

脑类器官技术探索阿尔茨海默症致病机制的研究进展

邵晨宁, 葛荣

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.08.040

【中图分类号】 R749.16 【文献标志码】 C 【文章编号】 1671-0800(2024)08-1117-04

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,主要发病于65岁及以上的老年群体^[1]。根据世界卫生组织(WHO)统计报告,AD在全球前十死亡原因中排第七,也是导致痴呆的最主要病因^[2-3]。AD治疗方法和特效药物至今仍未找到,科学家们已发现了多种致病机制,提出了多种假说,试图揭开AD患者脑组织及神经元的复杂变化。2007年人诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)技术问世^[4],将iPSCs用于体外构建脑类器官(brain organoids, BOs)来模拟AD病理变化,成为当下研究热点。本研究拟对BOs技术探索AD致病机制的研究进展进行综述。

1 AD的病理机制

AD包括家族型(familial AD, FAD)和散发型(sporadic AD, SAD),其中FAD占1%,两者病理变化相似^[5]。目前普遍认为多种因素可以加速AD进展,如遗传因素、环境毒素、衰老、感染及外伤等,也因此出现了多种假说,包括淀粉样蛋白 β (β -amyloid, A β)沉积、Tau蛋白过磷酸化、神经炎症、线粒体功能障碍、氧化应激及载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)级联反应等^[6]。除了上述主流假说,还有感染假说、胆碱能假说及卫生假说等被提出来,为研究AD提供了多方位的思路。

2 AD的BOs

动物模型是研究AD机制的重要工具。如实验室使用与人类高度相似的非人灵长类动物作为实验

模型,或者使用被敲入人类淀粉样蛋白前体(amyloid precursor protein, APP)突变基因的转基因小鼠模型,均取得了一定成果^[7-8]。目前使用的动物模型大部分模拟的是FAD,将基于FAD创建的动物模型进行实验得到的结果在SAD患者群体中进行临床试验,加之不同物种之间的药代动力学存在差异,试验结果必然不如人意。于2016年成立的MODEL-AD联盟尽管已开发了几种人源化动物模型,但至今还未有突破性的进展。

iPSCs既有与人胚胎干细胞同样的自我更新和多谱系分化能力,又避免了伦理争议,展现了前所未有的潜力和优势^[9]。利用iPSCs强大的自组织能力,iPSCs首先聚集形成胚状体(embryoid bodies, EBs),EBs可以分化成内胚层、外胚层和中胚层的任何细胞,经培养形成类器官。Lancaster等^[10]将EBs埋入Matrigel基质胶并在神经诱导培养基中培养,最终形成一个有组织的3D结构即BOs。BOs被迅速用于观察人类神经发育、神经退行性等病理特征,成为研究AD的工具。

2.1 多样化的BOs模型 AD复杂的发病机制需要多样化的BOs模型,经过10余年探索,从基础到区域特异性,从单向到协同工程,各种模式的AD的BOs被开发出来。

小胶质细胞作为大脑免疫细胞,在大脑发育和神经系统疾病中起着关键作用,是AD的重要风险因素之一。Abud等^[11]成功地从iPSCs中分离培养出与人类小胶质细胞高度相似的小胶质细胞样细胞(human microglial-like cells, iMGLs)。因小胶质细胞基因与晚发性SAD有关,实验室将iMGLs与BOs一起培养用来测试神经元损伤后的小胶质细胞的反

作者单位: 315020 宁波,宁波市临床病理诊断中心

通信作者: 葛荣, Email: gerong123@sina.com

应,结果表明,iMGLs分泌细胞因子并主动迁移聚集在受伤区域附近,吞噬多种神经元起底物^[11]。其还可以通过髓系转录因子PU.1的过表达构建含iMGLs的人类皮质类器官,再移植到小鼠大脑中用于研究其在神经退行性疾病中的作用^[12]。使用实时共聚焦电子显微镜,在培养系统中引入两种致病性Tau突变进行观察,是一种具有更多可能性且利于操作的标准化小型化平台^[13]。

针对强遗传危险因素APOE4,有研究将被星形因子NFIB和SOX9诱导的iPSCs和未被诱导的iPSCs共培养,创建了一种嵌合人脑类器官(chimeric human cerebral organoids, chCOs)。相比传统BOs, chCOs更能评估APOE4在神经元和星形胶质细胞中的作用^[14]。为模拟SAD中血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)渗漏的情况,Chen等^[15]选择具有良好重复性和均匀性的BOs暴露于人血清,再将突触染色,用微电机阵列进行评估,结果表明此模型能有效模拟BBB渗漏。脉络丛(choroid plexus, Chp)是一种高度血管化的组织,负责分泌脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)形成BBB,通过培养Chp类器官,测试其在Wnt信号转导下对A β 42寡聚体的免疫反应以及生物标志物的含量变化,为研究AD中BBB及Chp的变化提供了一种新模型^[16]。

最新研究认为,AD患者的病理变化不仅存在于大脑,也存在于视网膜中,非常适合非侵入性诊断成像,因此AD的视网膜特征有望成为早期AD的生物标志物。在一项研究中,实验人员使用2个患者来源的iPSCs生成视网膜类器官(retinal organoids, ROs),分别在3和5个月时收集ROs进行切片染色及定量分析,结果证明此ROs包含了人视网膜的结构和细胞,也显示出一些AD特征性病理变化,表明ROs用于AD建模极具研究潜力^[17]。还有研究从1例AD患者的尿液中分离出细胞,称之为尿源性细胞(urine-derived cells, UDCs),经重新编辑为iPSCs并被分化成神经细胞。UDCs的获取简便无创,减轻了患者负担,可以扩大AD建模的目标人群^[18]。

2.2 现有BOs的不足

2.2.1 细胞类型不全

理论上iPSCs可以诱导培养成任意中枢神经系统类器官,但受到现有技术的限制,大多数BOs并未包含所有细胞类型,如血管内

皮细胞和小胶质细胞,这类缺陷削弱了BOs模拟重建大脑环境的能力,限制了其在神经系统疾病研究中的应用。

针对以上不足,文献报道了一种可无血清培养的组装技术,即将FBOs与普通髓系祖细胞和表型稳定的人脐静脉内皮细胞共培养成集合体,称之为血管化脑集合体^[19],或者分别开发BOs和血管类器官,然后将它们融合在一起,这样就获得了血管化BOs^[20]。另外,通过分化神经元-星形胶质细胞,然后加入AD不同阶段的成熟小胶质细胞,建立一个三培养系统,可用于观察A β 聚集、p-Tau形成及细胞因子变化^[21]。由神经祖细胞衍生的小球体融合后可形成神经同心体,其核心是一个促血管生成结构,外面包绕密集的星形胶质细胞,与单类器官相比,此模型更贴近胎儿大脑,可用于更复杂的脑模拟实验^[22]。以上几种模型均为复合型多功能类器官模型,更接近人脑,与普通BOs相比,这类模型的神经上皮更活跃、星形胶质细胞更成熟、突触数量更多,显示了研究AD复杂机制的可行性,大幅度拓宽了研究范围。

除了在培养技术上创新,研究人员还尝试结合辅助设备探究细胞内代谢。Bai等^[23]展示了一种单细胞代谢成像平台,利用光学光热红外(OP-TIR)技术对结合叠氮化物-PA标记的红外探针进行追踪,结合光谱分析,将细胞内的脂质分布可视化。使用改良的机器学习平台NEUBOrg诱导生成AD全脑类器官,花费低耗时少,且能完整地反映疾病进展,可大大扩展AD的研究范围^[24]。以上这些技术弥补了BOs细胞不全的短板,有助于更全面地研究AD细胞内病变。

2.2.2 异质性

现有BOs还存在细胞系间及培养批次间的异质性问题。有人将不同个体来源的成纤维细胞重新编辑为iPSCs,均使用非诱导模式培养6个月生成BOs,通过测算APOE、A β 和p-Tau水平,结果表明类器官的异质性可能与BOs的分化变异有关^[25]。

为解决这一困扰,科学家们进行了诸多实验。有研究使用重组的蜘蛛丝纤维蛋白作为细胞附着的支架,iPSCs分散其中并沿着支架表面蔓延,再将培养物切换至神经诱导培养基培养,最终生成BOs。丝纤维BOs的分化更均匀,氧化应激和核心坏死更少,功能更加成熟,证明此方法可以降低类器官的变异

性^[26]。Cho 等^[27]利用微流控系统,通过精确控制流体流速,培养基中的氧气、营养物和生物活性分子被有效交换,细胞凋亡明显减少,建立了一个高质量的生物工程平台。Acharya 等^[28]为避免培养过程中多次转移和封装导致的变异及耗时,将培养步骤简化,使用简单的夹层和倒置法将EBs转移至含有基质胶的柱板上,可形成均匀性高、重复性好的BOs,其简单性适于广泛采用。以上实验从培养设备和操作环节着手,消除或降低培养过程中容易产生变异的隐患,达到生成高质量类器官的目的。

3 BOs 和药物筛选

构建BOs不仅可以研究疾病的发病机制,也可以寻求疾病的治疗方法,开发特效药物。由于AD的致病因素和过程的复杂性,动物模型、细胞模型和单通路分析模型都存在局限性,无法满足研究需求。通过整合明确的病因或者定时定量调节细胞因子等方法来引导形成各种亚型类器官,为AD提供了优秀的体外药物实验模型,虽然进展缓慢,但也取得了一些成果。

通过Wnt信号转导刺激类器官,添加或不添加Wnt小分子抑制剂,使用免疫细胞化学和流式细胞术来检测炎症因子和生物标志物的含量变化,可用于药物筛选^[16]。用曲米前列酸处理BOs,结合X射线晶体成像、定点诱变、氦质谱、静态光散射和分子动态模拟等技术,可比较该药物在细胞水平对APOE4聚集的影响^[29]。针对突触损伤,一种比美金刚更有效的NMDAR双重抑制拮抗剂已被研发,既可阻断过度开放的NMDAR离子通道,还能进行定向S-亚硝基化,突触可塑性类器官证明了这个药物的有效性^[30]。在研究过程中,CRISPR/Cas9基因编辑技术经常被用来生成同基因对照类器官,以观察实验组的病理变化和药物敏感性,以上模型可用于药物筛选、探索药物新靶点和设计药物递送系统,也证明BOs是精准医疗的可靠平台。

值得强调的是,业内认为建立药物评估平台非常有必要,这一般需要进行3个步骤。首先诱导生成类器官,其次对类器官进行信号网络构建、信号模型确认和控制节点识别,最后使用美国食品药品监督管理局(FDA)批准的药物进行验证,此即高内涵筛选系统^[31]。

4 总结与展望

BOs技术的出现,使解开AD发病机制成为可能,也让药物从实验室走向临床试验的可能性大大增加。在现有的AD模型中,BOs与人类大脑最为接近,通过设计,它可以模拟特定的疾病状态,也可增减遗传风险、细胞因子等进行药物筛选,为精准医疗提供最有潜力的模型。但BOs之于AD的研究仍处于起步阶段,远不够成熟。随着对BOs模型的深入研究,有望解开AD及其他神经退行性疾病的发病机制。
利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] 2023 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19(4):1598-1695.
- [2] World Health Organization. The top 10 causes of death[EB/OL]. (2020-12-09)[2024-03-23]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [3] World Health Organization. Dementia[EB/OL]. (2023-03-15)[2024-03-23]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
- [4] YU J, VODYANIK M A, SMUGA-OTTO K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [5] DORSZEWSKA J, PRENDECKI M, OCZKOWSKA A, et al. Molecular basis of familial and sporadic Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2016, 13(9): 952-963.
- [6] MONTEIRO A R, BARBOSA D J, REMIAO F, et al. Alzheimer's disease: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and disease-modifying drugs[J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 211: 115522.
- [7] YOKOYAMA M, KOBAYASHI H, TATSUMI L, et al. Mouse models of Alzheimer's disease[J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 912995.
- [8] CHEN Z Y, ZHANG Y. Animal models of Alzheimer's disease: Applications, evaluation, and perspectives[J]. *Zool Res*, 2022, 43(6): 1026-1040.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] ABUD E M, RAMIREZ R N, MARTINEZ E S, et al. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases[J]. *Neuron*, 2017, 94(2): 278-293.e9.
- [12] CAKIR B, TANAKA Y, KIRAL F R, et al. Expression of the transcription factor PU.1 induces the generation of microglia-like cells in human cortical organoids[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 430.
- [13] BATENBURG K L, SESTITO C, CORNELISSEN-STEIJGER P,

- et al. A 3D human co-culture to model neuron-astrocyte interactions in tauopathies[J]. *Biol Proced Online*, 2023, 25(1): 4.
- [14] HUANG S C, ZHANG Z, CAO J W, et al. Chimeric cerebral organoids reveal the essentials of neuronal and astrocytic APOE4 for Alzheimer's tau pathology[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 176.
- [15] CHEN X, SUN G, TIAN E, et al. Modeling sporadic Alzheimer's disease in human brain organoids under serum exposure[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(18): e2101462.
- [16] MUOK L, LIU C, CHEN X C, et al. Inflammatory response and exosome biogenesis of choroid plexus organoids derived from human pluripotent stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7660.
- [17] JAMES E, VIELLE A, CUSATO K, et al. Human iPSC-derived retinal organoids develop robust Alzheimer's disease neuropathology[J]. *Front Cell Neurosci*, 2024, 18: 1340448.
- [18] SUPAKUL S, HATAKEYAMA Y, LEVENTOUX N, et al. Urine-derived cells from the aged donor for the 2D/3D modeling of neural cells via iPSCs[J]. *Aging Brain*, 2023, 4: 100101.
- [19] KOFMAN S, SUN X H, OGBOLU V C, et al. Vascularized brain assembloids with enhanced cellular complexity provide insights into the cellular deficits of tauopathy[J]. *bioRxiv*, 2023, 30(6): 547293.
- [20] SUN X Y, JU X C, LI Y, et al. Generation of vascularized brain organoids to study neurovascular interactions[J]. *Elife*, 2022, 11: e76707.
- [21] PARK J, WETZEL I, MARRIOTT I, et al. A 3D human triculture system modeling neurodegeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21: 941-951.
- [22] CHAI Y C, TO S K, SIMORGH S, et al. Spatially self-organized three-dimensional neural concentroid as a novel reductionist humanized model to study neurovascular development[J]. *Adv Sci*, 2024, 11(5): e2304421.
- [23] BAI Y R, CAMARGO C M, GLASAUER S M K, et al. Single-cell mapping of lipid metabolites using an infrared probe in human-derived model systems[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 350.
- [24] ESMAIL S, DANTER W R. NEUBOrg: Artificially induced pluripotent stem cell-derived brain organoid to model and study genetics of Alzheimer's disease progression[J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 643889.
- [25] HERNÁNDEZ D, ROONEY L A, DANISZEWSKI M, et al. Culture variabilities of human iPSC-derived cerebral organoids are a major issue for the modelling of phenotypes observed in Alzheimer's disease[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, 18(2): 718-731.
- [26] SOZZI E, KAJTEZ J, BRUZELIUS A, et al. Silk scaffolding drives self-assembly of functional and mature human brain organoids[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 1023279.
- [27] CHO A N, JIN Y, AN Y, et al. Microfluidic device with brain extracellular matrix promotes structural and functional maturation of human brain organoids[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4730.
- [28] ACHARYA P, JOSHI P, SHRESTHA S, et al. Uniform cerebral organoid culture on a pillar plate by simple and reproducible spheroid transfer from an ultralow attachment well plate[J]. *Biofabrication*, 2023, 4: 537886.
- [29] NEMERGUT M, MARQUES S M, UHRIK L, et al. Domino-like effect of C112R mutation on ApoE4 aggregation and its reduction by Alzheimer's Disease drug candidate[J]. *Mol Neurodegener*, 2023, 18(1): 38.
- [30] GHATAK S, DOLATABADI N, GAO R, et al. NitroSynapsin ameliorates hypersynchronous neural network activity in Alzheimer hiPSC models[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(10): 5751-5765.
- [31] PARK J C, JANG S Y, LEE D, et al. A logical network-based drug-screening platform for Alzheimer's disease representing pathological features of human brain organoids[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 280.

收稿日期:2024-05-08

(本文编辑:钟美春)