

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230119

· 论 著 ·

## 成人源性甲状腺类器官的构建、鉴定及体外培养方案的优化

盛琪轩, 李蕾, 李伟, 张伟, 王强, 查斯洛, 马冠君, 徐昕昀, 单成祥\*

海军军医大学(第二军医大学)第二附属医院甲乳疝外科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 构建成人源性甲状腺类器官模型, 并优化其体外培养方案。**方法** 选取成人甲状腺乳头状癌(PTC)患者癌旁正常甲状腺组织, 经消化、分离得到甲状腺细胞, 以基质胶包埋细胞, 设计不同甲状腺类器官条件培养基进行培养, 在显微镜下观察第1代和第2代类器官形成效率和出芽情况。采用H-E染色观察类器官模型的组织学形态, 免疫组织化学染色检测类器官模型中甲状腺特异性标志物NK2同源框蛋白1(NKX2.1)、配对盒基因8(PAX8)和甲状腺球蛋白(TG)表达情况, 评估类器官模型与正常甲状腺组织的一致性。采用ELISA法检测类器官模型上清液中甲状腺素(T4)和三碘甲状腺原氨酸(T3)水平, 验证其是否具有激素分泌功能。**结果** 从7例PTC患者的手术标本中成功建立了8例甲状腺类器官模型。在甲状腺类器官培养体系中, 提高Noggin和表皮生长因子浓度及联用多种小分子抑制剂后, 第1代和第2代类器官模型出芽更多、球体更大, 类器官形成效率更高。H-E染色结果显示, 甲状腺类器官模型中可见大量由单层立方上皮细胞围成的滤泡结构, 与人体甲状腺组织结构特征相似。免疫组织化学染色结果显示, 类器官模型中甲状腺标志物NKX2.1、PAX8和TG阳性, 与来源组织生物标志物特征一致。ELISA检测结果显示, 类器官模型上清液中可见T3、T4分泌, 表明其具有甲状腺激素分泌能力。**结论** 采用成人甲状腺组织构建的类器官模型稳定, 为甲状腺功能减退症的再生医学治疗提供了新的方向。

**[关键词]** 类器官; 模型; 甲状腺; 培养; 甲状腺功能减退症

**[引用本文]** 盛琪轩, 李蕾, 李伟, 等. 成人源性甲状腺类器官的构建、鉴定及体外培养方案的优化[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(1): 49-56. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230119.

### Construction, identification, and optimization of *in vitro* culture protocol of adult-derived thyroid organoid model

SHENG Qixuan, LI Lei, LI Wei, ZHANG Wei, WANG Qiang, ZHA Siluo, MA Guanjun, XU Xinyun, SHAN Chengxiang\*

Department of Thyroid, Breast and Hernia Surgery, The Second Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To construct an adult-derived thyroid organoid (ADTO) model and optimize its culture protocol *in vitro*. **Methods** Normal thyroid tissue from adult patients with papillary thyroid cancer (PTC) was digested and separated to obtain thyroid cells. The cells were embedded with Matrigel. Different conditioned culture media were designed and added. The forming efficiency and budding number of the first- and second-generation organoid were observed under microscope. Hematoxylin-eosin (H-E) staining was used to observe the histological morphology of the organoid model; immunohistochemical staining was used to detect the expression of thyroid specific markers, including NK2 homeobox protein 1 (NKX2.1), paired-box 8 (PAX8), and thyroglobulin (TG), to evaluate the consistency between the organoid model and normal thyroid tissue. Thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) levels in the supernatant of the ADTO models were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to verify whether they have hormone secretion function or not. **Results** Eight ADTO models were successfully established from the surgical specimens of 7 PTC patients. In the ADTO culture system, after increasing the concentrations of Noggin and epidermal growth factor and combination of multiple small molecule inhibitors, the first- and second-generation organoid models had more buds, larger spheres, and higher efficiency of organoid formation. H-E staining showed that a large number of follicular structures surrounded by monolayer cubic epithelial cells could be seen in the ADTO model, which was similar to the structural characteristics of human thyroid tissue. Immunohistochemical staining showed positive NKX2.1, PAX8, and TG, which was consistent with the primary tissue. The results of ELISA showed T3 and T4 in the supernatant of the ADTO models, indicating that it had thyroid hormone secretion function. **Conclusion** The

[收稿日期] 2023-03-17 [接受日期] 2023-11-09

[作者简介] 盛琪轩, 硕士生. E-mail: shengqixuan1228@163.com

\*通信作者( Corresponding author ). Tel: 021-81885805, E-mail: chengxiangshan@smmu.edu.cn

ADTO model established from human thyroid tissue is stable, which provides insights into regenerative medicine to treat hypothyroidism.

[ Key words ] organoid; model; thyroid; culture; hypothyroidism

[ Citation ] SHENG Q, LI L, LI W, et al. Construction, identification, and optimization of *in vitro* culture protocol of adult-derived thyroid organoid model[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(1): 49-56. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R. 20230119.

甲状腺功能减退症（以下简称甲减）是一种常见的内分泌疾病，系甲状腺激素缺乏引起<sup>[1]</sup>。据报道，3.7%的美国人<sup>[2]</sup>和4.5%的欧洲人<sup>[3]</sup>患有甲减。慢性自身免疫性甲状腺炎是甲减的最常见原因<sup>[4]</sup>，近年来随着甲状腺良恶性疾病发病率的增加，放射性碘治疗及甲状腺切除术后的甲减患者亦越来越多<sup>[1]</sup>。补充外源性甲状腺激素是甲减的标准治疗方案<sup>[5]</sup>，但是患者需要终身服药，而且外源性激素也无法实现体内下丘脑-垂体-甲状腺轴的精准调控，患者常因激素水平失衡出现神经认知障碍、乏力、体重增加等表现，严重影响生活质量<sup>[6-7]</sup>。因此，寻找一种能让甲减患者重获最佳激素平衡状态的替代治疗势在必行。

类器官是一种体外培养的模拟活体器官的3D模型，其构成和功能与来源组织、器官高度相似<sup>[8]</sup>。类器官技术在再生医学领域有着广泛的应用前景，通过类器官移植治疗甲减是研究的前沿与热点<sup>[9]</sup>，有望解决外源性药物治疗带来的激素水平失调相关并发症和终身服药等问题。本研究以成人甲状腺组织为种子细胞，初步构建及鉴定了成人源性甲状腺类器官（adult-derived thyroid organoid, ADTO）模型，并优化了ADTO的体外培养方案，以期为再生医学治疗甲减的研究提供思路。

## 1 材料和方法

1.1 甲状腺组织来源 成人甲状腺组织标本来自海军军医大学（第二军医大学）第二附属医院8例行手术治疗的甲状腺乳头状癌（papillary thyroid carcinoma, PTC）患者。取材及运送流程：先切除病灶侧甲状腺腺叶，再从已切除甲状腺腺叶中切取位于中极外侧的正常甲状腺组织（若病灶位于中极外侧，则选取病灶旁5 mm肉眼观正常的甲状腺组织），取材的热缺血时间短于40 min，标本大小不小于5 mm×5 mm。将切取的标本放入预装保存液的冻存管中，用纱布包裹冻存管放入0~4℃

泡沫箱中，后运送至实验室进行组织解离。整个取材、运送过程耗时约为2~3 h。取材后对甲状腺取材点进行标记，随后进行术后病理检测，验证取材点无肿瘤侵犯。本研究已通过海军军医大学（第二军医大学）伦理委员会审批，8例患者及其家属均签署知情同意书。

1.2 实验试剂 改良DMEM/F12培养基、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES]、L-丙氨酸-L-谷氨酰胺（GlutaMAX）、B27购自美国ThermoFisher Scientific公司；人表皮生长因子（epidermal growth factor, EGF）、A83-01、前列腺素E2（prostaglandin E2）、Y-27632购自加拿大STEMCELL Technology公司；Noggin购自北京义翘神州科技股份有限公司；N-乙酰半胱氨酸（N-acetyl-cysteine, NAC）、SB202190购自美国MedChemexpress公司；烟酰胺、胶原酶I购自美国Sigma公司；原代细胞抗生素（Primocin）购自法国InvivoGen公司；透明质酸酶、青霉素-链霉素混合液、D-Hanks缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司；FBS、RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司；甲状腺球蛋白（thyroglobulin, TG）抗体、配对盒基因8（paired-box 8, PAX8）抗体、NK2同源框蛋白1（NK2 homeobox protein 1, NKX2.1）抗体，以及山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司；基质胶（Matrigel）购自美国BD Biosciences公司；Wnt3A条件培养基和R-spondin1条件培养基均为自制。人甲状腺素（thyroxine, T4）和人三碘甲状腺原氨酸（triiodothyronine, T3）ELISA试剂盒均购自上海江莱生物科技有限公司。

根据既往研究结合自身实验条件，设计了2种类器官条件培养基。条件培养基1：改良DMEM-F12培养基加入10 mmol/L HEPES，1×GlutaMAX，1×原代细胞抗生素，1×B27，1 mmol/L NAC，

10 mmol/L 烟酰胺, 10 mmol/L 前列腺素 E2, 20% 的 Wnt3A 条件培养基, 10% 的 R-spondin1 条件培养基, 25 ng/mL Noggin, 20 ng/mL EGF, 500 nmol/L A83-01<sup>[10]</sup>; 条件培养基 2: 改良 DMEM-F12 培养基加入 10 mmol/L HEPES, 1×GlutaMAX, 1×原代细胞抗生素, 1×B27, 1 mmol/L NAC, 10 mmol/L 烟酰胺, 10 mmol/L 前列腺素 E2, 20% 的 Wnt3A 条件培养基, 10% 的 R-spondin1 条件培养基, 50 ng/mL Noggin, 50 ng/mL EGF, 同时联用 3 种小分子抑制剂 (500 nmol/L A83-01、10 μmol/L Y-27632、5 μmol/L SB202190)。

### 1.3 甲状腺细胞分离与 ADTO 模型构建 在无茵

条件下将新鲜成人甲状腺组织标本送至实验室处理, 一部分用于构建 ADTO 模型, 剩余部分进行组织固定 (图 1)。去除标本中肌肉、脂肪和坏死组织, 用无菌眼科剪剪碎组织, 加入胶原酶 I / 透明质酸酶 / FBS/Y-27632 混合液, 37 °C 震荡消化 30~40 min。经孔径为 70 μm 的滤网过滤获得单细胞悬液, 200×g 离心 5 min, 弃上清液, 用 D-Hanks 溶液洗 1~2 次。取适量 PBS 和基质胶液重悬细胞, 混匀后接种在 37 °C 预热的 24 孔板中 (每孔 25 μL), 在 37 °C 培养箱中放置 25 min 待其凝固, 随后加入类器官条件培养基 1 或 2。每隔 2~3 d 更换培养基, 2 周后传代。

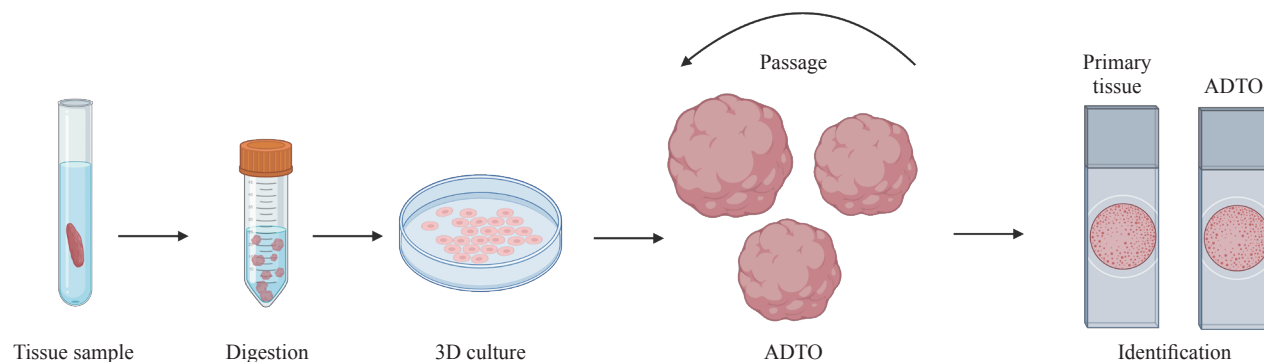


图 1 ADTO 模型的构建流程图

Fig 1 Flow chart of ADTO model establishment

ADTO: Adult-derived thyroid organoid.

1.4 类器官的传代和冻存 吸取适量预冷 PBS 溶液吹打促进类器官和基质胶分离, 随后冰浴上融化 10~20 min, 至胶体完全融化后离心弃上清液, 加入 TrypLE (美国 Life Technologies 公司) 消化 10 min, 待类器官分离成单个细胞时, 离心重悬后重新包埋, 常规传代培养或冻存。

### 1.5 类器官的鉴定

1.5.1 H-E 染色 将收集的正常甲状腺组织样本和类器官模型进行 H-E 染色, 步骤如下: 4% 甲醛溶液固定样本, 石蜡包埋, 制作切片, 烤片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 苏木精和伊红染液染色, 梯度乙醇脱水, 切片风干后封片, 在显微镜下观察并拍照。

1.5.2 免疫组织化学染色 利用先前制备的石蜡切片进行免疫组织化学染色, 步骤如下: 烤片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 抗原修复, 3% 过氧化氢及封闭液封闭, 加入稀释后的一抗 (NKX2.1、PAX8

和 TG 抗体) 4 °C 孵育 16 h, 加入相应种属二抗孵育, DAB 显色, 苏木精复染, 晾干后封片, 在显微镜下观察并拍照。

1.5.3 ELISA 检测 将 ADTO 传代至第 2 代, 培养至第 14 天, 收集细胞上清液, 200×g 离心 20 min, 取上清液稀释 1 倍后待测。按说明书配制各工作液, ELISA (竞争结合法) 检测步骤如下:

- (1) 在细胞培养板上设立标准孔、待测样本孔和样本复孔, 每孔加 50 μL 样本和生物素标记的抗体工作液 50 μL, 封板后 37 °C 孵育 1 h;
- (2) 弃去液体, 加洗涤液重复洗板 3 次;
- (3) 加酶结合物工作液后封板, 37 °C 孵育 30 min;
- (4) 洗板 3 次;
- (5) 加底物封板后, 37 °C 避光孵育 15 min;
- (6) 加终止液终止反应, 使用酶标仪检测各孔光密度值;
- (7) 计算各孔平均光密度值, 绘制标准曲线, 并根据样本稀释倍数, 计算出各指标的实际浓度。

## 2 结果

2.1 ADTO模型的构建 本研究共收集了8例新鲜成人正常甲状腺组织,1例组织样本保存运输不当,未进行后续处理及培养,其余7例样本均成功构建出ADTO模型,其中3号样本构建了2例

ADTO模型,其余样本各构建了1例ADTO模型(图2)。显微镜下记录6号样本来源ADTO的生长及传代情况,如图3所示,可见其从单细胞或小微球状态长成紧致实性球体或带有滤泡样结构的球体;2周后传代,细胞增殖活跃,第2代ADTO中类器官数量显著增多。

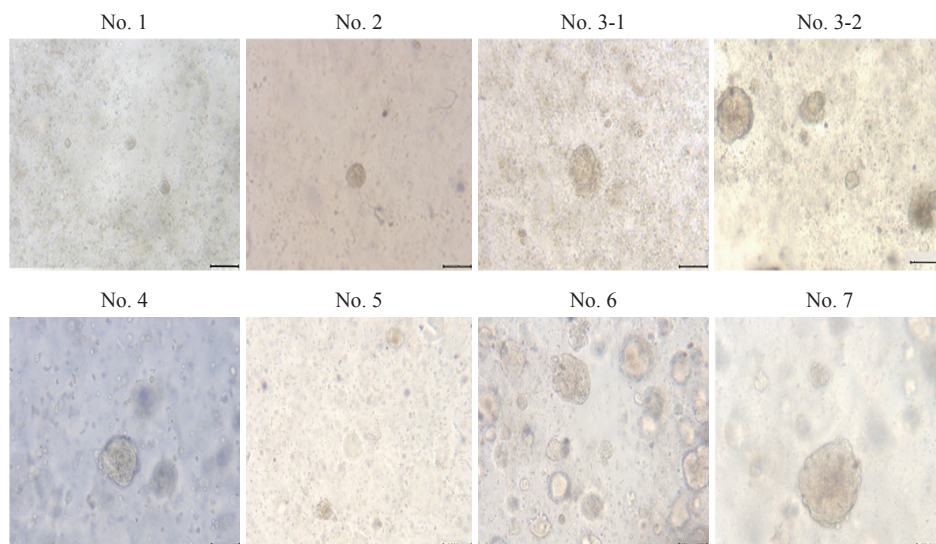


图2 从7例样本中成功构建的8例ADTO模型第14天的形态

Fig 2 Morphology of 8 ADTO models successfully constructed from 7 samples on day 14

ADTO models of No. 1-7 were derived from samples 1-7 (No. 3-1 and No. 3-2 were both derived from sample 3. No. 3-1 was cultured in conditioned medium 1, while No. 3-2 was cultured in conditioned medium 2). Scale bar=100 μm. ADTO: Adult-derived thyroid organoid.

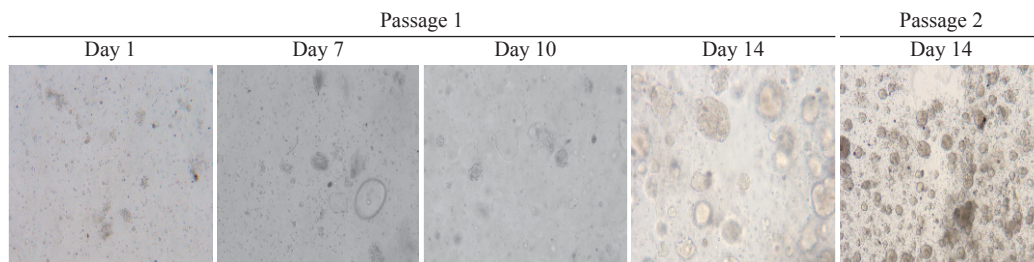


图3 6号样本来源ADTO模型的生长及传代情况

Fig 3 Growth and passage status of ADTO model from sample 6

Scale bar=100 μm. ADTO: Adult-derived thyroid organoid.

2.2 ADTO培养基的优化 为探索更合理的培养基配方,对1号和2号样本来源的细胞使用条件培养基1培养,4、5、6、7号样本来源的细胞使用条件培养基2培养,而3号样本来源的细胞分别使用条件培养基1和2培养。结果显示,2种条件培养基均可培养出ADTO(图2)。比较3号样本来源的ADTO在不同条件培养基中的生长和传代情况,结果如图4所示,可见使用条件培养基2培养

的第1代和第2代ADTO出芽更多、球体更大,说明类器官形成效率更高。

### 2.3 甲状腺类器官的鉴定

2.3.1 组织学形态 为评估ADTO模型与体内甲状腺组织在组织学形态上的符合程度,分别对原代甲状腺组织和ADTO模型进行H-E染色(图5)。原代甲状腺组织形态正常,可见甲状腺滤泡呈圆形或椭圆形,滤泡腔及间隙内见残留红细胞,周围

可见毛细血管,滤泡上皮细胞排列紧密,细胞核居中,大小比较一致。ADTO模型中可见许多大小不等的滤泡样结构,滤泡上皮细胞为单层立方状,形态正常,排列较规则,与原代甲状腺组织滤泡结构相似。

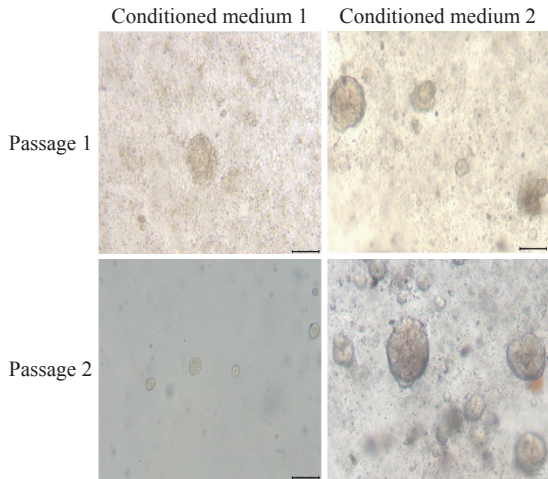


图4 使用不同条件培养基培养的第1代和第2代ADTO模型第14天的形态

Fig 4 Morphology of passage 1 and passage 2 ADTO models cultured in different conditioned media

The ADTO models were derived from sample 3. Scale bar=100 μm. ADTO: Adult-derived thyroid organoid.

2.3.2 生物标志物 为验证构建的ADTO模型是否反映原代甲状腺组织的分子标志物特征,采用免疫组织化学染色检测原代甲状腺组织和ADTO模型中甲状腺细胞标志物NKX2.1、PAX8和TG的表达。结果显示,构建的ADTO模型维持了与原代甲状腺组织一致的阳性表达结果,即NKX2.1、PAX8、TG均呈阳性表达;并且出现阳性表达的位置大致相似,即NKX2.1和PAX8的表达主要分布于细胞核,而TG主要在滤泡腔和细胞质中表达(图6)。由此得出,构建的ADTO模型维持了与来源组织一致的生物学标志物特征。

2.3.3 激素分泌能力 为验证构建的ADTO模型是否具有激素分泌功能,使用ELISA法检测了3例ADTO传代后(第2代)第14天的上清液T3和T4水平。结果显示,使用条件培养基2培养的3号样本来源、7号样本来源和6号样本来源的ADTO培养上清液中均可见一定程度的T3、T4分泌,其中6号样本来源的ADTO第2代第14天的上清液中T3和T4水平均明显高于另外2例样本来源的ADTO,同时其类器官数目也明显多于另2例样本来源的ADTO(图7),提示ADTO分泌T3、T4的能力与类器官数目相关。

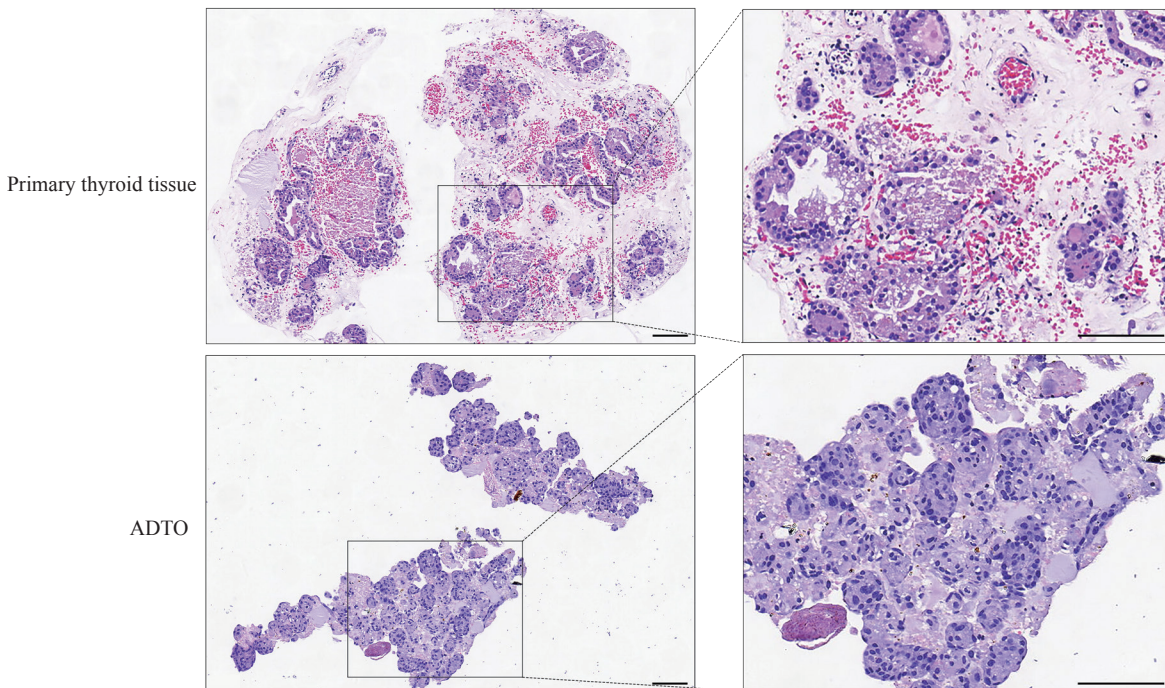


图5 原代甲状腺组织与ADTO模型的H-E染色结果

Fig 5 H-E staining results of ADTO models and corresponding primary thyroid tissue

Scale bar=100 μm. ADTO: Adult-derived thyroid organoid; H-E: Hematoxylin-eosin.

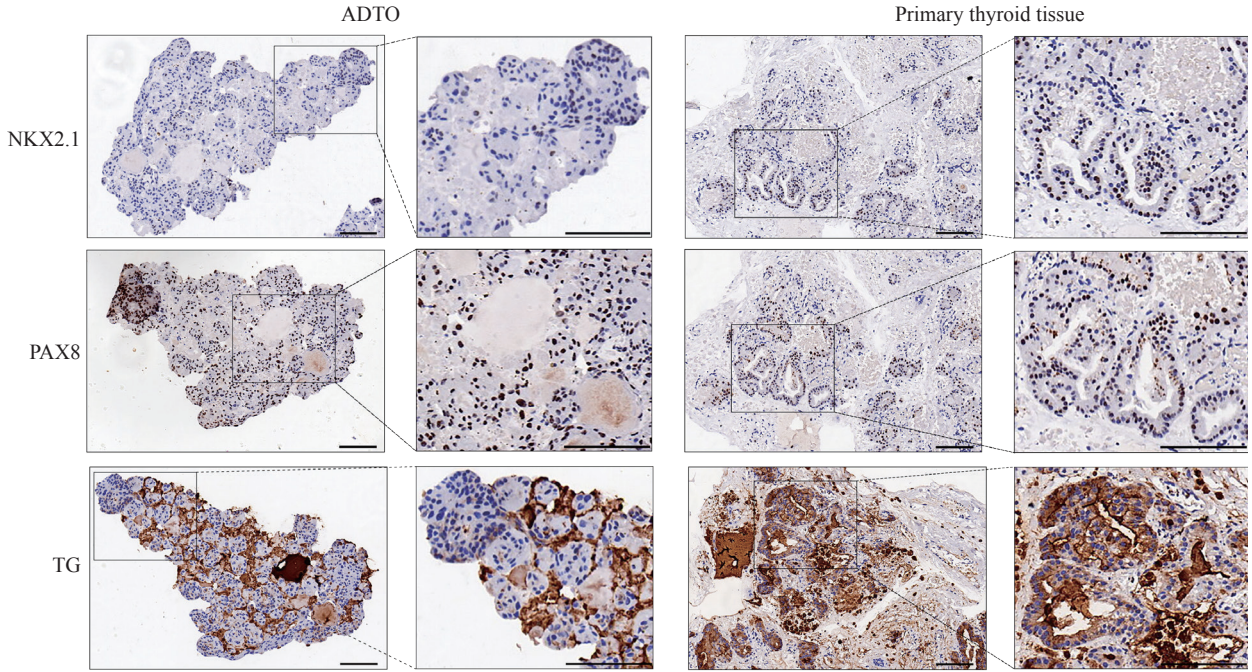


图6 原代甲状腺组织与ADTO模型的免疫组织化学染色结果

Fig 6 Immunohistochemical staining results of ADTO models and corresponding primary thyroid tissue

Scale bar=100 μm. ADTO: Adult-derived thyroid organoid; NKX2.1: NK2 homeobox protein 1; PAX8: Paired-box 8; TG: Thyroglobulin.

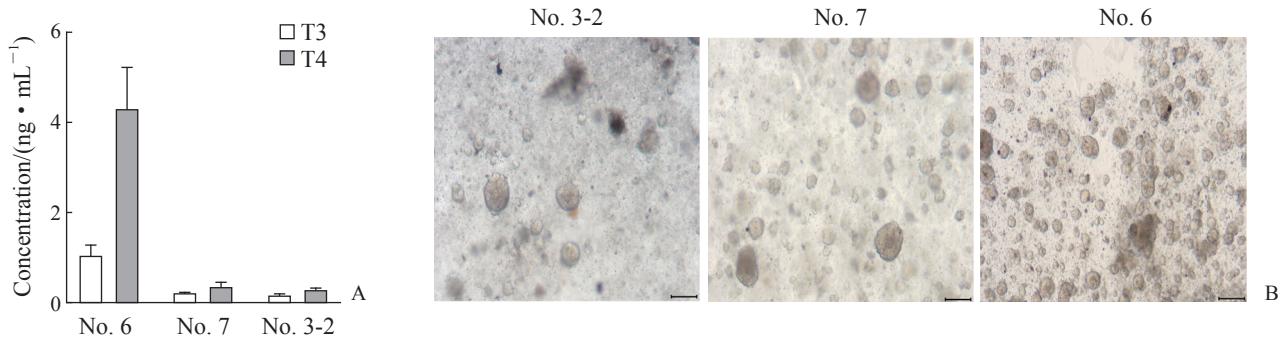


图7 第2代ADTO模型培养至第14天时的生长状态及上清液中T3、T4水平

Fig 7 Growth status and T3 and T4 secretion of passage 2 ADTO models on day 14

A: T3 and T4 levels of supernatant of ADTO models detected by enzyme-linked immunosorbent assay ( $n=3, \bar{x} \pm s$ ); B: Microscopic observation of the growth status of ADTO models (scale bar=100 μm). ADTO models of No. 3-2, 7, and 6 were derived from samples 3, 7, and 6, respectively. ADTO: Adult-derived thyroid organoid; T3: Triiodothyronine; T4: Thyroxine.

### 3 讨论

在目前的研究中,甲状腺类器官主要以胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)、成体干细胞(adult stem cell, ASC)等为种子细胞在体外培养而成<sup>[11-12]</sup>。2012年Antonica等<sup>[13]</sup>率先报道利用Tet调控系统诱导鼠ESC中NKX2.1和PAX8基因过表达,再加入含有特殊因子的培养基进行三维培养,成功构建了ESC来源的甲状腺类器官。2015年

Ma等<sup>[14]</sup>成功诱导NKX2.1/PAX8阳性的鼠iPSC分化为甲状腺滤泡细胞并自组装成三维甲状腺滤泡结构;将ESC/iPSC构建的甲状腺类器官移植到甲减小鼠体内,能维持激素水平、缓解甲减症状。然而,尽管ESC和iPSC构建甲状腺类器官可行,但存在分化效率低、易产生新突变和伦理学限制等问题,临床应用转化阻力较大<sup>[15-16]</sup>。ASC亦具备干细胞的自我更新及分化特性。一些证据表明,在人、鼠甲状腺组织中均发现侧群细胞(side population cell, SPC)的存在,此类细胞表达干细胞抗原1

(stem cell antigen-1, SCA1)、CD34、神经上皮干细胞蛋白(nestin)、八聚体结合转录因子4(octamer-binding transcription factor 4, OCT4)和Nanog等干细胞标志物<sup>[17]</sup>,可在干细胞生长因子的刺激下迅速增殖,形成三维结构的悬浮干细胞球,将其接种在分化培养基上进行三维培养能够获得有功能的甲状腺类器官,此甲状腺类器官与真正的人、鼠甲状腺滤泡在功能和形态等方面都非常相似,并且能够在体外传代至15代以上<sup>[10]</sup>。近年研究表明,直接将消化后的成人或胎儿甲状腺细胞接种在基质胶上,并在培养体系中加入EGF、成纤维细胞生长因子10(fibroblast growth factor-10, FGF10)、Wnt、R-spondin1和Noggin等调控相关信号通路,获得的甲状腺类器官可以传代培养长达1年,将其移植至甲减小鼠肾包膜下,可发育出功能性甲状腺滤泡样结构<sup>[18-19]</sup>。因此,ADTO可以通过组织特异性ASC作为种子细胞进行体外三维培养,相较ESC/iPSC,其具备来源易获取、培养及操作简单和不涉及伦理道德问题等优势,并可以在体外长期培养的过程中维持遗传和表型的稳定<sup>[10]</sup>。

我们利用7例PTC患者的正常甲状腺组织成功构建了ADTO,对ADTO进行传代培养,观察到细胞增殖活跃,第2代ADTO中类器官数量显著增多,而既往研究显示ADTO可在体外稳定传代至第7代或稳定扩增超过1年<sup>[10,18]</sup>,这些证据表明ADTO模型能稳定传代并维持增殖活力。对原代甲状腺组织及ADTO模型的H-E染色结果显示,ADTO模型的组织学形态类似于原代甲状腺组织,其中可见许多大小不等的滤泡结构,滤泡外层由甲状腺上皮细胞组成,上皮细胞形态正常,与正常甲状腺上皮相似。对原代组织及ADTO模型的免疫组织化学染色结果显示,NKX2.1和PAX8均呈阳性,这2种转录因子共表达为甲状腺细胞所特有<sup>[20]</sup>,提示了这些细胞的来源;而TG在滤泡腔和细胞质中表达,进一步证实了功能性甲状腺滤泡的发育<sup>[13,21]</sup>。本研究还采用ELISA法检测了3例第2代ADTO模型在培养第14天的上清液T3、T4水平,初步证实构建的ADTO模型具有甲状腺激素分泌能力,且激素水平与类器官的数目有关。组织学形态、甲状腺标志物及激素水平检测结果均提示本研究成功构建了ADTO模型。

ADTO的培养基成分复杂,不同培养条件下的类器官形成效率存在差异,需要探索更佳的培养基配方。现有ADTO培养体系中,R-spondin1和Noggin的主要作用是促进干细胞增殖,EGF可促进甲状腺滤泡上皮细胞增殖,Y-27632[Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(Rho associated coiled coil containing protein kinase, ROCK)抑制剂]可有效抑制干细胞的凋亡与分化,与A83-01(TGF- $\beta$ 抑制剂)和SB202190(p38抑制剂)联合使用可以提高细胞的存活率和细胞增殖能力、促进类器官形成<sup>[22-23]</sup>。据此,本研究对Ogundipe等<sup>[10]</sup>的培养基(条件培养基1)进行优化,提高关键因子Noggin和EGF的浓度并联用3种小分子抑制剂A83-01、Y-27632和SB202190,使用优化培养基(条件培养基2)培养的ADTO出芽更多、球体更大。这将为ADTO培养条件的进一步探索提供参考。

综上所述,本研究追踪并优化了ADTO培养体系,成功构建了8例ADTO模型,鉴定结果显示构建的ADTO模型与正常甲状腺组织间一致性较高,初步探讨了利用成人甲状腺组织构建甲状腺类器官的可行性。但本研究也存在一定的局限性:

(1)由于样本量及培养基分组较少,本实验仅对ADTO培养条件的优化进行了初步探索,但培养基的最佳配方及各因子的最佳浓度尚需要进一步研究。(2)由于缺乏动物实验,ADTO移植后能否发挥甲状腺细胞的作用尚不得而知,且目前探索体内移植最佳部位和数量的研究仍处于空白状态,这也将是今后ADTO研究的重点方向。

## [参考文献]

- [1] CHAKER L, BIANCO A C, JONKLAAS J, et al. Hypothyroidism[J]. Lancet, 2017, 390(10101): 1550-1562. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30703-1.
- [2] AOKI Y, BELIN R M, CLICKNER R, et al. Serum TSH and total T4 in the United States population and their association with participant characteristics: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999-2002)[J]. Thyroid, 2007, 17(12): 1211-1223. DOI: 10.1089/thy.2006.0235.
- [3] GARMENDIA MADARIAGA A, SANTOS PALACIOS S, GUILLÉN-GRIMA F, et al. The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: a meta-analysis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(3): 923-931. DOI: 10.1210/jc.2013-2409.

- [4] CARLÉ A, LAURBERG P, PEDERSEN I B, et al. Epidemiology of subtypes of hypothyroidism in Denmark[J]. *Eur J Endocrinol*, 2006, 154(1): 21-28. DOI: 10.1530/eje.1.02068.
- [5] GARBER J R, COBIN R H, GHARIB H, et al. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association [J]. *Thyroid*, 2012, 22(12): 1200-1235. DOI: 10.1089/thy.2012.0205.
- [6] PETERSON S J, CAPPOLA A R, CASTRO M R, et al. An online survey of hypothyroid patients demonstrates prominent dissatisfaction[J]. *Thyroid*, 2018, 28(6): 707-721. DOI: 10.1089/thy.2017.0681.
- [7] SARAVANAN P, CHAU W F, ROBERTS N, et al. Psychological well-being in patients on 'adequate' doses of L-thyroxine: results of a large, controlled community-based questionnaire study[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2002, 57(5): 577-585. DOI: 10.1046/j.1365-2265.2002.01654.x.
- [8] IWASAWA K, TAKEBE T. Organogenesis *in vitro*[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2021, 73: 84-91. DOI: 10.1016/j.ccb.2021.06.007.
- [9] ROMITTI M, TOURNEUR A, DE FARIA DA FONSECA B, et al. Transplantable human thyroid organoids generated from embryonic stem cells to rescue hypothyroidism[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7057. DOI: 10.1038/s41467-022-34776-7.
- [10] OGUNDIPE V M L, GROEN A H, HOSPER N, et al. Generation and differentiation of adult tissue-derived human thyroid organoids[J]. *Stem Cell Reports*, 2021, 16(4): 913-925. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.02.011.
- [11] LI L, SHENG Q, ZENG H, et al. Engineering a functional thyroid as a potential therapeutic substitute for hypothyroidism treatment: a systematic review[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1065410. DOI: 10.3389/fendo.2022.1065410.
- [12] OGUNDIPE V M L, PLUKKER J T M, LINKS T P, et al. Thyroid gland organoids: current models and insights for application in tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2022, 28(11/12): 500-510. DOI: 10.1089/ten.tea.2021.0221.
- [13] ANTONICA F, KASPRZYK D F, OPITZ R, et al. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2012, 491(7422): 66-71. DOI: 10.1038/nature11525.
- [14] MA R, MORSHED S A, LATIF R, et al. Thyroid cell differentiation from murine induced pluripotent stem cells[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6: 56. DOI: 10.3389/fendo.2015.00056.
- [15] BRAGANÇA J, LOPES J A, MENDES-SILVA L, et al. Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications[J]. *World J Stem Cells*, 2019, 11(7): 421-430. DOI: 10.4252/wjsc.v11.i7.421.
- [16] YE S, ZHU L. Stem cell therapy for thyroid diseases: progress and challenges[J]. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2022, 96: 100665. DOI: 10.1016/j.curtheres.2022.100665.
- [17] FIERABRACCI A. Identifying thyroid stem/progenitor cells: advances and limitations[J]. *J Endocrinol*, 2012, 213(1): 1-13. DOI: 10.1530/joe-11-0183.
- [18] VAN DER VAART J, BOSMANS L, SIJBESMA S F, et al. Adult mouse and human organoids derived from thyroid follicular cells and modeling of Graves' hyperthyroidism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(51): e2117017118. DOI: 10.1073/pnas.2117017118.
- [19] LIANG J, QIAN J, YANG L, et al. Modeling human thyroid development by fetal tissue-derived organoid culture[J]. *Adv Sci*, 2022, 9(9): e2105568. DOI: 10.1002/advs.202105568.
- [20] FERNÁNDEZ L P, LÓPEZ-MÁRQUEZ A, SANTISTEBAN P. Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(1): 29-42. DOI: 10.1038/nrendo.2014.186.
- [21] ANTONICA F, KASPRZYK D F, SCHIAVO A A, et al. Generation of functional thyroid tissue using 3D-based culture of embryonic stem cells[M]//TSUJI T. Organ regeneration: vol. 1597. New York, NY: Springer New York, 2017: 85-95.
- [22] ZHANG C, GUO H, YANG C, et al. The biological behavior optimization of human periodontal ligament stem cells via preconditioning by the combined application of fibroblast growth factor-2 and A83-01 in *in vitro* culture expansion[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 66. DOI: 10.1186/s12967-019-1799-1.
- [23] AOKI H, YAMASHITA M, HASHITA T, et al. Efficient differentiation and purification of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells and expansion with the use of inhibitors of ROCK, TGF- $\beta$ , and GSK3 $\beta$ [J]. *Heliyon*, 2020, 6(3): e03493. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03493.

[本文编辑] 孙岩