSC 细胞。以助于填补实验室动物(尤其是小鼠)实验和人类临床实验之间的巨大差距,并作为比啮齿动物更准确的研究人类疾病的模型,为测试 iPSCs 安全性和潜力提供宝贵系统^[21]。

2 大动物 iPSCs 的建立

2.1 猪诱导多能干细胞

相比于牛和马,猪的诱导多能干细胞研究开展的较早。早在 2009 年就有三个小组发文声称成功利用 Yamanaka 四因子从猪成纤维细胞产生猪 iPS 细胞系^[22-24]。次年,美国密苏里州密苏里大学通过慢病毒载体使用重编程因子 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog 和 Lin28 从猪骨髓源间充质干细胞产生猪 iPS 系,并首次证明了猪 iPS 能够形成对所有 3 个胚层,滋养外胚层和性腺都起作用的嵌合体,且

能繁殖活后代^[25]。他们将 iPSCs 显微注射到胚胎期的猪胚胎中生产出了能适应种系的嵌合家畜,但是在该研究中生产的 29 个嵌合动物中的种系传播率低(4.7%);在生产的两只 Oct4 和 Nanog 转基因阳性 F1 仔猪中,一只为死胎,而其同窝其他仔猪只存活了 3 d。随后,在 2011 年有研究报道^[26]首次从猪 iPSC 细胞系衍生功能性细胞,即成功诱导猪 iPSC 细胞系,并将 piPSC 在补充抗坏血酸的分化培养基中培养 15 d 后,该细胞系自发产生了跳动的心肌样细胞,其通过免疫荧光分析表达 GATA4、SMA 和 vimentin 显示出类似于心肌细胞的特征。诱导多能干细胞虽然不涉及伦理道德等问题,但存在技术方面的困难,如病毒载体随机整合到宿主基因组中,可能会破坏肿瘤抑制基因,激活癌基因或破坏必需基因的危险性,因此尽管病毒介导的转染非常有效且易于使用,人们仍在努力开发其他方法来诱导猪 iPSC 细胞系,如减少或替代转录因子^[27-28]、非病毒转染法^[29-30]、microRNA 诱导^[31]等。此外也有研究团队致力于提高 piPSC 产生效率的研究中,如培养条件的改善^[32-35]、宿主细胞的选择^[35]。这些研究中产生的猪 iPSC 细胞表达多能性基因 OCT3/4 和 SOX2 并且可以在体外和体内分化为三胚层的细胞^[23-24,27-28,33-34],而其中的部分细胞对于 SSEA-3、SSEA-4、TAR-1-60 和 TAR-1-81 的表达呈阳性^[24,27],部分却呈阴性^[23,30]。另外,它们还可以诱导产生神经元^[32]和软骨细胞^[30]。

2.2 牛诱导多能干细胞

通过逆转录病毒载体和多启动子质粒方法从牛成纤维细胞产生牛 iPSC 细胞系,正式开启了牛 iPSC 细胞相关研究的道路^[36-38]。分别使用了 6 个转录因子(transcription factor, TF)(Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog 和 Lin28)、Yamanaka 4TF (Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc)以及 4TF+Nanog 的组合。其中使用 6TF 和 5TF 的小组明确指出了 4TF 产生的克隆不能传代至第 6 代或第 8 代以上,而另一个小组并没有明确说明,也许这一差别出自前者使用了逆转录病毒载体,而后者则使用了多启动子质粒方法。同时,研究表明,血清替代物(knockout serum replacement, KSR)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, BFGF)最有利于 biPS 的产生^[36];牛 iPSC 细胞对 MEK、GSK3 β 及其各自信号通路的成分具有依赖性^[37];以及将 NANOG 添加到逆转录病毒诱导混合物中对于 biPS 的产生至关重要^[38]。次

年,首次报道了牛 iPSC 细胞在使用猪卵泡液和 RA 诱导分化的特定培养条件下,P12 代 biPS 细胞被诱导为雌性生殖细胞并表达早期和晚期雌性生殖细胞特异性基因 Vasa、Dazl、Gdf9、Zp2 和 Zp3,并观察到多个卵母细胞样细胞和滤泡样结构,免疫荧光染色显示,生殖细胞特异性标记 Vasa 和 Nobox 在卵母细胞样细胞中呈阳性^[39]。另外,这项研究所产生的牛 iPSC 细胞对于 SSEA-1 的表达呈阳性,对 SSEA-3、SSEA-4、TAR-1-60 和 TAR-1-81 的表达呈阴性,刚好与 Huang 等^[37]的研究结果相反。同年,广西大学石德顺研究员等^[40]提出,SV40 大 T 抗原可降低 p53 的表达并提高 biPSC 重编程的效率,或者在重编程的早期使用 p53 抑制剂 PFT(p-fifty three)抑制 p53 的表达可以促进 biPSC 的重编程的理论。随后,在 2015 年 Talluri 等^[41]和 Kawaguchi 等^[41-42]通过 piggyBac 转座子方法使用 4TF 分别从牛成纤维细胞和羊膜细胞成功产生了牛 iPSC 细胞。Talluri 等^[41]是将两种转座子(sleeping beauty, SB 和 piggy bac, PB)进行比较,并表示相比于 SB 系统 PB 更适合 BEF 的重编程。Kawaguchi 等^[42]则是从羊膜细胞建立了两种类型的牛 iPSC 细胞,并首次证明了牛 iPSC 细胞可以促进嵌合胎儿并分化为所有组织,包括胚外组织。在去年,Rawat 等^[43]为提高牛胚胎成纤维细胞(bovine embryonic fibroblast, BEF)重编程效率进行了不同的时间更换培养基来确定重编程效率的研究,并表示在第 5 天更换培养基,克隆形成率最高。而 Pillai 等^[44]是将人和鼠类中可提高重编程效率的方法用在牛 iPSC 诱导实验中,如通过敲低 MBD3、Trp53/TP53 和过表达 BRD3R 和多能性相关 microRNA 302/367 簇,结果显示这些方法在牛中都不能有效改善重编程效率。而使用牛基因对牛细胞进行重编程可能会导致某种程度的效率提高;且胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)中的某些成分对于增强牛细胞的重编程效率可能至关重要。这些牛 iPSC 细胞可以在体外和体内分化为三胚层的细胞^[36-40],并且表达多能性相关基因 NANOG 和 SSEA-1,个别除外^[37]。

2.3 马诱导多能干细胞

马 iPSC 细胞系的研究始于 2011 年 Nagy 等^[45]的一篇文章,即基于 piggyBac 转座子方法用重编程因子 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 从妊娠 55 d 马胎儿成纤维细胞中生成 iPSC 细胞。其建立的马 iPSC 细胞系表达标志性多能性标记 Nanog、SSEA1、SSEA4、

Tra-1-60 和 Tra-1-81,即使在长期培养期间也显示出稳定的核型,并且在体内移植到免疫功能低下的小鼠中后容易形成包含所有三个胚芽层衍生组织的复杂畸胎瘤,虽然注射的小鼠暂时接受了强力霉素的喂养之后维持重编程转基因的表达,但仍表明获得的细胞具有体内分化能力。随后,澳大利亚科学家通过逆转录病毒利用三因子(Oct4、Sox2 和 Klf4)将成年马成纤维细胞重编程为 iPS 细胞,并首次证明了不含原癌基因 c-Myc,一样可以从马胚胎成纤维细胞(equine embryonic fibroblast, EEF)产生 iPS 细胞系,此研究为软骨和腱损伤模型中的自体移植打开了大门^[46]。2013 年,英国爱丁堡大学的科研人员首次报道,马 iPS 细胞系在适当的条件下,可以分化为具有运动神经元样特性的电活性细胞,产生的细胞具有胆碱能运动神经元的特征,包括能够产生动作电位的能力,并且发现马 iPS 细胞表达多能干细胞标记 Dnmt3B^[47]。另外,此文和同年发布的另一篇文章都表示,马 iPS 细胞系的自我更新对 LIF 具有依赖性^[47-48]。2018 年,有研究团队首次对马 iPS 细胞系进行了 MicroRNA 分析,结果显示与成纤维细胞相比, E-iPS 中 MicroRNA 的表达水平与人类的较为相似^[49]。因诱导多能干细胞可以从不同类型的细胞产生, Pessôa 等^[50]通过慢病毒系统使用人 4TF 分别从成年马成纤维细胞(eFibros)和骨髓间充质细胞(eBMsc),脂肪组织间充质细胞(eADmsc)和脐带组织间充质细胞(eUCmsc)生成马 iPS 细胞。结果表明, eBMsc 无法生成 E-iPSC。产生的所有马 iPS 细胞都表达多能性相关基因 OCT3/4 和 NANOG,而且部分可以在体外和体内分化为三胚层的细胞^[46-48]。

3 结语

现如今,大型哺乳动物胚胎干细胞和诱导多能干细胞的建立在产生转基因动物以及再生医学领域提供了巨大的应用潜力,如遗传疾病的研究、安全性的测试、异种移植物的来源、优秀性状动物繁殖等。然而,胚胎干细胞因涉及到胚胎及其它的收集难度、衍生物的分化潜能,使得无法建立稳定的家畜胚胎干细胞系。这一局面虽然已被诱导多能干细胞的出现打破了,但是由于物种差异和大型哺乳动物多能性的定义等难题,还尚未报道可通过四倍体嵌合实验这一黄金标准的大型哺乳动物多能干细胞。目前,研究人员们在啮齿类和灵长类哺乳

动物 naïve 或 primed 多能性状态的基因网络、两个状态维持和培养条件、甚至对体内胚胎生长发育及分化机理的深入研究都将对建立和优化及鉴定其他大型哺乳动物胚胎干细胞和诱导多能干细胞提供新思路和方法^[51]。作者认为,参考其他哺乳动物研究结果深入了解细胞不同多能性状态内外因素的基础上,结合所关注大型哺乳动物胚胎生长发育特点,对可能关键因素的充分验证和试验是突破研究现状的关键。幸运的是,已有越来越多的研究人员致力于家畜多能干细胞系的建立工作中,相信会在不久的将来这些问题都会逐步得到解决。

参 考 文 献(References)

- [1] Roberts RM, Yuan Y, Genovese N, et al. Livestock models for exploiting the promise of pluripotent stem cells[J]. ILAR J, 2015, 56(1): 74-82.
- [2] Ezashi T, Yuan Y, Roberts RM. Pluripotent stem cells from domesticated mammals[J]. Annu Rev Anim Biosci, 2016, 4: 223-253.
- [3] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(5819): 154-156.
- [4] Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(6): 487-492.
- [5] Secher JO, Callesen H, Freude KK, et al. Initial embryology and pluripotent stem cells in the pig-the quest for establishing the pig as a model for cell therapy[J]. Theriogenology, 2016, 85(1): 162-171.
- [6] Park JK, Kim HS, Uh KJ, et al. Primed pluripotent cell lines derived from various embryonic origins and somatic cells in pig[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e52481.
- [7] Kim E, Hwang SU, Yoo H, et al. Putative embryonic stem cells derived from porcine cloned blastocysts using induced pluripotent stem cells as donors[J]. Theriogenology, 2016, 85(4): 601-616.
- [8] Uh KJ, Park CH, Choi KH, et al. Analysis of imprinted IGF2/H19 gene methylation and expression in normal fertilized and parthenogenetic embryonic stem cells of pigs[J]. Anim Reprod Sci, 2014, 147(1-2): 47-55.
- [9] Vassiliev I, Vassilieva S, Beebe LF, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of putative porcine embryonic stem cells[J]. Cell Reprogram, 2010, 12(2): 223-230.
- [10] Telugu BP, Ezashi T, Sinha S, et al. Leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent, pluripotent stem cells established from inner cell mass of porcine embryos[J]. J Biol Chem, 2011, 286(33): 28948-28953.
- [11] Madeja ZE, Pawlak P, Piliszek A. Beyond the mouse: non-rodent animal models for study of early mammalian development and biomedical research[J]. Int J Dev Biol, 2019, 63(3-4-5): 187-201.

- [12] Bogliotti YS, Wu J, Vilarino M, et al. Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(9): 2090–2095.
- [13] Kim D, Park S, Jung YG, et al. *In vitro* culture of stem-like cells derived from somatic cell nuclear transfer bovine embryos of the Korean beef cattle species, HanWoo [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2015, 10. 1071/RD14071.
- [14] Singh KP, Kaushik R, Garg V, et al. Expression pattern of pluripotent markers in different embryonic developmental stages of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos and putative embryonic stem cells generated by parthenogenetic activation [J]. *Cell Reprogram*, 2012, 14(6): 530–538.
- [15] McClellan A, Paterson YZ, Paillet R, et al. Equine fetal, adult, and embryonic stem cell-derived tenocytes are all immune privileged but exhibit different immune suppressive properties *in vitro* [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(21): 1413–1423.
- [16] Saito S, Ugai H, Sawai K, et al. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation *in vitro* [J]. *FEBS Lett*, 2002, 531(3): 389–396.
- [17] Li X, Zhou SG, Imreh MP, et al. Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2006, 15(4): 523–531.
- [18] Guest DJ, Allen WR. Expression of cell-surface antigens and embryonic stem cell pluripotency genes in equine blastocysts [J]. *Stem Cells Dev*, 2007, 16(5): 789–796.
- [19] Desmarais JA, Demers SP, Suzuki JJ, et al. Trophoblast stem cell marker gene expression in inner cell mass-derived cells from parthenogenetic equine embryos [J]. *Reproduction*, 2011, 141(3): 321–332.
- [20] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676.
- [21] Cebrian-Serrano A, Stout T, Dinnyes A. Veterinary applications of induced pluripotent stem cells; regenerative medicine and models for disease? [J]. *Vet J*, 2013, 198(1): 34–42.
- [22] Esteban MA, Xu J, Yang J, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(26): 17634–17640.
- [23] Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(27): 10993–10998.
- [24] Wu Z, Chen J, Ren J, et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system [J]. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1(1): 46–54.
- [25] Telugu BP, Ezashi T, Roberts RM. Porcine induced pluripotent stem cells analogous to naive and primed embryonic stem cells of the mouse [J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(11–12): 1703–1711.
- [26] Montserrat N, Bahima EG, Batlle L, et al. Generation of pig iPS cells; a model for cell therapy [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2011, 4(2): 121–130.
- [27] Montserrat N, De OL, Garreta E, et al. Generation of feeder-free pig induced pluripotent stem cells without Pou5f1 [J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(5): 815–825.
- [28] Liu K, Ji G, Mao J, et al. Generation of porcine-induced pluripotent stem cells by using OCT4 and KLF4 porcine factors [J]. *Cell Reprogram*, 2012, 14(6): 505–513.
- [29] Du X, Feng T, Yu D, et al. Barriers for deriving transgene-free pig iPS cells with episomal vectors [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(11): 3228–3238.
- [30] Li D, Secher JO, Juhl M, et al. Identification of SSEA-1 expressing enhanced reprogramming (SEER) cells in porcine embryonic fibroblasts [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(11): 1070–1084.
- [31] Qiao S, Deng Y, Li S, et al. Partially reprogrammed induced pluripotent stem cells using microRNA cluster miR-302s in guangxi bama minipig fibroblasts [J]. *Cell Reprogram*, 2019, 21(5): 229–237.
- [32] Gu Q, Hao J, Hai T, et al. Efficient generation of mouse ESCs-like pig induced pluripotent stem cells [J]. *Protein Cell*, 2014, 5(5): 338–342.
- [33] Zhang W, Pei Y, Zhong L, et al. Pluripotent and metabolic features of two types of porcine iPSCs derived from defined mouse and human es cell culture conditions [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124562.
- [34] Liu K, Mao J, Song L, et al. DNA repair and replication links to pluripotency and differentiation capacity of pig iPS cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173047.
- [35] Li X, Zhang P, Jiang S, et al. Aging adult porcine fibroblasts can support nuclear transfer and transcription factor-mediated reprogramming [J]. *Anim Sci J*, 2018, 89(2): 289–297.
- [36] Han X, Han J, Ding F, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells [J]. *Cell Res*, 2011, 21(10): 1509–1512.
- [37] Huang B, Li T, Alonso-Gonzalez L, et al. A virus-free poly-promoter vector induces pluripotency in quiescent bovine cells under chemically defined conditions of dual kinase inhibition [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24501.
- [38] Sumer H, Liu J, Malaver-Ortega LF, et al. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts [J]. *J Anim Sci*, 2011, 89(9): 2708–2716.
- [39] Cao H, Yang P, Pu Y, et al. Characterization of bovine induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction of reprogramming factor fusion proteins [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(4): 498–511.
- [40] Deng Y, Liu Q, Luo C, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal fibroblasts with buffalo defined factors [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(13): 2485–2494.
- [41] Talluri TR, Kumar D, Glage S, et al. Derivation and characterization of bovine induced pluripotent stem cells by transposon-mediated reprogramming [J]. *Cell Reprogram*, 2015, 17(2): 131–140.
- [42] Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, et al. Generation of naive bovine induced pluripotent stem cells using piggybac

transposition of doxycycline-inducible transcription factors [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135403.

[43] Rawat N, Singh MK, Sharma T, et al. Media switching at different time periods affects the reprogramming efficiency of buffalo fetal fibroblasts[J]. Anim Biotechnol, 2019, 1-14.

[44] Pillai VV, Kei TG, Reddy SE, et al. Induced pluripotent stem cell generation from bovine somatic cells indicates unmet needs for pluripotency sustenance [J]. Anim Sci J, 2019, 90(9): 1149-1160.

[45] Nagy K, Sung HK, Zhang P, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts[J]. Stem Cell Rev, 2011, 7(3): 693-702.

[46] Khodadadi K, Sumer H, Pashaiasl M, et al. Induction of pluripotency in adult equine fibroblasts without c-MYC[J]. Stem Cells Int, 2012, 2012: 429160.

[47] Sharma R, Livesey MR, Wyllie DJ, et al. Generation of functional neurons from feeder-free, keratinocyte-derived equine induced pluripotent stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(13): 1524-1534.

[48] Whitworth DJ, Ovchinnikov DA, Sun J, et al. Generation and characterization of leukemia inhibitory factor-dependent equine induced pluripotent stem cells from adult dermal fibroblasts[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(13): 1515-1523.

[49] Moro LN, Amin G, Furmento V, et al. MicroRNA characterization in equine induced pluripotent stem cells [J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0207074.

[50] Pessoa LVF, Pires PRL, Del Collado M, et al. Generation and miRNA characterization of equine induced pluripotent stem cells derived from fetal and adult multipotent tissues[J]. Stem Cells Int, 2019, 2019: 1393791.

[51] Devika AS, Wruck W, Adjaye J, et al. The quest for pluripotency: a comparative analysis across mammalian species [J]. Reproduction, 2019, 158(3): R97-R111.

[收稿日期] 2020-04-12