



人脑类器官在神经退行性疾病中的应用与展望

颜弘烨^{1,2}, 王慧敏^{1,2}, 张文雕^{1,2}, 姜佳美^{1,2}, 万娟^{1,2}, 徐振宏^{1,2}, 杨珍玉^{1,2},
唐北沙^{1,2,3*}, 蒙庆团^{1,2*}

1. 南华大学衡阳医学院附属第一医院脑疾病多组学研究中心、神经内科, 衡阳 421001;
2. 南华大学衡阳医学院附属第一医院, 湖南省免疫相关性脑病临床医学研究中心, 衡阳 421001;
3. 中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008

* 联系人, E-mail: bstang7398@163.com; mengqingtuan@glmc.edu.cn

收稿日期: 2023-06-18; 接受日期: 2023-08-22; 网络版发表日期: 2023-09-26

摘要 人脑类器官是指体外培养的, 在一定程度上模拟人脑细胞类型组成、空间结构、生理功能等特征的三维类组织培养物。目前, 人脑类器官已广泛应用于人脑发育、基因功能、疾病机制、药物筛选等方面的研究。本文聚焦于神经退行性疾病, 概述了人脑类器官在阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、亨廷顿病研究中的应用, 并对其面临的挑战与未来的发展方向进行了展望。

关键词 神经退行性疾病, 人脑类器官, 神经免疫脑类器官, 类器官移植, 类器官组装体, 类器官芯片

神经退行性疾病(neurodegenerative diseases, NDDs)是一类因神经元和(或)其髓鞘进行性丢失, 导致神经网络结构和功能异常, 产生认知、感觉、运动功能等障碍的疾病^[1,2]。常见的NDDs包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、亨廷顿病(Huntington's disease, HD)等。NDDs多见于老年人群, 患病风险随年龄增加, 发病率也呈现逐年增长趋势。NDDs的致病机制复杂, 涉及遗传因素和环境因素, 其主要的病理机制包括病理性蛋白聚集与降解异常、炎症与免疫激活、线粒体能量稳态改变、突触和神经网络功能障碍等^[2]。数十年来, 尽管科学家对NDDs进行了大量的研究, 然而其发病机制仍未被阐明。目前为止, 针对NDDs的药物研发

也几乎全部失败^[3], 这主要是由于候选药物在细胞或动物实验中有效, 但在临床试验中被发现无效。因此, 开发基于人源细胞且能更好地模拟人体生理和病理情况的新模型, 将有助于NDDs的机制研究与药物研发。

1 人脑类器官在NDDs研究中的应用

在既往的研究中, 二维(two dimensional, 2D)细胞模型和动物模型(如啮齿类动物、果蝇、猪、灵长类动物等)无疑是NDDs的重要研究模型, 为理解疾病的发病机制、发现药物治疗靶点提供了诸多重要依据。然而2D细胞模型和动物模型存在一定的局限性。例如, 2D细胞模型的细胞类型通常较为单一, 难以模拟人脑

引用格式: 颜弘烨, 王慧敏, 张文雕, 等. 人脑类器官在神经退行性疾病中的应用与展望. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1383–1396
Yan H Y, Wang H M, Zhang W D, et al. Applications and prospect of human brain organoids in neurodegenerative diseases (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 1383–1396, doi: [10.1360/SSV-2023-0116](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0116)

复杂的细胞间相互作用; 而动物模型与人类的遗传背景不同, 也难以完全反映相同基因或者药物在人类遗传背景下的作用。这也可能是目前NDDs药物研发失败率高的主要原因^[3]。因此, 具备人类遗传背景且能够模拟人脑关键特征的研究模型有望为NDDs的致病机制研究和药物研发带来新的突破。

人脑类器官(human brain organoids, hBOs)是由人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)、人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)或成体干细胞分化形成, 具有自我组装和定向分化能力的三维(three dimensional, 3D)类组织培养物, 在一定程度上模拟人脑细胞类型组成、空间结构和生理功能等特征^[4]。鉴于hBOs独特的优势和特点, 科学家目前已成功构建了多种hBOs模型, 包括全脑^[4]、前脑^[5]、中脑^[6]、小脑^[7]、海马^[8]、丘脑^[9]、下丘脑^[5,10]、脊髓^[11]等hBOs模型, 并应用于包括NDDs在内的多种脑疾病的研究(表1)。例如, Pérez等人^[12]发现, *PITRM1*基因敲除的hBOs会自发表现出AD样病理特征, 包括淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的聚集、Tau蛋白磷酸化和神经元细胞死亡。然而这些病理表型在*PITRM1*基因敲除的2D神经培养物中并未观察到, 提示hBOs是NDDs研究中具有相对优势的模型。本文将着重综述hBOs在NDDs领域中的应用和研究进展, 并对其未来的发展趋势和面临的挑战进行展望, 以期NDDs研究领域提供更加完善的研究工具。

1.1 hBOs在AD研究中的应用

AD是一类起病隐匿, 以认知功能障碍及行为损害为主要临床表现的进行性发展NDDs^[13]。AD的标志性病理特征包括神经元胞外 β 淀粉样蛋白(amyloid beta, A β)斑块的沉积以及细胞内高磷酸化Tau(phosphorylated Tau, P-Tau)蛋白聚集形成的神经原纤维缠结^[13]。AD的病因迄今未明, 通常认为与遗传因素、环境毒素、感染和衰老等多因素有关^[14]。AD涉及的致病机制复杂多样, 建立一个能够真实模拟AD病理状态的研究模型一直是一个挑战。

由于hBOs在模拟人脑生理特征和疾病建模方面具有独特的优势, 已有相当数量的研究将hBOs模型用于AD发病机制和药物筛选的探索^[12,15-37]。基因突变是AD的重要致病因素, 采用AD患者来源的hiPSCs建立hBOs模型是常用的AD建模方式。自2016年Raja等

人^[15]首先建立了*APP*基因重复突变的家族性AD(familial AD, fAD)患者的hBOs以来, 携带有*PSEN1*^[16-19], *PSEN2*^[19,20], *MAPT*^[21]基因突变的fAD hBOs模型也相继建立。这些fAD hBOs模型再现了A β 聚集、P-Tau增加等AD标志性病理表型。除fAD hBOs模型外, 来自散发性AD(sporadic AD, sAD)患者的hBOs也发现A β 1-42、A β 1-40、总Tau和P-Tau蛋白明显增多的病理表型^[22,23]。此外, 在正常人hiPSCs中引入*BACE2*^{G446R}突变^[24]、*APOE4*纯合突变^[25]再诱导生成的hBOs, 同样能表现出A β 的积累^[24,25]与P-Tau增加的病理表型^[25], 但此方式建立的模型缺乏AD患者来源的遗传背景。

除遗传因素外, 环境暴露也是AD的重要致病因素。Chen等人^[26]发现, hBOs受到人血清刺激后会表现出AD样病理病变, 包括A β 聚集和P-Tau水平增加, 突触缺失和神经网络受损。在hBOs中加入A β 42诱导剂Afin-5或者A β 1-42寡聚体也导致时间依赖性A β 积累及斑块形成^[27,28]。

另一方面, 病毒或细菌感染也是AD的危险因素。研究发现, 正常hiPSCs来源的hBOs受到新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[29]、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus 1, HSV-1)^[30,31]、寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)^[32]、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)^[33]感染后也会出现AD相关的病理表型。

基于以上AD hBOs模型, 研究人员在AD的机制研究及治疗应用上取得了一定的进展。例如, Kuehner等人^[18]通过比较fAD和正常对照hBOs不同时间点的5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)和转录组图谱发现, 5hmC的异常改变可能导致神经发育异常, 最终导致AD的发生。Pérez等人^[12]通过*PITRM1*基因敲除的hBOs模型支持了线粒体功能障碍导致AD相关表型的发生。Lee等人^[32]利用hBOs发现ZIKV通过激活PERK/eIF2 α 通路导致AD病理表型, 并且该表型能够被PERK抑制剂所改善。在AD的治疗研究方面, Zhao等人^[23]发现, *APOE4*主要加剧了P-Tau的积累, 最终导致神经元退化丢失等AD病理表型, 而*APOE4*向*APOE3*的等位基因转化减轻了AD的相关表型。Luo等人^[24]在引入*APP*^{Swe/Idl}突变的hiPSCs中过表达*BACE2*^{WT}也对AD相关表型起到了改善作用。Mazzarino等人^[34]在携带有fAD基因突变(*PSEN1* E280A)和AD保护性突变(*APOE3* Ch)的hiPSCs中, 利用基因编辑技术将

表 1 人脑类器官在神经退行性疾病研究中的应用

Table 1 Applications of hBOs in the study of NDDs

疾病类型	疾病造模方法	基因突变信息/处理因素	脑类器官细胞来源	脑类器官类型	文献	文献发布年份
AD	家族性AD患者来源	<i>APP</i>	hiPSCs	全脑	[15]	2016
		<i>PSEN1</i>		前脑	[16,17]	2018 ^[16] , 2023 ^[17]
		<i>PSEN1</i>			[18]	2021
		<i>PSEN1, PSEN2</i>		全脑	[19]	2022
		<i>PSEN2</i>			[20]	2021
		<i>MAPT</i>			[21]	2021
	散发性AD患者来源	未知突变	hiPSCs	全脑	[22,37]	2021 ^[22] , 2020 ^[37]
		<i>APOE4</i>			[23,35]	2020 ^[23] , 2023 ^[35]
	基因编辑	<i>PITRM1</i> 敲除	hiPSCs	全脑	[12]	2021
		引入 <i>BACE2</i> ^{G446R} , <i>APP</i> ^{Swe/Ldl} 突变	hESCs		[24]	2022
		引入 <i>APOE4</i> 纯合突变	hiPSCs		[25]	2018
		在携带 <i>PSEN1, APOE3ch</i> 的hiPSCs中将 <i>APOE3ch</i> 突变为 <i>APOE3WT</i>			[34]	2023预印版
	环境暴露	人血清	hiPSCs	全脑	[26]	2021
		Aβ1-42	NPCs		[27]	2023
		Aftin-5	hiPSCs		[28]	2018
		Aβ			[36]	2022
	病毒及细菌感染	SARS-CoV-2病毒	hiPSCs	全脑	[29]	2023
		HSV-1病毒			[30,31]	2021 ^[30] , 2022 ^[31]
		ZIKA病毒			[32]	2022
		金黄色葡萄球菌			[33]	2022
PD	PD患者来源	<i>SNCA</i> 三倍体	hiPSCs	中脑	[39]	2021
		<i>LRRK2 G2019S</i>	神经干细胞(NSCs)		[40]	2020
		<i>LRRK2 G2019S</i>	NPCs		[41]	2019
		<i>PRKN</i>	hiPSCs		[42]	2020
		<i>PINK1</i>	神经上皮干细胞(NESCs)		[43]	2022
	基因编辑	引入 <i>DNAJC6</i> 突变	hESCs	中脑	[44]	2021
		引入 <i>LRRK2 p.Gly2019Ser</i> 突变	NPCs		[45]	2022
		<i>GBA1</i> 纯和敲除+ <i>SNCA</i> 过表达	hESCs		[46]	2021
ALS	ALS患者来源	<i>C9ORF72</i> 六核苷酸重复扩增	hiPSCs	全脑	[51]	2021
		未知突变			[54]	2023
	环境暴露	TDP-43	hiPSCs	全脑	[52]	2023
	基因编辑	<i>GRN</i> 敲除	hiPSCs	全脑	[53]	2023
HD	HD患者来源	<i>HTT</i> CAG重复扩增	hiPSCs	全脑	[60]	2018

APOE3Ch 编辑为野生型 *APOE3*, 发现 *APOE3Ch* 可以显著减少 hBOs 中 AD 的 Tau 病理表型。此外, 部分研究使

用 hBOs 开展了 AD 治疗药物的筛选研究。研究发现, 云母纳米颗粒 STB-MP^[17]、高良姜素^[27]、曲米溴酸

盐^[35]、雌激素^[36]、组蛋白去乙酰化酶6抑制剂CKD-504^[37]对AD hBOs的病理表型有不同程度的改善作用。Park等人^[22]还整合了数学建模方法和sAD患者来源的hBOs病理特征, 开发了一个高效的AD药物筛选平台, 有望为AD的药物治疗带来新的发现。

1.2 hBOs在PD研究中的应用

PD是以运动功能障碍(运动迟缓、静止性震颤、肌强直等)及非运动功能障碍(嗅觉减退、睡眠障碍等)为主要表现的第二大NDDs。PD的主要病理表现为黑质多巴胺能神经元的进行性丢失和嗜酸性包涵体即路易小体的产生。既往研究表明, PD与遗传因素、环境因素、衰老等因素相关, 但其具体病因尚未明确^[38]。

由于PD主要累及中脑, 大部分研究聚焦在中脑多巴胺能神经元丢失的机制研究。目前, 已有多个研究通过建立中脑类器官(human midbrain organoids, hMOs)开展PD的机制、药物开发和治疗研究。研究发现, 携带*SNCA*^[39], *LRRK2*^[40,41], *PRKN*^[42], *PINK1*^[43]等致病基因突变的PD患者来源的hMOs成功再现了PD的病理表型, 包括多巴胺能神经元的进行性丢失和路易小体的产生等。例如, Mohamed等人^[39]在*SNCA*基因突变的hMOs模型中观察到 α -突触核蛋白聚集体随着培养时间的延长逐渐增加, 最终导致多巴胺能神经元的丢失。Kano等人^[42]发现, 携带*PRKN*突变的PD hMOs中星形胶质细胞的数量减少, 这与*PRKN*基因突变的PD患者死后脑组织中的病理表型相似。除PD患者来源的hMOs外, 在正常多能干细胞中引入基因突变并诱导形成的hMOs同样出现多巴胺能神经元进行性丢失和路易小体的产生等PD病理变化^[44-46]。例如, Wulansari等人^[44]在*DNAJC6*纯合基因突变的hMOs中发现, *DNAJC6*功能丧失会导致WNT-LMX6A信号传导和自噬-溶酶体功能受损, 以及 α -突触核蛋白积累等。

由于hMOs很好地复现了PD的核心病理表型, PD患者来源或者携带特定基因突变的hMOs可作为药物筛选的模型。例如, 研究发现*LRRK2*基因突变可能通过破坏神经发育而导致多巴胺能神经元的分化和成熟受阻^[45]以及数量的减少^[41]; 使用*LRRK2*抑制剂PFE-360可以减少*LRRK2*基因突变hMOs所致的多巴胺能神经元丢失^[40]。另有研究发现, 在培养基中添加2-羟丙基- β -环糊精可以增强*PINK1*基因突变hMOs中神经元和

线粒体自噬, 并改善hMOs中多巴胺能神经元的退化坏死, 提示2-羟丙基- β -环糊精可能是PD的潜在治疗药物^[43]。除了药物筛选, 也有研究探索hMOs移植对PD的治疗效果。Zheng等人^[47]将正常人来源的hMOs移植到免疫缺陷PD模型小鼠大脑后发现, hMOs能在宿主纹状体中存活和进一步成熟, 并逆转了PD模型小鼠的运动功能障碍。该研究发现, hMOs移植并未导致肿瘤或移植物过度生长, 提示hMOs移植是PD临床细胞治疗的潜在新策略。

1.3 hBOs在ALS研究中的应用

ALS是以上或(和)下运动神经元进行性损害为特征的NDDs。约90%的ALS病例为散发性ALS(sporadic ALS, sALS), 约10%的病例为具有家族遗传特点的家族性ALS(familial ALS, fALS)^[48]。目前, 研究已经发现超过40个与ALS相关的基因, 包括超氧化物歧化酶1(*SOD1*)、融合肉瘤(*FUS*)、TAR DNA结合蛋白(*TARDBP*)、前纤维蛋白-1(*PFN1*)和9号染色体开放阅读框72(*C9ORF72*)、共济失调素2(*ATXN2*)等基因^[49]。ALS的发病机制尚未完全明确, 氧化应激障碍、兴奋性氨基酸毒性、线粒体功能障碍、神经营养因子缺失和异常、蛋白质异常聚集、钙超载毒性、自身免疫紊乱、自噬等被认为是ALS的主要致病机制^[50]。

目前, 已有一些研究利用hBOs探索ALS的致病机制和治疗药物。Szebenyi等人^[51]利用ALS伴有额颞叶痴呆患者来源的hiPSCs建立hBOs切片培养模型, 该模型再现了*C9ORF72*六核苷酸重复扩增突变的ALS伴有额颞叶痴呆患者的早期分子病理表型。基于该模型的单细胞RNA测序等分析发现, 星形胶质细胞和神经元表现出不同的基因转录、蛋白质稳态和DNA修复障碍。研究还发现, 患者来源的星形胶质细胞表现出自噬信号蛋白P62水平增加、深层神经元中二肽重复蛋白poly(GA)积累、DNA损伤和核固缩, 使用PERK通路抑制剂GSK2606414能够挽救这些表型^[51]。对于sALS而言, 其病理标志之一是中枢神经系统内TAR DNA结合蛋白43 kD(TDP-43)的细胞质错误定位和聚集。为了研究病理性蛋白TDP-43在细胞间的传递和毒性作用, Tamaki等人^[52]将来自三名非ALS对照和五名含有病理性TDP-43蛋白的sALS患者死后脊髓蛋白提取物分别注射到hBOs中, 发现病理性TDP-43蛋白可以在细胞间传递, 诱导星形胶质细胞增生、细胞凋亡和DNA双链

断裂等。虽然ALS主要累及运动神经元, 但星形胶质细胞特异性基因突变也可以引起ALS病理表型。de Majo等人^[53]发现, 星形胶质细胞中颗粒蛋白前体基因*GRN*功能缺失导致hBOs自发出现TDP-43错误折叠、过度磷酸化等典型TDP-43蛋白病表型。在星形胶质细胞和神经元共培养的2D细胞模型中并未观察到*GRN*基因缺失引起TDP-43蛋白病相关表型。另外, 研究者通过建立含有小胶质细胞的hBOs模型发现, 星形胶质细胞和小胶质细胞也参与了ALS的发病过程^[54]。

以上研究表明, hBOs能够复现ALS在神经系统中的一些病理表型, 是疾病机制研究和药物筛选的有效工具。然而ALS涉及的基因众多、致病机制复杂, 仍然需要更多的研究来揭示其发病机制。鉴于ALS选择性累及上或(和)下运动神经元导致肌无力症状, 构建神经-肌肉接头(neuromuscular junction, NMJ)类器官模型有望为ALS研究带来新的突破。

1.4 hBOs在HD研究中的应用

HD是一种由亨廷顿(*HTT*)基因中CAG重复扩增引起的致命性NDDs, 以不自主的舞蹈动作、认知障碍和精神问题为主要临床特征^[55]。在HD中, CAG重复扩增导致形成过长的聚谷氨酰胺(polyglutamine, polyQ)束, 而polyQ会导致HTT蛋白异常聚集形成毒性的突变型亨廷顿蛋白(mutant HTT, mHTT)^[56]。mHTT主要沉积在皮层及纹状体的神经元中^[57], 可以破坏正常细胞的转录, 干扰免疫和线粒体功能, 并在翻译后发生异常修饰^[56], 进而造成这些部位神经元的显著变性。尽管HD被认为是一类NDDs疾病, 越来越多的证据提示HD存在早期神经发育异常。研究发现, mHTT会抑制神经祖细胞(neural progenitor cells, NPCs)的分裂, 影响神经元的迁移和成熟^[58,59]。鉴于早期神经发育异常可能是HD的致病基础, hBOs是研究HD的有力模型。

目前, 仅有少数研究使用HD患者来源的hBOs进行HD的机制探索^[60]。研究发现, mHTT导致HD hBOs的基因表达异常, 表现为多能性标志物OCT4表达上调, 神经外胚层命运决定因素PAX6、皮质特异性标志物TBR1和CTIP2的表达降低, 最终导致hBOs的神经发育和分化缺陷。而使用针对mHTT的锌指蛋白阻遏因子或金属蛋白酶ADAM10的抑制剂都有效地挽救了HD hBOs中的神经发育和分化障碍^[60]。

2 人脑类器官在NDDs研究的潜在发展方向

hBOs模型在NDDs研究领域已崭露头角, 为疾病的机制研究和药物筛选提供了前所未有的平台和机会。然而该模型目前仍存在诸多不足, 包括缺乏完整的免疫系统、血液循环系统和神经环路等问题。由于缺乏微血管系统和体内微环境的支持, hBOs长期处于细胞压力激活状态, 中心区域存在一定的缺氧和细胞坏死^[61,62]。此外, 单一使用hBOs无法研究多器官互作在NDDs中的作用。针对目前hBOs存在的这些问题, 本文概述了未来hBOs在NDDs研究中可供采取的策略和解决方案(表2)。

2.1 神经免疫脑类器官模型

越来越多的证据表明, 神经炎症在NDDs发挥至关重要的作用。小胶质细胞作为中枢神经系统的常驻免疫细胞, 被认为是参与神经炎症调控的关键细胞类型。建立包含小胶质细胞的hBOs模型并阐明小胶质细胞在神经炎症中的作用将为NDDs的研究提供前沿模型。由于小胶质细胞起源于中胚层, 而神经系统起源于外胚层, 通常情况下hBOs中不包含小胶质细胞。随着培养体系的改良, 目前已有多种方法可形成包含小胶质细胞的hBOs, 可以作为神经免疫脑类器官模型用于NDDs研究。Zhang等人^[63]详细总结了四种建立包含小胶质细胞hBOs的策略: (i) hBOs与外源性小胶质细胞共培养^[25,64~71]。该方法是将原代小胶质细胞或小胶质细胞系或多能干细胞衍生的小胶质细胞融入已形成的hBOs中, 以重塑hBOs的免疫功能。这种共培养模型可用于研究NDDs中小胶质细胞特异性基因突变对神经系统的影响。然而, 不同研究中形成的hBOs或小胶质细胞成熟度不一, 可能导致小胶质细胞进入hBOs后对免疫刺激的反应能力存在差异。(ii) 将小胶质祖细胞融入hBOs, 在hBOs微环境作用下诱导产生成熟小胶质细胞^[72~74]。这种策略模拟了体内生理情况下小胶质细胞的发育轨迹, 可用于探索在NDDs背景下小胶质细胞的发育进程以及对神经系统发育的影响。然而, 小胶质祖细胞融入hBOs后其发育轨迹不可控, 可能导致hBOs中小胶质细胞数量和成熟度存在异质性。(iii) 小胶质祖细胞与NPCs共培养^[75]。NPCs本身具有形成hBOs的能力, 与小胶质祖细胞共培养后可以形成包含小胶质细胞的hBOs。在该方法中, 研究人员

表 2 人脑类器官在神经退行性疾病研究中的优化方案

Table 2 Optimization of hBOs in the study of NDDs

优化方案分类	构建方法	主要应用	主要优势	参考文献
神经免疫脑类器官模型	hBOs与外源性小胶质细胞共培养	研究NDDs中小胶质细胞特异性基因突变对神经系统的影响	小胶质细胞可以重塑脑类器官的免疫微环境	[25,64~71]
	将小胶质祖细胞融入hBOs, 在hBOs微环境作用下诱导产生成熟小胶质细胞	研究正常或NDDs背景下小胶质细胞的发育进程以及对神经系统发育的影响		[72~74]
	小胶质祖细胞与NPCs共培养	研究NDDs遗传背景下小胶质祖细胞和NPCs神经祖细胞之间的相互作用		[75]
	多能干细胞自发分化形成包含小胶质细胞的hBOs	研究神经免疫与NDDs的便捷方案		[76~78]
脑类器官-大鼠/小鼠移植模型	生理状态下的脑类器官移植	在体内环境和人类遗传背景下研究基因功能、神经发育与功能等; 研究脑类器官对宿主行为学的影响	可以在体内环境和人类遗传背景下研究NDDs的发生发展, 探索hBOs移植对NDDs的潜在治疗作用	[61,80~84]
	疾病大鼠/小鼠模型中的脑类器官移植	研究hBOs在NDDs疾病的治疗作用		[47,85~88]
类器官组装体	不同脑区类器官间的融合	研究神经发育、神经环路功能与NDDs的研究	可以探索多脑区与多器官互作在NDDs中的作用	[9,91~95]
	hBOs和其他类器官的融合	研究多器官间互作在NDDs中的作用		[96~100]
器官芯片与类器官芯片	细胞/类器官在微流控装置中培养	疾病建模、药物筛选等	可实现器官/类器官的自动化、高通量培养和监测	[103~111,114,115]

可以控制初始小胶质祖细胞与NPCs的比例, 使得hBOs中神经元与小胶质细胞的比例接近于生理状态. 该方法可用于研究NDDs遗传背景下小胶质祖细胞和NPCs之间的相互作用. (iv) 由多能干细胞自发分化形成包含小胶质细胞的hBOs^[76~78]. 由于神经系统起源于外胚层, hBOs形成过程中通常需要加入SMAD信号通路抑制剂来抑制细胞向内胚层和中胚层分化^[79]. 该策略利用了多能干细胞可向三个胚层所有细胞类型分化的潜能, 在hBOs形成初期不添加SMAD信号通路抑制剂, 使得小胶质祖细胞可能在hBOs中出现并进一步分化为成熟的小胶质细胞. 尽管小胶质细胞可以通过该方法在hBOs中自发形成, 但该非定向分化使得小胶质细胞在hBOs中的比例和分布是高度可变和不可控的.

以上这些策略均能够产生包含小胶质细胞的神经免疫脑类器官模型. 该模型中的小胶质细胞具有与体内相似的形态特征和生理功能, 能够重塑hBOs中的免疫环境并增强神经功能和网络连接^[63], 将是研究神经免疫与NDDs的有力工具.

2.2 脑类器官-大鼠/小鼠移植模型

虽然神经免疫脑类器官的建立可能解决了hBOs缺乏小胶质细胞的问题, 但hBOs缺乏血管组织、内部缺氧、细胞应激激活、成熟度不足等问题仍然存在. 为了克服上述局限性, 研究人员开发了hBOs异种移植技术以构建更成熟的血管化和功能化的脑类器官. 研究发现, hBOs移植到免疫缺陷小鼠的皮层后可在内部形成有血液流动的功能性血管网络系统, 且hBOs中的神经元能投射到宿主的多个脑区并形成功能性神经连接网络^[61]. 另一项研究将hBOs与人脐静脉内皮细胞共培养60天形成血管化hBOs, 将其移植入免疫缺陷小鼠皮质后, 该血管化hBOs和宿主脑组织形成功能性血管网络, 且移植的hBOs与宿主神经元建立了广泛的电突触及化学突触联系^[80]. 与NPCs移植相比, hBOs移植至免疫缺陷小鼠的前额叶皮质缺损区后其存活率和血管化程度更高^[81].

除了可移植到小鼠皮层中形成血管化类器官, hBOs还能够整合至宿主深部脑区并进一步成熟和行

使功能. 研究报道, 移植的hBOs的神经元轴突可通过皮质层和胼胝体^[61], 伴行锥体束^[82]延伸至大脑的基底区域^[83], 并整合至宿主神经环路中形成有功能的神经网络连接. 另外, Dong等人^[83]将小型hBOs移植到免疫缺陷小鼠的前额叶皮质内侧区后, 发现hBOs神经元可在宿主脑内进行长距离投射, 并功能性整合到宿主神经回路中. 这些研究表明, 移植的hBOs可与宿主大脑整合并形成有功能的神经网络连接.

与宿主神经网络整合的hBOs亦可参与调控宿主的神经活动与行为. 研究报道, hBOs移植增强了小鼠对听觉条件性刺激的恐惧反应^[83]. 最近的一项研究将hBOs移植入出生后3~7天免疫缺陷大鼠的体感皮层, 发现hBOs中的神经元展现出更复杂的形态以及更成熟的突触和电生理功能, 更重要的是hBOs可以整合至宿主脑内控制行为的神经环路中并调节大鼠神经元活动和寻求奖赏行为^[84]. 另外, 越来越多的研究发现, hBOs移植可改善宿主脑损伤^[85-88]. 在大鼠创伤性脑损伤模型中, 移植的hBOs重建了受损的运动皮质, 进而改善神经运动功能和脑损伤^[85]. 同样, 在大脑动脉闭塞的卒中大鼠模型中, 移植的hBOs可促进大鼠运动皮质区域特异性重建^[86]. hBOs移植亦可促进创伤性脑损伤模型小鼠损伤区的血管化和神经修复, 并减少胶质瘢痕的形成^[87]. Cao等人^[88]的研究还发现, hBOs移植可减少中风模型小鼠的组织梗死, 并可将轴突投射到远距离脑区, 整合到宿主神经环路中, 从而改善中风模型小鼠的感觉运动缺陷行为. Jgamadze等人^[89]亦发现, hBOs移植到成年大鼠受损的视觉皮层后, 其可整合到宿主视觉神经网络中, 使宿主恢复视觉刺激反应. 最近, 研究还发现hBOs移植可功能性地整合到宿主纹状体回路中, 并可恢复PD模型小鼠的运动功能^[47].

以上这些研究表明, hBOs体内移植使得hBOs更加成熟, 并可以整合至宿主神经环路中, 参与调控宿主的神经功能和行为活动, 展现了广阔的临床治疗应用前景. 利用脑类器官-动物移植技术, 可以建立NDDs患者来源或特定基因突变的包含小胶质细胞的hBOs并移植入宿主脑中, 在生理条件和人类遗传背景下研究NDDs的发生与发展, 探索hBOs移植对NDDs的治疗作用.

2.3 类器官组装体

NDDs涉及多个脑区、多个神经环路、多种细

胞类型, 甚至多种器官间的相互作用. 例如, 肠道与大脑两个器官间的相互作用被发现与NDDs的发病密切相关. 建立肠-脑类器官融合模型将极大推动NDDs的研究进展. 随着hBOs模型的不断发展, 研究人员已不再局限于使用单一的hBOs模型进行疾病研究. 斯坦福大学 Pasca教授首次提出了“类器官组装体”(assembloid)的概念^[90], 即不同类型细胞或类器官的融合与功能整合形成的3D细胞结构. 该模型可用于研究不同脑区、不同神经环路甚至不同器官之间的相互作用. 目前已有的脑类器官组装体可大致分为: 不同脑区类器官间的融合、hBOs和其他类器官的融合. 不同脑区类器官形成的类组装体包括: 皮层与皮层下区前脑类器官组装体^[91], 背侧和腹侧前脑类器官组装体^[92], 丘脑与皮层类器官组装体^[9], 下丘脑与垂体类器官组装体^[93], 纹状体与皮层类器官组装体^[94], 皮质、丘脑、海马类器官组装体^[95]. 在这些类组装体模型中, 不同脑区类器官之间可以形成功能性的融合与连接, 神经元可以实现跨脑区迁移与投射并形成神经环路, 为研究生理或疾病状态下神经环路的作用提供了更为复杂的模型. 然而目前的研究更多聚焦在类组装体模型的建立, 还有待用于具体的NDDs研究.

除了不同脑区类器官的融合, 研究人员还通过融合不同类型的类器官建立类组装体模型, 为NDDs提供了更多的研究思路与选择. 这些类组装体包括脑-肌肉类组装体^[96], 脑-脊髓-肌肉类组装体^[97], 脑-脊髓类组装体^[98]. Pereira等人^[99]通过融合ALS患者hiPSCs来源的神经外胚层与中胚层类器官构建了NMJ类组装体. 该类组装体能够产生具有功能的、NMJ依赖性骨骼肌收缩, 且ALS患者来源的NMJ类组装体收缩次数显著减少. 研究还发现, 与经过基因编辑的等遗传背景对照相比, 不同基因突变的ALS NMJ类组装体的神经元和骨骼肌的生长没有显著差异, 而突变主要是导致了NMJ缺陷, 表明NMJ功能在ALS中的重要作用^[99]. 此外, Workman等人^[100]将神经嵴细胞融入肠道类器官, 构建了具有肠神经系统功能的类器官组装体, 为今后构建肠-脑类器官组装体提供了基础和依据.

2.4 器官芯片与类器官芯片

早在2004年, Sin等人^[101]便提出“微型细胞模拟培

养装置”的概念。这种微型系统可以实现多种人源细胞的共同培养, 并通过微流控技术模拟体液交互微环境以及生物体内的药物代谢过程。该系统便是器官芯片(organ-on-a-chip)的前身, 有望在人源细胞背景下实现可靠的、低成本、高通量药物筛选。2010年, Huh等人^[102]首次构建了人肺器官芯片, 该芯片能够重现肺泡-毛细血管交互界面的功能活性, 可用于药物筛选和毒理学研究, 是动物模型和临床研究的低成本替代方案。在随后的研究中, 模拟不同组织的器官芯片以及模拟多器官间交互作用的芯片陆续诞生^[103~106], 以模拟更复杂、更真实的生物体内环境。

目前已有研究人员利用微流控平台或器官芯片进行NDDs的相关研究。例如在PD领域, Gribaudo等人^[107]通过微流控装置构建了皮层神经网络, 证明了人 α -Syn蛋白能以类似朊病毒的方式在人神经网络中传播; Iannielli等人^[108]构建了黑质-纹状体器官芯片, 揭示OPA1基因突变导致线粒体功能障碍和多巴胺能神经元丢失。在AD领域, Park等人^[109]开发了一种微流控装置, 将hiPSCs衍生的神经元和星形胶质细胞以及永生小胶质细胞进行共培养, 发现A β 刺激小胶质细胞触发炎症反应在AD中的重要性; Palma-Florez等人^[110]构建了血脑屏障器官芯片, 用来研究AD纳米治疗药物在血脑屏障环境下的通透性。此外, Osaki等人^[111]使用ALS患者来源的hiPSCs构建了具有运动神经元和NMJ的ALS芯片, 并发现ALS芯片比正常对照中的肌肉收缩减少、细胞凋亡增加。利用该芯片, 研究人员还发现了雷帕霉素和博舒替尼联合使用在ALS治疗的潜力。

随着类器官技术的发展, Park等人^[112]在2019年首次提出了类器官芯片(organoid-on-a-chip), 即将类器官植入器官芯片中进行培养。类器官芯片综合了类器官与器官芯片技术的优点, 在模拟真实体内环境具有独特的优势, 在疾病建模、药物筛选、个体化精准医疗等方面具有重要应用价值。近期, 美国食品药品监督管理局发表声明称, 新药研发在人体临床试验前不再要求进行动物实验^[113]。可以想象在不久的将来, 器官芯片和类器官芯片将成为NDDs等各个领域的热点技术, 是基础和临床转化研究的强有力工具。由于类器官芯片技术起步相对较晚, 目前仍处于模型构建的探索阶段。现阶段的脑类器官芯片主要是解决hBOs无功能

性血流灌注的问题^[114], 或用于研究环境毒物暴露对早期神经系统发育的初步探索^[115]。在今后的研究中, 研究人员可以构建hBOs与其他类型类器官交互作用的类器官芯片, 研究中枢神经系统与类淋巴系统、外周免疫系统、肠-脑轴间的联系, 研究器官之间的互作在NDDs发生发展中的作用, 为疾病研究提供新的思路 and 模型。

3 总结与展望

hBOs是神经科学领域新兴发展的研究模型, 在模拟人脑细胞组成、空间结构和生理功能等方面具有独特的优势, 在疾病机制研究、药物筛选和精准医疗等方面具有广阔的应用前景^[116]。目前的hBOs模型可以很好地模拟人脑早期发育特征, 但在模拟多发于老年人群的NDDs仍存在一定的不足。也有一些研究发现NDDs与早期神经发育异常相关^[18,117~120], 临床上也有年轻人群NDDs的病例报道^[121], 这为使用hBOs研究NDDs提供了理论基础。目前研究人员通过建立NDDs患者来源的hiPSCs或通过基因编辑、环境因素暴露、病毒感染等方法建立了NDDs hBOs模型, 为NDDs机制研究和药物研发提供了重要平台。

逐步完善hBOs模型使其更真实地模拟体内生理状态是未来NDDs研究领域的重点发展方向之一。建立神经免疫脑类器官、脑类器官体内移植、类器官组装体、类器官芯片将是进一步完善hBOs模型的潜在解决方案。这些模型和研究方案之间的融合也尤为重要。例如, 建立不同脑区的神经免疫类器官的组装体, 再进行体内移植, 可能有效解决目前hBOs模型存在的主要问题。虽然目前没有证据表明人脑类器官的体内移植能够使动物形成人的意识, 或导致移植物过度生长和肿瘤发生, 但仍需警惕这些问题的发生。此外, 考虑到NDDs是涉及多细胞类型、多脑区、多器官、多因素的复杂疾病, 多器官之间的交流与联系在NDDs中也尤为重要。构建肠-脑交流的新型类器官模型, 研究肠道微生物、肠、迷走神经、脑等多器官之间的联系可能是未来NDDs研究的突破口。相信随着hBOs模型和多组学研究技术的不断发展, NDDs的基础和临床转化研究将迎来新的发展契机。

参考文献

- 1 Lunn J S, Sakowski S A, Hur J, et al. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*, 2011, 70: 353–361
- 2 Wilson 3rd D M, Cookson M R, Van Den Bosch L, et al. Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell*, 2023, 186: 693–714
- 3 Gribkoff V K, Kaczmarek L K. The need for new approaches in CNS drug discovery: why drugs have failed, and what can be done to improve outcomes. *Neuropharmacology*, 2017, 120: 11–19
- 4 Lancaster M A, Renner M, Martin C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 2013, 501: 373–379
- 5 Qian X, Nguyen H N, Song M M, et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell*, 2016, 165: 1238–1254
- 6 Jo J, Xiao Y, Sun A X, et al. Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 248–257
- 7 Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, et al. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep*, 2015, 10: 537–550
- 8 Sakaguchi H, Kadoshima T, Soen M, et al. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat Commun*, 2015, 6: 8896
- 9 Xiang Y, Tanaka Y, Cakir B, et al. hESC-derived thalamic organoids form reciprocal projections when fused with cortical organoids. *Cell Stem Cell*, 2019, 24: 487–497.e7
- 10 Huang W K, Wong S Z H, Pather S R, et al. Generation of hypothalamic arcuate organoids from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 1657–1670.e10
- 11 Lee J H, Shin H, Shaker M R, et al. Production of human spinal-cord organoids recapitulating neural-tube morphogenesis. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 435–448
- 12 Pérez M J, Ivanyuk D, Panagiotakopoulou V, et al. Loss of function of the mitochondrial peptidase pitrm1 induces proteotoxic stress and Alzheimer's disease-like pathology in human cerebral organoids. *Mol Psychiatry*, 2021, 26: 5733–5750
- 13 Arvanitakis Z, Shah R C, Bennett D A. Diagnosis and management of dementia: review. *JAMA*, 2019, 322: 1589–1599
- 14 Migliore L, Coppèdè F. Gene-environment interactions in Alzheimer disease: the emerging role of epigenetics. *Nat Rev Neurol*, 2022, 18: 643–660
- 15 Raja W K, Mungenast A E, Lin Y T, et al. Self-organizing 3D human neural tissue derived from induced pluripotent stem cells recapitulate Alzheimer's disease phenotypes. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0161969
- 16 Gonzalez C, Armijo E, Bravo-Alegria J, et al. Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids. *Mol Psychiatry*, 2018, 23: 2363–2374
- 17 Kim N G, Jung D J, Jung Y K, et al. The effect of a novel mica nanoparticle, STB-MP, on an Alzheimer's disease patient-induced PSC-derived cortical brain organoid model. *Nanomaterials*, 2023, 13: 893
- 18 Kuehner J N, Chen J, Bruggeman E C, et al. 5-hydroxymethylcytosine is dynamically regulated during forebrain organoid development and aberrantly altered in Alzheimer's disease. *Cell Rep*, 2021, 35: 109042
- 19 Shimada H, Sato Y, Sasaki T, et al. A next-generation iPSC-derived forebrain organoid model of tauopathy with tau fibrils by AAV-mediated gene transfer. *Cell Rep Methods*, 2022, 2: 100289
- 20 Yin J, VanDongen A M. Enhanced neuronal activity and asynchronous calcium transients revealed in a 3D organoid model of Alzheimer's disease. *ACS BioMater Sci Eng*, 2021, 7: 254–264
- 21 Bowles K R, Silva M C, Whitney K, et al. ELAVL4, splicing, and glutamatergic dysfunction precede neuron loss in *MAPT* mutation cerebral organoids. *Cell*, 2021, 184: 4547–4563.e17
- 22 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. *Nat Commun*, 2021, 12: 280
- 23 Zhao J, Fu Y, Yamazaki Y, et al. *APOE4* exacerbates synapse loss and neurodegeneration in Alzheimer's disease patient iPSC-derived cerebral organoids. *Nat Commun*, 2020, 11: 5540

- 24 Luo J, Zou H, Guo Y, et al. BACE2 variant identified from HSCR patient causes AD-like phenotypes in hPSC-derived brain organoids. [Cell Death Discov](#), 2022, 8: 47
- 25 Lin Y T, Seo J, Gao F, et al. *APOE4* causes widespread molecular and cellular alterations associated with Alzheimer's disease phenotypes in human iPSC-derived brain cell types. [Neuron](#), 2018, 98: 1141–1154.e7
- 26 Chen X, Sun G, Tian E, et al. Modeling sporadic Alzheimer's disease in human brain organoids under serum exposure. [Adv Sci](#), 2021, 8: e2101462
- 27 Zhang R, Lu J, Pei G, et al. Galangin rescues Alzheimer's amyloid- β induced mitophagy and brain organoid growth impairment. [Int J Mol Sci](#), 2023, 24: 3398
- 28 Pavoni S, Jarray R, Nassor F, et al. Small-molecule induction of $\text{A}\beta$ -42 peptide production in human cerebral organoids to model Alzheimer's disease associated phenotypes. [PLoS ONE](#), 2018, 13: e0209150
- 29 Kong D, Park K H, Kim D H, et al. Cortical-blood vessel assembloids exhibit Alzheimer's disease phenotypes by activating glia after SARS-CoV-2 infection. [Cell Death Discov](#), 2023, 9: 32
- 30 Abrahamson E E, Zheng W, Muralidaran V, et al. Modeling $\text{A}\beta$ 42 accumulation in response to herpes simplex virus 1 infection: 2D or 3D? [J Virol](#), 2021, 95: e02219-20
- 31 Qiao H, Zhao W, Guo M, et al. Cerebral organoids for modeling of HSV-1-induced-amyloid β associated neuropathology and phenotypic rescue. [Int J Mol Sci](#), 2022, 23: 5981
- 32 Lee S E, Choi H, Shin N, et al. Zika virus infection accelerates Alzheimer's disease phenotypes in brain organoids. [Cell Death Discov](#), 2022, 8: 153
- 33 Lim J Y, Lee J E, Kim H K, et al. Human palatine tonsils are linked to Alzheimer's disease through function of reservoir of amyloid beta protein associated with bacterial infection. [Cells](#), 2022, 11: 2285
- 34 Mazzarino R, Perez-Corredor P, Vanderleest T, et al. *ApoE3* christchurch modulates tau phosphorylation and β -catenin/Wnt/Cadherin signaling in induced pluripotent stem cell-derived cerebral organoids from Alzheimer's cases. [bioRxiv](#), 2023, 2023.01.11.523290
- 35 Nemergut M, Marques S M, Uhrlik L, et al. Domino-like effect of C112R mutation on ApoE4 aggregation and its reduction by Alzheimer's disease drug candidate. [Mol Neurodegener](#), 2023, 18: 38
- 36 Kim J Y, Mo H, Kim J, et al. Mitigating effect of estrogen in Alzheimer's disease-mimicking cerebral organoid. [Front Neurosci](#), 2022, 16: 816174
- 37 Choi H, Kim H J, Yang J, et al. Acetylation changes tau interactome to degrade tau in Alzheimer's disease animal and organoid models. [Aging Cell](#), 2020, 19: e13081
- 38 Tolosa E, Garrido A, Scholz S W, et al. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. [Lancet Neurol](#), 2021, 20: 385–397
- 39 Mohamed N V, Sirois J, Ramamurthy J, et al. Midbrain organoids with an *SNCA* gene triplication model key features of synucleinopathy. [Brain Commun](#), 2021, 3: fcab223
- 40 Ha J, Kang J S, Lee M, et al. Simplified brain organoids for rapid and robust modeling of brain disease. [Front Cell Dev Biol](#), 2020, 8: 594090
- 41 Smits L M, Reinhardt L, Reinhardt P, et al. Modeling Parkinson's disease in midbrain-like organoids. [NPJ Parkinsons Dis](#), 2019, 5: 5
- 42 Kano M, Takanashi M, Oyama G, et al. Reduced astrocytic reactivity in human brains and midbrain organoids with *PRKN* mutations. [NPJ Parkinsons Dis](#), 2020, 6: 33
- 43 Jarazo J, Barmppa K, Modamio J, et al. Parkinson's disease phenotypes in patient neuronal cultures and brain organoids improved by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin treatment. [Mov Disord](#), 2022, 37: 80–94
- 44 Wulansari N, Darsono W H W, Woo H J, et al. Neurodevelopmental defects and neurodegenerative phenotypes in human brain organoids carrying Parkinson's disease-linked *DNAJC6* mutations. [Sci Adv](#), 2021, 7: eabb1540
- 45 Zagare A, Barmppa K, Smajic S, et al. Midbrain organoids mimic early embryonic neurodevelopment and recapitulate LRRK2-p.Gly2019Ser-associated gene expression. [Am J Hum Genet](#), 2022, 109: 311–327
- 46 Jo J, Yang L, Tran H -, et al. Lewy body-like inclusions in human midbrain organoids carrying glucocerebrosidase and α -synuclein mutations. [Ann Neurol](#), 2021, 90: 490–505
- 47 Zheng X, Han D, Liu W, et al. Human iPSC-derived midbrain organoids functionally integrate into striatum circuits and restore motor function in a mouse model of Parkinson's disease. [Theranostics](#), 2023, 13: 2673–2692
- 48 Ling S C, Polymenidou M, Cleveland D W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. [Neuron](#), 2013,

- 79: 416–438
- 49 Wang H, Guan L P, Deng M. Recent progress of the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and challenges of gene therapy. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1170996
 - 50 Brown R H, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 2017, 377: 162–172
 - 51 Szebenyi K, Wenger L M D, Sun Y, et al. Human ALS/FTD brain organoid slice cultures display distinct early astrocyte and targetable neuronal pathology. *Nat Neurosci*, 2021, 24: 1542–1554
 - 52 Tamaki Y, Ross J P, Alipour P, et al. Spinal cord extracts of amyotrophic lateral sclerosis spread TDP-43 pathology in cerebral organoids. *PLoS Genet*, 2023, 19: e1010606
 - 53 de Majo M, Koontz M, Marsan E, et al. Granulin loss of function in human mature brain organoids implicates astrocytes in TDP-43 pathology. *Stem Cell Rep*, 2023, 18: 706–719
 - 54 Hong Y, Dong X, Chang L, et al. Microglia-containing cerebral organoids derived from induced pluripotent stem cells for the study of neurological diseases. *iScience*, 2023, 26: 106267
 - 55 Bates G P, Dorsey R, Gusella J F, et al. Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15005
 - 56 Tabrizi S J, Flower M D, Ross C A, et al. Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16: 529–546
 - 57 Johnson E B, Ziegler G, Penny W, et al. Dynamics of cortical degeneration over a decade in Huntington's disease. *Biol Psychiatry*, 2021, 89: 807–816
 - 58 Barnat M, Le Fricc J, Benstaali C, et al. Huntingtin-mediated multipolar-bipolar transition of newborn cortical neurons is critical for their postnatal neuronal morphology. *Neuron*, 2017, 93: 99–114
 - 59 McKinsty S U, Karadeniz Y B, Worthington A K, et al. Huntingtin is required for normal excitatory synapse development in cortical and striatal circuits. *J Neurosci*, 2014, 34: 9455–9472
 - 60 Conforti P, Besusso D, Bocchi V D, et al. Faulty neuronal determination and cell polarization are reverted by modulating HD early phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E762
 - 61 Mansour A A F, Gonçalves J T, Bloyd C W, et al. An *in vivo* model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 432–441
 - 62 Qian X, Su Y, Adam C D, et al. Sliced human cortical organoids for modeling distinct cortical layer formation. *Cell Stem Cell*, 2020, 26: 766–781.e9
 - 63 Zhang W, Jiang J, Xu Z, et al. Microglia-containing human brain organoids for the study of brain development and pathology. *Mol Psychiatry*, 2023, 28: 96–107
 - 64 Abud E M, Ramirez R N, Martinez E S, et al. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*, 2017, 94: 278–293.e9
 - 65 Song L, Yuan X, Jones Z, et al. Functionalization of brain region-specific spheroids with isogenic microglia-like cells. *Sci Rep*, 2019, 9: 11055
 - 66 Bejoy J, Yuan X, Song L, et al. Genomics analysis of metabolic pathways of human stem cell-derived microglia-like cells and the integrated cortical spheroids. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 1–21
 - 67 Ao Z, Cai H, Wu Z, et al. Tubular human brain organoids to model microglia-mediated neuroinflammation. *Lab Chip*, 2021, 21: 2751–2762
 - 68 Popova G, Soliman S S, Kim C N, et al. Human microglia states are conserved across experimental models and regulate neural stem cell responses in chimeric organoids. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 2153–2166.e6
 - 69 Muffat J, Li Y, Omer A, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived glial cells and neural progenitors display divergent responses to Zika and dengue infections. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 7117–7122
 - 70 Abreu C M, Gama L, Krasemann S, et al. Microglia increase inflammatory responses in iPSC-derived human BrainSpheres. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2766
 - 71 dos Reis R S, Sant S, Keeney H, et al. Modeling HIV-1 neuropathogenesis using three-dimensional human brain organoids (hBORGs) with HIV-1 infected microglia. *Sci Rep*, 2020, 10: 15209
 - 72 Wörsdörfer P, Dalda N, Kern A, et al. Generation of complex human organoid models including vascular networks by incorporation of mesodermal progenitor cells. *Sci Rep*, 2019, 9: 15663
 - 73 Sabate-Soler S, Nickels S L, Saraiva C, et al. Microglia integration into human midbrain organoids leads to increased neuronal maturation and

- functionality. [Glia](#), 2022, 70: 1267–1288
- 74 Fagerlund I, Dougalis A, Shakirzyanova A, et al. Microglia-like cells promote neuronal functions in cerebral organoids. [Cells](#), 2022, 11: 124
- 75 Xu R, Boreland A J, Li X, et al. Developing human pluripotent stem cell-based cerebral organoids with a controllable microglia ratio for modeling brain development and pathology. [Stem Cell Rep](#), 2021, 16: 1923–1937
- 76 Ormel P R, Vieira de Sá R, van Bodegraven E J, et al. Microglia innately develop within cerebral organoids. [Nat Commun](#), 2018, 9: 4167
- 77 Bodnar B, Zhang Y, Liu J, et al. Novel scalable and simplified system to generate microglia-containing cerebral organoids from human induced pluripotent stem cells. [Front Cell Neurosci](#), 2021, 15: 682272
- 78 Samudiyata , Oliveira A O, Malwade S, et al. SARS-CoV-2 promotes microglial synapse elimination in human brain organoids. [Mol Psychiatry](#), 2022, 27: 3939–3950
- 79 Chambers S M, Fasano C A, Papapetrou E P, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. [Nat Biotechnol](#), 2009, 27: 275–280
- 80 Shi Y, Sun L, Wang M, et al. Vascularized human cortical organoids (vorganoids) model cortical development *in vivo*. [PLoS Biol](#), 2020, 18: e3000705
- 81 Daviaud N, Friedel R H, Zou H. Vascularization and engraftment of transplanted human cerebral organoids in mouse cortex. [eneuro](#), 2018, 5: ENEURO.0219-18.2018
- 82 Kitahara T, Sakaguchi H, Morizane A, et al. Axonal extensions along corticospinal tracts from transplanted human cerebral organoids. [Stem Cell Rep](#), 2020, 15: 467–481
- 83 Dong X, Xu S B, Chen X, et al. Human cerebral organoids establish subcortical projections in the mouse brain after transplantation. [Mol Psychiatry](#), 2021, 26: 2964–2976
- 84 Revah O, Gore F, Kelley K W, et al. Maturation and circuit integration of transplanted human cortical organoids. [Nature](#), 2022, 610: 319–326
- 85 Wang S N, Wang Z, Xu T Y, et al. Cerebral organoids repair ischemic stroke brain injury. [Transl Stroke Res](#), 2020, 11: 983–1000
- 86 Wang Z, Wang S N, Xu T Y, et al. Cerebral organoids transplantation improves neurological motor function in rat brain injury. [CNS Neurosci Ther](#), 2020, 26: 682–697
- 87 Bao Z, Fang K, Miao Z, et al. Human cerebral organoid implantation alleviated the neurological deficits of traumatic brain injury in mice. [Oxid Med Cell Longev](#), 2021, 2021: 6338722
- 88 Cao S Y, Yang D, Huang Z Q, et al. Cerebral organoids transplantation repairs infarcted cortex and restores impaired function after stroke. [NPJ Regen Med](#), 2023, 8: 27
- 89 Jgamadze D, Lim J T, Zhang Z, et al. Structural and functional integration of human forebrain organoids with the injured adult rat visual system. [Cell Stem Cell](#), 2023, 30: 137–152.e7
- 90 Paşca S P. The rise of three-dimensional human brain cultures. [Nature](#), 2018, 553: 437–445
- 91 Birey F, Andersen J, Makinson C D, et al. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. [Nature](#), 2017, 545: 54–59
- 92 Bagley J A, Reumann D, Bian S, et al. Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. [Nat Methods](#), 2017, 14: 743–751
- 93 Kasai T, Suga H, Sakakibara M, et al. Hypothalamic contribution to pituitary functions is recapitulated *in vitro* using 3D-cultured human iPS cells. [Cell Rep](#), 2020, 30: 18–24.e5
- 94 Miura Y, Li M Y, Birey F, et al. Generation of human striatal organoids and cortico-striatal assembloids from human pluripotent stem cells. [Nat Biotechnol](#), 2020, 38: 1421–1430
- 95 Zhu Y, Zhang X, Sun L, et al. Engineering human brain assembloids by microfluidics. [Adv Mater](#), 2023, 35: e2210083
- 96 Faustino Martins J M, Fischer C, Urzi A, et al. Self-organizing 3D human trunk neuromuscular organoids. [Cell Stem Cell](#), 2020, 26: 172–186.e6
- 97 Andersen J, Revah O, Miura Y, et al. Generation of functional human 3D cortico-motor assembloids. [Cell](#), 2020, 183: 1913–1929.e26
- 98 Son J, Park S J, Ha T, et al. Electrophysiological monitoring of neurochemical-based neural signal transmission in a human brain-spinal cord assembloid. [ACS Sens](#), 2022, 7: 409–414
- 99 Pereira J D, DuBreuil D M, Devlin A C, et al. Human sensorimotor organoids derived from healthy and amyotrophic lateral sclerosis stem cells form neuromuscular junctions. [Nat Commun](#), 2021, 12: 4744
- 100 Workman M J, Mahe M M, Trisno S, et al. Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. [Nat Med](#), 2017, 23: 49–59
- 101 Sin A, Chin K C, Jamil M F, et al. The design and fabrication of three-chamber microscale cell culture analog devices with integrated dissolved

- oxygen sensors. *Biotechnol Prog*, 2004, 20: 338–345
- 102 Huh D, Matthews B D, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 2010, 328: 1662–1668
- 103 Maoz B M, Herland A, FitzGerald E A, et al. A linked organ-on-chip model of the human neurovascular unit reveals the metabolic coupling of endothelial and neuronal cells. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 865–874
- 104 Raimondi M T, Albani D, Giordano C. An organ-on-a-chip engineered platform to study the microbiota-gut-brain axis in neurodegeneration. *Trends Mol Med*, 2019, 25: 737–740
- 105 Skardal A, Aleman J, Forsythe S, et al. Drug compound screening in single and integrated multi-organoid body-on-a-chip systems. *Biofabrication*, 2020, 12: 025017
- 106 Wang X, Cirit M, Wishnok J S, et al. Analysis of an integrated human multiorgan microphysiological system for combined tolcapone metabolism and brain metabolomics. *Anal Chem*, 2019, 91: 8667–8675
- 107 Gribaudo S, Tixador P, Bousset L, et al. Propagation of α -synuclein strains within human reconstructed neuronal network. *Stem Cell Rep*, 2019, 12: 230–244
- 108 Iannielli A, Ugolini G S, Cordiglieri C, et al. Reconstitution of the human nigro-striatal pathway on-a-chip reveals OPA1-dependent mitochondrial defects and loss of dopaminergic synapses. *Cell Rep*, 2019, 29: 4646–4656.e4
- 109 Park J, Wetzel I, Marriott I, et al. A 3D human triculture system modeling neurodegeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 2018, 21: 941–951
- 110 Palma-Florez S, López-Canosa A, Moralez-Zavala F, et al. BBB-on-a-chip with integrated micro-TEER for permeability evaluation of multi-functionalized gold nanorods against Alzheimer's disease. *J Nanobiotechnol*, 2023, 21: 115
- 111 Osaki T, Uzel S G M, Kamm R D. Microphysiological 3D model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from human iPS-derived muscle cells and optogenetic motor neurons. *Sci Adv*, 2018, 4: eaat5847
- 112 Park S E, Georgescu A, Huh D. Organoids-on-a-chip. *Science*, 2019, 364: 960–965
- 113 Wadman M. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science*, 2023, 379: 127–128
- 114 Salmon I, Grebenyuk S, Abdel Fattah A R, et al. Engineering neurovascular organoids with 3D printed microfluidic chips. *Lab Chip*, 2022, 22: 1615–1629
- 115 Wang Y Q, Tao T T, Qin J H. Organoids-on-a-chip (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 211–220 [王亚清, 陶婷婷, 秦建华. 类器官芯片. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 211–220]
- 116 Pang W, Liu Y T, Xiang Y F. Current progress in brain organoid technology (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 161–174 [庞澈, 刘彦彤, 向阳飞. 脑类器官技术研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 161–174]
- 117 Hurley E M, Mozolewski P, Dobrowolski R, et al. Familial Alzheimer's disease-associated PSEN1 mutations affect neurodevelopment through increased Notch signaling. *Stem Cell Rep*, 2023, 18: 1516–1533
- 118 Farrow S L, Schierding W, Gokuladhas S, et al. Establishing gene regulatory networks from Parkinson's disease risk loci. *Brain*, 2022, 145: 2422–2435
- 119 Barnat M, Capizzi M, Aparicio E, et al. Huntington's disease alters human neurodevelopment. *Science*, 2020, 369: 787–793
- 120 Yeh T H, Liu H F, Li Y W, et al. C9orf72 is essential for neurodevelopment and motility mediated by Cyclin G1. *Exp Neurol*, 2018, 304: 114–124
- 121 Jia J, Zhang Y, Shi Y, et al. A 19-year-old adolescent with probable Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis*, 2023, 91: 915–922

Applications and prospect of human brain organoids in neurodegenerative diseases

YAN HongYe^{1,2}, WANG HuiMin^{1,2}, ZHANG WenDiao^{1,2}, JIANG JiaMei^{1,2}, WAN Juan^{1,2},
XU ZhenHong^{1,2}, YANG ZhenYu^{1,2}, TANG BeiSha^{1,2,3} & MENG QingTuan^{1,2}

1 Multi-Omics Research Center for Brain Disorders, Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China;

2 Clinical Research Center for Immune-Related Encephalopathy of Hunan Province, The First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China;

3 Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Human brain organoids (hBOs) are in vitro three-dimensional cell cultures that recapitulate the cell composition, spatial structure, physiological functions and other key features of the human brain. Currently, hBOs have been widely utilized to examine human brain development, gene function, disease mechanism, drug screening, etc. In this review, we focus on neurodegenerative diseases (NDDs), summarize the applications of hBOs in the study of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Huntingdon's disease and outline the challenges and future directions in this field.

neurodegenerative diseases, human brain organoids, neuroimmune brain organoids, organoids transplantation, assembloids, organoids-on-a-chip

doi: [10.1360/SSV-2023-0116](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0116)