小鼠成体干细胞来源的甲状腺类器官构建及其中干细胞样细胞群的检测

张林丽[1,2,3]，黎一志[1,2,3]，程　全[1,2,3]，刘　莉[1,2,3]*

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务平台，上海 200437；
3. 先导物成药性研究全国重点实验室，上海 201203）

摘要：为建立可用于研究甲状腺疾病药效学的体外甲状腺模型，该研究采用小鼠成体来源的干细胞构建了甲状腺类器官，并分析、鉴定了类器官中的干细胞样细胞群标记。首先，以类器官生成数量和成长状态为指标优化了类器官培养基，通过苏木精 - 伊红染色（H&E）、免疫组织化学染色（IHC）、免疫荧光染色（IF）等方法，对使用优化的类器官培养基培养得到的甲状腺类器官进行鉴定，包括组织细胞结构以及组成细胞特异性表达的蛋白。同时，采用电化学发光法表征类器官的 T3 和 T4 分泌功能。随后，采用单细胞转录组测序（scRNA-Seq）技术分离、鉴定类器官中干细胞的基因标记，采用 IF 染色验证干细胞标记蛋白在类器官中的阳性表达，并以流式细胞术测定类器官中干细胞的表达量。结果显示，通过优化培养基和改良培养方法，可成功构建小鼠成体干细胞来源的甲状腺类器官。培养成熟的类器官形态结构含有甲状腺的基本功能单位甲状腺滤泡，表达甲状腺组织的结构特征性分子标记，具有合成、分泌甲状腺激素的功能。scRNA-Seq 分析结果显示，类器官中富集了具有干细胞特性的 $p63^{+}Isl1^{+}Sox2^{+}$ 细胞亚群。IHC 染色和流式细胞术的检测结果进一步验证了类器官中干细胞样细胞群的存在及表达。综上所述，建立的甲状腺类器官作为体外模型，为探索甲状腺的发育及疾病的发生、发展提供了可靠的研究平台。

关键词：甲状腺类器官；类器官培养；小鼠成体干细胞；干细胞样细胞群；甲状腺功能；表达

中图分类号：R318.1；R581；Q813.1+3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2025)06-0760-09

引用：张林丽，黎一志，程　全，等．小鼠成体干细胞来源的甲状腺类器官构建及其中干细胞样细胞群的检测［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(6): 760-768．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.06.008

Establishment of Thyroid Organoids Derived from Adult Mouse Stem Cells and Identification of Stem-like Cell Populations

ZHANG Linli[1,2,3], LI Yizhi[1,2,3], CHENG Quan[1,2,3], LIU Li[1,2,3]*

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai Professional and Technical Service Center for Biological Material Druggability Evaluation, Shanghai 200437; 3. National Key Lab. of Lead Druggability Research, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: To establish an *in vitro* thyroid module for thyroid pharmacodynamic research, this study constructed thyroid organoids derived from adult mouse stem cells and analyzed the stem-like cell populations of the organoid. First, the culture medium was optimized based on cell population and characteristics of the organoid as indicators. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used to display the histocellular structure of organoids; while immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining were employed to identify the expression of thyroid specific proteins. Meanwhile, the electrochemiluminescence assay was used to assess the secretory functions of T3 and T4. Subsequently, the stem cell gene markers in organoids were profiled by single cell RNA sequencing (scRNA-Seq), the expression of stem cell protein markers were verified by IF staining, and the cell proportion of stem cell expression was quantified by flow cytometry. The results showed that thyroid organoids derived from mouse adult stem cell were successfully established by optimizing the culture medium. Mature organoids contained thyroid follicles, and expressed characteristic molecular markers and secreted thyroid hormones. The results of scRNA-Seq revealed an enriched subpopulation of $p63^{+}Isl1^{+}Sox2^{+}$ cells with stem cell properties. The results of IHC and flow cytometry analyses further confirmed the presence of the above stem-like cell populations in organoids and their markers expression. In conclusion, the established thyroid organoids serve as a reliable *in vitro* model for exploring thyroid development and pathogenesis.

Key Words: thyroid organoid; organoid culture; adult mouse stem cell; stem-like cell population; thyroid function; expression

甲状腺是人体内分泌系统中最大的内分泌腺，对甲状腺激素的产生、储存和分泌发挥着至关重要的作用。由于生活压力增大、饮食习惯改变、药物使用等因素可能对甲状腺造成不同程度的结构和功能损害，导致甲状腺疾病的发病率逐年上升[1—2]。甲状腺疾病的临床前研究主要以动物模型为主，存在模型少、周期长、成本高的特点。而细胞模型，如人甲状腺正常细胞（Nthy-ori 3-1 细胞），缺乏甲状腺滤泡上皮细胞之间的紧密连接和间隙连接等复杂结构[3]，因而无法准确模拟甲状腺疾病的病理、生理机制，进而阻碍了人们对甲状腺生物学和疾病病因学的深入研究。当前，临床前和临床研究都迫切需要建立合适的甲状腺模型以研究甲状腺疾病的发生、发展机制，并积极探索有效的治疗策略。

类器官为来源于原代组织胚胎干细胞（embryonic stem cells，ESCs）或诱导多能干细胞（induced pluripotent stem cells，iPSC）的体外 3D 细胞簇，具有自我更新和自我组织能力，并表现出与来源组织相似的器官功能。多能干细胞（pluripotent stem cells，PSCs）具有可形成类器官的潜力，包括 ESCs、iPSCs 和成体干细胞（adult stem cells，ASCs）[4—5]。ESCs 的应用面临分化功效有限、易受基因突变影响、伦理问题等挑战；采用 iPSCs 构建类器官，存在诱导分化操作复杂、周期长等特征；而采用 ASCs 构建类器官，具有取材方便、操作简单、周期短、稳定性高的特点。然而，ASCs 来源的甲状腺类器官直到 2018 年[6]才首次在体外建立，其构建方法、培养基的组成及鉴定都尚未明确或统一。此外，甲状腺内干细胞群的鉴定及分类一直是甲状腺研究的难点，目前的研究中尚未明确统一甲状腺中的干细胞标记[7]。基于此，本研究拟建立成年鼠来源的甲状腺类器官，通过明场显微镜观察、苏木精和伊红（hematoxylin and eosin，H&E）染色、免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）染色和免疫荧光（immunofluorescence，IF）染色对甲状腺类器官的形态结构、标记物的表达展开分析，并借助单细胞转录组测序（single cell RNA sequencing，scRNA-Seq）技术和流式细胞术鉴定、测定类器官中存在的干细胞群，以期为后续甲状腺疾病模型的诱导、建立提供新选择，并为疾病发生、发展的机制研究提供新的思路。

1 仪器与试药

Nikon TS-2 型倒置显微镜、CSU 型转盘式共聚焦显微镜，均购自日本 Nikon 公司；1300 系列Ⅱ级 A2 型生物安全柜、热电 i160 型二氧化碳蜂巢培养箱，均购自美国 Thermo Scientific 公司；XPR105DR 型微量分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；MA900 型多功能全自动流式细胞仪（日本 Sony 公司）。

EGF、R-Spondin 1、Wnt3a、骨形态发生蛋白（bone morphogenetic protein 4，BMP4）、成纤维细胞生长因子 10（fibroblast growth factor 10，FGF10）、FGF2、抗钠碘转运体（sodium iodide symporter，NIS）抗体，均购自美国 PeproTech 公司；基质胶（商品名为 Matrigel，美国 Corning 公司）；Advanced DMEM/F12（AD/F12）培养基、B27 补充剂、L- 丙氨酰 -L- 谷氨酰胺（商品名为 GlutaMAX）、4- 羟乙基哌嗪乙磺酸［4-（2-hydroxyethyl）piperazine-1-ethanesulfonic acid，HEPES］、TrypLE 消化酶，均购自美国 Gibco 公司；烟酰胺（nicotinamide）、*N*- 乙酰半胱氨酸（*N*-acetylcysteine，Nace）和 Rho 激酶抑制剂 Y27632，均购自美国 AbMole 公司；组织分散酶 Dispase（加拿大 STEM CELL Technologies 公司）；抗甲状腺球蛋白（thyroglobulin，TG）抗体、抗甲状腺过氧化物酶（thyroid peroxidase，TPO）抗体、抗甲状腺激素受体（thyroid hormone receptors，TSHR）抗体，均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司；抗甲状腺素（thyroxine，T4）抗体（美国 Cloud-Clone Corp 公司）；抗闭锁小带蛋白 -1（zona occludens 1，ZO-1）抗体、抗 p63 抗体、抗 LIM 同源转录因子胰岛 1（LIM homeobox transcription factor islet 1，ISL1）抗体，均购自英国 Abcam 公司；抗 SOX2 抗体（美国 Biolegned 公司）；T4 试剂盒和 T3 试剂盒，均购自瑞士 Roche 公司；RNase 抑制剂（美国 Invitrogen 公司）；PBS、青霉素 / 链霉素双抗、Tris-EDTA 抗原修复液（pH 9.0）、牛血

收稿日期：2025-03-17

作者简介：张林丽（1982—），女，博士研究生，工程师，专业方向：炎症免疫药理，中枢神经系统药理等。

通信作者：刘　莉（1967—），女，研究员，博士生导师，从事抗炎免疫药理、心脑血管药理、肿瘤药理的研究。

E-mail：liulisipi@foxmail.com

清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）、羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗、中性树脂、24 孔细胞培养板、细胞筛（20、40 和 70 μm），均购自武汉塞维尔生物科技有限公司；Ⅱ型胶原酶（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）、SABC-HRP 试剂盒、Triton X-100，均购自上海碧云天生物技术有限公司；促甲状腺激素（TSH，美国 MedChemexpress 公司）；流式细胞术用固定 / 渗透缓冲液、流式细胞术用渗透缓冲液（美国 BioGems 公司）。

6 ～ 8 周龄雌性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠，购自上海斯莱克实验动物有限公司，实验动物生产许可证号为 SCXK（沪）2022-0004；实验动物使用许可证号为 SYXK（沪）2019-0027。本动物实验获得上海医药工业研究院药理评价中心伦理委员会批准（伦理批准号为 LQG202102）。实验小鼠进入动物房后于独立通风笼中适应性饲养 7 d 后使用；饲养环境为：室温 22 ～ 24 ℃，相对湿度 40%～ 70%，12 h 明暗交替，常规饲料喂养。

2　方法与结果

2.1　统计学分析

使用 GraphPad Prism 9、Adobe Illustrator 2023 和 FCS Express 7 软件对数据进行统计分析及作图。试验结果由 3 次独立重复试验获得，试验数据以均值 ±SD 表示，组间比较采用单因素方差分析进行数据统计，P<0.05 表示差异具有显著性，P<0.01 表示差异非常显著。

2.2　甲状腺类器官的建立与培养基筛选

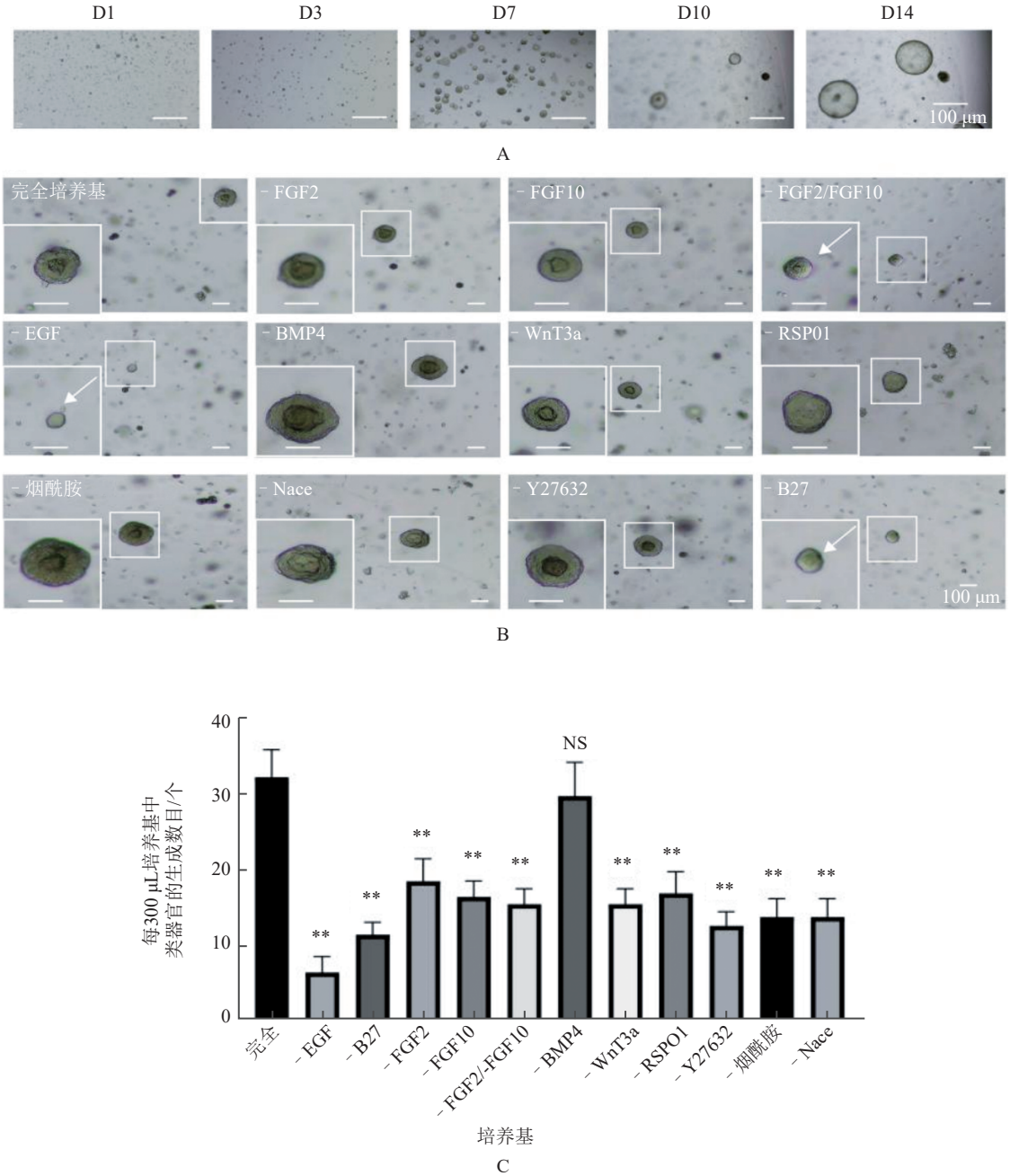
类器官完全培养基配制：用 AD/F12 培养基配制含 1× GlutaMAX+1×HEPES+1×B27+50 ng/mL EGF+100 ng/mL WNT-3a+100 ng/mL R-Spondin-1+100 ng/mL Nace+100 ng/mL 烟酰胺 +20 ng/mL FGF2+100 ng/mL FGF10+10 μmol/L Y27632+10 ng/mL BMP4 的培养基。

类器官培养：小鼠用异氟烷麻醉后，于无菌条件下取出甲状腺组织，用含青霉素 / 链霉素双抗的 PBS 清洗干净后剪成 1 mm×1 mm×1 mm 立方块，加入含 3 mg/mL Ⅱ型胶原酶和 2 IU/mL Dispase 酶工作液，置 37 ℃摇床中消化 1 h。随后离心（300×g）5 min，弃上清，剩余的细胞沉淀重悬于 AD/F12 培养基中，并接种于 24 孔板，置培养箱中于 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育过夜。第二天收集孔板中细胞悬液，离心（300×g）5 min，弃上清，剩余的细胞沉淀加入 TrypLE 1 mL，于 37 ℃消化 15 min 后经 70 μm 的细胞筛网过滤。收集细胞滤液，离心（300×g）5 min，弃上清，剩余的细胞沉淀加入上述类器官完全培养基和基质胶（体积比 1 ∶ 1）的混悬液，所得的重悬液以每 1 mL 含 8×10^5 个细胞的密度接种于 24 孔板，置培养箱中于 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 45 min，然后加入类器官完全培养基 300 μL 继续培养。隔 2 ～ 3 d 换液 1 次，并使用倒置显微镜拍照，跟踪观察类器官的生长情况。

结果如图 1A 所示，D3 即可观察到甲状腺类器官（细胞团）的生成。随着培养时间的延长，类器官体积明显增大。D7 时类器官呈致密的细胞球状；继续培养到 D14 时，可见形成了中间透亮、具有空腔状结构的甲状腺类器官。

培养基减因子筛选：在完全培养基的基础上分别配制删减不同因子的类器官培养基。具体有如下 11 种减因子培养基：减 EGF（－ EGF）、减 B27（－ B27）、减 BMP4（－ BMP4）、减 Wnt3a（－ Wnt3a）、减 R-Spondin 1（－ RSPO1）、减 Y26732（－ Y26732）、减 Nace（－ Nace）、减烟酰胺（－烟酰胺）、减 FGF2（－ FGF2）、减 FGF10（－ FGF10）、减 FGF2/FGF10（－ FGF2/FGF10）。前述操作同上，自“以每 1 mL 含 8×10^5 个细胞的密度接种于 24 孔板”步骤起，分别加入上述减因子培养基，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养，隔 2 ～ 3 d 换液 1 次，置显微镜下观察、拍照，跟踪类器官的成长情况。

结果如图 1 所示。与完全培养基组相比，缺少 EGF 会导致甲状腺类器官体积和数目显著减少（P<0.01）；缺少 B27、发育转录因子（FGF-2、FGF-10 或二者皆无），或类器官培养通用的 R-Spondin-1、Wnt3a、烟酰胺和 Nace 等均会影响类器官的生成数目（图 1B），与完全培养基组相比具有统计学差异（P<0.01）；但缺少 BMP4 对生成的甲状腺类器官的数目无显著影响（图 1C）。因此，后续采用的小鼠甲状腺类器官培养基为：以 AD/F12 培养基配制含



A—完全培养基组甲状腺类器官的显微镜图（各图标尺均相同）；B—完全培养基组和各减因子培养基组 D14 时的甲状腺类器官显微镜图（各图标尺均相同）；C—减因子培养基对类器官数目影响（n=12；** 表示与完全培养基组相比，P<0.01；NS 表示与完全培养基组相比，P>0.05）

图 1　甲状腺类器官的建立及培养基筛选

Fig.1　Establishment of Thyroid Derived Organoids and Culture Medium Screening

1× GlutaMAX、1×HEPES、1×B27、50 ng/mL EGF、100 ng/mL Wnt-3a、100 ng/mL R-Spondin-1、100 ng/mL Nace、100 ng/mL 烟酰胺、20 ng/mL FGF2、100 ng/mL FGF10、10 μmol/L Y27632 的培养基。

2.3　甲状腺类器官的鉴定

类器官 H&E 染色[8]：选取采用优化培养基培养且生长良好的类器官，去除培养基后加入 Dispase 酶 1 mL，于 37 ℃ 消化 20 min，离心（300×g）5 min，

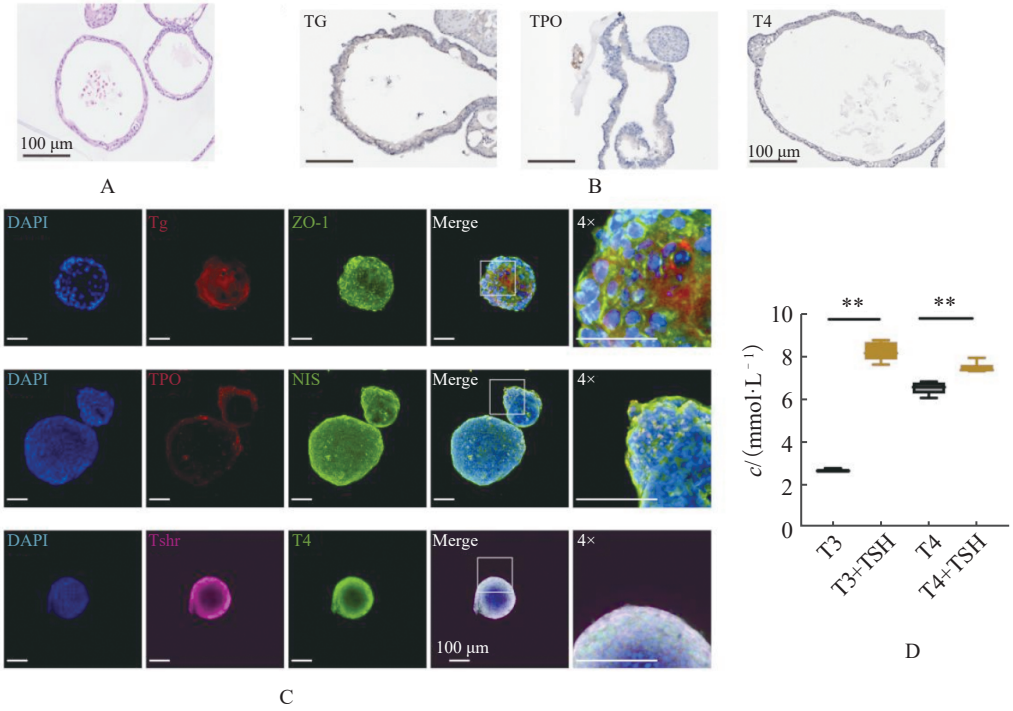
弃上清，剩余物用 4%多聚甲醛溶液重悬，并在室温固定 2 h。离心（300×*g*）5 min，将获得的类器官沉淀脱水并包埋在石蜡中，用石蜡切片机切成厚 4 μm 的切片，依次使用二甲苯、梯度乙醇进行脱蜡处理，开展甲状腺类器官的 H&E 染色。

H&E 染色结果如图 2A 所示，类器官空腔外围是多层细胞结构，系甲状腺滤泡细胞紧密连接形成的滤泡结构。

类器官 IHC 染色：石蜡切片脱蜡后，使用 pH 9 的 Tris-EDTA 抗原修复液进行抗原修复，然后在封闭缓冲液（含 0.1% Triton X-100 和 3%牛血清白蛋白的 PBS，pH 7.2 ～ 7.4）中室温孵育 1 h，再加入含抗 TG 抗体、抗 TPO 抗体、抗 T4 抗体（均 1 ∶ 100 稀释）的封闭缓冲液 50 μL，于 4 ℃孵育过夜。反应体系用 PBS 洗涤后，按含抗兔 IgG 的 SABC-HRP 试剂盒说明书孵育，随后用 3,3'- 二氨基联苯胺四盐酸盐（diaminobenzidine，DAB）洗涤和显影，并用中性树脂封膜。

类器官 IF 染色：将收集的类器官加至类器官清洗液（即含 0.1 % Triton X-100 和 0.2 % BSA 的 PBS）200 μL 中，重悬后转移到 24 孔板中，于 4 ℃孵育 15 min。吸出上层类器官清洗液，孔底类器官沉淀加入含一抗类器官清洗液［抗 TG 抗体（1 ∶ 100）、抗 TPO 抗体（1 ∶ 100）、抗 TSHR 抗体（1 ∶ 100）、抗 T4 抗体（1 ∶ 100）、抗 NIS 抗体（1 ∶ 50）、抗 ZO-1 抗体（1 ∶ 100）］200 μL，于 4 ℃孵育过夜。D2 加入类器官清洗液 1 mL，洗涤 3 次，吸弃清洗液后加入含羊抗兔二抗（1 ∶ 100）或羊抗小鼠二抗（1 ∶ 100）的类器官清洗液 200 μL，于室温下避光孵育 1 h。加入类器官清洗液 1 mL 清洗 3 次，吸弃清洗液后加入 DAPI 原液 200 μL，在室温下避光孵育 30 min。体系用类器官清洗液 1 mL 清洗 3 次后避光保存，采用共聚焦显微镜拍摄。

结果如图 2B、C 所示。IHC 和 IF 染色结果表明



A—类器官 H&E 染色图；B—类器官 IHC 染色图（各图标尺相同）；C—类器官 IF 染色图（各图标尺相同，最后一列照片是前一列照片中框选部分的放大图）；D—T3 和 T4 测定结果（n=12；** 表示 P<0.01）。

图 2　甲状腺类器官的鉴定

Fig.2　Identification of Thyroid Organoids

TG、TPO、NIS、T4、ZO-1 以及 TSHR 标志物在甲状腺类器官中显著表达。

类器官功能测定：取类器官培养 D13 时更换的培养基。试验组加入含 100 mIU/mL TSH 的甲状腺类器官优化培养基，对照组使用类器官优化培养基；培养 12 h 后收集上清，采用电化学发光法[9]检测 T3 和 T4 的浓度。

结果如图 2D 所示，对照组 T3 平均浓度为 (2.66±0.02) nmol/L，T4 浓度为 (6.53±0.12) nmol/L，表明所建立的甲状腺类器官具有分泌功能。TSH 试验组 T3 为 (8.22±0.18) nmol/L，T4 为 (7.48±0.10) nmol/L，说明 TSH 刺激后类器官中 T3 和 T4 浓度显著升高 (P<0.01)。

2.4 甲状腺类器官中的干细胞群分析

类器官测序：根据杭州联川生物技术有限公司单细胞测序方案，将甲状腺类器官消化成单细胞后过 20 μm 细胞筛后收集。通过 10×genomics 平台微流体分离标记单个细胞，通过 SMART 扩增技术构建 cDNA 文库，使用 Illumina 测序仪检测单细胞水平的基因表达谱和差异[10]。

测试结果如图 3 所示。首先通过聚类降维分析获得 20 组亚群细胞，以细胞特异性标志物进行注释，结果显示测得的细胞中包含滤泡旁细胞、甲状旁腺细胞、甲状腺幼稚细胞、甲状腺胶质前期细胞、甲状腺胶质生成期细胞、甲状腺成熟细胞、甲状腺增殖细胞和甲状腺干细胞样细胞（图 3A）。进一步的拟时序分析结果显示，上述细胞群分布在发育的不同阶段（图 3B），其中第 11、12 细胞群处于发育的前端（图 3C）。根据标记物鉴定得第 11 细胞群为甲状旁腺细胞群，于是对第 12 细胞群开展基因本体 (gene ontology，GO) 功能分析和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome，KEGG) 通路富集分析。GO 分析结果显示，第 12 细胞群与增殖、分化、转录调控和信号转导等功能相关（图 3D）。KEGG 分析显示，类器官中富集的通路与 Hippo 信号通路、Wnt 信号通路、多能干细胞信号通路以及甲状腺激素信号通路相关（图 3E）。上述结果提示，第 12 细胞群可能与干细胞相关。对第 12 细胞群差异表达的基因进行分析，观察到 *Isl1*、*Trp63*、*Sox2* 基因标记在第 12 细胞群中高表达（图 3F）。上述结果揭示，甲状腺类器官中存在 *Isl1*、*Trp63*、*Sox2* 基因标记的干细胞群。

2.5 甲状腺类器官中的干细胞群检测

按“**2.2**”项下方法对甲状腺类器官进行 IF 染色，一抗为 p63 抗体、ISL1 抗体和 SOX2 抗体。

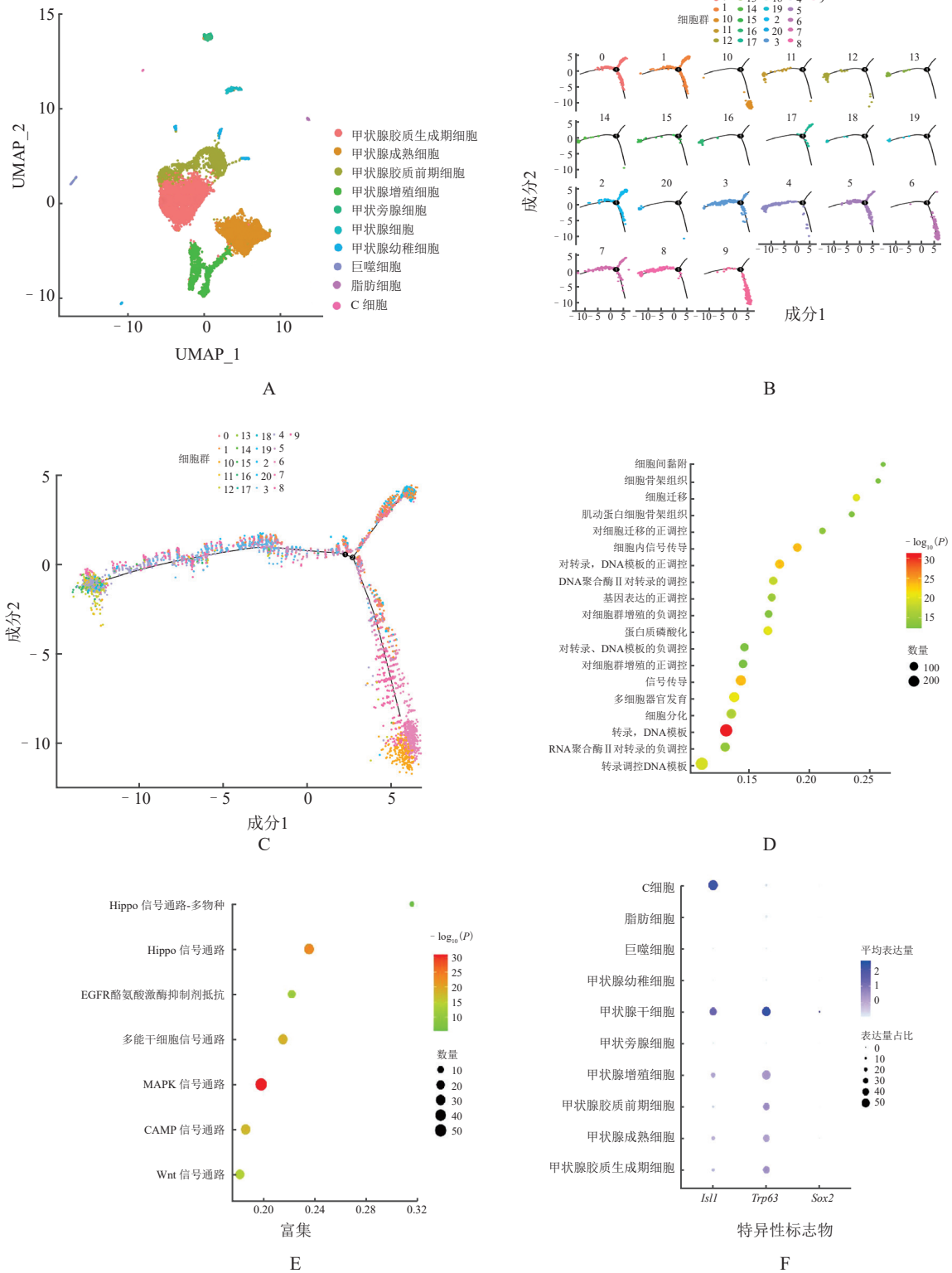
类器官流式检测：甲状腺类器官使用 TrypLe 消化酶 1 mL 消化 15 min 获得单细胞，加入流式细胞术用转录因子固定 / 渗透缓冲液 1 mL，于 4 ℃避光孵育 30 min。再加入流式细胞术用渗透缓冲液 2 mL，离心 (300×g) 5 min。细胞沉淀中加入含 p63 抗体（1 ∶ 80）、ISL1 抗体（1 ∶ 50）和 SOX2 抗体（1 ∶ 50）的渗透缓冲液 1 mL，室温孵育 30 min。最后细胞通过 40 μm 细胞筛，采用流式细胞仪检测 $p63^{+}ISL1^{+}SOX2^{+}$ 细胞比例。

IF 染色结果显示所建立的甲状腺类器官中存在 p63、ISL1、SOX2 标记的共表达；流式细胞分析结果也显示类器官 F1 ～ F3 代 $p63^{+}ISL1^{+}SOX2^{+}$ 细胞群表达呈阳性（图 4）。

3 总结与讨论

当前，甲状腺疾病的发病率大幅上升。然而，缺乏含甲状腺结构的体外模型阻碍了人们对甲状腺的生理、病理研究。本研究成功构建了成年小鼠组织来源的，含有甲状腺特异标记和功能的类器官。类器官的建立首先需要采用合适的消化处理方式获得高活性含干细胞的原代细胞，可通过将甲状腺初次消化后培养过夜获得的单细胞来提高类器官的建成效率。其次，类器官的培养基组分至关重要，通过对培养基因子开展筛选评估，获得有利于类器官成长、生长状态最合适的培养基。EGF 作为有丝分裂因子，可刺激各种表皮和上皮细胞的增殖[11]，其与松属素作用具有促进皮肤角质层增殖和存活作用[12]。本研究结果显示，EGF 具有相似的促甲状腺类器官生成作用，是类器官体外培养的重要培养基因子。

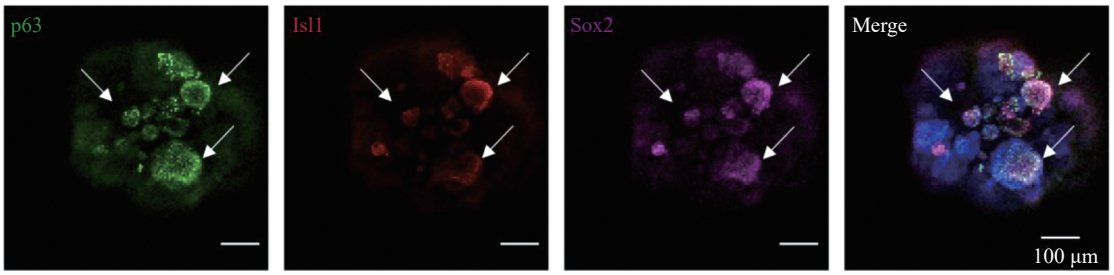
本研究对建立的类器官进行了鉴定。首先进行形态学和组织学的鉴定，结果确认所建立的甲状腺



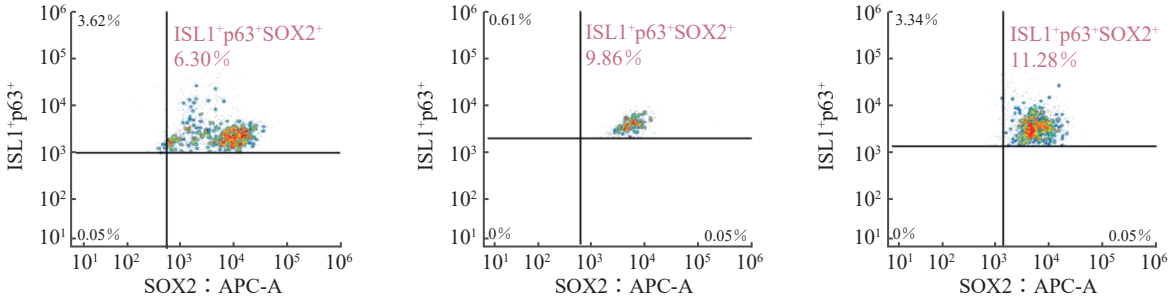
A—测序后的细胞降维分析；B—测序后的拟时序分析；C—12 群位于发育前端；D—12 群的 GO 功能分析；E—12 群的 KEGG 功能分析；F—12 群的差异表达基因。

图 3　单细胞测序法鉴定甲状腺类器官的干细胞群

Fig.3　Stem Cell Populations Identification of Thyroid Organoids by Single-cell Sequencing



A



B

A—IF 染色鉴定甲状腺类器官 $p63^+ISL1^+SOX2^+$ 干细胞标记；B—甲状腺类器官中的 $p63^+ISL1^+SOX2^+$ 干细胞群（F1 ～ F3 代）的流式分析。

图 4 甲状腺类器官中干细胞的 IF 染色鉴定和流式分析

Fig.4 Staining and Flow Cytometry of Thyroid Organoids Stem Cells

类器官呈现出甲状腺滤泡的基本结构。随后，通过免疫组化和免疫荧光染色技术，确认所建立的甲状腺类器官含有甲状腺相关的细胞类型及标记蛋白。最后开展的功能评估确认了甲状腺类器官具备分泌功能。以上结果说明，本研究成功在体外建立了甲状腺类器官。

甲状腺干细胞的研究已开展数十年，但尚未达成普遍共识[13]。伴随着类器官传代，可观察到类器官的生长速度逐渐加快的现象。这提示类器官中的干细胞标记及表达可能随着类器官的传代而明显强化。因此，开展了甲状腺类器官中干细胞群的鉴定和测定。首先，采用单细胞测序技术通过拟时序分析筛选到一组表达 p63、*Isl1*、*Sox2* 标记，且处于早期发育阶段的细胞群。富集分析表明，该细胞群中存在与干细胞相关的各种通路，如 Hippo、Wnt 和多能干细胞通路。

p63 是 p53 抑癌基因家族成员之一，在上皮细胞中具有调节干细胞动态的作用。一项针对年轻和老年个体肺样本的干细胞（表达 SOX2、p63、KRT5）、衰老和增殖标记物的研究显示，$p63^+$/$KRT5^+$ 干细胞的再生在衰老应激状态下可被激活。此外，p63 的激活对肺损伤后肺泡的再生必不可少[14—15]。在甲状腺胚胎的发育中，ISL1 在甲状腺原基和末端鳃体中高度表达。甲状腺原基和末端鳃体结构融合后，未成熟的滤泡细胞会继续表达 ISL1[16]。转录因子 SOX2 为胚胎发育所必需，在胚胎细胞和成体干细胞群的干性维持中具有重要作用。SOX2 阳性的干细胞群可在视网膜、食道、前胃、毛囊毛乳头、垂体等多种组织中检测到，同时这些组织的发育过程也依赖 SOX2 的表达[17—18]。研究[19]显示，SOX2 和 p63 在体内的小鼠角膜干 / 祖细胞室和体外的未分化人角膜缘上皮干 / 祖细胞共表达。本研究在基因层面上鉴定到甲状腺类器官中存在 $p63^+$*Isl1*$^+$*Sox2*$^+$ 标记的细胞群，又通过免疫荧光染色进一步确认。流式细胞术的结果再次表明 $p63^+ISL1^+SOX2^+$ 阳性细胞群在类器官中的存在。

综上所述，本研究成功构建了具有甲状腺标记、表达和分泌功能的甲状腺类器官。该类器官能稳定

培养、传代、冻存、复苏，操作方便，易复现。后续将在此平台上建立甲状腺上皮 - 间质转化疾病模型，可为探索疾病机制及药物筛选提供可靠的研究平台。

参考文献：

[1] TETI C, PANCIROLI M, NAZZARI E, *et al*. Iodoprophylaxis and thyroid autoimmunity: an update [J]. *Immunol Res*, 2021, **69**(2): 129-138.

[2] TYWANEK E, MICHALAK A, ŚWIRSKA J, *et al*. Autoimmunity, new potential biomarkers and the thyroid gland – the perspective of Hashimoto's thyroiditis and its treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, **25**(9): 4703.

[3] MOU L, LIAO L, ZHANG Y, *et al*. Ursolic acid ameliorates Nthy-ori 3-1 cells injury induced by IL-1β through limiting MALAT1/miR-206/PTGS1 ceRNA network and NF-κB signaling pathway [J]. *Psychopharmacology* (Berl), 2021, **238**(4): 1141-1156.

[4] TANG X Y, WU S S, WANG D, *et al*. Human organoids in basic research and clinical applications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, **7**(1): 168.

[5] 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.

[6] SAITO Y, ONISHI N, TAKAMI H, *et al*. Development of a functional thyroid model based on an organoid culture system [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, **497**(2): 783-789.

[7] ZITO G, COPPOLA A, PIZZOLANTI G, *et al*. Heterogeneity of stem cells in the thyroid [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, **1169**: 81-93.

[8] XIE X R, TONG X B, LI Z H, *et al*. Use of mouse primary epidermal organoids for USA300 infection modeling and drug screening [J]. *Cell Death Dis*, 2023, **14**(1): 15.

[9] SÁNCHEZ-CARBAYO M, MAURI M, ALFAYATE R, *et al*. Analytical and clinical evaluation of TSH and thyroid hormones by electrochemiluminescent immunoassays [J]. *Clin Biochem*, 1999, **32**(6): 395-403.

[10] GUPTA R K, KUZNICKI J. Biological and medical importance of cellular heterogeneity deciphered by single-cell RNA sequencing [J]. *Cells*, 2020, **9**(8): 1751.

[11] BURGESS A W. Regulation of signaling from the epidermal growth factor family [J]. *J Phys Chem B*, 2022, **126**(39): 7475-7485.

[12] RUTTANAPATTANAKUL J, WIKAN N, POTIKANOND S, *et al*. Combination of pinocembrin and epidermal growth factor enhances the proliferation and survival of human keratinocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(15): 12450.

[13] AL-SUHAIMI E A, AL-KHATER K. Functions of stem cells of thyroid glands in health and disease [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2019, **20**(2): 187-195.

[14] MORENO-VALLADARES M, MONCHO-AMOR V, SILVA T M, *et al*. $KRT5^{+}/p63^{+}$ Stem cells undergo senescence in the human lung with pathological aging [J]. *Aging Dis*, 2023, **14**(3): 1013-1027.

[15] LV Z, LIU Z X, LIU K, *et al*. Alveolar regeneration by airway secretory-cell-derived $p63^{+}$ progenitors [J]. *Cell Stem Cell*, 2024, **31**(11): 1685-1700. e6.

[16] WESTERLUND J, ANDERSSON L, CARLSSON T, *et al*. Expression of Islet1 in thyroid development related to budding, migration, and fusion of primordia [J]. *Dev Dyn*, 2008, **237**(12): 3820-3829.

[17] NOVAK D, HÜSER L, ELTON J J, *et al*. SOX2 in development and cancer biology [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, **67**(Pt 1): 74-82.

[18] SANTAMBROGIO A, KEMKEM Y, WILLIS T L, *et al*. $SOX2^{+}$ sustentacular cells are stem cells of the postnatal adrenal medulla [J]. *Nat Commun*, 2025, **16**(1): 16.

[19] BHATTACHARYA S, SERROR L, NIR E, *et al*. SOX2 regulates p63 and stem/progenitor cell state in the corneal epithelium [J]. *Stem Cells*, 2019, **37**(3): 417-429.