

慢病毒直接诱导形成猪 iPS 细胞无需限定因子*

曹鸿国^{1, 2)**} 陈 涛¹⁾ 殷慧群¹⁾ 孙雪萍¹⁾ 蒲 勇¹⁾ 杨 盼¹⁾

张运海^{1, 2)} 刘 亚^{1, 2)} 李运生^{1, 2)} 陶 勇^{1, 2)} 章孝荣^{1, 2)**}

(¹⁾安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; ²⁾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 为了证实慢病毒对细胞具有遗传修饰和重编程作用, 在本实验中使用慢病毒感染猪胎儿成纤维细胞. 结果显示: 慢病毒介导的 EGFP 在猪胎儿成纤维细胞中稳定和高效表达, 使用添加 LIF 和 bFGF 的细胞培养液, 部分猪的胎儿成纤维细胞逐渐改变原有的纤维状形态, 形成圆形的细胞, 细胞逐步增殖形成细胞集落, 细胞集落边界清晰, 在饲养层上细胞集落生长迅速, 具有稳定的生长性能和正常核型, 细胞碱性磷酸酶染色为阳性, 表达干细胞特有的标记 Oct4、Nanog 和 SSEA1, 在体外能够形成拟胚体, 在体内分化形成包含三个生殖层的畸胎瘤. 作为核移植的供体细胞, 克隆胚的卵裂率为 53.33%、桑椹胚率为 9.03%、囊胚率为 2.07%、孵化囊胚的总细胞数为 26.5, 在桑椹胚率和囊胚率方面显著低于猪普通胎儿成纤维细胞核移植克隆胚的发育能力($P < 0.05$). 结果证实慢病毒能够直接使猪的胎儿成纤维细胞转变成 iPS 细胞, 因此慢病毒将成为一种理想的材料和工具用于细胞的遗传修饰和细胞重构等方面的研究.

关键词 慢病毒, 猪 iPS 细胞, 胎儿成纤维细胞

学科分类号 Q813.5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00091

慢病毒是逆转录病毒家族的一员, 作为基因介导工具能够有效感染周期性和非周期性细胞, 具有简单、快速、有效和稳定转染的优点. 因此, 目前已成为一种重要的基因转染工具广泛应用于细胞生物学和分子生物学等研究领域. 2006 年逆转录病毒介导 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 4 个基因在小鼠胎儿或成年成纤维细胞中表达, 稳定表达这些限定因子的成纤维细胞逐步转变成 iPS 细胞 (induced pluripotent stem cells). 病毒介导限定因子诱导形成的小鼠 iPS 细胞具有二倍体生殖系嵌合和四倍体互补产生后代的能力. 诱导形成的 iPS 细胞具有小鼠 ES 细胞 (embryonic stem cells) 所特有的特征^[1], 小鼠 iPS 细胞的成功诱导显示了逆转录病毒介导外源基因在宿主细胞稳定表达的强大功能. 此外, 慢病毒介导 Oct4、Sox2、Nanog 和 Lin 28^[2] 或 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc^[3] 4 个基因在人成纤维细胞的表达, 也能成功诱导形成人 iPS 细胞, 人 iPS 细胞也呈现出人 ES 细胞所具有的特征. 在家畜方面, 2009 年 Esteban 等^[4-6] 分别采用逆转录病毒或慢病毒介导外源限定因子诱导产生猪 iPS 细胞. 猪在解剖

和生理结构等方面与人非常相似^[7-8], 因此, 猪是一个理想的动物模型和实验材料来源. 在本研究中发现, 猪 iPS 细胞可以不用慢病毒介导外源限定因子作用, 而直接由慢病毒诱导形成, 慢病毒直接诱导形成的猪 iPS 细胞具有干细胞的形态、基因表达和分化能力等方面的特点. 因此这些发现将会提供一个理想的手段和方法用于细胞生长、发育、遗传修饰、重构和分化等方面的研究.

1 材料与方法

1.1 细胞培养和慢病毒感染

猪胎儿成纤维细胞来源于 60 天日龄的杜长达

* 国家自然科学基金(30800784), 国家重点基础研究发展计划(973)(2009CB941004), 国家高技术研究发展计划(863)(2008AA101003, 2008AA101010, 2011AA100307) 和国家转基因育种项目(2009ZX08008-007B)资助.

** 通讯联系人.

曹鸿国. Tel: 0551-5786357, E-mail: caohongguo1@yahoo.com.cn

章孝荣. Tel: 0551-5785543, E-mail: zxr@ahau.edu.cn

收稿日期: 2012-04-16, 接受日期: 2012-06-15

三元杂交猪胎儿. 细胞用高糖 DMEM (Hyclone 公司) 培养液培养, 培养液含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Hyclone 公司). 慢病毒载体 PLentilox 3.7 和包装组分 PMDL、REV 和 VSVg 通过磷酸钙介导在 293T 细胞中包装成慢病毒. 收集包含慢病毒的细胞培养上清液, 病毒上清液离心浓缩后, 取 100 μ l 病毒滴度为 1×10^{11} U/L 的慢病毒上清液按 1:10 加入到细胞培养液中, 混匀后添加到猪胎儿成纤维细胞上, 6 孔板每孔 1 ml 细胞培养液, 细胞接种密度为 $1.0 \times 10^4/\text{cm}^2$, 添加含 10 mg/L polybrene (Sigma 公司) 于培养液中以增加病毒感染效率. 经过 2 次病毒连续感染后, 更换含 15% FBS、 1×10^6 U/L LIF (Chemicon 公司) 和 4 μ g/L bFGF (Sigma 公司) 的高糖 DMEM (Hyclone 公司) 培养液. 当细胞形态变化形成细胞克隆后, 用 1 g/L Dispase (Roche 公司) 消化, 收集细胞集落接种到小鼠胎儿成纤维细胞饲养层上, 培养箱中培养.

1.2 免疫荧光检测

细胞经 4% 多聚甲醛固定 15 min, 用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 液室温作用细胞 10 min, 然后在含 1% BSA 的 PBS 液室温处理细胞 30 min. 用一抗为兔抗 Oct4 (Abcam 公司)、山羊抗 Nanog (R&D 公司)、鼠抗 SSEA1 (Chemicon 公司)、鼠抗 SSEA3 (Chemicon 公司)、鼠抗 SSEA4 (Chemicon 公司)、鼠抗 TRA-1-60 (Chemicon 公司) 和鼠抗 TRA-1-81 (Chemicon 公司) 1:200 稀释后与细胞 4 $^{\circ}$ C 共孵育过夜. PBS 液洗涤后, 细胞用 CY3 标记的二抗按 1:200 稀释后室温作用 1 h, PBS 液洗涤后, 用 1 mg/L DAPI (Roche 公司) 4 孔板每孔 300 μ l 对细胞进行细胞核染色, 然后在荧光显微镜下观察检测.

1.3 核型分析和 AP 染色

细胞用 0.1 mg/L 秋水仙素 (Sigma 公司) 作用 2.5 h, 然后收集和离心, 用 0.075 mol/L KCl 低渗溶液处理, 固定后滴加到载玻片上, 经 Giemsa 染液染色后干燥, 树胶封片后于显微镜下观察检测.

细胞用 4% 多聚甲醛固定后, 按照染液说明书进行添加 AP 染液进行 AP 染色.

1.4 拟胚体形成和体外分化

细胞经 PBS 液洗涤后, 用 1 g/L Dispase 消化, 重悬于无 LIF 和 bFGF 的培养液中, 培养于低黏附力的培养皿 (Qingdao Alpha 公司) 后, 放置培养箱中培养.

细胞用 0.25% 胰酶消化后, 用无血清 DMEM

重悬, 注射细胞悬液于 6 周 BALB/C 免疫缺陷鼠的背部腹侧皮下, 肿瘤形成后, 取出肿瘤组织固定于 4% 多聚甲醛中, 经苏木素和伊红染色后显微镜下观察记录.

1.5 体细胞核移植

猪卵丘卵母细胞复合物 (cumulus-oocyte complexes, COCs) 从卵巢中取出后于 39 $^{\circ}$ C 培养 (42 ± 2) h, 待卵母细胞成熟后, 借助显微操作系统经盲吸法抽除第一极体连同周围 1/5~1/4 的卵胞质, 将来自诱变形成的细胞注射于去核的卵母细胞透明带下, 用 10 mg/L CHX 处理 10 min, 及 156 V/mm 100 μ s DC 电脉冲融合和激活重构胚, 融合的重构胚移至培养液滴中, 于 38.5 $^{\circ}$ C 培养箱中培养.

1.6 克隆囊胚染色

核移植重构囊胚 4% 多聚甲醛固定后, 用 Hoechst 33258 进行染色, PBS 液洗涤后用含 0.05% PVP 的 PBS 液转移至甘油液滴中, 覆盖盖玻片于荧光显微镜下观察.

1.7 数据处理

试验数据用 SAS8.0 数据分析软件进行分析处理, 以 $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结 果

2.1 细胞克隆形成

经过一轮慢病毒感染后, 60%~70% 的猪胎儿成纤维细胞高水平稳定表达 EGFP (图 1a). 然后再经过 2~4 轮的慢病毒感染后, 显微镜下可见一些猪胎儿成纤维细胞改变原有的纤维状形态, 逐渐形成圆形的细胞形态, 圆形的细胞逐步增殖形成细胞集落 (图 1b). 仅一次慢病毒感染能够从 5×10^5 个猪成纤维细胞中获得 2~6 个 AP $^{+}$ 阳性的细胞集落, 形成细胞集落的时间大约为 28 天. 经过 4 次慢病毒重复感染后能够从 5×10^5 个猪成纤维细胞中获得 20~80 个 AP $^{+}$ 阳性的细胞集落, 形成细胞集落的时间大约为 7 天. 细胞集落出现的效率同病毒的感染效率和重复次数呈明显的正相关, 更多的慢病毒重复感染或更高的慢病毒感染效率会导致更高的细胞集落出现和更快的细胞集落形成. 当细胞集落消化传代 2 天后, 生长在饲养层上的细胞集落具有清晰的边界. 在一般情况下, 细胞在 1:4 消化传代时, 细胞每 2~3 天传代一次. 细胞生长状态稳定, 常规的冻存复苏和传代等对细胞的形态、生长速度均无明显影响. 伴随细胞的稳定传代, EGFP 在细

胞集落中仍稳定和高水平表达(图 1c). 在同样的生长条件下, 未经慢病毒感染的猪胎儿成纤维细胞没

有任何形态的变化, 仍保持纤维状细胞形态.

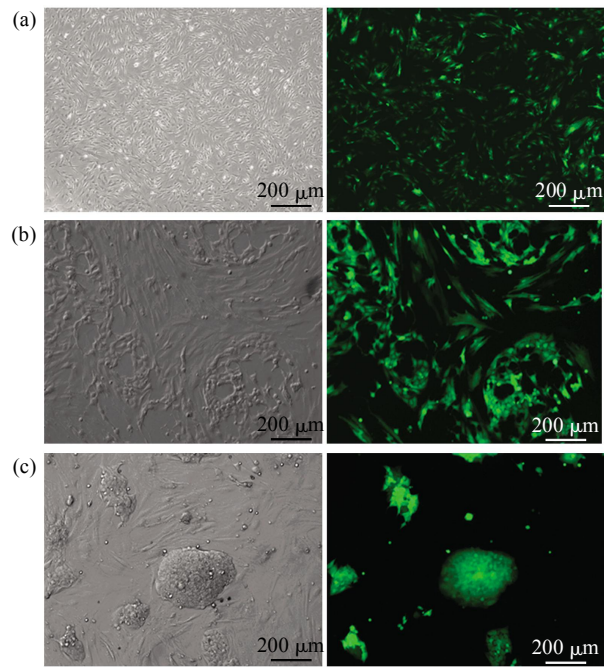


Fig. 1 The growth and EGFP expression of PFBs and the formation and morphology of cell clones after lentivirus infection
(a) The growth and morphology of PFBs on day 2 after 1 round of lentivirus infection. (b) PFBs showed round morphology on day 4 after 2 rounds of lentivirus infection. (c) Morphology of cell colonies on mouse embryonic fibroblast feeder layer cells on day 2 after the 10th generations.

2.2 AP 阳性和正常核型

胚胎来源的细胞或低分化状态的细胞表达高水平的 AP. 猪胎儿成纤维细胞经慢病毒作用后形成的细胞集落 AP 染色为强阳性, 细胞集落呈现红褐

色或紫红色, 在相同的条件下, 小鼠胎儿成纤维细胞饲养层或猪胎儿成纤维细胞均不显色, 呈阴性 (图 2a). 来源于第 4 代的细胞集落核型检测显示染色体为 38, 呈正常核型(图 2b).

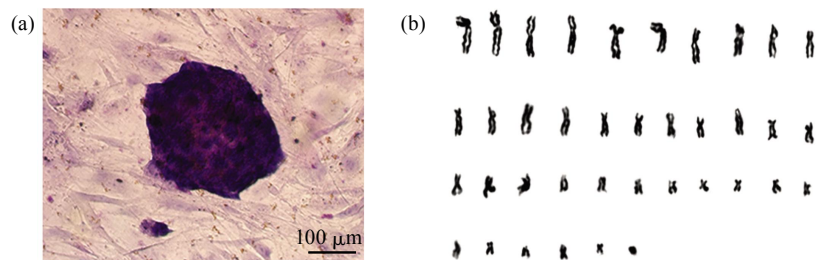


Fig. 2 AP-positive staining of the 6th generation cell colonies and the normal karyotype of the 4th generation cell colonies
(a) AP-positive staining of the 6th generation cell colonies on mouse embryonic fibroblast feeder layer cells. (b) The normal karyotype of the 4th generation cell colonies.

2.3 干细胞标记的表达

干细胞特异性抗体检测显示, 细胞集落呈现 Oct4 (图 3a)、Nanog (图 3b)和 SSEA-1 (图 3c)阳性, 其他的干细胞标记 SSEA3、SSEA4、TRA-1-60 和

TRA-1-81 为阴性. 在相同情况下, 这些干细胞标记在小鼠胎儿成纤维细胞饲养层和猪胎儿成纤维细胞均为阴性.

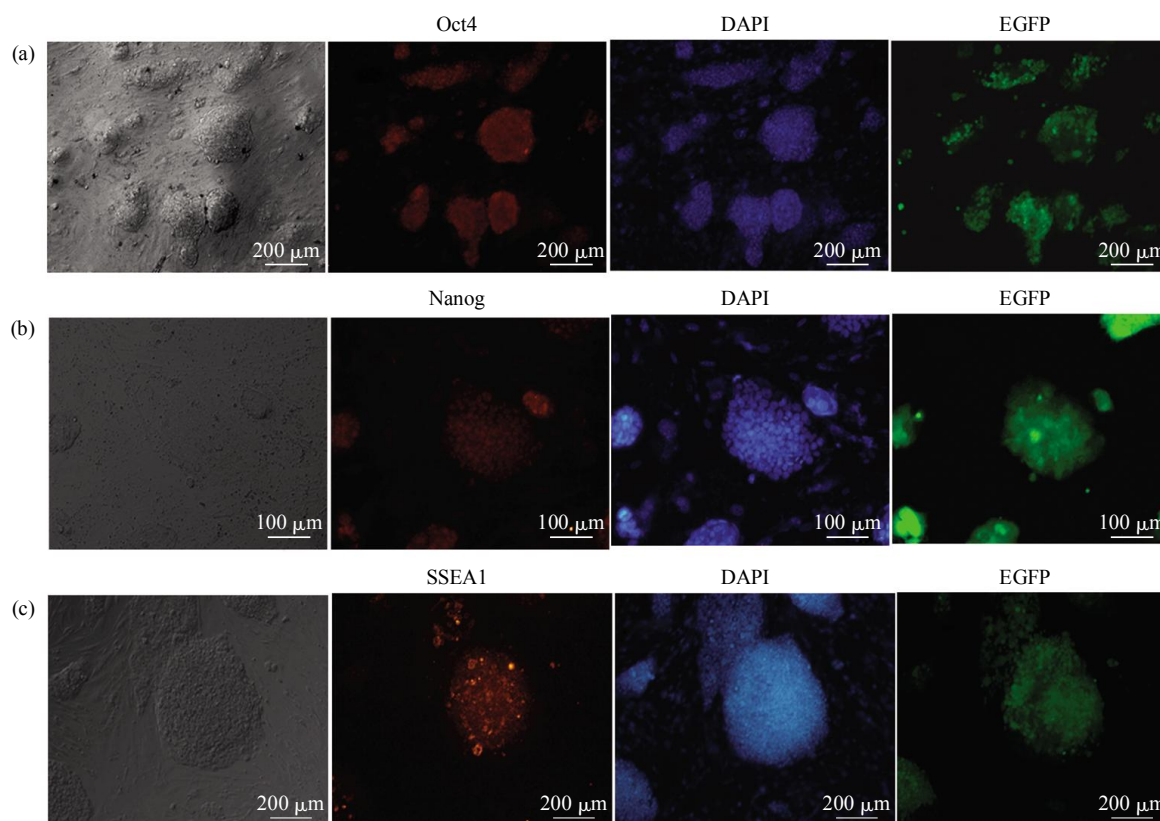


Fig. 3 Expression of stem cell markers in the 9th generation cell colonies

(a) Growth morphology of the 9th generation cell colonies for Oct4 protein assay. (b) The morphology of the 9th generation cell colonies for Nanog protein assay. (c) The morphology of the 9th generation cell colonies for SSEA1 protein assay.

2.4 拟胚体和畸胎瘤形成

消化的细胞集落在低黏附的培养皿中形成拟胚体，拟胚体贴壁后在拟胚体周围能够形成多种形态的细胞(图 4a)。拟胚体伴随着培养时间的延长，拟胚体变得较为致密，颜色较深。拟胚体间能够相互聚集形成更大的拟胚体(图 4b)。此外，细胞集落注射到 BALB/C 免疫缺陷鼠皮下 6 周后，能够形成肉眼可见的表达 EGFP 的畸胎瘤组织，畸胎瘤组织表达高水平的 EGFP。H&E 染色显示，在畸胎瘤组织中可见来源于外胚层的神经组织、内胚层的消化管腔和中胚层的软骨、肌肉组织等 3 个胚层的组织和细胞(图 4c)。

2.5 重构胚的体外发育

用慢病毒直接诱导形成的猪 iPS 细胞作为核供体进行体细胞核移植，核移植重构胚的卵裂率为 52.33%、桑葚胚率为 9.03%和囊胚率为 2.07%，对重构囊胚进行细胞计数显示孵化囊胚的总细胞数为 26.5。同直接用未经慢病毒感染的猪胎儿成纤维细胞作为核供体的重构胚比较显示，猪 iPS 细胞的核移植重构胚在桑葚胚率和囊胚率方面低于猪胎儿成纤维细胞核移植重构胚，且差异显著 ($P < 0.05$)。猪 iPS 细胞的核移植重构胚发育到孵化囊胚后，与猪胎儿成纤维细胞核移植重构胚发育的孵化囊胚两者之间在囊胚总细胞数方面差异不显著(图 4d，表 1)。

Table 1 The effects of different donor cells on *in vitro* development of embryos reconstructed from nuclear transfer

Treatment group	No. of Reconstructed embryos	No. of cleavage (%)	No. of morula (%)	No. of blastocyst (%)	Total cell number of blastocysts
PFB-lentivirus	144	75(52.33±5.18) ^a	13(9.03±1.68) ^a	3(2.07±1.13) ^a	26.5(26.5±6.4) ^a
PFB-non-lentivirus	155	105(67.57±3.78) ^a	30(22.25±2.35) ^b	12(7.73±0.97) ^b	38.5(38.5±11.0) ^a

Different letters in the same column represented a significant difference ($P < 0.05$).

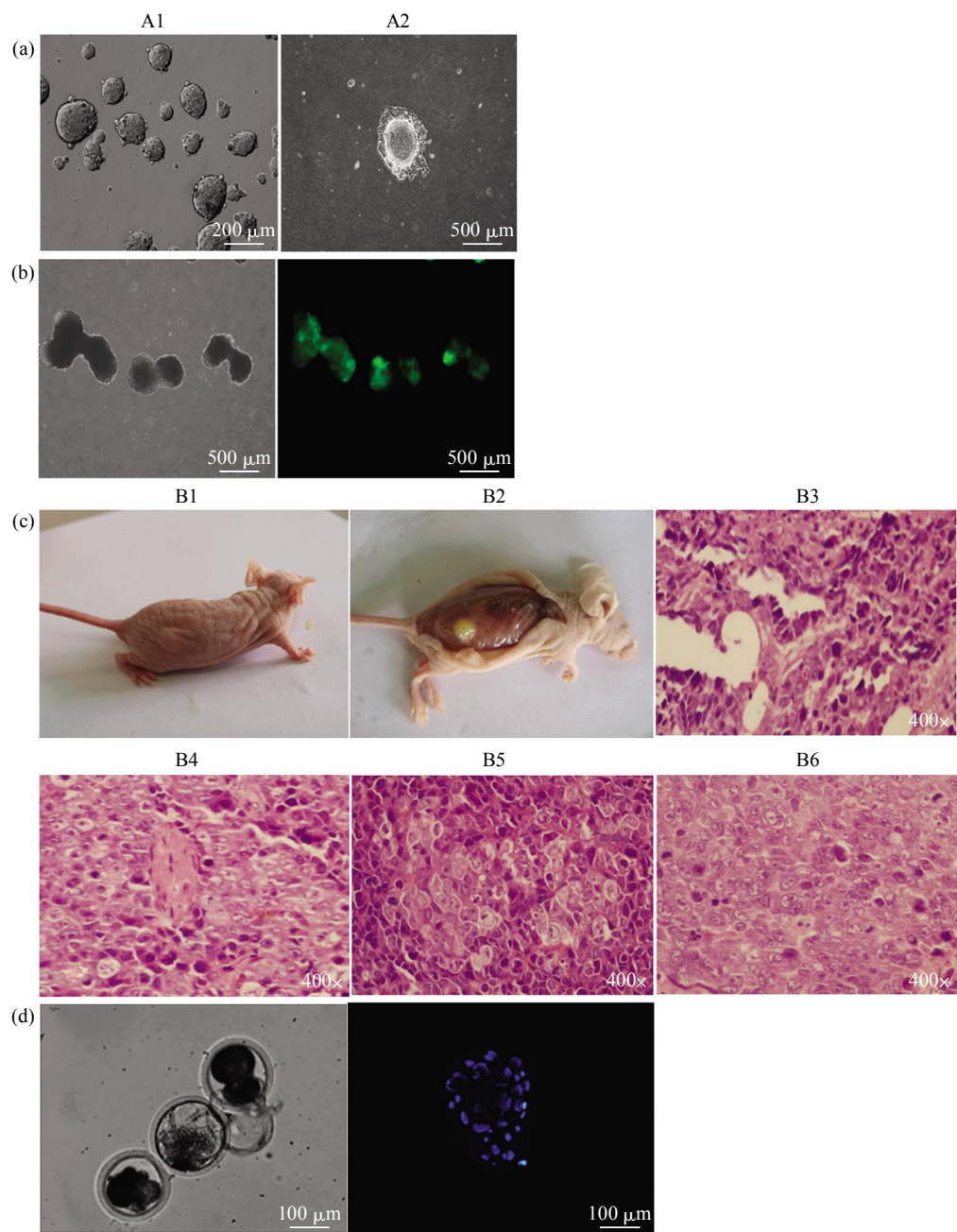


Fig. 4 *In vitro* development and *in vivo* differentiation of cell colonies

(a) Cell morphology on day 1 (A1) and day 18 (A2) after cell colonies developed into EBs. (b) Cell morphology on day 20 after cell colonies developed into EBs. (c) Formation of teratoma in BALB/C nude mice 6 weeks after subcutaneous injection of cell colonies in dorsal abdomen(B1, B2), and formation of endodermal intestine cavity-like tissue structures(B3), mesodermal muscle-like tissue structures and mesodermal bone-like tissue structures (B4, B5), ectodermal neural-like tissue structures(B6) in tumor tissues. (c) *In vitro* development of hatched blastocysts constructed by nuclear transfer from cell colonies and H33258 staining of hatched blastocysts.

3 讨 论

在人和动物的疾病中，病毒会导致一些肿瘤疾病的发生。在本研究中，慢病毒介导的 EGFP 能够在猪胎儿成纤维细胞中稳定和高效表达。但

是，慢病毒作用后的猪胎儿成纤维细胞在形态、基因表达和生长方式等方面呈现特征性变化。Hacein-Bey-Abina 等^[9]在处理严重免疫缺陷(severe combined immunodeficiency-X1, SCID-X1)的病人时发现，逆转录病毒介导的基因治疗能够导致白血病

致癌基因的激活, 逆转录病毒或慢病毒具有携带外源基因随机整合到宿主细胞基因组, 这种随机的整合会激活致癌基因或使抑癌基因失活, 从而导致细胞发生重构, 并在重构过程中发生横向分化或肿瘤的发生, 细胞在生长方式、形态特征和基因表达等方面呈现特征性变化^[10].

慢病毒感染能够导致猪胎儿成纤维细胞形成猪 iPS 细胞, 表达 AP、Oct4、Nanog、SSEA1 等干细胞的标记, 在体内分化形成畸胎瘤。其实, 研究发现, 一些肿瘤细胞同 ES 细胞没有明显的差异, 例如, 睾丸生殖细胞的肿瘤是一种恶性肿瘤, 主要发病于 15 至 34 岁的男性, 这些肿瘤组成细胞具有同人 ES 细胞相似的多能性^[11]。在机体器官和组织的许多肿瘤中包含着大量的干细胞群体, 肿瘤是许多类型干细胞的发源地^[12-13]。研究发现, 肿瘤发生的实质就是体细胞去分化重编程至胚胎或干细胞阶段^[14-15]。在本研究中, 慢病毒感染能够导致猪胎儿成纤维细胞形成猪 iPS 细胞, 分析认为, 在慢病毒作用下猪体细胞发生去分化重编程形成干细胞, 在干细胞培养的环境条件下这些干细胞呈现出稳定的生长特性, 细胞表达 Oct4 和 Nanog 等干细胞标记源于这些基因的启动子或增强子经过病毒表观遗传修饰的影响如甲基化作用^[16-17], 体细胞重构的过程实质上是启动子甲基化的状态发生了变化, 甲基化的程度决定了体细胞重构的程度^[18-21]。

在本研究中, 来源于第 4 代猪 iPS 细胞集落核型检测显示核型正常, 结果提示了慢病毒通过作用于猪胎儿成纤维细胞基因组中的一些关键基因, 改变这些基因的启动子甲基化水平, 一些关键基因的表观遗传修饰还不足以导致细胞核型的改变, 这些细胞作为核供体用于体细胞核移植能够支持重构胚发育到孵化囊胚, 显示了这些细胞在核移植重构胚发育过程中能够进一步发生重编程。

前期的研究中利用慢病毒介导 4 个限定因子诱导出牛^[22]和猪^[23]的 iPS 细胞, 但本次使用慢病毒能够直接诱导猪胎儿成纤维细胞形成 iPS 细胞而无需重构因子, 说明了 iPS 细胞具有更深的含义, 也说明了细胞重构过程的复杂性和人类对细胞重编程认识的局限性, 因此慢病毒将会成为一种理想的实验材料和工具用于细胞重编程和表观遗传修饰等方面的研究。

参 考 文 献

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, **126**(4): 663-676
- [2] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, **318**(5858): 1917-1920
- [3] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, **131**(5): 861-872
- [4] Esteban M A, Xu J, Yang J, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*, 2009, **284**(26): 17634-17640
- [5] Ezashi T, Telugu B P, Alexenko A P, *et al.* Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(27): 10993-10998
- [6] Wu Z, Chen J, Ren J, *et al.* Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*, 2009, **1**(1): 46-54
- [7] Hall V. Porcine embryonic stem cells: a possible source for cell replacement therapy. *Stem Cell Rev*, 2008, **4**(4): 275-282
- [8] Brandl U, Michel S, Erhardt M, *et al.* Transgenic animals in experimental xenotransplantation models: orthotopic heart transplantation in the pig-to-baboon model. *Transplant Proc*, 2007, **39**(2): 577-578
- [9] Haccin-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003, **302**(5644): 415-419
- [10] Seifinejad A, Tabebordbar M, Baharvand H, *et al.* Progress and promise towards safe induced pluripotent stem cells for therapy. *Stem Cell Rev*, 2010, **6**(2): 297-306
- [11] Clark A T. The stem cell identity of testicular cancer. *Stem Cell Rev*, 2007, **3**(1): 49-59
- [12] Al-Hajj M, Clarke M F. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 2004, **23**(43): 7274-7282
- [13] Caussinus E, Gonzalez C. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*, 2005, **37**(10): 1125-1129
- [14] Trosko J E. From adult stem cells to cancer stem cells: Oct-4 Gene, cell-cell communication, and hormones during tumor promotion. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, **1089**(1): 36-58
- [15] Gu G, Yuan J, Wills M, *et al.* Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor *in vivo*. *Cancer Res*, 2007, **67**(10): 4807-4815
- [16] Hattori N, Nishino K, Ko Y G, *et al.* Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem*, 2004, **279**(17): 17063-17069
- [17] Yamazaki Y, Fujita T C, Low E W, *et al.* Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, 2006, **73**(2): 180-188
- [18] Simonsson S, Gurdon J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol*, 2004, **6**(10): 984-990
- [19] Cheng J C, Matsen C B, Gonzales F A, *et al.* Inhibition of DNA

- methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst*, 2003, **95**(5): 399–409
- [20] Li L, Connelly M C, Wetmore C, *et al.* Mouse embryos cloned from brain tumors. *Cancer Res*, 2003, **63**(11): 2733–2736
- [21] Billewicz R H, Hochedlinger K, Yamada Y, *et al.* Nuclear cloning of embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(39): 13985–13990
- [22] Cao H G, Yang P, Pu Y, *et al.* Characterization of bovine induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction of reprogramming factor fusion proteins. *Int J Biol Sci*, 2012, **8**(4): 498–511
- [23] 殷慧群, 曹鸿国, 孙雪萍, 等. 限定因子诱导胎猪成纤维细胞重编程为多能性细胞. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(6): 607–612
- Yin H Q, Cao H G, Sun X P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(6): 607–612

Generation of Porcine iPS Cells From Fetal Fibroblasts by Lentivirus Without Defined Factors*

CAO Hong-Guo^{1,2)**}, CHEN Tao¹⁾, YIN Hui-Qun¹⁾, SUN Xue-Ping¹⁾, PU Yong¹⁾, YANG Pan¹⁾, ZHANG Yun-Hai^{1,2)},
LIU Ya^{1,2)}, LI Yun-Sheng^{1,2)}, TAO Yong^{1,2)}, ZHANG Xiao-Rong^{1,2)**}

⁽¹⁾College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

⁽²⁾Local Animal Genetic Resources Conservation and Bio-Breeding Laboratory of Anhui Province, Hefei 230036, China)

Abstract To investigate the effects of lentivirus on the growth and development of porcine fetal fibroblasts (PFBs), in this study PFBs were repeatedly infected by lentivirus. The results showed that lentivirus-mediated enhanced green fluorescent protein (EGFP) had stable and efficient expression in PFBs. Under the condition with leukemia inhibitory factor (LIF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), some PFBs gradually changed their fibrous growth pattern into round cell morphology. These round cells proliferated and formed cell clones with clear edge boundary. Clones grew rapidly on feeder layers and passaged stably with normal karyotypes. These cells were positive for alkaline phosphatase (AP) and expressed stem cell markers Oct4, Nanog, and SSEA1. In addition, these cells formed embryoid bodies (EB) *in vitro* and three germ layers *in vivo*. After the cells were used as nuclear donors, the cleavage rate of the cloned embryos was 53.33%, the morula rate 9.03%, the blastocyst rate 2.07%, and the total cell number per hatched blastocyst was 26.5. Compared with embryos cloned from non- lentivirus PFBs, the morula rate and blastocyst rate were lower and significantly different ($P < 0.05$). Lentivirus can result in the generation of porcine iPS cells from PFBs, so it can be used as ideal material and tool for research such as epigenetic modification and cell reprogramming.

Key words lentivirus, porcine iPS cells, fetal fibroblasts

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00091

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30800784), National Basic Research Program of China (2009CB941004), Hi-Tech and Development Program of China (2008AA101003, 2008AA101010, 2011AA100307) and National Transgenic Breeding Program (2009ZX08008-007B).

**Corresponding author.

CAO Hong-Guo. Tel: 86-551-5786357, E-mail: caohongguo1@yahoo.com.cn

ZHANG Xiao-Rong. Tel: 86-551-5785543, E-mail: zxr@ahau.edu.cn

Received: April 16, 2012 Accepted: June 15, 2012