



猪多能干细胞与基因编辑技术创新及应用

邳明雷[†], 高菲[†], 杜旭光, 陈心泽, 张孟乔, 梁楚悦, 韩建永^{*}, 吴森^{*}

中国农业大学生物学院, 北京 100093

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: hanjy@cau.edu.cn; swu@cau.edu.cn

2025-01-09 收稿, 2025-02-11 修回, 2025-04-07 接受, 2025-04-07 网络版发表

国家自然科学基金(32370846, 32402757)、国家重点研发计划(2021YFA0805900, 2022YFD1302200)、博士后创新人才支持计划(BX20220344)、中国博士后科学基金面上项目(2022M720168)、畜禽生物育种全国重点实验室自主研究课题(2024SKLAB 1-2/8/9)和拼多多-中国农业大学研究基金(PC2023B01019)资助

摘要 猪多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)和基因编辑技术在生物医学和生物育种领域具有重要价值, 它们为人类疾病模型构建、再生医学、基因治疗以及动物育种提供了强大的工具. 中国农业大学生物学院在过去40年中在PSCs(包括胚胎干细胞和诱导多能干细胞)多能性调控及建系方面取得了显著进展, 特别是建立了猪稳定的胚胎干细胞和不依赖于外源基因的诱导多能干细胞, 以及在家畜多能干细胞领域广泛适用的3iLAF培养体系. 同时, 学院在基因编辑技术的优化和应用方向也取得了一系列突破. 这些成果不仅推动了我国农业生物技术的发展, 也为动物模型构建和人类疾病研究提供了新思路. 本综述旨在总结这些创新性成果, 分析其科学意义, 并展望未来研究方向.

关键词 猪, 多能干细胞, 基因编辑, 克隆, 胚胎发育

猪是我国重要家畜之一, 也是生物医学研究中的重要模型动物, 因其与人类在胚胎发育、生理机能和解剖结构上的相似性而备受关注. 这种相似性使得猪成为了研究人类疾病、测试新疗法以及开发再生医学策略的理想对象. 在这一领域, 猪PSCs, 包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 扮演着关键角色. 它们不仅具有自我更新和多向分化的潜能, 还能在体外模拟胚胎发育过程, 为疾病模型的构建和细胞治疗提供了独特的平台. 同时, 基因编辑技术, 尤其是CRISPR/Cas9系统的发展, 为精确修改猪基因组提供了强大工具, 极大地推动了疾病模型的创建和基因功能的研究.

本综述旨在介绍猪PSCs和基因编辑技术在生物医学研究中的应用与发展, 特别是在中国农业大学生物

学院建院40周年之际, 回顾和总结该院在这一领域的主要研究成果和科学贡献. 我们将探讨PSCs的特性、建系技术的进步以及基因编辑技术在疾病模型创建中的应用, 强调这些研究对于推动生物医学进步的重要性, 并展望未来的发展方向. 通过这一综述, 我们期望为读者提供一个全面的视角, 了解猪PSCs和基因编辑技术在现代生物医学中的重要作用及其潜力.

1 猪多能干细胞建系及应用

1.1 多能干细胞定义与特性

多能干细胞(PSCs)具有强大的自我更新能力和向各胚层分化的潜能^[1]. 根据干细胞来源的不同, 可将其分为来源于胚胎谱系的胚胎干细胞(ESCs)和通过体细胞重编程技术获得的诱导多能干细胞(iPSCs)^[2,3]. 胚胎

引用格式: 邳明雷, 高菲, 杜旭光, 等. 猪多能干细胞与基因编辑技术创新及应用. 科学通报, 2025, 70: 4338–4349

Zhi M, Gao F, Du X, et al. Innovation and application of porcine pluripotent stem cells and gene editing technology (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 4338–4349, doi: [10.1360/TB-2025-0003](https://doi.org/10.1360/TB-2025-0003)

干细胞根据其多能性状态可分为初始态(naïve)、激发态(primed)以及形成态(formative)或中间态(intermediate)^[3~7](图1)。iPSCs重编程方法主要包括转录因子诱导、病毒载体法、非整合重编程、小分子化合物诱导以及体细胞核移植等^[8]。诱导多能干细胞不牵涉伦理问题, iPSCs的获得不需要胚胎和卵子, 其获得方法简单, 多能性与正常胚胎干细胞相似, 但其安全性和遗传稳定性对其应用前评估至关重要。

除了上面提到的干细胞种类, 在整个胚胎发育过程中, 还有类似2~4细胞期卵裂球多能性水平的全能样干细胞(totipotent stem cells, TPSCs)^[9], 类似桑葚胚时期多能性水平的扩展多能干细胞(expanded or extended pluripotent stem cell, EPSC)^[10,11], 来源于原始生殖细胞的胚胎生殖干细胞(embryonic germ cells, EGCs)^[12,13]和来源于睾丸精原干细胞的生殖干细胞(germ stem cells, GSCs)^[14]等。来源于不同时期的干细胞在不同培养环境下能够相互转变, 这推动了人们对胚胎发育和干细胞多能性调控分子机制的认知, 极大丰富和完善了干细胞和发育生物学领域的研究。

1.2 多能干细胞建系技术的发展

在中国农业大学生物学院建院40年的历程中, 研究团队在PSCs干性调控及建系方面取得了显著进展,

得到了领域内的广泛认可。小鼠及人iPSCs的成功建立为干细胞领域打开了新的大门^[15,16]。而iPSCs的质量控制对其临床应用至关重要。为了解决iPSCs质量控制难题, 中国农业大学生物学院韩建永教授率先验证了转录因子Tbx3可显著提高iPSCs的质量。Tbx3除了与Oct4, Sox2, Nanog和Smad1共享许多共同的下游调控靶点外, 还能调控多能性相关因子和重编程因子^[17]。同时, 还发现核受体Nr5a2可以替代Oct4, 将小鼠体细胞重编程为多能干细胞^[18]。

在猪iPSCs建系方面, 团队利用易被GP2-293细胞包装的VSV-G逆转录病毒, 一步法将四种人重编程因子(*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*和*Myc*)转染猪成纤维细胞获得了猪的iPSCs^[19]。随后, 中国农业大学生物学院研究团队联合国内多家科研单位, 首次成功地从iPSCs中克隆出活体猪^[20], 这是继小鼠之后, 首次在非啮齿类动物中实现从iPSCs通过核移植技术克隆出活体哺乳动物, 为未来利用iPSCs进行基因工程猪的高效生产提供了新的可能性。

在iPSCs多能性维持机制上, 韩建永教授团队也做了重要探索, 包括发现*Rab32*可以通过增强脂质合成来改善iPSCs的诱导过程^[21], Activin A在猪iPSCs中由NA-NOG介导的多能性调控中发挥着重要作用^[22], 猪早期囊胚内胚层中表达的IRF-1可增强iPSCs的多能性, 部

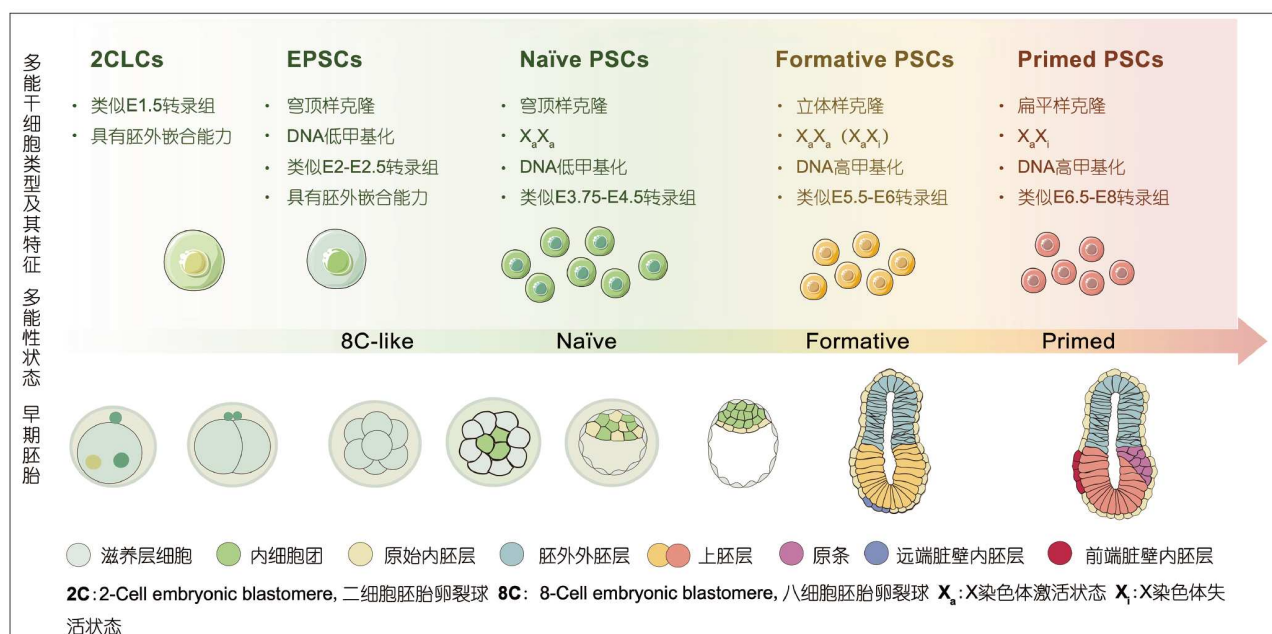


图1 干细胞定义与分类

Figure 1 Stem cell definition and classification

分通过促进JAK-STAT通路^[23]、脂质补充剂通过cAMP/PKA/CREB信号通路促进猪iPSCs的产生^[24]。利用扩展的多能干细胞培养系统也可以产生猪诱导多能干细胞^[25]。团队还比较和分析了两种来自人和小鼠干细胞条件培养基的猪iPSCs的多能性特征、代谢特征和独特的miRNA表达特征^[26,27]。通过优化培养条件,建立了猪iPSCs向原始生殖细胞样细胞(PGCLCs)诱导体系,PGCLCs在体外可进一步分化为精原干细胞样细胞(SSCLCs)^[28]。

猪ESCs不像小鼠ESCs那样稳定,iPSC的多能性维持依赖于外源基因的持续表达,近年来,研究者们利用猪早期囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)或者上胚层(epiblast, EPI),筛选培养体系,在有或无饲养层细胞的基础上做了诸多尝试,使猪胚胎干细胞建系领域取得一定进展,但仍然没有稳定的猪胚胎干细胞被建立起来^[29-31]。其主要原因是对猪胚胎发育机制了解不清楚,没有合适的培养体系维持猪胚胎干细胞本身的多能性调控网络。韩建永教授团队在猪胚胎早期发育机制上做了多年探索^[32,33],在此基础上,郅明雷博士等人绘制了猪完整的第0~14天胚胎单细胞转录组图谱,解析了猪胚胎不同多能性状态所依赖的关调控键信号,研制了能够维持猪胚胎原肠化前上胚层干细胞(pre-gastru-

lation epiblast stem cells, pgEpiSCs)多能性的3iLAF培养体系,在此基础上建立了多株pgEpiSCs,可长期传代并维持干细胞多能性和基因组稳定性,并且验证了pgEpiSCs能够耐受至少3次连续基因编辑,成功获得pgEpiSCs来源的多基因编辑克隆仔猪^[34]。在3iLAF培养体系下,该团队还成功建立了不依赖于外源基因的猪iPSCs^[35],进一步获得了稳定的牛胚胎干细胞系^[36](图2)。3iLAF培养体系的建立和pgEpiSCs的稳定建系为以干细胞为核心的家畜干细胞育种和人类疾病模型构建提供了新的思路。

1.3 多能干细胞应用研究

多能干细胞的安全性和基因组稳定性评估对于其应用至关重要。一方面,要监测干细胞多能性标记表达情况和多向分化潜能,如拟胚体形成能力和体内发育能力,确保其符合多能干细胞标准;另一方面,在长期培养过程中,要定期检测是否存在支原体等微生物污染,并通过高通量测序技术(如全基因组测序和重测序、转录组测序等)检测基因组的完整性,筛查是否存在基因突变、拷贝数变异及关键基因标记表达异常等,结合细胞的表型和功能变化进行综合评估。猪胚胎干细胞具有干细胞多能性和基因组稳定性,是研究胚



图2 家畜多能干细胞研究进展

Figure 2 Research progress on pluripotent stem cells in livestock

胎发育和多能性调控分子机制的理想模型,有助于探索多能性状态间的转化和定向分化,这些细胞也是人工培养肉产品的关键种子细胞.韩建永教授团队通过将pgEpiSCs诱导分化和生物工程获得具有传统肉类特性的细胞培养肉^[37],对畜牧业可持续发展和食品战略安全有重要意义.此外,猪胚胎干细胞在胚胎-干细胞育种模式中扮演核心角色,通过体外生殖细胞诱导和受精,可实现快速遗传改良和濒危物种保护^[38].结合基因编辑技术,韩建永教授团队在猪pgEpiSCs上实现了随机整合、定点敲入和单碱基编辑等不同方法的连续编辑,并获得了成活的多基因编辑克隆仔猪^[34],大大缩短克隆猪筛选时间和成本,为再生医学和多基因

育种带来新的思路(图3).目前,已报道猪多能干细胞在嵌合能力方面依然存在一定的缺陷,值得未来深入研究.

2 基因编辑技术在猪模型中的应用

基因编辑技术的发展为创建疾病模型猪提供了强大的工具,这些模型在揭示人类疾病机制及探索新型疗法中扮演着至关重要的角色.猪因其在体型、解剖结构、生理机能及病理生理反应上与人类的高度相似性,成为了生物医学研究的优选对象.通过精准的基因操作,科学家能够创建出模拟人类疾病的猪模型,显著提升临床前研究中治疗策略的预测精度.在构建疾病

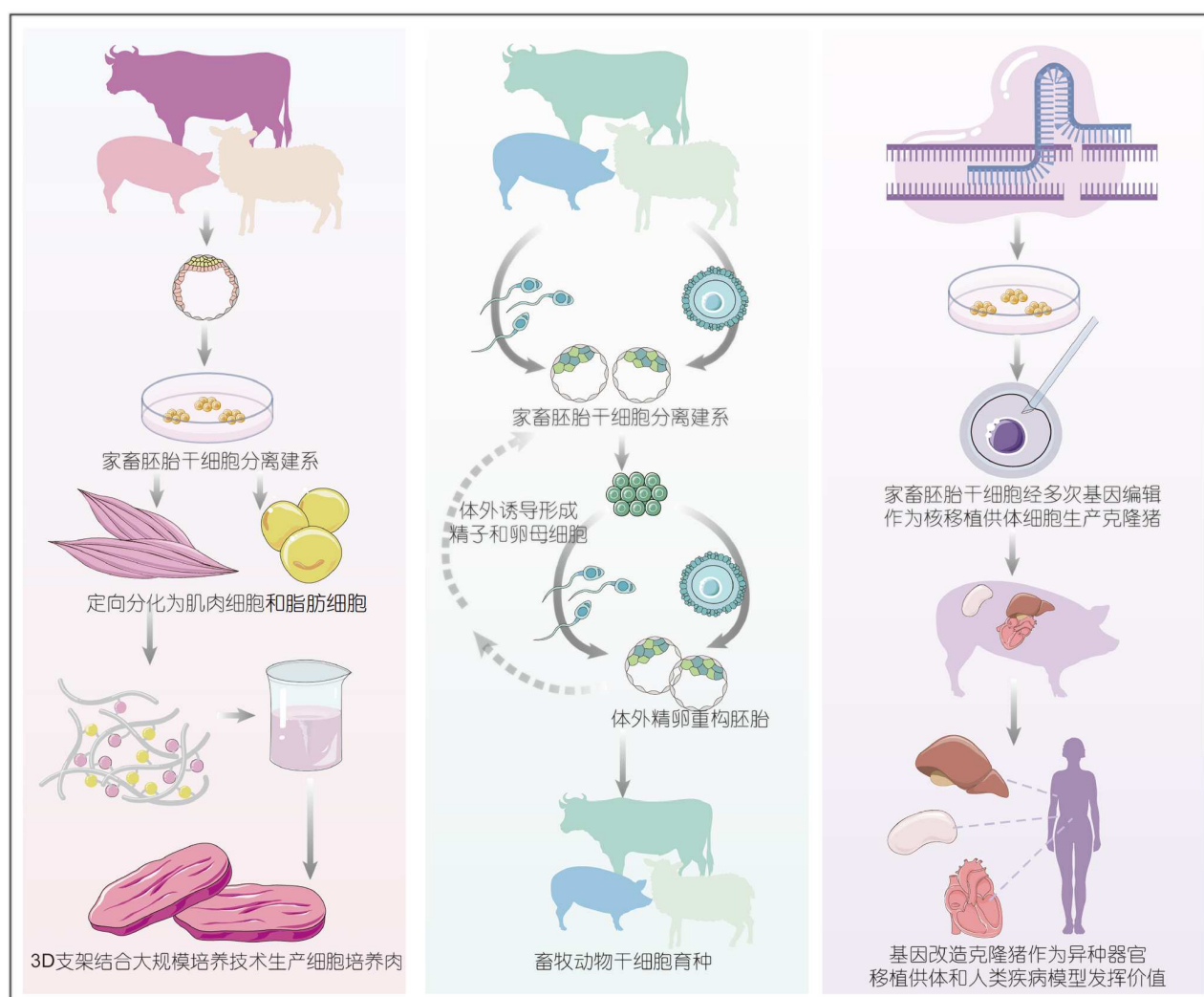


图3 猪多能干细胞应用前景

Figure 3 Application prospects of porcine pluripotent stem cells

模型猪的方法上,存在两种主要途径.其一为直接胚胎基因编辑法,通过收集早期胚胎并显微注入或电脉冲导入编辑工具至合子胞质中,随后将编辑后的合子移植至同步发育的受体动物输卵管内,以孕育出基因编辑猪.尽管该方法操作相对简便,但可能导致遗传嵌合体的产生,即同一生物体内存在多种遗传变异.另一种更为广泛采用的方法是体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT).此技术涉及利用基因编辑工具制备携带特定遗传修饰的体细胞,通常选用猪胎儿成纤维细胞,随后将这些细胞与去核的MII期卵母细胞融合,重启胚胎发育,并最终将重构胚胎移植至受体动物输卵管内,以获得具有预期基因型的克隆仔猪.尽管SCNT技术高效,但操作复杂且技术要求高,通常需要移植大量重构胚胎以成功建立妊娠.

基因编辑技术在猪模型中的应用经历了从传统技术到现代技术的逐步发展.同源重组技术(homologous recombination, HR)作为基因编辑的基石,依赖于细胞的自然修复机制,通过提供与目标基因片段同源的DNA序列,引导细胞修复过程中的同源序列交换.尽管同源重组在理论上能够实现精确的基因编辑,但其效率低下,尤其是在大型动物和人类细胞中,这也限制了其在实际应用中的广泛性.随着锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子效应物核酸酶(transcriptional activator-like effect nucleases, TALENs)的出现,基因编辑技术迎来了革命性的进步.这些序列特异的核酸酶能够识别特定的DNA序列,并在目标位点上造成双链断裂,从而提高基因编辑的精确性和效率^[39,40].中国农业大学生物学院的猪基因编辑团队巧妙地运用ZFNs,针对性地敲除了生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)基因的特定外显子,成功培育出表现出人类Laron综合征类似症状的猪模型^[41].进一步地,通过ZFNs介导的单等位基因敲除*PKD1*基因,有效诱导了肾脏与肝脏囊肿的形成,为常染色体显性多囊肾病(autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD)的研究开辟了新途径^[42].此外,ZFNs技术还被用于敲除*LEPTIN*基因,精准模拟了从脂肪肝发展至非酒精性脂肪性肝炎及肝纤维化的病理过程,成功构建了非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的猪模型^[43].尽管ZFNs和TALENs在基因编辑领域取得了一定的成功,但它们的设计和构建过程复杂且成本高昂.

规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regu-

larly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)系统的出现标志着基因编辑技术的一个新的时代. CRISPR系统源自细菌的适应性免疫机制,通过向导RNA(guide RNA, gRNA)引导Cas9核酸酶精确定位到目标DNA序列并造成双链断裂^[44]. CRISPR/Cas9技术以其高效率、低成本和易于操作的特点,迅速成为基因编辑的主流工具.在抗病育种领域,中国农业大学生物学院的猪基因编辑团队利用CRISPR/Cas9精准靶向猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)感染的关键受体CD163,成功培育出抗蓝耳病的猪模型,为抗病育种工作树立了新的里程碑^[45,46].此外,吴森教授团队利用CRISPR/Cas9系统,成功培育了*ASGR1*基因敲除猪,这些猪模型表现出血脂水平降低且肝脏未受明显损害,为心血管疾病的治疗研究提供了宝贵的新的靶点和潜在药物抑制剂^[47].该团队还将人*ACE2*的编码序列插入猪*ACE2*基因位点,创建了对SARS-CoV-2高度敏感的人源化猪模型,为研究COVID-19的病理机制、传播特性及疫苗、药物研发提供了强有力的实验平台^[48].

进一步的技术改进中,碱基编辑器(base editor, BE)的出现解决了传统基因编辑技术中双链断裂可能带来的基因组不稳定性问题.碱基编辑技术通过结合CRISPR系统和脱氨酶,能够在不产生DNA双链断裂的情况下,直接在DNA或RNA中实现单个碱基的转换.例如,胞嘧啶碱基编辑器(cytidine base editor, CBE)能将C·G碱基对高效、精确地转换为T·A碱基对,而腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)则能将A·T碱基对转换为G·C碱基对^[49].自CBE和ABE两种主要碱基编辑器开发以来,科学家们已经开发了100多种优化的碱基编辑器,提高了编辑效率、精确性、特异性、靶向范围和体内递送能力,从而增强了它们在生物医学中的应用潜力^[50].结合碱基编辑器BE3与体细胞核移植技术,吴森教授团队成功制备了模拟人类遗传疾病的猪模型,如眼睑缺失大口畸形综合征和I型眼皮肤白化病,精确重现了人类疾病表型,极大地促进了疾病机制探索与治疗策略的发展^[51].

先导编辑器(prime editor, PE)结合了CRISPR系统的靶向能力和逆转录酶的DNA合成能力,使用Cas9切口酶(nickase)和含有pegRNA(prime editing guide RNA)的复合体,使得先导编辑器能够在目标位点附近产生一个单链DNA切口,并以pegRNA为模板进行DNA合成,实现了无需双链断裂和供体DNA模板即可

引入所有类型的单碱基变化^[52,53]。近年来,通过不断优化先导编辑器,国内外的研究者们分别在羊、猪和人类细胞中实现了特定基因突变的精确引入^[54~56]。先导编辑技术的优化研究仍在快速发展中,随着技术的不断改进和应用范围的扩大,它有望在未来的基因治疗和生物医学研究中发挥重要作用(图4)。

中国农业大学生物学院在基因编辑技术领域取得显著成就,推动农业生物技术革新。张然团队开发了一种截短的超小型TnpB编辑器,并验证了其在哺乳动物细胞和小鼠体内均具有高效的基因编辑能力,其中在小鼠胚胎的Mstn位点基因编辑效率可达76.8%(15/19)^[57]。吴森教授团队融合CRISPR/Cas9与piggyBac转座子,创新体内CRISPR文库筛选方法,助力小鼠肿瘤研究^[58],同时还构建了猪的全基因组CRISPR敲除文库,为病毒宿主因子筛选提供新方案^[59]。在规模化突变上,开发了不依赖同源重组的HIT-trapping系统,为哺乳动物突变体制备开辟新径^[60]。此外,利用MITI方法和Cas12a酶,实现了外源基因的精准整合,相比于Cas9-HITI策略,其精确度提升了2.7~4.2倍,支撑基因治疗与大动物模型制备^[61]。吴森教授团队还优化了Dvu型I-C CRISPR系统,在哺乳动物细胞中实现了基因组编辑,其编辑效率最高可达60%左右,创制了CD163缺失的克隆

仔猪,同时开发出Dvu-CBE和Dvu-ABE碱基编辑系统,其中Dvu-CBE在多个内源性位点上诱导C到T替换的效率范围为11.5%~57.08%,Dvu-ABE在多个内源性位点上诱导A到G替换的效率范围为10%~61.63%,脱靶检测分析证实了其高特异性,为基因治疗与农业生物技术带来新机遇^[62]。这些成果不仅彰显了基因编辑技术在生物医学研究与抗病育种领域的巨大潜力,也进一步强调了猪模型在模拟人类疾病、推动医学进步中的不可替代作用(表1)。

3 动物克隆与胚胎发育机制

3.1 猪克隆技术改进

自1996年世界上第一头克隆羊Dolly在英国成功诞生以来,哺乳动物克隆技术便迈入了全新的发展阶段。Dolly的问世不仅证明了成年体细胞的细胞核具有重新编程以启动全新生命过程的全能性,也开启了科学家们对其他哺乳动物克隆研究的热情探索。其中,猪因其独特的生物学特性和广泛的应用价值,成为了克隆技术研究的焦点。在克隆猪的研究历程中,早期面临着效率低下和高胎儿损失率等严峻挑战。然而,随着核移植技术的持续优化与创新,克隆猪的成功率取得了显著

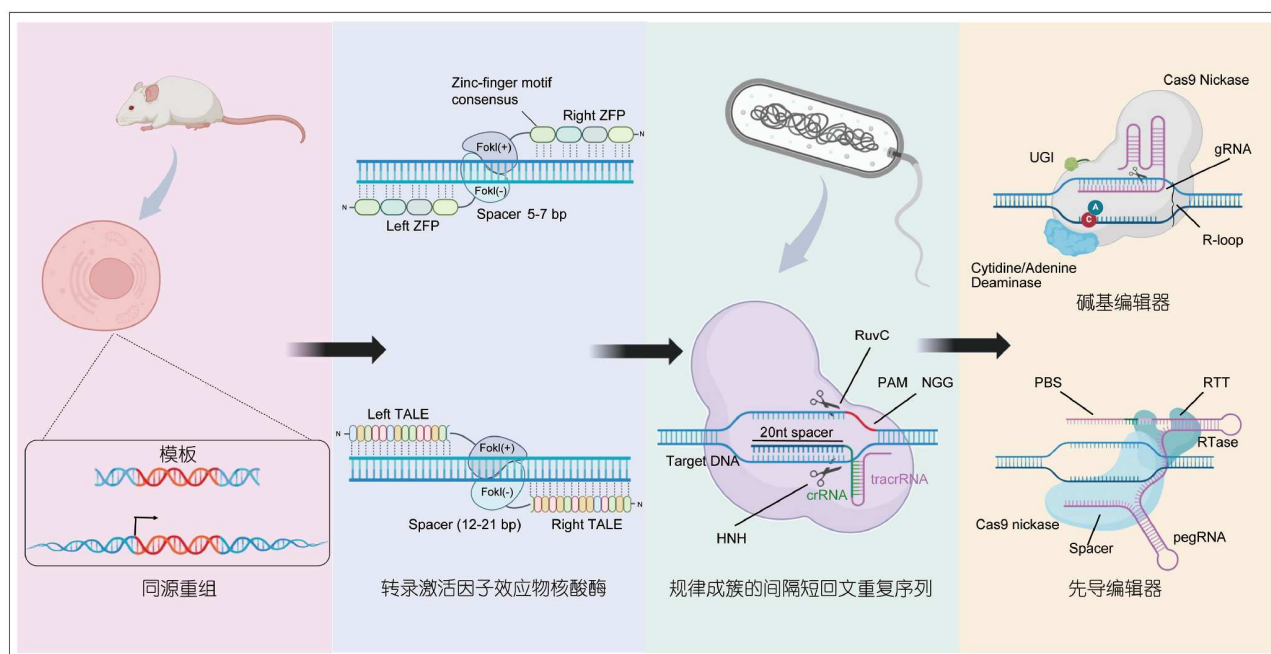


图4 基因编辑技术分类及特点。图示由BioRender.com制作

Figure 4 Classification and characteristics of gene editing techniques (Created by BioRender.com)

表 1 中国农业大学生物学院利用基因编辑技术制备的模型猪

Table 1 Genetically modified pig models developed by the College of Biological Sciences, China Agricultural University

靶向基因	基因编辑方法	模拟疾病/表型	参考文献
<i>GHR</i>	ZFN介导的基因敲除	Laron综合征	[41]
<i>PKD1</i>	ZFN介导的基因敲除	常染色体显性多囊肾病	[42]
<i>LEPTIN</i>	ZFN介导的基因敲除	非酒精性脂肪肝病	[43]
<i>TWIST2</i>	BE3介导的单碱基突变	眼睑缺失大口畸形综合征	[51]
<i>TYR</i>	BE3介导的单碱基突变	I型眼皮肤白化病	[51]
<i>ASGR1</i>	CRISPR介导的基因敲除	心血管疾病风险降低	[47]
<i>ACE2</i>	CRISPR介导的基因敲入	新冠肺炎	[51]
<i>CD163</i>	CRISPR介导的基因敲除	抗蓝耳病	[45,46]

提升。2005年8月5日,中国农业大学生物学院李宁教授团队成功克隆出中国首例克隆猪,这一里程碑式的成就不仅标志着中国在克隆技术领域的重大突破,也为后续猪克隆技术的深入发展奠定了坚实基础。

近年来,猪克隆技术的研究不断向纵深拓展,涉及遗传改良、疾病模型建立以及农业生产等多个领域。其中,*RTL1*基因在克隆猪中的重要作用尤为引人注目。*RTL1*基因的异常沉默被认为是导致克隆猪妊娠失败的主要表观遗传因素。通过深入研究*RTL1*基因在猪诱导多能干细胞iPSC中的表达水平与克隆胚胎发育潜力的关系,研究人员发现,恢复iPSC中*RTL1*的表达能够显著提升克隆胚胎的存活率,有效减少妊娠失败^[63]。这一发现不仅揭示了*RTL1*基因在维持妊娠中的关键作用机制,也为提高克隆技术的成功率提供了全新的策略,为改善克隆过程中的妊娠失败提供了新的分子靶点。此外,曲古抑菌素A(Trichostatin A, TSA)作为一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,已被证实能够激活多能性因子,显著提升再克隆猪胚胎的发育能力。科学家们通过建立报告系统,实时监测克隆和再克隆猪胚胎中多能基因*OCT4*和*SOX2*的表达动态,并发现TSA处理能够显著提高这些基因的表达,从而增强胚胎的发育潜力^[64]。这项研究不仅为改善克隆技术提供了新的分子工具,也为理解表观遗传修饰在克隆过程中的作用提供了新的视角。

这些研究成果不仅为提高克隆胚胎的重编程效率和发育能力提供了新的策略,对于推动克隆技术的优化与创新具有实际应用价值,也为其他哺乳动物的克隆研究提供了宝贵借鉴,进一步拓展了克隆技术在农业和生物医学领域的广阔应用前景。随着对猪克隆技术的深入研究与持续创新,我们有望在未来进一步提

高克隆效率,为农业生产和生物医学研究开辟更多可能性。

3.2 猪胚胎发育机制解析

中国农业大学生物学院在猪胚胎发育研究领域取得显著进展,特别是在理解早期细胞命运决定机制和多能性状态方面。韩建永教授团队发现,母体组蛋白乙酰转移酶KAT8被证实对猪胚胎植入前发育至关重要^[65]。通过对受精卵至囊胚阶段的单个卵裂球进行基因表达分析,团队还揭示了猪胚胎早期细胞命运决定的机制,并为获得猪胚胎干细胞提供了理论支持^[33]。

在单细胞转录组数据集方面,郅明雷博士等选取了E0~E14共109枚体内胚胎,建立了1458个高质量单细胞转录组数据库,这是在猪胚胎发育研究领域所用胚胎数目和细胞数目最多,胚胎时期最连续的单细胞转录组数据集,为后续猪胚胎发育和多能性调控机制研究提供了高质量的数据资源^[34]。单细胞转录组分析明确了猪合子基因组激活(zygotic genome activation, ZGA)事件发生于4细胞期;同时在E6胚胎成腔时,已有EPI、下胚层(hypoblast, HYPO)和滋养外胚层(trophectoderm, TE)三种细胞的区分。值得注意的是,猪的ICM/TE谱系分离并没有呈现*CDX2*和*POU5F1*的异质性表达,这与人类胚胎发育相似。在胚胎E8~E10期,胚胎形态和基因表达模式相对稳定,但胚盘细胞数目迅速增加,这为胚胎干细胞的分离提供了有利条件。

从多能性变化的角度来看,猪胚胎naïve多能性窗口期处于E4~E7阶段,此时胚胎状态极不稳定,相继发生致密化、极化和谱系分离等多个发育事件。EPI在E7阶段完全生成,此时Naïve多能性相关基因表达较低或不表达,这与小鼠和人类胚胎不同。猪E8~E10时期的胚

胎上胚层类似于小鼠E5.5~6.0和人E8~12时期胚胎EPI,此时胚胎未进入原肠化阶段,EPI处于相对稳定的状态,且Formative多能性相关基因的表达水平也比较稳定。

在胚胎发育信号通路的依赖性方面,猪、人和小鼠之间相似性较大。LIF/STAT3信号通路在Naïve多能性阶段起主要作用;Activin/Nodal和FGF/ERK信号通路相关因子在Formative-Primed阶段促进了EPI多能性维持和自我更新;而WNT/ β -catenin信号通路相关基因在Primed阶段占据主导地位,调控胚层分化和形态建成^[34]。这些发现为深入理解猪胚胎发育的分子机制提供了重要信息,并为未来的研究和应用奠定了基础。

4 总结与展望

4.1 创新性与科学意义

猪多能干细胞(PSCs)和基因编辑技术的研究在家畜育种和生物医学领域展现出巨大的创新性和科学意义。PSCs的研究不仅加深了我们对干细胞多能性调控机制的理解,还为再生医学、疾病模型构建和基因治疗提供了新的策略。基因编辑技术,尤其是CRISPR/Cas9系统的应用,使得精确的基因修饰成为可能,极大地推动了生物医学研究的进展。中国农业大学生物学院在过去40年中在这一领域的贡献不容忽视,从*Tbx3*对干细胞质量调控作用的发现到pgEpiSCs培养体系的建立,凝结了“不忘初心”的始终探索。此外,基因编辑技术在家畜育种中的应用,如抗病育种和遗传改良,为农业生产带来了革命性的变化。猪模型的成功创建,为研究人类疾病提供了宝贵的工具,特别是在心血管疾病、糖尿病和神经退行性疾病等领域。这些成就展示了猪PSCs和基因编辑技术在未来生物医学研究和农业生物技术中的巨大潜力。

4.2 挑战与展望

尽管猪PSCs和基因编辑技术的研究取得了显著进展,但仍面临一些挑战和限制。在技术层面上,由于CRISPR/Cas9系统在识别和切割目标基因时,可能会因gRNA的非特异性结合或Cas蛋白的脱靶活性,导致对

非目标基因的错误编辑,产生不可预见的后果。所以如何提高基因编辑的精确性和减少非目标效应仍然是一个关键问题。可供选择的解决方法一是优化gRNA的设计,通过生物信息学工具和深度学习算法,筛选出特异性更高的gRNA序列,减少其与非目标序列的结合。二是开发高保真Cas蛋白变体,如SpCas9-HF1, eSpCas9等,这些变体在降低脱靶效应的同时,仍能保持较高的基因编辑效率。三是采用双重RNA引导系统,增加CRISPR-Cas系统的特异性。此外,RNP(sgRNA+Cas9)方法通过直接将组装好的sgRNA和Cas9蛋白输送到目标细胞中,减少了Cas9在细胞内的存在时间,从而降低了脱靶效应的发生。

在干细胞层面,长期培养中的PSCs其多能性的维持和基因组稳定性受到多种因素的影响。如细胞内的氧化应激,DNA复制错误等导致的基因组突变,以及温度和pH等物理因素和培养基营养成分的供应等化学因素也会对其多能性和基因组稳定性产生影响。针对这一问题,一是要深入研究PSCs的多能性维持机制,筛选更加适合PSCs多能性维持的细胞因子和小分子抑制剂,优化培养条件;二是精确控制培养环境中的温度、pH、氧气浓度等参数,减少外界因素对PSCs基因组的损伤,或添加抗氧化剂等保护性物质,降低细胞内的氧化应激水平。

未来研究的潜在方向除了提高基因编辑技术的精确性和效率,开发新的基因编辑工具,以及深入研究PSCs的多能性调控机制,优化培养条件以保持其多能性和基因组稳定性之外,还需要进一步拓展基因编辑技术在猪等农业动物中的应用。如通过干细胞与基因编辑技术相结合,培育具有优良性状的猪品种,提高猪肉的品质和生产效率。同时,加强干细胞和基因编辑技术在动物疾病模型构建中的研究,为人类疾病的治疗提供更可靠的模型。此外,还应关注基因编辑技术在农业生物技术应用中的伦理和法律问题,建立完善的监管体系,确保其安全和可持续发展。预期目标是通过干细胞与基因编辑技术的结合,实现更高效、更安全的基因编辑,以及开发新的疾病模型和治疗方法,最终为人类健康和农业生产带来实质性的改善。

参考文献

- 1 Rossant J. Stem cells and early lineage development. *Cell*, 2008, 132: 527–531
- 2 Shi Y, Inoue H, Wu J C, et al. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 115–130

- 3 Weinberger L, Ayyash M, Novershtern N, et al. Dynamic stem cell states: naïve to primed pluripotency in rodents and humans. [Nat Rev Mol Cell Biol](#), 2016, 17: 155–169
- 4 Smith A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. [Development](#), 2017, 144: 365–373
- 5 Wu J, Ocampo A, Belmonte J C I. Cellular metabolism and induced pluripotency. [Cell](#), 2016, 166: 1371–1385
- 6 Nichols J, Smith A. Naïve and primed pluripotent states. [Cell Stem Cell](#), 2009, 4: 487–492
- 7 Hackett J A, Surani M A. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. [Cell Stem Cell](#), 2014, 15: 416–430
- 8 Wang J, Sun S, Deng H. Chemical reprogramming for cell fate manipulation: methods, applications, and perspectives. [Cell Stem Cell](#), 2023, 30: 1130–1147
- 9 Shen H, Yang M, Li S, et al. Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression. [Cell](#), 2021, 184: 2843–2859.e20
- 10 Yang J, Ryan D J, Wang W, et al. Establishment of mouse expanded potential stem cells. [Nature](#), 2017, 550: 393–397
- 11 Yang Y, Liu B, Xu J, et al. Derivation of pluripotent stem cells with *in vivo* embryonic and extraembryonic potency. [Cell](#), 2017, 169: 243–257.e25
- 12 Matsui Y, Zsebo K, Hogan B L M. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. [Cell](#), 1992, 70: 841–847
- 13 Leitch H G, Blair K, Mansfield W, et al. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. [Development](#), 2010, 137: 2279–2287
- 14 Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. [Cell](#), 2004, 119: 1001–1012
- 15 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. [Cell](#), 2006, 126: 663–676
- 16 Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. [Science](#), 2007, 318: 1917–1920
- 17 Han J, Yuan P, Yang H, et al. Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. [Nature](#), 2010, 463: 1096–1100
- 18 Heng J C D, Feng B, Han J, et al. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. [Cell Stem Cell](#), 2010, 6: 167–174
- 19 Ruan W M, Han J Y, Li P, et al. A novel strategy to derive iPS cells from porcine fibroblasts. [Sci China Life Sci](#), 2011, 54: 553–559
- 20 Fan N, Chen J, Shang Z, et al. Piglets cloned from induced pluripotent stem cells. [Cell Res](#), 2013, 23: 162–166
- 21 Pei Y, Yue L, Zhang W, et al. Improvement in mouse iPSC induction by Rab32 reveals the importance of lipid metabolism during reprogramming. [Sci Rep](#), 2015, 5: 16539
- 22 Xu J, Zheng Z, Du X, et al. A cytokine screen using CRISPR-Cas9 knock-in reporter pig iPS cells reveals that Activin A regulates NANOG. [Stem Cell Res Ther](#), 2020, 11: 67
- 23 Shi B B, Gao D F, Zhong L, et al. IRF-1 expressed in the inner cell mass of the porcine early blastocyst enhances the pluripotency of induced pluripotent stem cells. [Stem Cell Res Ther](#), 2020, 11: 505
- 24 Zhang W, Wang H, Zhang S, et al. Lipid supplement in the cultural condition facilitates the porcine iPSC derivation through cAMP/PKA/CREB signal pathway. [Int J Mol Sci](#), 2018, 19: 509
- 25 Xu J, Yu L, Guo J, et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells using an extended pluripotent stem cell culture system. [Stem Cell Res Ther](#), 2019, 10: 193
- 26 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. [PLoS One](#), 2015, 10: e0124562
- 27 Zhang W, Zhong L, Wang J, et al. Distinct microRNA expression signatures of porcine induced pluripotent stem cells under mouse and human ESC culture conditions. [PLoS One](#), 2016, 11: e0158655
- 28 Wang H, Xiang J, Zhang W, et al. Induction of germ cell-like cells from porcine induced pluripotent stem cells. [Sci Rep](#), 2016, 6: 27256
- 29 Gao X, Nowak-Imialek M, Chen X, et al. Establishment of porcine and human expanded potential stem cells. [Nat Cell Biol](#), 2019, 21: 687–699
- 30 Yuan Y, Park J, Tian Y, et al. A six-inhibitor culture medium for improving naïve-type pluripotency of porcine pluripotent stem cells. [Cell Death Discov](#), 2019, 5: 104
- 31 Kinoshita M, Kobayashi T, Planells B, et al. Pluripotent stem cells related to embryonic disc exhibit common self-renewal requirements in diverse livestock species. [Development](#), 2021, 148: dev.199901
- 32 Cao S, Han J, Wu J, et al. Specific gene-regulation networks during the pre-implantation development of the pig embryo as revealed by deep

- sequencing. *BMC Genomics*, 2014, 15: 4
- 33 Wei Q, Li R, Zhong L, et al. Lineage specification revealed by single-cell gene expression analysis in porcine preimplantation embryos†. *Biol Reprod*, 2018, 99: 283–292
 - 34 Zhi M, Zhang J, Tang Q, et al. Generation and characterization of stable pig pregastrulation epiblast stem cell lines. *Cell Res*, 2022, 32: 383–400
 - 35 Zhu Q, Wang F, Gao D, et al. Generation of stable integration-free pig induced pluripotent stem cells under chemically defined culture condition. *Cell Prolif*, 2023, 56: e13487
 - 36 Zhi M, Gao D, Yao Y, et al. Elucidation of the pluripotent potential of bovine embryonic lineages facilitates the establishment of formative stem cell lines. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81: 427
 - 37 Zhu G, Gao D, Li L, et al. Generation of three-dimensional meat-like tissue from stable pig epiblast stem cells. *Nat Commun*, 2023, 14: 8163
 - 38 Hou Z, An L, Han J, et al. Revolutionize livestock breeding in the future: an animal embryo-stem cell breeding system in a dish. *J Anim Sci Biotechnol*, 2018, 9: 90
 - 39 Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1156–1160
 - 40 Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326: 1509–1512
 - 41 Cui D, Li F, Li Q, et al. Generation of a miniature pig disease model for human Laron syndrome. *Sci Rep*, 2015, 5: 15603
 - 42 He J, Li Q, Fang S, et al. *PKD1* mono-allelic knockout is sufficient to trigger renal cystogenesis in a mini-pig model. *Int J Biol Sci*, 2015, 11: 361–369
 - 43 Tan T, Song Z, Li W, et al. Modelling porcine NAFLD by deletion of leptin and defining the role of AMPK in hepatic fibrosis. *Cell Biosci*, 2023, 13: 169
 - 44 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
 - 45 Wang H, Shen L, Chen J, et al. Deletion of *CD163* Exon 7 confers resistance to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory viruses on pigs. *Int J Biol Sci*, 2019, 15: 1993–2005
 - 46 Chen J, Wang H, Bai J, et al. Generation of pigs resistant to highly pathogenic-porcine reproductive and respiratory syndrome virus through gene editing of *CD163*. *Int J Biol Sci*, 2019, 15: 481–492
 - 47 Yin Y J, Liu J, Yu J, et al. ASGR1 is a promising target for lipid reduction in pigs with PON2 as its inhibitor. *Iscience*, 2024, 27: 110288
 - 48 Du X, Guo Z, Fan W, et al. Establishment of a humanized swine model for COVID-19. *Cell Discov*, 2021, 7: 70
 - 49 Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420–424
 - 50 Liang Y, Chen F, Wang K, et al. Base editors: development and applications in biomedicine. *Front Med*, 2023, 17: 359–387
 - 51 Li Z, Duan X, An X, et al. Efficient RNA-guided base editing for disease modeling in pigs. *Cell Discov*, 2018, 4: 64
 - 52 Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149–157
 - 53 Fu Y, He X, Gao X D, et al. Prime editing: current advances and therapeutic opportunities in human diseases. *Sci Bull*, 2023, 68: 3278–3291
 - 54 Zhou S, Lenk L J, Gao Y, et al. Generation of sheep with defined *FecBB* and *TBXT* mutations and porcine blastocysts with *KCNJ5G151R/+* mutation using prime editing. *BMC Genomics*, 2023, 24: 313
 - 55 Wimmer T, Sawinski H, Urban A M, et al. Rapid and reliable quantification of prime editing targeting within the porcine *ABCA4* gene using a BRET-based sensor. *Nucleic Acid Ther*, 2023, 33: 226–232
 - 56 Qi Y, Zhang Y, Tian S, et al. An optimized prime editing system for efficient modification of the pig genome. *Sci China Life Sci*, 2023, 66: 2851–2861
 - 57 Wang M, Sun Z, Liu Y, et al. Hypercompact TnpB and truncated TnpB systems enable efficient genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Cell Discov*, 2024, 10: 31
 - 58 Xu C, Qi X, Du X, et al. *piggyBac* mediates efficient *in vivo* CRISPR library screening for tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 722–727

- 59 Peng G C, Liu T R, Qi X L, et al. A genome-wide CRISPR screening uncovers that TOB1 acts as a key host factor for FMDV infection via both IFN and EGFR mediated pathways. *PLoS Pathogens*, 2024, 20: e1012104
- 60 Lu H, Liu J, Feng T, et al. A HIT-trapping strategy for rapid generation of reversible and conditional alleles using a universal donor. *Genome Res*, 2021, 31: 900–909
- 61 Li P, Zhang L, Li Z, et al. Cas12a mediates efficient and precise endogenous gene tagging via MITI: microhomology-dependent targeted integrations. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77: 3875–3884
- 62 Li P, Dong D, Gao F, et al. Versatile and efficient mammalian genome editing with Type I-C CRISPR system of *Desulfovibrio vulgaris*. *Sci China Life Sci*, 2024, 67: 2471–2487
- 63 Yu D, Wang J, Zou H, et al. Silencing of retrotransposon-derived imprinted gene RTL1 is the main cause for postimplantational failures in mammalian cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E11071–E11080
- 64 Feng T, Qi X, Zou H, et al. TSA activates pluripotency factors in porcine recombined embryos. *Genes*, 2022, 13: 649
- 65 Cao Z, Wu R, Gao D, et al. Maternal histone acetyltransferase KAT8 is required for porcine preimplantation embryo development. *Oncotarget*, 2017, 8: 90250–90261

Summary for “猪多能干细胞与基因编辑技术创新及应用”

Innovation and application of porcine pluripotent stem cells and gene editing technology

Minglei Zhi[†], Fei Gao[†], Xuguang Du, Xinze Chen, Mengqiao Zhang, Chuyue Liang, Jianyong Han^{*} & Sen Wu^{*}

College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100093, China

[†] Equally contributed to this work

^{*} Corresponding authors, E-mail: hanjy@cau.edu.cn; swu@cau.edu.cn

Porcine pluripotent stem cells (PSCs) and gene editing are pivotal in biomedicine and biobreeding, offering tools for disease modeling, regenerative medicine, gene therapy, and animal breeding. Over the past 40 years, the College of Biological Sciences at China Agricultural University has made significant advancements in the regulation of pluripotency and the establishment of PSCs. Notably, we have successfully developed stable porcine embryonic stem cell lines and induced pluripotent stem cell lines (iPSCs). Additionally, important breakthroughs have been achieved in gene editing and the preparation of gene-modified pig models. These achievements not only propel the development of agricultural biotechnology but also provide novel insights for human disease research and treatment.

Our research has not only confirmed the role of the transcription factor Tbx3 in enhancing reprogramming efficiency but also revealed that the nuclear receptor Nr5a2 can effectively substitute for Oct4 in the reprogramming of somatic cells in mice. We have successfully derived porcine iPSCs by retrovirally transducing porcine fibroblasts with four human reprogramming factors, leading to the birth of cloned pigs. We have identified factors such as Rab32, Activin A, and IRF-1 as crucial for regulating iPSCs pluripotency and established an induction system for directing porcine iPSCs toward primitive germ-like cells. Additionally, we have developed exogenous gene-independent porcine iPSCs and a stable culture system for porcine pregastrulation epiblast-like stem cells (pgEpiSCs), providing novel insights into livestock stem cell breeding. Porcine embryonic stem cells are ideal models for studying pluripotency regulation and are key seed cells for cultured meat production. We can obtain cell-cultured meat with traditional meat characteristics, which is significant for sustainable livestock development and food security. Moreover, porcine embryonic stem cells play a central role in embryo-stem cell breeding strategies, enabling rapid genetic improvement and endangered species conservation through *in vitro* germline induction and fertilization, providing new avenues for biodiversity protection.

In the field of gene-editing technology, we have developed various efficient gene-editing tools, such as truncated ultra-small TnpB editors and *in vivo* CRISPR library screening methods combining CRISPR/Cas9 with *piggyBac* transposons, offering new solutions for mammalian gene editing. We have also developed a HIT-trapping system independent of homologous recombination for large-scale mutagenesis. Furthermore, we have successfully innovated the Cas12a-MITI method for precise gene integration. In base editing, we have optimized the Dvu-type I-C CRISPR system, leading to the development of Dvu-CBE and Dvu-ABE base editing systems, presenting new opportunities for gene therapy and agricultural biotechnology. Significant breakthroughs have been made in creating gene-modified pig models that mimic human diseases, such as Laron syndrome, autosomal dominant polycystic kidney disease, and non-alcoholic fatty liver disease. These models provide valuable tools for studying human disease mechanisms and advancing medical progress. We have also developed pig models resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome, marking a milestone in disease-resistant breeding.

Despite significant progress in porcine PSC and gene editing research, challenges and limitations remain. Future research directions include developing new gene editing tools, improving the precision and efficiency of gene editing, and exploring the application of gene editing in agricultural biotechnology. In-depth studies on pluripotency regulation mechanisms and optimizing culture conditions to maintain pluripotency and genomic stability are essential. The expected goal is to achieve more efficient and safer gene editing tools, develop new disease models and therapies, and ultimately bring substantial improvements to human health and agricultural production.

pigs, pluripotent stem cells, gene editing, cloning, embryonic development

doi: [10.1360/TB-2025-0003](https://doi.org/10.1360/TB-2025-0003)