

DOI: 10.13376/j.cbls/2024096

文章编号: 1004-0374(2024)07-0943-08

人诱导多能干细胞来源的小胶质样细胞模型优化及其在阿尔茨海默症研究中的应用

李颖, 魏子巍, 钱欣, 丁红群, 刘思雨, 赵君瑜, 张维宁*

(江苏大学医学院, 镇江 212013)

摘要: 在过去的二十年中, 人诱导多能干细胞在体外研究人类神经发育机制、疾病建模和药物发现等领域应用广泛, 特别是在神经退行性疾病领域。相比于其他研究模型, 以诱导多能干细胞衍生的小胶质细胞为基础的体外模型更有利于研究阿尔茨海默症背后的病理机制。然而, 不同来源的诱导多功能干细胞在分化潜能、表观遗传状态等方面差异较大, 其体外分化能力易受重编程方法和培养体系影响。因此, 本文综述了近年来人诱导多能干细胞来源的小胶质样细胞模型的发展现状及其在阿尔茨海默症研究中的应用, 希望能为今后小胶质细胞的研究提供有效参考。

关键词: 人诱导多功能干细胞; 小胶质细胞; 阿尔茨海默症

中图分类号: Q813; R741 文献标志码: A

Optimization of human induced pluripotent stem cell-derived microglia-like cell model and its application in the study of Alzheimer's disease

LI Ying, WEI Zi-Wei, QIAN Xin, DING Hong-Qun, LIU Si-Yu, ZHAO Jun-Yu, ZHANG Wei-Ning*

(School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Over the past two decades, human induced pluripotent stem cells have been widely used for *in vitro* studies of human neurodevelopmental mechanisms, disease modeling, and drug discovery, especially in the field of neurodegenerative diseases. Compared to other research models, *in vitro* models based on induced pluripotent stem cell-induced microglia-like cells are more favorable for studying the pathological mechanisms behind Alzheimer's disease. However, induced multifunctional stem cells from different sources vary widely in differentiation potential and epigenetic status, and their *in vitro* differentiation ability is susceptible to reprogramming methods and culture systems. Therefore, this paper reviews the current development of microglia-like cell models derived from human induced pluripotent stem cells and their applications in Alzheimer's disease research in recent years, hoping to provide an effective reference for future microglia research.

Key words: human-induced pluripotent stem cells; microglia; Alzheimer's disease

1 阿尔茨海默症中小胶质细胞异常

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病, 其发病机制较为复杂, 典型的病理特征有脑萎缩、 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 沉积、Tau 蛋白异常聚集、部分突触和神经元丢失等。截至 2021 年^[1], 我国 60 岁以上人群中 AD 患者高达 983 万例, 预计到 2050 年, 我国 AD

患者将超过 3 000 万人。目前多数新药研发以 A β 斑块为导向, 通过抑制 A β 沉积或抑制 γ -分泌酶和 β -分泌酶来降低脑内 A β 的生成, 但这些治疗策略在临床试验中均以失败告终。近 20 年来, 美国 FDA

收稿日期: 2024-03-21; 修回日期: 2024-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(81671053)

*通信作者: E-mail: wnzhang@ujs.edu.cn

仅批准 6 个 AD 治疗药物^[2], 即他克林、多奈哌齐、卡巴拉汀、加兰他敏、美金刚和美金刚多奈哌齐复方制剂, 其中他克林由于肝脏毒性较强, 会导致急性肝损伤, 现已退市。这些药物只能在 6~12 个月内改善认知功能低下等症, 不能阻止 AD 进一步发展。为探求更有效的早期诊断及治疗方案, 研究人员将目光投向其他治疗靶点, 如小胶质细胞^[3]。

在 AD 发生发展过程中, 小胶质细胞既发挥神经保护作用, 又有神经毒性作用。一方面, A β 斑块负担增加会激活小胶质细胞, 引发炎症小胶质细胞增生, 通过多种信号通路发挥细胞吞噬作用, 来清除 A β 斑块和受损细胞, 保护神经元; 另一方面, 小胶质细胞表面受体与 A β 斑块相互作用, 促使细胞释放促炎因子、趋化因子和神经毒素等有害物质, 影响其吞噬作用, 导致 A β 进一步累积与播散。人类全基因组关联研究的结果表明, 小胶质细胞特异性表达或高度表达的基因附近存在超过 25 个与 AD 风险密切相关的基因^[4-5], 包括载脂蛋白 E (apolipoprotein E, *ApoE*)、髓细胞受体 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells-2, *TREM2*) 等^[6]。同时, Claes 等^[7] 利用基因编辑技术构建 *TREM2*^{+R47H}、*TREM2*^{+/-} 和 *TREM2*^{-/-} 突变型人诱导多功能干细胞 (human pluripotent stem cells, hiPSCs), 发现其衍生的小胶质细胞 (human induced microglia-like cells, iMGL) 中 *TREM2* 的突变会损伤其清除异常聚集淀粉样蛋白的能力, 据此推测小胶质细胞病变会增加 AD 的病发率。随着对 AD 病理机制的深入研究, 小胶质细胞的相关基因和信号转导通路在 AD 病理机制中的作用受到越来越多的重视, 特别是在目前以 A β 蛋白和 Tau 蛋白为靶点的治疗方案效果不佳的情况下, 基于小胶质细胞的靶向治疗研究明显增多。

AD 的疾病机制非常复杂, 许多临床试验不仅在时间、空间上都存在局限性, 而且在伦理上也受到极大限制, 因此需要借助动物模型进行间接研究。其中使用较多的是啮齿类动物模型, 可模拟 AD 患者脑组织的病理变化及行为特征, 以便探索新的治疗方案, 如在 BV2 细胞与 AD 小鼠模型中引入光敏通道蛋白^[8], 发现在光刺激下小胶质细胞形态发生改变且其清除淀粉样蛋白的能力增强, 为清除蛋白聚集物而不丢失突触提供了一种潜在治疗策略。目前应用较多的模型有自然衰老认知障碍 AD 模型、快速老化小鼠模型、D-半乳糖诱导的亚急性衰老模型和各类转基因 AD 模型。但相关研究结果还有待在人源性细胞中进一步验证, 因为啮齿类动物和人

类的小胶质细胞在细胞特性、蛋白表达等方面存在难以忽视的差异。部分人类小胶质细胞的关键免疫基因在小鼠模型中均未表达或表达量较低, 而且人类和啮齿类动物的小胶质细胞的免疫代谢方式也有较大差异^[9]。此外, 对比神经退行性疾病患者和 AD 小鼠的小胶质细胞基因表达谱发现, 人类和啮齿类动物仅有小部分基因表达是重叠的^[10-11]。由此可见, 啮齿类动物模型在研究人类神经退行性疾病方面有一定局限性, 利用 AD 动物模型展开的研究, 很可能出现与体外实验截然不同的结果。因此, 建立新型小胶质细胞体外研究模型对 AD 及其他人类神经退行性疾病有重要意义。

2 小胶质细胞特性与体外研究模型

小胶质细胞是大脑中驻留的巨噬细胞^[12], 起源于胚胎期卵黄囊产生的骨髓祖细胞, 在产前早期定植于中枢神经系统, 占中枢神经系统全部胶质细胞的 5%~20%。小胶质细胞作为中枢神经系统中重要的免疫细胞, 通过一组独特的蛋白质不断扫描周围环境, 检测细胞碎片、传染性病原体、具有病原体相关分子模式和损伤相关分子模式的生物大分子。在早期发育中小胶质细胞还能通过释放胰岛素生长因子 1 等物质促进神经元存活、调节神经元兴奋性^[13], 同时也能对兴奋性和抑制性突触进行重塑, 在发育期通过 *TREM2* 信号调节突触活动, 清除受损或功能较弱的突触以形成神经环路。表达 B 型 γ -氨基丁酸受体的小胶质细胞会选择性地修剪抑制性突触^[14], 这一功能的异常所导致的发育期障碍可能会引起成年多动症。

小胶质细胞传统表型为静息态 (M0 型) 和激活态 (M1、M2 型), 随着相关研究的深入, 这种简单的分类不足以阐明不同脑区或不同疾病影响下小胶质细胞的状态^[15]。转录组学和蛋白质组学的迅速发展使得研究人员能够深入了解小胶质细胞在不同刺激下表现出的形态和功能差异, 从而进一步丰富小胶质细胞谱系结构。现已发现许多小胶质细胞新亚型, 其中与 AD 相关的有疾病相关小胶质细胞 (disease-associated microglia, DAM) 和斑块相关小胶质细胞 (plaque-associated microglia, PAM) 等。随着单细胞转录组技术的迅速发展, 通过分析胎儿组织中的小胶质细胞发现其表达的基因多种多样, 根据小胶质细胞表达的不同基因可将其分为 16 个亚群^[16-17], 其中几种亚群种富集了神经退行性疾病相关基因和 RNA 标记^[18]。这 16 种亚群的共性是均表达小胶质

细胞标记物集落刺激因子-1受体(colony-stimulating factor 1 receptor, CSF-1R)、基序趋化因子受体1(chemokine receptor 1, CX3CR1)以及与神经退行性疾病相关的基因,表明在人类胎儿的早期,小胶质细胞就已经出现激活态^[17]。同时也有研究通过单细胞RNA测序技术分析人类大脑皮层样本,将成年人小胶质细胞分为9个不同的细胞簇,其中几个细胞簇富集了与神经退行性疾病相关的基因,并与AD的病理和临床特征有不同关联^[19]:细胞簇4富集多发性硬化疾病相关基因;细胞簇5和6富集大量疾病诊断相关基因,包括AD和神经血管疾病;细胞簇7中富集的疾病相关基因最多,包括AD、炎症性脱髓鞘和缺血。

研究小胶质细胞的体外模型主要有原代小胶质细胞、永生化小胶质细胞系、诱导型小胶质样细胞、共培养模型和3D脑类器官。人原代小胶质细胞主要从死后脑组织中分离,虽更接近于体内情况,具有更高的生物学真实性,但来源稀缺。离体培养的小胶质细胞可能出现异常表型^[19-20],稳定性较差且不具备自我更新能力,不适合长期培养。对原代细胞进行基因改造或病毒感染可构建永生化小胶质细胞系。这种细胞系更容易获得,具有自我更新能力,体外培养时能响应趋化因子和炎症刺激并表达小胶质细胞激活标志物。但和原代小胶质细胞相比,其胞内特异性基因表达下调或缺失,无法再现遗传和衰老人类疾病的表现遗传特性。而iMGL具有易获得、体外培养时可无限增殖且能反映个体遗传特性等优势,是小胶质细胞及AD研究的新工具。

3 多功能干细胞诱导分化的小胶质细胞

人胚胎干细胞系建立于1998年,受限于稀缺的细胞来源、无法避免伦理争议以及免疫排斥等问题,该领域进展缓慢。hiPSCs研究肇始于2007年^[21],其在细胞形态、特性等方面与人胚胎干细胞极其相似。hiPSCs具有自我更新、高度分化等特性,为获得患者特异性体细胞提供了新渠道^[22-23],现已成为研究人类早期发育机制^[24-26]和开发新型细胞疗法^[27]最适合的细胞来源。一经发现,hiPSCs立刻在国际上掀起研究热潮,历经17年的发展,不仅为探索细胞治疗方案提供了新的视角,也为破译大量疾病的病理机制和开发治疗手段提供了新的启示。然而,在临床应用中,hiPSCs面临成瘤性、免疫原性、异质性等挑战,从体细胞的选择、重编程到体外培养,每一环节都存在导致hiPSCs变异的风险^[28],在研

究过程中难以维持hiPSCs的多能性及其衍生细胞的稳定性。近年来,新方法、新技术层出不穷,hiPSCs研究在体细胞选择、重编程技术及体外培养等方面有了极大进步。

与原代细胞和小胶质细胞系相比,iMGL不仅易获得,还具备自我更新能力,能反映个体遗传特性。与此同时,用常规方法难以向小胶质细胞中递送基因,故其基因编辑效率极低,无法有针对性地构建疾病模型。而iMGL的出现解决了这一问题,研究人员可根据实验目的先对hiPSCs进行基因编辑^[29-30],随后将hiPSCs诱导为iMGL,以构建新的研究模型^[40-41],便于剖析疾病的病理机制^[31-32]。

在iMGL诱导技术成熟前,诱导型小胶质细胞的主要来源是外周血单个核细胞^[33]。在单个核细胞培养基中添加白细胞介素34(interleukin-34, IL-34)和集落刺激因子1(colony-stimulating factor 1, CSF-1),10天后就能得到小胶质样细胞。不同来源的诱导型小胶质细胞均能分泌细胞因子、修剪突触、表达小胶质细胞特异性标志物,并且能够吞噬异常聚集的蛋白质、受损的神经元和突触。对比两种来源的小胶质细胞发现,iMGL与胎儿或出生后早期的人小胶质细胞非常相似^[34],能表征个体特异性遗传信息,也能诱导出炎症相关基因突变的受试者特异性的小胶质样细胞。而单核细胞来源的小胶质细胞诱导程序简单,更适合药物筛选研究。

4 hiPSCs诱导小胶质细胞技术优化进展

hiPSCs的诞生为小胶质细胞模型开发提供新的方向,但早期有关小胶质细胞起源的研究并不深入,因而iMGL技术直到2017年才得以实现^[35]。如图1所示,可用多种方式对hiPSCs进行诱导获得iMGL^[36],在此基础上建立各种研究模型,包括单细胞模型、共培养模型、类器官模型等。

最早的诱导方案是先将hiPSCs诱导为卵黄囊拟胚体(embryoid bodies, EBs)^[37]。在hiPSCs的无血清培养基中添加IL-34和CSF-1,两周后可检测到细胞表达早期卵黄囊骨髓形成标志物,表明已成功生成EBs。随后将培养物转移至低附着培养皿中继续培养,一个月后将出现一种半贴壁细胞,不仅呈高度运动形态且大量表达造血转录因子和同种异体炎症因子,证明成功诱导出iMGL。通过这种方案获得的iMGL和人体内小胶质细胞高度相似,但耗时久且效率低,不适合大规模制备小胶质细胞。

研究人员对上述诱导方案进行改进,利用碱性

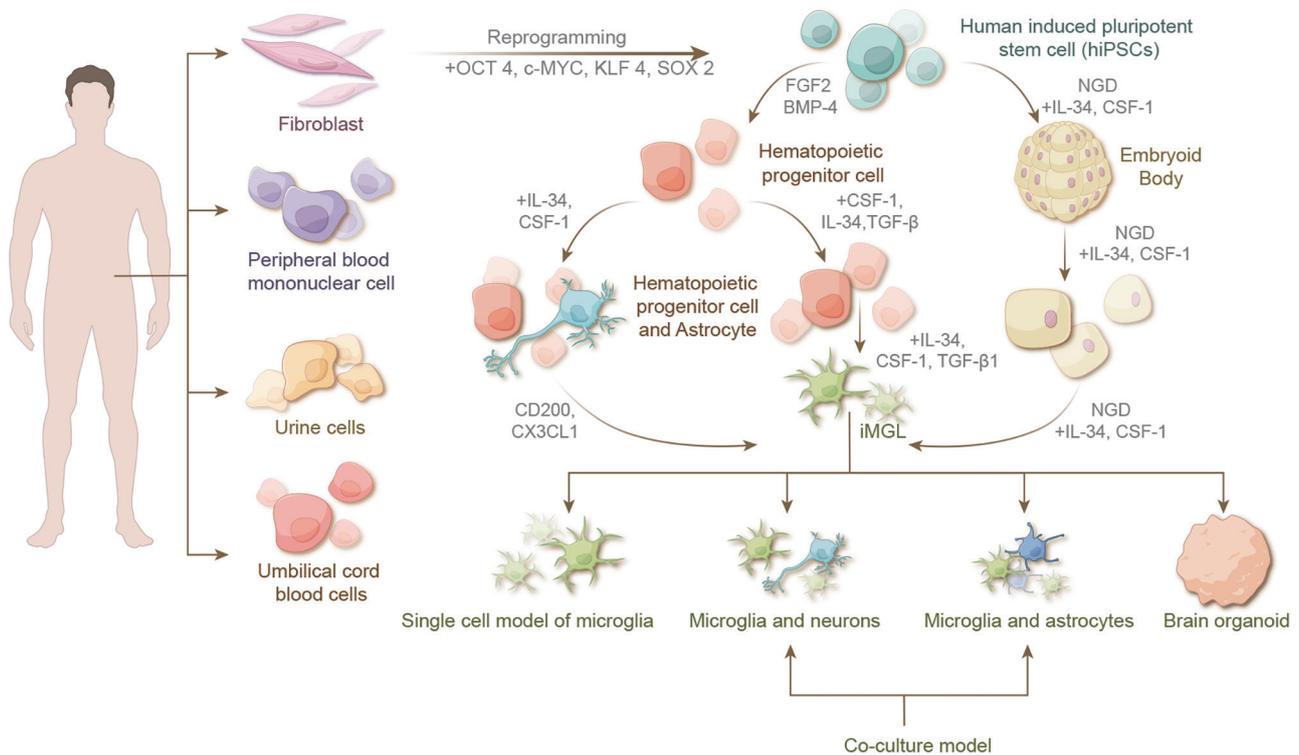


图1 iMGL的不同诱导方式及iMGL体外研究模型

成纤维细胞生长因子 2 (basic fibroblast growth factor-2, bFGF-2) 和骨形态发生蛋白 4 (bone morphogenetic protein-4, BMP-4) 刺激 hiPSCs, 将其诱导为造血祖细胞, 耗时 5 周; 接着用流式细胞术从中分选 CD34⁺ 细胞, 在培养体系中添加 CSF-1、IL-34 和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β), 培养 3 周后再加入糖蛋白和趋化因子, 3 天后可收获成熟的 iMGL, 整个分化过程需 40 天。这种方案获得的 iMGL 具有与人胎儿和成人脑源性初级小胶质细胞高度相似的基因表达谱^[35, 39]。不足之处是在分化过程中需要多次调节培养环境的氧浓度, 对设备要求较高且操作较繁琐。而将造血祖细胞和星形胶质细胞共培养, 可模拟中枢神经系统周围的胶质细胞环境^[40], hiPSCs 在这种培养环境中可分化为 iMGL。先在 hiPSCs 培养基中添加血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、BMP4、干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 和激活素 A, 4 天后补充 FMS 样酪氨酸激酶 (FMS-like tyrosine kinase 3, Flt3)、IL-3、IL-6、CSF-1, 培养两周后细胞开始表达骨髓祖细胞标志物——CD34 和 CD43。此时在培养基中加入人源性星形胶质细胞, 并添加 CSF-1 和 IL-3, 两周后可获得 iMGL。这种 iMGL 同样具有和胎儿小胶质细胞相似的髓系表达谱系。

共培养方案不需要改变氧浓度, 在实验室内可行性更高。

以往 iMGL 诱导方案大多数耗时长, 最短也需 25 天左右^[41]。针对这一问题, Dräger 等^[42] 开创了一种更加高效的方法, 他们筛选出 6 种在小胶质细胞中高表达的转录因子: 造血转录因子、MAF 转录因子 B、CCAAT 增强子结合蛋白 α 、CCAAT 增强子结合蛋白 β 、干扰素调节因子 5 和干扰素调节因子 8。在 hiPSCs 中过表达这 6 种转录因子, 2~3 周后可获得一定量的 iMGL。这种新型的方法不涉及流式细胞分选或共培养操作, 简化了 iMGL 的生产流程, 但生成的 iMGL 在基因表达水平上也和其他方案获得的 iMGL 存在一定差异。

5 不同iMGL研究模型的应用

5.1 单细胞模型

单一细胞模型是最简单的体外模型, 只需将 hiPSCs 诱导为 iMGL (图 2), 随后在培养基中添加不同物质, 来探究人类小胶质细胞的特性以及 AD 病理状态下小胶质细胞的变化^[43], 以便于进一步探索 AD 治疗新靶点。van Lengerich 等^[44] 利用 iMGL 单细胞模型发现一种能够激活 TREM2 受体的抗体——ATV:TREM2, 单细胞 RNA 测序和形态测定

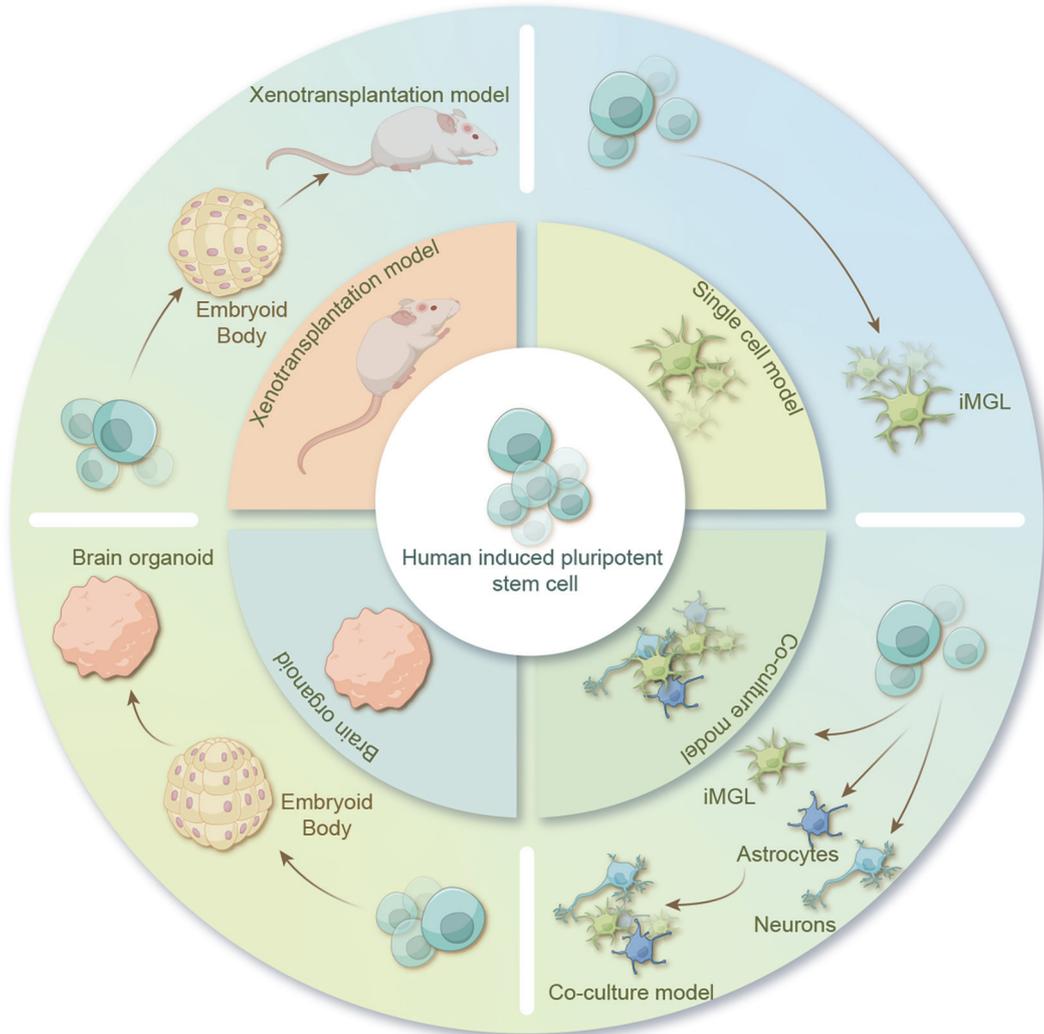


图2 iMGL单细胞模型、共培养模型、脑类器官、嵌合鼠模型的构建流程

表明, ATV:TREM2 可以激活 TREM2 受体, 并诱导小胶质细胞增殖、促进细胞代谢, 从而改善小胶质细胞功能, 研究人员推测这可能是治疗 AD 患者脑低代谢的新靶点。此外, iMGL 单细胞模型的构建还利于细胞信号通路的探索, iMGL 能通过 CXCL16-CXCR6 信号通路招募具有免疫抑制性的 CD8⁺ T 细胞, 这些 CD8⁺ T 细胞能抑制小胶质细胞介导的炎症反应, 一定程度上缓解了 AD 病理进程^[45]。

iMGL 单细胞模型应用广泛, 但体外单一培养环境极可能导致小胶质细胞表面标记物异常表达^[46]。此外, 在中枢神经系统中, 其他神经细胞向小胶质细胞传递信号, 促进小胶质细胞的成熟, 而单一培养环境无法满足这一点, 因此 iMGL 单细胞模型和体内小胶质细胞存在一定差异^[47-48]。

5.2 共培养模型

常见的共培养模型有小胶质细胞与星形胶质细

胞、小胶质细胞与神经元(图2)。共培养模型可用于观察细胞之间或细胞与其周围微环境之间的相互作用, 可分为直接接触共培养模型和间接接触共培养模型。直接接触共培养是指将两种或两种以上的细胞按一定比例混合并在特定条件下接种在同一培养皿中。此外, 还可以在共培养系统中添加额外的调节因子, 如免疫细胞因子, 以研究细胞间相互作用。间接接触共培养是培养两种或两种以上不同的细胞类型, 使细胞通过培养基内的化学因子相互作用, 而没有物理直接接触。

共培养时, iMGL 具备单细胞模式下缺乏的部分表型特征, 便于研究细胞间的连接通讯作用。星形胶质细胞的存在有助于提高小胶质细胞的吞噬作用, 相较于单一培养, 共培养体系中细胞内 α -突触核蛋白和 A β 沉积明显减少, 这表明胶质细胞相互作用可缓解 AD 发展过程中的神经炎症^[49]。与神

神经元共培养有助于促进小胶质细胞分化^[33, 50]。在神经元的支持下,成熟的 iMGL 表现出典型的巨噬细胞功能,能够收缩、延伸分支,扩大吞噬突触的范围^[51]。与此同时, iMGL 分泌的因子也可增强体细胞和神经干细胞的多巴胺能分化,促进神经元的成熟^[52],两者之间存在一种相互作用模式。

5.3 脑类器官

2D 细胞培养方法操作简便,经济高效,适用于大规模培养,但无法模拟小胶质细胞在中枢神经系统中的生长状态^[53],可能导致细胞行为与体内差异较大。而在 3D 培养系统中生长时,细胞在基质内、基质上或悬浮培养基中形成聚集体或球体(图 2),其中细胞-细胞相互作用和细胞-基质相互作用更接近体内的自然环境,因此细胞行为特性更接近于生物体内的生存状态。脑类器官是 3D 培养模式下模拟人脑生理特性的最佳工具,满足了小胶质细胞的培养需求^[54],可用来探索小胶质细胞在人脑发育和神经退行性疾病中的作用^[46, 55]。

脑类器官的构建分为引导分化法和非引导分化法。引导分化法是将 hiPSCs 诱导为 EBs,外胚层形成后在培养环境中添加生长因子,诱导 hiPSCs 分化为特定细胞^[56-57],如神经祖细胞、神经元、星形胶质细胞及其他的大脑细胞;非引导分化法依赖于细胞自身的形态发生和内在的分化能力,将外在干扰最小化,得到具有前脑、中脑、后脑、视网膜和脉络丛的类器官。但非引导分化法不如引导法稳定,存在高可变性和异质性问题。

以 hiPSCs 为基础的脑类器官可控性更高,可通过控制原始巨噬细胞祖细胞和原始神经祖细胞的起始细胞量来调节 iMGL 的比例^[35],在更贴近体内生理环境的条件下模拟小胶质细胞在中枢神经系统中的特异性发育过程并揭示人类大脑神经发育异常调控机制,如蒂莫西综合征(Timothy syndrome)中皮层中间神经元切向迁移的异常行为及调控机制^[58]。在脑类器官的支持下,研究人员还发现编码中心体蛋白的基因 *CDK5RAP2* 突变会造成人脑发育障碍,导致患者大脑体积明显减小^[59]。

脑类器官能模拟中枢神经系统中干细胞及其分化细胞的相互作用,但无法呈现器官组织损伤再生状态下的变化。与此同时,由于缺乏循环系统的参与,有限的内部氧气和营养物质不足以支持脑类器官的长期培养,一段时间后内部细胞就会死亡。

5.4 嵌合鼠模型

综上所述,小胶质细胞对周围环境高度敏感,

不论是 2D 细胞模型还是 3D 脑类器官模型,在体外培养时均无法完全重现中枢神经系统环境。近年来,研究人员成功将 hiPSCs 来源的神经细胞或造血细胞移植到免疫缺陷小鼠大脑不同区域中(图 2),开发出携带人源性细胞的嵌合鼠模型^[29, 60]。单细胞 RNA 测序显示,在嵌合大脑中,小胶质细胞遵循确定的发育轨迹并保持人类细胞特征^[61],也保留了小胶质细胞的特异性功能,具有吞噬突触、对免疫刺激做出反应、吞噬神经前体细胞和向伤口迁移的能力。为保证嵌合模型中小胶质细胞的长时间存活,还需补充 CSF1、IL-34 等物质^[60]。

将 hiPSCs 与实验动物相结合构建嵌合鼠模型,不仅能进一步验证体外研究结果的准确性^[62],也为探索体外研究的盲区提供了新工具。将 iMGL 移植入免疫缺陷小鼠的脾后皮质中,发现移植的小胶质细胞表现出 A β 趋化性,随后吞噬 A β 斑块,从而揭示了新的人类特异性 A β 应答基因^[29]。Jin 等^[63]成功在 hiPSCs 中敲低 I 型干扰素受体(interferon receptor, IFNAR),诱导其分化为 iMGL,并在此基础上构建了唐氏综合征(Down syndrome)相关的嵌合鼠模型。在病理性 Tau 蛋白刺激下, iMGL 呈现为干扰素反应性小胶质细胞表型且过度修剪突触,而敲除 *IFNAR* 基因后,这两种表征有所减轻,证明该突变可改善人类小胶质细胞的衰老和营养不良表型。综上,嵌合鼠模型能辅助研究人类细胞如何影响神经回路和动物行为,从分子和细胞到环路和行为水平阐明疾病机制,并测试细胞治疗干预的疗效,提供在体内研究人类小胶质细胞的新思路。

6 展望

通过 hiPSCs 体外诱导技术能够实现 iMGL 的量产, iMGL 具有与成人中枢神经系统中的小胶质细胞高度相似的基因表达谱,可应用于 A β 蛋白和脑源性 Tau 低聚物对 AD 相关基因表达的影响、突触修剪的机制等研究,也能融入复杂的培养条件,建立共培养模型、大脑类器官模型、嵌合鼠模型。随着这些技术的不断完善,使用人类细胞模拟 AD 疾病发生发展的能力将会提高,也为进一步探索散发性 AD 风险基因在 hiPSCs 衍生的脑细胞类型中的功能、家族性 AD 不同类型基因突变对神经细胞间相互作用的影响等问题奠定基础,并提供更好的临床前预测和结果,从而增加转化潜力。

[参 考 文 献]

- [1] The China Alzheimer report 2022. *General Psychiatry*, 2022, 35: 1-19
- [2] van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, et al. Lecanemab in early Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 2023, 388: 9-21
- [3] 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 2023, 19: 1598-695
- [4] Wingo AP, Liu Y, Gerasimov ES, et al. Integrating human brain proteomes with genome-wide association data implicates new proteins in Alzheimer's disease pathogenesis. *Nat Genet*, 2021, 53: 143-6
- [5] Wightman DP, Jansen IE. A genome-wide association study with 1,126,563 individuals identifies new risk loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 2021, 53: 1276-82
- [6] Knupp A, Mishra S, Martinez R, et al. Depletion of the AD risk gene *SORL1* selectively impairs neuronal endosomal traffic independent of amyloidogenic app processing. *Cell Rep*, 2020, 31: 107719
- [7] Claes C, Van den Daele J, Boon R, et al. Human stem cell-derived monocytes and microglia-like cells reveal impaired amyloid plaque clearance upon heterozygous or homozygous loss of *TREM2*. *Alzheimers Dement*, 2019, 15: 453-64
- [8] Lv Z, Chen L, Chen P, et al. Clearance of β -amyloid and synapses by the optogenetic depolarization of microglia is complement selective. *Neuron*, 2024, 112: 740-54.e7
- [9] Sabogal-Guáqueta AM, Marmolejo-Garza A, Trombetta-Lima M, et al. Species-specific metabolic reprogramming in human and mouse microglia during inflammatory pathway induction. *Nat Commun*, 2023, 14: 6454
- [10] Galatro TF, Holtman IR, Lerario AM, et al. Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nat Neurosci*, 2017, 20: 1162-71
- [11] Friedman BA, Srinivasan K, Ayalon G, et al. Diverse brain myeloid expression profiles reveal distinct microglial activation states and aspects of Alzheimer's disease not evident in mouse models. *Cell Rep*, 2018, 22: 832-47
- [12] Gosselin D, Skola D, Coufal NG, et al. An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science*, 2017, 356: eaal3222
- [13] Badimon A, Strasburger HJ, Ayata P, et al. Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature*, 2020, 586: 417-23
- [14] Cao P, Chen C, Liu A, et al. Early-life inflammation promotes depressive symptoms in adolescence via microglial engulfment of dendritic spines. *Neuron*, 2021, 109: 2573-89.e9
- [15] Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, et al. Microglia states and nomenclature: a field at its crossroads. *Neuron*, 2022, 110: 3458-83
- [16] Fügen P, Hefendehl JK, Veeraraghavalu K, et al. Microglia turnover with aging and in an Alzheimer's model via long-term *in vivo* single-cell imaging. *Nat Neurosci*, 2017, 20: 1371-6
- [17] Kracht L, Borggrewe M, Eskandar S, et al. Human fetal microglia acquire homeostatic immune-sensing properties early in development. *Science*, 2020, 369: 530-7
- [18] Olah M, Menon V, Habib N, et al. Single cell RNA sequencing of human microglia uncovers a subset associated with Alzheimer's disease. *Nat Commun*, 2020, 11: 6129
- [19] Kantarci A, Tognoni CM, Yaghmoor W, et al. Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 2020, 10: 18561
- [20] Xu Y, Gao W, Sun Y, et al. New insight on microglia activation in neurodegenerative diseases and therapeutics. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1308345
- [21] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131: 861-72
- [22] Kobayashi GS, Vieira-Silva GA, Varella-Branco E, et al. Generation of four induced pluripotent stem cells lines from PBMC of the DFNA58 family members: two hearing-impaired duplication carriers (USPi006-A e USPi007-A) and two normal-hearing noncarriers (USPi004-A and USPi005-A). *Stem Cell Res*, 2023, 71: 103181
- [23] Wang Y, Fang Y, Wang Y, et al. Establishment of induced pluripotent stem cell lines from an ARVC patient carrying a heterozygous variant in *LAMA2* gene. *Stem Cell Res*, 2023, 66: 102999
- [24] Liu X, Tan JP, Schroder J, et al. Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids. *Nature*, 2021, 591: 627-32
- [25] Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, et al. Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 1016-22
- [26] Yu L, Wei Y, Duan J, et al. Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature*, 2021, 591: 620-6
- [27] Pizzato HA, Alonso-Guallart P, Woods J, et al. Engineering human pluripotent stem cell lines to evade xenogeneic transplantation barriers. *Stem Cell Rep*, 2024, 19: 299-313
- [28] Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges. *Cell Stem Cell*, 2020, 27: 523-31
- [29] Hasselmann J, Coburn MA, England W, et al. Development of a chimeric model to study and manipulate human microglia *in vivo*. *Neuron*, 2019, 103: 1016-33.e10
- [30] Kim MS, Ra EA, Kweon SH, et al. Advanced human iPSC-based preclinical model for Parkinson's disease with optogenetic alpha-synuclein aggregation. *Cell Stem Cell*, 2023, 30: 973-86.e11
- [31] Langston RG, Beilina A, Reed X, et al. Association of a common genetic variant with Parkinson's disease is mediated by microglia. *Sci Transl Med*, 2022, 14: eabp8869
- [32] Eitan C, Siany A, Barkan E, et al. Whole-genome sequencing reveals that variants in the interleukin 18 receptor accessory protein 3'UTR protect against ALS. *Nat Neurosci* 2022, 25: 433-45
- [33] Guttikonda SR, Sikkema L, Tchieu J, et al. Fully defined human pluripotent stem cell-derived microglia and tri-

- culture system model C3 production in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 2021, 24: 343-54
- [34] Lehoux M, Connolly K, Assetta B, et al. The generation and functional characterization of human microglia-like cells derived from iPSC and embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*, 2023, 2683: 69-78
- [35] Abud EM, Ramirez RN, Martinez ES, et al. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*, 2017, 94: 278-93
- [36] Mathews M, Wißfeld J, Flitsch LJ, et al. Reenacting neuroectodermal exposure of hematopoietic progenitors enables scalable production of cryopreservable iPSC-derived human microglia. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19: 455-74
- [37] Haenseler W, Sansom SN, Buchrieser J, et al. A highly efficient human pluripotent stem cell microglia model displays a neuronal-co-culture-specific expression profile and inflammatory response. *Stem Cell Rep*, 2017, 8: 1727-42
- [38] Douvaras P, Sun B, Wang M, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to microglia. *Stem Cell Rep*, 2017, 8: 1516-24
- [39] McQuade A, Coburn M, Tu CH, et al. Development and validation of a simplified method to generate human microglia from pluripotent stem cells. *Mol Neurodegener*, 2018, 13: 67
- [40] Pandya H, Shen MJ, Ichikawa DM, et al. Differentiation of human and murine induced pluripotent stem cells to microglia-like cells. *Nat Neurosci*, 2017, 20: 753-9
- [41] Konttinen H, Cabral-da-Silva MEC, Ohtonen S. *PSEN1* Δ E9, *APP*^{swe}, and *APOE4* confer disparate phenotypes in human iPSC-derived microglia. *Stem Cell Rep*, 2019, 13: 669-83
- [42] Drager NM, Sattler SM, Huang CTL, et al. A CRISPRi/a platform in human iPSC-derived microglia uncovers regulators of disease states. *Nat Neurosci*, 2022, 25: 1149-62
- [43] Li Y, Li Z, Yang M, et al. Decoding the temporal and regional specification of microglia in the developing human brain. *Cell Stem Cell*, 2022, 29: 620-34
- [44] van Lengerich B, Zhan L, Xia D, et al. A TREM2-activating antibody with a blood-brain barrier transport vehicle enhances microglial metabolism in Alzheimer's disease models. *Nat Neurosci*, 2023, 26: 416-29
- [45] Su W, Saravia J, Risch I, et al. CXCR6 orchestrates brain CD8⁺ T cell residency and limits mouse Alzheimer's disease pathology. *Nat Immunol*, 2023, 24: 1735-47
- [46] Schafer ST, Mansour AA, Schlachetzki JCM, et al. An *in vivo* neuroimmune organoid model to study human microglia phenotypes. *Cell*, 2023, 186: 2111-26.e20
- [47] Cooper YA, Teyssier N, Drager NM, et al. Functional regulatory variants implicate distinct transcriptional networks in dementia. *Science*, 2022, 377: eabi8654
- [48] Speicher AM, Wiendl H, Meuth SG, et al. Generating microglia from human pluripotent stem cells: novel *in vitro* models for the study of neurodegeneration. *Mol Neurodegener*, 2019, 14: 46
- [49] Rostami J, Mothes T, Kolahdouzan M, et al. Crosstalk between astrocytes and microglia results in increased degradation of α -synuclein and amyloid- β aggregates. *J Neuroinflammation*, 2021, 18: 124
- [50] Bassil R, Shields K, Granger K, et al. Improved modeling of human AD with an automated culturing platform for iPSC neurons, astrocytes and microglia. *Nat Commun*, 2021, 12: 5220
- [51] Washer SJ, Perez-Alcantara M, Chen Y, et al. Single-cell transcriptomics defines an improved, validated monoculture protocol for differentiation of human iPSC to microglia. *Sci Rep*, 2022, 12: 19454
- [52] Schmidt SI, Bogetofte H, Ritter L, et al. Microglia-secreted factors enhance dopaminergic differentiation of tissue- and iPSC-derived human neural stem cells. *Stem Cell Rep*, 2020, 16: 281-94
- [53] Ormel PR, de Sa RV, van Bodegraven EJ, et al. Microglia innately develop within cerebral organoids. *Nat Commun*, 2018, 9: 4167
- [54] Chhibber T, Bagchi S, Lahooti B, et al. CNS organoids: an innovative tool for neurological disease modeling and drug neurotoxicity screening. *Drug Discov Today*, 2020, 25: 456-65
- [55] Chen X, Sun G, Tian E, et al. Modeling sporadic Alzheimer's disease in human brain organoids under serum exposure. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8: e2101462
- [56] Xu R, Boreland AJ, Li X, et al. Developing human pluripotent stem cell-based cerebral organoids with a controllable microglia ratio for modeling brain development and pathology. *Stem Cell Rep*, 2021, 16: 1923-37
- [57] Park DS, Kozaki T, Tiwari SK, et al. iPSC-cell-derived microglia promote brain organoid maturation via cholesterol transfer. *Nature*, 2023, 623: 397-405
- [58] Birey F, Li MY, Gordon A, et al. Dissecting the molecular basis of human interneuron migration in forebrain assembloids from Timothy syndrome. *Cell Stem Cell*, 2022, 29: 248-64.e7
- [59] Lu X, Yang J, Xiang Y. Modeling human neurodevelopmental diseases with brain organoids. *Cell Regen*, 2022, 11: 1
- [60] Fattorelli N, Martinez-Muriana A, Wolfs L, et al. Stem-cell-derived human microglia transplanted into mouse brain to study human disease. *Nat Protoc*, 2021, 16: 1013-33
- [61] Welberg L. Studying human microglia *in vivo*. *Nat Neurosci*, 2023, 26: 923
- [62] Abud EM, Ramirez RN, Martinez ES, et al. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*, 2017, 94: 278-93.e9
- [63] Jin M, Xu R, Wang L, et al. Type-I-interferon signaling drives microglial dysfunction and senescence in human iPSC models of down syndrome and Alzheimer's disease. *Cell Stem Cell*, 2022, 29: 1135-53.e8