

刘妍, 南京医科大学药学院副院长, 二级教授, 博士生导师, 国家杰青, 国家优青, 科技部重点研发专项首席科学家, 首届江苏省青年女科学家, 江苏省杰出青年基金获得者, 江苏省双创人才, 江苏省“333”工程培养对象和六大人才高峰等。获得“江苏省巾帼科技之星”称号(2020), 参与获得江苏省科技进步二等奖(2020)。研究着重于利用人脑类器官开展神经疾病机制及细胞移植治疗研究, 成果发表于*Nat Biotechnol*、*Nat Commun*、*J Clin Invest*、*Mol Psychiatry*和*EMBO Mol Med*等国际权威期刊上。

## 人源脑类器官模型在孤独症相关神经发育缺陷研究中的应用与进展

王源浩<sup>1</sup> 张栩<sup>1</sup> 韩晓<sup>2</sup> 刘妍<sup>1, 2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室, 南京 211166; <sup>2</sup>南京医科大学药学院, 南京 211166)

**摘要** 孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是一种以社交障碍及刻板行为为核心症状的神经发育疾病。其受遗传和环境等多种因素影响, 病因复杂、患者异质性极高, 这给疾病机制研究和治疗靶点的研究造成了阻碍。3D人脑类器官是由多能干细胞(pluripotent stem cell, PSCs)经悬浮培养及诱导分化后自组织形成的器官样三维组织, 其可携带患者完整的遗传信息, 可在体外模拟胚胎的早期脑发育过程并反映病理过程。脑类器官是研究孤独症谱系障碍的理想模型与平台, 该文将对近年来人脑类器官在孤独症研究中的进展与成果作综述。

**关键词** 孤独症谱系障碍; 诱导多能干细胞; 人脑类器官; 神经发育

## Application and Progress of Human Brain Organoid Model in the Study of Autism-Related Neurodevelopmental Defects

WANG Yuanhao<sup>1</sup>, ZHANG Xu<sup>1</sup>, HAN Xiao<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>1, 2\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China;

<sup>2</sup>School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

**Abstract** ASD (autism spectrum disorder) is a neurodevelopmental disorder characterized by social deficits and repetitive behavior. It is influenced by various factors such as genetics and environment, and has complex etiology and high heterogeneity among patients, which hinders the research on disease mechanisms and therapeutic targets. 3D human brain organoids are organ-like 3D tissues formed from PSCs (pluripotent stem cells) after suspension culture and induced differentiation, which can carry complete genetic information of patients, and can sim-

收稿日期: 2024-01-30

接受日期: 2024-03-04

国家重点研发计划(批准号: 2023YFF1203600、2021YFA1101800)和国家自然科学基金(批准号: 82325015)资助的课题

\*通信作者。Tel: 025-86508960, E-mail: yanliu@njmu.edu.cn

Received: January 30, 2024

Accepted: March 4, 2024

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2023YFF1203600, 2021YFA1101800), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82325015)

\*Corresponding author. Tel: +86-25-86508960, E-mail: yanliu@njmu.edu.cn

ulate the early brain development process of embryos *in vitro* and reflect the pathological process. Brain organoids are ideal models and platforms for studying ASD. This article will review the progress and achievements of human brain organoids in ASD research in recent years.

**Keywords** autism spectrum disorder; induced pluripotent stem cells; human brain organoids; neurodevelopment

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD, 简称孤独症) 是一种常见的、高度遗传性、高度异质性的儿童神经发育障碍疾病<sup>[1-2]</sup>, 其核心症状为刻板重复行为及社交障碍<sup>[2]</sup>, 患者常伴有智力障碍、注意缺陷多动障碍 (attention-deficit/hyperactivity disorder, ADHD)、焦虑、抑郁和癫痫等症状<sup>[1]</sup>, 同时多种神经发育缺陷都可能伴发孤独症行为。孤独症可能受环境及遗传背景等多种因素影响, 致病原因尚不明确且十分复杂<sup>[3]</sup>。目前认为遗传因素在 ASD 的发生中占主导地位, 双胞胎家系研究揭示了 ASD 的高遗传倾向, 同卵双胞胎的患病一致性率达 70%~90%<sup>[4]</sup>。根据基因背景及患者表型的不同, 孤独症可分为多个亚型<sup>[1,3]</sup>, 如具有特征明确的遗传综合征同时伴有孤独症行为的患者可称为综合征型孤独症患者<sup>[5]</sup>, 典型的综合征型孤独症相关的神经发育缺陷如结节硬化症 (tuberous sclerosis complex, TSC)、脆性 X 染色体综合征 (fragile X syndrome, FXS)、雷特综合征 (Rett syndrome, RTT) 等<sup>[6]</sup>。孤独症患者的尸检显示其脑内存在诸多病理变化, 包括脑区结构的异常改变、神经胶质/神经元数量的改变、神经元的形态学异常以及神经突触结构与数量的变化等<sup>[7-8]</sup>。此外, 也有研究指出孤独症患者脑内谷氨酸能及  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 能神经环路异常, 表现为兴奋性突触密度增加、谷氨酸脱羧酶水平显著降低以及 GABA 受体的改变。科研人员在孤独症的小鼠模型中重现了神经元的突触异常<sup>[9]</sup>, 并证明了可以通过药物治疗来改善小鼠的病理组织学表型及孤独症样行为<sup>[10]</sup>。基于小鼠模型成果推进了胰岛素样生长因子 1 (insulin like growth factor 1, IGF1) 治疗 Rett 综合征的临床试验以及代谢型谷氨酸受体 5 (metabotropic glutamate receptor 5, mGluR5) 抑制剂治疗 FXS 的临床试验。但由于人鼠物种的差异性, 这些临床前药物研究并没有得到良好的结果, 相关的临床试验也被终止<sup>[11-12]</sup>。这些失败的研究也表明, 作为一种以社交障碍为特点的高度“人化”的疾病, 孤独症仅通过小鼠模型进行

机制及治疗靶点研究可能是不够的, 需要相关的人源模型来进行孤独症相关神经发育缺陷的模拟及研究。

## 1 诱导多能干细胞与人脑类器官

THOMSON 等<sup>[13]</sup>在 1998 年建立了从囊胚中分离并培养人类胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 的技术, 此后体外培养具有多能性的人胚胎干细胞便成为可能。2006 年 YAMANAKA 等<sup>[14]</sup>通过四种重编程因子诱导小鼠成纤维细胞重新变为未分化状态并具有多分化潜能的干细胞, 即诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC)。iPSC 可由易获得的患者来源的体细胞重编程而来, 并且可以再次分化成中枢神经元等几乎任何类型的体细胞。利用孤独症患者 iPSC 分化的神经元可以作为孤独症研究的人源模型, GAGE 团队<sup>[15]</sup>利用孤独症患者 iPSC 诱导分化的神经元揭示了其神经前体细胞 (neural progenitor cell, NPC) 早期发育过程基因网络的异时性失调, 并导致了神经前体细胞分化的加速; MAR-CHETTO 等<sup>[16]</sup>的工作证明了孤独症患者来源的 NPC 由于  $\beta$ -catenin/BRN2 转录级联反应失调而过度增殖, 同时孤独症患者来源的神经元表现出神经发生和突触发生的异常, 并导致神经网络的功能缺陷<sup>[16]</sup>。然而 2D 环境的神经元培养体系在模拟大脑的复杂结构和功能方面存在较大的局限性<sup>[17]</sup>, 其体系内细胞类型过于单一, 且二维培养与真实脑发育情况不同, 既不能模拟大脑在三维空间位置上细胞的排列及相应的组织结构, 也不能形成各种脑源性分泌因子所构成的细胞生长发育微环境, 限制了培养组织中如脑室区、皮层区等结构的产生; 另外, 由于疾病往往涉及不同脑区间、不同细胞类型间的相互作用及功能紊乱, 而 2D 培养细胞不能有效模拟多脑区、多细胞类型在三维空间层面上的相互作用, 难以反映疾病脑内的真实情况<sup>[18]</sup>。

三维培养的人脑类器官主要由 ESC 和 iPSC 在悬浮条件下自我组织并培养分化而来。2001 年,

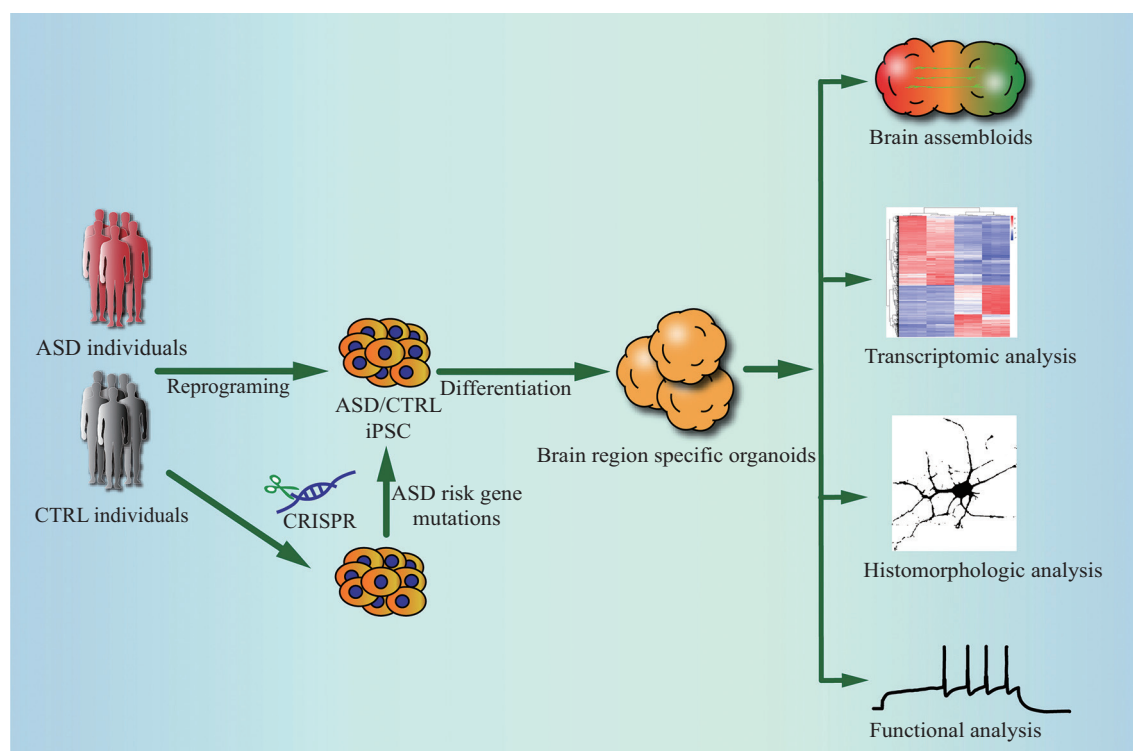


图1 应用人脑类器官探究孤独症谱系障碍的示意图

Fig.1 Application of brain organoids to explore autism spectrum disorders

ZHANG等<sup>[19]</sup>将人胚胎干细胞聚集为拟胚体,贴壁培养后分化得到“玫瑰花结样”的神经管状结构,且神经上皮细胞可进一步分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。2005年, SASAI团队<sup>[20]</sup>建立了无血清悬浮培养方法,通过添加神经分化诱导因子,将小鼠胚胎干细胞产生的拟胚体分化为端脑组织。2013年, LANCASTER等<sup>[21]</sup>利用人类胚胎干细胞和诱导多能干细胞构建了“全脑类器官”(cerebral organoid)模型。该模型采用三维(3D)培养技术,结合特定的生长因子和基质胶包埋方法,成功地培育出了模拟9至10周胚胎大脑阶段的结构。3D人脑类器官可以模拟人脑早期发育的特定阶段,具有神经发育过程中的多种细胞类型,包括放射状胶质细胞、皮层深层投射神经元、抑制性神经元等<sup>[22]</sup>,并且这些细胞可以形成类似脑发育过程中脑室区等的组织结构<sup>[21,23]</sup>。人脑类器官携带有所来源个体的完整遗传信息,并且可以体外模拟其脑发育过程,是研究高遗传性、高异质性的孤独症发育障碍的理想模型与有力工具<sup>[21,23]</sup>(图1)。

但需要指出的是,孤独症患者间的异质性大,不同环境因素及遗传背景对患者的影响可能较为复杂<sup>[1,24]</sup>,不同患者的临床症状也可能存在较大差

异<sup>[1,24]</sup>。若不依据相关标准对患者进行区分,对致病机制及治疗靶点的寻找无疑会造成干扰。因此,在利用ESC和iPSC来源的人脑类器官对孤独症类器官进行研究时,通过患者的综合征类型、基因型、表型等因素对患者加以区分并进行针对性研究往往是十分必要的。

## 2 人脑类器官在综合征型孤独症相关神经发育缺陷研究中的应用

ASD症状可能是某些特征明确的遗传综合征患者临床表型的一部分<sup>[5]</sup>,这些伴有孤独症临床表型的神经发育缺陷患者被统称为综合征型孤独症,如结节硬化症、脆性X染色体综合征、雷特综合征等,其患者中均有一定比例伴有孤独症行为<sup>[2]</sup>。关于此类综合征的类器官模型研究已有诸多报道。

### 2.1 结节硬化症

TSC是一种常染色体显性遗传病,由 *TSC1* 及 *TSC2* 基因遗传性或自发性功能缺失突变引起;TSC患者常患有孤独症谱系障碍,并伴发癫痫、智力障碍等多种神经系统疾病<sup>[25-26]</sup>。*TSC1*和 *TSC2* 基因分别编码错构素蛋白(hamartin)和马铃薯球蛋白(tuberin),两者形成TSC蛋白复合物并抑制雷帕霉

素复合物1(mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1)的过度激活,从而调控细胞的正常生长、增殖及分化过程<sup>[25]</sup>。*TSC1/2*基因的突变位点存在多样性,且即使同基因型的患者间也存在不同的临床表型,这导致TSC患者的临床症状与病情严重程度存在较大异质性,为疾病机制及治疗靶点的研究带来困难<sup>[25]</sup>。ALSAQATI等<sup>[27]</sup>分化了ASD患者来源的携带*TSC2*突变的神经元,并利用微点电极阵列(multi-electrode array, MEA)解析其神经网络活动;该研究结果显示*TSC2*突变的ASD神经元过度活跃,表现出神经元电活动爆发的同步性降低和空间连接性降低的特征,并进一步导致神经网络功能失调;同时该研究也指出,*TSC2*的突变会引起编码谷氨酸和GABA信号转导相关酶和受体蛋白的基因表达发生改变。DOOVES等<sup>[28]</sup>也发现TSC患者来源的脑类器官中GABA能神经元与谷氨酸能神经元比例失调,这些结果均表明TSC患者脑内可能存在神经网络突触兴奋抑制(E/I)的失衡。BLAIR等<sup>[29]</sup>通过CRISPR-Cas9技术分别构建了*TSC1*及*TSC2*突变的细胞系并且这些细胞系可以分化为人脑类器官,他们还发现*TSC1/2*的功能缺失会过度激活mTORC1,引起神经元的减少及神经胶质细胞的增多,并引发神经细胞胞体的增大及畸形。EICHMÜLLER等<sup>[26]</sup>建立了*TSC2*杂合突变患者的人脑类器官;结合单细胞测序技术鉴定了在神经发育过程中引起皮质块茎病变的中间神经元祖细胞CLIP细胞群,揭示了TSC脑类器官中mTOR过度激活会导致CLIP细胞的过度增殖,最终导致皮质块茎和室管膜下肿瘤的形成。

目前对于TSC中块茎形成的理论尚有争议。小鼠模型的研究表明,虽然皮质祖细胞中*Tsc1*或*Tsc2*的缺失会导致神经元分化、形态和迁移的异常改变,但并没有产生真正的块茎,这可能是物种差异的结果,也为探究TSC的病理机制造成了阻碍<sup>[29]</sup>。TSC的人脑类器官模型发现*TSC1*或*TSC2*的纯合而非杂合缺失会影响人类皮质神经元和神经胶质细胞的正常发育,从而产生类似于块茎中发育不良细胞。相关结果支持了TSC的“二次打击(second-hit)”假说,即*TSC1*或*TSC2*突变杂合患者的体细胞“二次打击”突变驱动mTORC1过度激活和前体细胞聚集的结节形成<sup>[29]</sup>。但TSC的类器官模型仍未能产生与病人体内相同的、真正意义上的块茎,在疾病模拟方面仍存在一定的局限,但总结而言,人脑类器官模型可以

较好地复现TSC的病理表型,并进一步验证人类特异性的病理机制。

## 2.2 脆性X染色体综合征

脆性X综合征是孤独症谱系障碍的主要单基因遗传因素之一,其患者常表现发育迟缓、智力障碍、注意力缺陷/多动障碍、焦虑和癫痫等临床症状<sup>[30]</sup>。FXS是由X染色体上*FMR1*基因的5'非编码区(5' untranslated region, 5'UTR)中胞嘧啶-鸟嘌呤-鸟嘌呤(CGG)三核苷酸序列的重复紊乱引起的。正常人的*FMR1*基因中CGG序列重复数小于54,而当CGG序列重复次数大于200时会造成*FMR1*基因的启动子区域高度甲基化并导致脆X智力迟钝蛋白(fragile X mental retardation 1 protein, *FMRP*)的功能缺失,最终导致FXS的发病<sup>[30]</sup>。*FMRP*调控数百种mRNA的翻译,涉及到神经发生、轴突和树突形成、突触可塑性等多种生理过程,对维持正常的神经发育过程起着十分重要的作用<sup>[30]</sup>。FXS的动物模型研究发现*FMRP*功能的缺失会造成神经可塑性紊乱,同时导致抑制性和兴奋性神经元神经环路的不平衡,这也被认为是可能造成FXS临床症状的原因之一<sup>[31]</sup>。但有研究发现FXS的致病机制可能具有人源特异性,具有CGG高重复数的小鼠模型无法重现FXS的病理过程<sup>[32]</sup>,且*FMRP*蛋白在人类与动物模型中可能调控不同的mRNA等<sup>[33]</sup>。

RAJ等<sup>[34]</sup>在2021年首次报道了利用病人来源的iPSC构建的FXS人脑类器官模型;该研究发现,分化第28天的FXS皮层类器官具有更高比例的Ki67阳性与SOX2阳性细胞,同时转录组数据表明FXS皮层类器官中神经前体细胞增殖相关基因表达上调,而神经元分化及成熟相关基因表达下调,提示FXS脑类器官中神经前体细胞存在异常增殖及分化滞后的细胞表型<sup>[34]</sup>。KANG等<sup>[33]</sup>利用FXS患者iPSC分化的前脑类器官探究了*FMRP*基因缺陷在脑发育过程中的病理表型及相关机制;其通过免疫荧光染色及电生理等多种手段对FXS类器官进行鉴定,发现分化第56天的FXS脑类器官中神经祖细胞增殖减少、神经分化失调、突触形成增加、神经元兴奋性升高以及GABA神经元的发生存在缺陷;单细胞测序结果显示FXS前脑类器官中基因表达谱及神经分化轨迹的异常改变;该研究还阐明,调控在FXS小鼠模型中具有挽救作用的mGluR5通路并不能影响FXS脑类器官中的病理表型,而特异性抑制PIK3通路则具病理

挽救作用;并进一步发现人源特异性的FMRP靶标CHD2<sup>[33]</sup>。这一结果提示可能存在以前FXS动物模型中未发现的人类特异性疾病机制,为FXS的人类特异性分子机制研究提供了新的视角。值得一提的是,该研究与RAJ等<sup>[34]</sup>研究工作中的细胞表型相反,这可能提示了FXS患者间神经发育的异质性,以及FXS病理过程中神经前体细胞增殖及分化过程的紊乱。此外,BRIGHI等<sup>[35]</sup>利用CRISPR-Cas9技术构建了FMRP-KO hiPSC系,该细胞系分化为脑类器官;该研究观察到FMRP-KO类器官在发育过程中尺寸异常增大,且其中以星形胶质细胞为代表的神经胶质细胞比例增加,提示FMRP在调节胶质生成以及神经元/胶质发育平衡方面发挥重要作用。

总而言之,针对FXS的人脑类器官模型研究揭示了FXS病理进程早期神经前体细胞增殖与分化的紊乱,同时发现小鼠模型中的药理学挽救靶点mGluR5通路可能并不适用于人源模型,并挖掘了人源特异性的具有潜在治疗靶点的PIK3通路及CHD2蛋白。但针对FXS人脑类器官的研究结果并未得到公认一致的细胞表型,神经前体细胞提前与滞后分化的表型均有报道。这可能反映了FXS患者间存在较大的异质性,同时也可能是类器官模型本身的异质性所致,这也是限制人脑类器官无法高通量培养与应用的局限之一。未来随着类器官技术的发展,高度均质化的人脑类器官模型可能会帮助人们在FXS的病理研究中提出新的见解。

## 2.3 雷特综合征

雷特综合征是一类X染色体相关的神经发育障碍,患者多为女性,临床症状多表现为孤独症样行为、呼吸和心脏功能异常、癫痫发作和运动协调障碍等<sup>[36-37]</sup>。RTT由编码甲基-CpG结合蛋白2(methyl-CpG binding protein 2, MeCP2)基因的突变引起,MECP2通过其甲基-CpG结合域(methyl-CpG-binding domain, MBD)与靶基因的甲基化CpG二核苷酸结合,并通过转录阻遏结构域(transcriptional repressor domains, TRD)募集染色质重塑蛋白,调节神经元发育<sup>[36,38]</sup>。MECP2基因通过可变剪切可产生不同的转录本,MeCP2不同位点的突变对大脑发育和功能的影响仍未得到阐明,这也可能是导致RTT患者临床症状异质性较大的原因之一<sup>[38]</sup>。2018年,MELLIOS等<sup>[39]</sup>首次报道研究了RTT患者iPSC来源的人脑类器官,发现了RTT脑类器官中miR-199和miR-

214等miRNA的显著上调会引起细胞外信号调节激酶(EKR/MAPK)和蛋白激酶B(PKB/AKT)信号通路的失控,并导致神经前体细胞分化与神经发生的异常。另一项研究中,GOMES等<sup>[40]</sup>分别构建了RTT患者来源的背侧及腹侧前脑类器官,发现了RTT背侧前脑类器官中PAX6阳性的神经前体细胞比例下降、TBR1阳性的深层神经元比例上升,以及存在神经元电生理及钙信号的异常;该研究同时发现RTT腹侧前脑类器官中DCX阳性的新生神经元比例减少;这一研究结果暗示RTT中可能存在过早的背侧神经分化及受损的腹侧神经发生,并可能会导致神经网络兴奋/抑制平衡的异常。

之前针对RTT的小鼠模型研究筛选出了如沙立佐坦(Sarizotan)等潜在的治疗药物并进入了临床前试验,但常常不能取得理想的治疗效果。人脑类器官模型在为RTT的药理学靶点挖掘提出了新的方向。TRUJILLO等<sup>[41]</sup>试图利用脑类器官模型进行RTT潜在药物筛选,其通过MEA及机器学习等手段阐释了MECP2-KO人脑类器官中存在神经元形态发生异常、突触形成受损以及类器官尺寸明显减小的现象,而经过两种先导化合物奈非西坦(Nefiracetam)和PHA543613的处理后可明显挽救MECP2-KO脑类器官的病理表型,为RTT的药物靶点及药理学研究提供了依据。

因此,人脑类器官模型在RTT的研究领域进一步弥补了小鼠模型的不足,这不仅进一步验证了人类RTT神经前体细胞的发育缺陷,提出了miRNA失调所介导的病理机制。同时也提供了人源的药理学靶点研究及筛药模型。

## 2.4 其他综合征型孤独症

天使综合征(angelman syndrome, AS)是由神经元中UBE3A基因的母源性遗传拷贝丢失而引起的遗传发育障碍,患者常表现出发育迟缓、智力障碍、癫痫、共济失调等症状<sup>[42]</sup>。UBE3A基因在动物模型中被广泛研究,但其在人类神经发育过程中的表达模式及功能并未被完全阐明<sup>[42]</sup>。对人源脑类器官的研究揭示了神经发育早期UBE3A基因在神经前体细胞及神经元中的表达模式,并利用AS脑类器官模拟了病理条件下UBE3A表达异常的情况<sup>[42]</sup>。另外也有研究发现UBE3A-KO的脑类器官神经元中大电导钾离子通道(large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels, BK channels)数量上升,神经元兴奋性增

加, 与AS病人中观察到的临床表型一致<sup>[43]</sup>。22q11.2缺失综合征(22q11DS)是孤独症谱系障碍的常见染色体变异之一<sup>[44]</sup>, 利用22q11DS患者来源的脑类器官表现出神经元自发电活动的紊乱和钙信号转导的异常, 而利用雷氯必利(Raclopride)、舒必利(Sulpiride)和奥氮平(Olanzapine)等抗精神病药物可以在22q11DS的脑类器官中挽救神经元异常的功能表型<sup>[45]</sup>。蒂莫西综合征(Timothy syndrome, TS)是一种罕见的神经发育常染色体遗传病, 由编码电压门控钙通道 $\alpha$ 亚基Cav1.2的基因*CACNA1C*突变引起, 患者常共患孤独症<sup>[46]</sup>。斯坦福大学医学院的PAŞCA研究组<sup>[47]</sup>利用前沿的人脑类组装体技术(brain assembloids)整合构建患者来源的皮质/腹侧前脑组装体, 并发现TS类组装体中皮质神经元迁移过程中跳跃长度缩短, 导致神经元迁移缺陷, 并最终导致神经网络活动的异常, 而针对Cav1.2的急性药理学调节可以发挥挽救作用。该研究通过双脑区融合的类型组装体详细阐明了TS病理过程中的细胞表型并探究了潜在的治疗靶点。值得一提的是, 该研究组还构建了*SHANK3*功能缺失的22q13.3缺失综合征的皮层/纹状体类组装体模型, 并成功模拟了疾病组纹状体神经元的病理缺陷<sup>[48]</sup>。

人脑类器官已经广泛应用于多种综合征型孤独症相关的神经发育缺陷的表型及病理机制研究中, 促进了我们对相关疾病的认知。但综合征型孤

独症相关的神经发育缺陷分类众多、表型各异、病因复杂, 人脑类器官模型具有患者的遗传背景, 是针对良好的人源发育模型, 但是其作为体外培养模型并不能模拟在体发育过程, 同时也无法进行行为学实验以模拟相关疾病行为。未来仍需要将动物模型与脑类器官模型相结合, 更加深入全面地探索相关疾病的发病机制与治疗靶点。

### 3 人脑类器官在非综合征型孤独症相关神经发育缺陷研究中的应用

伴有孤独症行为、同时不具有明确遗传特征的神经发育缺陷常可为非综合征型孤独症。非综合征型孤独症患者间也存在较大异质性, 研究者利用脑类器官进行相关研究时常常也会按照患者表型及基因型等标准进行分类研究(表1)。

#### 3.1 小头畸形

小头畸形(microcephaly)患者常伴有孤独症行为, 同时该疾病也是脑类器官技术建立早期模拟研究的靶点之一<sup>[21,23,56]</sup>, 其病因可能受多种因素影响, 患者常表现出发育迟缓、智力障碍等症状<sup>[57]</sup>; 在2013年, 奥地利科学院KNOBLICH研究团队<sup>[21]</sup>首次提出人脑类器官概念的工作中, LANCASTER等<sup>[21]</sup>便构建了小头畸形患者的脑类器官, 并发现其发育过程中神经前体细胞增殖减少, 提前分化为神经元。WANG等<sup>[58]</sup>在七名小头畸形患者中鉴定了*NARS1*双

表1 人脑类器官模型在非综合征孤独症相关神经发育缺陷研究中的部分应用  
Table 1 Some applications of brain organoids in non-syndromic autism research

| 研究者<br>Researcher                | 模拟表型<br>Simulated phenotype         | 建模方式<br>Modeling method | 表型<br>Phenotype                                       | 异常基因<br>Abnormal gene                | 挽救<br>Rescue |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| LANCASTER, et al <sup>[21]</sup> | Microcephaly                        | Patient iPSCs           | Decreased NPC proliferation                           | <i>CDK5RAP2</i>                      | shRNA        |
| MARIANI, et al <sup>[49]</sup>   | Macrocephaly                        | Patient iPSCs           | Increased GABA neurons                                | <i>FOXG1</i>                         | shRNA        |
| JOURDON, et al <sup>[50]</sup>   | Large/normal head circumference ASD | Patient iPSCs           | Abnormal NPC differentiation                          | —                                    | —            |
| QIAN, et al <sup>[51]</sup>      | Microcephaly                        | Zika virus exposure     | Decreased NPC proliferation                           | —                                    | —            |
| BRUNA, et al <sup>[52]</sup>     | ASD risk gene mutations             | CRISPR/CAS9             | Abnormal development of excitatory/inhibitory neurons | <i>SUV420H1ARID1B</i><br><i>CHD8</i> | —            |
| LI, et al <sup>[53]</sup>        | ASD risk gene mutations             | CHOOSE system           | Abnormal development of interneuron                   | <i>ARID1B</i>                        | CRISPR/CAS9  |
| MENG, et al <sup>[54]</sup>      | ASD risk gene mutations             | CRISPR Screen           | Abnormal migration of inhibitory neurons              | <i>LNPK</i>                          | —            |
| BIRTELE, et al <sup>[55]</sup>   | <i>SYNGAP1</i> gene mutation        | Patient iPSCs           | Abnormal cortical plate like structure                | <i>SYNGAP1</i>                       | —            |

NPC: 神经前体细胞; CHOOSE: CRISPR human organoids scRNA-seq; —: 不清楚。  
NPC: neural precursor cells; CHOOSE: CRISPR human organoids scRNA-seq; —: unclear.

等位基因错义和移码突变,患者的皮层脑类器官模型显示放射状胶质细胞(radial glia cell, RGC)增殖水平降低,单细胞转录组分析表明星形胶质细胞和RGC谱系发生的改变,揭示了*NARS1*对人脑发育中RGC增殖的重要影响<sup>[58]</sup>。GABRIEL等<sup>[59]</sup>利用iPSC及脑类器官模型提出小头畸形相关基因*CPAP*的缺陷会导致神经前体细胞过早地从对称分裂转变为不对称分裂<sup>[59]</sup>,进而影响神经分化。ZHANG等<sup>[60]</sup>通过*WDR62-KO*脑类器官模拟了常染色体隐性遗传原发性小头畸形(primary microcephaly, MCPH),并发现其中神经前体细胞的细胞周期异常以及外侧放射状神经胶质细胞(outer radial glia cell, oRG)的增殖水平减少<sup>[60]</sup>。值得一提的是,GABRIEL等<sup>[59]</sup>以及ZHANG等<sup>[60]</sup>的研究均指出纤毛功能在影响神经前体细胞增殖分化、调节神经发生中起着重要作用。2015年拉丁美洲爆发寨卡病毒,造成当地新生儿小头畸形患者人数激增<sup>[61]</sup>。脑类器官模型完善了2D模型的不足,成功模拟出了病毒感染后脑类器官尺寸减少的表型<sup>[51,62-64]</sup>,并深入揭示了寨卡病毒感染后影响RGC增殖、促进细胞凋亡、破坏RGC顶端连接结构进而造成组织结构紊乱的致病机制<sup>[51,62-64]</sup>。针对小头畸形脑类器官的研究发现,该模型在培养过程中尺寸相比对照组减小,同时其中的神经前体细胞增殖水平降低,可以模拟患者的相关表型。虽然脑类器官模型在模拟小头畸形方面还存在一些不足,如难以长期培养并模拟患者出生后的相关病理表型等,但利用该模型已经揭示了多个基因及环境因素引发小头畸形的可能机制,对未来寻找小头畸形的治疗靶点具有重要意义。

### 3.2 伴有大头畸形的孤独症患者脑类器官研究

孤独症患者常表现出头围异常增大的症状(macrocephaly)<sup>[65]</sup>,这可能是由神经发育过程异常导致的<sup>[49,65]</sup>。2015年,耶鲁大学医学院的VACCARINO研究组的MARIANI等<sup>[49]</sup>首次成功构建了头围异常增大的孤独症患者的前脑类器官。该工作研究了来自13个家庭的头围异常增大的先天孤独症患者前脑类器官的发育情况,发现了囊泡性GABA转运蛋白(vesicular GABA transporter, VGAT)的增加。研究者进一步利用单细胞转录组学等手段揭示*FOXG1*基因的异常上调导致GABA能抑制性神经元的比例增加,并最终导致神经兴奋/抑制失衡的作用机制。而在2023年,同样来自该研究组的JOURDON等<sup>[50]</sup>分别

构建了来自多个家庭的头围异常增加以及正常头围的孤独症患者的人脑类器官。该研究进行了数十例样本的单细胞测序,并采用拟时序分析等方法加以解析,发现了大头孤独症脑类器官中神经前体细胞过度增殖,神经分化滞后;而正常头围孤独症患者的脑类器官存在神经前体细胞增殖减少,神经前体细胞提前分化的现象。这一工作揭示了大头及正常头围的孤独症患者脑内早期神经发育阶段可能存在相反的病理过程,为探究孤独症早期病理机制及诊断、治疗的靶点的发掘提供了线索。

头围增大是孤独症患者的常见表型之一,针对伴有头围增大的孤独症患者的脑类器官研究发现了*FOXG1*异常导致孤独症脑类器官中神经发育异常,同时揭示了神经前体细胞的增殖分化过程与孤独症病理过程的密切联系,针对头围有增大及无变化的患者脑类器官研究进一步强调了神经前体细胞分化时序提前或滞后的改变均可能是引发孤独症的重要因素。

### 3.3 基于孤独症风险基因的类器官研究

*SHANK3*是一种被广泛认可的与ASD发病高度相关的风险基因<sup>[66-67]</sup>,*Shank3*缺陷的小鼠模型可表现出孤独症样行为及异常的神经发育表型<sup>[66-67]</sup>。WANG等<sup>[68]</sup>将脑类器官分化过程中放射状胶质细胞形成的玫瑰花环结构(Rosettes)单独分离出来并使其形成单神经管端脑类器官,并发现*SHANK3*表达缺陷的单神经管类器官中神经元的内在兴奋性上升以及突触形成受损,并通过转录组寻找到多种原钙黏蛋白和钙黏蛋白信号通路的表达异常<sup>[68]</sup>。染色域解旋酶DNA结合蛋白8基因(chromodomain helicase DNA binding protein 8 gene, *CHD8*)是外显子组测序研究中发现的可诱发孤独症的常见突变基因之一<sup>[69]</sup>,携带该基因突变的患者常表现为大头畸形。WANG等<sup>[70]</sup>利用CRISPR-Cas9技术研究了*CHD8*敲除对脑类器官发育的影响,通过RNA测序分析发现*CHD8-KD*脑内器官与大头孤独症患者脑类器官在转录组层面存在高度相似性<sup>[49]</sup>,并表现出WNT/ $\beta$ -catenin信号通路的异常<sup>[70]</sup>。*CNTNAP2*编码细胞黏附分子,参与髓鞘的形成、细胞膜钾通道的运输、神经突和突触发育<sup>[71-72]</sup>。该基因的功能缺失常导致孤独症的发生,并在小鼠模型中得到广泛研究<sup>[71-73]</sup>,但*CNTNAP2*在人神经发育过程中的作用并未得到阐明。DE JONG等<sup>[71]</sup>构建了家族遗传性*CNTNAP2*突变的

孤独症患者的前脑类器官,发现了其神经发育早期神经前体细胞增殖增多并导致脑类器官尺寸增大,并且通过单细胞测序数据揭示了受*CNTNAP2*突变影响最大的是新生的深层兴奋性神经元。BIRTELE等<sup>[53]</sup>研究了孤独症风险基因*SYNGAPI*在皮层类器官中的表达模式,并观察到了*SYNGAPI*功能缺失导致类器官组织结构的动态失衡,并加快了大脑皮层神经元的成熟进程。该研究表明了*SYNGAPI*通过非突触途径影响了孤独症的病理过程,强调了RGC的异常发育在孤独症障碍中的重要影响<sup>[55]</sup>。

孤独症的风险基因数量众多,不同基因的功能缺失是否会导致相同的细胞表型及病理过程也是研究者们关注的重点。哈佛大学的ARLOTTA团队<sup>[52]</sup>分别构建了*SUV420H1*、*ARID1B*和*CHD8*等3个孤独症风险基因杂合突变的大脑皮层类器官,并通过单细胞测序等手段构建其早期发育图谱<sup>[52]</sup>;该研究结果显示,虽然不同风险基因所导致的类器官转录组发生改变的差异基因重叠很小,但均会造成GABA能神经元及谷氨酸能神经元的发育缺陷,最终导致神经网络活动的异常<sup>[52]</sup>。这项研究揭示了不同的孤独症风险基因可能影响共同的特异性类型细胞的发育,并促成相同的孤独症表型特征。2023年,KNOBLICH团队的李冲等<sup>[53]</sup>将高通量基因编辑技术和单细胞转录组技术结合,在脑类器官中开发出一种名为CHOOSE(CRISPR human organoids scRNA-seq)的高通量致病基因筛选系统,并利用CHOOSE系统在脑类器官中随机敲除了36种孤独症高度相关的风险基因<sup>[53]</sup>。他们发现敲除不同的风险基因会在类器官的发育过程中影响不同的细胞类型,但同时也指出,多个风险基因均影响中间神经干细胞(intermediate progenitor cells, IPC)的正常发育及成熟,而这一结果也揭示了虽然孤独症病因存在高度异质性及复杂性,但仍可能存在共同的细胞表型与机制<sup>[53]</sup>。同样在2023年,PAŞCA团队的孟祥玲等<sup>[54]</sup>结合CRISPR screen高通量筛选及人脑类组装体技术,在背/腹侧融合人脑类组装体中随机敲除了425个神经发育障碍相关的基因,其中大部分与孤独症相关。该研究筛选出13个对抑制性神经元生成及33个对抑制性神经元迁移有影响的基因,并解析了其中*LNPk*基因通过影响内质网迁移现象导致神经元迁移障碍的作用机制。综上所述,人脑类器官已经较为广泛地应用于探究多种不同的孤独症风险基因对于病理过程的

影响。虽然脑类器官作为体外研究模型还存在一些不足,如细胞类型受限,不能模拟脑内多种神经细胞的互作;同时培养时间受限,难以获得结构与功能成熟的神经元等,因而无法全面地反映某些基因的表达模式及相应功能机制。但脑类器官模型对孤独症风险基因的研究也取得了一些令人鼓舞的发现,例如通过对比不同风险基因突变后产生的共同表型来排除患者间异质性的干扰,以探究不同的孤独症患者间可能存在的共同组织学表型及相关机制,为寻找治疗孤独症的普适靶点开拓了新的视角。

## 4 总结与展望

孤独症谱系障碍作为神经发育性疾病,其病理过程常在胚胎脑发育早期便已开始,但孤独症行为的诊断至少要在胎儿出生后进行,因此无法获得伴有孤独症行为患者的胚胎脑发育样本,这也为孤独症相关研究造成了较大的阻碍。三维培养的人脑类器官可模拟早期胚胎人脑发育的关键节点,弥补了二维培养神经元模型中细胞类型单一和难以形成复杂的组织结构等不足之处<sup>[21,23]</sup>。脑类器官根据培养时间长短可产生放射状胶质细胞、中间神经元、皮层兴奋性神经元、抑制性神经元,海马神经元等多种神经元类型,以及星形胶质细胞等神经谱系细胞类型<sup>[22,74]</sup>。不同的细胞类型还可形成相应的组织结构,如脑室区细胞放射状排列的玫瑰花环结构以及脑室样区域与皮层样区域的分层结构<sup>[56,74]</sup>。同时,向不同命运分化的脑区特异性类器官可以模拟皮层、纹状体、丘脑、中脑、小脑、脊髓等不同的脑区,为特定脑区的孤独症表型模拟及致病机制研究带来了十分有力的工具<sup>[74]</sup>。此外,由患者体细胞重编程而来的iPSC具有个体整套的遗传信息,其分化的脑类器官可以一定程度上反映患者的个体差异,对于孤独症等具有高度异质性疾病的研究具有独特的优势。因此,人脑类器官模型是较好的研究孤独症谱系障碍的脑发育模型,其既可以在一定程度上模拟伴有孤独症行为患者胚胎时期的脑发育异常,同时也具有患者的遗传信息,可以反映患者特性及患者间的异质性。目前针对孤独症相关神经发育缺陷的脑类器官研究主要针对具有明确分类标准的具体疾病或亚型,如对TSC的研究论证了基因突变“二次打击”的理论,弥补了小鼠模型的不足;针对RTT的脑类器官研究推动了奈非西坦等多种临床前药物试

验的进行。脑类器官模型也被广泛应用于孤独症风险基因的相关研究, *SHANK3*、*CHD8*、*CNTNAP2*、*SUV420H1*、*ARID1B*等多个孤独症风险基因突变的脑类器官模型均被构建并深入研究。无风险基因突变的非综合征型孤独症患者的脑类器官研究也有报道, 如针对伴有头围增大的孤独症患者的脑类器官研究发现 *FOXG1* 的异常表达可能是造成该表型及神经发育异常的原因之一。最近发表的针对头围明显增大及无明显变化的孤独症患者的脑类器官研究也发现这两类孤独症患者可能具有不同的神经发育时序, 但均可归为神经前体细胞增殖分化的异常。体外培养的人源脑类器官模型既可以方便地对孤独症脑发育周期的多时间点进行模拟与研究, 也可以与动物模型相互补充, 推动疾病治疗靶点的筛选, 也是一个拥有巨大潜力的可进行患者个性化筛药、个体化诊疗的理想平台<sup>[23,50,53,56]</sup>。

人脑类器官作为人源发育模型, 在药物筛选方面具有其独特优势, 目前应用人脑类器官进行孤独症相关神经发育缺陷的药物筛选已有诸多报道。mTORC1抑制剂依维莫司 (Everolimus) 和表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 激酶抑制剂阿法替尼均被发现在 TSC 类器官模型中可减小块茎大小<sup>[75-77]</sup>。MECP2 敲除的人脑皮层类器官被应用于多种 RTT 的药物筛选, 其中奈非西坦与化合物 PHA543613 可有效改善 RTT 人脑类器官中突触的病理学缺陷<sup>[41]</sup>, 同时 P53 通路抑制剂 Pifithrin- $\alpha$  可以有效拮抗 RTT 脑类器官中 P53 通路的异常激活, 并挽救异常的神经元电生理缺陷及神经网络功能障碍<sup>[78]</sup>。对 *Shank3* 缺陷小鼠开发的小分子化合物 OICR-9249 可改善神经前体细胞的异常休眠, 这一效果也在人类 iPSC 来源的神经前体细胞模型中得到了验证<sup>[79]</sup>。但目前针对孤独症相关神经发育缺陷的人脑类器官药物筛选还仅限于综合征型或有特定基因突变的孤独症, 目前仍未有报道针对无基因突变的先天特发孤独症的脑类器官药物筛选, 主要原因在于其致病机制尚未明确, 难以发掘共同的治疗靶点。

但仍需指出的是, 目前的孤独症脑类器官模型还存在一些不足。单一脑区的类器官常常无法反映出孤独症疾病进程中多脑区间的互作以及大脑的全局变化。目前多个研究组已报道的双脑区融合类组装体可以在一定程度上模拟不同脑区间神经细胞间的互作及环路, 如皮层/丘脑、皮层/纹状体等<sup>[48,80]</sup>,

是十分有前景的疾病与药物研究平台。另外, 人脑类器官中缺少血管结构, 随着发育过程中体积的增大, 外部的营养成分难以进入其内部、内部的代谢产物难以及时排出, 限制了其长期培养<sup>[81]</sup>。对脑类器官长期培养的研究表明<sup>[82]</sup>, 培养 250~300 天的皮层类器官可模拟出生后早期的神经发育情况, 但再延长培养时间也无法继续模拟更后期的脑发育<sup>[82]</sup>, 此外, 孤独症中神经炎症的存在被广泛报道, 但神经外胚层谱系分化的脑类器官难以自发产生中胚层来源的小胶质细胞, 极大地限制了其应用<sup>[83]</sup>。目前已有报道构建了包含小胶质细胞的脑类器官<sup>[84-85]</sup>, 这一包含免疫细胞的脑类器官模型推动了脑类器官技术的成熟。最后, 孤独症是以社交障碍和刻板重复行为为核心症状的发育疾病, 脑类器官模型作为体外培养的发育模型无法进行动物行为学等研究。目前已经有研究组通过将脑类器官活体移植到动物的特定脑区并进行长期培养, 以构建人-动物嵌合脑<sup>[86]</sup>并探究在体培养的脑类器官变化及对动物行为的影响<sup>[86]</sup>。总而言之, 目前脑类器官已经较为广泛地应用到孤独症研究中, 并且在对细胞表型、分子机制以及诊疗靶点的研究中取得了诸多成果。相信未来随着脑类器官技术的更新, 更成熟、“逼真”的脑类器官一定会不断推动孤独症研究, 并最终造福广大的患者及其家庭。

## 参考文献 (References)

- [1] LORD C, BRUGH T S, CHARMAN T, et al. Autism spectrum disorder [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 5.
- [2] LAI M C, LOMBARDO M V, BARON-COHEN S. Autism [J]. Lancet, 2014, 383(9920): 896-910.
- [3] VORSTMAN J A S, PARR J R, MORENO-DE-LUCA D, et al. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation [J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(6): 362-76.
- [4] FOLSTEIN S E, ROSEN-SHEIDLEY B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder [J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(12): 943-55.
- [5] SINGH S K, EROGLU C. Neuroligins provide molecular links between syndromic and nonsyndromic autism [J]. Sci Signal, 2013, 6(283): re4.
- [6] BRITO A, RUSSO F B, MUOTRI A R, et al. Autism spectrum disorders and disease modeling using stem cells [J]. Cell Tissue Res, 2018, 371(1): 153-60.
- [7] JIANG C C, LIN L S, LONG S, et al. Signalling pathways in autism spectrum disorder: mechanisms and therapeutic implications [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 229.
- [8] MANOLI D S, STATE M W. Autism spectrum disorder genetics and the search for pathological mechanisms [J]. Am J Psychiatry, 2021, 178(1): 30-8.

- [9] BOURGERON T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015, 16(9): 551-63.
- [10] VICIDOMINI C, PONZONI L, LIM D, et al. Pharmacological enhancement of mGlu5 receptors rescues behavioral deficits in SHANK3 knock-out mice [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(5): 689-702.
- [11] ERICKSON C A, DAVENPORT M H, SCHAEFER T L, et al. Fragile X targeted pharmacotherapy: lessons learned and future directions [J]. *J Neurodev Disord*, 2017, 9: 7.
- [12] O' LEARY H M, KAUFMANN W E, BARNES K V, et al. Placebo-controlled crossover assessment of mecamermin for the treatment of Rett syndrome [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2018, 5(3): 323-32.
- [13] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7.
- [14] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [15] SCHAFER S T, PAQUOLA A C M, STERN S, et al. Pathological priming causes developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(2): 243-55.
- [16] MARCHETTO M C, BELINSON H, TIAN Y, et al. Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(6): 820-35.
- [17] AVIOR Y, SAGI I, BENVENISTY N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(3): 170-82.
- [18] 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(Pt 24): 4332-44.
- [19] ZHANG S C, WERNIG M, DUNCAN I D, et al. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(12): 1129-33.
- [20] WATANABE K, KAMIYA D, NISHIYAMA A, et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(3): 288-96.
- [21] LANCASTER M A, RENNER M, MARTIN C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-9.
- [22] SWINGLER M, DONADONI M, BELLIZZI A, et al. iPSC-derived three-dimensional brain organoid models and neurotropic viral infections [J]. *J Neurovirol*, 2023, 29(2): 121-34.
- [23] WANG L, OWUSU-HAMMOND C, SIEVERT D, et al. Stem cell-based organoid models of neurodevelopmental disorders [J]. *Biol Psychiatry*, 2023, 93(7): 622-31.
- [24] RABOT J, RØDGAARD E M, JOOBER R, et al. Genesis, modelling and methodological remedies to autism heterogeneity [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2023, 150: 105201.
- [25] NIU W, SICILIANO B, WEN Z. Modeling tuberous sclerosis complex with human induced pluripotent stem cells [J]. *World J Pediatr*, 2022, doi: 10.1007/s12519-022-00576-8.
- [26] EICHMÜLLER O L, CORSINI N S, VÉRTESY Á, et al. Amplification of human interneuron progenitors promotes brain tumors and neurological defects [J]. *Science*, 2022, 375(6579): eabf5546.
- [27] ALSAQATI M, HEINE V M, HARWOOD A J. Pharmacological intervention to restore connectivity deficits of neuronal networks derived from ASD patient iPSC with a TSC2 mutation [J]. *Mol Autism*, 2020, 11(1): 80.
- [28] DOOVES S, VAN VELTHOVEN A J H, SUCIATI L G, et al. Neuron-glia interactions in tuberous sclerosis complex affect the synaptic balance in 2D and organoid cultures [J]. *Cells*, 2021, 10(1): 134.
- [29] BLAIR J D, HOCKEMEYER D, BATEUP H S. Genetically engineered human cortical spheroid models of tuberous sclerosis [J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1568-78.
- [30] RICHTER J D, ZHAO X. The molecular biology of FMRP: new insights into fragile X syndrome [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2021, 22(4): 209-22.
- [31] SIDOROV M S, AUERBACH B D, BEAR M F. Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity [J]. *Mol Brain*, 2013, 6: 15.
- [32] BROUWER J R, MIENTJES E J, BAKKER C E, et al. Elevated Fmr1 mRNA levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragile X full mutation [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(2): 244-53.
- [33] KANG Y, ZHOU Y, LI Y, et al. A human forebrain organoid model of fragile X syndrome exhibits altered neurogenesis and highlights new treatment strategies [J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(10): 1377-91.
- [34] RAJ N, MCEACHIN Z T, HAROUSSEAU W, et al. Cell-type-specific profiling of human cellular models of fragile X syndrome reveal PI3K-dependent defects in translation and neurogenesis [J]. *Cell Rep*, 2021, 35(2): 108991.
- [35] BRIGHI C, SALARIS F, SOLOPERTO A, et al. Novel fragile X syndrome 2D and 3D brain models based on human isogenic FMRP-KO iPSCs [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5): 498.
- [36] CHAHROUR M, ZOGHBI H Y. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology [J]. *Neuron*, 2007, 56(3): 422-37.
- [37] ACHARYA P, CHOI N Y, SHRESTHA S, et al. Brain organoids: a revolutionary tool for modeling neurological disorders and development of therapeutics [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2024, 121(2): 489-506.
- [38] MARTÍNEZ DE PAZ A, KHAJAVI L, MARTIN H, et al. MeCP2-E1 isoform is a dynamically expressed, weakly DNA-bound protein with different protein and DNA interactions compared to MeCP2-E2 [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2019, 12(1): 63.
- [39] MELLIOS N, FELDMAN D A, SHERIDAN S D, et al. MeCP2-regulated miRNAs control early human neurogenesis through differential effects on ERK and AKT signaling [J]. *Mol Psychiatry*, 2018, 23(4): 1051-65.
- [40] GOMES A R, FERNANDES T G, VAZ S H, et al. Modeling rett syndrome with human patient-specific forebrain organoids [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 610427.
- [41] TRUJILLO C A, ADAMS J W, NEGRAES P D, et al. Pharmacological reversal of synaptic and network pathology in human MECP2-KO neurons and cortical organoids [J]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(1): e12523.
- [42] SEN D, VOULGAROPOULOS A, DROBNA Z, et al. Human cerebral organoids reveal early spatiotemporal dynamics and

- pharmacological responses of UBE3A [J]. *Stem Cell Rep*, 2020, 15(4): 845-54.
- [43] SUN A X, YUAN Q, FUKUDA M, et al. Potassium channel dysfunction in human neuronal models of Angelman syndrome [J]. *Science*, 2019, 366(6472): 1486-92.
- [44] ZINKSTOK J R, BOOT E, BASSETT A S, et al. Neurobiological perspective of 22q11.2 deletion syndrome [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(11): 951-60.
- [45] KHAN T A, REVAH O, GORDON A, et al. Neuronal defects in a human cellular model of 22q11.2 deletion syndrome [J]. *Nat Med*, 2020, 26(12): 1888-98.
- [46] BADING H. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(9): 593-608.
- [47] BIREY F, LI M Y, GORDON A, et al. Dissecting the molecular basis of human interneuron migration in forebrain assembloids from Timothy syndrome [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(2): 248-64.e7.
- [48] MIURA Y, LI M Y, BIREY F, et al. Generation of human striatal organoids and cortico-striatal assembloids from human pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(12): 1421-30.
- [49] MARIANI J, COPPOLA G, ZHANG P, et al. FOXG1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders [J]. *Cell*, 2015, 162(2): 375-90.
- [50] JOURDON A, WU F, MARIANI J, et al. Modeling idiopathic autism in forebrain organoids reveals an imbalance of excitatory cortical neuron subtypes during early neurogenesis [J]. *Nat Neurosci*, 2023, 26(9): 1505-15.
- [51] QIAN X, NGUYEN H N, SONG M M, et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure [J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1238-54.
- [52] PAULSEN B, VELASCO S, KEDAIGLE A J, et al. Autism genes converge on asynchronous development of shared neuron classes [J]. *Nature*, 2022, 602(7896): 268-73.
- [53] LI C, FLECK J S, MARTINS-COSTA C, et al. Single-cell brain organoid screening identifies developmental defects in autism [J]. *Nature*, 2023, 621(7978): 373-80.
- [54] MENG X, YAO D, IMAIZUMI K, et al. Assembloid CRISPR screens reveal impact of disease genes in human neurodevelopment [J]. *Nature*, 2023, 622(7982): 359-66.
- [55] BIRTELE M, DEL DOSSO A, XU T, et al. Non-synaptic function of the autism spectrum disorder-associated gene SYNGAP1 in cortical neurogenesis [J]. *Nat Neurosci*, 2023, 26(12): 2090-103.
- [56] EICHMÜLLER O L, KNOBLICH J A. Human cerebral organoids: a new tool for clinical neurology research [J]. *Nat Rev Neurol*, 2022, 18(11): 661-80.
- [57] NAWATHE A, DOHERTY J, PANDYA P. Fetal microcephaly [J]. *BMJ*, 2018, 361: k2232.
- [58] WANG L, LI Z, SIEVERT D, et al. Loss of NARS1 impairs progenitor proliferation in cortical brain organoids and leads to microcephaly [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4038.
- [59] GABRIEL E, WASON A, RAMANI A, et al. CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool [J]. *EMBO J*, 2016, 35(8): 803-19.
- [60] ZHANG W, YANG S L, YANG M, et al. Modeling microcephaly with cerebral organoids reveals a WDR62-CEP170-KIF2A pathway promoting cilium disassembly in neural progenitors [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2612.
- [61] CALVET G, AGUIAR R S, MELO A S O, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(6): 653-60.
- [62] 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(7606): 267-71.
- [63] TANG H, HAMMACK C, OGDEN S C, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(5): 587-90.
- [64] YOON K J, SONG G, QIAN X, et al. Zika-virus-encoded NS2A disrupts mammalian cortical neurogenesis by degrading adherens junction proteins [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(3): 349-58.e6.
- [65] BARNARD-BRAK L, SULAK T, HATZ J K. Macrocephaly in children with autism spectrum disorders [J]. *Pediatr Neurol*, 2011, 44(2): 97-100.
- [66] ZHOU Y, KAISER T, MONTEIRO P, et al. Mice with Shank3 mutations associated with ASD and schizophrenia display both shared and distinct defects [J]. *Neuron*, 2016, 89(1): 147-62.
- [67] MONTEIRO P, FENG G. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(3): 147-57.
- [68] WANG Y, CHIOLA S, YANG G, et al. Modeling human telencephalic development and autism-associated SHANK3 deficiency using organoids generated from single neural rosettes [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5688.
- [69] BERNIER R, GOLZIO C, XIONG B, et al. Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development [J]. *Cell*, 2014, 158(2): 263-76.
- [70] WANG P, MOKHTARI R, PEDROSA E, et al. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in cerebral organoids derived from iPS cells [J]. *Mol Autism*, 2017, 8: 11.
- [71] DE JONG J O, LLAPASHTICA C, GENESTINE M, et al. Cortical overgrowth in a preclinical forebrain organoid model of CNTNAP2-associated autism spectrum disorder [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4087.
- [72] ANDERSON G R, GALFIN T, XU W, et al. Candidate autism gene screen identifies critical role for cell-adhesion molecule CASPR2 in dendritic arborization and spine development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(44): 18120-5.
- [73] PEÑAGARIKANO O, ABRAHAMS B S, HERMAN E I, et al. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits [J]. *Cell*, 2011, 147(1): 235-46.
- [74] MARTON R M, PAŞCA S P. Organoid and assembloid technologies for investigating cellular crosstalk in human brain development and disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(2): 133-43.
- [75] WIND S, SCHNELL D, EBNER T, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of afatinib [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2017, 56(3): 235-50.
- [76] FRANZ D N, BELOUSOVA E, SPARAGANA S, et al. Everolimus for subependymal giant cell astrocytoma in patients with tuberous sclerosis complex: 2-year open-label extension of the randomised EXIST-1 study [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(13): 1513-20.
- [77] RABELING A, GOOLAM M. Cerebral organoids as an *in vitro*

- model to study autism spectrum disorders [J]. *Gene Therapy*, 2023, 30(9): 659-69.
- [78] SAMARASINGHE R A, MIRANDA O A, BUTH J E, et al. Identification of neural oscillations and epileptiform changes in human brain organoids [J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(10): 1488-500.
- [79] KIM H, CHO B, PARK H, et al. Dormant state of quiescent neural stem cells links Shank3 mutation to autism development [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(6): 2751-65.
- [80] XIANG Y, TANAKA Y, CAKIR B, et al. hESC-derived thalamic organoids form reciprocal projections when fused with cortical organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(3): 487-97, e7.
- [81] SALEWSKI K, PENNINGER J M. Blood vessel organoids for development and disease [J]. *Circ Res*, 2023, 132(4): 498-510.
- [82] GORDON A, YOON S J, TRAN S S, et al. Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions [J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(3): 331-42.
- [83] ZHANG W, JIANG J, XU Z, et al. Microglia-containing human brain organoids for the study of brain development and pathology [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28(1): 96-107.
- [84] PARK D S, KOZAKI T, TIWARI S K, et al. iPS-cell-derived microglia promote brain organoid maturation via cholesterol transfer [J]. *Nature*, 2023, 623(7986): 397-405.
- [85] SCHAFER S T, MANSOUR A A, SCHLACHETZKI J C M, et al. An *in vivo* neuroimmune organoid model to study human microglia phenotypes [J]. *Cell*, 2023, 186(10): 2111-26, e20.
- [86] CHEN H I, WOLF J A, BLUE R, et al. Transplantation of human brain organoids: revisiting the science and ethics of brain chimeras [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(4): 462-72.