

猪原始生殖细胞生物学特性的研究

马 婧[#] 张 宇[#] 王健宇 薛冰华 伟人悦 李 妍 刘忠华*

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要 胚胎生殖细胞(embryonic germ cell, EGC)是由胎儿原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)经体外驯化培养获得的一种多潜能干细胞。研究猪PGC生物学特性对于建立猪EGC及了解猪生殖细胞发育机制具有重要意义。该研究以原代培养的猪PGC为对象,探讨了其生长行为特征及其重编程过程中多能性、生殖系标志基因的表达模式。结果显示,26 d胚胎生殖嵴分离的PGC呈碱性磷酸酶阳性,细胞体积及核质比较大;体外培养初期呈现出较强的增殖及迁移能力,培养第5 d细胞增殖达到平台期,此时克隆高表达*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*c-Myc*、*Klf4*和*Ifitm3*($P<0.05$),低表达*Blimp1*($P<0.05$),*Nanos1*和*Stella*的表达水平与猪胎儿成纤维细胞无差异;猪PGC形成的原代克隆已经具有多向分化潜能。

关键词 原始生殖细胞; 胚胎生殖细胞; 猪; 重编程

Biological Characteristics of Porcine Primordial Germ Cells

Ma Jing[#], Zhang Yu[#], Wang Jianyu, Xue Binghua, Wei Renyue, Li Yan, Liu Zhonghua*

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Embryonic germ cells (EGCs) are a kind of pluripotent stem cells derived from primordial germ cells (PGCs). Studies on biological characteristics of PGCs are favorable for the establishment of EGCs and understanding the development program of germ cells. In this study, we observed growth behaviors of primary porcine PGCs as well as expression patterns of pluripotency and germline markers during their reprogramming. The result showed that PGCs isolated from genital ridge of porcine embryos age of 26 d were alkaline phosphatase-positive cells, with larger size and nuclear-cytoplasmic ratio; the PGCs exhibited enhanced migration and proliferation abilities at the beginning of *ex vivo* cultivation, and the propagation reached a plateau at day 5, when the clones were with elevated levels of *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4* and *Ifitm3* ($P<0.05$) and depressed level of *Blimp1* ($P<0.05$), compared with porcine embryonic fibroblasts. Besides, the primary clones had the potential to differentiate into different cell types.

Key words primordial germ cell; embryonic germ cell; porcine; reprogramming

干细胞是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞类型,它在转基因动物生产、组织工程治疗、基础理论研究等方面有着广阔的应用前景和重要的研究价值。胚胎来源的干细胞包括两类:来源于囊

胚的内细胞团(inner cell mass, ICM)的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和来源于原始生殖细胞(primordial germ cells, PGC)的胚胎生殖细胞(embryonic germ cell, EGC)。与ICM相比,个体内PGC数量较多,存在时间较

收稿日期: 2014-02-25 接受日期: 2014-04-03

国家自然科学基金(批准号: 31301211)和哈尔滨医科大学心脑缺血省部共建教育部重点实验室开放课题基金(批准号: KF201317)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0451-55101729, E-mail: liu086@126.com

Received: February 25, 2014 Accepted: April 3, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31301211) and Open Project Program of Key Laboratory of Myocardial Ischemia of Harbin Medical University (Grant No.KF201317)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-451-55101729, E-mail: liu086@126.com

网络出版时间: 2014-07-25 09:59 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0053.html>

长, 这为胚胎来源困难的濒危动物和难以分离ICM的物种提供了获得干细胞的新选择。

1992年, Resnick等^[1]和Matsui等^[2]将小鼠PGC体外培养获得了EGC, 并发现该细胞的生长行为和分化潜能与ESC类似, 此后, Stewart等^[3]证实小鼠EGC具有生殖系嵌合能力, 能够产生功能性的配子, 从而引发了诸多实验室在其他物种中建立EG细胞系的尝试。1997年, Shim等^[4]从24~25日龄猪的生殖嵴中分离PGC建立了猪EG细胞系, 并获得了嵌合体猪; 1998年, Piedrahita等^[5]对所得的EGC进行转基因操作, 并用该EGC制备嵌合体, 获得了转基因嵌合体猪。此后, 陆续有国内外的实验室报道了猪EGC的建立, 包括本实验室^[6], 但是所获得的猪EGC都只是在一定程度上符合胚胎干细胞的鉴定标准, 真正具有种系嵌合能力的猪EG细胞系仍未建立起来。究其原因, 是尚无有效的培养体系支持PGC的体外驯化: 包括多能性的建立、分化的抑制、表观遗传的正确修饰等。近年来, 猪PGC培养体系的优化一直是该领域的研究热点, 包括基础培养基与血清及其替代物的选择^[7]、不同来源的饲养层细胞的比较^[8]、猪胚胎日龄对EGC建系效率的影响^[6]以及与多能性相关的信号通路小分子抑制剂的搭配使用等^[9]。然而, 要想从根本上完善培养体系, 依然有赖于我们对PGC多能性维持和分化抑制机制的深入了解。

PGC是EGC的唯一源头细胞。胚胎发育初期, 单能性的PGC向生殖嵴迁移的同时大量增殖, 进入生殖嵴后, PGC经历了表观遗传重编程并最终分化为配子; 在体外适宜的培养条件下, PGC向生殖细胞的特化被阻断, 重编程为能够自我更新且具多向分化潜能的EGC。目前, 对于该过程机制的研究主要集中在小鼠上, 猪上的报道多是关于EGC建系的尝试和PGC特化相关的表观遗传学调控的研究^[7,10-11], 而对于猪PGC本身生物学特性(特别是其重编程过程中多能性)、生殖系标志基因表达模式的研究鲜有报道。然而, 该方面的探索不仅有利于猪EGC的最终建系, 还对猪生殖细胞体内发育机制的阐述具有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验用猪由东北农业大学生命科学中心的生物学研究基地猪场提供。

1.2 实验试剂及仪器

胎牛血清(FBS)、高糖DMEM购自Gibco公司; 链霉素、青霉素购自Cellgro公司; 人源干细胞因子(human stem cell factor, hSCF)及人源碱性成纤维细胞生长因子(human basic fibroblast growth factor, hbFGF)购自R&D公司; 人源白血病抑制因子(human leukemia inhibitory factor, hLIF)购自Millipore公司; 一抗Oct4、Sox2、Nanog和SSEA1购自Santa Cruz Biotechnology公司; Stella购自Abcam公司; Blimp1购自ThermoFisher公司; 碱性磷酸酶染色试剂盒、H&E染色试剂盒购自碧云天生物技术研究so。其他化学试剂为分析纯试剂。

6孔和24孔细胞培养板(Costar); 二氧化碳培养箱(Thermo-FORMA); 倒置显微镜(Olympus cx21); 体式显微镜(Olympus Dfplapoix-4); 石蜡切片机(Leica-RM2235); Real-time PCR仪(ABI 7500)。

1.3 猪PGC的分离及培养

体式镜下分离26 d猪胚胎, PBS清洗5次后用眼科镊小心剥离位于中肾内侧的生殖嵴, PBS清洗后剪成1 mm³以下的组织块, 加入0.25% Trypsin-EDTA于37 °C消化10~15 min, 期间反复吹打3~5次, 加足量DMEM-10% FBS终止消化, 离心后用EG细胞培养液重悬细胞并接种于明胶铺底的培养皿中, 隔天换液。

EG细胞培养液含有20% KOSR、高糖DMEM、2 mmol/L谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、1%双抗、10 μmol/L β-巯基乙醇、5 ng/mL hLIF、10 ng/mL hSCF和10 ng/mL hbFGF。

1.4 猪生殖嵴组织切片的制备

按照1.3所述的步骤获取26 d猪胚胎的生殖嵴, PBS清洗3次, 置于4%多聚甲醛中于4 °C固定过夜。组织块在70%、80%、90%、95%乙醇中各脱水6 h, 无水乙醇中脱水1 h, 重复2次。二甲苯透明20 min, 重复2次。组织块于熔点为56~58 °C的石蜡中浸泡2次后进行包埋。待蜡块完全凝固之后, 用石蜡切片修块并切片, 切片厚度为6 μm。

1.5 碱性磷酸酶染色

弃去培养皿中的培养液, PBS清洗3次, 加入4%多聚甲醛固定1 min, PBS清洗3次; 加入适量BCIP/NBT染色工作液, 确保其充分覆盖样品, 37 °C避光孵育30 min; PBS清洗3次后于显微镜下观察并拍照。

1.6 免疫荧光鉴定

除去细胞培养液, PBS(pH7.2)洗3次后加入4%

多聚甲醛固定30 min; PBS洗3次, 37 °C透膜液透膜1 h; 清洗后, 室温下封闭液孵育1 h, 加相应的一抗Oct4、Sox2、SSEA3、Nanog、Blimp1或Stella, 4 °C孵育过夜; PBS洗3次后避光加入二抗, 37 °C避光孵育1 h; Hoechst33342染核10 min; 清洗3次, 加入防荧光淬灭剂, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.7 基因表达检测

提取细胞的总RNA, 具体过程参照Trizol Reagent说明书。反转录为cDNA后, 按照TaKaRa SYBR PrimeScript™ Kit说明书建立反应体系。GAPDH为内参, 猪胎儿成纤维细胞为对照, 采用Real-time PCR检测猪原始生殖细胞多能性基因Oct4、Sox2、Nanog、c-Myc、Klf4和生殖系标志基因Blimp1、Stella、Ifitm3、Nanos1的表达水平。所用引物由华大基因合成, 引物序列如表1所示。

1.8 分化能力检测

1.8.1 拟胚体的诱导 用玻璃针挑取收集原代克隆, 加入0.25% Trypsin-EDTA于37 °C消化10~15 min, 期间反复吹打3~5次离散单细胞, 加入DMEM-10% FBS终止消化, 离心收集细胞。用不含生长因子的EG细胞培养液将细胞重悬并接种到超低黏附培养皿中, 37 °C培养3~4 d可见拟胚体形成。

1.8.2 细胞的自发分化 细胞在体外培养5 d后, 将细胞培养液更换为不含生长因子的EG细胞培养液, 每2 d更换一次, 10~12 d时在显微镜下进行观察拍照。

1.9 数据统计

采用SPSS软件包(10.0.1)进行数据处理, 显著性分析采用student *t*-test, $P < 0.05$ 认为存在显著差异, $P < 0.01$ 认为存在极显著差异。

2 结果

2.1 猪原始生殖细胞的获得

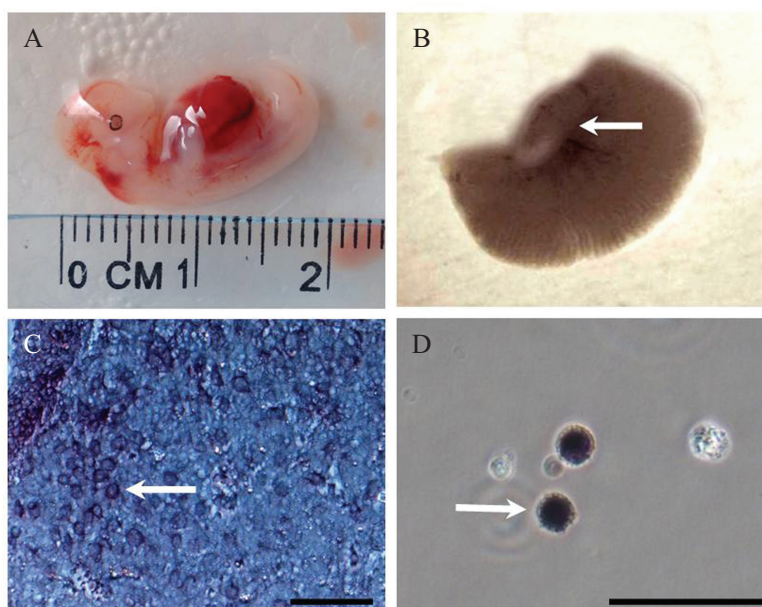
从26 d的猪胚胎(图1A)剥离出中肾-生殖嵴, 可见生殖嵴位于中肾内侧, 隆起呈月牙形(图1B白色箭头所示)。生殖嵴切片经碱性磷酸酶染色, 可以清晰地观察到位于生殖嵴基质中的碱性磷酸酶阳性的PGC(图1C白色箭头所示), 而间质细胞呈碱性磷酸酶阴性。新鲜分离的PGC(图1D白色箭头所示)呈圆形, 体积较间质细胞大, 细胞边缘可见细小的纤毛样结构。

2.2 猪原始生殖细胞的生长行为

将猪PGC置于1.3所述的EG细胞培养液中培养并观察其生长行为变化。体外培养1 d后, 细胞出现聚集样分布(图2A虚线箭头所示), 且大量细胞

表1 引物序列表
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物长度 Product length
Oct4	F: 5'-GAA GGT GTT CAG CCA AAC GAC-3' R: 5'-CGA TAC TTG TCC GCT TTC-3'	185 bp
Sox2	F: 5'-AAC CAG AAG AAC AGC CCA GAC-3' R: 5'-TCC GAC AAA AGT TTC CAC TCG-3'	155 bp
Nanog	F: 5'-CCT CCA TGG ATC TGC TTA TTC-3' R: 5'-CAT CTG CTG GAG GCT GAG GT-3'	210 bp
C-myc	F: 5'-GGA ACT CTT GCC CAT AAA TTG ACC TA-3' R: 5'-AAG GTT GTG AGG TTG CAC TGG ATC-3'	153 bp
Klf4	F: 5'-AGA TGA ACT GAC CAG GCA CTA CCG-3' R: 5'-TGT TGG GAA CTT GAC CAT GAT TGT AG-3'	133 bp
Blimp1	F: 5'-GCT ACA AGA CGC TCC CCT AC-3' R: 5'-GTG GCA AAC CTG GCA TTC-3'	239 bp
Stella	F: 5'-CTG AGT AGG TTG AGC CCA CA-3' R: 5'-CCA AAA GAG GCA AAA CCT GA-3'	281 bp
Ifitm3	F: 5'-CTA CTC CGT GAA GGC GA-3' R: 5'-CGC AAT GAT CAG AAG GAG G-3'	123 bp
Nanos1	F: 5'-GTC TGC TAC TGC CAC CT-3' R: 5'-CAT CTC AAG TTC AAC CAA CAG-3'	124 bp
GAPDH	F: 5'-GCA AAG TGG ACA TTG TCG CCA TCA-3' R: 5'-TCC TGG AAG ATG GTG ATG GCC TTT-3'	213 bp

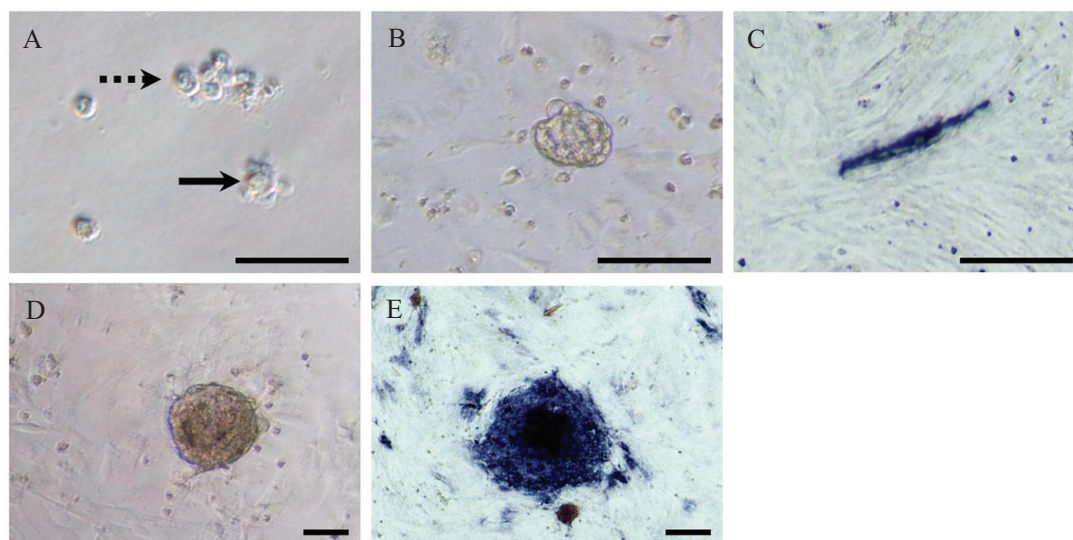


A: 26 d的猪胚胎; B: 26 d猪胚胎的生殖嵴; C: 猪生殖嵴组织学切片的碱性磷酸酶染色; D: 原代分离PGC的碱性磷酸酶染色。标尺=50 μm 。

A: porcine embryo at 26 d age; B: genital ridge porcine embryo at 26 d age; C: alkaline phosphatase staining of histological section of genital ridge; D: alkaline phosphatase staining of freshly isolated PGC. Scale bars=50 μm .

图1 猪胚胎生殖细胞的获得

Fig.1 Acquisition of porcine embryonic germ cells



A: 体外培养1 d的猪PGC; B: 体外培养2 d的猪PGC; C: 体外培养2 d的PGC的碱性磷酸酶染色; D: 体外培养5 d形成的克隆; E: 体外培养5 d形成克隆的碱性磷酸酶染色。标尺=50 μm 。

A: porcine PGC after 1 d of culture; B: porcine PGC after 2 d of culture; C: alkaline phosphatase staining of porcine PGC after 2 d of culture; D: porcine PGC clone after 5 d of culture; E: alkaline phosphatase staining of clone after 5 d of culture. Scale bars=50 μm .

图2 猪原始生殖细胞的形态学观察

Fig.2 Morphological characteristics of porcine primordial germ cells

呈现“发泡”状,如图2A实线箭头所示,提示增殖期PGC的大量存在。培养第2 d,培养皿底部出现若干克隆样的细胞聚集体(图2B),突出于贴壁的间质细胞表面;构成克隆的细胞界限明显,折光率较好;用碱性磷酸酶对培养的PGC进行标记,结果发

现,培养皿底部散在分布大量的单个PGC(图2C),其延伸的伪足提示该类细胞具有良好的迁移能力。第5 d,可以观察到克隆更加致密(图2D),折光率降低;细胞间连接紧密,边界不可见;碱性磷酸酶染色显示(图2E),大多数克隆染色均匀致密、

边界清晰, 但部分克隆中间染色较深、边缘染色较浅, 提示猪PGC形成克隆时或许存在致密化的过程。

此外, 猪PGC原代培养期间, 进行了碱性磷酸酶阳性克隆形成率的检测(图3)。结果显示, 体外培养的前3 d, AP阳性克隆数呈指数增长; 第4 d后增殖减缓; 第5 d达到峰值, 平均1个生殖嵴可以得到26个克隆; 此后克隆数略有下降, 第7 d可见个别克隆边缘开始分化。

2.3 猪胚胎生殖细胞的体外分化

PGC体外培养5 d后, 将培养液更换为不含生长因子的EG细胞培养液继续培养5~7 d, 可以观察到克隆边缘逐渐分化为神经样细胞(图4A)、成纤维样

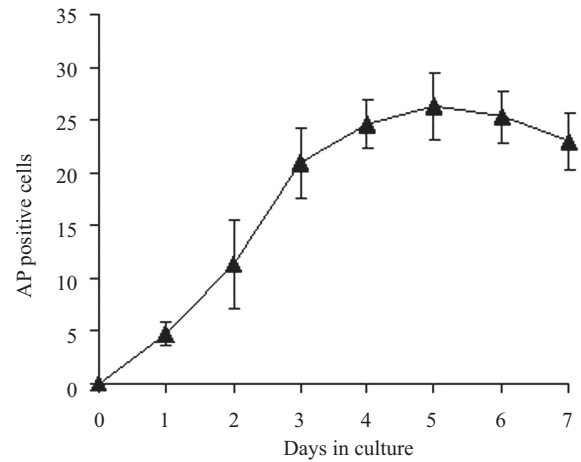
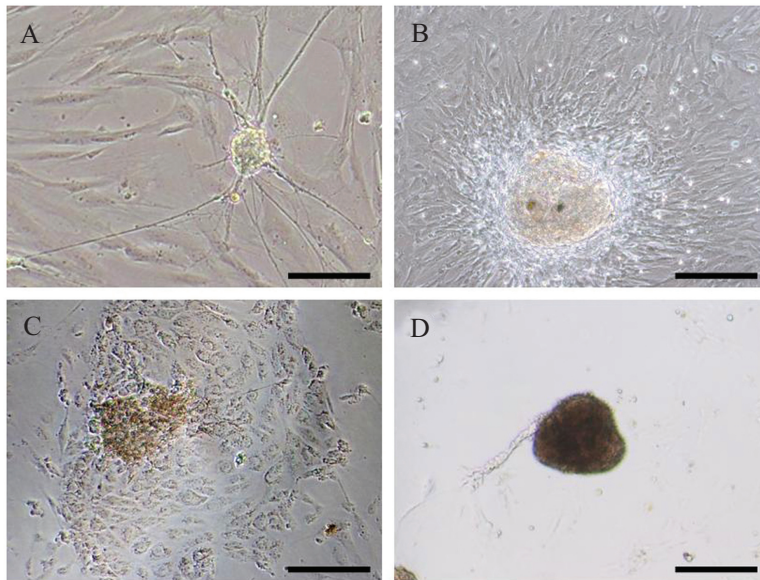


图3 猪胚胎生殖细胞的克隆形成率

Fig.3 The clonig efficiency of porcine embryonic germ cells



A: 神经样细胞; B: 成纤维样细胞; C: 上皮样细胞; D: 拟胚体。标尺=100 μm 。

A: nerve-like cells; B: fibroblast-like cells; C: epithelium-like cells; D: embryoid bodies. Scale bars=100 μm .

图4 猪胚胎生殖细胞的自发分化

Fig.4 Spontaneous differentiation of porcine embryonic germ cells

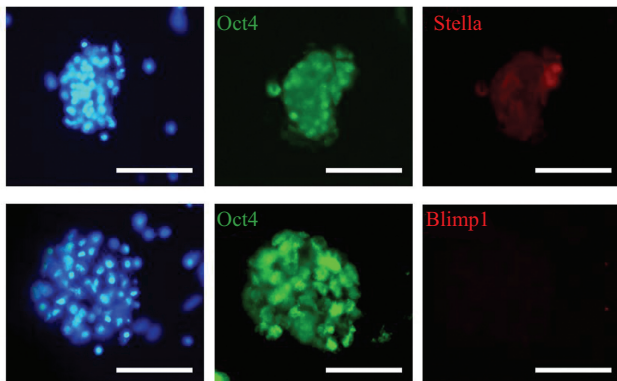
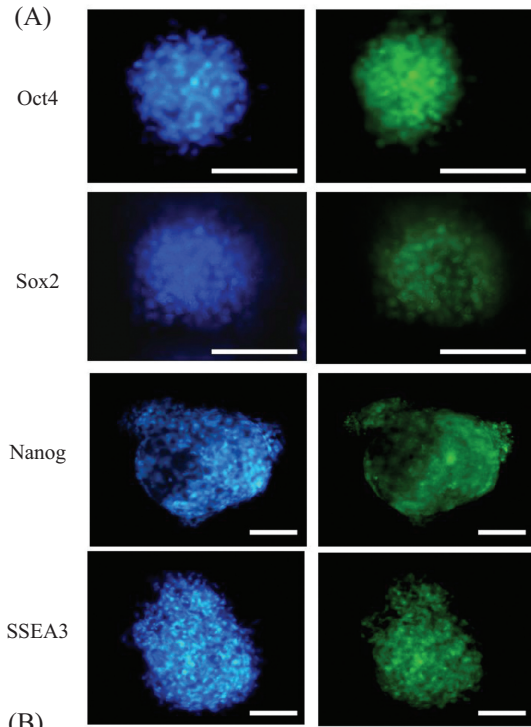
细胞(图4B)、上皮样细胞(图4C)等类型。将第5 d的克隆消化成单细胞, 悬浮培养3 d后可见拟胚体形成, 镜下观察拟胚体呈半透明的圆球状(图4D)。该结果显示, PGC形成的原代EGC样克隆细胞具有良好的体外分化能力。

2.4 猪胚胎生殖细胞的多能性及生殖系基因的表达

本实验首先通过免疫荧光检测了猪EGC样克隆的多能性转录因子Oct4、Sox2、Nanog, 阶段特异性胚胎抗原SSEA3和生殖系相关基因Stella、Blimp1的表达情况。结果显示, Oct4、Sox2、Nanog、

SSEA-3和Stella在克隆中均成阳性表达, Blimp1则不表达(图5); 多能性转录因子集中分布在细胞核内, 而Stella在胞质中呈均匀分布。

随后的荧光定量PCR结果显示, 所检测的多能性转录因子Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4和Nanog在EGC样克隆中的表达水平均显著高于猪胎儿成纤维细胞(图6A)($P < 0.05$); 生殖系相关基因在二者中的表达情况不一致: EGC样克隆的Ifitm3的表达量显著高于猪胎儿成纤维细胞($P < 0.05$), Blimp1表达量显著低于猪胎儿成纤维细胞($P < 0.05$), 而Stella和Nanos1表



A: 多能性基因的免疫荧光检测, 其中左图为Hoechst33342染色的细胞核, 右图为FITC标记的多能性基因; B: 生殖系基因的免疫荧光检测, 其中左图为Hoechst33342染色的细胞核, 中图为FITC标记的Oct4, 右图为TRITC标记的生殖系基因。标尺=50 μm。

A: immunofluorescence staining of pluripotency markers of porcine EGC. Left: nuclei stained by Hoechst33342. Right: pluripotency markers labeled by FITC-labeled antibody; B: immunofluorescence staining of germline markers of porcine EGC. Left: nuclei stained by Hoechst33342. Middle: FITC-labeled Oct4. Right: germline markers labeled by TRITC-labeled antibody. Scale bars=50 μm.

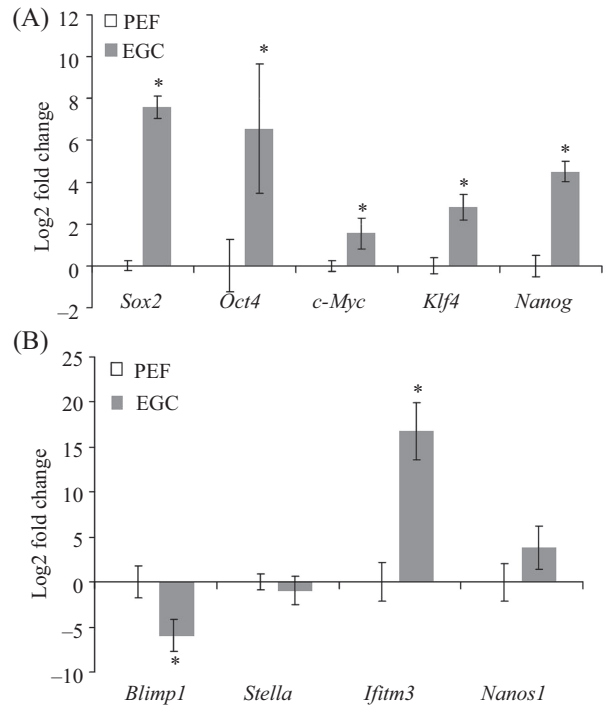
图5 猪胚胎生殖细胞的多能性及生殖系基因的免疫荧光检测

Fig.5 Immunofluorescence staining of pluripotency and germline markers in porcine EGC

达量在二者中差异不显著(图6B)。

3 讨论

猪作为传统家畜, 不仅具有较高的经济价值, 同时由于其解剖结构、生理功能和免疫机制与人类



A: 多能性基因的表达; B: 生殖系基因的表达。PEF: 猪胎儿成纤维细胞; EGC: 猪胚胎生殖细胞。* $P < 0.05$, 与PEF组比较。

A: expression of pluripotency genes in porcine EGC; B: expression of germline genes in porcine EGC. PEF: porcine fetal fibroblasts; EGC: porcine embryonic germ cell. * $P < 0.05$ compared with PEF group.

图6 猪胚胎生殖细胞的多能性及生殖系基因的mRNA水平检测

Fig.6 The mRNA levels of pluripotency and germline genes in porcine embryonic germ cells

非常接近, 也具有很高的研究价值。因此, 猪胚胎干细胞系的建立一直备受关注, 但是迄今仍未获得真正意义的猪胚胎干细胞。究其原因, 是我们对其多能性维持和分化抑制的机制了解地不够深入, 尚未建立有效的培养体系完成胚胎细胞的体外驯化, 包括多能性的维持或建立、分化的抑制、表观遗传的正确修饰等。PGC作为EGC的源头细胞, 对其本身生物学特性及其重编程过程中重要基因表达模式的研究及最终建立猪EG细胞系具有重要意义。

本研究采用无血清培养体系, 发现新鲜分离的猪PGC具有很强的增殖和迁移能力, 培养5 d就可以重编程为具有多向分化潜能的细胞。可见, 无血清培养能够支持猪PGC的重编程。该结果与Petkov等^[7]的结论相一致, 然而Petkov等采用STO细胞作为饲养层培养猪PGC, 本实验采用了无饲养层培养体系, 更好地避免了未知因子的影响, 为后续相关机制的研究提供了成分明确的培养条件。

PGC的重编程伴随着一系列细胞行为上的改

变^[12]。实验发现, 原代培养初期可以看到大量“发泡”或“出芽”状的细胞。之前在两栖类有研究证明, 爪蟾24期胚胎的PGC呈现小的泡状结构, 此后随着泡状结构的不断收缩, 28期胚胎的PGC泡状结构增大, 此时细胞变得狭长、增殖活跃且具有能动性^[13]。细胞的能动性依赖于本身与胞外基质的相互作用, 实验中我们用碱性磷酸酶对PGC进行标记, 结果发现, 大量贴壁的PGC分布于基质细胞中, 其延伸的伪足证明其具有良好的迁移能力。同时, 文章又指出爪蟾PGC的上述特性依赖于F-actin、myosin II和ROCK信号通路的激活^[13]。最近的研究表明, ROCK信号通路在维持细胞的多能性上发挥重要作用^[14]。因此, 我们有理由推测, PGC作为动物体内在功能上最为保守的一类细胞, 其增殖、分化、迁移等生理行为及其调控机制在高、低等动物中或许具有很大的相似性。

干细胞的多能性依赖于多能基因调控网络的建立和维持^[15]。本实验获得的EGC样克隆, 其多能性转录因子Oct4、Sox2、Nanog和阶段特异性胚胎抗原SSEA3均为阳性表达, Real-time PCR结果进一步证实其多能基因的表达水平显著高于猪胎儿成纤维细胞, 可见该细胞具有良好的多能性。动物体内的PGC是单能干细胞, 随着个体发育它们将最终分化为两性配子, 其中生殖系决定基因的时序性表达是PGC特化的决定因素。*Blimp1*也称为*Prdm1*, 在PGC特化过程中发挥重要作用。有关小鼠的研究显示, *Blimp1*突变的胚胎中, PGC数目明显减少, 细胞不能增殖、迁移, 不能抑制Hox家族基因的表达^[16]。*Stella*基因是编码含有类SAP结构域的蛋白, 在PGC、卵母细胞、naïve干细胞中均有表达。*Ifitm3*是编码干扰素诱导跨膜蛋白的基因, 研究显示, 小鼠PGC向生殖嵴迁移的过程中, *Ifitm3*基因的激活能够促使PGC应答周围环境的信号, 从而指导其迁移路径^[17]。*Nanos1*基因在胚胎发生过程中对于PGC的存活具有重要作用, 此外, *Nanos1*对于卵母细胞生成是必需的^[18]。本研究的免疫荧光结果显示, EGC样克隆中检测不到*Blimp1*信号, 并且*Blimp1*的mRNA水平显著低于猪胎儿成纤维细胞。小鼠中的研究发现, 体内PGC特化后或体外EGC形成后, *Blimp1*的表达量显著下降, 与此同时, *c-Myc*、*Klf4*、*Dh38*等*Blimp1*的抑制基因被激活^[19-20], 而*c-Myc*和*Klf4*作为重要的多能性因子, 二者的激活对EGC的维持具有正反馈作用。可见,

猪PGC形成的原代克隆已经进行了深刻的重编程, 之后的自发分化实验也证明了该细胞已具有多向分化潜能。尽管*Ifitm3*属于生殖系相关基因, 但鉴于*Ifitm3*在PGC迁移过程中发挥着转导信号的重要作用, *Ifitm3*基因的高表达提示猪PGC原代克隆的构成细胞或许依然保持着良好的迁移能力, 这点在小鼠和鸡上都已经被证明^[17,21]。

参考文献 (References)

- 1 Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992; 359(6395): 550-1.
- 2 Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; 70(5): 841-7.
- 3 Stewart CL, Gadi I, Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol* 1994; 16(2): 626-8.
- 4 Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen LR, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod* 1997; 57(5): 1089-95.
- 5 Piedrahita JA, Moore K, Oetama B, Lee CK, Scales N, Ramsoondar J, et al. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cells. *Biol Reprod* 1998; 58(5): 1321-9.
- 6 Cong Y, Ma J, Sun R, Wang J, Xue B, Xie B, et al. Derivation of putative porcine embryonic germ cells and analysis of their multi-lineage differentiation potential. *J Genet Genomics* 2013; 40(9): 453-64.
- 7 Petkov SG, Anderson GB. Culture of porcine embryonic germ cells in serum-supplemented and serum-free conditions: the effects of serum and growth factors on primary and long-term culture. *Cloning Stem Cells* 2008; 10(2): 263-76.
- 8 Lee CK, Piedrahita JA. Effects of growth factors and feeder cells on porcine primordial germ cells *In vitro*. *Cloning* 2000; 2(4): 197-205.
- 9 Wen J, Liu J, Song G, Liu L, Tang B, Li Z. Effects of 6-bromoindirubin-3'-oxime on the maintenance of pluripotency of porcine embryonic germ cells in combination with stem cell factor, leukemia inhibitory factor and fibroblast growth factor. *Reproduction* 2010; 139(6): 1039-46.
- 10 Tsung HC, Du ZW, Rui R, Li XL, Bao LP, Wu J, et al. The culture and establishment of embryonic germ (EG) cell lines from Chinese mini swine. *Cell Res* 2003; 13(3): 195-202.
- 11 Petkov SG, Marks H, Klein T, Garcia RS, Gao Y, Stunnenberg H, et al. *In vitro* culture and characterization of putative porcine embryonic germ cells derived from domestic breeds and Yucatan mini pig embryos at Days 20-24 of gestation. *Stem Cell Res* 2011; 6(3): 226-37.
- 12 Donovan PJ, Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13(5): 463-71.
- 13 Terayama K, Kataoka K, Morichika K, Orii H, Watanabe K, Mochii M. Developmental regulation of locomotive activity in *Xenopus* primordial germ cells. *Dev Growth Differ* 2013; 55(2): 217-28.

- 14 Frisca F, Crombie DE, Dottori M, Goldshmit Y, Pébay A. Rho/ROCK pathway is essential to the expansion, differentiation, and morphological rearrangements of human neural stem/progenitor cells induced by lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* 2013; 54(5): 1192-206.
- 15 Nichols J, Smith A. Naïve and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 487-92.
- 16 Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, *et al.* Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005; 436(7048): 207-13.
- 17 Tanaka SS, Yamaguchi YL, Tsoi B, Lickert H, Tam PP. IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Dev Cell* 2005; 9(6): 745-56.
- 18 Draper BW, McCallum CM, Moens CB. Nanos1 is required to maintain oocyte production in adult zebrafish. *Dev Biol* 2007; 305(2): 589-98.
- 19 Ancelin K, Lange UC, Hajkova P, Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T, *et al.* Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol* 2006; 8(6): 623-30.
- 20 Durcova-Hills G, Tang F, Doody G, Tooze R, Surani MA. Re-programming primordial germ cells into pluripotent stem cells. *PLoS One* 2008; 3(10): e3531.
- 21 Choi JW, Kim S, Kim TM, Kim YM, Seo HW, Park TS, *et al.* Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS One* 2010; 5(9): e12968.