

# 猪多能干细胞的研究进展

李 侠 李运生 张运海\*

(安徽农业大学动物科技学院, 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036)

**摘要** 多能干细胞, 如胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)和成体干细胞(adult stem cells, ASCs), 是一类具有巨大潜能的独特细胞。猪作为试验材料, 在遗传、代谢、生理生化及基因序列等方面较小鼠更接近于人类, 正逐渐成为人类异种移植和再生医学研究的理想生物学模型。然而, 目前对猪多能干细胞种类、来源、特征及机制的有限认识直接阻碍了其相关应用。该文将分别对猪ASCs的研究现状、猪类ESCs的分离培养、猪iPSCs的研究进展、多能干细胞间的联系和展望进行论述, 以期为从事该领域研究的科研人员提供参考。

**关键词** 猪; 多能干细胞; 胚胎干细胞; 诱导多能干细胞; 成体干细胞

## Recent Progress of Porcine Pluripotent Stem Cells

Li Xia, Li Yunsheng, Zhang Yunhai\*

(Anhui Provincial Laboratory for Local Livestock and Poultry Genetic Resource Conservation and Breeding, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract** Pluripotent stem cells, such as embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells and adult stem cells, are unique cells with great value. Pigs are considered as a kind of more ideal biomedical model in human xenotransplantation and regenerative medicine, bearing similar properties with human in genetic, metabolism, physiology, biochemistry and gene sequence. However, limited information on the sorting, derivation, characterization and mechanisms of porcine pluripotent stem cells impairs their application. Herein, we briefly reviewed the latest progresses about the derivation, current status, interrelationships and future perspectives of porcine pluripotent stem cells, in order to providing a useful reference for researchers' working in this filed.

**Key words** porcine; pluripotent stem cells; embryonic stem cells; induced pluripotent stem cells; adult stem cells

多能干细胞是一类具有多向分化潜能的细胞, 如ESC、iPSC和ASC, 它们不仅具有自我更新的能力, 并且在一定诱导条件下能够分化形成具有特定功能的成熟细胞<sup>[1]</sup>。这些特性使多能干细胞在细胞代替治疗、基因工程和再生医学等诸多研究中, 具有独特的应用前景和优越性。

早在1981年, Evans等<sup>[2]</sup>通过分离早期胚胎中的内细胞团, 成功建立了小鼠ESC细胞系。这项技术为干细胞研究及基因打靶带来了新的材料, 由此, Evans被授予了2007年的诺贝尔医学或生理学奖。1988年, Thomson等<sup>[3]</sup>又成功建立了人的ESC细胞系(human embryonic stem cells, hESC), 掀起了hESC应用研究的热潮。然而, 目前hESC运用于临床仍面临伦理和免疫排斥两大难题。为了解决这些问题, 科研人员进行了多种探索和尝试。(1)细胞融合技术, 即将体细胞与多能干细胞或卵母细胞融合<sup>[4-5]</sup>; (2)用多能干细胞的提取物对体细胞进行处理<sup>[6-7]</sup>; (3)用体细胞核移植技术(somatic cell nuclear transfer, SCNT)使体

收稿日期: 2013-09-04 接受日期: 2013-11-04

国家自然科学基金(批准号: 31272442)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0551-65786357, E-mail: yunhaizhang@ahau.edu.cn

Received: September 4, 2013 Accepted: November 4, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31272442)

\*Corresponding author. Tel: +86-551-65786357, E-mail: yunhaizhang@ahau.edu.cn

网络出版时间: 2014-01-27 16:22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0285.html>

细胞核发生重编程<sup>[8-9]</sup>。然而,上述方法并没有从根本上解决干细胞临床应用所存在的两大问题,这使得人们不得不另寻出路。经过几十年的努力,2006年,Yamanaka等<sup>[10]</sup>发现四种因子(*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*)的过表达可以将小鼠胎儿成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)重编程为与ESCs形态、增殖速率相似的细胞,这类细胞在体内和体外分别能形成畸胎瘤和拟胚体(embryoid bodies, EBs),还能嵌合到小鼠囊胚中,被称为诱导多能干细胞。这种新的重编程方法不仅成功规避了因涉及人类胚胎使用等方面的伦理问题,并且为消除或降低细胞免疫排斥提供了可能<sup>[11]</sup>。遗憾的是,iPSCs仍旧存在着诸如安全、诱导效率以及是否存在免疫排斥等问题。ASCs作为多能干细胞的一种,是指在出生后存在于机体中的一小部分未完全分化的细胞,其主要作用是更新生理性死亡的细胞或组织受损时的代偿性增生。在治疗人类相关疾病方面,ASCs已显示出广阔的应用前景,如ASCs中的脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, AMSCs)能抑制因心肌缺血后造成的心脏功能衰退<sup>[12]</sup>,这也将为ESCs/iPSCs的应用提供参考和借鉴。然而,小鼠由于自身寿命、器官大小和生理功能等局限使其并不适合作为人类疾病的理想模型,所以非常有必要寻找更为理想的模式动物。

猪被认为是研究人类疾病发生、诊疗的理想动物模型。首先,猪在解剖学、生理学和疾病发生机理等方面与人具有诸多相似之处,并且小型猪器官与人类器官大小相似,可以用于器官的代替治疗。其次,猪有被用来作为治疗人类疾病的历史,如用猪生产胰岛素治疗人类的糖尿病、用猪的心脏瓣膜及皮肤细胞治疗相应的人类疾病等<sup>[13]</sup>。再次,最近也有研究组报道了猪iPSCs成功应用于心肌梗死等疾病的治疗<sup>[14-15]</sup>。最后,猪还具有来源方便、基因序列与人类相似及在我国畜牧业中占有重要地位等诸多优势。

因此,在未来的移植治疗和人类疾病模型建立方面,猪作为一种重要的生物学模型,将会是检验多能干细胞安全和研究其功能的理想工具。虽然,猪ASCs在治疗某些人类疾病方面已显示出其独特的优势,但是其有限的分化潜能直接阻碍了其应用。研究人员尝试利用具有全能性的ESCs解决这一问题,但一直苦于没有建立真正意义上的猪ESCs细胞

系,而iPSCs技术的诞生为猪ESCs的建系问题提供了新的解决途径。同时,猪ASCs的临床应用将对ESCs和iPSCs的应用提供参考。因此,本文将分别对多能干细胞的种类及鉴定指标、猪ASCs的研究现状、猪类ESCs的研究历史、猪iPSCs的研究进展、多能干细胞间的联系和展望进行论述。

## 1 多能干细胞的种类及鉴定指标

多能干细胞是一类具有分化出多种细胞组织潜能的特殊细胞群体,可分为胚胎干细胞、诱导多能干细胞和成体干细胞三大类。目前,人们可以通过早期胚胎(自然受精胚胎、体外受精胚胎和孤雌激活胚胎)、体细胞克隆、细胞融合等多种途径来获取多能干细胞<sup>[16]</sup>。

为了获取猪多能干细胞,必须对所建立的细胞系进行必要的检测。常用来检测细胞全能性的指标可以归纳为以下几种:(1)碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)活性检测;(2)多能干细胞表面标记物的检测,包括荧光定量PCR等在mRNA水平上和流式细胞术、免疫荧光染色及Western blot等在蛋白质水平上的检测;(3)体外分化潜能的检测,包括拟胚体形成及后续拟胚体分化的检测;(4)体内分化潜能的检测,包括畸胎瘤和嵌合体的检测;(5)全能性的检测,多能干细胞生殖系转移能力的检测,其能充分证明多能干细胞是否具有全能性;(6)其他的一些指标,如核型检测、基因图谱和端粒酶活性分析。如果符合上述的所有指标,则能证明细胞具有全能性,目前只有鼠类的ESCs满足上述的所有标准<sup>[17]</sup>。其中,ESCs细胞系和iPSCs细胞系可以用上述指标进行检测,而ASCs作为一种分化能力有限的细胞,其检测指标又有所不同。以ASCs中的间充质干细胞为例,根据国际细胞治疗协会的标准<sup>[18]</sup>,其检测指标主要包括以下三个方面:(1)形态特征:体外培养为纺锤状贴附型细胞;(2)表形分析:细胞表达CD73、CD90和CD105,不表达CD14、CD34、CD45和HLA-DR;(3)分化潜能:体外培养时能向脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞分化即可。如待检测的细胞符合上述指标,则初步认为该细胞为间充质干细胞。

## 2 猪ASCs的研究现状

成体干细胞是指存在于各种已发育成熟的组织中,具有自我更新和分化能力的一类多能干细

胞,如脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)和造血干细胞(hemopoietic Stem cells, HSCs)。该类细胞虽处于已分化成熟的组织中,但它们本身处于未完全分化的状态,并能在特定条件下分化为特定功能的细胞。鉴于在农业生产和研究人类疾病上的优势,猪是研究AMSCs、BMSCs和HSCs等成体干细胞的理想材料。

首先,AMSCs具有取材容易、增值速度快、安全及多向分化潜能等优势,逐渐成为近年ASCs中的研究热点。自2001年Zuk等<sup>[19]</sup>成功建立了人AMSCs,研究人员也成功分离并建立了啮齿类动物的AMSCs<sup>[20-21]</sup>。2007年,屈长青等<sup>[22]</sup>建立了猪的AMSCs,并证明其具有向脂肪细胞、成骨细胞、成肌细胞等分化的潜能。2008年,Sheyn等<sup>[23]</sup>通过使用表达骨形成蛋白的质粒转染猪AMSCs,建立细胞系后将其移植到免疫缺陷的小鼠体内,发现AMSCs能高效分化形成骨组织并与小鼠颈椎发生融合,这为颈椎方面疾病的治疗带来了曙光。遗憾的是,初期的培养体系中均含有胎牛血清,其中的异源蛋白成份阻碍了AMSCs的临床应用。2011年,德国Schwarz等<sup>[24]</sup>研究出了猪AMSCs的无血清培养系统,与有血清的培养系统中的细胞相比,猪AMSCs表现出了相似的特性,为猪AMSCs的临床应用提供了可能。2013年,Dariolli等<sup>[25]</sup>又对猪AMSCs的长时间低温冻存是否会影响其质量进行了探索,他们发现猪AMSCs在低温冻存3到12个月后,其增殖活性、核型、可塑性和正常衰老等指标与冻存前没有明显的差别。这说明猪AMSCs可以在体外长时间的高质量保存,为猪AMSCs的进一步应用奠定了基础。其次,BMSCs因具有多向分化潜能、造血支持及促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点而日益受到人们的关注,并在猪上也取得了很大的进步。在农业生产方面,2006年,Faast等<sup>[26]</sup>发现与猪成纤维细胞作为SCNT供体细胞相比,将猪BMSCs做为供体细胞有利于重组胚胎发育至囊胚期,进而提高核移植效率。2013年,李自聪等<sup>[27]</sup>首次证明使用猪BMSCs作为SCNT供体细胞时,其重组胚胎在体内发育至囊胚的总细胞数和体内胚胎存活的时间,显著高于使用猪成纤维细胞作为SCNT供体细胞时。在生物医学方面,2009年,Liska等<sup>[28]</sup>发现对猪门静脉进行结扎处理后,门静脉注射猪的BMSCs能与肝脏处门静脉发

生融合,这有助于肝组织的再生。2011年,Groth等<sup>[29]</sup>证明猪BMSCs对人的淋巴细胞具有一定的免疫耐受能力,可能在未来治疗人类肝脏疾病中发挥作用。最后,ASCs中的造血干细胞、成骨干细胞、和神经干细胞等都取得了较大进步。

虽然ASCs具有很大的应用前景,但是其有限的分化潜能限制了在再生医学等方面的进一步应用。这对多能干细胞的分化潜能提出了更高的要求,也促使研究人员找到更加合适的多能干细胞系。

### 3 猪类ESC的研究历史

胚胎干细胞是从囊胚内细胞团中分离出的一类特殊细胞群体,具有自我更新、无限增殖和发育全能性等特征<sup>[30]</sup>。由于能分化形成机体绝大部分的细胞类型,ESC为了解决ASCs有限的分化潜能提供了可能,因而具有更大的应用价值。目前,哺乳动物中仅小鼠、恒河猴、人及大鼠得到了公认的ESC细胞系,这些细胞系绝大多数是采用传统的分离内细胞团的方法获得的。然而,采用同样方法获得的猪等哺乳动物ESC细胞系往往由于核型异常、不具备分化能力、不具有生殖嵌合能力等缺陷而只能称为“类ESC”。鉴于猪在研究人类疾病上的优越性,建立真正的猪ESC细胞系,研究其分化和功能,可为今后hESC细胞系在细胞治疗和组织修复等临床应用提供有益的参照。于是,我们将从猪类胚胎干细胞的来源、鉴定指标和培养体系三方面对猪类胚胎干细胞的建系进行阐述。

首先,在细胞来源方面,早期的研究主要采用体内囊胚分离猪ESC。1990年,由Evans等<sup>[31]</sup>用冲洗子宫的方法,从体内发育至7~10 d的孵化囊胚中获取了猪类胚胎干细胞。同年,Strojek等<sup>[32]</sup>用全胚胎培养法获得了类似的细胞,Piedrahita等<sup>[33]</sup>运用免疫手术法从受精后7~8 d的囊胚内细胞团中,也获得了猪的类胚胎干细胞。研究人员还进一步探索了不同发育阶段的胚胎,如4-细胞期到6-细胞期的胚胎、桑葚胚、不同时期的囊胚,同样也获得了类似的干细胞。然而,在接下来的传代培养中这些细胞很快失去了多能性。直到2000年,Miyoshi等<sup>[34]</sup>才从体外囊胚分离得到了上皮样的猪类胚胎干细胞系。该细胞系在体外传代次数超过30代,作为SCNT的供体细胞,能支持重构胚胎发育到囊胚阶段。2005年,Brevini等<sup>[35]</sup>又利用猪孤雌胚胎获得了类胚胎干细胞系。

其次,在鉴定指标方面,早期的研究主要是通过细胞形态学来区分的。后来,人们逐渐发现细胞形态与其分化潜能很难直接联系起来,于是分子与细胞水平上的筛选纯化就应运而生了。1993年,Talbot等<sup>[36]</sup>发现AP是ESCs的一个稳定分子标记,随后其他人也发现了一些ESCs特异性表达的因子,如SSEA-1、Oct4、Nanog。这些技术和方法的完善促进了猪胚胎干细胞的发展。

最后,在培养体系方面,早期的研究组大多采用类似于小鼠ESCs的培养液,主要包括基础培养液DMEM、谷氨酰胺、巯基乙醇、非必需氨基酸、抗生素和血清。后来,研究人员发现小鼠ESCs培养体系中的白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)对猪ESCs的分离作用不大,hESCs培养体系中的bFGF却有利于猪类胚胎干细胞的分离培养<sup>[37]</sup>。有趣的是,2011年Telugu等<sup>[38]</sup>通过上调*Oct4*、*Klf4*基因表达的体外囊胚内细胞团中,分离并建立了猪类ESCs细胞系。该细胞系在体外的传代次数超过50代,并且能形成畸胎瘤,但多能性的维持需要LIF,这使其在细胞形态、多能基因表达和ESCs表面标记物等方面更接近于小鼠的ESCs。2012年,Haraguchi等<sup>[39]</sup>首先将体外囊胚中分离出的猪的类ESCs培养于hESCs的培养体系中,并加入CHIR99021和PD184352两种抑制剂后,成功建立了猪的类ESCs细胞系。虽然该细胞系在分化潜能方面只能在体外形成EBs,不能在体内形成畸胎瘤等组织;但是,该细胞系在体外培养中可传至100代以上,同时高代次的细胞依然具有AP及端粒酶活性并表达相关的多能性基因。

虽然近几年人们在猪的类ESCs上取得了较大进步,但由于对猪早期胚胎发育和谱系决定的分子调控机理知之甚少,只是简单地把啮齿类和灵长类动物ESCs建立的成功经验转移到猪上,却发现不能建立真正的猪ESCs,其问题是随着细胞传代次数的增加,类ESCs发生分化,类ESCs的全能性没有得到验证。此外,胚胎的使用、可能存在的免疫排斥等问题也在一定程度上阻碍了ESCs的应用。这些都要求人们找到能解决猪ESCs建系及应用所面临问题的方法。

#### 4 猪iPSCs的研究进展

2006年,Yamanaka等<sup>[10]</sup>将*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*和

*c-Myc*四种转录因子,通过逆转录病毒导入小鼠成纤维细胞,成功获取了一种多能干细胞并称之为iPSCs。该技术被认为是一种较为高效、快速建立动物及患者特异多能干细胞的方法,为消除和降低细胞移植治疗带来的免疫排斥和减少胚胎的使用带来了曙光,因此受到了全球的广泛关注,也引发了iPSCs的研究热潮。迄今为止,已有小鼠、大鼠、羊、猪、牛、猴子、兔、水牛、鸡、人等多种动物iPSCs成功建系的报道。目前,iPSCs技术研究主要集中在源头细胞、载体、转录因子、筛选标记、iPSCs鉴定指标,培养体系和iPSCs应用等方面(图1)。由于猪在农业生产和研究人类疾病等方面的优越性,猪iPSCs技术的诞生和逐渐完善,将会对猪ESCs细胞系的建立、各种转基因克隆猪及嵌合体猪的生产、畜牧业的发展、药物开发和人类疾病研究产生深远的影响。

近几年,猪iPSCs的研究也取得了巨大进展(表1),我们将从iPSCs技术的优化和应用两个方面对猪iPSCs的进步进行分析。在技术优化方面,2009年,Wu等<sup>[40]</sup>成功地运用可诱导(Tet-on/off系统)慢病毒表达系统,首次将猪体细胞重编程为iPSCs,这也是世界上首次建立的家养有蹄动物的iPS细胞系。该细胞系与hESCs细胞系具有许多相似特征,如形态、表达的干细胞标记物和高的端粒酶活性,并且这些细胞在体外和体内都具有向内、中、外三个胚层分化的能力。同年,Esteban等<sup>[41]</sup>和Ezashi等<sup>[42]</sup>也分别报道获得了猪的iPSCs。三个研究组的第一个区别,在于供体细胞的选择。Wu等所使用的供体细胞是猪原代耳缘成纤维细胞和猪原代骨髓细胞,而Esteban等和Ezashi等所使用的供体细胞分别是藏猪胚胎成纤维细胞(porcine embryonic fibroblasts, PEFs)和家猪的胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblasts, PFFs)。第二个区别,在于诱导和培养猪iPSCs所用的培养基。Esteban等使用的是含血清的培养基来进行诱导和传代,而Wu等和Esteban等所使用的是含血清代替物(knockout serum replacement, KSR)的培养基。第三个区别,在于猪iPSCs鉴定时所用的检测指标。其中差别最大的为猪iPSCs的表面标记物,并且Esteban等所获得的猪iPSCs在体外不能形成拟胚体。三个研究组的共同点,在于所获得猪iPSCs在形态学上更像人的ESCs/iPSCs,呈现扁平样克隆,而不是像小鼠ESCs/iPSCs样的紧凑型克隆。这可能是由于在其体外培养过程中,培养基内中添加了hESCs/iPSCs

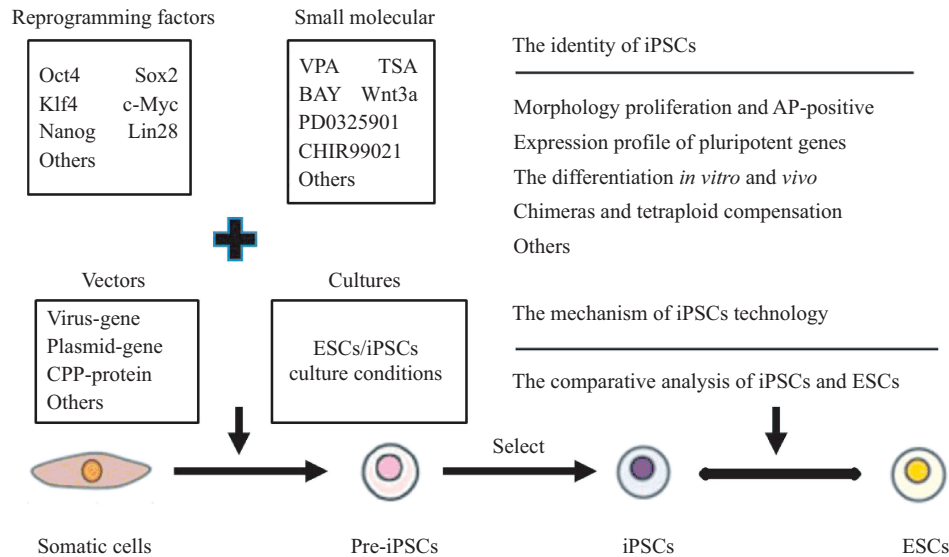


图1 iPSCs技术中的关键步骤

Fig.1 Key protocols of iPSCs technology

表1 猪iPSCs的研究进展

Table 1 Recent progress of porcine induced pluripotent stem cells

作者/时间 Author/Date	重编程因子 Reprogramming factors	载体 Vector	源头细胞 Type of source cell	饲养层 Feeder layer	培养条件 Culture conditions	分化潜能 Differentiation potential	多能性标记物 Pluripotent markers
Wu <i>et al.</i> 2009	hOSKMNL	Doxycycline inducible lentivirus	Porcine ear fibroblasts	MEFs	DMEM/F12, Doxycycline, KSR	Teratomas Cloned pig EBs	AP, Oct4, Sox2, Nanog, CDH1, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Rex1, Tra-1-81
Esteban <i>et al.</i> 2009	mOSKM hOSKM	Retrovirus	Tibetan miniature porcine fibroblasts	MEFs	bhFGF, mLIF, PD0325901, CHIR99021, 39 °C	Teratomas	AP, Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, SSEA-4, Rex1, Lin28
Ezashi <i>et al.</i> 2009	hOSKM	Lentivirus	PFFs	MEFs	hbFGF	Teratomas EBs	AP, Oct4, Sox2, Nanog, SSEA-1
Yin <i>et al.</i> 2010	hO+pSKM	Lentivirus	PFFs	MEFs	mLIF, hFGF	Teratomas	AP, Oct4, Klf4 SSEA-1, c-Myc, Nanog
Montserrat <i>et al.</i> 2012	mSKM	Retrovirus	Pig ear fibroblasts	MEFs or Gelatin only	hbFGF, mLIF	Teratomas EBs	AP, Oct4, Sox2, Nanog, SSEA-4, TRA-1-81, TRA-1-60
Kues <i>et al.</i> 2013	mOSKM	Sleeping beauty transposon	PFFs	MEFs or SNLs	KSR, hbFGF	Teratomas EBs	AP, Oct4, Sox2, Nanog, Rex1, ESRRB, DPPA5, UTF1
Wang <i>et al.</i> 2013	mOSKMTN	Retrovirus	PEFs	MEFs	KSR, bFGF, hLIF, BSA	Teratomas EBs	AP, Oct4, Sox2, Nanog, Rex1
West <i>et al.</i> 2010, 2011	hOSKMNL	Lentivirus	PMSCs	MEFs	KSR, hbFGF, TeSR1	Chimeric offspring EBs	AP, Oct4, Sox2
Fujishiro <i>et al.</i> 2012	hOSKM	Retrovirus	PEFs	MEFs	pLIF, Forskolin	Chimeric offspring EBs	AP, Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, Stella, Eras, SSEA-1

OSKMNL分别代表Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog和Lin28六种转录因子;前缀m、p、h分别代表鼠源、猪源、人源;SNLs代表表达白血病抑制因子的小鼠成纤维细胞。

OSKMNL represent Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, and Lin28, respectively; Prefix m, p, h represent murine, porcine, and human, respectively; SNLs represent mouse fibroblast cells with expression of leukemia inhibitory factor.

体外培养所需的碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的缘故。

随后,许多研究组相继报道了猪iPSCs的获得。2010年,殷慧群等<sup>[43]</sup>利用慢病毒介导表达外源限定因子(*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*)与EGFP的融合蛋白成功诱导出猪的iPSCs。这项研究证实了融合蛋白中的EGFP不影响体细胞重编程过程,为限定因子融合蛋白介导猪体细胞发生重编程奠定了基础。2012年,西班牙的Montserrat等<sup>[44]</sup>首次报道了在无*Oct4*过表达的条件下仅用三个因子(*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*)在无饲养层培养体系中将成年猪的成纤维细胞重编程为iPSCs。这暗示人们应探索*Oct4*在猪体细胞重编程及胚胎发育过程中起到的作用,同时无饲养层的培养体系减少了异源蛋白的污染,有利于猪iPSCs在转基因和药物筛选等方面的应用。2013年,德国的Kues等<sup>[45]</sup>利用CAG驱动的Sleeping Beauty转座子质粒共表达经典的鼠源四因子(*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*)将猪的成纤维细胞重编程为iPSCs。这种新的转载体转染进入细胞后,其游离在宿主细胞基因组外,整合进宿主细胞基因组的频率很低,不会带来因病毒转染过程中病毒重新激活的不安全因素,为生产出更加安全的猪iPSCs带来了希望。并且,最近刘中华等<sup>[46]</sup>发现在生产猪iPSCs的过程中,*Tbx3*和*Nr5a2*两因子起到了重要作用。他们证明*Tbx3*和*Nr5a2*两因子不仅能提高重编程的效率,甚至单独过表达*Nr5a2*因子就能使猪胚胎成纤维细胞重编程成为猪iPSCs,这为猪iPSCs转录因子的选择及重编程机制的研究提供了新的方法和思路。

在应用方面,猪iPSCs主要集中在农业和再生医学的应用上,其在农业上的应用主要体现在各种转基因猪的生产上面。2010年,West等<sup>[47]</sup>报道利用人的六种转录因子(*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*、*Nanog*和*Lin28*)诱导猪的骨髓间充质干细胞获得了猪iPSCs,将这些细胞注射进猪囊胚后成功得到了嵌合体猪。并且2011年,West等<sup>[48]</sup>又报道将获取的雌性嵌合体猪与正常的雄性野生型猪交配后,成功获取了生殖嵌合的猪,这些材料和技术方法为转基因猪的生产奠定了基础。然而,令人遗憾的是,West等仅采用RCR方法对生殖嵌合的猪进行鉴定,缺乏说服力。2012年,Fujishiro等<sup>[49]</sup>将表达EGFP的质粒转染入Naive状态的iPSCs,再将其注射进猪的孤雌桑葚胚和体外受精的桑葚胚中,分别生产出了携带绿

色荧光标记的嵌合囊胚及胎儿,说明了Naive状态的猪iPSCs具有嵌合到猪胚胎及胎儿中的能力。1997年诞生的多莉羊<sup>[50]</sup>不仅证明了终端分化的细胞核仍具有全能性,也说明了体细胞核移植在家畜动物上取得了历史性突破。经过多个研究团队的共同努力,2012年肖磊和赖良学等课题组<sup>[51]</sup>又一次通过将由iPSCs分化而来的细胞作为SCNT的供体细胞核,分别于2011年和2012年成功培育出了多头iPSCs来源的猪,这也是世界上首次获得活体iPSCs来源的克隆猪。其中,克隆猪的细胞核大多数来源于肖磊课题组于2009年利用可诱导的慢病毒载体生产的猪iPSCs,这证明了沉默猪iPSCs中的外源转录因子有利于提高克隆猪的生产效率。在再生医学方面,2011年,Zhou等<sup>[52]</sup>将猪iPSCs在特定条件下诱导分化为视杆细胞,再将这些细胞移植到无视杆细胞的猪视网膜腔内,发现这些细胞能与损害的视网膜神经发生融合,这为利用干细胞治疗失明问题带来了曙光。2012年,Gu等<sup>[53]</sup>将由猪iPSCs分化而来的血管内皮细胞移植到患有心肌梗塞的小鼠体内,发现这些细胞能改善小鼠的心脏功能,推进了大动物iPSCs的临床应用。2013年,Li等<sup>[14]</sup>则将猪iPSCs直接注射到心肌缺血的猪体内时,发现iPSCs整合到心肌后能分化形成血管细胞,为心脏缺血疾病的治疗带来了新的方法。

虽然猪iPSCs为建立猪ESC细胞系提供了新的方法和思路,但由于使用病毒或质粒等介导外源基因的过表达,可能引起细胞基因组的插入突变及病毒重新激活等不安全因素,iPSCs技术的安全性严重阻碍了猪iPSCs的相关应用。另一方面,较低的诱导效率,如利用病毒介导经典四因子的重编程效率为0.01%<sup>[10]</sup>和蛋白质介导的重编程效率为0.001%<sup>[53]</sup>,也制约了iPSCs的相关应用。

## 5 多能干细胞间的联系

自小鼠ESC建系以来,人们一直致力于建立猪等家畜ESC细胞系的研究,然而至今尚未获得真正的家畜ESC,而猪iPSCs的诞生为缓解猪ESC细胞系所存在的问题及建立真正的猪ESC细胞系提供了新的方法。目前应用较为广泛的ASCs,由于其有限的分化潜能限制了其进一步应用,这使得人们不得不去寻找诸如ESC和iPSCs等分化潜能更强的细胞。ESC、iPSC和ASC作为多能干细胞的一员,

都具有一定的自我更新和再分化能力,存在着较多的相似之处和紧密联系。

一方面, ESCs和iPSCs在细胞形态、增殖速度和分子标记等方面存在惊人的相似,它们的对比分析有利于人们对重编程机制和ESCs的了解<sup>[54]</sup>。并且, iPSCs技术的不断完善丰富了人们对猪多能性调控网络的认识,其研究也将为建立猪等家畜ESCs细胞系提供参考。另一方面, iPSCs和ASCs也存在着诸多联系。研究人员发现,将ASCs直接用于重编程,有利于提高重编程的效率和iPSCs的质量。如2009年, Kim等<sup>[55]</sup>证明单独过表达*Oct4*因子就能将ASCs中的神经干细胞重编程为iPSCs,该方法由于减少了重编程中外源因子的数目降低了外源基因整合的风险,有利于提高iPSCs的质量。2011年, Braga等<sup>[56]</sup>发现,将骨髓干细胞作为重编程的源头细胞有利于提高重编程的效率;同时无饲养层培养体系的使用,有助于iPSCs的后续基础研究和细胞治疗。目前, ASCs的研究价值还体现在其临床应用价值上,其临床应用也将为iPSCs/ESCs的临床推广提供依据,如可以将ESCs/iPSCs定向分化为造血干细胞<sup>[57]</sup>和神经干细胞<sup>[58]</sup>等重要的成体干细胞。因此, ESCs、iPSCs和ASCs的研究是紧密联系,相互促进的。

## 6 展望

在过去的三十多年里,研究人员在猪多能干细胞领域取得了很大的进步,然而也存在诸多问题。首先在ESCs方面,其最大的难题是如何建立真正的猪ESCs细胞系,其中最关键的是猪ESCs的培养体系和特异性标记物。这使得探索与猪早期胚胎发育及与猪多能性相关的特异性标记物和猪干细胞调控网络等工作迫在眉睫。其次,在iPSCs方面,其问题在于如何提高iPSCs技术的安全性和诱导效率。最近几年,以蛋白质和小分子化合物介导的体细胞重编程技术<sup>[53,59-63]</sup>在小鼠和人上取得了很大进步,为彻底解决iPSCs技术的安全性问题带来了可能,但单纯利用蛋白质和小分子化合物或两者的联合使用,能否得到猪iPSCs尚有待证明。2013年, Rais等<sup>[64]</sup>发现,敲除小鼠体细胞中的*Mbd3*基因能显著提高重编程的效率,为解决iPSCs技术的低效率问题提供了新的思路。此外,最近几年利用iPSCs细胞生产的克隆猪或嵌合体猪还存在存活时间不长、效率低下等问题。这就要求人们加强重编程机制、核移植条件优化和

iPSCs应用等方面的研究。最后,在ASCs方面,其最大的限制是其有限的分化潜能,并且如何获得足够的纯化细胞并如何将其应用于农业生产和临床应用也是其亟待解决的问题。这些都要求人们加强细胞分选、移植技术和ASCs分化机制等方面的研究。综上所述,在细胞来源方面,猪多能干细胞存在着诸多限制;同时,在安全性方面,随着连续的传代培养,多能干细胞的染色体可能会出现明显异常<sup>[65-67]</sup>,由iPSCs产生的克隆动物和嵌合体动物也有成瘤的风险<sup>[68]</sup>;此外,在经济效益方面,猪多能干细胞不能像人的多能干细胞一样在较短时间内取得很好的经济效益。这些问题严重阻碍了猪多能干细胞的广泛应用。为了彻底解决上述问题,研究人员应加强对猪早期胚胎发育、重编程机制和猪多能干细胞的调控网络、分化及应用等问题的探索。

2012年,猪基因组图谱的公布<sup>[69]</sup>为猪多能干干细胞的研究提供了新的视野和方法,人们将通过找到维持和抑制猪多能干细胞分化的因子,剔除可能诱使猪多能干细胞遗传物质发生改变的因素,高效率地建立安全的猪多能干细胞系,为后期在农业生产和再生医学等领域的应用奠定坚实的基础。同时,随着对多能性调控网络的认识和新技术新方法的出现,相信不久的将来人们会在猪多能干细胞领域取得更大的进步。

致谢——

衷心感谢魏超、张宇和蒲勇等师兄给予本文的帮助。

## 参考文献 (References)

- 1 Cho SJ, Cho J, Jung S, Choi HW, Seo HG, Do JT. Activation of pluripotency genes by a nanotube-mediated protein delivery system. *Mol Reprod Dev* 2013; 4(10): 22263.
- 2 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 3 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 4 Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005; 309(5739): 1369-73.
- 5 Matsumura H, Tada T. Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(1): 51-6.
- 6 Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts

- of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16(12): 5719-35.
- 7 Collas P, Taranger CK. Epigenetic reprogramming of nuclei using cell extracts. *Stem cell reviews* 2006; 2(4): 309-17.
- 8 Hakelien AM, Gaustad KG, Collas P. Modulation of cell fate using nuclear and cytoplasmic extracts. *Methods Mol Biol* 2006; 325: 99-114.
- 9 Bui HT, Kwon DN, Kang MH, Oh MH, Park MR, Park WJ, *et al.* Epigenetic reprogramming in somatic cells induced by extract from germinal vesicle stage pig oocytes. *Development* 2012; 139(23): 4330-40.
- 10 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 11 Plews JR, Gu M, Longaker MT, Wu JC. Large animal induced pluripotent stem cells as pre-clinical models for studying human disease. *J Cell Mol Med* 2012; 16(6): 1196-202.
- 12 Danoviz ME, Nakamura JS, Marques FL, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA, *et al.* Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. *PLoS One* 2010; 5(8): e12077.
- 13 Schuurman HJ, Pierson RN 3rd. Progress towards clinical xenotransplantation. *Front Biosci* 2008; 13: 204-20.
- 14 Li X, Zhang F, Song G, Gu W, Chen M, Yang B, *et al.* Intramyocardial injection of pig pluripotent stem cells improves left ventricular function and perfusion: A study in a porcine model of acute myocardial infarction. *PLoS one* 2013; 8(6): e66688.
- 15 Gu M, Nguyen PK, Lee AS, Xu D, Hu S, Plews JR, *et al.* Microfluidic single-cell analysis shows that porcine induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells improve myocardial function by paracrine activation. *Circ Res* 2012; 111(7): 882-93.
- 16 Klimanskaya I, Rosenthal N, Lanza R. Derive and conquer: Sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(2): 131-42.
- 17 Blomberg LA, Telugu BP. Twenty years of embryonic Stem cell research in farm animals. *Reprod Domest Anim* 2012; 47 Suppl 4: 80-5.
- 18 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- 19 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, de Ugarte DA, Huang JL, Mizuno H, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95.
- 20 Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007; 327(3): 449-62.
- 21 Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Shimada T, Hyakusoku H. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313(4): 871-7.
- 22 Qu CQ, Zhang GH, Zhang LJ, Yang GS. Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Anim* 2007; 43(2): 95-100.
- 23 Sheyn D, Pelled G, Zilberman Y, Talasazan F, Frank JM, Gazit D, *et al.* Nonvirally engineered porcine adipose tissue-derived stem cells: Use in posterior spinal fusion. *Stem Cells* 2008; 26(4): 1056-64.
- 24 Schwarz C, Leicht U, Rothe C, Drosse I, Luibl V, Roecken M, *et al.* Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. *Res Vet Sci* 2012; 93(1): 457-62.
- 25 Dariolli R, Bassaneze V, Nakamura JS, Omae SV, Campos LC, Krieger JE. Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation. *PLoS One* 2013; 8(7): e67939.
- 26 Faast R, Harrison SJ, Beebe LF, McIlpatrick SM, Ashman RJ, Nottle MB. Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. *Cloning Stem Cells* 2006; 8(3): 166-73.
- 27 Li Z, He X, Chen L, Shi J, Zhou R, Xu W, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells are an attractive donor cell type for production of cloned pigs as well as genetically modified cloned pigs by somatic cell nuclear transfer. *Cell Reprogram* 2013; 15(5): 459-70.
- 28 Liska V, Slowik P, Eggenhofer E, Treska V, Renner P, Popp FC, *et al.* Intraportal injection of porcine multipotent mesenchymal stromal cells augments liver regeneration after portal vein embolization. *In Vivo* 2009; 23(2): 229-35.
- 29 Groth A, Ottinger S, Kleist C, Mohr E, Golriz M, Schultze D, *et al.* Evaluation of porcine mesenchymal stem cells for therapeutic use in human liver cancer. *Int J Oncol* 2012; 40(2): 391-401.
- 30 Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 2011; 144(6): 940-54.
- 31 Evans MJ, Notarianni E, Laurie S, Moor RM. Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell lines from porcine and bovine blastocysts. *Theriogenology* 1990; 33(1): 125-8.
- 32 Strojek RM, Reed MA, Hoover JL, Wagner TE. A method for cultivating morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Theriogenology* 1990; 33(4): 901-13.
- 33 Piedrahita JA, Anderson GB, Bondurant RH. Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines. *Theriogenology* 1990; 34(5): 865-77.
- 34 Miyoshi K, Taguchi Y, Sendai Y, Hoshi H, Sato E. Establishment of a porcine cell line from *in vitro*-produced blastocysts and transfer of the cells into enucleated oocytes. *Biol Reprod* 2000; 62(6): 1640-6.
- 35 Anonymous T, Cillo F, Gandolfi F. Establishment and molecular characterization of pig parthenogenetic embryonic stem cells. *Reprod Fertil Develop* 2005; 17(1/2): 235-35.
- 36 Talbot NC, Rexroad CE Jr, Pursel VG, Powell AM. Alkaline phosphatase staining of pig and sheep epiblast cells in culture. *Mol Reprod Dev* 1993; 36(2): 139-47.
- 37 Hall VJ, Christensen J, Gao Y, Schmidt MH, Hyttel P. Porcine pluripotency cell signaling develops from the inner cell mass to the epiblast during early development. *Dev Dyn* 2009; 238(8): 2014-24.
- 38 Telugu BP, Ezashi T, Sinha S, Alexenko AP, Spate L, Prather RS, *et al.* Leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent, pluripotent stem cells established from inner cell mass of porcine embryos. *J Biol Chem* 2011; 286(33): 28948-53.
- 39 Haraguchi S, Tokunaga T, Furusawa T, Ohkoshi K, Nakai M,



- Ikeda M, *et al.* 299 a feature of self-renewal porcine embryonic stem cell-like cell lines established by inhibitors. *Reprod Fret Develop* 2012; 25(1): 297.
- 40 Wu Z, Chen JJ, Ren JT, Bao L, Liao J, Cui C, *et al.* Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol* 2009; 1(1): 46-54.
- 41 Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem* 2009; 284(26): 17634-40.
- 42 Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(27): 10993-8.
- 43 Yin HQ, Cao HG, Sun XP, Xue YJ, Zhang WQ, Huang WL, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from porcine fibroblasts. *Prog Biochem Biophys* 2010; 37(6): 607-12.
- 44 Montserrat N, de Oñate L, Garreta E, González F, Adamo A, Eguizábal C, *et al.* Generation of feeder-free pig induced pluripotent stem cells without Pou5f1. *Cell Transplant* 2012; 21(5): 815-25.
- 45 Kues WA, Herrmann D, Barg-Kues B, Haridoss S, Nowak-Imialek M, Buchholz T, *et al.* Derivation and characterization of sleeping beauty transposon-mediated porcine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2013; 22(1): 124-35.
- 46 Wang J, Gu Q, Hao J, Jia Y, Xue B, Jin H, *et al.* Tbx3 and Nr5a2 play important roles in pig pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2013; 9(5): 700-8.
- 47 West FD, Terlouw SL, Kwon DJ, Mumaw JL, Dhara SK, Hasneen K, *et al.* Porcine induced pluripotent stem cells produce chimeric offspring. *Stem Cells Dev* 2010; 19(8): 1211-20.
- 48 West FD, Uhl EW, Liu Y, Stowe H, Lu Y, Yu P, *et al.* Brief report: Chimeric pigs produced from induced pluripotent stem cells demonstrate germline transmission and no evidence of tumor formation in young pigs. *Stem Cells* 2011; 29(10): 1640-3.
- 49 Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, *et al.* Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev* 2013; 22(3): 473-82.
- 50 Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385(6619): 810-3.
- 51 Fan N, Chen J, Shang Z, Dou H, Ji G, Zou Q, *et al.* Piglets cloned from induced pluripotent stem cells. *Cell Research* 2012; 23(1): 162-6.
- 52 Zhou L, Wang W, Liu Y, Fernandez de Castro J, Ezashi T, Telugu BP, *et al.* Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina. *Stem Cells* 2011; 29(6): 972-80.
- 53 Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 472-6.
- 54 Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell* 2012; 10(6): 678-84.
- 55 Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009; 136(3): 411-9.
- 56 Beltrao-Braga PC, Pignatari GC, Maiorka PC, Oliveira NA, Lizzier NF, Wenceslau CV, *et al.* Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells. *Cell Transplant* 2011; 20(11/12): 1707-19.
- 57 Cao N, Liao J, Liu Z, Zhu W, Wang J, Liu L, *et al.* *In vitro* differentiation of rat embryonic stem cells into functional cardiomyocytes. *Cell Res* 2011; 21(9): 1316-31.
- 58 Peljto M, Dasen JS, Mazzoni EO, Jessell TM, Wichterle H. Functional diversity of ESC-derived motor neuron subtypes revealed through intraspinal transplantation. *Cell Stem Cell* 2010; 7(3): 355-66.
- 59 Zhou HY, Wu SL, Joo JY, Zhu SY, Han DW, Lin TX, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 381-4.
- 60 Lee J, Sayed N, Hunter A, Au KF, Wong WH, Mocarski ES, *et al.* Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell* 2012; 151(3): 547-58.
- 61 Zhang H, Ma Y, Gu J, Liao B, Li J, Wong J, *et al.* Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors. *Biomaterials* 2012; 33(20): 5047-55.
- 62 Khan M, Narayanan K, Lu H, Choo Y, Du C, Wiradharma N, *et al.* Delivery of reprogramming factors into fibroblasts for generation of non-genetic induced pluripotent stem cells using a cationic bolaamphiphile as a non-viral vector. *Biomaterials* 2013; 34(21): 5336-43.
- 63 Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013; 341(6146): 651-4.
- 64 Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, *et al.* Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* 2013; 502(7469): 65-70.
- 65 Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1276-84.
- 66 Fukuda T, Katayama M, Yoshizawa T, Eitsuka T, Mizukami H, Nakagawa K, *et al.* Efficient establishment of pig embryonic fibroblast cell lines with conditional expression of the simian vacuolating virus 40 large T fragment. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76(7): 1372-7.
- 67 Park KM, Cha SH, Ahn C, Woo HM. Generation of porcine induced pluripotent stem cells and evaluation of their major histocompatibility complex protein expression *in vitro*. *Vet Res Commun* 2013; 37(4): 293-301.
- 68 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313-7.
- 69 Groenen MA, Archibald AL, Uenishi H, Tuggle CK, Takeuchi Y, Rothschild MF, *et al.* Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* 2012; 491(7424): 393-8.