

李鑫璐, 李浩杰, 谭磊, 等. 家禽胚胎干细胞研究进展及其应用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (5): 140-146.

LI X L, LI H J, TAN L, et al. Recent advances in avian embryonic stem cell research and applications [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (5): 140-146.

家禽胚胎干细胞研究进展及其应用

李鑫璐, 李浩杰, 谭磊, 张勇, 王坤, 葛长荣*

(云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 家禽胚胎干细胞 (ESCs) 作为具有高度多能性的细胞, 在家禽遗传育种和生物医学研究中展现出重要价值。本文综述了家禽 ESCs 的概念、特点、维持和分化机制, 以及它们在疫苗生产、生物反应器、遗传育种和人类医学研究中的应用。随着分子生物学技术的不断进步, 家禽 ESCs 的研究进一步揭示了胚胎干细胞的分化机制, 也为未来的生物技术应用提供了新的方向。

关键词: 胚胎干细胞; 分化; 信号通路

中图分类号: S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)05-0140-07

Recent advances in avian embryonic stem cell research and applications

LI Xinlu, LI Haojie, TAN Lei, ZHANG Yong, WANG Kun, GE Changrong*

(College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Avian embryonic stem cells (ESCs), characterized by their high pluripotency, play a significant role in poultry genetic breeding and biomedical research. This review summarized the fundamental concepts, key characteristics, maintenance mechanisms, and differentiation pathways of avian ESCs. Furthermore, this paper explored the potential applications of ESCs in vaccine production, bioreactor technology, genetic breeding, and human medical research. With the continuous advancement of molecular biology techniques, the study of avian ESCs had further revealed the differentiation mechanisms of embryonic stem cells, and provided a new direction for future biotechnology applications.

Keywords: embryonic stem cells; differentiation; signaling pathways

干细胞是存在于动物生命周期各阶段中, 具备不同层次自我复制与分化能力的细胞群体的统称。依据它们分化为不同细胞类型的能力, 干细胞可被划分为五个主要类别: 全能干细胞、多能干细胞、多潜能干细胞、寡能干细胞和专能干细胞^[1]。在动物的生长发育过程中, 这些起源各异的干细胞的分化能力展现出递减的趋势。全能干细胞具有分化为完整生物体及其胎盘等胚外组织的能力, 展现出最高的分化潜力; 多能干细胞具有较强的分化潜能, 能够在无限增殖中保持稳定, 并在一定诱导条件下分化为各种细胞^[2]; 而寡能或专能干细胞只能分化为生理功能相近的几种(寡能)或一种(专能)细胞。正是由于这样的特性, 干细胞在生物医药、动物繁殖与育种等领域展现出广泛的应用价值与前景, 从而推动干细胞研究成为

学术界和业界的热点议题^[3]。

干细胞按来源分类为胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 与成体干细胞 (adult stem cells, ASCs)^[4]。前者在囊胚初期被识别, 后者在成体组织中出现, 涵盖丰富的多样性, 如造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞和精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSCs) 等^[5]。SSCs 是一类存在于睾丸中的 ASCs, 主要负责维持和产生精子, 对保持雄性生殖能力至关重要。这些不同类型的 ASCs 在生物体的成长过程中扮演着重要角色, 特别是在组织损伤后促进修复和再生方面。鸡是发育生物学和胚胎学中的经典模型。几十年来, 鸡作为替代人类的研究动物, 在动物研究中发挥了重要作用, 以弥补伦理限制所带来的不足。由于卵内胚胎发育, 鸡的 ESCs 和原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 比其他物种更容易和方便获取。这种独特的优势加速了鸡 ESCs 在研究人类生殖细胞发育和分化机制中的应用^[6]。

利用干细胞作为研究对象具有高效和遗传效果稳定等优势。若将干细胞技术与基因编辑等技术结合,

收稿日期: 2024-06-04; 修回日期: 2025-04-09

基金项目: 云南联合基金项目 (U2002205)

第一作者: 李鑫璐, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 葛长荣, 教授, 研究方向为家禽遗传资源评价、保护与利用, E-mail: gcrzal@126.com。

可以进一步加快育种进程,推动畜禽种业的高速发展。本文主要对 ESCs 在家禽遗传育种中的研究现状及应用进行综述,旨在为干细胞在家畜领域的应用提供科学依据。

1 ESCs 的概念与特点

ESCs 是一类具有高度多能性的细胞,它们通常从早期胚胎的内细胞团 (inner cell mass, ICM) 中分离出来,并通过在体外抑制分化的培养条件进行筛选^[7]。在适当的体外培养环境中,这些细胞能够分化形成内胚层、外胚层和中胚层,进而形成类胚体^[8]。ESCs 因其一系列独特且宝贵的特性而被视为生物医学和动物育种研究中的宝贵资源。这些细胞在体外环境下展现出多向分化潜能,能够分化成神经细胞、造血细胞、心肌细胞等三大胚层的各类细胞,同时保持长期的未分化状态,通过自我更新过程大量增殖,生成新的 ESCs。此外,ESCs 具有将遗传信息传递给后代的能力,对基因改造操作具有高度适应性^[9],并可维持稳定的正常二倍体核型。它们的生长、自我更新和分化过程显著受到培养环境、细胞因子和营养物质等环境因素的影响。

家禽作为研究模型,其独特的生殖结构、生理特性以及快速的胚胎发育周期,为深入理解 ESCs 提供了极大的帮助^[10]。这些特性不仅凸显了 ESCs 在科学研究中的价值,也预示着它们在生物医学、动物育种等领域具有巨大的应用潜力。通过对家禽模型的研究,科学家们能够更深入地探索 ESCs 的生物学特性,为未来的应用奠定坚实的基础。

2 家禽 ESCs 的分离培养

在 ESCs 的体外培养体系中,维持细胞增殖活力与抑制分化是根本目标。该目标通过体外施加特定化合物及细胞因子来实现,旨在维系 ICM 的多潜能性并促进其增殖^[11]。培养基的优化配制,尤其是精确调整生长因子与激素含量,对促进未分化状态下的细胞扩增至关重要。此外,依据胚胎发育阶段选用分化抑制剂,结合严格的环境参数管理(如温度、氧气浓度等)是保持 ESCs 多潜能性的另一关键要素^[12]。ESCs 的体外存活与特性维持高度依赖于富含调节因子的培养介质,其中的激素与细胞因子在 ESCs 的获取与持续培养中扮演核心角色^[13]。这些综合策略协同确保了 ESCs 在试验条件下的稳定性与功能性表现。

Sun 等^[14]的研究发现,含有 10 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 C (VC) 的培养液能显著促进 ESCs 细胞的增殖。此外,转染了 pEGFP-hTERT 的 ESCs 在含有外源因子

(mLIF + bFGF + hSCF) 和 VC 的培养基中可培养十代以上,而且这些 ESCs 克隆在冷冻保存后仍可再生。已有多项研究证实,一些特定细胞因子,包括鸡干细胞因子 (SCF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、小鼠白介素-6 (IL-6)、人白介素-11 (IL-11)、人胰岛素样生长因子-1 (hIGF-1) 以及小鼠白血病抑制因子 (mLIF) 等^[15-17]能显著促进 ESCs 的增殖。

3 家禽 ESCs 的分化与调控

分子生物学技术的持续进步深化了对家禽 ESCs 分化为特定细胞类型,尤其是生殖细胞系形成的理解。研究已鉴定出多个关键基因和信号通路,这些成果不仅增进了对家禽 ESCs 分化机制的认识,也为遗传资源的保护与利用奠定了科学基础。本节将聚焦于家禽 ESCs 向 SSCs 和 PGCs 的分化过程。分析这些分化阶段中起关键作用的基因及其调控网络,有助于揭示家禽生殖系统发育的分子机制。表 1 提供了这些关键基因和信号通路的详细信息。

表 1 参与家禽 ECS 分化过程的关键基因和信号通路

分化方向	关键基因或信号通路	参考文献
PGCs	RXRG 基因 (Gene ID: 396231)	[18]
	PPAR 信号通路 (ID: hsa03320)	[18]
	MAPK/ERK 信号通路 (ID: hsa04010)	[19]
	cNANOG 基因 (ID: 100272166)	[20]
	JUN 基因 (ID: NM_001031289.1)	[21]
SSCs	转化生长因子 (TGF) $-\beta$ 信号通路 (ID: hsa04510)	[22]
	JAK-STAT 信号通路 (ID: hsa04630)	[23]
	视黄醇代谢信号通路 (ID: hsa00830)	[24]
	Wnt 信号通路 (ID: hsa04310)	[25]
	JNK 信号通路 (ID: hsa04010)	[26]
	细胞外基质 (ECM) 受体相互作用 (ID: hsa04512)	[27]
	NOTCH 信号通路 (ID: hsa04330)	[28]
	硫酸软骨素 (CS) 信号通路	[29]
	C1EIS 基因 (ID: XM416004.2)	[30]
	Stra8 基因 (ID: XM_416179)	[31]
Hedgehog 信号通路 (ID: hsa04340)	[32]	
DAZL 基因 (ID: 374054)	[33]	

3.1 家禽 ESCs 分化为 PGCs

PGCs 是将来发育成为精子或卵子的前体细胞,在生殖系统的建立中发挥着至关重要的作用。过氧化

物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 是核受体家族中的一员, 作为配体激活的转录因子, 主要调节基因表达, 并参与脂肪酸和葡萄糖代谢以及炎症反应等生理过程^[34]。视黄醇 X 受体 γ (RXR γ) 由 RXRG 基因编码, 属于 RXRs 家族, 这些核受体作为转录因子参与细胞生长、分化、代谢和发育。RXRs 能与 PPARs 形成异二聚体, 共同调节基因表达。在家禽中, Cheng 等^[18]的研究表明 PPAR 信号通路和 RXRG 基因在鸡 ESCs 分化为 PGCs 中起关键作用, RXRG 正向调节 PPAR 信号通路, 促进分化。

MAPK/ERK 信号通路是细胞信号传导的重要路径, 涉及细胞增殖、分化、生存及应激反应等生理功能。该通路的核心是一系列丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs)。研究发现, FGF8 的过表达促进鸡 ESCs 分化为 PGCs, 抑制 SSCs 形成, 并增强 FGFR2、GRB2、RAS、BRAF、RAF1 和 MEK2 等下游基因的表达^[19]。此外, c-JUN 也在多种信号通路如 MAPK/ERK 中发挥作用, 且在雄性和雌性 ESCs 及 PGCs 中差异表达的 JUN 基因是鸡雌性分化的关键调节因子, 通过抑制 Smad2 的转录和促进雌二醇合成参与性别分化^[21]。

在哺乳动物中, NANOG 基因维持 ESCs 的多能性, 在家禽中, cNANOG 也发挥相似作用^[35]。POU5F3 和 SOX2 在 PGCs 中正向调控 cNANOG, 而 TP53 则负向调控。ESCs 中 cNANOG 启动子的近端区域含有 CCAAT/增强子结合蛋白 (CEBP) 结合位点。通过干扰 siRNA 技术证实了 POU5F3、SOX2 和 CEBP 在 cNANOG 基因表达中的关键作用^[20]。这些发现揭示了 cNANOG 基因表达调控的复杂性, 并有助于理解 PGCs 和 ESCs 的发育和功能。

以上研究表明, PPAR 信号通路和 RXRG 基因在家禽 ESCs 分化为 PGCs 的过程中起着重要作用。MAPK/ERK 信号通路通过调控 FGF8 和其他相关基因的表达, 影响 PGCs 的自我更新和分化。此外, cNANOG 基因的表达受到多个转录因子的调控, 对维持细胞多能性至关重要。

3.2 家禽 ESCs 分化为 SSCs

SSCs 在雄性生殖系统中扮演着关键角色。它们通过自我更新来保持自身的未分化状态和数量, 并通过分化过程持续产生精子。SSCs 通过平衡自我更新和分化这两种功能, 维持生殖细胞群体的稳定。这种平衡对于保持精子发生的连续性和供应的稳定性至关重要, 对雄性的生育能力有着决定性的影响。相较于 ESCs, SSCs 避免了伦理争议和免疫排斥的风险, 同时提供了相似的治疗潜力和基因编辑的可能性, 因此在生物学研究中受到广泛关注。在 ESCs 的分化过程

中, 多种信号通路和基因调控网络参与其中。例如, TGF- β 信号通路不仅在细胞增殖、分化和胚胎发育中起着重要作用^[36], 还参与了鸡 ESCs 向雄性生殖细胞的分化^[22]。与此同时, JAK-STAT 信号通路也在包括 SSCs 分化在内的多种生理过程中发挥作用^[23]。此外, 视黄酸 (retinoic acid, RA) 代谢中的细胞色素 P450 家族成员在调控家禽雄性生殖细胞分化中扮演角色^[37]。研究发现, 抑制视黄醇通路会减少 RA 诱导的 SSC 样细胞数量^[24], 而 RA 受体结合基因对 ECM-受体相互作用信号的影响则降低了 RA 诱导 SSCs 形成的效率^[27]。这些研究强调了视黄醇通路在鸡雄性生殖细胞形成中的正向调控作用。He 等^[25]发现, 抑制 Wnt 信号通路中的 Wnt5a 会减少 SSCs 标志基因 (如 c-Kit、Cvh、Integrins $\alpha 6$ 和 Integrins $\beta 1$) 的表达, 证明 Wnt5a 对 SSCs 分化的促进作用。关于 JNK 信号通路 (c-JUN N 端激酶/SAPK), Wang 等^[26]证实, MAPK8 的敲除或过表达通过抑制或激活 JNK 信号通路影响 ESCs 向雄性生殖细胞分化。硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 通过影响细胞表面受体状态调节多个信号通路, 研究发现, 在鸡 ESCs 分化为 SSCs 的过程中, CS 信号通路持续发挥作用, 而其他代谢通路如戊糖磷酸途径和葡萄糖酸的互变途径也在特定分化阶段显示出重要性。该研究还发现 CS 信号通路中的四个关键基因 (CHSY3、B3GAT1、CHPF 和 B4GALT7) 对维持该通路的功能至关重要^[29]。

C1EIS 基因在鸡 ESCs 分化为 SSCs 中具有重要作用。研究发现通过 CRISPR/Cas9 技术敲除 C1EIS 基因, 发现其促进了 ESCs 向雄性生殖细胞的分化, 敲除后分化受到抑制。此外, 敲除组中 Integrins $\alpha 6$ 和 Integrins $\beta 1$ 的表达水平降低, 进一步证实了 C1EIS 基因的重要性^[30]。同时 Stra8 基因在精子发生中也起关键作用, 其表达由 RA 诱导。Stra8 的表达与 Wnt、JNK 等信号通路相关, 这些通路对细胞增殖、分化及迁移至关重要。研究表明, 鸡的 Stra8 基因的核心启动子区域位于 -1 055 bp 至 +54 bp 间。化合物 Am80 和 TSA 可增强 Stra8 的转录活性, 促进 ESCs 向 SSCs 的分化, 显示 Stra8 在生殖细胞发育中不可或缺, 且其表达水平可通过特定化学物质调节^[31-32]。并且 DAZL 基因在生殖细胞发育中发挥关键作用, 通过调控 miRNA 前体和与 Dicer 酶的相互作用调节增殖与分化^[38]。Zhang 等^[33]确定 DAZL 基因的核心启动子区域位于负 383 至负 39 碱基对之间, 且 ATRA、Am80 和雌二醇均可显著增强其转录水平。

在家禽 ESCs 向 SSCs 的分化中, 关键信号通路如 TGF- β 、JAK-STAT、Wnt 和 JNK, 以及 C1EIS、

Stra8 和 DAZL 等基因都发挥着核心作用。未来的研究可以进一步探索这些信号通路和基因的相互作用,以及它们如何影响 ESCs 的分化过程。

4 家禽 ESCs 的应用

4.1 疫苗生产

选择细胞基质是开发和制造病毒疫苗候选物的关键步骤。由于伦理和安全问题,对于人类疫苗的生产,通常更倾向于使用非哺乳动物来源或者经过优化的人源化细胞系。例如,鸡胚成纤维细胞(primary chicken embryo fibroblasts, CEF) 长期以来一直被用于生产多种类型的疫苗,尤其是流感疫苗^[39]。然而,CEF 存在一些限制,比如批次间的一致性和安全性问题。与此同时,鸡 ESCs 由于其无限的增殖能力和较低的成本,正在成为一种替代传统细胞系的选择。Giotis 等^[40]的研究显示,鸡 ESCs 对几种痘病毒疫苗载体如鸡痘病毒疫苗 9 型(fowlpox virus vaccine 9, FP9) 和金丝雀痘病毒疫苗(canarypox virus vaccine, CNPV) 表现出高度易感性,并支持其持续感染及有效复制,同时维持高水平的病毒产量。与传统的鸡 CEF 相比,鸡 ESCs 显示出作为支持疫苗病毒及其他病毒复制的高产细胞系的巨大潜力,并为研究禽类病毒的分子病理学提供了一个有用的平台。在家禽领域,鸭源细胞系也有广泛应用。例如,EB66 细胞系是从鸭的 ESCs 发展而来的一种细胞系,已获得日本卫生当局的批准用于 H5N1 流感疫苗的生产。此外,EB66 细胞系还被用于生产其他类型的疫苗,如改良的牛痘病毒安卡拉(modified vaccinia ankara, MVA)^[41] 和鸭坦布苏病毒(duck tembusu virus, DTMUV)^[42]。

4.2 嵌合鸡与生物反应器

近年来,禽类的卵细胞和胚胎细胞系在生物技术领域内愈发受到青睐,尤其是在重组蛋白的安全性保障、生产规模的扩大化及成本效益方面展现出独特优势,同时也为治疗性蛋白的制备提供了新的途径^[43]。通过 ESCs 工程技术,能够成功构建禽类输卵管生物制造平台,专门用于生产重组蛋白等高附加值医药产品,预示着禽蛋将成为生物制药领域中“动物源性工厂”的新支柱。Zhang 等^[44]分离了鸡 ESCs,并通过碱性磷酸酶活性和 SSEA-1 染色进行了鉴定。随后,他们使用线性化的 pEGFP-N1 质粒转染 ESCs,发现当电穿孔条件为 280 V 和 75 μ s 时,转染效率最高,证明了用 ESCs 生成嵌合鸡的可行性。Byun 等^[45]将含有 EGFP 基因的重组慢病毒注射到 X 期的鸡胚胎中,生成的转基因母鸡在输卵管的肾小管中特异性表达了 EGFP。此外,王晶^[46]的研究成功地在鹌

鹌细胞中表达了人血清白蛋白基因,这些结果表明了利用禽类作为生物反应器来生产生物活性蛋白的潜力。目前,已有多种治疗性生物制剂利用禽类作为生物反应器成功生产,包括重组人组织激肽释放酶(rhK1)^[47]、人溶菌酶(hLYZ)^[48] 和人中性粒细胞防御素 4 (HNP4)^[49] 等。除了生产生物制剂之外,利用生物反应器生产异种器官也有报道。Wen 等^[50]通过将野生型小鼠 ESC 注射到肺发育不全的 Nkx2-1 缺陷大鼠胚胎中,产生了种间小鼠-大鼠嵌合体。这些研究进展预示着,随着技术的不断成熟,家禽 ESCs 技术有望在未来成为一种高效、经济的生物反应器平台,进一步推动生物制药行业的发展。

4.3 推进遗传育种效率

多能干细胞包括 ESCs 和诱导多能干细胞,因其多能性和自我分化性在畜禽遗传育种等领域受到高度关注。体外配子发生(*in vitro* gametogenesis, IVG) 技术是一种新兴的生殖技术,通过在体外条件下从多能干细胞中制备功能性生殖细胞,相比传统的配子生产和遗传育种方法,具有更高的效率、更低的成本以及更强的可控性。通过 IVG 技术,可以精准控制配子的遗传背景,减少遗传变异带来的不确定性,从而提高育种效率^[51]。

过去十年在 IVG 方面取得了长足的进步,目前已有不少研究者成功从多能干细胞中制备出功能性精子细胞。例如,Zhou 等^[52]的研究证明,小鼠 ESCs 衍生的原始生殖细胞样细胞在体外进入减数分裂,经历体内减数分裂的关键过程,包括染色体突触和重组,最后分化为单倍体精子样细胞(spermatid-like cells, SLCs)。这些 SLCs 通过胞浆内单精子注射成功使卵母细胞受精,由此产生的胚胎经历了正常的胚胎发育,最终产生了生育下一代的可育后代。此外,绵羊^[53]、牛^[54]、猪^[55] 和小鼠^[56] 等物种在 ESCs 分离培养以及体外配子技术方面也取得了一定的进展。这些研究为理解多能干细胞向生殖细胞分化的机制提供了重要线索,并为实际应用奠定了基础。这些进展表明,通过 ESCs 技术可以有效地在体外制备功能性生殖细胞,为遗传育种提供了新的工具。IVG 技术不仅提高了配子生产的效率,还允许研究人员精确控制遗传背景,这对于培育具有特定遗传特性的动物具有重要意义。在家禽领域,鸡 ESCs 同样具有巨大的应用潜力。家禽具有生长周期短和卵生的特点,使得家禽 ESCs 的研究更便利高效。目前家禽 ESCs 的研究取得了显著进展,推动了家禽遗传育种的发展,为其他畜禽物种提供参考,也为人类 IVG 技术提供思路。

4.4 人类医学研究潜力

人类 ESCs 在再生医学领域的探索与应用标志着

一场深刻的科学革命，它不仅为多种疾病的治疗开辟了新的前景，还深刻地改变了我们对生物学的理解。这些具有多潜能性的细胞来源于人类早期胚胎阶段，能够分化成体内几乎任何类型的细胞，因此成为了现代生物医学研究中不可或缺的组成部分。通过干细胞疗法，科学家们已经为神经退行性疾病、眼科疾病、糖尿病等顽固性疾病的治疗找到了全新的方法，同时也在女性生殖健康、泌尿生殖系统疾病以及心血管疾病的临床治疗上取得了突破性进展^[57]。然而，这一前沿领域的快速发展同样伴随着一系列复杂的问题。首先，人类 ESCs 的研究和应用触及到了深层次的伦理、法律和社会争议，特别是关于人类胚胎使用的正当性和界限问题。这促使科研界、政策制定者乃至整个社会不断寻求平衡点，以确保科学研究既能推进医疗进步，又不会逾越道德底线。鉴于此，寻找人类 ESCs 的替代方案成为了研究的一个重要方向。在此背景下，动物来源的 ESCs，尤其是禽类的 ESCs，因其独特的生物学特性和试验优势而受到重视。禽类本身具有较短的繁殖和生长周期，使 ESCs 易于获得，这为快速开展大规模试验研究提供了极大的便利。此外，禽类模型在研究胚胎发育过程中的细胞分化、组织形成等方面也展现了价值，成为探究干细胞治疗策略和机制的理想选择。

因此，虽然人类 ESCs 的研究面临诸多挑战，但通过不断探索包括禽类在内的各种动物模型，科学家们正逐步克服障碍，推动再生医学领域向前发展，为未来的医学实践带来无限可能。

5 总结

随着分子生物学技术的不断进步，我们对 ESCs 分化机制的理解不断加深，为未来的生物技术应用提供了新的方向。在家禽 ESCs 的研究中，已经识别出多个关键基因和信号通路，这些基因和通路在 ESCs 向 SSCs 和 PGCs 的分化过程中发挥着核心作用。特定的培养条件和细胞因子的添加已被证实可以促进 ESCs 的增殖和维持其多潜能性。在家禽 ESCs 的应用方面，它们已被用于疫苗生产，显示出作为高效细胞基质的潜力。同时，利用家禽 ESCs 构建嵌合鸡和生物反应器，为生产重组蛋白和其他高附加值医药产品提供了新的途径。此外，ESCs 在加速遗传育种进程中也显示出巨大潜力，IVG 技术的发展为遗传育种提供了新的工具。

展望未来，家禽 ESCs 的研究将继续深化我们对其分化机制的理解，并推动相关生物技术的发展。未来的研究可能会集中在探索新的分子标记和信号通路，以更精确地控制 ESCs 的分化和多潜能性维持。

同时，优化 ESCs 的培养条件，提高其增殖效率和降低成本，使其在生物制药和疫苗生产中得到更广泛的应用。基因编辑技术将进一步改良 ESCs，增强其在生物反应器和遗传育种中的性能。此外，ESCs 在再生医学中的应用，特别是在组织工程和细胞治疗领域，也将成为研究的热点。深入研究家禽 ESCs 在人类疾病模型中的应用，将促进新药的开发和疾病机制的研究。随着这些研究的进展，家禽 ESCs 有望在未来的生物技术和医学领域发挥更加重要的作用，为人类健康和农业生产带来革命性的变化。

参考文献：

- [1] ZAKRZEWSKI W, DOBRZYŃSKI M, SZYMONOWICZ M, et al. Stem cells: past, present, and future [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10: 68.
- [2] JONES J M, THOMSON J A. Human embryonic stem cell technology [J]. *Semin Reprod Med*, 2000, 18 (2): 219-224.
- [3] PUNETHA M, BAJWA K K, DUA S, et al. Pluripotent stem cells for livestock health and production [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2022, 17 (3): 252-266.
- [4] DE MORREE A, RANDO T A. Regulation of adult stem cell quiescence and its functions in the maintenance of tissue integrity [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24 (5): 334-354.
- [5] ZHANG H, LI Y, MA Y, et al. Epigenetic integrity of paternal imprints enhances the developmental potential of androgenetic haploid embryonic stem cells [J]. *Protein Cell*, 2022, 13 (2): 102-119.
- [6] JIN K, ZHOU J, ZUO Q, et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis of amphoteric escs and pgs in chicken (*Gallus gallus*) [J]. *Animals*. 2020, 10 (12): 2228.
- [7] VARZIDEH F, GAMBARDILLA J, KANSAKAR U, et al. Molecular mechanisms underlying pluripotency and self-renewal of embryonic stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (9): 8386.
- [8] SHETTY D K, INAMDAR M S. Generation of a heterozygous knock-out human embryonic stem cell line for the *ociad1* locus using CRISPR/Cas9 mediated targeting: BJNH20-OCIAD1-CRISPR-39 [J]. *Stem Cell Res*, 2016, 16 (2): 308-310.
- [9] 郝原. 维生素 C 促进小鼠胚胎干细胞多能性维持的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [10] WANG H S, MA X R, GUO Y H. Development and application of haploid embryonic stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15 (1): 116.
- [11] 尹媛媛. 猪早期胚胎和胚胎干细胞体外培养体系优化的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [12] 乌云她娜. 不同小分子抑制剂对牛类胚胎干细胞多能性维持的作用研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2018.
- [13] AIERKEN A, LI B, LIU P, et al. Melatonin treatment improves human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy in a mouse model of type II diabetes mellitus via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13 (1): 164.
- [14] SUN C, WANG Y, JIN K, et al. Study on immortal conditions of chicken embryonic stem cells [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120

- (2): 1376–1385.
- [15] XIONG C, WANG M, LING W, et al. Advances in isolation and culture of chicken embryonic stem cells *in vitro* [J]. Cell Reprogramming, 2020, 22 (2): 43–54.
- [16] FARZANEH M. Mini-review: deriving avian stem cells by small molecules [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2021, 16 (3): 238–242.
- [17] 李欣, 于永生, 吕阳, 等. 鸡胚胎干细胞的分离培养与鉴定 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40 (6): 1228–1231.
- [18] CHENG S, WANG M, WANG Y, et al. RXRG associated in PPAR signal regulated the differentiation of primordial germ cell [J]. J Cell Biochem, 2018, 119 (8): 6926–6934.
- [19] WANG M, ZHANG C, HUANG C, et al. Regulation of fibroblast growth factor 8 (FGF8) in chicken embryonic stem cells differentiation into spermatogonial stem cells [J]. J Cell Biochem, 2018, 119 (2): 2396–2407.
- [20] CHOI H J, JIN S D, RENGARAJ D, et al. Differential transcriptional regulation of the NANOG gene in chicken primordial germ cells and embryonic stem cells [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2021, 12 (1): 40.
- [21] ZHANG M, XU P, SUN X, et al. JUN promotes chicken female differentiation by inhibiting Smad2 [J]. Cytotechnology, 2021, 73 (1): 101–113.
- [22] ZHANG Y, WANG Y, ZUO Q, et al. Effects of the transforming growth factor β signaling pathway on the differentiation of chicken embryonic stem cells into male germ cells [J]. Cell Reprogram, 2016, 18 (6): 401–410.
- [23] ZHANG Y, ZHANG L, ZUO Q, et al. JAK-STAT signaling regulation of chicken embryonic stem cell differentiation into male germ cells [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2017, 53 (8): 728–743.
- [24] 左其生, 张蕾, 连超, 等. 脂代谢通路对鸡雄性生殖细胞分化的调控机制 [J]. 中国农业科学, 2015, 48 (22): 4539–4550.
- [25] HE N, WANG Y, ZHANG C, et al. Wnt signaling pathway regulates differentiation of chicken embryonic stem cells into spermatogonial stem cells via Wnt5a [J]. J Cell Biochem, 2018, 119 (2): 1689–1701.
- [26] WANG Y, BI Y, ZUO Q, et al. MAPK8 regulates chicken male germ cell differentiation through JNK signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2018, 119 (2): 1548–1557.
- [27] HU C, ZUO Q, JIN K, et al. Retinoic acid promotes formation of chicken (*Gallus gallus*) spermatogonial stem cells by regulating the ECM-receptor interaction signaling pathway [J]. Gene, 2022, 820: 146227.
- [28] LI D, JI Y, WANG F, et al. Regulation of crucial lncRNAs in differentiation of chicken embryonic stem cells to spermatogonia stem cells [J]. Anim Genet, 2017, 48 (2): 191–204.
- [29] LIAN C, ZUO Q, LI D, et al. Basing RNA-seq explored the regulatory mechanism of the carbohydrate metabolism pathways during chicken male germ cell differentiation [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2015, 51 (7): 690–696.
- [30] 连超. CIEIS 基因对鸡 ESC 向雄性生殖细胞分化的调控作用 [D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
- [31] ZHANG Y, WANG Y, ZUO Q, et al. CRISPR/Cas9 mediated chicken Stra8 gene knockout and inhibition of male germ cell differentiation [J]. PLoS One, 2017, 12 (2): e0172207.
- [32] ZHANG Y, ZUO Q, LIU Z, et al. The induction effect of AM80 and TSA on ESC differentiation via regulation of Stra8 in chicken [J]. PLoS One, 2015, 10 (11): e0140262.
- [33] ZHANG L, ZHU R, ZUO Q, et al. Activity analysis and preliminary inducer screening of the chicken DAZL gene promoter [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16 (3): 6595–6605.
- [34] CHRISTOFIDES A, KONSTANTINIDOU E, JANI C, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses [J]. Metabolism, 2021, 114: 154338.
- [35] CHAMBERS I, COLBY D, ROBERTSON M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells [J]. Cell, 2003, 113 (5): 643–655.
- [36] DENG Z, FAN T, XIAO C, et al. TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9 (1): 61.
- [37] 沈舒萍, 张颖, 陈林, 等. CYP1 基因家族对家禽繁殖性状的调控机制研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60 (6): 49–54.
- [38] YAN A, XIONG J, ZHU J, et al. DAZL regulates proliferation of human primordial germ cells by direct binding to precursor miRNAs and enhances DICER processing activity [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50 (19): 11255–11272.
- [39] WORKINEH D, BITEW M, OLUWAYELU D, et al. Comparative safety, immunogenicity, and efficacy of CEF cell-based and DF-1 cell line adapted infectious bursal disease vaccines in specific-pathogen-free chickens [J]. J Immunol Res, 2022, 2022: 5392033.
- [40] GIOTIS E S, MONTILLET G, PAIN B, et al. Chicken embryonic-stem cells are permissive to poxvirus recombinant vaccine vectors [J]. Genes, 2019, 10 (3): 237.
- [41] LÉON A, DAVID A L, MADELINE B, et al. The EB66[®] cell line as a valuable cell substrate for MVA-based vaccines production [J]. Vaccine, 2016, 34 (48): 5878–5885.
- [42] YANG Z, WANG J, WANG X, et al. Immunogenicity and protective efficacy of an EB66[®] cell culture-derived duck Tembusu virus vaccine [J]. Avian Pathol, 2020, 49 (5): 448–456.
- [43] FARZANEH M, HASSANI S N, MOZDZIAK P, et al. Avian embryos and related cell lines: a convenient platform for recombinant proteins and vaccine production [J]. Biotechnol J, 2017, 12 (5): 1600598.
- [44] ZHANG Y, YANG H, ZHANG Z, et al. Isolation of chicken embryonic stem cell and preparation of chicken chimeric model [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40: 2149–2156.
- [45] BYUN S J, KIM S W, KIM K W, et al. Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75 (4): 646–649.
- [46] 王晶. 人血清白蛋白鹤鹑输卵管特异表达载体的构建及其表达 [D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [47] WANG A P, SUN H C, WANG J Y, et al. Recombinant avian adeno-associated virus-mediated oviduct-specific expression of recombinant human tissue kallikrein [J]. Poult Sci, 2008, 87 (4): 777–782.
- [48] WANG A P, WANG Y J, WU S, et al. Study on the expression of human lysozyme in oviduct bioreactor mediated by recombinant avian adeno-associated virus [J]. Poult Sci, 2017, 96 (7): 2447–2453.
- [49] LIU T, WU H, CAO D, et al. Oviduct-specific expression of human

- neutrophil defensin 4 in lentivirally generated transgenic chickens [J]. PLoS One, 2015, 10 (5): e0127922.
- [50] WEN B, LI E, WANG G, et al. CRISPR-Cas9 genome editing allows generation of the mouse lung in a rat [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2024, 210 (2): 167-177.
- [51] BOTIGELLI R C, GUILTINAN C, ARCANJO R B, et al. *In vitro* gametogenesis from embryonic stem cells in livestock species: recent advances, opportunities, and challenges to overcome [J]. J Anim Sci, 2023, 101: skad137.
- [52] ZHOU Q, WANG M, YUAN Y, et al. Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells *in vitro* [J]. Cell Stem Cell, 2016, 18 (3): 330-340.
- [53] ZHU S X, SUN Z, ZHANG J P, et al. Ovine (*Ovis aries*) blastula from an *in vitro* production system and isolation of primary embryonic stem cells [J]. Zygote, 2007, 15 (1): 35-41.
- [54] FERRÉ L B, KJELLAND M E, STRØBECH L B, et al. Review: recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods [J]. Animal, 2020, 14 (5): 991-1004.
- [55] GARCIA-CANOVAS M, PARRILLA I, CUELLO C, et al. Swine *in vitro* embryo production: potential, challenges, and advances [J]. Anim Reprod Sci, 2024.
- [56] SAITOU M, HAYASHI K. Mammalian *in vitro* gametogenesis [J]. Science, 2021, 374 (6563): eaaz6830.
- [57] YAMANAKA S. Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges [J]. Cell Stem Cell, 2020, 27 (4): 523-531.

