

· 综 述 ·

人类3D大脑类器官研究进展

许磊,唐晓艳,徐敏*,刘妍*

南京医科大学药学院干细胞与神经再生研究所,江苏 南京 211166

[摘 要] 人类3D大脑类器官为研究人脑发育和神经系统疾病提供了新的模型。体外培育的人类3D大脑类器官主要是由人多能干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC),包括人胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)分化而来。iPSC重编程技术与3D大脑类器官技术相结合,可以获得来自患者的iPSC并分化成包括神经元及大脑类器官在内的几乎任何人体细胞或组织,是动物实验向临床试验转化的桥梁。本文回顾了从多能干细胞技术到3D大脑类器官诞生并发展的历程,介绍了以3D大脑类器官为工具构建脑发育和神经系统疾病的研究模型,讨论了大脑类器官在其他方面的应用和相关技术的研究进展,并分析了3D大脑类器官的局限性及其未来可能的发展方向。

[关键词] 诱导多能干细胞;3D大脑类器官;大脑发育;神经系统疾病

[中图分类号] R329

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)01-133-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20200128

Research progresses of 3D brain organoids derived from pluripotent stem cells

XU Lei, TANG Xiaoyan, XU Min*, LIU Yan*

Institute of Stem Cell and Neural Regeneration, School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] The 3D brain organoids derived from human pluripotent stem cells (hPSCs), including embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs), provides a new research model for brain development and neurological diseases. The iPSC reprogramming technology combined with 3D brain organoids technology can help researchers obtain syngeneic stem cells from patients directly and differentiate the iPSCs into almost any cells including neurons. The 3D brain organoids have become a bridge from animal experiments to clinical trials. This article reviews the history from the emergence of pluripotent stem cell technology to the birth and development of 3D brain organoids, and introduces the classic models of brain development and neurological diseases using 3D brain organoids as tools, and briefly mentions other applications of 3D brain organoids and the research progress of the related technologies. The limitations and future directions of 3D brain organoids are also discussed.

[Key words] induced pluripotent stem cells; 3D brain organoids; brain development; neurological diseases

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(01): 133-140]

大脑结构和功能上的复杂性,尤其是人类独特的脑功能分区对脑科学研究提出了挑战。由于伦理与人脑组织来源的限制,传统上研究者利用动物模型研究人类的大脑发育。因此,对人类大脑发育

的研究往往停留在研究哺乳动物和其他脊椎动物的共同特征,而人脑发育结构与功能的独特性使得许多与基因变异高度相关的神经退行性疾病,如精神分裂症(schizophrenia)、自闭症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)、阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)、帕金森综合征(Parkinson's syndrome, PD)等并不能在动物模型中呈现人脑发育的特征。随着诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)重编程技术的问世,研究者们可以获得直接来

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金面上项目(17KJB180 010);南京医科大学科技发展基金面上项目(2016NJMU006)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yanliu@njmu.edu.cn; xumin@njmu.edu.cn

自于患者且携带致病基因的 iPSC^[1],在一定条件下可以分化成任何类型的携带该基因的体细胞。传统的2D培养体系所分化得到的细胞始终难以模拟人类大脑3D空间里客观真实的内环境,也无法反映出3D层面细胞间的相互作用^[2-4],而这些3D特征是在脑发育和神经科学研究领域里相当重要的一部分。因此,研究人员迫切地需要一种能够更直观反映人脑发育与结构功能特点的模式。

1 多能干细胞衍生3D大脑类器官方法的构建

1998年 Thomson 等^[5]建立了从囊胚中分离人胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)的技术,使研究者可以获得维持未分化多能状态的干细胞。而2006年 Takahashi 等^[1]又通过逆转录转录因子 Sox2 (sex determining region Y-box 2)、Klf4 (Kruppel-like factor 4)、Oct3/4 (octamer-binding transcription factor 3/4)和 c-Myc (myelocytomatosis)将小鼠成纤维细胞诱导产生具有干细胞特性的多能干细胞 iPSC。两个团队又于次年各自独立建立了第一批人 iPSC^[6-7]。iPSC 的诞生既可规避 ESC 的道德和法律争议,又可利用易获得的患者来源细胞分化成几乎任何类型的同基因细胞,包括中枢和外周神经系统的神经元,开辟了一条脑与神经科学领域研究的新道路,具有里程碑式的意义。

然而,传统上模拟神经系统疾病利用的是从人多能干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC)中分化发育得到的神经元,这种方法还是一种基于2D培养的体系^[2,8]。尽管分化方案可以相对成熟地产生稳定同质、纯度较高的各类神经元^[9-10],如运动神经元、端脑兴奋性神经元和中脑多巴胺能神经元等^[11],但2D培养的细胞模型具有一定的不足之处,既不能模拟大脑在三维空间上由各种调节因子和内源性信号组成的微环境^[2],也不能模拟三维空间层面上细胞之间的相互作用^[3],使得神经系统疾病中不同脑区之间不同种类细胞间的功能紊乱始终无法得到很好的模拟^[12]。因此,3D培养体系的建立应运而生。

在干细胞领域中,从肠类器官^[13-14]开始,视网膜^[15]、大脑^[16]、肝^[17]、肾^[18-20]等各种类器官相继诞生。其基本原理是按照既定的时间、剂量特定组合补充多种诱导因子,以使具有干性潜能的细胞自发分化形成所需要的相应器官的部分组织,再利用人工基质胶代替细胞外基质,从而实现3D培养体系的构建^[16,21]。对比2D培养体系,3D培养体系拥有类似自然状态下的细胞外基质,可以模拟各类自分泌信号组成的内源微环境,更精确地模拟细胞的形态、增殖、迁移、分化等^[22]。对于大脑与神经科学来说,尽管已经有研究者开发了可以在两个不同大脑区域(即新皮层和中脑神经元)间建立联系的2D神经培养系统^[23],但只有3D培养体系问世后,才得以在不同脑区不同类型的细胞组织间模拟突触连接的形成。

Kadoshima 的团队^[24]很早研发了由人 ESC 衍生的具有特异性祖细胞动力学的极化皮层自组织结构,已经接近后来出现的大脑类器官的概念。Lancaster 等^[16]首先通过加入各类生长因子将人 ESC 与人 iPSC 在3D培养体系下用基质胶包埋,以培养出类似于9~10周胚胎脑的“全脑类器官”,已经出现背侧皮层、腹侧前脑等特征性结构。该团队还将小头畸形患者的成纤维细胞诱导形成多能干细胞系,并利用其构建了小头畸形症的大脑类器官疾病模型^[16]。Chromiak 等^[25]很早利用生物反应器来维持骨骼肌类器官。Qian 等^[26]应用微型生物反应器(图1A)维持寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)处理过的脑区特异性类器官。Kirwan 等^[27]又利用人 iPSC 系成功构建了脑皮层神经网络的类器官模型,可以模拟皮层网络的发育与功能。Pham 等^[28]将人的 iPSC 培养成大脑类器官,并将同一来源的 iPSC 分化为内皮细胞(endothelial cells, EC),3D培养一段时间后将类器官重新包埋在具有250 000个内皮细胞的基质胶中,从而产生血管化的大脑类器官。

从 hPSC 产生3D大脑类器官的最广泛使用的方案是用基质胶包被快速再聚集的胚状体样无血清漂浮培养物(serum-free culture of embryoid body-like

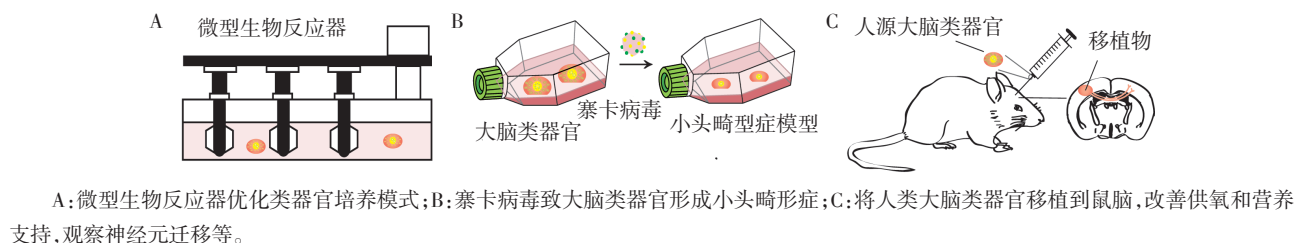


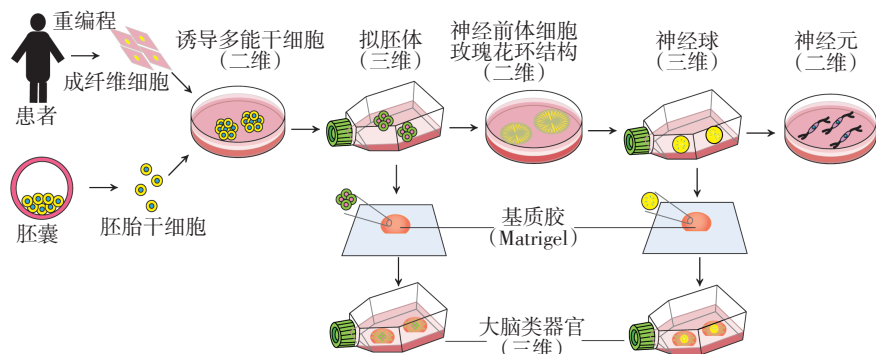
图1 3D大脑类器官相关技术进展

Figure 1 Advances in technologies related to brain organoids

quick-aggregation, SFEBq)^[24, 29-30],即先通过形成拟胚体(embryoid body, EB),再将这些悬浮培养的EB样聚集体逐渐分化为几个极化的神经前体细胞花环结构,随后重新吹悬成神经球(neurosphere),再用含有高水平神经元细胞外基质蛋白的基质胶包埋,从而生成具有特异性皮质特征的大脑类器官^[16](图2)。随着生物工程技术的进步,多能干细胞衍生3D大脑类器官技术的开发愈发成熟,应用前景愈发广阔。综合来看,多能干细胞衍生的3D大脑类器官技术可用来突破当前研究脑发育与神经系统疾病的瓶颈,作为脑发育与神经系统疾病研究的模型具有巨大的应用潜力。

2 多能干细胞衍生3D大脑类器官用于构建脑发育与神经系统疾病模型

动物模型对于研究神经发育障碍仍然很重要,但物种差异、遗传背景的不同、脑结构与功能复杂性的不同也限制了动物模型对人类脑发育和神经系统疾病的研究。而重编程技术使得研究者更容易获得直接来源于患者的干细胞^[1],iPSC分化技术又使这些干细胞可以定向分化为包括神经元在内的几乎任何细胞,而类器官3D培养技术的出现^[16],使得研究者可以利用大脑类器官来构建脑发育与神经系统疾病的模型。



将ESC或患者来源的iPSC先产生EB进行3D培养,并在2D体系下将其分化出神经祖细胞花结,再重新吹悬成3D培养的神经球。之后即可将3D体系下的EB或神经球用基质胶包被形成大脑类器官。

图2 产生大脑类器官的流程
Figure 2 The process of producing brain organoids

2.1 小头畸形症

常染色体隐性遗传性原发性小头畸形症 (autosomal recessive primary microcephaly, MCPH) 是一种由于常染色体畸变引起的神经发育障碍疾病,其主要特征是脑较小,尤其是大脑皮质变小^[31-32]。在已知与小头畸形症相关的基因中,CDK5 调节亚基相关蛋白 2(CDK5 regulatory subunit-associated protein 2, CDK5RAP2)调节中心体蛋白有丝分裂的复制过程,CDK5RAP2 的损失或突变可引起小头畸形症^[33-34]。在小鼠动物模型中,CDK5RAP2 突变小鼠的大脑皮质并没有像人类患者那样明显变小^[35-36],而 Lancaster 等^[16]使用了基因中携带 CDK5RAP2 突变的小头畸形症患者来源的 iPSC 经 3D 培养为大脑类器官。与对照组相比,患者来源的类器官显示出了较小的神经上皮区域,整体尺寸也更小,很好地模拟了小头畸形症患者最典型的症状。该团队还利用大脑类器官模型研究发现患者来源细胞生长的大脑类器官的增殖祖细胞减少并显示出过早的神经分化,而

小鼠的神经祖细胞在神经发生前并不能增殖扩增到与人类相当的程度,这也解释了 CDK5RAP2 突变小鼠模型不能呈现大脑显著变小的原因^[37-38]。在此研究的基础上,又有许多利用大脑类器官探索寨卡病毒(ZIKV)引起小头畸形症机制的研究相继报道(图2B)。ZIKV 感染引起类器官的大小总体降低,ZIKV 在神经前体细胞中还可诱导细胞凋亡,减弱前体细胞增殖,并增加了脑室结构内腔的大小^[26, 39-41]。这些结果与描述在 ZIKV 感染的人类胎儿脑中观察到的扩大脑室结构内腔的临床病例报告一致^[42]。可见大脑类器官模型可帮助研究者探索神经与脑发育的机制。

2.2 ASD

ASD 是一种复杂的大脑发育障碍,其症状主要包括语言能力障碍、社交能力障碍与重复刻板行为^[43]。ASD 脑发育的改变导致皮质层状结构的破坏和皮质网络的变化,这可能导致自闭行为。Mariani 等^[44]利用 4 例患有严重特发性 ASD 的患者和来自未受影响

响的一级相关患者的 iPSC 衍生的大脑类器官直接模拟早期 ASD 的大脑发育,发现在分化的早期阶段,ASD 衍生的类器官在神经祖细胞中表现出细胞周期缩短,突触成熟度增强,以及 γ -氨基丁酸(γ aminobutyric acid, GABA)能抑制性神经元的过度产生。他们使用 RNA 干扰技术进一步证明了 FOXG1 (forkhead box G1) 的过表达是 GABA 能神经元过度产生的原因^[44]。这表明大脑类器官模型可用来探索自闭症复杂的病理机制,以及为寻找自闭症治疗方法提供新的平台。

2.3 AD

AD 是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病^[45]。2D 细胞培养可能无法提供模拟细胞外蛋白质聚集所必需的复杂细胞外环境,使得 3D 大脑类器官成为更有前景的疾病模型^[46-47]。大多数 AD 首先出现在成年人中,因此在应用大脑类器官构建 AD 模型时必须考虑多能干细胞衍生出的大脑类器官往往体现脑早期发育的特征。Raja 等^[48]利用早发型家族性阿尔茨海默症(familial Alzheimer's disease, fAD)患者来源的 iPSC 衍生的 3D 大脑类器官模型研究了 fAD 中 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)聚集、过度磷酸化 Tau 蛋白(hyperphosphorylation microtubule-associated protein tau, pTau)和 fAD 患者衍生的 3D 大脑类器官的内体异常。他们还发现 β 和 γ 分泌酶抑制剂可治疗 fAD 大脑类器官的淀粉样蛋白和 pTau 病理过程^[48]。可见多能干细胞衍生 3D 大脑类器官可以为神经退行性疾病的药物筛选提供新的平台。而针对前述的大多数迟发型 AD 类器官造模所需克服的困难,长期分化并寻找简单易行的血管化方法是一个理性可靠的策略。而长期的分化培养所带来的类器官内部缺乏氧气和营养物质导致中心坏死的问题也限制了迟发型 AD 大脑类器官造模的可靠性。Pham 等^[28]发现的产生血管化大脑类器官的方法以及生物工程技术如生物反应器^[26]等工具的应用也许给大脑类器官模拟迟发型 AD 提供了参考。此外,在 AD 小鼠模型中筛选出的几种很具潜力的药物,在晚期临床试验中并未能改善认知能力,因此大脑类器官有望成为发现神经退行性疾病药物的新平台。

2.4 无脑回畸形

无脑回畸形(lissencephaly)是表现为大脑表面光滑,大脑皮质无脑沟及脑回的先天畸形,又称平滑脑。Miller-Dieker 综合征(MDS)是先天性无脑回畸形中最严重的形式^[49-50],由染色体 17p13.3 的杂合

缺失引起,其涉及基因 LIS1 和 YWHAE (编码 14.3.3 ϵ)并且在皮质发育期间导致畸形^[51]。Iefremova 等^[51]用患者特异性前脑类器官来研究与 MDS 相关的病理变化,发现患者衍生的类器官体积显著减小,并伴随着脑室区放射状胶质细胞(ventricular zone radial glia cells, vRGC)从对称细胞分裂到不对称细胞分裂的转变,及 vRGC 中微管网络组织的改变。Bershteyn 等^[52]使用延时成像、免疫染色和单细胞 RNA 测序来分析来自对照组和 MDS 诱导的多能干细胞的大脑类器官。该团队使用大脑类器官模型不仅重复出了无脑回畸形小鼠模型中发现的几种表型,如神经上皮干细胞有丝分裂期纺锤体的失调和神经元迁移的缺陷,还新发现了脑室区神经上皮干细胞的严重凋亡和外侧桡神经胶质细胞的有丝分裂缺陷,这些表型在大脑遗传性啮齿动物中基本不存在,但对人类新皮层扩张至关重要^[52]。由此可见,大脑类器官在模拟人类特异性表型方面具有独特优势。

2.5 精神分裂症

精神分裂症是由一组症状群所组成的临床综合征,目前对其病因的认识尚不很明确,临床症状可涉及感知觉、思维、情感、意志行为及认知功能等方面^[53]。其中人的精神分裂症中断基因 1(disrupted-in-schizophrenia 1, DISC1)的突变与主要精神疾病相关,主要包括精神分裂症、双相情感障碍和抑郁症等^[54-55]。Ye 等^[56]证明 DISC1 可以调节核分布组分类似基因 1(nuclear-distribution element-like 1, Ndel1)的动粒附着,延长有丝分裂,影响人体细胞的细胞周期进程,并导致小鼠胚胎皮质和人类前脑类器官中桡神经胶质细胞的细胞周期缺陷。而这些缺陷可以在源自 DISC1 突变的精神分裂症患者的类器官中得到证实,该突变破坏了其与 Nde11 的相互作用。这表明类器官模型在对精神分裂症某些突变基因与蛋白质相互作用以及大脑影响的模拟上大有可为。

2.6 Sandhoff 病

Sandhoff 病是一种溶酶体聚集病,它是由于己糖胺酶 A(hexosaminidase A, HexA)和己糖胺酶 B(hexosaminidase B, HexB)的活力缺乏,使得 GM2 神经节苷脂在脑中沉积,同时 β -氨基己糖最终产物糖脂、糖蛋白及低聚糖也在脑与内脏中沉积^[57-58]。Allende 等^[59]利用来自患有桑德霍夫病的婴儿成纤维细胞诱导的 iPSC 构建了大脑类器官,并使用 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced palin-

dromic repeats/CRISPR-associated proteins 9)技术通过基因组编辑创建了同基因(HEXB校正的)对照。Sandhoff病的类器官显示积累的GM2神经节苷脂,而对照组则没有。与其同基因对照相比,患病的类器官也表现出体积增加和细胞增殖。转录组学分析显示Sandhoff病类器官的发育受损^[59]。由此可见作为早期发育疾病的模型,大脑类器官可以很好地表现出Sandhoff病的病理特征,为此类罕见病提供了重要的研究方法。

3 多能干细胞衍生3D大脑类器官的现状、局限与展望

当前多能干细胞衍生3D大脑类器官技术的研究已经取得了许多进展,除了构建脑发育与神经系统疾病模型外,还被用于研究人类放射状胶质细胞中的细胞分裂^[16]和人类皮层祖细胞扩增^[60],也可以用于药物筛选,例如利用大脑类器官进行产前药物处理的研究。已知产前可卡因暴露于大鼠会诱导胚胎新皮层中的细胞结构和相关信号转导变化^[61-62],而种属差异使得仅用模拟动物模型还是不够可靠, Lee等^[63]利用人大脑类器官模型研究产前药物暴露对人胎脑的影响,证明可卡因暴露可以抑制新皮质祖细胞的增殖,引起过早的神经元分化并中断神经组织的发育,并发现细胞色素P450 3A5 (cytochrome P450 3A5, CYP3A5)可能是治疗与产前可卡因暴露相关的神经发育障碍的治疗靶点。这表明大脑类器官可以帮助寻找良好的药物治疗靶点,并为围产期药物的研究提供了新的平台。Mansour等^[64]建立了将人大脑类器官移植到成年小鼠脑中的方法,提供了大脑类器官血管化的功能性体内模型,并结合光遗传学技术揭示了所移植大脑类器官和宿主间的功能性突触连接,为生理条件下脑发育与神经疾病模型的建立提供了重要参考。

尽管多能干细胞衍生3D大脑类器官取得了上述进展,但仍有一些困难需要克服,一些问题亟待解决。大脑类器官毕竟不是真的人类大脑,并不能将自身自组织化成与人类大脑完全相同的形状和脑功能分区。同时,大脑的发育成熟特别是晚期阶段高度依赖于脑室下区(subventricular zone, SVZ)的血管化,没有血管的形成限制了类器官的氧气和营养物质的供应,往往造成中心区域的坏死,干扰神经元的迁移^[65]。尽管大脑类器官与神经元培养物可以产生功能性突触连接,但仍缺乏完整神经回路与成熟突触的建立^[65]。

值得期待的是,研究者们对改进类器官培养模式的研究也取得了许多重大进展。如前文所提到的, Ming团队开发的自旋Ω微型生物反应器推动了脑区特异性类器官的大量扩增与生产自动化^[26,66]。Kirwan等^[27]又利用人iPSC系成功构建了脑皮层神经网络的类器官模型,可以模拟皮层网络的发育与功能,为复杂精神疾病的模拟奠定了基石。Pham等^[28]将患者的iPSC培养出了血管化的大脑类器官,更精确地模拟体内大脑解剖学和生理学,为大脑类器官改善缺氧和营养支持提供了参考,可以促进脑疾病建模,并且还提供用于药物测试的理想平台。Mansour等^[64]建立了将人大脑类器官移植到鼠脑的方法(图1C),也提供了另一种大脑类器官血管化的功能性体内模型的思路,还可以借此观察神经元的迁移等。Schwartz等^[67]更是将人类iPSC衍生的神经祖细胞、间充质干细胞、内皮细胞和小胶质细胞前体在化学工程水凝胶上组合以形成具有小胶质细胞和血管网络的3D神经培养物。在神经科学、干细胞生物学、神经学、生物工程和生物材料等不同领域科学家们的努力下,大脑类器官的性状功能将和真实的人类大脑越来越接近,能够更加充分地发挥大脑类器官模拟人类大脑发育和神经系统疾病的潜力。

4 小结

本文回顾了多能干细胞衍生3D大脑类器官技术诞生与发展的重要成果与历史进程,包括多能干细胞技术的突破^[1]和类器官技术^[16]的出现等。接着对比了3D类器官模型与传统2D培养模式和动物模型的特点,3D大脑类器官可以在空间结构上更精确地模拟人类大脑,也可以模拟出动物模型难以显示的一些脑发育与神经系统疾病的相关表型^[2-3,12,22]。然后,我们详细地列举了多能干细胞衍生3D大脑类器官模拟脑发育和神经系统疾病的经典研究^[16,44,49,52,56,59],并分别对这些工作作出评价。此外,我们还对3D大脑类器官在其他方面的研究应用以及近年来与该技术在包括神经科学、干细胞生物学、神经学、生物工程和生物材料等不同领域的突破进行了介绍^[16,60,63-64]。最后还提出了3D大脑类器官当前存在的问题,以及对未来该技术可能改进的发展方向进行了展望。总之,尽管大脑类器官不能将自身自组织化成与人类大脑完全相同的形状或脑功能分区,并因为未形成血管限制了氧气和营养的支持^[65],但随着各领域技术的突破,多能干细胞衍生人类3D大脑类器官的性状功能将越来越接近真实的人类大脑,更充分地发

挥其模拟人类大脑发育和神经系统疾病的功能,并逐步将基础研究转化到临床应用,在基础研究、药物筛选、临床治疗等多个方面具有不可忽视的潜力与价值。

[参考文献]

- [1] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676
- [2] ALOYSIOUS N, NAIR P D. Enhanced survival and function of isletlike clusters differentiated from adipose stem cells on a threedimensional natural polymeric scaffold: an *in vitro* study[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(9/10): 1508-1522
- [3] MEYERS J, CRAIG J, ODDE D J. Potential for control of signaling pathways via cell size and shape[J]. *Current Biology*, 2006, 16(17): 1685-1693
- [4] BHANG S H, LEE T J, LA W G, et al. Delivery of fibroblast growth factor 2 enhances the viability of cord blood-derived mesenchymal stem cells transplanted to ischemic limbs[J]. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(5): 584-589
- [5] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-1147
- [6] YU J Y, VODYANIK M A, SMUGA-OTTO K A, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920
- [7] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872
- [8] AVIOR Y, SAGI I, BENVENISTY N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(3): 170-182
- [9] CHUA J S, CHNG C P, MOE A A, et al. Extending neurites sense the depth of the underlying topography during neuronal differentiation and contact guidance[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(27): 7750-7761
- [10] TYLER W J. The mechanobiology of brain function[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2012, 13(12): 867-878
- [11] SUBRAMANIAN A, KRISHNAN U M, SETHURAMAN S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration[J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16: 108
- [12] MSEKA T, BAMBURG J R, CRAMER L P. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(24): 4332-4344
- [13] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche[J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-265
- [14] 丁菲, 夏凡, 狄文娟, 等. 雌性 11 β -HSD1 敲除小鼠肠道类器官体外研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(5): 653-658
- [15] EIRAKU M, SASAI Y. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture[J]. *Neurosci Res*, 2011, 71(S): E127-E128
- [16] LANCASTER M A, RENNER M, MARTIN C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly[J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-379
- [17] HUCH M, DORRELL C, BOJ S F, et al. *In vitro* expansion of single Lgr5(+) liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration[J]. *Nature*, 2013, 494(7436): 247-250
- [18] XIA Y, NIVET E, SANCHO-MARTINEZ I, et al. Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(12): 1507
- [19] TAKASATO M, ER P X, BECROFT M, et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(1): 118-126
- [20] TAGUCHI A, KAKU Y, OHMORI T, et al. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables Generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(1): 53-67
- [21] HOGBERG H T, BRESSLER J, CHRISTIAN K M, et al. Toward a 3D model of human brain development for studying gene/environment interactions[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(1): S4
- [22] MIMEAULT M, HAUKE R, MEHTA P P, et al. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers[J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(5): 981-1011
- [23] LEE C T, BENDRIEM R M, FREED W J. A new technique for modeling neuronal connectivity using human pluripotent stem cells[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2015, 33(3): 347-356
- [24] 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 U S A*, 2013, 110(50): 20284-20289
- [25] CHROMIAK J A, SHANSKY J, PERRONE C, et al. Bio-reactor perfusion system for the long-term maintenance of tissue-engineered skeletal muscle organoids[J]. *In Vitro*

- Cell Dev Biol Anim, 1998, 34(9):694-703
- [26] QIAN X Y, NGUYEN H N, SONG M M, et al. Brain-Region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure[J]. Cell, 2016, 165(5):1238-1254
- [27] KIRWAN P, TURNER-BRIDGER B, PETER M, et al. Development and function of human cerebral cortex neural networks from pluripotent stem cells in vitro[J]. Development, 2015, 142(18):3178-3187
- [28] PHAM M T, POLLOCK K M, ROSE M D, et al. Generation of human vascularized brain organoids[J]. Neuroreport, 2018, 29(7):588-593
- [29] WATANABE K, KAMIYA D, NISHIYAMA A, et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells[J]. Nat Neurosci, 2005, 8(3):288-296
- [30] EIRAKU M, WATANABE K, MATSUO-TAKASAKI M A, 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):519-532
- [31] FAHEEM M, NASEER M I, RASOOL M, et al. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview[J]. BMC Med Genomics, 2015, 8(Suppl 1):S4
- [32] WOODS C G, BOND J, ENARD W. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings[J]. Am J Hum Genet, 2005, 76(5):717-728
- [33] BUCHMAN J J, TSENG H C, ZHOU Y, et al. Cdk5rap2 interacts with pericentrin to maintain the neural progenitor pool in the developing neocortex[J]. Neuron, 2010, 66(3):386-402
- [34] MEGRAW T L, SHARKEY J T, NOWAKOWSKI R S. Cdk5rap2 exposes the centrosomal root of microcephaly syndromes[J]. Trends Cell Biol, 2011, 21(8):470-480
- [35] 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):913-926
- [36] 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):1907-1917
- [37] FLORIO M, HUTTNER W B. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex[J]. Development, 2014, 141(11):2182-2194
- [38] LUI J H, HANSEN D V, KRIEGSTEIN A R. Development and evolution of the human neocortex[J]. Cell, 2011, 146(1):18-36
- [39] 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):258-265
- [40] GARCEZ P P, LOIOLA E C, DA COSTA R M, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids[J]. Science, 2016, 352(6287):816-818
- [41] CUGOLA F R, FERNANDES I R, RUSSO F B, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models[J]. Nature, 2016, 534(766):267
- [42] DRIGGERS R W, HO C Y, KORHONEN E M, et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities[J]. N Engl J Med, 2016, 374(22):2142-2151
- [43] WANG H S, DOERING L C. Autism spectrum disorders: emerging mechanisms and mechanism-based treatment[J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9:183
- [44] MARIANI J, COPPOLA G, ZHANG P, et al. FOXP1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders[J]. Cell, 2015, 162(2):375-390
- [45] QUERFURTH H W, LAFERLA F M. Alzheimer's disease[J]. N Engl J Med, 2011, 364(6):588
- [46] 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-U293
- [47] LEE H K, SANCHEZ C V, 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
- [48] 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[J]. PLoS One, 2016, 11(9):e0161969
- [49] Anon. Lissencephaly and miller-dieker syndrome[J]. Pediatr Neurol, 2009, 40(4):324-325
- [50] NAGAMANI S C, ZHANG F, SHCHELOCHKOV O A, et al. Microdeletions including YWHAE in the Miller-Dieker syndrome region on chromosome 17p13.3 result in facial dysmorphisms, growth restriction, and cognitive impairment[J]. J Med Genet, 2009, 46(12):825-833
- [51] 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):50-59
- [52] 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
- [53] BUCKLEY P F, MILLER B J. Schizophrenia research a progress report[J]. Psychiatric Clinics of North America,

- 2015,38(3):373
- [54] PORTEOUS D J, MILLAR J K, BRANDON N J, et al. DISC1 at 10: connecting psychiatric genetics and neuroscience[J]. Trends Mol Med, 2011, 17(12):699-706
- [55] PRYTKOVA I, BRENNAND K J. Prospects for modeling abnormal neuronal function in schizophrenia using human induced pluripotent stem cells[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11:360
- [56] YE F, KANG E, YU C, et al. DISC1 regulates neurogenesis via modulating kinetochore attachment of Ndel1/Nde1 during mitosis[J]. Neuron, 2017, 96(5):1204
- [57] CORDEIRO P, HECHTMAN P, KAPLAN F. The GM2 gangliosidosis databases: allelic variation at the HEXA, HEXB, and GM2A gene loci[J]. Genet Med, 2000, 2(6):319-327
- [58] FERREIRA C R, GAHL W A. Lysosomal storage diseases [J]. Transl Sci Rare Dis, 2017, 2(1/2):1-71
- [59] ALLENDE M L, COOK E K, LARMAN B C, et al. Cerebral organoids derived from Sandhoff disease-induced pluripotent stem cells exhibit impaired neurodifferentiation [J]. J Lipid Res, 2018, 59(3):550-563
- [60] 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):467-480
- [61] LEE C T, CHEN J, WORDEN L T, et al. Cocaine causes deficits in radial migration and alters the distribution of glutamate and GABA neurons in the developing rat cerebral cortex[J]. Synapse, 2011, 65(1):21-34
- [62] LEE C T, CHEN J, HAYASHI T, et al. A mechanism for the inhibition of neural progenitor cell proliferation by cocaine[J]. PLoS Med, 2008, 5(6):e117
- [63] LEE C T, CHEN J, KINDBERG A A, et al. CYP3A5 mediates effects of cocaine on human neocortogenesis: studies using an *in vitro* 3D self-organized hPSC model with a single cortex-like unit[J]. Neuropsychopharmacology, 2017, 42(3):774-784
- [64] MANSOUR A A, GONCALVES J T, BLOYD C W, et al. An *in vivo* model of functional and vascularized human brain organoids[J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(5):432
- [65] KELAVA I, LANCASTER M A. Dishing out mini-brains: current progress and future prospects in brain organoid research[J]. Dev Biol, 2016, 420(2, SI):199-209
- [66] 高峰, 范卫民, 崔维顶, 等. 应用旋转式生物反应器体外构建组织工程软骨具优越性[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2008, 28(3):350-353
- [67] SCHWARTZ M P, HOU Z G, PROPSON N E, et al. Human pluripotent stem cell-derived neural constructs for predicting neural toxicity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(40):12516-12521
- [收稿日期] 2018-11-07

(上接第127页)

- plications in oromandibular defects: Comparing scapular and fibular based free flap reconstructions [J]. Oral Oncol, 2017, 71:163-168
- [14] OH S M, KIM J W, CHOI S Y, et al. Full-mouth rehabilitation with bone-level implant guide and monolithic zirconia prosthesis for fibular free flap reconstruction: a case history report [J]. Int J Prosthodont, 2018, 31(6):573-576
- [15] LOFSTRAND J, NYBERG M, KARLSSON T A, et al. Quality of life after free fibula flap reconstruction of segmental mandibular defects [J]. J Reconstr Microsurg, 2018, 34(2):108-120
- [16] ORABONA G D, ABBATE V, MAGLITTO F, et al. Low-cost, self-made CAD/CAM-guiding system for mandibular reconstruction[J]. Surg Oncol, 2018, 27(2):200-207
- [17] 李明, 邱憬, 邢树忠, 等. 折叠腓骨肌皮瓣同期牙种植修复下颌骨缺损: 即刻种植延期修复的临床应用 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(9):1287-1290
- [18] BOUCHET B, RAOUL G, JULIERON B, et al. Functional and morphologic outcomes of CAD/CAM-assisted versus conventional microvascular fibular free flap Reconstruction of the mandible: A retrospective study of 25 cases[J]. J Stomatol Oral Maxillofac Surg, 2018, 119(6):455-460
- [收稿日期] 2019-07-02