

· 综述 ·

# 异种嵌合体的前世今生与未来

于静, 杨杨\*

南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 在发育生物学中, 嵌合体是指在同一个个体内, 由基因型不同的细胞或组织相互接触且维持各自并存的混合状态。如果细胞来自不同的物种, 所组成的个体就被称为异种嵌合体, 也称为种间嵌合体。如果细胞来自同一物种, 则称为同种嵌合体, 也叫种内嵌合体。本文着眼于异种嵌合体, 首先介绍了异种嵌合体的起源, 随后就不同干细胞来源的异种嵌合体的发展和形成异种嵌合体的关键因素进行了深入分析, 并对异种嵌合体在研究领域的应用和临床发展前景进行了展望。

**[关键词]** 异种嵌合体; 多潜能性干细胞; 多能干细胞; 发育潜能

**[中图分类号]** R329

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)01-128-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200127

## The past, present and future of interspecies chimaeras

YU Jing, YANG Yang\*

State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** In developmental biology, chimera refers to the mixed state that cells or tissues with different genotypes contact and coexist in the same individual. If the cells come from different species, the individual is called interspecies-chimera, whereas the chimera composed of cells coming from the same species is called the intraspecies-chimera. In this paper, we review the origin of the interspecies-chimera, and analyze the development progress of the interspecies-chimera from different types of stem cells and the key factors of their formation. The application of the interspecies-chimera in research fields and their clinical development are envisaged.

**[Key words]** interspecies chimaeras; pluripotent stem cells; multipotent stem cells; development potential

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(01): 128-132]

### 1 异种嵌合的起源

1973年, Garder和Johnson<sup>[1]</sup>第一次尝试用大鼠和小鼠的胚胎获得异种嵌合体。他们将大鼠的内细胞团细胞(inner cell mass, ICM)注射入小鼠的囊胚中, 再移植入小鼠的子宫内, 得到有大鼠细胞参与小鼠胚胎发育的嵌合体, 并以此嵌合体作为研究哺乳动物早期胚胎发育的研究模型<sup>[2]</sup>。但随着嵌合体的发育, 大鼠细胞在小鼠胚胎中所占的比例越来

越低, 这可能是由于不同物种的发育速度有差异导致的。1980年, Rossant等<sup>[3]</sup>通过对小家鼠和田鼠进行囊胚注射, 也成功获得异种嵌合体。该团队在后续研究中发现, 与同种嵌合体相比, 异种嵌合体需要克服种间障碍。他们将完整的田鼠囊胚移植到小家鼠子宫内发现胚胎不能正常发育, 而用田鼠的ICM和小家鼠的滋养外胚层细胞重新组装成一个新的囊胚移植到小家鼠子宫内, 则可以获得田鼠后代。这说明, 用着床前胚胎作为受体细胞构建异种嵌合体需要保证滋养外胚层细胞与母体子宫相匹配<sup>[4]</sup>。

这些研究使越来越多的科学工作者们意识到早期的异种嵌合研究可以帮助人们在体内环境理

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31801205); 江苏省自然科学基金(BK20180677)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: yyalicell@126.com

解生物进化过程中物种的保守性和特异性,同时也是研究胚胎发育过程中细胞命运和分化方向的辅助工具。自此,哺乳动物异种嵌合技术开始发展。

## 2 异种嵌合体与干细胞

干细胞是具有自我复制和分化潜能的一类细胞。根据其分化潜能的高低可以被分为全能性干细胞、多潜能性干细胞(pluripotent stem cell, PSC)、多能干细胞(multipotent stem cell, MSC)和单能干细胞。其中,根据PSC起始细胞来源的不同,又可以分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和诱导的多潜能性干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)两大类。干细胞因自身具有强大的分化潜能,被认为可以参与异种嵌合体的形成。通常是将MSC或PSC作为供体注射到胚胎、胎儿或出生后发育阶段的受体动物体内,从而形成嵌合。根据供体细胞类型和宿主发育阶段的不同,嵌合体的组织分布和持续时间往往也不同。

### 2.1 异种嵌合与PSC

#### 2.1.1 naive和primed概念的提出

PSC是一类具有向内、中、外3个胚层细胞分化能力的细胞。2008年Lahn和他的同事通过将姬鼠的ESC注射进小家鼠的胚胎,获得了第1个由干细胞和胚胎形成的异种嵌合体<sup>[5]</sup>。随后人们进一步发现注射ESC的嵌合率要高于内细胞团细胞,并且ESC对受体后期发育有着较高的贡献。自此,人们开始越来越多地利用PSC来制备异种嵌合体。

ESC作为一种典型的PSC,被认为可以与胚胎形成嵌合体。目前,人们已经可以从啮齿类动物、人或者非人类灵长类动物的着床前胚胎中获得稳定的ESC细胞系<sup>[6]</sup>,但与啮齿类动物的ESC不同,在很长的一段时间内,人和非人类灵长类动物的ESC被证明没有形成同种或异种嵌合体的能力,说明不同物种的ESC发育潜能不同,即处于不同的多潜能性状态。基于此,2009年Nichols和Smith<sup>[7]</sup>提出了primed和naive这两个概念来区分该状态。其中,经典的小鼠ESC属于naive状态,其基因表达谱与着床前胚胎的ICM细胞的基因表达谱最为接近,生长特性、干性维持的分子机制也类似。而经典的人ESC则被认为属于primed PSC,此外,由E5.5~E7.5的小鼠胚胎上胚层(epiblast)体外特化为细胞系的小鼠上胚层干细胞(epiblast stem cell, EpiSC)也属于这类。

虽然primed状态的PSC也具有分化为多种细胞

类型的能力,但被注射入囊胚中后,细胞不能参与胚胎的发育,不会形成嵌合体。但如果将primed状态的PSC注射到植入后的胚胎上胚层区,则可以形成嵌合体。非人类灵长类动物胚胎来源的PSC也具有primed特性,因而也不能与着床前胚胎形成嵌合体<sup>[8]</sup>。Mascetti和Pedersen<sup>[9]</sup>将人PSC注射入原肠期的小鼠胚胎,干细胞能够克服嵌合障碍,参与3个胚层正常发育,形成植入后的人鼠异种嵌合体。这进一步表明异种嵌合体的形成受到严格的时空限制。

#### 2.1.2 naive状态的人类ESC的出现

小鼠的ESC和EpiSC是代表两种不同多潜能性状态的细胞,ESC可以在体外被诱导为EpiSC样的primed细胞,这表明naive和primed PSC之间可以实现相互转换。但是由于表观遗传障碍等原因,反向转换具有一定的挑战性。为了提高人PSC的异种嵌合能力和深入探究人类胚胎发育的过程,人们开启了寻找naive状态的人PSC之旅<sup>[10]</sup>。2010年,Buecker等<sup>[11]</sup>通过LIF诱导人iPSC(hiPSC)进一步进行重编程,得到naive状态的人PSC。同一时间,Hanna等<sup>[12]</sup>用2i/LIF条件培养hESC,并诱导转录因子OCT4、KLF4、KLF2过表达,从而获得具有类似naive特性的细胞,这些细胞具有较高的单细胞克隆效率以及mESC的一些特性,但稳定性较差。此后的3年间,该领域陷入研究瓶颈,直至2013年12月,以色列的Jacob Hanna团队利用多个化学小分子及细胞因子,终于实现了从着床前的人囊胚中获得真正的naive hESC,并证明该类细胞在被注射入小鼠的着床前胚胎后,可以形成异种嵌合体<sup>[13]</sup>。此后,数家团队分别发表了他们各自这方面的工作<sup>[14-15]</sup>,Theunissen等<sup>[16]</sup>联合5种激酶抑制剂作用于hESC,诱导NANOG和KLF2的过表达,提高细胞H3K27me3水平和多潜能性相关基因的表达。该领域也逐步揭秘naive多潜能性状态的分子调控机制,例如Qin等<sup>[17]</sup>发现YAP可以调控WNT信号通路,从而参与调控人源细胞的naive状态,增加naive状态人PSC的自我复制能力。经过近8年的研究,已经发现可以通过多种途径促使人PSC从primed状态转变为naive状态<sup>[18]</sup>。由于非人类灵长类动物和啮齿动物的发育具有很大差异,naive状态的人PSC的特性更倾向于灵长类动物的PSC,与小鼠的naive细胞还是存在一定差异<sup>[19]</sup>。用naive状态的人PSC构建植入前的异种嵌合体的效率远低于使用naive状态的小鼠胚胎干细胞。

#### 2.1.3 超潜能性干细胞的双向嵌合能力

2017年,一种名为超潜能性干细胞(extended

pluripotent stem, EPS)的特殊细胞被发现,这种细胞突破了传统PSC不能参与胚外组织发育的限制,可以向胚内和胚外双向发育,再次拓宽了PSC的类别及发育潜能<sup>[20]</sup>。该团队通过筛选出LIF、CHIR99021、(S)-(+)-Dimethindene maleate和Minocycline Hydrochloride 4种可以调节干性基因表达的化学小分子/细胞因子,促使naive状态的小鼠ESC和primed状态的人PSC转化为超潜能性干细胞。小鼠EPS细胞通过了严格的四倍体补偿实验,可以产生具有繁殖能力的嵌合体。人EPS细胞同样和小鼠胚胎形成异种嵌合体,并参与胚胎组织和胚外组织的发育。基因表达谱分析发现,相较于naive和primed细胞,EPS细胞与8-细胞期胚胎及桑葚胚更接近。说明EPS细胞是一种具有独特基因表达谱的PSC。但该篇文章对于这种特殊的多潜能性状态的分子调控机制则未能充分阐述。

#### 2.1.4 DUX转录因子家族参与分化潜能的调控

通过分析哺乳动物胚胎早期发育的基因调控网络发现,DUX转录因子家族参与调控合子基因组激活,也对小鼠和人的多潜能性状态的调控起到不可或缺的作用<sup>[21]</sup>。DUX在人和小鼠胚胎2-细胞阶段表达活跃,激活卵裂球阶段的大量内源性基因(如ZSCAN4、ZFP352、KDM4E)和MERVL家族。诱导小鼠ESC高表达DUX,会造成OCT4蛋白和染色质中心的缺失,同时使染色体呈现出一种高度开放状态,便于调控元件的作用,使小鼠ESC向早期2-细胞胚胎样细胞的状态靠近<sup>[22]</sup>。不过这种类2-细胞胚胎样PSC的嵌合能力还有待研究。

### 2.2 异种嵌合与MSC

MSC是一类发育受限的干细胞,具有分化为特定细胞系或组织细胞类型的能力,因而也被认为具有嵌合能力。但是,MSC由于分化潜能受限,通常是通过子宫注射或原位注射进行异种嵌合,可被用于评估细胞的干性和作用机制等方面的研究。

#### 2.2.1 通过神经嵴细胞建立异种嵌合体模型

神经嵴细胞(neural crest cell, NCC)是胚胎发育过程中位于神经管和表皮之间的一种MSC。将人的NCC注射入带有c-Kit基因突变的无黑色素原的小鼠原肠期胚胎中,NCC可以沿着胚胎的腹侧迁移,形成小鼠-人的神经嵴嵌合体,若发育后的新生小鼠的毛发带有颜色,说明NCC有一部分最终分化为黑色素细胞,也说明人的NCC参与了小鼠胚胎的发育<sup>[23]</sup>。其他物种如大鼠的NCC也可以注射入小鼠胚胎形成大鼠-小鼠异种嵌合体。

#### 2.2.2 通过人类造血干细胞建立异种嵌合体模型

人的造血干细胞(haematopoietic stem cell, HSC)具有分化成各类成熟血细胞的潜能,是存在于血液系统的一种成体干细胞,被广泛用于免疫缺陷病的治疗。将HSC注射入免疫缺陷的小鼠体内形成嵌合体,可以评估细胞的免疫功能和分化能力。人-猪造血嵌合体等模型也已构建成功,可被用来研究人类的造血作用<sup>[24]</sup>。

### 3 异种嵌合体形成的关键因素

在异种嵌合体,尤其是PSC的研究历程中,嵌合比例是人们所关心的一大问题。以下几个因素对嵌合比例的高低至关重要。

#### 3.1 相互匹配的发育时间

嵌合是将供体细胞移植入受体组织内,此时供体细胞和受体组织的发育阶段应当匹配<sup>[25]</sup>。这可以解释为什么小鼠的ESC可以和受体囊胚形成嵌合体——小鼠ESC的特性与植入前胚胎的ICM细胞的发育状态相近;但小鼠上胚层样干细胞不能与植入前胚胎形成嵌合体,却可以参与植入后受体胚胎3个胚层的发育,这是因为小鼠上胚层样干细胞特性与植入后胚胎的上胚层细胞特性相近。此外小鼠上胚层样干细胞也不能与E8.5的胚胎形成嵌合体,这是由于E8.5的胚胎已经丧失了某些发育潜能,二者的发育状态不匹配<sup>[26]</sup>。例如,有团队尝试将大鼠的iPSC注射入小鼠E6.5的胚胎,从E6.5到E9.5,即使处于小鼠的发育环境,大鼠iPSC依然可以分化为各种类型的细胞。但E9.5之后,小鼠的胚盘组织环境阻止大鼠iPSC进一步参与胚胎发育。即嵌合程度随着发育的进行和发育阶段的改变而逐渐降低。将小鼠iPSC注射入大鼠的胚胎也发生相似的情况<sup>[27]</sup>。因此,受体组织所处发育阶段的环境不同,对供体细胞的作用不同,匹配的发育时间有利于嵌合的进行。

#### 3.2 物种间的进化差异

大鼠ESC属于naive状态的PSC,可以与小鼠的囊胚形成大小鼠囊胚嵌合体,并可以发育成为成熟个体,这是由于大鼠和小鼠的物种间亲缘关系较近,所以嵌合程度好。传统嵌合用啮齿动物作为受体组织来研究,因而人们认为获得naive多潜能状态是解决异种嵌合障碍的关键。Wu等<sup>[28]</sup>尝试将大鼠ESC注射入猪的囊胚中,令人吃惊的是大鼠的ESC并没有参与猪胚胎的发育,嵌合失败。这表明啮齿动物的PSC对啮齿动物的胚胎有很强的嵌合能力,

但对于其他哺乳动物的胚胎,如猪的囊胚,则有嵌合障碍。这可能是猪与大鼠的物种差异较大造成的。同样地,将naive状态的人PSC用激光辅助的方法分别注入猪或者牛的植入前囊胚,前者很难形成嵌合,而后者却可以。这表明相比于猪,牛的囊胚提供的发育环境更适合供体细胞的分化。这种差异可能也是由物种的进化差异造成的,人和猪的种间差异要大于人和牛<sup>[28]</sup>。

### 3.3 供体细胞在受体胚胎内具有优势

改变受体组织的状态,创造一个有利于供体细胞生长的环境,同时给受体组织选择性压力,可以帮助嵌合体的形成<sup>[29]</sup>。例如,将原始生殖样干细胞注入有内源性生殖细胞缺陷的小鼠睾丸内,可以分化为精子<sup>[30]</sup>。又如前文提到的将人NCC注入无黑色素原的小鼠胚胎中,人NCC将特化为黑色素细胞,也促进人-鼠异种嵌合体的形成<sup>[23]</sup>。

## 4 异种嵌合体的应用展望

### 4.1 作为干细胞和胚胎发育的研究模型

异种嵌合体形成实验是评估细胞分化潜能的一种方法,可以作为干细胞和胚胎发育的研究模型。由于受伦理规范的限制和取材的困难,对于人胚胎发育的直接研究一直发展缓慢,通过将人的细胞注入其他动物胚胎中形成异种嵌合体,可以模拟人的胚胎发育,帮助人们更好地理解胚胎发育的机制和机体内稳态。

此外,异种嵌合体在其他方面也有应用。将携带患者病变基因的PSC注射到小鼠胚胎中,研究其在体内环境导致人类疾病发生的多基因突变,将能帮助我们更好地了解该疾病的起始、进展和表现。但是,这一研究模型的缺点是宿主特异性的发育和生理程序可能会改变供体及人体细胞的行为<sup>[31]</sup>。

### 4.2 提供个体特异性器官

目前,人们致力于通过异种嵌合体获得个体特异性的器官,为广大患者提供可供移植的器官,这也是再生医学的目标之一。将大鼠PSC注入Pdx1基因缺陷的小鼠囊胚中,可以得到完全由大鼠PSC分化、发育而来的正常大鼠胰腺器官<sup>[32]</sup>。这是第1例在受体中获得供体细胞来源的器官的实验,证明种间囊胚互补的可能性。因此,人们设想,如果将患者的PSC注入某器官重要发育基因缺陷的大型动物胚胎中,有望在大动物体内获得患者PSC来源的器官,不仅可以解决可供移植的人体器官短缺的问题,同时可以避免人的异体器官移植所带来

的免疫排斥问题<sup>[33]</sup>。

要实现这个目标,要解决两个问题,一是找到具有较高嵌合能力的人PSC或者是MSC,二是理解阻碍人的干细胞作为供体细胞形成异种嵌合体的种间屏障。现阶段的研究已经可以通过多种途径得到naive状态的人PSC。这种细胞与经典的处于primed状态的人PSC相比,发生了表观基因的重置和转录因子的重组以提供无偏差发育环境,因此有更高的嵌合能力。这一突破为异种移植带来了希望。此外,要通过种间囊胚互补技术得到人体器官,需要使用适宜的大型动物而非啮齿类动物。猪和羊在器官大小、繁殖潜力、繁殖成熟期等方面与人相近,是较为合适的受体动物。利用基因工程和克隆技术对受体动物进行处理,能够克服种间隔离的障碍,实现囊胚嵌合<sup>[34]</sup>。比如,通过CRISPR/Cas9技术敲除绵羊卵母细胞的Pdx1基因,可以诱导绵羊的胰腺发育障碍。这种基因缺陷的绵羊可以作为得到人PSC特化而成的胰腺器官的良好容器<sup>[35]</sup>。

当然,通过异种嵌合和囊胚互补技术得到人类器官还未得到直接的证实。一些问题如人与近源性物种是否可以形成广泛的嵌合,不同物种间的发育速度差异等多种因素造成的问题还有待解决。

### 【参考文献】

- [1] GARDNER R L, JOHNSON M H. Investigation of early mammalian development using interspecific chimaeras between rat and mouse [J]. *Nat New Biol*, 1973, 246 (151):86-89
- [2] GARDNER R L, JOHNSON M H. Investigation of cellular interaction and deployment in the early mammalian embryo using interspecific chimaeras between the rat and mouse [J]. *Ciba Found Symp*, 1975, 29:183-200
- [3] ROSSANT J, FRELS W I. Interspecific chimeras in mammals: successful production of live chimeras between *Mus musculus* and *Mus caroli* [J]. *Science*, 1980, 208 (4442): 419-421
- [4] ROSSANT J, MAURO V M, CROY B A. Importance of trophoblast genotype for survival of interspecific murine chimaeras [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1982, 69: 141-149
- [5] XIANG A P, MAO F F, LI W Q, et al. Extensive contribution of embryonic stem cells to the development of an evolutionarily divergent host [J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17 (1):27-37
- [6] 胡菲菲, 张 纬, 欧阳琦, 等. 稳定表达红色荧光蛋白的人胚胎干细胞系的建立 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(7):868-873
- [7] NICHOLS J, SMITH A. Naive and primed pluripotent states

- [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6):487-492
- [8] TAKAHASHI S, KOBAYASHI S, HIRATANI I. Epigenetic differences between naïve and primed pluripotent stem cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(7):1191-1203
- [9] MASCEZZI V L, PEDERSEN R A. Human-mouse chimerism validates human stem cell pluripotency [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(1):67-72
- [10] MASCEZZI V L, PEDERSEN R A. Contributions of mammalian chimeras to pluripotent stem cell research [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(2):163-175
- [11] BUECKER C, CHEN H H, POLO J M, et al. A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(6):535-546
- [12] HANNA J, CHENG A W, SAHA K, et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(20):9222-9227
- [13] GAFNI O, WEINBERGER L, MANSOUR A A, et al. Derivation of novel human ground state naïve pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2013, 504(7479):282-286
- [14] WARE C B, NELSON A M, MECHAM B, et al. Derivation of naïve human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(12):4484-4489
- [15] FONSECA S A, COSTAS R M, PEREIRA L V, et al. Search for naïve human pluripotent stem cells[J]. *World J Stem Cells*, 2015, 7(3):649-656
- [16] THEUNISSEN T W, POWELL B E, WANG H, et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naïve human pluripotency [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(4):471-487
- [17] QIN H, HEJNA M, LIU Y, et al. YAP induces human naïve pluripotency[J]. *Cell Rep*, 2016, 14(10):2301-2312
- [18] TRUSLER O, HUANG Z, GOODWIN J, et al. Cell surface markers for the identification and study of human naïve pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res*, 2018, 26:36-43
- [19] BOROVIK T, NICHOLS J. Primate embryogenesis predicts the hallmarks of human naïve pluripotency [J]. *Development*, 2017, 144(2):175-186
- [20] YANG Y, LIU B, XU J, et al. Derivation of pluripotent stem cells with in vivo embryonic and extraembryonic potency[J]. *Cell*, 2017, 169(2):243-257.e25
- [21] DE IACO A, PLANET E, COLUCCIO A, et al. DUX-family transcription factors regulates zygotic genome activation in placental mammals [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(6):941-945
- [22] HENDRICKSON P G, DORÁIS J A, GROW E J, et al. Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage - stage genes and MERVL/HERVL retrotransposons [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(6):925-934
- [23] COHEN M A, WERT K J, GOLDMANN J, et al. Human neural crest cells contribute to coat pigmentation in interspecies chimeras after in utero injection into mouse embryos [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(6):1570-1575
- [24] FUJIKI Y, FUKAWA K, KAMEYAMA K, et al. Successful multilineage engraftment of human cord blood cells in pigs after in utero transplantation [J]. *Transplantation*, 2003, 75(7):916-922
- [25] COHEN M A, MARKOULAKI S, JAENISCH R. Matched developmental timing of donor cells with the host is crucial for chimera formation [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(5):1445-1452
- [26] HUANG Y, OSORNO R, TSAKIRIDIS A, et al. *In vivo* differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(6):1571-1578
- [27] YAMAGUCHI T, SATO H, KOBAYASHI T, et al. An interspecies barrier to tetraploid complementation and chimera formation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):15289
- [28] WU J, PLATERO-LUENGO A, SAKURAI M, et al. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells article interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2017, 168(3):473-486
- [29] SUCHY F, NAKAUCHI H. Lessons from interspecies mammalian chimeras [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33:203-217
- [30] HAYASHI K, OHTA H, KURIMOTO K, et al. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2011, 146(4):519-532
- [31] WU J, GREELY H T, JAENISCH R, et al. Stem cells and interspecies chimeras [J]. *Nature*, 2016, 540(7631):51-59
- [32] KOBAYASHI T, YAMAGUCHI T, HAMANAKA S, et al. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2010, 142(5):787-799
- [33] DE L A, Pho N, Redmond DE. generating human organs via interspecies chimera formation: advances and barriers [J]. *Yale J Biol Med*, 2018, 91(3):333-342
- [34] COOPER D K. A brief history of cross-species organ transplantation [J]. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 2012, 25(1):49-57
- [35] VILARINO M, RASHID S T, SUCHY F P, et al. CRISPR/Cas9 microinjection in oocytes disables pancreas development in sheep [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):17472