



脑类器官技术研究进展

庞激, 刘彦彤, 向阳飞*

上海科技大学生命科学与技术学院, 上海 201210

* 联系人, E-mail: xiangyf@shanghaitech.edu.cn

收稿日期: 2021-09-11; 接受日期: 2021-11-08; 网络版发表日期: 2022-04-19

上海市科委浦江人才项目(编号: 20PJ1410400)和上海科技大学启动经费资助

摘要 脑类器官是指体外培养的, 具备与大脑相似的细胞类型、一定的空间组织结构以及对应生物学功能的三维神经组织. 脑类器官可为研究人类大脑发育与功能、疾病发生、药物发现等提供新的研究模型. 区域特异性脑类器官的构建, 推动了脑类器官技术的进一步发展. 本文简要介绍了脑类器官技术, 包括区域特异性脑类器官的发展进程. 重点综述了脑类器官模型用于探究大脑发育机制的技术及应用. 此外, 本文也讨论了多种关键技术, 包括脑类器官血管化、基因编辑、单细胞测序以及其他工程性技术在脑类器官研究中的应用与挑战.

关键词 脑类器官, 迁移模型, 共培养, 血管化, 基因编辑, 单细胞RNA测序

类器官是指由多能干细胞(pluripotent stem cell, PSC)或成体干细胞(adult stem cell, ASC)衍生、自组织形成的体外三维(three-dimensional, 3D)培养物, 可在体外模拟特定器官的细胞构成、组织结构与功能. 与传统的二维(two-dimensional, 2D)培养相比, 类器官能展现更复杂的细胞类型多样性与细胞行为. 目前, 神经类器官主要基于胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)或诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)建立.

2013年, Lancaster等人^[1]在体外成功分化获得具有类似大脑结构特征的三维培养物, 命名为全脑类器官(cerebral organoids). 近年来, 除了非定向分化的全脑类器官系统, 基于定向分化策略的区域特异性脑类器官也得到了快速发展. 目前, 模拟皮层^[2,3]、中脑^[4,5]、小脑^[6]、丘脑^[7]、海马^[8]、脊髓^[9]等区域的特

异性脑类器官已被成功建立. 区域特异性脑类器官的建立, 将有助于进一步探究人类大脑发育与疾病. 本文简要回顾了脑类器官建立和发展的历程, 介绍了目前脑类器官研究中使用的关键新技术, 并讨论了目前面临的主要问题与挑战.

1 脑类器官的发展

1.1 脑类器官发展背景

脑类器官技术的发展基于早期二维神经外胚层细胞诱导和三维拟胚体(embryoid body, EB)分化的研究. 由于二维培养体系下细胞类型较为单一, 细胞间相互作用与真实组织差异大, 以及直接研究人类脑组织难度大等问题, 研究人员也开始探索从三维水平诱导多能干细胞(包括胚胎干细胞和诱导多能干细胞)神经分

引用格式: 庞激, 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

Pang W, Liu Y T, Xiang Y F. Current progress in brain organoid technology (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 161–174, doi: [10.1360/SSV-2021-0278](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0278)

化. 1992年, Reynolds等人^[10]利用表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)处理, 从小鼠胚胎脑纹状体分离了神经祖细胞, 并诱导产生了含有神经元和胶质细胞的三维神经球体. 2001年, Zhang等人^[11]将人胚胎干细胞聚集为拟胚体, 通过添加成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF或FGF-2), 贴壁培养后分化得到“玫瑰花结样”神经管状结构; 去除FGF-2后, 神经上皮进一步分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞. 随后, 不依赖于拟胚体培养的多能干细胞单层神经分化方法也被建立^[12]. 由多能干细胞定向分化产生的神经干细胞(neural stem cells, NSCs), 经过皮层神经发生的延长期后, 具备终末成熟神经元的电生理特性, 并可形成功能性突触网络^[13].

2005年, Sasai团队^[14]建立了无血清悬浮培养(serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation, SFEBq culture)方法, 通过同时添加神经分化诱导因子(如Wnt拮抗剂、Nodal拮抗剂、SHH激活剂)等, 成功将小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)产生的拟胚体分化为端脑组织. 2013年, Lancaster等人^[1]建立了基于人类多能干细胞的三维脑类器官培养系统, 即全脑类器官(cerebral organoid). 全脑类器官包含多种离散的大脑区域组织, 并展现了人类皮层发育的基本特征, 如脑室样区域具有丰富的放射状胶质细胞. 目前, 脑类器官培养体系主要可分为两类: 非定向型脑类器官(即全脑类器官)与区域特异性脑类器官(表1).

1.2 非定向型脑类器官

胚胎发育过程中, 神经管发育成三个初级脑泡区域, 进而发育为全脑结构. 早期的脑类器官分化大多利用无血清培养^[15]方法产生神经外胚层, 并利用基质胶(matrigel)和生物反应器^[1]等进行长期神经分化培养, 以此产生包含多个脑区的全脑类器官. 该方法很大程度上取决于多能干细胞的内在信号传导和自组织能力^[34]. 全脑类器官与体内大脑的细胞类型、结构特征类似, 并且具有展示大脑生理、病理特征的潜力, 因此为大脑功能、疾病模拟、药物发现等研究提供了新的方法.

全脑类器官含有前脑、中脑、后脑、海马区、视网膜等区域的相关细胞, 具有顶端-基底极性(apical-basal polarity)^[1]. 进一步研究表明, 三维培养与组织工

程结合可提高分化可重复性, 并改善脑类器官组织结构^[16]. 2017年, 研究人员利用乙交酯丙交酯共聚物(poly(lactide-co-glycolic acid), PLGA)纤维微丝作为支架, 建立了微丝工程脑类器官(microfilament-engineered cerebral organoids, enCORs), 该体系可促进神经外胚层形成并改善皮层发育^[16]. 2019年, 其利用气液界面培养全脑类器官(air-liquid interface cerebral organoid, ALI-CO), 提高了全脑类器官中神经元的存活率, 促进了轴突生长^[17]. 另外, 通过改变拟胚体的大小、增加培养表面积等方法, 如切片培养(slice culture), 可保持营养和氧气进入脑类器官内部区域, 达到长期培养的目的^[35].

1.3 区域特异性大脑类器官

全脑类器官存在一定的异质性, 包括可能含有非外胚层的细胞类型^[18]. 为便于研究特定脑区特征, 研究人员通过体外模拟大脑发育过程中的信号调控机制, 已建立了一系列区域特异性脑类器官. 这些区域特异性脑类器官可呈现人类大脑特定区域的部分功能特征.

前脑包括视杯、皮层、海马区、端脑、丘脑、下丘脑等脑区. 2011年, Eiraku等人^[19]通过抑制WNT通路减少神经管尾化, 随后激活WNT, SHH通路促进视网膜上皮结构形成, 建立了含有多视视网膜细胞类型的视杯类器官. 通过诱导产生成熟光感受器细胞, 可进一步促进视杯类器官的功能完善^[36]. 随后, 研究人员构建了重现大脑皮层发育的三维培养系统^[2,3], 为建立区域特异性脑类器官提供了基础. Qian等人^[20]通过建立微型生物反应器、优化神经诱导因子等, 建立了可重现6个皮层的脑类器官. 随后, 通过切片培养脑类器官, 解决了脑类器官培养过程中内部缺氧的问题, 减少了皮层类器官的细胞死亡^[21]. Sakaguchi等人^[8]利用胚胎干细胞诱导背侧端脑结构, 成功分化得到海马颗粒神经元和锥体神经元, 为未来构建更完善的海马突触回路奠定了基础. 2016年, Qian等人^[20]通过抑制SMAD通路、激活WNT3A, SHH信号通路等构建了下丘脑类器官. 2019年, Xiang等人^[7]通过抑制SMAD通路、尾化神经外胚层组织、添加BMP7等诱导产生了丘脑类器官. 目前, 在脑类器官中建立精细亚区仍存在较大挑战, 如建立针对不同功能皮层或其他脑区中特定核团的模型. 最近, 研究人员成功构建了下丘脑弓

表 1 多能干细胞衍生的脑类器官类型

Table 1 Brain organoids derived from pluripotent stem cells

主要类型	分化策略	脑区	培养条件	表型	参考文献
全脑类器官	非定向	全脑	悬浮, 旋转生物反应器	顶端-基底极性、核间运动、神经干细胞分裂和神经元迁移模式良好, 外脑室下区(outer subventricular zone, OSVZ)增大	[1]
		前脑	微丝(microfilaments), 悬浮, 旋转水平摇床	皮层发育良好, 皮层板极化, 皮层的径向组织、神经元迁移	[16]
		全脑	悬浮, 旋转生物反应器	细胞多样, 包括皮层和视网膜等细胞, 神经元成熟, 树突棘形成, 自发性神经网络形成	[18]
		前脑	微丝, 悬浮, 旋转水平摇床, 气液界面(air-liquid interface)	神经元长距离投射, 有功能性输出的皮层和胼胝体束	[17]
区域特异性脑类器官	定向	皮层	悬浮	以空间和时间控制的模式形成皮层神经上皮细胞, 自组织结构具有顶端-基底极性	[15]
		背侧端脑	悬浮	包含径向胶质细胞、神经元祖细胞和早期神经元的多层结构, 转录组与受孕后8~10周人类大脑皮层相似	[2]
		皮层	悬浮, 40% O ₂ /5% CO ₂	自组织的皮层组织形成轴向极性, 生成半球形结构. 神经上皮自身形成一个多层结构, 包括三个神经元区(下板区、皮层板和Ca-jal-Retzius细胞区)和三个祖细胞区(脑室区、脑室下区、中间区)	[3]
		皮层	悬浮	类器官中包含皮层深层和表层神经元, 有电生理活性, 被星形胶质细胞包围, 并形成功能性突触	[23]
		皮层	悬浮, 旋转生物反应器	重现人类大脑皮层发育的关键特征, 包括祖细胞区、神经发生、基因表达, 尤其是人类特有的外层放射状神经胶质细胞	[20]
		皮层	悬浮, 旋转水平摇床	外放射状胶质细胞呈径向结构, 出现皮质表层和深层细胞, 包含星形胶质细胞	[26]
		皮层	悬浮, 旋转生物反应器, 旋转水平摇床, 切片	前脑类器官表现出多层祖细胞区, 形成扩大的皮质板, 产生6个皮质层的所有不同神经元亚型	[21]
		视杯	悬浮, 40% O ₂ /5% CO ₂	产生视网膜色素上皮、神经视网膜, 包含六层神经视网膜的感觉层细胞, 出现外翻折叠现象	[19,29]
		腹侧端脑	悬浮	腹侧前脑标记物NKX2-1, DLX2和GSX2表达	[25]
		海马区	悬浮, 40% O ₂ /5% CO ₂	产生海马颗粒神经元和锥体神经元, 两者形成功能性网络	[8]
		脉络丛	悬浮, 40% O ₂ /5% CO ₂	出现乳头状的薄TTR+脉络丛组织	[8]
		脉络丛	悬浮, 旋转摇床	形成立方体上皮, 产生“囊肿”或隔室, 其中包含类似于脑脊液的分泌物, 形成紧密连接性屏障	[30]
		皮层内侧神经节隆起(medial ganglionic eminence, MGE)	悬浮, 旋转水平摇床	MGE类器官成熟时含有GABA能、SST+等中间神经元, OSVZ样结构中观察到祖细胞迁移现象	[26]
		丘脑	悬浮, 旋转水平摇床	丘脑类器官富集表达OTX2, GBX2和DBX1, 与体内丘脑中神经元表达相似	[7]
		下丘脑	悬浮, 旋转生物反应器	40天类器官出现肽能神经元标记物, 有细胞群体表达OTP(a homeobox protein, 对于下丘脑谱系分化十分重要)	[20]

(表1续1)					
主要类型	分化策略	脑区	培养条件	表型	参考文献
		下丘脑(弓状核)	悬浮, 旋转水平摇床	下丘脑弓状核区发育中表达OTP, DLX, TBX3 POMC等标记物, 含有多种神经元群体	[22]
		下丘脑-垂体	悬浮, 40% O ₂	下丘脑与垂体前部神经元同时发育, 产生成熟的下丘脑组织, 有促肾上腺皮质激素分泌	[31]
		中脑	悬浮, 旋转生物反应器	中脑类器官中晚期含有功能性多巴胺能神经元	[20]
		中脑	悬浮, 旋转水平摇床	中脑类器官中晚期含有功能性多巴胺能神经元	[5]
		后脑(小脑)	悬浮	产生具有菱形样结构的小脑板上皮, 含有电生理活性的浦肯野细胞(Purkinje cells)	[6]
		脑干	悬浮, 旋转水平摇床	含中脑/后脑祖细胞, 去甲肾上腺素能和胆碱能神经元、多巴胺能神经元和神经嵴谱系细胞	[32]
		神经肌肉	悬浮, 旋转水平摇床	人PSC衍生的神经-中胚层祖细胞在三维培养中产生人神经肌肉类器官, 其形成功能性神经肌肉连接	[33]
融合类器官(组装体)	定向	腹侧前脑与背侧前脑	悬浮, 旋转水平摇床	含谷氨酸能神经元、GABA能神经元, 中间神经元跳跃式迁移	[24,25]
		MGE与皮层	悬浮, 旋转水平摇床	构建内侧神经节隆起类器官, 产生皮层-MGE神经网络, 中间神经元迁移	[26]
		丘脑和皮层	悬浮, 旋转水平摇床	皮层与丘脑建立轴突投射	[7]
		皮层和脊髓和肌肉	悬浮, Transwell	组装成完整的皮层-运动环路, 形成功能性突触连接, 控制肌肉收缩	[28]
		皮层和纹状体	悬浮	皮层神经元将轴突投射到纹状体类器官, 并在组装体中形成突触连接	[27]

形核类器官(arcuate organoids , ARCOs), 且基于患者诱导多能干细胞建立了ARCO模型, 展示了人类大脑发育过程中及疾病状态下的脑区核团特异性机制^[22].

中脑多巴胺神经元与多种神经退行性疾病密切相关. 2016年, Jo等人^[5]通过抑制SMAD通路、激活WNT通路、添加SHH/FGF8诱导产生顶板结构, 建立了中脑类器官并成功检测到多巴胺产生, 为研究帕金森等疾病提供了新的平台. Muguruma等人^[6]通过抑制SMAD通路、添加FGF2、Insulin促进脑类器官尾部化, 建立了中脑-后脑边界结构, 并通过进一步添加FGF19, SDF1促进了小脑上皮样组织的产生. 由于小脑区域细胞类型复杂、结构精细, 小脑类器官培养体系还有待进一步探索.

除神经元外, 胶质细胞也在大脑中发挥重要作用. 2015年, Paşca等人^[23]跟踪分析了皮质球体(human cortical spheroid, hCSs)中星形胶质细胞的成熟过程. 星形胶质细胞介导突触发生, 对神经网络的功能构建起重

要作用. 随着培养时间的延长, 皮质球体中的星形胶质细胞从以胚胎期状态为主, 转变为成熟的细胞状态, 可用于研究疾病的发展与建模^[37]. 另一种重要的胶质细胞, 少突胶质细胞的分化, 也进一步促进了脑类器官的功能完善^[38,39].

目前, 关于区域性脑类器官的构建方法也正在继续发展. 结合发育诱导因子、生物材料、生物反应器等指导, 有望更准确地实现区域性脑类器官的构建, 以模拟不同脑区发育、构建疾病模型.

2 脑类器官模型探究人脑发育机制

2.1 脑类器官共培养与融合

(1) 细胞迁移. 神经元迁移是大脑发育过程中的重要环节. 新生神经元产生后会迁移至目的区域, 建立短距离和长距离投射, 最终形成功能性神经回路. 人类与其他模式动物(如小鼠)相比, 其大脑具有更大体

积、更高复杂程度、更长的发育时期。比如, 人类神经元迁移在孕期持续数月, 并在出生后早期继续, 而啮齿类动物的这一过程仅需数天即可完成^[40]。

脑类器官可用于研究神经疾病中的细胞迁移缺陷。Miller-Dieker综合征(Miller-Dieker syndrome, MDS)是一种严重的无脑回畸形疾病, 患者大脑皮层表面光滑^[41]。使用Miller-Dieker综合征患者来源的诱导干细胞建立的脑类器官与对照组相比, 其皮层神经元的放射状迁移行为发生异常^[42,43]。在脑室旁灰质异位(periventricular heterotopia)的类器官模型中, 神经元迁移的速度、曲折性等均有变化^[44]。

区域特异性脑类器官及融合培养技术的发展, 使得脑类器官可用来构建不同脑区间相互作用。 γ -氨基丁酸能中间神经元(GABAergic interneurons)从腹侧端脑(ventral telencephalon)向大脑皮层(cerebral cortex)的切向迁移已研究得较为充分^[45,46]。区域特异性脑类器官可用于模拟人类中间神经元的切向迁移行为(图1A)。2017年报道的三项研究, 分别建立了模拟背侧端脑(富集兴奋性神经元)和腹侧端脑(富集抑制性神经元)的类器官模型; 通过将两种类器官融合实现功能整合, 在体外三维培养环境下再现了人类中间神经元的切向迁移^[24-26,47]。其中, Pasca团队^[25]将腹侧端脑与背侧端脑类器官进行融合, 观察到中间神经元向皮层组织的跳跃迁移, 并发现Timothy综合征患者来源的融合类器官中中间神经元存在异常迁移。Bagley等人^[24]通过融合腹侧端脑与全脑类器官, 建立了具备背腹轴的融合脑类器官, 并基于此研究了CXCR4依赖的中间神经元从端脑腹侧到背侧的迁移。Xiang等人^[26]构建了人内侧神经节隆起(medial ganglionic eminence, MGE)类器官, 该区域是产生皮层中间神经元的关键腹侧脑区; 该研究通过将MGE类器官与皮层类器官融合, 再现了中间神经元的切向迁移, 证实了非肌肉型肌球蛋白II对人类中间神经元迁移调控的关键作用。融合模型将有利于在更多区域建立迁移模型。另外, 星形胶质细胞^[48]和血管^[49]也是神经元迁移调节因子的重要组成部分, 对神经元迁移过程中真实细胞环境重现具有重要作用。将其引入培养体系, 有望更好地再现真实的体内环境。

(2) 环路连接。目前已有一系列研究报道了类器官融合技术在远程连接模型构建中的应用。基于多能干细胞分化而来的脊髓运动神经元(spinal motor neu-

rons)与人成肌细胞衍生的骨骼肌共培养, 可建立功能性神经肌肉接头(图1A), 在光刺激条件下触发抽搐^[50]。2019年, Giandomenico等人^[17]建立了ALI-CO系统, 通过与小鼠脊髓切片共培养, 实现了脑类器官与脊髓神经元突触连接, 以及小鼠肌肉收缩控制(图1A)。在该系统中, 人源皮层神经轴突束能有效地控制小鼠脊髓, 且椎旁肌肉的收缩由ALI-CO轴突束控制^[17]。另外, 通过共培养人多能干细胞来源的神经嵴细胞和人肠道类器官细胞, 可体外再现肠神经系统(enteric nervous system, ENS)的发育^[51]。

丘脑与皮层间的双向轴突投射对感觉信息传递、感觉决策和执行控制等至关重要^[52,53]。2019年, 首个三维脑类器官投射模型建立^[7](图1A)。该研究通过将人皮层类器官与丘脑类器官进行融合, 在体外再现了丘脑与皮层的远程相互投射。在丘脑-皮层融合体中, 轴突表现出直接靶向以及突触形成, 且类器官融合后丘脑神经元的放电能力明显增加。此外, 皮层纹状体投射也是调节动机行为的前脑回路的关键组成部分。研究人员利用多能干细胞衍生的纹状体类器官与大脑皮层类器官组装, 建立了皮层纹状体组合体, 观察到皮层神经元将轴突投射至纹状体类器官并形成突触连接^[27]。融合/组装类器官模型也为模拟神经-肌肉交互提供了新的方法。通过人诱导多能干细胞分化而来的皮层类器官、人后脑/脊髓类器官与人骨骼肌类器官的组装, 可构建皮层-运动三维组装体(图1A); 该组装体可产生功能性神经回路, 以模拟肌肉收缩的皮层控制^[28]。不同的融合类器官系统可用于探究更多的器官、组织间的相互作用, 阐释疾病发生机制, 探索治疗策略。

融合技术不仅可以在体外研究细胞间的相互作用, 也可以探究发育组织中心对脑类器官分化的影响。在大脑发育过程中, 分泌Sonic Hedgehog(SHH)的组织中心沿体轴产生不同的形态梯度, 引导脑区分化^[54]。Cederquist等人^[55]利用TALEN介导的基因编辑, 设计了SHH诱导表达型人多能干细胞(iSHH)。iSHH细胞团可分泌SHH, 以距离依赖的方式在脑类器官中形成背腹轴模式(图1A)。通过组织中心引导, 可在体外构建更加符合体内发育环境的区域特异性脑类器官。当然, 与组织中心的共培养还存在诸多问题, 如其在类器官发育过程中存在随机迁移的现象, 该缺陷可能会对形态发生的调控形成挑战。

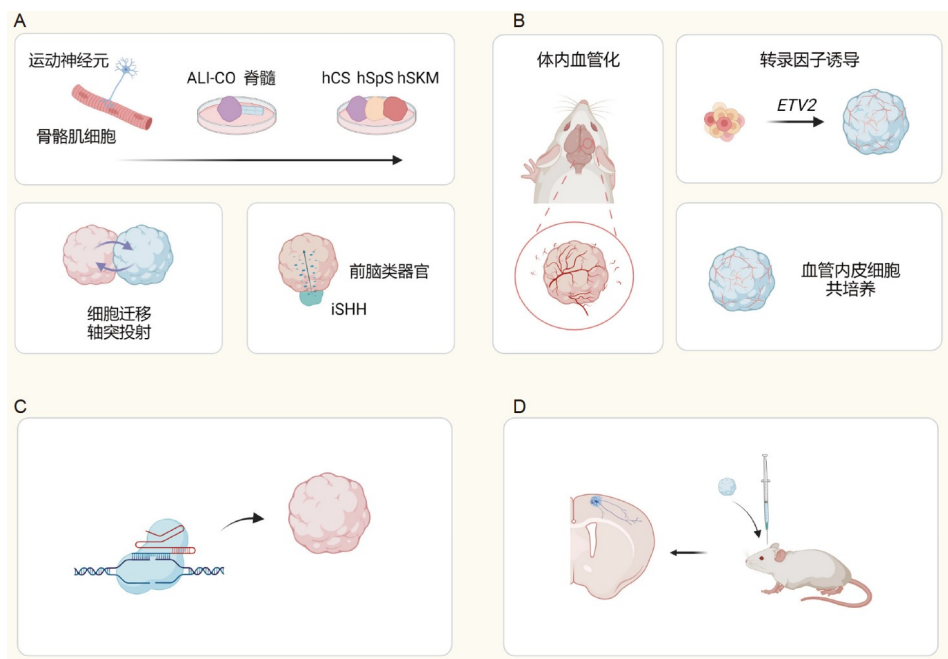


图 1 脑类器官研究技术与应用. A: 共培养与融合技术(上: 脊髓运动神经元与人成肌细胞衍生的骨骼肌二维共培养, 建立功能性神经肌肉接头^[50]; ALI-CO与小鼠脊髓切片共培养^[17], 指导肌肉收缩; hCS, hSpS与hSkM三者融合构建皮层-运动组装体^[28], 箭头表示按照时间顺序依次出现的技术. 左下: 融合脑类器官在体外再现细胞迁移与投射^[7,24-27]. 右下: 组织中心分泌SHH, 并作为信号中心, 以距离依赖的方式使其产生前脑组织的背腹轴模式^[55]). B: 脑类器官中血管化的产生(左: 脑类器官移植到啮齿动物体内实现血管生成^[59]. 右上: 诱导ETV2表达构建血管化的脑类器官^[67]. 右下: hPSCs与HUVECs共培养产生血管化的脑类器官^[66]). C: 脑类器官中基因编辑技术应用. D: 脑类器官异种移植

Figure 1 Techniques and applications of brain organoid research. A: Brain organoid co-culture and fusion. Top: Spinal cord motor neurons were co-cultured with human myoblast-derived skeletal muscle to establish functional neuro-muscular joints^[50]; ALI-CO^[17] was co-cultured with mouse spinal cord sections to guide muscle contraction; hCS, hSpS and hSkM were assembled to construct cortical motor assembly^[28], the arrows indicate the chronological order of emerging technologies. Bottom left: Cell migration and projection reconstructed by fusion of brain organoids *in vitro*^[7,24-27]. Bottom right: the tissue center secretes SHH to produce the dorso-ventral pattern of forebrain tissue in a distance-dependent manner^[55]. B: Vascularization of brain organoids. Left: Transplanting brain organoids into rodents to achieve angiogenesis^[59]. Upper right: Induction of ETV2 expression to construct vascularized brain organoids^[67]. Bottom right: hPSCs and HUVECs were co-cultured to produce vascularized brain organoids^[66]. C: Application of gene editing technology in brain organoids. D: Brain organoid transplantation

2.2 脑类器官移植

研究脑类器官中神经网络功能的策略之一是将其异种移植至模式动物中(图1D), 以此来探究体内发育环境下神经网络的连接及信号传递. 由多能干细胞分化而来的神经元具有替代在体神经元的潜力^[56,57]. 移植后的神经元在大脑内可建立轴突投射, 与特定皮层区域建立突触连接, 重新形成皮层回路^[58]. 将脑类器官移植至小鼠大脑后, 宿主血管网络可侵入生长, 脑类器官中细胞存活率提高^[59,60].

此外, 研究人员建立了组织体积更小的脑类器官, 将其移植到小鼠内侧前额叶皮层后, 发现脑类器官神经元在1个月内投射至基底脑区^[61]. 研究显示, 移植的脑类器官生成了人类谷氨酸能神经元, 这些神经元在

小鼠大脑中获得了成熟的电生理特性. 通过与小鼠宿主神经元形成双向突触连接, 移植的脑类器官在功能上整合到内源的神经回路中^[61]. 因此, 通过移植建立皮层下投射, 可为脑类器官用于神经系统疾病的治疗提供重要信息. 此外, 移植后的血管化环境改善了脑类器官的长期功能成熟; 基于移植策略, 将有助于建立人类神经发育、神经系统疾病新模型^[62].

3 脑类器官研究技术

3.1 脑类器官血管化

脑类器官与真实的人类大脑相比, 目前仍存在较大差异. 其中的关键挑战之一是血管系统的缺失. 血

管功能对气体渗透、营养供应、神经分化等起重要作用^[63,64]。氧气、营养物质渗透不足会导致类器官中心易形成坏死区域,影响脑类器官正常发育和神经元迁移途径^[65]。因此,构建血管网络是脑类器官技术优化的迫切需求。目前,脑类器官血管化主要可分为两类途径:通过体内移植在脑类器官中建立血管和在体外培养中构建血管。

2018年,研究人员将脑类器官移植至NOD-SCID免疫缺陷小鼠大脑皮层(图1B),移植后14天内小鼠血管浸润到植入的脑类器官中;与体外无血管化的脑类器官相比,体内发育环境提高了脑类器官中细胞成熟与存活^[59]。脑类器官移植体可存活200天以上,且移植的脑类器官可建立广泛的轴突生长,从而实现人源轴突与小鼠大脑中神经元的功能连接^[59]。将与人脐静脉内皮细胞共培养生成的人血管化脑类器官(vascularized organoids, vOrganoids)移植至小鼠S1皮层,可在移植体中产生人-鼠血管组织连接;与无血管脑类器官相比,血管化脑类器官移植可增强血管形成,并促进细胞存活^[66]。因此,一系列的移植实验证明了血管化在脑类器官成熟中的重要性。

体外构建血管化方面,2019年,Cakir等人^[67]将表达ETV2(ETS variant 2)的人胚胎干细胞与野生型胚胎干细胞共分化,实现了在皮层类器官中定向诱导血管内皮细胞分化,基于此构建了血管化皮层类器官(图1B)。血管化皮层类器官(vascularized human cortical organoids, vhCOs)形成可灌注的血管;与对照皮层类器官相比,血管化皮层类器官中细胞存活率显著提高^[67]。此外,研究人员通过与静脉内皮细胞共培养,可在体外建立血管化脑类器官(图1B),静脉内皮细胞在脑类器官中可形成发育良好的网状或管状血管系统,单细胞RNA测序证实,该血管化脑类器官系统与人类胎儿端脑具有相似的分子特性和细胞类型^[66]。体外培养条件下脑类器官与血管系统的整合,将有助于改善脑类器官长期培养过程中出现的中心坏死的现象。

3.2 基因编辑

结合基因编辑技术可进一步拓展对脑类器官作为大脑发育^[25]、进化^[68]、疾病^[69],以及药物发现^[70]等方面的应用。通过基因编辑(图1C),可在脑类器官中引入不同突变类型(如点突变、大片段基因序列去除或重组)。

目前应用成熟的核酸酶工具包括转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)、锌指核酸酶(Zinc-finger nuclease, ZFN)和基于成簇规律间隔短回文重复(clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR)的编辑技术。其中,CRISPR/Cas9系统因其易用性和高效性,近年来被广泛拓展及应用,包括其与脑类器官技术的结合。基因编辑可在构建脑类器官的初始细胞,如胚胎干细胞^[71,72]或诱导多能干细胞^[42]、早期拟胚体或成熟脑类器官^[69]开展。

目前,CRISPR/Cas9系统在脑类器官中的主要应用之一一是用于构建疾病模型。Matsui等人^[73]利用CRISPR/cas9介导的基因编辑技术,建立了人*RB1*敲除的人胚胎干细胞系,并将其分化为脑类器官。与野生型脑类器官相比,*RB1*功能缺失导致脑类器官体积增大。此外,神经干细胞、神经母细胞(neuroblasts)以及神经元凋亡增加,且神经元迁移出现异常。基于CRISPR/Cas9基因编辑技术将MECP2突变导入人类胚胎干细胞,可构建Rett综合征(Rett syndrome, RTT)体外细胞模型。研究表明,MECP2突变导致胚胎干细胞分化而来的大脑中间神经元的电生理活性受损,其转录组和蛋白组也出现异常;突变细胞建立的内侧神经节隆起类器官、皮层类器官展示了区域特异性及细胞类型特异性的转录异常^[74]。近期利用患者来源的诱导多能干细胞结合CRISPR/Cas9基因编辑,研究人员建立了由*SURF1*基因突变引起的Leigh综合征(Leigh syndrome, LS)体外模型^[75]。通过基因编辑在人胚胎干细胞引入*DNAJC6*突变,由*DNAJC6*突变细胞建立的人中脑类器官展示出关键的帕金森病理特征,如中脑多巴胺神经元变性和 α -突触核蛋白聚集^[76]。另外,研究表明利用CRISPR/Cas9基因编辑将*DSCAM*基因敲低,可有效挽救唐氏综合征(Down syndrome, DS)皮层类器官中神经前体细胞增殖能力降低以及皮层神经元的缺陷^[77]。

此外,也可在脑类器官发育过程中对样本进行基因编辑。比如,研究表明通过CRISPR/Cas9技术在早期脑类器官中引入致癌突变,可体外模拟脑肿瘤的发生^[69]。利用基因编辑激活癌基因的同时,破坏肿瘤抑制因子TP53,也可在脑类器官中诱导肿瘤发生^[78]。随着基因编辑技术的不断发展,一系列编辑体系如碱基编辑(base editor)、先导编辑(prime editor)、组学筛选工具与脑类器官的整合,将有望进一步拓展脑类器官

的应用。

3.3 单细胞测序技术

由人类干细胞培养而成的三维类器官, 为研究发育与疾病提供了新的方法。在脑、肠、肝、肾脏等多种组织中, 单细胞转录组学技术已被用于分析原代组织与类器官组织间的相似性^[79]。脑类器官结合单细胞测序技术, 在解析人脑发育、探究物种间差异、揭示疾病病理机制方面也具有重要意义。

2015年, Camp等人^[80]使用单细胞RNA测序, 比较了人脑类器官与胎儿新皮质的转录组, 揭示了脑类器官用于研究人类皮层发育特征的可行性。单细胞RNA测序技术也被用于探究人类和非人灵长类动物在皮层发育过程中基因表达模式的差异, 揭示人类大脑进化机制。基于不同物种的脑类器官单细胞转录测序研究表明, 与非人灵长类动物相比, 人类放射神经胶质细胞表现出更强的mTOR激活^[81]。2019年, 研究人员利用单细胞转录组学和染色质开放性分析技术, 探究了脑类器官发育过程中, 细胞从多能性状态到神经外胚层和神经上皮阶段, 再到前脑背侧和腹侧以及中脑和后脑区域, 整个发育过程中的细胞构成与分化轨迹^[82]。结合单细胞测序分析, 脑类器官也可揭示新的疾病机制。比如, 脑类器官已用于在体外模拟*Aspm*基因突变导致的小头畸形症表型, 探究*Aspm*突变导致小头畸形的病理特征和机制^[83]。此外, 对不同研究团队建立的脑类器官, 以及胎儿脑的单细胞转录组分析, 也可用于了解不同分化方法中细胞类型和细胞谱系变化过程^[84]。结合其他计算比较工具如VoxHunt, 通过整合单细胞转录组信息与脑区定位, 可进一步评估脑类器官区域特征与发育状态^[85]。

3.4 其他工程性技术

目前, 结合其他工程性技术可进一步拓展脑类器官系统的特征及应用。微组织工程神经网络(micro-tissue engineered neural networks, Micro-TENN)是直径数百微米的水凝胶柱, 可将神经元胞体与排列好的神经突分开^[86](图2A)。将脑类器官与水凝胶微柱相结合, 可构建以三维、可移植的形式生成厘米级别的人类轴突束^[87]。使用精确设计的水凝胶微柱可以限制轴突在预定的方向上生长, 促进移植到大脑所需的物理操作的耐受性。类器官Micro-TENN的应用不仅限于重建大

脑环路, 还可用于建立人类神经发育和疾病的神经网络模型。

器官芯片(organ-on-a-chip)技术提供了便于控制微环境、养分供应等的重要平台, 也为类器官系统中不同细胞和组织类型的共培养提供了关键方法^[88]。器官芯片也可在一定程度上解决不同类器官无法在相同培养基中共培养的问题。从发育过程来看, 类器官需要在特定时间激活形态发生相关的信号通路, 以诱导细胞命运和不同细胞类型的物理分离, 实现细胞分化与自组织^[89]。传统类器官培养过程中, 形态发生素和细胞分泌的可溶性因子扩散梯度不易控制, 难以模拟体内器官形成过程中形态发生素分布^[88]。微流控体外模型可用于模拟神经管发育建立(图2B)。比如, 器官芯片中的微通道可作为可溶性因子的进入和汇合区域, 通过在中央培养室中扩散产生稳定的形态发生梯度。该体系可用于模拟沿神经管背腹轴的SHH信号分子和骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)梯度, 诱导神经管模式化^[90]。脑类器官芯片技术也被用于研究尼古丁暴露对早期神经发育的影响。研究发现, 暴露于尼古丁环境中会导致脑类器官神经发育受损^[91]。另外, 利用微流控系统可将小胶质细胞引入星形细胞和神经元共培养物中, 用于研究神经炎症在阿尔茨海默症(Alzheimer's disease AD)中的作用^[92]。

如上所述, 三维培养的类器官中, 物质扩散运输不足以满足不断增长的代谢需求, 因此难以保证长期生长成熟。功能性血管系统的建立是实现脑类器官持续健康培养的必要条件。利用类器官芯片可模拟产生具有可灌注能力的血管^[93-95]。此外, 芯片或微型生物反应器也被构建用于脑类器官, 如在微流体培养系统中, 通过连续层流确保培养基的供应, 以此减少中脑类器官中的坏死区域(图2C)^[96], 该系统利用强制对流和介质混合来增强营养供应。因此, 器官芯片也是解决类器官培养过程中所面临困难的重要方案^[88]。

4 总结与展望

近年来类器官研究发展迅速。通过与多种技术的结合, 脑类器官在后续研究中具备巨大的应用潜力, 如可在体外用于探究人类大脑发育^[97-103]、进化^[97-99,104,105]、发育异常^[1,106,107]、退行性病变^[108-111]、肿瘤^[69,112]等脑疾病。同时, 在药物发现、器官移植等

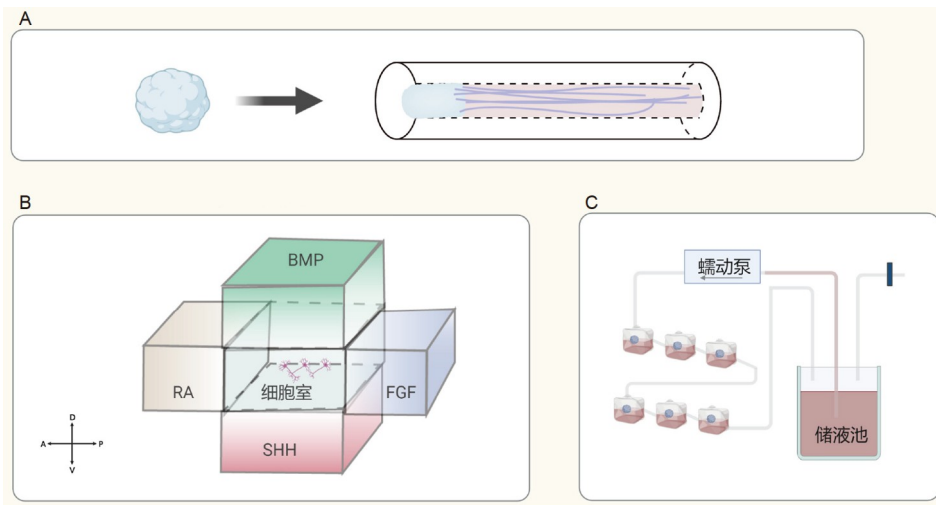


图 2 工程性技术在脑类器官中的应用. A: 微组织工程神经网络(Micro-TENN)产生移植的形式的人类轴突束^[86]; B: 微流控体外模型用于模拟发育中沿神经管的背腹轴(SHH和BMP信号)和前后轴(RA和FGF信号)中的调节^[90]; C: 微流体培养系统连续层流保证培养基的供应, 减少中脑类器官的坏死核心^[96]

Figure 2 Engineering approaches in brain organoid study. A: The micro-tissue engineering neural network (Micro-TENN) produces transplanted human axon bundles^[86]; B: the microfluidic system is used to simulate regulation along the dorsal ventral axis (SHH and BMP signals) and anterior and posterior axis (RA and FGF signals) during development of the neural tube^[90]; C: the continuous laminar flow of the microfluidic culture system ensures the supply of medium and reduces the necrotic core of midbrain organoids^[96]

方面, 脑类器官技术也具备应用前景.

利用脑类器官开展人类神经元迁移疾病的建模尚处于初步阶段. 研究不同神经元的迁移过程将了解人类大脑发育、神经网络塑造等问题提供重要信息. 脑类器官模型的发展以及其他技术(如复杂实时成像技术)的整合, 将进一步推动对细胞迁移调控分子机制的探究. 同样, 脑类器官环路连接模型也利于探究不同脑区间相互作用, 但需要更多技术来重现体内的真实环境. 以上研究都涉及脑类器官与不同类型细胞的共培养、类器官融合等技术. 尤其随着脑类器官培养时间的延长, 为了更好地保证细胞健康发育成熟, 需要进一步优化血管化模型.

另外, 不同的遗传修饰方法也已成功应用于脑类器官相关研究. 目前, 其潜在应用的范围, 可从荧光标记蛋白的表达^[23], 到功能基因研究^[1], 或疾病模型的建立^[43,73]. 稳定遗传修饰与瞬时遗传修饰的组合, 也可为未来脑类器官发育以及特性等各方面研究带来帮助, 同时也将促进针对更复杂疾病的类器官建模及剖析.

类器官移植具备重要的研究前景, 但也面临关于潜在伦理问题的思考^[62]. 另外, 与其他干细胞疗法一样, 关于利用脑类器官进行大脑修复的潜在风险也需要进一步评估. 即便是基于自体细胞建立的脑类器官,

也存在引发免疫反应的风险^[113]. 此外, 移植后祖细胞的肿瘤转化仍是需要关注的问题, 而非肿瘤性的过渡生长也可能导致神经系统异常. 因此, 需要实现对类器官生长的精确调控或可控诱导移植细胞凋亡, 以避免移植体异常增殖.

目前脑类器官培养仍然有一系列待解决的问题, 如批次效应、可重复性以及体内和体外发育进程差异等. 批次效应使得相同细胞来源的、不同批次的脑类器官间也可能具有不同的分化效率、形态特征以及细胞组成^[114]. 另外, 不同细胞系之间的同批次实验也可能存在一定的差异, 导致脑类器官构建的可重复性受影响. 相对而言, 非定向分化策略建立的全脑类器官, 与定性分化构建的区域特异性脑类器官相比, 可能面临更大的批次效应和可重复性问题. 后续仍需开展相关研究, 明确脑类器官分化途径中影响细胞谱系决定的关键因素, 包括培养条件、细胞微环境以及不同细胞系间遗传学或表观遗传学差异等因素的影响.

虽然脑类器官可模拟大脑发育的细胞、分子及功能特征, 受限于长期健康培养的技术难度, 目前体外构建的脑类器官在有限的培养时间内, 主要仍仅能表征胚胎脑的特征. 对于具备更复杂、成熟神经网络的脑

类器官构建, 目前仍需进一步探索. 其中, 功能性血管化脑类器官的构建, 有望为促进脑类器官长期发育提供支撑. 总之, 作为近年来发展迅速且广受关注的新

技术, 脑类器官研究机遇与挑战并存. 相信该技术的进一步发展, 将了解人类大脑, 解析多种生物学、医学问题提供重要工具.

致谢 本文图片由BioRender.com工具编辑.

参考文献

- 1 Lancaster M A, Renner M, Martin C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. [Nature](#), 2013, 501: 373–379
- 2 Mariani J, Vittoria Simonini M, Palejev D, et al. Modeling human cortical development *in vitro* using induced pluripotent stem cells. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2012, 109: 12770–12775
- 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. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2013, 110: 20284–20289
- 4 Monzel A S, Smits L M, Hemmer K, et al. Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells. [Stem Cell Rep](#), 2017, 8: 1144–1154
- 5 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
- 6 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
- 7 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
- 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 Ogura T, Sakaguchi H, Miyamoto S, et al. Three-dimensional induction of dorsal, intermediate and ventral spinal cord tissues from human pluripotent stem cells. [Development](#), 2018, 145
- 10 Reynolds B A, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. [J Neurosci](#), 1992, 12: 4565–4574
- 11 Zhang S C, Wernig M, Duncan I D, et al. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. [Nat Biotechnol](#), 2001, 19: 1129–1133
- 12 Ying Q L, Stavridis M, Griffiths D, et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. [Nat Biotechnol](#), 2003, 21: 183–186
- 13 Shi Y, Kirwan P, Smith J, et al. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. [Nat Neurosci](#), 2012, 15: 477–486
- 14 Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. [Nat Neurosci](#), 2005, 8: 288–296
- 15 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. [Cell Stem Cell](#), 2008, 3: 519–532
- 16 Lancaster M A, Corsini N S, Wolfinger S, et al. Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids. [Nat Biotechnol](#), 2017, 35: 659–666
- 17 Giandomenico S L, Mierau S B, Gibbons G M, et al. Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. [Nat Neurosci](#), 2019, 22: 669–679
- 18 Quadrato G, Nguyen T, Macosko E Z, et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. [Nature](#), 2017, 545:

48–53

- 19 Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 2011, 472: 51–56
- 20 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
- 21 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
- 22 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
- 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. *Nat Methods*, 2015, 12: 671–678
- 24 Bagley J A, Reumann D, Bian S, et al. Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat Methods*, 2017, 14: 743–751
- 25 Birey F, Andersen J, Makinson C D, et al. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*, 2017, 545: 54–59
- 26 Xiang Y, Tanaka Y, Patterson B, et al. Fusion of regionally specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 383–398.e7
- 27 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
- 28 Andersen J, Revah O, Miura Y, et al. Generation of functional human 3D Cortico-Motor assembloids. *Cell*, 2020, 183: 1913–1929.e26
- 29 Nakano T, Ando S, Takata N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 771–785
- 30 Pellegrini L, Bonfio C, Chadwick J, et al. Human CNS barrier-forming organoids with cerebrospinal fluid production. *Science*, 2020, 369
- 31 Kasai T, Suga H, Sakakibara M, et al. Hypothalamic contribution to pituitary functions is recapitulated *in vitro* using 3D-cultured human iPSC cells. *Cell Rep*, 2020, 30: 18–24.e5
- 32 Eura N, Matsui T K, Luginbühl J, et al. Brainstem organoids from human pluripotent stem cells. *Front Neurosci*, 2020, 14: 538
- 33 Faustino Martins J M, Fischer C, Urzi A, et al. Self-organizing 3D human trunk neuromuscular organoids. *Cell Stem Cell*, 2020, 27: 498
- 34 Werner S, Vu H T K, Rink J C. Self-organization in development, regeneration and organoids. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 44: 102–109
- 35 Giandomenico S L, Sutcliffe M, Lancaster M A. Generation and long-term culture of advanced cerebral organoids for studying later stages of neural development. *Nat Protoc*, 2021, 16: 579–602
- 36 Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun*, 2014, 5: 4047
- 37 Sloan S A, Darmanis S, Huber N, et al. Human astrocyte maturation captured in 3D cerebral cortical spheroids derived from pluripotent stem cells. *Neuron*, 2017, 95: 779–790.e6
- 38 Marton R M, Miura Y, Sloan S A, et al. Differentiation and maturation of oligodendrocytes in human three-dimensional neural cultures. *Nat Neurosci*, 2019, 22: 484–491
- 39 Madhavan M, Nevin Z S, Shick H E, et al. Induction of myelinating oligodendrocytes in human cortical spheroids. *Nat Methods*, 2018, 15: 700–706
- 40 Reiner O, Parichha A, Sapir T. Modeling human neuronal migration deficits in 3D. *Curr Opin Neurobiol*, 2021, 66: 30–36
- 41 Amin N D, Paşca S P. Building models of brain disorders with three-dimensional organoids. *Neuron*, 2018, 100: 389–405
- 42 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. *Cell Rep*, 2017, 19: 50–59
- 43 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. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 435–449.e4
- 44 Klaus J, Kanton S, Kyrousi C, et al. Altered neuronal migratory trajectories in human cerebral organoids derived from individuals with neuronal heterotopia. *Nat Med*, 2019, 25: 561–568
- 45 Ma T, Wang C, Wang L, et al. Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 1588–1597
- 46 Hansen D V, Lui J H, Flandin P, et al. Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human ganglionic eminences. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 1576–1587

- 47 Mich J K, Close J L, Levi B P. Putting two heads together to build a better brain. [Cell Stem Cell](#), 2017, 21: 289–290
- 48 Eom T Y, Li J, Anton E S. Going tubular in the rostral migratory stream: neurons remodel astrocyte tubes to promote directional migration in the adult brain. [Neuron](#), 2010, 67: 173–175
- 49 Ming G L, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. [Neuron](#), 2011, 70: 687–702
- 50 Steinbeck J A, Jaiswal M K, Calder E L, et al. Functional connectivity under optogenetic control allows modeling of human neuromuscular disease. [Cell Stem Cell](#), 2016, 18: 134–143
- 51 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
- 52 Steriade M, McCormick D A, Sejnowski T J. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. [Science](#), 1993, 262: 679–685
- 53 López-Bendito G, Molnár Z. Thalamocortical development: how are we going to get there? [Nat Rev Neurosci](#), 2003, 4: 276–289
- 54 Benito-Kwiecinski S, Lancaster M A. Brain organoids: human neurodevelopment in a dish. [Cold Spring Harb Perspect Biol](#), 2020, 12: a035709
- 55 Cederquist G Y, Asciolla J J, Tchieu J, et al. Specification of positional identity in forebrain organoids. [Nat Biotechnol](#), 2019, 37: 436–444
- 56 Tornero D, Wattananit S, Grønning Madsen M, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons integrate in stroke-injured cortex and improve functional recovery. [Brain](#), 2013, 136: 3561–3577
- 57 Tornero D, Tsupkyov O, Granmo M, et al. Synaptic inputs from stroke-injured brain to grafted human stem cell-derived neurons activated by sensory stimuli. [Brain](#), 2017, 140: 692–706
- 58 Espuny-Camacho I, Michelsen K A, Linaro D, et al. Human pluripotent stem-cell-derived cortical neurons integrate functionally into the lesioned adult murine visual cortex in an area-specific way. [Cell Rep](#), 2018, 23: 2732–2743
- 59 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
- 60 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
- 61 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
- 62 Chen H I, Wolf J A, Blue R, et al. Transplantation of human brain organoids: revisiting the science and ethics of brain chimeras. [Cell Stem Cell](#), 2019, 25: 462–472
- 63 Yin X, Mead B E, Safaee H, et al. Engineering stem cell organoids. [Cell Stem Cell](#), 2016, 18: 25–38
- 64 Shen Q, Goderie S K, Jin L, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. [Science](#), 2004, 304: 1338–1340
- 65 Giandomenico S L, Lancaster M A. Probing human brain evolution and development in organoids. [Curr Opin Cell Biol](#), 2017, 44: 36–43
- 66 Shi Y, Sun L, Wang M, et al. Vascularized human cortical organoids (vOrganoids) model cortical development *in vivo*. [PLoS Biol](#), 2020, 18: e3000705
- 67 Cakir B, Xiang Y, Tanaka Y, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. [Nat Methods](#), 2019, 16: 1169–1175
- 68 Mora-Bermúdez F, Badsha F, Kanton S, et al. Differences and similarities between human and chimpanzee neural progenitors during cerebral cortex development. [eLife](#), 2016, 5: e18683
- 69 Bian S, Repic M, Guo Z, et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. [Nat Methods](#), 2018, 15: 631–639
- 70 Zhou T, Tan L, Cederquist G Y, et al. High-content screening in hPSC-neural progenitors identifies drug candidates that inhibit zika virus infection in fetal-like organoids and adult brain. [Cell Stem Cell](#), 2017, 21: 274–283.e5
- 71 Fiddes I T, Lodewijk G A, Mooring M, et al. Human-specific NOTCH2NL genes affect notch signaling and cortical neurogenesis. [Cell](#), 2018, 173: 1356–1369.e22
- 72 Karzbrun E, Kshirsagar A, Cohen S R, et al. Human brain organoids on a chip reveal the physics of folding. [Nat Phys](#), 2018, 14: 515–522
- 73 Matsui T, Nieto-Estévez V, Kyrychenko S, et al. Retinoblastoma protein controls growth, survival and neuronal migration in human cerebral organoids. [Development](#), 2017, 144: 1025–1034
- 74 Xiang Y, Tanaka Y, Patterson B, et al. Dysregulation of BRD4 function underlies the functional abnormalities of MeCP2 mutant neurons. [Mol Cell](#), 2020, 79: 84–98.e9

- 75 Inak G, Rybak-Wolf A, Lisowski P, et al. Defective metabolic programming impairs early neuronal morphogenesis in neural cultures and an organoid model of Leigh syndrome. [Nat Commun](#), 2021, 12: 1929
- 76 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
- 77 Tang X Y, Xu L, Wang J, et al. DSCAM/PAK1 pathway suppression reverses neurogenesis deficits in iPSC-derived cerebral organoids from patients with Down syndrome. [J Clin Invest](#), 2021, 131
- 78 Ogawa J, Pao G M, Shokhirev M N, et al. Glioblastoma model using human cerebral organoids. [Cell Rep](#), 2018, 23: 1220–1229
- 79 Brazovskaja A, Treutlein B, Camp J G. High-throughput single-cell transcriptomics on organoids. [Curr Opin Biotechnol](#), 2019, 55: 167–171
- 80 Camp J G, Badsha F, Florio M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2015, 112: 15672–15677
- 81 Pollen A A, Bhaduri A, Andrews M G, et al. Establishing cerebral organoids as models of human-specific brain evolution. [Cell](#), 2019, 176: 743–756.e17
- 82 Kanton S, Boyle M J, He Z, et al. Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development. [Nature](#), 2019, 574: 418–422
- 83 Li R, Sun L, Fang A, et al. Recapitulating cortical development with organoid culture *in vitro* and modeling abnormal spindle-like (ASPM related primary) microcephaly disease. [Protein Cell](#), 2017, 8: 823–833
- 84 Tanaka Y, Cakir B, Xiang Y, et al. Synthetic analyses of single-cell transcriptomes from multiple brain organoids and fetal brain. [Cell Rep](#), 2020, 30: 1682–1689.e3
- 85 Fleck J S, Sanchís-Calleja F, He Z, et al. Resolving organoid brain region identities by mapping single-cell genomic data to reference atlases. [Cell Stem Cell](#), 2021, 28: 1177–1180
- 86 Struzyna L A, Harris J P, Katiyar K S, et al. Restoring nervous system structure and function using tissue engineered living scaffolds. [Neural Regen Res](#), 2015, 10: 679
- 87 Cullen D K, Gordián-Vélez W J, Struzyna L A, et al. Bundled three-dimensional human axon tracts derived from brain organoids. [iScience](#), 2019, 21: 57–67
- 88 Park S E, Georgescu A, Huh D. Organoids-on-a-chip. [Science](#), 2019, 364: 960–965
- 89 Kretzschmar K, Clevers H. Organoids: modeling development and the stem cell niche in a dish. [Dev Cell](#), 2016, 38: 590–600
- 90 Demers C J, Soundararajan P, Chennampally P, et al. Development-on-chip: *in vitro* neural tube patterning with a microfluidic device. [Development](#), 2016, 143: 1884–1892
- 91 Wang Y, Wang L, Zhu Y, et al. Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure. [Lab Chip](#), 2018, 18: 851–860
- 92 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
- 93 Kim S, Lee H, Chung M, et al. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. [Lab Chip](#), 2013, 13: 1489
- 94 Hasan A, Paul A, Memic A, et al. A multilayered microfluidic blood vessel-like structure. [Biomed Microdev](#), 2015, 17: 88
- 95 Kolesky D B, Homan K A, Skylar-Scott M A, et al. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2016, 113: 3179–3184
- 96 Berger E, Magliaro C, Paczia N, et al. Millifluidic culture improves human midbrain organoid vitality and differentiation. [Lab Chip](#), 2018, 18: 3172–3183
- 97 Amiri A, Coppola G, Scuderi S, et al. Transcriptome and epigenome landscape of human cortical development modeled in organoids. [Science](#), 2018, 362: eaat6720
- 98 Benito-Kwiecinski S, Giandomenico S L, Sutcliffe M, et al. An early cell shape transition drives evolutionary expansion of the human forebrain. [Cell](#), 2021, 184: 2084–2102.e19
- 99 Ou M Y, Xiao Q, Ju X C, et al. The CTNNBIP1-CLSTN1 fusion transcript regulates human neocortical development. [Cell Rep](#), 2021, 35: 109290
- 100 Hou Q Q, Xiao Q, Sun X Y, et al. TBC1D3 promotes neural progenitor proliferation by suppressing the histone methyltransferase G9a. [Sci Adv](#), 2021, 7: eaba8053
- 101 Ou M Y, Ju X C, Cai Y J, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 controls mitotic progression of neural progenitors via interaction

- with cohesin. [Development](#), 2020, 147
- 102 Trujillo C A, Rice E S, Schaefer N K, et al. Reintroduction of the archaic variant of *NOVA1* in cortical organoids alters neurodevelopment. [Science](#), 2021, 371
- 103 Trujillo C A, Gao R, Negraes P D, et al. Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development. [Cell Stem Cell](#), 2019, 25: 558–569.e7
- 104 Muchnik S K, Lorente-Galdos B, Santpere G, et al. Modeling the evolution of human brain development using organoids. [Cell](#), 2019, 179: 1250–1253
- 105 Marchetto M C, Hrvoj-Mihic B, Kerman B E, et al. Species-specific maturation profiles of human, chimpanzee and bonobo neural cells. [eLife](#), 2019, 8: e37527
- 106 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. [Cell Stem Cell](#), 2016, 19: 258–265
- 107 Dang J, Tiwari S K, Agrawal K, et al. Glial cell diversity and methamphetamine-induced neuroinflammation in human cerebral organoids. [Mol Psychiatry](#), 2021, 26: 1194–1207
- 108 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
- 109 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
- 110 Kim H, Park H J, Choi H, et al. Modeling G2019S-LRRK2 sporadic Parkinson's disease in 3D midbrain organoids. [Stem Cell Rep](#), 2019, 12: 518–531
- 111 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–E771
- 112 Jacob F, Salinas R D, Zhang D Y, et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral heterogeneity. [Cell](#), 2020, 180: 188–204.e22
- 113 Zhao T, Zhang Z N, Rong Z, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. [Nature](#), 2011, 474: 212–215
- 114 Chiaradia I, Lancaster M A. Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of *in vitro* and *in vivo*. [Nat Neurosci](#), 2020, 23: 1496–1508

Current progress in brain organoid technology

PANG Wei, LIU YanTong & XIANG YangFei

School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China

Brain organoids are *in vitro* three-dimensional neural cultures with similar cellular diversities, spatial organizations, and physiological functions of the human brain. Since its establishment, brain organoid technology has provided valuable tools for investigating the human brain development and functionality, disease etiology, drug discovery, and many other biological and medical questions. The progress of region-specific brain organoids has furthered the frontiers of brain organoid technology. In this article, we briefly review the development of brain organoid technology, including region-specific brain organoids. In particular, we focus on the technologies and applications of brain organoids in modeling human brain development. We also discuss the progress and challenges of various pivotal technologies in brain organoid studies, including vascularization, gene editing, single-cell sequencing, and other engineering approaches.

brain organoids, neural migration, axon projection, co-culture, vascularization, gene editing, single-cell RNA sequencing

doi: [10.1360/SSV-2021-0278](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0278)