

猪胚胎干细胞研究进展

赵颖 孔庆然 刘忠华*

(东北农业大学胚胎工程实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 胚胎干细胞是一类具有在体外无限自我复制和分化为体内任何种类细胞的多潜能细胞。目前, 公认的胚胎干细胞全能性判断标准包括: 体内及体外向三胚层细胞分化和二倍体嵌合后能形成生殖细胞。从 1981 年 Kaufman 等第一次分离小鼠胚胎干细胞至今, 能满足这些标准的只有小鼠、大鼠和鸡的胚胎干细胞系。猪作为一种生理结构和器官的三维结构和人都比较相似的传统药物实验模型, 其胚胎干细胞系的建立一直受到广泛的关注, 但是迄今为止真正的猪胚胎干细胞系(即满足上述判定标准)还未被建立起来。本文将从多个方面阐述猪胚胎干细胞系的研究进展及亟待解决的问题。猪的全基因组序列已经测序完成, 相信随着干细胞研究的深入开展, 对维持多能性的转录因子和细胞信号通路认识的逐步加深, 建立真正的猪胚胎干细胞系将成为可能。

关键词 胚胎干细胞; 猪; 建系

1981 年, Evans 和 Kaufman^[1]第一次分离小鼠胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM), 并通过体外培养获得了稳定的细胞系——小鼠胚胎干细胞系(mouse embryonic stem cell lines, ESCs)。这些细胞可在体外无限增殖, 并同时保持了分化为成体各种类型组织细胞的能力。胚胎干细胞最初主要被用于分化方面的研究。由于其具有种系嵌合能力并与同源重组技术的结合, 胚胎干细胞很快成为了基因操作中强有力的工具。1998 年在获得了人胚胎干细胞以后^[2], 人们逐渐认识到胚胎干细胞在再生医学、组织修复和基因治疗方面的巨大潜力。

尽管目前人和小鼠胚胎干细胞在体外得到了广泛的研究, 然而体内实验却主要局限于对小鼠胚胎干细胞的研究。小鼠和人不仅在体型和生理结构上差别非常大, 而且小鼠和人的胚胎干细胞系在维持多能性方面所依赖的信号通路也不一样。研究表明, 白血病抑制因子(leukemia inhibitor factor, LIF)和骨形态蛋白-4(Bone morphogenetic protein-4, BMP4)是维持小鼠胚胎干细胞多能性的因子^[3], 而人胚胎干细胞多能性的维持则需要碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)与 Activin, 且 BMP4 会促进其分化^[4]。另外, 小鼠作为动物模型, 其生命周期很短, 无法进行长时间的追踪。所以, 将小鼠作为动物模型得到的实验结果直接应用到人, 既不安全也不科学。猪是一种传统的医学实验模型, 和小鼠相比, 猪的生理结构和免疫特性更接近人, 猪器官的三维结构和人的也很相似, 且猪的生命周期较长, 方便

进行长时间的跟踪研究。因此, 建立真正的猪胚胎干细胞系, 研究其分化及在疾病模型中的功能可为今后人胚胎干细胞在细胞治疗和组织修复等临床应用提供有益的参照^[5]。另外, 胚胎干细胞的无限增殖能力和种系嵌合能力, 使其已成为生产转基因动物的重要手段之一, 猪胚胎干细胞的分离也将会给转基因猪的生产提供极大的便利。

1 猪胚胎干细胞建系的研究进展

关于猪胚胎干细胞系建立的文章相对较少, 实验材料的限制是一个主要的原因。表 1 总结了到目前为止关于猪胚胎干细胞建系的主要研究结果^[6-21]。最早关于猪胚胎干细胞建系的研究始于 1990 年, 但是迄今为止所有得到的猪胚胎干细胞系都达不到经典的胚胎干细胞的鉴定标准, 包括: 畸胎瘤的形成(体内分化)、体外向三胚层细胞分化和生殖系嵌合。因此, 这些细胞通常被称为类胚胎干细胞。

最初阶段所有的建系工作主要基于小鼠胚胎干细胞的经验, 而鉴定标准主要是简单的形态观察和类胚体(embryonic body, EB)分化实验。根据形态可把猪类胚胎干细胞分为两类: 一类是胚胎干细胞样的, 即细胞小而圆, 细胞核很大且有一到两个明显的核仁; 另一类是上皮样的, 即扁平立方体形的。上皮样的胚胎干细胞也能在体外维持很长的时间并形成 EB^[6-9]。

收稿日期: 2009-12-07 接受日期: 2010-09-07

国家重点基础研究发展规划(973计划)(No.2009CB941002)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0451-55191729, E-mail: liu086@yahoo.com

Table 1 Summary of main results describing porcine ESC derivation⁵¹

Embryo origin	d.p.i.	ICM isolation method	Culture medium	Feeder layer	Maximum passage	Primary undifferentiated evaluation	Method of evaluation and type of differentiation	Reference
In-vivo	7-9	Whole embryo; isolated ICM	DMEM; FCS; CS; 2ME; PS	STO	>1 year	Morphology	EB formation In 1997, they translated genes to one of the cell line and got transgenic chimera	6 7
In-vivo	8	Immunosurgery	DMEM; FBS; CS; L-GLU; 2ME; PS	STO	>10	Morphology	EB	8
In-vivo	10	Not mentioned	DMEM; FCS; NCS; nucleosides; NEAA; PS; 2ME; insulin	PUE; STO	5	Morphology	Not mentioned	9
In-vivo	7-8	Three-step method	DMEM or DMEM199; FCS; CS; hLIF	STO	>80	Morphologu	Neuron; muscle; epithelial	10
In-vivo	5-6; 10-11	Whole embryo; mechanical	DMEM; FCS; 2ME; hLIF; hSCF; EGF; PDGF; TGF	PEF	11	Morphology	EB; teratoma	11
In-vivo	5.5-7.5	Whole embryo	DMEM; 2ME; NEAA; nucleosides; FCS	STO	44	Morphology	EB; teratoma	12
In-vivo	8-10	Immunosurgery	DMEM; CF; FBS; L-GLU; 2ME; PS	STO	>10	Morphology	No chimera after blastocysts injection	13
In-vivo	7;11	Immunosurgery	DMEM; FCS; 2ME; PS; hLIF	PEF	2	SSEA-1	CK8/18; LN	14
In-vivo	7	Immunosurgery	DMEM or DMEM /F10 FBA; L-GLU; NEAA; 2ME, hLIF	gelatin	4 days	AP	CK8.13; ultra microstructure	15
In-vivo	6-8	Whole embryo or immunosurgery	ES culture medium		>35	AP	Polarized epithelium EB; normal karyotype; chimera	16
In-vitro	7-8	Whole embryo	BLR conditioned medium + FCS; 2ME; NEAA; nucleosides; LIF; bFGF	STO; Feeder-free	>30	Morphology	Used for nuclear transfer with embryo development to blastocyst stage	17
In-vivo	7-9	Trypsin digestion and mechanical	DMEM; FBS; 2ME; NEAA; hbFGF; rh-LIF; PS; nucleosides	MEF, PEF, STO	9	AP	Fibroblast; smooth muscle; epithelial; nuoron	18
In-vitro	2-5	Whole embryo	DMEM; 2ME; PS; NEAA; bFGF; rhLIF; nucleo-sides; FBS	MEF	4	Morphologu; AP	EB	19
In-vivo	6	Immunosurgery	DMEM/F10; mLIF; FCS; KOSR	STO	32	Morphology; Oct4; Nanog; SSEA-4; AP; TRA-1-82; TRA-2-54	Vimentin; cytocheratin; desmin; a-amylase	20
In-vitro	7-9	Immunosurgery	DMEM; or DMEM/F10; or DMEM/ NCSU-23; L-GLU; 2ME; PS; hLIF; NEAA; FBS	MEF; STO; PUE	5	AP		21

由于早期的鉴定标准过于简单,所以很多实验结果缺乏可信度。1993年Talbot等^[10]首次采用分子手段证明碱性磷酸酶(alkaline phosphate, AP)的表达,之后阶段特异胚胎抗原-1(stage specific embryonic antigen-1, SSEA-1)也被作为一个猪胚胎干细胞多能性的标记基因^[10,14]。而在所有得到的细胞系中,只有Hochereau-de等^[11]和Gerfen等^[12]的细胞系注射到裸鼠以后能形成畸胎瘤,而Chen等^[16]得到的细胞系能进行毛色嵌合,但不能形成生殖系嵌合。因此,目前已建成的所谓猪胚胎干细胞系都只能在某一方面符合经典的胚胎干细胞的鉴定标准。

早期的研究主要采用体内囊胚分离猪胚胎干细胞,直到2000年Miyoshi等^[17]才用体外囊胚分离得到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,作为核移植供体细胞,能支持重构胚发育到囊胚阶段。2005年Brevini等^[20]用猪孤雌胚胎也得到了类胚胎干细胞系。从本实验室的经验来看,体外发育的囊胚无论是总细胞数还是内细胞团的细胞数,都远远低于体内囊胚。所以,用体外培养的囊胚来建系,其难度无疑会更大,有着更多的问题有待探索。

2 影响猪胚胎干细胞建系的因素

2.1 胚胎的年龄

小鼠和人的胚胎从囊胚形成到胚胎着床是在很短的时间窗口内完成的,所以我们很容易就发现受精后3.5天和5.5天分别是分离小鼠胚胎干细胞和人类胚胎干细胞的最佳时期。但对于猪而言,囊胚大约形成于4.75天,而胚胎着床发生在第14天,所以至今我们仍不清楚哪一个时期是分离猪胚胎干细胞的最佳时期。

根据Patten《猪胚胎学》^[22]中的描述,猪早期囊胚形成是在受精后约4.75天,之后囊胚持续扩张,在大约6.5天时囊胚从透明带中孵化出来。在第7到第8天之间,内细胞团在局部迅速增生,而且其中的一部分会明显地脱离内细胞团进入胚泡腔内,形成最早的内胚层细胞。内胚层细胞出现后迅速扩增,不久就在原来的胚泡外层内侧形成完整的第二层,其围绕的腔即为原肠腔。内胚层形成的同时,内细胞团上方覆盖的滋养层细胞退化,使内细胞团裸露于表面,构成胚泡外壁的一部分。同时细胞迅速增生并聚集形成一盘状增厚区,能与其附近的滋养层明显区分,形成胚盘。从第8天开始,整个胚泡迅速被拉伸,从球

形囊状变成管状囊。伸长过程与滋养层有关,主要是为胚外膜的形成和后续的着床做准备。胚泡拉伸的同时,胚盘也在发生局部的变化,第9天的时候原条形成。在第10天左右的时候,原条区细胞活动导致中胚层的形成^[22]。

我们可以看出,从发育第6天至第10天,猪胚胎内部发生着巨大的变化,那么哪一天或者哪一个时期的胚胎更有利于胚胎干细胞系的分离呢?Chen等^[16]曾对该问题进行研究。他们把囊胚根据发育阶段分为:早期囊胚、扩张囊胚和孵化囊胚。其中孵化囊胚再分为早期、中期和晚期三组。结果表明早期孵化囊胚最适合建系,建系效率达21%。尽管如此,从表1中我们还是看到从第6天到第11天,都有研究者选择其用于建系,也都得到了类胚胎干细胞。从我们实验室的研究结果来看,一方面将胚胎按天数进行归类划分是不够科学的,因为即使从同一头母体同时获取的胚胎,相互之间发育差异都是很大的。另外,不同实验室对胚胎天数的计算可能还存在差异。我们冲取的10.5天胚胎(人工授精当晚0点为第0天),这时候的胚胎已经拉伸得非常长,整个胚胎像一个絮状的线团,很难区分胚盘的位置以及进行下一步的操作。笔者认为想要弄清最有利于猪胚胎干细胞系建立的最佳胚胎发育时期,还要对猪胚胎早期发育及胚层分化进行系统研究,找到猪胚胎早期发育中适合于分离全能性细胞的时期和位置后才有可能分离培养出真正的猪胚胎干细胞。

2.2 内细胞团的分离

从表一中可以看到,有些研究者选择用全胚进行建系,而有更多的研究者通过免疫外科法分离内细胞团进行建系。尽管两种方法都获得了猪类胚胎干细胞系,但由于滋养层细胞和脏壁内胚层细胞的贴壁和生长不但不会促进内细胞团的增殖,反而有抑制效果,使其退化和分化,所以Talbot等认为内细胞团比全胚更适合用于建系。另外,与小鼠囊胚仅有滋养层和内细胞团组成的结构不一样,猪囊胚的结构是上胚层细胞被原始内胚层细胞紧紧包裹,最外侧才是滋养层细胞,所以Talbot等提出免疫外科法只能除去滋养层细胞,却不能去除原始内胚层细胞。他们设计了一种3步切割法:首先是免疫外科法去除滋养层细胞,然后对得到的上胚层和原始内胚层细胞进行在饲养层上进行短期培养,由于原始内胚层细胞的生长速度较上胚层细胞快,所以能区分出两者,然后用机械法切除生长较快的原始内胚层细胞,进而分离得到上胚

层细胞^[10]。除了免疫外科法以外, Ming 等^[18]报道了用 0.25% 胰酶-0.04% EDTA 直接消化胚胎得到的内细胞团同样可以用于建系,但这个方法还未被其他实验室证明。从我们实验室的经验来看,全胚和分离后的内细胞团都具备贴壁以及形成早期克隆的能力,但滋养层和内胚层细胞的存在是否会影响内细胞团的生长或分化还有待进一步验证。

2.3 培养环境

2.3.1 饲养层 饲养层是胚胎干细胞建系和培养中最为重要的因素之一。它不仅为胚胎干细胞提供附着的环境,并且还分泌很多维持干细胞多能性的重要细胞因子,如: LIF 和 bFGF 等^[23]。小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)被反复证明不仅能够很好的支持小鼠胚胎干细胞的生长^[1],也能很好地支持灵长类胚胎干细胞的体外增殖与全能性的维持。所以在猪胚胎干细胞建系中, MEF 和 STO(永生化小鼠胚胎成纤维细胞系)是两种目前被广泛使用的饲养层细胞^[19,20]。

除此之外,猪胚胎成纤维细胞(porcine fetal fibroblasts, PFF)和猪子宫上皮细胞(porcine uterus epithelial, PUE)也受到了很多实验室的青睐^[9,11]。但这些饲养层细胞中谁最适于猪胚胎干细胞的建系和生长呢? Piedrahita 等曾对 STO、MEF、BRL(buffalo rat liver, buffalo 大鼠肝细胞)、PUE、PH3A(epithelial-like porcine embryo-derived cell line, 猪胚胎来源的上皮细胞样细胞系)、PEF、STO+BRL、以及 STO+BRL 条件培养基进行比较,实验结果表明所有这些饲养层都不能为猪胚胎干细胞的分离提供最优的环境,尽管在 STO 及 STO+BRL 条件培养基的条件下分离得到了类胚胎干细胞系,但这些细胞系和小鼠胚胎干细胞系在集落大小和数量、增殖速度及体内外分化的能力等方面都存在差异^[8]。

另外更重要的是, MEF、PEF 等饲养层在制备中存在巨大的批次差异,即使在同一实验室也不可避免。所以,正如表 1 中看到的,不同的实验室在建系中往往有自己的选择。

2.3.2 培养液 与其他影响因素一样,至今仍没有标准的用于分离和培养猪胚胎干细胞的培养液。大多数实验室用的培养液都类似于小鼠胚胎干细胞培养液,即基础培养液 DMEM、添加 1mmol/L 左旋谷氨酰胺(L-glutamine, L-GLU)、0.1mmol/L β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, 2ME)、1% 非必须氨基酸(non essential amino acid, NEAA), 抗生素及血清^[6-8]。

由于 LIF/STAT3 信号通路对小鼠干细胞维持多能性起着至关重要的作用,所以小鼠胚胎干细胞培养液还有一个必不可少的重要成份——LIF^[24]。但是 Moor 等^[25]的实验结果表明人源的 LIF 并不能阻止猪胚胎干细胞的分化,而且 Vanessa 等^[25]最近的实验结果也表明,体内发育到第 6、第 9 和第 11 天的猪胚胎均不表达 LIF/STAT3 信号通路相关的基因,所以现在一般都认为 LIF 对猪胚胎干细胞分离的作用不大。

另外,由于 bFGF 对维持人胚胎干细胞的多能性起着重要的作用,所以人们自然会联想到 bFGF 是否也对猪胚胎干细胞的建立起重要作用呢?从表 1 可以看到,绝大多数的实验室都在培养基里面添加了 bFGF, Hall 等的研究表明 bFGF 可能与猪早期胚胎中上胚层细胞多能性的维持有关。同时他们发现尽管第 6 天的猪胚胎并不表达 bFGF 及 FGFR(fibroblast growth factor receptor, 成纤维生长因子受体),但第 11 天的猪胚胎的滋养层细胞表达 bFGF,且 FGFR1 特异性地在在上胚层细胞中表达^[25]。

很多实验室还尝试了其他的一些细胞因子和生长因子。现已发现牛胰岛素^[9]、血小板来源的生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)^[11]、BRL 细胞条件培养基对分离和维持猪胚胎干细胞有促进作用^[18]。

血清作为细胞培养液中的一个重要组成成份,其对胚胎干细胞多能性的维持也是很多实验室的研究重点。Strojek 等证明胎牛血清(fetus calf serum, FCS) + 猪血清(porcine serum, PS)的组合对干细胞多能性的维持优于胎牛血清 + 小牛血清(calf serum, CS)及胎牛血清 + 人脐带血清(human cord serum, HCS)的组合^[9]。但 Bryja 等^[26]认为,血清中含有促进胚胎干细胞分化的因子,因此他们认为血清替代物(knock-out serum replacement, KOSR)能更好地维持胚胎干细胞的多能性。实际上, KOSR 问世之后,在小鼠胚胎干细胞和人胚胎干细胞培养中广泛被应用,从本实验室未发表的数据来看, KOSR 在猪胚胎干细胞的分离上确实比 FBS 更好。

2.4 传代方法

传代是建立并维持胚胎干细胞系所必需的环节。研究表明,小鼠胚胎干细胞的传代都用胰酶,但是胰酶却不适合灵长类胚胎干细胞的传代^[27]。目前,基本上所有的研究者都采用胰酶或胰酶-EDTA 消化的方法对猪胚胎干细胞系进行传代。Wianny 等^[4]的实验结果表明原代分离的上胚层细胞中有 47%±7%

的细胞处于S期,用胰酶消化传一代和两代以后,处于S期的细胞比例分别下降到了 $26\% \pm 1\%$ 和 $17\% \pm 5\%$ 。尽管他认为胰酶促进了上胚层细胞的自发分化,但也并未找到一个合适的替代品。鉴于胶原酶和 dispase(一种经四型胶原酶改造而成的酶)在灵长类干细胞传代中的广泛应用,且已建成的类猪胚胎干细胞从形态上看更接近灵长类胚胎干细胞,也许胶原酶或者 dispase 更合适用于猪胚胎干细胞的分离和传代。

当然,传统的机械切割法被认为是对细胞损伤最小的方法,但机械切割法一方面是对操作人员的技术要求比较高,另一方面因为工作量太大而不可能用于常规的传代。笔者认为机械切割法和酶消化法结合起来使用可能是解决这个问题的一种途径。胚胎贴壁后的早期几代,细胞量很少且还未形成稳定的干细胞系,因此可能用机械切割法传代更好,等几代之后,细胞系已稳定建立,再换成合适的酶消化后进行常规传代。

3 猪胚胎干细胞的鉴定

尽管人们在小鼠和人胚胎干细胞的分子鉴定方面积累了大量经验,但是对于猪胚胎干细胞而言,大部分实验室仍把形态及长期传代作为鉴定依据。分子生物学鉴定手段的匮乏原因之一是由于迟迟得不到真正的猪胚胎干细胞造成的,同时它也制约了猪胚胎干细胞建系的进展。

研究证明, Oct4 和 Nanog 是对维持人和小鼠胚胎干细胞多能性最重要的两个因子^[28]。在猪胚胎中, Oct4 的表达模式已经研究得较透彻:从猪卵母细胞到受精后早期卵裂阶段再到囊胚都一直表达 Oct4。与小鼠胚胎不同的是,在猪的囊胚从透明带中孵化出来以前, Oct4 在囊胚的内细胞团和滋养层的所有细胞中都有表达^[29]。

Keefe 等提出,只用一个标记蛋白不能准确的鉴定猪胚胎干细胞,最好的鉴定方法是用一组多能性标记蛋白来定义猪胚胎干细胞^[30]。而之前的研究往往只用很少的几个标记蛋白来对猪胚胎干细胞进行鉴定,例如: Oct4, SSEA1 或者 AP 等。Brevini 等^[31]的结果表明从囊胚分离 ICM 得到的猪类胚胎干细胞系, Oct4 的表达最多可以维持到第七代。之后 Oct4 不再表达,但是细胞系仍然能维持原状进行长达几个月的传代。所以他提出 Oct4 对于猪胚胎干细胞而言有可能不是维持多能性的必需因子。Blomberg 等^[32]将培养一段时间(96 个小时以内)的上胚层细胞中 Oct4、

Nanog 和 Sox2 的表达情况进行了分析发现, Oct4 在培养 24、48、96 小时以后表达均有增加,而 Nanog 和 Sox2 的表达则在培养 48 小时后达到顶峰,随后则开始下降。而 Venassa 等^[33]的实验结果表明他们分离得到的猪类胚胎干细胞系在 P0~P2 间维持未分化状态,且同时表达 Oct4、Nanog 和 Sox2。但到第三代后细胞分化,三个基因的表达也同时消失。因此,在用多能性的标记蛋白鉴定猪胚胎干细胞的时候,一定要慎重,因为未知的不确定的因素太多,从已有的实验结果中我们还无法明确猪胚胎干细胞多能性的鉴定因子究竟是哪些。

4 猪 iPS 研究进展

在 Yamanaka 等于 2006 年首次报道 iPS 之后, iPS 受到了广泛的关注,也取得了巨大的成果。不仅小鼠、人、大鼠三个物种的 iPS 先后被建立^[34, 35],而且目前世界范围内有三个实验室分别先后报道了猪 iPS 的建立。他们得到的猪 iPS 形态比较相似,类似于人胚胎干细胞。从体内外分化角度检测,也都得到了畸胎瘤和包括三个胚层的 EB。而与小鼠 iPS 细胞不同的是,三个实验室的 iPS 都未能得到嵌合体,且多能性标记的表达结果也不一致^[36~38]。Miguel 等和 Wu 等的结果表明猪 iPS 表达人胚胎干细胞多能性表面标记物之一的 SSEA-4,但 Toshihiko 等的结果却表明猪 iPS 不表达 SSEA-4,而表达小鼠胚胎干细胞多能性表面标记物 SSEA-1 这也说明这些 iPS 细胞尽管都类似于人胚胎干细胞,但彼此之间依然存在差异。由于在获得 iPS 的过程中,是否完全重编程对最终获得的 iPS 细胞有巨大的影响,因此,这些表面标记物的差异也有可能是因为这些 iPS 多能性高低不一样所导致的。另外,由于这些 iPS 细胞的培养环境与人类胚胎干细胞基本类似,其体内嵌合能力十分有限,能形成生殖系嵌合的可能性就会更小。由于缺乏猪胚胎干细胞的背景知识,因此,获得真正的能形成生殖系嵌合的猪 iPS 难度依然很大。

尽管现在得到的猪 iPS 都还远不够完善,但是也给了猪胚胎干细胞系的建立提供了很好的参照,随着猪 iPS 研究工作的深入,对全基因组表达信息的分析,找到维持猪胚胎干细胞多能性的重要信号通路,将会给猪胚胎干细胞的建立提供重要的线索。

综上所述,由于人们对猪胚胎早期发育机理的认识不够透彻,只是简单地把人和小鼠胚胎干细胞建立的成功经验转移到猪上,而维持猪干细胞多能性的信

号通路和分子机制与人和小鼠的还可能存在巨大差异,这可能是至今仍未得到真正猪胚胎干细胞系的主要原因。回归到猪胚胎早期发育的基础研究,系统而深入了解猪早期胚胎的发育过程、胚层分化以及在此过程中的分子调控机制,可能会对建立真正的猪胚胎干细胞和具有生殖系嵌合能力的iPS细胞具有积极的促进作用。

参考文献(References)

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells of mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Awiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003; 115(3): 281-92.
- Mark EL, Tenneille EL, Xu RH, Llanas RA, VanDenHeuvel-Kramer K, Thomson JA. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cell* 2006; 24(3): 568-74.
- Brevini VT, Tosetti V, Crestan M, Antonini S, Gandolfi F. Derivation and characterization of pluripotent cell lines from pig embryos of different origin. *Theriogenology* 2007; 67(1): 54-63.
- 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.
- Notarianni E, Laurie S, Moor RM, Evans MJ. Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. *J Reprod Fertil Suppl* 1990; 41: 51-6.
- 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.
- 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.
- Talbot NC, Rexroad CE, Pursel VG, Powell AM, Nel ND. Culturing the epiblast cells of the pig blastocysts. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993; 29(7): 543-54.
- Hochereau-de MT, Perreau C. *In vitro* culture of embryonic disc cells from porcine blastocysts. *Reprod Nutr Dev* 1993; 33(4): 475-83.
- Gerfen RW, Wheeler DA. Isolation of embryonic cell-lines from porcine blastocysts. *Anim Biotechnol* 1995; 6: 1-14.
- Anderson GB, Choi SJ, BonDurant RH. Survival of porcine inner cell masses in culture and after injection into blastocysts. *Theriogenology* 1994; 42(1): 204-12.
- Wianny F, Perreau C, Hochereau MT. Proliferation and differentiation of porcine inner cell mass and epiblast *in vitro*. *Biol Reprod* 1997; 57(4): 756-64.
- Moore K, Pirdrahita JA. The effects of human leukemia inhibitory factor (hLIF) and culture medium on *in vitro* differentiation of culture porcine inner cell mass. *In Vitro Cell Dev Biol* 1997; 33(1): 62-71.
- Chen LR, Shiue YL, Bertolini L, Medrano JF, BonDurant RH, Anderson GB. Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryos. *Theriogenology* 1999; 52(2): 195-212.
- 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.
- Li M, Ma W, Hou Y, Sun XF, Wang WH. Improved isolation and culture embryonic stem cells from Chinese miniature pig. *J Reprod Dev* 2004; 50(2): 237-44.
- Li M, Li YH, Hou Y, Sun XF, Sun Q, Wang WH. Isolation and culture of pluripotent cells from *in vitro* produced porcine embryos. *Zygote* 2004; 12(1): 43-8.
- Brevini T A, Cillo F, Gandolfi F. Establishment and molecular characterization of pig parthenogenetic embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 235.
- Kim HS, Son HY, Kim S, Lee GS, Park CH, Kang SK, *et al.* Isolation and initial culture of porcine inner cell masses derived from *in vitro*-produced blastocysts. *Zygote* 2007; 15(1): 55-63.
- Patten, Bradley M. *Embryology of the pig*, 3rd ed. Philadelphia: The Blakiston Company, 1948, 24-5.
- Eiselleova L, Peterkova I, Slaninova I, Neradil J, Hampl A, Dvorak P. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int J Dev Biol* 2008; 52(4): 353-63.
- Hitoshi N. How is pluripotency determined and maintained. *Dev* 2007; 134(4): 635-46.
- Hall VJ, Christensen J, Gao Y, Schmidt MH, Hyttel P. Porcine pluripotency cell signaling develops from the inner cell mass to the epiblast during the early development. *Dev Dyn* 2009; 238(8): 2014-24.
- Bryja V, Bonilla S, Parish CL, Schwartz CM, Rao MS, Luo YQ, *et al.* An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(4): 844-9.
- Mitalipova M, Palmarini G. Isolation and characterization of human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 2006; 331: 55-76.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, *et al.* The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113(5): 613-42.
- Kirchhof N, Carnwath J W, Lemme E, Anastassiadis K, Scholer H, Niemann H. Expression pattern of Oct4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* 2000; 63(6): 1698-705.
- Keefer CL, Part D, Blomberg L, Talbot NC. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim Reprod Sci* 2007; 98(1-2): 147-

- 68.
- 31 Brevini T A, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F. Expression pattern of Nanog gene in porcine tissue and parthenogenetic embryos. *Reprod Dom Anim* 2005; 40: 384.
- 32 Blomberg LA, Scherier L, Talbot NC. Expression analysis of pluripotency factors in the undifferentiated porcine inner Cell Mass and Epiblast During In Vitro Culture. *Mol Reprod Dev* 2008; 75(3): 450-63.
- 33 Vanessa H. Porcine embryonic stem cells: A possible source for cell replacement therapy. *Stem Cell Rev* 2008; 4(4): 275-82.
- 34 Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 662-76.
- 35 Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141-6.
- 36 Miguel AE, Xu JY, Yang JY, 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.
- 37 Wu Z, Chen J, Ren J, 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.
- 38 Toshihiki E, Bhanu P, Andrei PA, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *PNAS* 2009; 106(27): 10993-8.

Current Progress in Procine Embryonic Stem Cells

Ying Zhao, Qing-Ran Kong, Zhong-Hua Liu*

(Lab of Embryo Biotechnology, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract Embryonic stem cells can be maintained indefinitely *in vitro* and yet maintain the competence to produce all the cells within a fetus. The well-accepted criteria for totipotency of embryonic stem cells include 1) differentiating into three germ layers *in vitro*; 2) teratoma formation ability; 3) germline transmission and/or tetraploid-complementation. Only mouse, rat and chicken embryonic stem cell lines could satisfy all the standards since Kaufman MH and Evans MJ derived the first mouse embryonic stem cell line in 1981. Pigs are widely used as drug experimental models because of the physiological similarity with humans. Although the derivation of porcine embryonic stem cells are highly needed, no convincing embryonic stem cell lines have been produced in this species to date. In this review, we discuss the recent progress in this field, especially oriented on possible reasons and obstacles why establishment of porcine embryonic stem cell lines is still unsuccessful. The identification of appropriate stem cell markers, functional cytokine pathways, and key pluripotency-maintaining factors along with the accomplishment of porcine genomes, provide encouragement for establishment of porcine embryonic stem cell lines in the near future.

Key words embryonic stem cells; pig; derivation cell lines

Received: December 7, 2009 Accepted: September 7, 2010

This work was supported by grant from the National Basic Research Program of China(973 Program)(No.2009CB941002)

*Corresponding author. Tel: 86-451-55191729, E-mail: liu086@yahoo.com