



张明亮博士, 上海交通大学医学院组织胚胎学与遗传发育学系研究员、博士生导师, 上海市生殖医学重点实验室特聘研究员, 中国医师协会眼科分会基础研究与临床转化专业委员会学组委员, 中国医药生物技术协会神经修复与再生分会委员, 中国细胞生物学会青年工作委员会委员。研究聚焦于利用化学手段诱导产生神经系统的干/祖细胞和终末分化细胞, 并将化学策略应用于体内, 实现内源性神经修复与再生。相关成果发表在 *Cell Stem Cell* 等国际学术期刊上。

<https://www.shsmu.edu.cn/cbms/info/1063/2849.htm>

## 脑类器官技术的发展与应用

宋奕萱<sup>1,2</sup> 张明亮<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>上海交通大学医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海 200025; <sup>2</sup>上海市生殖医学重点实验室, 上海 200025)

**摘要** 脑类器官是由多能干细胞在三维培养条件下, 通过添加神经发育相关调控信号而分化产生的与脑的细胞组成、解剖结构相似, 并可以体现出类脑的发育进程及生理、病理和药理等特征的细胞培养物, 是迄今在体外研究人脑发育与相关疾病, 并开展药物筛选的良好模型。伴随着技术发展, 脑类器官在研究脑发育与疾病, 不同脑区以及脑与其他组织/器官间的相互作用, 脑进化等多个方面发挥重要作用。该文综述了脑类器官的发展历程, 及其在探索脑发育、疾病模拟和药物筛选等方面的进展。

**关键词** 脑类器官; 脑发育; 脑疾病模拟; 药物筛选; 三维培养

## Progression and Application of Brain Organoid Technology

SONG Yixuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Mingliang<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Histoembryology, Genetics, and Developmental Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; <sup>2</sup>Shanghai Key Laboratory of Reproductive Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract** By following developmental principles, brain organoids can be generated from pluripotent stem cells under three-dimensional culture conditions with sequential modulations of neural development-related regulatory signals. Brain organoids resemble, at least in part, brain tissue, in regarding to their cell composition and anatomical structure that recapitulate regions of the cortex observed in brains, and thus are considered as an ideal *in*

收稿日期: 2021-04-02 接受日期: 2021-05-20

国家自然科学基金(批准号: 32070866、31771643)、国家重点研发计划(批准号: 2020YFA0113101)、上海市科委基础研究领域项目(批准号: 19JC1413200)和上海高校东方学者特聘教授项目(批准号: 1710000009)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-54562516, E-mail: mingliang.zhang@shsmu.edu.cn

Received: April 2, 2021 Accepted: May 20, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32070866, 31771643), the National Key R & D Program of China (Grant No.2020YFA0113101), the Basic Research Program of Shanghai Science and Technology Committee (Grant No.19JC1413200), and the Program for Professor of Special Appointment (Eastern Scholar) at Shanghai Institutions of Higher Learning (Grant No.1710000009)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54562516, E-mail: mingliang.zhang@shsmu.edu.cn

*vitro* model to decipher the development mechanism, as well as roots of neurological disorders of brain. In addition, by using the organoids resembling individual brain domains, brain organoids can be used to explore the interactive cross-talk of brain with different regional information, or with other tissues/organs. Furthermore, through multi-omics analysis across species in a comparative way, evolution of brain is investigated with brain organoids. This article reviews recent progresses of brain organoids, particularly on brain development, disease modeling, and drug screening.

**Keywords** brain organoids; brain development; brain disease modeling; drug screening; three-dimensional culture

2013年, LANCASTER等<sup>[1]</sup>将多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)在悬浮条件下成功培养产生了具有类似大脑结构特征的三维培养物, 并将其命名为脑类器官(cerebral organoids)。脑类器官与脑的细胞组成、解剖结构相似, 并能模拟脑的发育进程, 体现脑的生理、病理和药理等特征<sup>[2]</sup>。在过去几年中, 脑类器官技术已经实现了从非定向的全脑类器官(unguided brain organoids), 逐步向皮质、海马、中脑、小脑、脊髓等具有区域特征的脑类器官(region-specific brain organoids)的过渡, 并实现了脑类器官的血管化<sup>[3-9]</sup>, 进而将代表不同脑区的脑类器官或脑与其他组织类器官进行融合, 更好地模拟不同脑区的解剖结构、生理特征、脑区间的相互作用, 以及脑与其他组织器官的调控关系<sup>[10]</sup>。脑类器官技术的产生既弥补了传统二维细胞培养无法模拟脑组织复杂结构和体内微环境、难以重现神经系统疾病复杂表型的缺陷, 又突破了动物模型缺乏人类特有的遗传特性、大脑区域和功能, 无法真实全面地模拟人脑的发育和疾病发生发展的局限, 是迄今在体外研究人脑发育、进化, 探究不同脑区、脑与其他器官的相互作用, 并在体外开展疾病模拟和药物筛选的重要工具<sup>[11]</sup>。本文将回顾脑类器官建立和发展的历程, 介绍脑类器官在探索脑发育、神经系统疾病模拟和药物筛选等方面的进展, 并分析未来可能的发展方向。

## 1 脑类器官模型的建立及发展

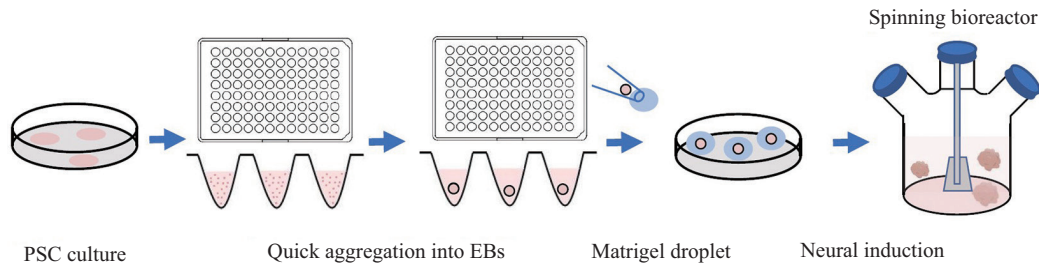
### 1.1 非定向脑类器官

脑类器官技术是在多能干细胞形成的拟胚体技术的基础上发展起来的用以更好地模拟脑的结构和生理特征的三维细胞培养技术。利用悬浮培养的方式, PSCs在缺乏维持多能性的条件下自发形成拟胚体, 其中包含类似于胚胎发育早期所具有的外、

中、内3个胚层的细胞, 并可以模拟胚层间细胞的相互诱导作用。2008年, SASAI团队<sup>[12]</sup>发现, 在无血清的悬浮培养(serum-free culture of embryoid body-like quick-aggregation, SFEBq)条件下产生的拟胚体在加入特定生长因子诱导后, 可以形成具有顶端-基底极性的皮质样结构, 并产生皮质祖细胞和功能性神经元。随后该团队利用SFEBq方法, 通过抑制Notch通路, 分别对小鼠和人的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)进行诱导获得了具有视网膜类似结构和细胞组成的视杯结构, 在一定程度上模拟了视网膜的发育过程, 也为脑类器官的建立奠定了基础<sup>[13-14]</sup>。

基于SFEBq技术, LANCASTER等<sup>[1]</sup>将神经分化诱导后的拟胚体包埋入基质胶(matrigel), 在悬浮培养过程中添加神经发育相关的调控信号, 之后将拟胚体转移至生物反应器中, 经长期神经分化培养后得到了在细胞组成和结构上更为复杂的细胞培养物(图1), 包含类似于大脑皮质、脉络丛(choroid plexus)、海马、视网膜的细胞, 并表达对应脑区特征性标记物。对背侧皮质区域进行分析发现, 其中含有人脑发育过程中特有的富含外层放射状胶质细胞(outer radial glia, oRG)的外室管膜下区(outer subventricular zone, oSVZ), 可观察到oRG的核动态迁移(interkinetic nuclear migration, IKNM)行为, 且可诱导出成熟的深层、浅层皮质神经元亚型。LANCASTER等<sup>[1]</sup>将这种能模拟脑的结构组成和发育进程的三维培养物命名为“脑类器官(cerebral organoids)”。该工作首次利用人多能干细胞构建了脑类器官, 并将脑类器官用于研究脑发育过程以及疾病建模, 具有里程碑式的意义。

为了更好地体现脑的结构层次, SASAI团队<sup>[3]</sup>通过同时抑制WNT和转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ), 选择性地诱导PSCs不断向神经上皮细胞分化, 使得皮质组织自发地沿背尾腹



脑类器官可以通过SFEBq技术,将PSC形成的拟胚胎包埋入基质胶,在悬浮培养中添加神经发育相关的调控信号诱导,在旋转生物反应器中经过长期神经分化培养后获得。

Brain organoids could be obtained from embryoid bodies which were originated from pluripotent stem cells and embedded in matrix gel, with addition of neural development-related regulatory signals in spinning bioreactor through long-term culture.

图1 脑类器官培养流程图

Fig.1 The flow chart illustrating the generation of brain organoids

侧轴形成极性,随后折叠形成包括脑室区(ventricular zone)、脑室下区(subventricular zone)、中间区(intermediate zones) 3个祖细胞区,以及底板(subplate)、皮质板(cortical plate)、Cajal-Retzius 3个神经元区的多层结构,并将其命名为皮质类器官(cortical organoids)。与LANCASTER构建的脑类器官相比,SASAI团队选择性地诱导皮质的生成,并产生相对复杂的皮质形态,但仍不能准确模拟人类大脑皮质分层的现象。QIAN等<sup>[4]</sup>通过添加脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)、TGF- $\beta$ 、环磷腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)等诱导产生的皮质类器官可模拟皮质组织的六层结构。目前所构建的皮质类器官主要含有神经祖细胞、中间神经祖细胞、胶质细胞、谷氨酸能神经元和 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)能神经元,并形成具有功能的神经网络,由此证明皮质类器官能够模拟人皮质发育和功能<sup>[15]</sup>。然而,皮质类器官目前最多可培养至4 mm左右,内部氧气和营养物质的缺乏使得皮质类器官的生长和分化受到了限制<sup>[14]</sup>。为了解决这个问题,QIAN等<sup>[16]</sup>通过切片的方法,将球形类器官剪切成圆盘状,使得类器官内部能暴露于培养环境中,从而有效解决了类器官中心区细胞死亡的问题。由此,oSVZ区的oRG能持续进行放射状迁移,以及神经生成和皮质扩展,模拟了孕晚期人类皮质发育的特征。在另一项研究中,PHAM等<sup>[17]</sup>通过matrigel将同一起来源的诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)衍生的血管内皮细胞包覆在脑类器官表面,共培养3~5周后移植到免疫缺

陷小鼠脑内。2周后发现,人源CD31<sup>+</sup>血管内皮细胞从表面向脑类器官核心区渗透,实现了脑类器官移植后在体内的血管化。在体外脑类器官是否可以实现血管化呢?CAKIR等<sup>[9]</sup>利用过表达转录因子ETS变体2(E26 transformation-specific variant 2, ETV2)的hESCs与野生型hESCs按照一定比例混合后再培养成脑类器官的方法,使脑类器官中含有ETV2的hESCs向血管内皮细胞分化。SHI等<sup>[18]</sup>利用人脐静脉内皮细胞与hPSCs共培养也成功构建了血管化的脑类器官。利用上述方法培养的血管化脑类器官模拟了脑内的血管网络,减少了中心细胞凋亡,提高了神经细胞存活率,并可用于探究体外血脑屏障的功能,具有重要的应用价值。

除神经元外,研究人员致力于在脑类器官中分化产生胶质细胞,来更好地模拟大脑的细胞组成。少突胶质细胞在中枢神经系统中发挥包绕轴突、形成髓鞘结构、协助生物电信号的跳跃式高效传递,以及维持和保护神经元正常功能的作用。其数量不足或髓鞘化能力缺失会导致中枢神经系统脱髓鞘病变,引起神经元损伤。因此,构建含有少突胶质细胞的脑类器官具有重要意义。单细胞转录组分析表明,早先构建的脑类器官存在少量的少突胶质祖细胞(oligodendrocyte progenitor cells, OPCs)<sup>[19-20]</sup>,也可分离出极少量的少突胶质细胞<sup>[6]</sup>,但髓鞘化作用较弱。为了产生成熟的少突胶质细胞并模拟脱髓鞘疾病,TESAR<sup>[21]</sup>和PASCA<sup>[22]</sup>团队分别在皮质类器官基础上,利用血小板衍生生长因子-AA(platelet-derived growth factor-AA, PDGF-AA)和胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)扩增OPCs群体,然后在甲状腺激素T3的作用下诱导少突胶质细

胞分化, 通过三维培养诱导产生了功能性少突胶质细胞。该类器官表现出与体内胶质发育类似的发育进程, 可模拟遗传突变导致的脱髓鞘疾病, 并在促髓鞘化药物作用下体现出少突胶质细胞诱导增加和髓鞘化加强的表型, 实现了药物的疗效评价, 为脱髓鞘疾病的研究提供了体外工具。此外, PASCA等<sup>[23]</sup>还构建了富含星形胶质细胞的脑类器官, 该种脑类器官重现了神经元与星形胶质细胞间的突触连接, 可用于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、癫痫、脑缺血等疾病的研究<sup>[24-25]</sup>。

上述工作构建的非定向全脑类器官与脑的细胞组成、解剖结构相似, 并能模拟脑的发育进程, 体现脑的生理、病理和药理等特征。全脑脑类器官包含多种类型的细胞, 并实现了血管化, 在疾病模拟和药物筛选方面表现出巨大的潜力。

## 1.2 具有区域特征的脑类器官

为了更好地探索不同脑区的功能及其相互调控作用, 研究针对特定脑区的神经发育规律和疾病发生发展过程, 区域特异性的脑类器官应运而生。遵循神经发育基本原理, 通过调控SMAD、WNT、SHH等相关信号通路, 已经构建具有前脑、中脑、后脑等不同区域特征的类器官(表1), 并利用融合等手段, 模拟不同脑区或脑与其他组织/器官的相互调

控作用。

1.2.1 前脑区域类器官 视杯(optic cup)形成是前脑早期发育中重要的步骤之一。SASAI团队<sup>[13,26]</sup>基于SFEBq技术, 通过抑制WNT通路(促进端脑形成)同时激活SHH通路(促进视网膜上皮结构形成), 将PSCs诱导成视网膜上皮细胞后自发形成半球形上皮囊泡, 并形成近端-远端轴(proximal-distal axis)。近端分化为色素上皮, 并包含视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)、Muller胶质细胞、光感受器细胞(photoreceptors)、双极细胞(bipolar cells)、水平细胞(horizontal cells)、无长突细胞(amacrine cells)多种细胞类型, 且呈现出有层次的视网膜节细胞层(retinal ganglion cells, RGCs)、内核层(inner nuclear layer, INL)、外核层(outer nuclear layer, ONL)等视网膜结构, 而远端则逐渐向内折叠形成视杯结构。用该方法构建的视杯类器官较好地模拟了视网膜的细胞组成和结构, 使我们首次在体外观察到类似于人类视网膜早期发育的动态过程。为了实现视网膜的光敏感性, 产生功能性的光感受器细胞, ZHONG等<sup>[27]</sup>通过悬浮-贴壁-再悬浮的多步骤诱导并添加维甲酸(retinoic acid, RA)的方法, 在视杯类器官中诱导产生成熟的光感受器细胞, 并形成外节结构。PARFITT等<sup>[28]</sup>分离出拟胚体中出芽的透

表1 区域特异性脑类器官

Table 1 Region-specific brain organoids

区域特异性脑类器官 Region-specific brain organoids	起始细胞 Starting cells	诱导时间/天 Durations /d	所含细胞类型 Cell types	标志物 Markers	参考文献 References
Optic cup organoids	Mouse ES cells	24	Ganglion cells, photoreceptors, bipolar cells, horizontal cells, amacrine cells, muller glia	rhodopsin, recoverin, Brn3, Pax6, calretinin, Chx10, calbindin, CRALBP	[13]
Cortical organoids	hESCs	90	oRG, superficial-layer neurons, deep-layer neurons	Pax6, Sox2, Satb2, Brn2, Tbr1, Ctip2	[3]
Hippocampal organoids	hESCs	200	Granule cells, pyramidal neurons	Zbtb20, Prox1, KA1	[5]
Thalamus organoids	hESCs	>40	Thalamic neurons	GBX2, DBX1, vGLUT2	[31]
Hypothalamus organoids	hiPSCs	>40	Peptidergic neurons, hypothalamic neurons	POMC, VIP, OXT, NPY, OTP	[4]
Midbrain organoids	hESCs	60	DA neurons	TH, DAT, GIRK2	[32]
Cerebellar organoids	hESCs	>40	Purkinje cells, Golgi cells, granule cells, DCN projection neurons, Non-Golgi-type interneurons	L7, CALB1, NRG1, PAX2, GAD65, ATOH1, BARHL1, PAX6, LHX2, TBR1, SMI32, PVALB	[7]
Spinal organoids	hESCs and hiPSCs	120	V1 renshaw interneurons, V2a interneurons, d1-3 somatosensory relay neurons, spinal motor neurons	Calbindin, MafB, Vglut2, Chx10, Brn3a, Islet1, ChAT, Hb9	[8]

明神经上皮结构后继续悬浮培养,经RA诱导的视杯类器官可分化出有纤毛结构的光感受器细胞,而利用先天性黑朦(leber congenital amaurosis)患者来源iPSCs诱导的视杯则体现出纤毛缺陷。目前,视杯类器官的培养条件仍需优化,以提高诱导效率,促进视杯类器官细胞类型和结构层次的完善,为视网膜疾病机制探索和药物筛选提供线索。

海马由端脑内侧皮层产生,在学习记忆中发挥关键作用,与阿尔茨海默病、精神分裂症等密切相关<sup>[29]</sup>。2015年,SASAI团队<sup>[5]</sup>在皮质类器官的基础上进行优化,首先通过抑制SMADs信号诱导端脑生成,再激活WNT和BMP通路诱导背侧化,生成脉络丛和背内侧端脑结构(dorsomedial telencephalic structures)。PSC经长期培养后诱导生成海马齿状回(dentate gyrus, DG)颗粒神经元和海马回(cornu ammonis, CA)锥体神经元,且形成了功能性的神经网络和突触连接,成功诱导产生了海马类器官(hippocampal organoids)<sup>[5]</sup>。海马神经元在不同类型神经元之间会形成突触回路,如三突触回路(tri-synaptic circuits)。因此,未来海马类器官面临的一大挑战就是重新构建复杂的神经环路。海马类器官的建立也为阿尔茨海默病、精神分裂症等相关疾病的分析提供了实验平台。

丘脑及下丘脑是大脑中的信息传递枢纽,是整合感觉信息并将之传递给大脑不同部位的重要集成器。丘脑功能障碍会引发自闭症谱系障碍(autism spectrum disorders, ASD)、精神分裂症和癫痫等神经系统疾病<sup>[30]</sup>。QIAN等<sup>[4]</sup>首先通过抑制SMADs信号诱导神经外胚层命运,激活WNT和SHH信号诱导丘脑谱系发生,然后在微型生物反应器中长期添加碱性成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)和脑多巴胺神经营养因子(cerebral dopamine neurotrophic factor, CDNF),诱导产生下丘脑特异性的肽能神经元(peptidergic neurons),成功建立了下丘脑类器官(hypothalamus organoids)。XIANG等<sup>[31]</sup>通过抑制SMADs信号进行神经化诱导,构建了丘脑类器官(thalamus organoids)。由于丘脑处于前脑的尾端区域,因此利用胰岛素(insulin)以促进脑类器官尾端化,并通过抑制MEK-ERK通路以防止过度尾端化使其向中脑命运转变,同时添加BMP7以促进丘脑命运。单细胞测序证明了类器官中丘脑谱系的形成,包括绝大多数谷氨酸能神经元以及少数GABA能和

血清素能神经元。XIANG等<sup>[31]</sup>又将此丘脑类器官与皮质类器官进行融合,产生了丘脑-皮质融合类器官,其可以在丘脑皮质间形成双向投射,用于模拟体内的突触连接。

目前,已成功诱导出视杯、海马、丘脑、下丘脑等前脑各区域的脑类器官,为探索大脑发育及与前脑相关疾病的建模提供了新的工具。

1.2.2 中脑区域类器官 中脑功能包括在前脑和脊髓之间进行信息传递、运动控制及感官处理等。中脑多巴胺能神经元在帕金森病(Parkinson's disease, PD)的发病和治疗中备受关注。JO等<sup>[32]</sup>抑制SMADs并激活WNT信号促进神经化诱导,利用SHH和FGF8诱导形成底板结构(floor-plate),后将其转移至基质胶在摇床上经长期培养得到了中脑类器官(midbrain organoids)。该结构包含与人类中脑发育过程相似的VZ(ventral zone)、IZ(intermediate zone)、MZ(mantle zone)等不同神经元祖细胞层,且检测到电话性和功能成熟的多巴胺能神经元以及多巴胺的产生<sup>[32]</sup>。与二维传统培养以及小鼠中脑类器官相比,人中脑类器官可产生与人脑黑质类似的神经黑色素(neuromelanin, NM)沉淀,为研究PD患者NM沉淀提供了思路。同年,QIAN等<sup>[4]</sup>延长诱导中脑命运时间,以更高效地产生多巴胺能神经元。除了使用PSCs作为起始细胞,MONZEL等<sup>[6]</sup>利用SHH通路抑制剂和GSK3抑制剂诱导神经上皮干细胞产生了中脑类器官。除了有多巴胺能神经元,还检测到少数星形胶质细胞和功能较为成熟的少突胶质细胞。考虑到多巴胺能神经元在PD等多种神经退行性疾病中的重要性,中脑类器官为其提供了一个研究病因及筛选治疗药物的平台。

1.2.3 后脑区域类器官 小脑是脑的运动控制中心,发育过程中包含小脑板神经上皮(cerebella plate neuroepithelium)、菱形唇(rhombic lip)等不同的祖细胞区,具有分化产生不同神经元群体的潜能,如:小脑板神经上皮中的PTF1A<sup>+</sup>祖细胞会产生浦肯野细胞(Purkinje cells)和中间神经元(interneurons),菱形唇中的MATH1<sup>+</sup>祖细胞会产生颗粒细胞(granule cells)和小脑核神经元(cerebellar nuclei neurons)<sup>[33-34]</sup>,这使得小脑类器官的体外重建变得困难。为了建立小脑类器官模型,MUGURUMA等<sup>[7]</sup>使用FGF2诱导hESCs尾端化产生小脑祖细胞,再添加FGF19和SDF1诱导细胞形成具有背腹和顶端基底极性(dorsoventral and api-

cobasal polarities)的神经管状结构,并促进小脑板中神经上皮的生成,最终产生具有类似于胚胎早期小脑的三层细胞结构,包括VZ区(aPKC<sup>+</sup>、SOX2<sup>+</sup>、PT-F1A<sup>+</sup>)、浦肯野祖细胞区(LHX5<sup>+</sup>、SKOR2<sup>+</sup>、OLIG2<sup>+</sup>、GAD<sup>+</sup>)、菱形唇祖细胞区(ATOH1<sup>+</sup>、BARHL1<sup>+</sup>),并可分化出成熟的有电生理功能的浦肯野细胞。目前,所构建的小脑类器官可模拟小脑发育早期过程,但仍然需要建立一个长期的培养体系,以模拟发育中期及晚期的小脑发育特征,包括小脑中神经网络的构成及小叶形态的发生。

脊髓是中枢神经系统最尾部的部分,其结构复杂,涉及超过20种不同的神经元亚类。虽然目前已在体外诱导分化得到脊髓运动神经元<sup>[35]</sup>,但作为一个整体组织的体外诱导还未实现。OGURA等<sup>[8]</sup>完成了脊髓类器官(spinal organoids)的三维诱导。他们通过BMP4处理诱导背侧脊髓样组织,使其产生背侧中间神经元。通过激活SHH信号通路形成中间和腹侧脊髓样组织,诱导腹侧中间神经元,进而成功地在背侧和腹侧脊髓样组织中产生了脊髓神经元的几个亚类,包括躯体感觉传递神经元(somatosensory relay neurons)、躯体感觉联合神经元(somatosensory associative neurons)和脊髓运动神经元(spinal motor neurons),模拟了脊髓的体内发育。此外,为了研究脊髓与大脑和肌肉的突触连接,FAUSTINO MARTINS团队<sup>[36]</sup>构建了脊髓-肌肉融合类器官,ANDERSEN团队<sup>[37]</sup>进一步构建了皮质-脊髓-肌肉的融合类器官。综上,脊髓类器官模拟了脊髓形成的体内发育过程及突触连接,有望成为研究人类脊髓相关疾病的工具。脊髓类器官未来的主要目标是诱导更完整的脊髓神经元亚类,以探究其中复杂的神经回路。

因此,促进尾端化可成功诱导后脑区域的脑类器官,为小脑、脊髓等区域的疾病研究提供了新工具。

综上,目前已成功构建具有前脑、中脑、后脑等不同区域特征的脑类器官,它们可用于探索针对特定脑区的神经发育规律和疾病发生,但仍需要提高所诱导脑区的精确性及细胞可重复性,使其更好地模拟脑的生理结构。

### 1.3 融合类器官(fused organoids)

全脑类器官虽然可诱导出具有不同区域特征的细胞,但所采用的非定向诱导方式限制了复杂和相对完整的脑区形成,而区域特异性脑类器官仅模拟了特定脑区的特征。将具有不同区域特征的脑类

器官进行融合,或者利用具有多向分化潜能的祖细胞诱导同步分化产生不同区域/组织细胞群,将为研究不同脑区或脑区与其他组织/器官间的相互作用开辟新的途径。

大脑皮层主要包含兴奋性谷氨酸能锥体神经元和GABA能中间神经元。其中,兴奋性谷氨酸能神经元主要由前脑背侧祖细胞产生,而GABA能神经元则由前脑腹侧祖细胞产生<sup>[38]</sup>。神经发育过程中,GABA能神经元需从腹侧进行长距离迁移到背侧并整合到皮层回路中,而遗传突变或环境干扰可能会使皮层兴奋抑制失衡,导致癫痫和自闭症谱系障碍等疾病<sup>[39-40]</sup>。为了研究前脑腹侧与背侧区域间的相互作用,PASCA团队<sup>[19]</sup>通过SFEBq对PSCs进行神经化诱导,调控WNT和SHH信号分别诱导产生代表前脑背侧和前脑腹侧的类器官,进一步通过自发融合建立前脑背侧与腹侧的融合类器官。他们发现与体内发育过程相似,腹侧GABA神经元向背侧皮层跳跃式迁移,并与谷氨酸能神经元建立连接,形成皮质回路,而在Timothy综合征(Timothy syndrome)患者来源的融合类器官中却表现出异常的迁移。因此,融合类器官使我们在体外观察到精细的发育过程,为研究特定神经元类型的相互作用并探究神经发育相关疾病机制提供工具。BAGLEY等<sup>[41]</sup>采用在单个matrigel液滴中嵌入两种类器官的方法也实现了前脑背侧和腹侧的融合。皮质神经元主要起源于皮层内侧神经节隆起(medial ganglionic eminence, MGE),之后迁移至大脑皮层并整合到神经网络中。XIANG等<sup>[42]</sup>构建了MGE类器官,并将其与皮质类器官进行融合,发现神经元迁移及神经网络的产生。因此,在融合类器官中可模拟体内神经发育过程中的神经元迁移。

脑发育过程中,不同脑区神经元通过投射建立连接和形成神经回路,从而调控机体功能。为了模拟丘脑与皮质间的相互投射,XIANG等<sup>[31]</sup>通过将丘脑类器官与皮质类器官静置融合的方法建立了丘脑-皮质融合类器官。丘脑和皮质间形成了双向投射,模拟了体内的突触连接,并可用于研究自闭症谱系障碍、精神分裂症和癫痫等神经系统疾病。MIURA等<sup>[43]</sup>开发了侧神经节隆起(lateral ganglionic eminence, LGE)类器官。他们将纹状体类器官和皮质类器官融合到一起,发现皮质神经元将轴突投射到纹状体类器官内,并与中性棘状神经元形成突触

连接,体现出成熟的电生理特性和钙活性。而在染色体22q13.3缺失患者的融合类器官中发现了神经元的突触功能缺陷。因此,融合类器官为研究不同脑区间的发育及功能连接提供了新的方案。

在胚胎发育早期,运动神经元就可以与肌肉建立突触连接,从而控制机体运动。研究显示,脊髓与相连接的骨骼肌在发育过程中具有共同的起源,即神经中胚层祖细胞(neuromesodermal progenitors, NMPs)。然而,是否可以在体外通过NMP同步双向分化产生具有神经肌肉接头的神经-肌肉类器官,从而研究运动神经元-肌肉发育及其相关疾病的致病机制,是研究人员希望解决的问题。FAUSTINO MARTINS等<sup>[36]</sup>使用PSCs诱导的NMPs同时生成脊髓神经元和骨骼肌细胞,在三维培养中自发组装融合成神经-肌肉类器官(neuromuscular organoids, NMOs)。NMOs包含脊髓神经元、骨骼肌和末端雪旺细胞(*terminal schwann cells*),从而产生功能性神经-肌肉连接。此模型可以模拟重症肌无力,在神经-肌肉疾病建模中展现出巨大的潜力。除了同时分化为不同的细胞再进行类器官诱导,ANDERSEN等<sup>[37]</sup>从iPSCs诱导得到类似于大脑皮质和后脑/脊髓的类器官,并将它们和人类骨骼肌类器官融合,产生了包含皮质下行神经元-脊髓源性运动神经元-肌肉的融合类器官。该类器官可在体外长期维持功能性收缩,并可通过光遗传和药理学操作来控制。

以上研究表明,三维类器官具有自发组织能力,可用于了解人类发育和疾病功能回路。由此可见,融合类器官为不同脑区/组织间相互作用的研究提供了一个有效的体外研究平台。但是目前融合类器官的构建方法仍需进一步优化,从而更好地反映脑区间特异性的投射和生理反应,以构建功能性回路,为探索脑功能提供有利工具。

## 2 脑类器官的应用

脑类器官作为一种新兴的体外培养技术,不仅可以在体外重现大脑早期发育过程,用于研究不同脑区或脑与其他组织间的相互作用,还可以帮助我们了解脑发育和谱系演化过程,探索人脑进化及其特有的调控机制,开展神经系统疾病的建模和体外药物筛选(图2)。

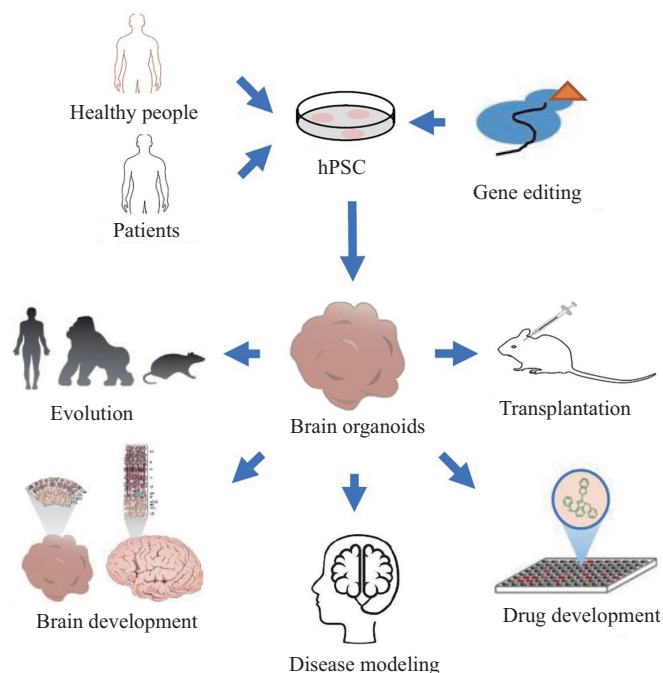
### 2.1 探索人类大脑的发育和谱系演化规律

以脑类器官为模型,结合单细胞RNA测序

(scRNA-seq)等技术,使得准确分析人脑发育中细胞命运选择调控和谱系演化规律,鉴定人脑特有的细胞类型和调控基因,并构建细胞命运的转录调控网络成为可能。

XIE等<sup>[44]</sup>通过多组学研究系统而全面地揭示了人胚胎视网膜与人视网膜类器官在发育和分化过程中染色质开放和基因转录的共性和差异,并发现了*NFIB*和*EHR4*参与调控人视网膜发育。与小鼠视网膜发育过程的表现遗传修饰不同,人胚胎视网膜发育受到H3K4me3和H3K27me3的共同修饰调控。LU等<sup>[45]</sup>通过对不同分化时间点的视网膜发育及视网膜类器官进行scRNA-seq,揭示了控制人类视网膜发育的转录网络,鉴定出了视网膜祖细胞及七种主要视网膜细胞类型的特征,确定了人类和小鼠视网膜发育过程中基因表达的物种特异性模式,并发现*ATOH7*在晚期视网膜形成过程中促进光感受器细胞分化的作用。以上研究说明,脑类器官与scRNA-seq技术的融合,可用于解析不同物种发育路径和差异,发现人类特有基因和细胞类型,探索大脑发育调控机制。

现有的大多数脑类器官可以依次诱导产生放射状胶质细胞、中间前体细胞、深层及表层神经元,并且按照与大脑发育相似的时间顺序,诱导出神经元亚型和胶质等多种细胞群,甚至可以产生与人类大脑皮质相似的板层结构<sup>[1]</sup>。研究人员通过转录组数据分析脑类器官的细胞组成,发现体外培养100天的脑类器官与孕17~24周的人脑相似<sup>[46]</sup>,证明了脑类器官中细胞的多样性。更重要的是,人脑类器官可以产生在啮齿动物中缺失的人脑细胞类型和发育过程,如鼠脑中缺失的oSVZ区<sup>[1]</sup>。人脑发育的另一个特点是皮层的扩展和折叠形成沟回,这是由祖细胞种群的扩大以及神经元的迁移造成的,而该发育过程在鼠脑发育模型中无法体现。OTANI等<sup>[47]</sup>利用人及三种非人类灵长类动物的PSCs诱导的三维脑类器官发现,大脑皮层祖细胞池的大小、祖细胞扩张时间的长短均不同,造成不同物种间皮层的大小以及神经元数量的显著差异。LI等<sup>[48]</sup>发现抑制PTEN信号,可以扩大VZ和oSVZ区,从而促进脑类器官表面结构延展并折叠形成褶皱结构。科学家们还将脑类器官用于研究胚胎期表现遗传学修饰对神经发育的影响。研究中虽然发现了一些与体内发育类似的DNA甲基化行为,但也有一些表现遗传现象并不存在于人脑中<sup>[49]</sup>,提示



把健康人群和神经相关疾病患者的hPSCs诱导为脑类器官。可结合基因编辑技术,将脑类器官用于体内移植,研究人脑发育、人类进化,探究不同脑区、脑与其他器官的相互作用,以及在体外开展疾病模拟和药物筛选。

Human PSCs derived from healthy people or patients with neural development disorders can be used to generate brain organoids. Combining with gene editing technology, brain organoids could be used for transplantation, investigating the principles of human brain development and evolution, exploring the interaction between different brain regions and/or with organs/tissues, and for disease modeling and drug development *in vitro*.

图2 脑类器官的应用(根据参考文献[2]修改)

Fig.2 Applications of the brain organoids (modified from the reference [2])

脑类器官的培养技术还需要进一步的完善。

## 2.2 探索人类大脑的进化和调控机制

与啮齿类和非人灵长类相比,人脑的结构和功能在进化过程中发生了显著变化,其调控机制尚不明确。脑类器官技术的发展为研究人脑进化和遗传调控机制提供了新工具。KANTON等<sup>[50]</sup>分别构建了人、黑猩猩和食蟹猴的脑类器官,并通过单细胞转录组技术依照分化不同阶段,比较了3个物种脑器官的基因表达谱系路径和差异,揭示了大脑早期分化转录特征,阐明了人类独有的动态基因调控。该研究发现,人类大脑发育相比于非人灵长类动物更为缓慢,其发育阶段的基因表达差异会一直持续到成年<sup>[50]</sup>。POLLEN等<sup>[51]</sup>通过比较黑猩猩、猕猴和人类的脑类器官,揭示了261个差异表达基因。研究人员通过生物信息学分析发现,与非人灵长类相比,人外层脑室下区RG中的PI3K/AKT/mTOR通路转录活性增强,揭示了人类所特有的发育调控机制<sup>[51]</sup>。LANCASTER团队<sup>[52]</sup>比较了人、大猩猩和黑猩猩的大脑类器官,发现在类脑发育过程的神经上皮(neuroepithelium, NE)向RG转化过程中有个tNE(transitioning

NE)阶段。在人脑中ZEB2相对于非人灵长类表达延迟,延长了NE阶段,从而促进了人类特异性的新皮层扩张。TRUJILLO团队<sup>[53]</sup>还将人类与已灭绝的古人类尼安德特人和丹尼索瓦人进行比较,发现基因组中存在一个重要差异基因NOVA1,其可以调控突触连接。他们通过基因编辑技术将古人类的NOVA1基因引入hPSCs并诱导脑类器官,发现其神经发育、细胞生长增殖、突触形成方式及突触蛋白水平都发生了明显改变,揭示了基因的改变在进化过程中至关重要。因此,脑类器官与基因组学的结合可以帮助我们了解人脑进化的遗传调控机制,解开进化之谜。

## 2.3 神经系统疾病建模

目前对神经系统疾病的研究主要利用动物模型。但是,模式动物的遗传背景以及生理、病理特征与人类存在差异,难以真实全面地模拟人脑的疾病发生发展过程。作为有效补充,人脑类器官为模拟人脑发育类、精神类和退行性疾病,以及开展药物筛选和基因治疗等提供了新工具。

2.3.1 幼年脑相关疾病 原发性小头畸形症(con-



genital microcephaly)是一种神经系统发育障碍疾病,多是由于常染色体畸变引起的,其主要临床特征为头围减小、脑回过小或无脑回,并伴随不同程度的智力障碍。目前已知的16个与小头畸形症相关基因大部分可编码在有丝分裂过程中发挥重要作用的中心体蛋白,而小鼠突变体都不能很好地模拟人类患者脑部严重缩小的现象<sup>[54-57]</sup>。细胞周期蛋白依赖激酶5的调节相关蛋白2(cyclin dependent kinase 5 regulatory associated protein 2, *CDK5RAP2*) 在细胞分裂和细胞周期调控中极为重要,其基因突变可导致小头畸形症<sup>[54-55]</sup>。LANCASTER等<sup>[1]</sup>将*CDK5RAP2*基因突变的小头畸形症患者的iPSCs培养为脑类器官,发现与正常对照组相比,小头畸形症患者的祖细胞区很早就停止增殖,并表现出过早的神经分化,导致脑组织较小,模拟了小头畸形症的临床表型。2015年,ZIKA病毒暴发之后小头畸形症患者与日俱增<sup>[58]</sup>。为了探究ZIKA病毒与小头畸形症的联系,2016年QIAN等<sup>[4]</sup>和GARCEZ等<sup>[59]</sup>不同团队都用ZIKA病毒感染脑类器官,发现ZIKA病毒优先感染早期皮质器官的神经祖细胞,减少神经祖细胞和分化的神经元数量,使得细胞死亡率增加,导致神经元层厚度和脑组织大小减小,这与小头畸形症表型一致。随后,DANG等<sup>[60]</sup>发现,ZIKA通过调节TRL3活化来激活细胞凋亡通路,从而导致类器官体积减小。

无脑回畸形又称光滑脑,是一种神经元移行障碍性疾病<sup>[61]</sup>,其中Miller-Dieker综合征(Miller-Dieker syndrome, MDS)是最为严重的一种,由人染色体17p13.3的大量杂合性缺失引起,涉及*PAFAH1B1*(编码LIS1蛋白)和*YWHAE*(编码14-3-3 $\epsilon$ 蛋白)等数十种基因<sup>[62-65]</sup>。由于啮齿动物的皮质中不存在oRG细胞<sup>[66]</sup>,因此*Pafah1b1*突变小鼠的表型比*PAFAH1B1*突变的人类患者弱得多。BERSHTEYN等<sup>[67]</sup>用MDS患者的iPSCs进行脑类器官的培养与分析,发现在神经上皮细胞扩增、神经元迁移和oRG祖细胞有丝分裂阶段,MDS类器官的神经干细胞大量凋亡,oRG细胞表现出有丝分裂的延迟,导致神经元迁移缺陷。同年,IEFREMOVA等<sup>[68]</sup>发现,MDS类器官体现出过早的神经发生,皮质扩增速率下降,类器官组织体积显著减小,并伴随着脑室区放射状胶质细胞(ventricular zone radial glia cell, vRGC)从对称细胞分裂到非对称细胞分裂的

转变,N-cadherin/ $\beta$ -catenin/WNT信号通路受到抑制,而给予WNT信号的激动剂可缓解MDS表型。

综上,脑类器官为原发性小头畸形症、无脑回畸形等幼年脑发育相关疾病的治疗提供了临床前机制探索及药物筛选的模型,具有重要意义。

2.3.2 成年脑相关疾病 成年人因外界压力、环境、遗传等因素易产生焦虑、抑郁、精神分裂症等精神障碍性疾病。*DISC1*(disrupted-in-schizophrenia 1)被报道与精神分裂症密切相关<sup>[68]</sup>。在精神分裂症患者的iPSC诱导的脑类器官中,由于*DISC1*易位突变造成C-端丢失会破坏其与Ndel1(nudE neurodevelopment protein 1 like 1)的相互作用,影响细胞周期进程,导致VZ区中神经干细胞的增殖数量减少,阻碍后期神经发育<sup>[70]</sup>。由此可见,脑类器官可以用于有效地研究复杂人类疾病中两种遗传危险因素之间的相互作用。此外,SRIKANTH等<sup>[71]</sup>发现,野生型脑类器官可以形成玫瑰花环和心室状结构,而*DISC1*突变的脑类器官玫瑰花环小且无序,细胞增殖受损。*DISC1*突变和激活WNT信号都能引起对神经发育至关重要的基因如*POU3F2/BRN2*和*CALB1*发生改变,而WNT抑制剂可缓解此表型,暗示WNT信号异常和精神疾病之间存在联系。

2.3.3 老年脑相关疾病 AD俗称老年性痴呆,是一种以记忆障碍、认知功能障碍、行为障碍等为表型的神经系统退行性疾病<sup>[72]</sup>,其病理特征为 $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )沉积、神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)等。现有的AD转基因小鼠模型仅能表现出A $\beta$ 诱导的突触和记忆缺陷,不能完全体现神经原纤维缠结的病理学特点<sup>[73-74]</sup>。AD患者来源的神经元虽显示出高水平的A $\beta$ 毒性和tau蛋白磷酸化,但也无法复制 $\beta$ 淀粉样斑块和神经原纤维缠结现象<sup>[75-77]</sup>。2014年,CHOI等<sup>[78]</sup>首先使用了稳转*APP*与*PS1*突变基因的人神经干细胞诱导的AD脑类器官模型,该模型重现了AD的病理特征,并验证了AD的淀粉样蛋白假说,即A $\beta$ 的过度积累会导致高磷酸化tau蛋白聚集组成的神经原纤维缠结。之后,LEE等<sup>[79]</sup>对AD来源的iPSCs同时进行二维和三维分化,发现了同一种药物在二维和三维中的不同疗效,提示我们三维系统能更好地模拟细胞间的相互作用和与体内更相似的微环境。为了更好地模拟AD病理条件下的神经炎症反应,PARK等<sup>[80]</sup>建立了神经

元、星形胶质细胞、小胶质细胞组成的AD共培养脑类器官模型,可以实现小胶质细胞的招募,模拟轴突损伤、淀粉样蛋白聚集、磷酸化tau蛋白积累和神经炎症环境,为体外人类AD培养模型提供更多生理相关的系统,以探究AD的关键病理特征。*APOE*(apolipoprotein E)编码载脂蛋白,该蛋白是一种脂质转运体,广泛分布于外周和脑中。与*APOEε3*等位基因相比,*APOEε4*与AD具有很强的相关性,但具体机制尚不明确。ZHAO等<sup>[81]</sup>分别用携带*APOEε3/ε3*或*APOEε4/ε4*基因型的健康人及AD患者的iPSC建立了大脑类器官模型,发现不管是哪种*APOE*基因型,AD患者来源的脑类器官的Aβ和磷酸化tau蛋白含量显著高于健康人,导致神经元大量死亡。有趣的是,不管患病与否,携带*APOEε4*等位基因的脑类器官中tau蛋白的磷酸化都加剧了,而使用基因编辑技术将*APOEε4*转变为*APOEε3*会减弱AD相关病理表型,暗示*APOEε4*可能是治疗AD的潜在靶点。由此可见,三维脑类器官为研究人类脑疾病的复杂病理机制提供了可能。

除了以上所述列的疾病类型,脑类器官在其他疾病方面也有突出的表现。如最新的研究报道了用新冠病毒刺突假病毒和活病毒攻击人脑类器官,可感染脑脉络丛并破坏人脑类器官中的血脑脊液屏障(blood-cerebrospinal fluid barrier),解释了临床患者除了呼吸系统症状还会出现头痛、癫痫、混乱等神经症状的原因<sup>[82-83]</sup>。由此可见,脑类器官已成为探索人类神经系统相关疾病机制的一个有力工具。

## 2.4 药物筛选和基因治疗

药物筛选是新药研发过程中重要的步骤。类器官因具有遗传背景多样性,更接近生理状况下的细胞组成和行为,作为体外高通量药物筛选模型脱颖而出。QIAN等<sup>[4]</sup>借助小型旋转生物反应器高通量培养的脑类器官,揭示了ZIKA病毒暴发与先天性小头畸形症发病之间的关系,体现出制备潜在的ZIKA病毒抗病毒药物的潜力。AD是一种多因素疾病,由于其复杂的发病机理,开发治疗AD的有效药物一直很困难。PARK等<sup>[84]</sup>使用来自11位患者的iPSC培养的1300个脑类器官建立了高通量筛选系统,通过测试部分FDA批准的可通过血脑屏障的药物来寻找可以治疗AD的有效药物。同时,脑类器官模型还可以进行临床前药物筛选以评价药物疗效

和安全性、进行多种肿瘤药物和放疗剂量的筛查等。胶质母细胞瘤是成人中最常见的原发性恶性脑肿瘤。JACOB等<sup>[85]</sup>构建了胶质母细胞瘤类器官(glioblastoma organoids, GBOs),分别用辐射和化学制剂处理GBOs后发现GBOs对不同药物治疗的反应具有差异,提示我们类器官模型对探索个性化药物治疗的价值。此外,大脑类器官模型在探究药物对胚胎早期大脑发育及机制研究方面也显示出了很大潜力。利用大脑类器官模型,ZHU等<sup>[86]</sup>发现酒精会导致神经损伤,WANG等<sup>[87]</sup>发现尼古丁可能会导致异常的神经分化,影响皮层发育。

CRISPR/Cas9技术与脑类器官技术的整合能够帮助我们更深入地了解人脑发育的奥秘。*APOE*基因与AD密切相关,使用基因组编辑技术将病人来源iPSC诱导的脑类器官的*APOEε4*转变为*APOEε3*后,凋亡相关标志物的水平降低,Aβ和tau病理情况也得到了改善,这一发现提示靶向*APOEε4*很可能是一项有效的治疗AD的策略<sup>[81]</sup>。ESK等<sup>[88]</sup>开发了一项名为CRISPR谱系追踪(CRISPR-LICHT)的基因筛选新技术。他们利用该技术不仅在大脑类器官中识别出25个可能导致小头畸形症的未知致病基因,还首次确定了内质神经素可以控制细胞外基质蛋白的分泌,从而调节组织完整性和脑组织大小。尽管CRISPR/Cas9技术在类器官中应用效果显著,但还是存在一些需要克服的困难,比如减小脱靶效应、提高编辑效率,以及临床治疗中的安全性和伦理等问题。

## 3 脑类器官技术的挑战与展望

脑类器官技术已取得巨大进步,研究人员成功构建了非定向脑类器官、区域性脑类器官及融合类器官模型,其在探索大脑发育谱系演变规律、大脑进化调控机制及在神经系统疾病建模、药物筛选、基因编辑等方面表现出巨大的潜力。但脑类器官仍存在很多局限性,其细胞组成、代谢特征、可重复性、长期培养等诸多方面仍需不断优化。

由于培养和诱导技术的限制,目前获得的脑类器官在结构上与脑组织仍有很大差异。第一,脑类器官的大小在5 mm至1 cm之间,缺乏功能分区和完整的神经环路,且内部结构难以预测;第二,放射状胶质细胞不附着于浅椎体表面,虽然已有脑类器官可具有深层和浅层神经元的分层,但在体外很难模

拟体内皮层神经元的6个分层;第三,细胞组成与脑组织有差异,脑类器官极少生成小胶质细胞<sup>[89-90]</sup>,脑白质区域在脑类器官中缺乏,血管以及脑膜生成较少;第四,脑类器官在代谢特征上与脑有很大差异;第五,脑类器官培养技术缺乏统一标准,不同实验室、不同批次间的脑类器官模型存在差异。如何提高可重复性、延长脑类器官的存活时间,这些问题都亟待解决。另外,虽然从脑类器官中已分化出多种细胞类型,但其与原代细胞之间仍存在差异。2020年,BHADURI等<sup>[91]</sup>利用scRNA-seq技术发现,与脑组织相比,皮质类器官虽然包含广泛的细胞类型,但是其放射状胶质细胞和中间祖细胞都有所减少,并且如上层神经元等细胞亚型含量也较少,细胞亚型分型受损,细胞应激通路异常,保真性存在一定缺陷。这就意味着脑类器官培养和诱导技术在未来还有待突破。

脑类器官已经应用于多种神经系统疾病的建模,但是多数神经系统疾病可能是多个发育进程紊乱导致的大脑发育异常和环路异常,类器官只能是研究补充,不能完全取代动物模型,完善的疾病机制研究需要联合脑类器官模型和动物模型共同实现。同时,在将脑类器官用于疾病建模和药物筛选之前,需要解决不同细胞系诱导产生脑类器官的可重复性问题。此外,将人脑类器官用于移植、修复大脑神经环路的报道仍然较少。LIU团队<sup>[92]</sup>构建了单VZ结构的皮层类器官,并将其移植至小鼠前额叶皮层,发现此皮层类器官可与宿主大脑的下丘脑外侧区(lateral hypothalamus, LH)建立远距离的长投射连接,并增强小鼠的恐惧记忆能力,为未来移植人脑类器官治疗神经系统疾病提供了实验依据。目前,大脑类器官移植仅限于实验室研究,而如何将大脑类器官用于临床上治疗神经系统疾病需要更深入的研究。

总之,脑类器官的构建和应用仍将是未来生命科学的重要科学问题。随着各领域技术的发展,脑类器官会更接近人类大脑,会在疾病模拟、药物筛选、基因治疗等方面发挥更为重要的作用。

### 参考文献 (References)

- [1] LANCASTER M A, RENNER M, MARTIN C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-9.
- [2] CHIARADIA I, LANCASTER M A. Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(12): 1496-508.
- [3] KADOSHIMA T, SAKAGUCHI H, NAKANO T, et al. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(50): 20284-9.
- [4] QIAN X, NGUYEN H N, SONG M M, et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure [J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1238-54.
- [5] SAKAGUCHI H, KADOSHIMA T, SOEN M, et al. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8896.
- [6] MONZEL A S, SMITS L M, HEMMER K, et al. Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 8(5): 1144-54.
- [7] MUGURUMA K, NISHIYAMA A, KAWAKAMI H, et al. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells [J]. *Cell Rep*, 2015, 10(4): 537-50.
- [8] OGURA T, SAKAGUCHI H, MIYAMOTO S, et al. Three-dimensional induction of dorsal, intermediate and ventral spinal cord tissues from human pluripotent stem cells [J]. *Development*, 2018, 145(16): dev162214.
- [9] CAKIR B, XIANG Y, TANAKA Y, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(11): 1169-75.
- [10] XIANG Y, CAKIR B, PARK I H. Deconstructing and reconstructing the human brain with regionally specified brain organoids [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, 111: 40-51.
- [11] AMIN N D, PAŞÇA S P. Building models of brain disorders with three-dimensional organoids [J]. *Neuron*, 2018, 100(2): 389-405.
- [12] EIRAKU M, WATANABE K, MATSUO-TAKASAKI M, et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 519-32.
- [13] EIRAKU M, TAKATA N, ISHIBASHI H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture [J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 51-6.
- [14] NAKANO T, ANDO S, TAKATA N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 771-85.
- [15] TRUJILLO C A, GAO R, NEGRAES P D, et al. Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(4): 558-69.
- [16] QIAN X, SU Y, ADAM C D, et al. Sliced human cortical organoids for modeling distinct cortical layer formation [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(5): 766-81.
- [17] PHAM M T, POLLOCK K M, ROSE M D, et al. Generation of human vascularized brain organoids [J]. *Neuroreport*, 2018, 29(7): 588-93.
- [18] SHI Y, SUN L, WANG M, et al. Vascularized human cortical organoids (vOrganoids) model cortical development *in vivo* [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(5): e3000705.
- [19] BIREY F, ANDERSEN J, MAKINSON C D, et al. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids [J]. *Nature*, 2017, 545(7652): 54-9.
- [20] QUADRATO G, NGUYEN T, MACOSKO E Z, et al. Cell diver-

- sity and network dynamics in photosensitive human brain organoids [J]. *Nature*, 2017, 545(7652): 48-53.
- [21] MADHAVAN M, NEVIN Z S, SHICK H E, et al. Induction of myelinating oligodendrocytes in human cortical spheroids [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(9): 700-6.
- [22] MARTON R M, MIURA Y, SLOAN S A, et al. Differentiation and maturation of oligodendrocytes in human three-dimensional neural cultures [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(3): 484-91.
- [23] PAŞCA A M, SLOAN S A, CLARKE L E, et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(7): 671-8.
- [24] TAKANO T, OBERHEIM N, COTRINA M L, et al. Astrocytes and ischemic injury [J]. *Stroke*, 2009, 40(3 Suppl): S8-12.
- [25] SANTELLO M, TONI N, VOLTERRA A. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(2): 154-66.
- [26] FUHRMANN S. Wnt signaling in eye organogenesis [J]. *Organogenesis*, 2008, 4(2): 60-7.
- [27] ZHONG X, GUTIERREZ C, XUE T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4047.
- [28] PARFITT D A, LANE A, RAMSDEN C M, et al. Identification and correction of mechanisms underlying inherited blindness in human iPSC-derived optic cups [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6): 769-81.
- [29] GEUZE E, VERMETTEN E, BREMNER J D. MR-based *in vivo* hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders [J]. *Mol Psychiatry*, 2005, 10(2): 160-84.
- [30] BARCH D M, CEASER A. Cognition in schizophrenia: core psychological and neural mechanisms [J]. *Trends Cogn Sci*, 2012, 16(1): 27-34.
- [31] XIANG Y, TANAKA Y, CAKIR B, et al. hESC-derived thalamic organoids form reciprocal projections when fused with cortical organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(3): 487-9.
- [32] JO J, XIAO Y, SUN A X, et al. Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(2): 248-57.
- [33] MARZBAN H, DEL BIGIO M R, ALIZADEH J, et al. Cellular commitment in the developing cerebellum [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 8: 450.
- [34] FINK A J, ENGLUND C, DAZA R A, et al. Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(11): 3066-76.
- [35] DU Z W, CHEN H, LIU H, et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6626.
- [36] FAUSTINO MARTINS J M, FISCHER C, URZI A, et al. Self-organizing 3D human trunk neuromuscular organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(2): 172-86, e6.
- [37] ANDERSEN J, REVAH O, MIURA Y, et al. Generation of functional human 3D cortico-motor assembloids [J]. *Cell*, 2020, 183(7): 1913-29, e26.
- [38] MARÍN O, MÜLLER U. Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2014, 26: 132-41.
- [39] KESSARIS N, MAGNO L, RUBIN A N, et al. Genetic programs controlling cortical interneuron fate [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2014, 26(100): 79-87.
- [40] MARÍN O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2012, 13(2): 107-20.
- [41] BAGLEY J A, REUMANN D, BIAN S, et al. Fused cerebral organoids model interactions between brain regions [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(7): 743-51.
- [42] XIANG Y, TANAKA Y, PATTERSON B, et al. Fusion of regionally specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(3): 383-98, e7.
- [43] MIURA Y, LI M Y, BIREY F, et al. Generation of human striatal organoids and cortico-striatal assembloids from human pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(12): 1421-30.
- [44] XIE H, ZHANG W, ZHANG M, et al. Chromatin accessibility analysis reveals regulatory dynamics of developing human retina and hiPSC-derived retinal organoids [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(6): eaay5247.
- [45] LU Y, SHIAU F, YI W, et al. Single-cell analysis of human retina identifies evolutionarily conserved and species-specific mechanisms controlling development [J]. *Dev Cell*, 2020, 53(4): 473-91, e9.
- [46] CAMP J G, BADSHA F, FLORIO M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(51): 15672-7.
- [47] OTANI T, MARCHETTO M C, GAGE F H, et al. 2D and 3D stem cell models of primate cortical development identify species-specific differences in progenitor behavior contributing to brain size [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(4): 467-80.
- [48] LI Y, MUFFAT J, OMER A, et al. Induction of expansion and folding in human cerebral organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(3): 385-96, e3.
- [49] LUO C, LANCASTER M A, CASTANON R, et al. Cerebral organoids recapitulate epigenomic signatures of the human fetal brain [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(12): 3369-84.
- [50] KANTON S, BOYLE M J, HE Z, et al. Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development [J]. *Nature*, 2019, 574(7778): 418-22.
- [51] POLLEN A A, BHADURI A, ANDREWS M G, et al. Establishing cerebral organoids as models of human-specific brain evolution [J]. *Cell*, 2019, 176(4): 743-56, e17.
- [52] BENITO-KWIECINSKI S, GIANDOMENICO S L, SUTCLIFFE M, et al. An early cell shape transition drives evolutionary expansion of the human forebrain [J]. *Cell*, 2021, 184(8): 2084-102.
- [53] TRUJILLO C A, RICE E S, SCHAEFER N K, et al. Reintroduction of the archaic variant of NOVA1 in cortical organoids alters neurodevelopment [J]. *Science*, 2021, 371(6530): eaax2537.
- [54] BARRERA J A, KAO L R, HAMMER R E, et al. CDK5RAP2 regulates centriole engagement and cohesion in mice [J]. *Dev Cell*, 2010, 18(6): 913-26.
- [55] LIZARRAGA S B, MARGOSSIAN S P, HARRIS M H, et al. Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors [J]. *Development*, 2010, 137(11): 1907-17.

- [56] PULVERS J N, BRYK J, FISH J L, et al. Mutations in mouse *Aspm* (abnormal spindle-like microcephaly associated) cause not only microcephaly but also major defects in the germline [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(38): 16595-600.
- [57] GRUBER R, ZHOU Z, SUKCHEV M, et al. MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(11): 1325-34.
- [58] SCHULER-FACCINI L, RIBEIRO E M, FEITOSA I M, et al. Possible association between Zika virus infection and microcephaly—Brazil, 2015 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2016, 65(3): 59-62.
- [59] GARCEZ P P, LOIOLA E C, MADEIRO DA COSTA R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids [J]. *Science*, 2016, 352(6287): 816-8.
- [60] DANG J, TIWARI S K, LICHINCHI G, et al. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3 [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(2): 258-65.
- [61] KATO M. Genotype-phenotype correlation in neuronal migration disorders and cortical dysplasias [J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 181.
- [62] HIROTSUNE S, FLECK M W, GAMBELLO M J, et al. Graded reduction of *Pafah1b1* (*Lis1*) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality [J]. *Nat Genet*, 1998, 19(4): 333-9.
- [63] TOYO-OKA K, SHIONOYA A, GAMBELLO M J, et al. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome [J]. *Nat Genet*, 2003, 34(3): 274-85.
- [64] GAMBELLO M J, DARLING D L, YINGLING J, et al. Multiple dose-dependent effects of *Lis1* on cerebral cortical development [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(5): 1719-29.
- [65] YOUNG Y H, PRAMPARO T, HIROTSUNE S, et al. Distinct dose-dependent cortical neuronal migration and neurite extension defects in *Lis1* and *Ndel1* mutant mice [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(49): 15520-30.
- [66] SHITAMUKAI A, KONNO D, MATSUZAKI F. Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(10): 3683-95.
- [67] BERSHTEYN M, NOWAKOWSKI T J, POLLEN A A, et al. Human iPSC-derived cerebral organoids model cellular features of lissencephaly and reveal prolonged mitosis of outer radial glia [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(4): 435-49, e4.
- [68] IEFREMOVA V, MANIKAKIS G, KREFFT O, et al. An organoid-based model of cortical development identifies non-cell-autonomous defects in Wnt signaling contributing to Miller-Dieker syndrome [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(1): 50-9.
- [69] THOMSON P A, MALAVASI E L, GRÜNEWALD E, et al. *DISC1* genetics, biology and psychiatric illness [J]. *Front Biol*, 2013, 8(1): 1-31.
- [70] YE F, KANG E, YU C, et al. *DISC1* regulates neurogenesis via modulating kinetochore attachment of *Ndel1*/*Ndel* during mitosis [J]. *Neuron*, 2017, 96(5): 1041-54, e5.
- [71] SRIKANTH P, LAGOMARSINO V N, MURATORE C R, et al. Shared effects of *DISC1* disruption and elevated WNT signaling in human cerebral organoids [J]. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1): 77.
- [72] WANG P, WANG Z Y. Metal ions influx is a double edged sword for the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 35: 265-90.
- [73] DUFF K. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and mechanisms of pathogenesis [J]. *Biochem Soc Symp*, 2001, (67): 195-202.
- [74] CHIN J. Selecting a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 670: 169-89.
- [75] CHOI S H, TANZI R E. iPSCs to the rescue in Alzheimer's research [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(3): 235-6.
- [76] ISRAEL M A, YUAN S H, BARDY C, et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2012, 482(7384): 216-20.
- [77] KONDO T, ASAI M, TSUKITA K, et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 487-96.
- [78] CHOI S H, KIM Y H, HEBISCH M, et al. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 274-8.
- [79] LEE H K, VELAZQUEZ SANCHEZ C, CHEN M, et al. Three dimensional human Neuro-spheroid model of Alzheimer's disease based on differentiated induced pluripotent stem cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163072.
- [80] PARK J, WETZEL I, MARRIOTT I, et al. A 3D human triculture system modeling neurodegeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(7): 941-51.
- [81] ZHAO J, FU Y, YAMAZAKI Y, et al. APOE4 exacerbates synapse loss and neurodegeneration in Alzheimer's disease patient iPSC-derived cerebral organoids [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5540.
- [82] PELLEGRINI L, ALBECKA A, MALLERY D L, et al. SARS-COV-2 infects the brain choroid plexus and disrupts the blood-CSF barrier in human brain organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(6): 951-61, e5.
- [83] VARATHARAJ A, THOMAS N, ELLUL M A, et al. Neurological and neuropsychiatric complications of COVID-19 in 153 patients: a UK-wide surveillance study [J]. *Lancet Psychiat*, 2020, 7(10): 875-82.
- [84] PARK J C, JANG S Y, LEE D, et al. A logical network-based drug-screening platform for Alzheimer's disease representing pathological features of human brain organoids [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 280.
- [85] JACOB F, SALINAS R D, ZHANG D Y, et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral heterogeneity [J]. *Cell*, 2020, 180(1): 188-204, e22.
- [86] ZHU Y, WANG L, YIN F, et al. Probing impaired neurogenesis in human brain organoids exposed to alcohol [J]. *Integr Biol*, 2017, 9(12): 968-78.
- [87] WANG Y, WANG L, ZHU Y, QIN J. Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(6): 851-60.
- [88] ESK C, LINDENHOFER D, HAENDELER S, et al. A human

- tissue screen identifies a regulator of ER secretion as a brain-size determinant [J]. *Science*, 2020, 370(6519): 935-41.
- [89] THION M S, GINHOUX F, GAREL S. Microglia and early brain development: an intimate journey [J]. *Science*, 2018, 362(6411): 185-9.
- [90] PRILLER J, PRINZ M. Targeting microglia in brain disorders [J]. *Science*, 2019, 365(6448): 32-3.
- [91] BHADURI A, ANDREWS M G, MANCIA LEON W, et al. Cell stress in cortical organoids impairs molecular subtype specification [J]. *Nature*, 2020, 578(7793): 142-8.
- [92] DONG X, XU S B, CHEN X, et al. Human cerebral organoids establish subcortical projections in the mouse brain after transplantation [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, doi: 10.1038/s41380-020-00910-4.