

T/CMBA

团 体 标 准

T/CMBA 020—2023

人正常乳腺及乳腺癌类器官制备、冻存、复苏和鉴定操作指南

Guideline for preparation, cryopreservation, recovery and identification of organoids
of human normal breast and breast cancer tissue

2023-2-21 发布

2023-2-21 实施

中国医药生物技术协会 发布

目 次

前 言	I
引 言	II
1 范围	1
2 规范性使用文件	1
3 术语和定义	1
4 通则	2
4.1 方案制订	2
4.2 知情同意	2
5 类器官制备	2
5.1 组织样本采集	2
5.2 组织样本的保存和运输	2
5.3 类器官制备、培养和传代	2
6 类器官冻存和复苏	3
7 类器官鉴定	3
8 数据管理	3
9 废弃物处理	3
10 质量控制	3
附 录 A（资料性） 人正常乳腺及乳腺癌类器官制备、冻存和复苏操作要点	4
A.1 仪器设备及试剂耗材	4
A.2 人正常乳腺及乳腺癌类器官制备操作步骤	5
A.3 人正常乳腺及乳腺癌类器官冻存和复苏核心步骤	6
附 录 B（资料性） 人正常乳腺类器官和乳腺癌类器官的鉴定	7
B.1 概述	7
B.2 类器官显微镜下的形态学观察	7
B.3 类器官细胞活性分析	7
B.4 类器官组织学特征分析	7
B.5 类器官分子分型鉴定	8
参 考 文 献	10

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国医药生物技术协会提出并归口。

本文件起草单位：四川大学生物治疗国家重点实验室、四川大学华西医院、广州精科生物技术有限公司、成都诺医德医学检验实验室有限公司、中国医学科学院肿瘤医院、中科院分子细胞科学卓越创新中心、广东省人民医院、中山大学肿瘤防治中心、广东医科大学附属医院、北京大学深圳医院、深圳市第二人民医院、川北医学院、华南理工大学、佛山市第一人民医院。

本文件主要起草人：魏于全、陈崇、李胜、苟马玲、高栋、罗健、马飞、张柏林、王坤、王树森、谢小明、杜正贵、陆政昊、李宏、刘佳、吴晴、薛晓红、陈伟财、韦伟、何劲松、马代远、梁法清、张清、李杰、张英、黄胜超、吴艳霞、罗云峰、张爱玲、张永成、曾志强、罗微、胥正敏、王瑶。

引 言

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤。利用类器官体外培养技术开展乳腺癌基础研究和临床治疗学研究具有重要的学术价值。类器官可在体外较好地模拟体内肿瘤的特征，为乳腺癌的基础研究、精准治疗和新药研发等提供新的技术手段。由于类器官的研究及应用涉及多个技术流程，影响因素多，开发难度大，特别是类器官的制备、冻存和复苏、鉴定等操作过程复杂。目前，国内对正常乳腺及乳腺肿瘤类器官制备、培养和鉴定等操作尚未建立规范标准。为此，特组织编写《人正常乳腺及乳腺癌类器官制备、冻存、复苏和鉴定操作指南》，以利于推动和指导类器官构建的相关研究，辅助研究人员开展乳腺癌致病机制、药物筛选和肿瘤治疗等相关研究，规范并引导行业发展。

人正常乳腺及乳腺癌类器官制备、冻存、复苏和鉴定操作指南

1 范围

本文件给出了人正常乳腺及乳腺癌组织类器官制备、传代、冻存、复苏和鉴定等的规范性操作和推荐方法。

本文件适用于科研院所、医疗机构、制药企业等构建人源正常乳腺及乳腺癌组织类器官。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489—2008 实验室 生物安全通用要求

GB 39707—2020 医疗废物处理处置污染控制标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人正常乳腺类器官 human normal breast organoids

人体正常乳腺上皮组织中的上皮干细胞或者多能干细胞经体外诱导分化，在有支架材料的培养条件下形成的与人正常乳腺上皮组织的细胞成分、组织结构及功能等关键特征具有相似性的三维多细胞培养物。

3.2

人乳腺癌类器官 human breast cancer-derived organoids

由人乳腺上皮癌变组织来源的肿瘤干细胞，在有支架材料的培养条件下形成的与其来源组织的细胞成分、组织结构及分子表型等关键特征具有相似性的三维多细胞培养物。

3.3

支架材料 scaffold material

用于辅助或支撑类器官体外培养的生物材料，包括天然材料如基质凝胶和合成材料。

3.4

传代 passage

将类器官制备为单细胞或细胞簇后再进行培养形成新的类器官的过程。

3.5

冻存 cryopreservation

将类器官经低温冷冻处理后在低温环境下长期保存并保持类器官细胞活力的技术。

3.6

复苏 recovery

将冻存的类器官解冻后进行培养,恢复类器官细胞组织活性的过程。

4 通则

4.1 方案制订

人正常乳腺类器官和人乳腺肿瘤类器官研究项目启动前应当制订工作方案。工作方案的内容包括但不限于:目标与任务、操作流程、工作条件、生物安全等级、操作人员资质、供体选择要求、类器官质量控制标准、参考文献等。供体选择要求中,建议将乳腺的生理特征及乳腺癌的治疗方法与用药史等情况纳入重要考虑因素。

4.2 知情同意

人体正常乳腺组织及乳腺癌组织的获取方法、处理手段、保存条件、使用目的等内容需获得伦理委员会审核批准,宜在充分尊重、告知人体组织提供者权益的前提下签署知情同意书,告知内容包括但不限于:组织的处置方案及可能涉及的应用场景。宜对组织提供者的个人信息进行隐私保护,严禁泄露可识别供体及亲属身份的信息,如:姓名、肖像、证件、社会关系等。

5 类器官制备

5.1 组织样本采集

5.1.1 应当建立相应的生物安全管控体系及使用规范,严格控制因直接或间接接触人类组织样本引起重大疾病传播的风险。

5.1.2 供体组织应当由医疗机构提供,乳腺癌组织样本可从通过穿刺或手术等手段获得的人体乳腺癌组织中选取,取样时应避免坏死区域;正常乳腺组织样本可通过乳腺相关手术治疗过程中切除的人体乳腺组织中获取;组织离体后宜尽快完成样本采集。

5.1.3 组织样本的采集人员需有相关专业的学习背景或培训经历。

注:除所用的培养基外,正常乳腺类器官和乳腺癌类器官的培养流程相同。

5.2 组织样本的保存和运输

采集的组织样本应完全浸没于无菌的组织保存液中,应于低温(0℃~4℃)条件下进行保存和运输,应避免保存液和其中的组织样本冻结。

所使用的保存液宜为组织保存、运输专用,所含成分对组织无毒害作用,不影响组织的生理功能。

5.3 类器官制备、培养和传代

5.3.1 类器官制备、培养

类器官制备、培养步骤如下:

- 制备前应对采集的组织样本进行清洗,组织清洗液建议使用置于4℃冰箱中预冷处理的DPBS缓冲液,清洗时上下左右迅速摇晃,摇晃力度适中,直至清洗液澄清;
- 选择组织消化液和/或机械破碎方法获得细胞簇或单细胞,组织消化液应保证无菌,建议采用胶原酶进行组织消化,结合适当的温和的机械吹打;
- 根据组织来源选择合适的培养基,正常乳腺类器官与乳腺肿瘤类器官可依据生长特性选择不同的培养基;
- 根据实验目的选择合适的支架材料(如基质胶)以支撑细胞进行三维(3D)立体生长,以及合适的培养器皿(如细胞培养板或芯片)、培养装置和培养条件。

详细操作规程和推荐的方法参见附录A

5.3.2 类器官传代

根据需要对类器官进行传代处理，并记录新培养类器官的代次。传代时机的选择依据类器官的大小、活性、使用要求等指标综合判定。

详细操作规程和推荐的方法参见附录 A。

6 类器官冻存和复苏

对正常乳腺类器官及乳腺癌类器官一般通过梯度降温的方法进行冷冻，然后采用适宜的低温条件进行保存，宜尽量避免冻融现象发生，记录冻存的条件与时间。

人正常乳腺或乳腺癌类器官复苏时，需要先对冻存的类器官在适宜的升温条件下进行解冻处理，去除冻存液后进行类器官的再次培养或其他处理。详细操作规程和推荐的方法参见附录 A。

7 类器官鉴定

根据需要对建立的类器官进行鉴定，合理设定鉴定内容，可参考的鉴定指标如：类器官显微镜下的形态学、类器官组织学特征、类器官分子分型、类器官细胞活性等。

详细操作规程和推荐的方法参见附录 B。

8 数据管理

宜结合类器官的使用目的，制订数据管理规范，包括但不限于数据内容及保存时间、数据管理与使用的权限及责任。

详细的临床样本数据管理可参照国家药品监督管理局颁布的《药物临床试验质量管理规范》(GCP) 中的数据管理部分内容。

9 废弃物处理

在组织样本获取、类器官培养、鉴定和冻存等操作过程中产生的废弃物，应按照 GB 19489—2008 中 7.19 和 GB/T 38736—2020 中 3.1 的要求，遵循《医疗废物管理条例》丢弃到指定地点妥善处置。对于使用过的类器官或不合格的类器官须严格按照生物样本处置与管理规范操作。

10 质量控制

类器官的质量控制包括但不限于类器官光镜下形态学观察，类器官细胞活力鉴定和类器官常见标志物表达，如 Ki67 增殖指标的表达等。类器官培养状态鉴定参见附录 B。

附录 A (资料性)

人正常乳腺及乳腺癌类器官制备、冻存和复苏操作要点

A.1 仪器设备及试剂耗材

A.1.1 仪器设备

生物安全柜、低温离心机、二氧化碳细胞培养孵箱、光学显微镜、37℃ 水浴锅、低温冰箱(4℃、-20℃、-80℃)、液氮罐等。

A.1.2 耗材

细胞培养孔板或芯片、15 mL 和 50 mL 无菌离心管、各种移液器和吸头、无菌镊子、无菌眼科剪、细胞冻存盒、细胞冻存管等。

A.1.3 试剂

组织保存液、DPBS、胶原酶、支架材料、类器官培养基、细胞级别二甲基亚砜等。

A.1.4 正常乳腺类器官培养基

推荐的正常乳腺类器官培养基的组成成分见表 A.1。

表 A.1 正常乳腺类器官培养基组成成分表

中文名称	英文名称
基础培养基	Advance DMEM/F12
WNT 信号通路激活剂	R-Spondin 1
WNT3a	Wnt3a
神经调节蛋白 1	Neuregulin 1
L-谷氨酰胺	L-Glutamax
ROCK 抑制剂	ROCK inhibitor Y-27632
人头蛋白	Noggin
sirtuins 抑制剂	Nicotinamide
TGFβ 抑制剂 A83-01	TGFβ inhibitor A83-01
纤维母细胞生长因子 10	FGF10
人表皮细胞因子	EGF
B27 添加剂	B27 supplement
乙酰半胱氨酸	N-acetylcysteine
Primocin 抗生素	Primocin
氢化可的松	Hydrocortisone
β-雌二醇	β-estradiol
腺苷酸环化酶激活剂	Forskolin

A.1.5 乳腺癌类器官培养基

推荐的乳腺癌类器官培养基的组成成分见表 A.2。

表 A.2 乳腺癌类器官培养基组成成分表

中文名称	英文名称
基础培养基	Advance DMEM/F12
WNT 信号通路激活剂	R-Spondin 3
青霉素/链霉素	Penicillin/streptomycin
神经调节蛋白 1	Neuregulin 1
L-谷氨酰胺	L-Glutamax
ROCK 抑制剂	ROCK inhibitor Y-27632

人头蛋白	Noggin
4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸	HEPES
sirtuins 抑制剂	Nicotinamide
TGF β 抑制剂 A83-01	TGF β inhibitor A83-01
纤维母细胞生长因子 10	FGF10
人表皮细胞因子	EGF
p38 MAPK 抑制剂	SB202190
B27 添加剂	B27 supplement
乙酰半胱氨酸	N-acetylcysteine
Primocin™ 抗生素	Primocin
重组人角质细胞生长因子	FGF 7

在准备乳腺癌类器官培养时，阻止正常细胞生长的方法包括去除正常细胞必需的某些生长因子（如，去除 Wnt3a），或者添加一种能杀死正常细胞的化合物（如，针对 TP53 突变添加 Nutlin3a），乳腺癌类器官培养基可根据具体情况在正常乳腺类器官培养基的基础上适量增减成分。

A.2 人正常乳腺及乳腺癌类器官制备操作步骤

A.2.1 通则

所有类器官的制备、培养、冻存和复苏宜在生物安全柜中保证无菌操作。所用试剂、洗液和器材等应无菌。

A.2.2 组织样本的预处理

评估获取的组织样本中上皮细胞的含量，利用眼科剪和镊子尽可能去除非上皮成分，包括肌肉和脂肪组织。对于乳腺癌组织样本，宜去除明显坏死的组织成分。

A.2.3 组织块的清洗

将上述预处理后的组织样本转移至 50 mL 离心管中，用含有抗生素的 4℃ 预冷的 DPBS 溶液/或基础培养基漂洗组织样本数次，直至漂洗液呈清液状态。

A.2.4 组织块的消化

将样本转移至 10 cm 的细胞培养皿中，使用手术剪或手术刀将组织样本尽可能剪碎呈现肉糜状态；根据组织量加入组织块组织消化液（ ≥ 10 mL），置于 37℃ 水浴锅中消化。仔细观察消化情况，每 10min~15min 混合 1 次；当混合物中组织块被明显解离破碎，光学显微镜下观察到大量细胞簇或单细胞出现时即可终止消化，4℃ 下，200 $\times g$ 离心 5min，弃上清，保留沉淀置于冰上。

A.2.5 组织细胞混悬液的过滤

将沉淀重悬于基础培养基中，并用 70 μm 或者 100 μm 细胞滤网过滤。4℃ 下，200 $\times g$ 离心 5min，弃上清，保留沉淀置于冰上。

A.2.6 细胞沉淀重悬及三维培养接种

取适量支架材料（如基质胶，低温条件下呈液体状态）重悬细胞沉淀，混合均匀后接种于培养孔板，或用培养基重悬后接种于芯片上，待支架材料凝固，添加相应的人正常乳腺类器官或乳腺癌类器官培养基，使培养基没过细胞，置于 37℃ 二氧化碳细胞培养箱中培养。

A.2.7 类器官培养

根据类器官生长情况，每 2 天~3 天更换 1 次类器官培养基。

A.2.8 类器官传代

- 待类器官平均直径为 120 μm ~180 μm 时，即可进行传代；一般而言，在此平均直径范围内的类器官生长活力较好；
- 传代时需要将类器官尽量消化为单个细胞；

- c) 正常乳腺类器官体外连续传代次数尽量控制在 10 代以内；乳腺癌类器官传代次数可根据实验要求适当延长，但宜对传代类器官定期做分子分型鉴定。

A.3 人正常乳腺及乳腺癌类器官冻存和复苏核心步骤

A.3.1 类器官冻存

类器官冻存步骤如下：

- a) 预先准备含有 10% 的二甲基亚砜的无血清细胞冻存液，现配现用；
- b) 使用配置好的冻存液重悬细胞簇或单细胞沉淀，并按 500 μ L~1 mL 体积分装至细胞冻存管中；
- c) 将细胞冻存管放入细胞冻存盒中，置于 -80°C 保存 24 h 后，将细胞冻存管转移至液氮罐中长期保存。

A.3.2 类器官复苏

类器官复苏步骤如下：

- a) 预先准备一个装有 10 mL 基础培养基的 15 mL 离心管；
- b) 将冻存管从液氮罐中取出后，宜立即放入 37°C 水浴中，轻轻摇动冻存管，尽量使其在短时间内全部融化；
- c) 将融化后的类器官冻存液悬液吸出，逐滴加入到 15 mL 离心管中，使液体中二甲基亚砜总量低于 1%。 4°C 下， $200 \times g$ 离心 5min，弃上清，保留类器官沉淀置于冰上；
- d) 将细胞沉淀再次与支架材料混匀，接种于培养孔板或生物芯片上，待支架材料稳定后，添加相应的类器官培养基，置于 37°C 二氧化碳细胞培养箱中进行培养。

附录 B

(资料性)

人正常乳腺类器官和乳腺癌类器官的鉴定

B.1 概述

根据需要对培养类器官进行鉴定，宜科学规划鉴定内容，可参考的鉴定指标如：形态、活性、组织学特征、分子分型等，作为参照来评估培养形成的类器官与来源组织的相似性。

B.2 类器官显微镜下的形态学观察

在类器官培养的第 2 天，即可在光学显微镜下进行形态学观察。正常乳腺类器官在培养数天后通常会形成直径 50 μm 及以上的球状结构，折光性良好，而乳腺肿瘤类器官的大小与形态可能有较大的个体差异。在进行大规模类器官培养及应用时，宜关注各组类器官的大小、形态及数量的均一性。

B.3 类器官细胞活性分析

B.3.1 台盼蓝染色法

台盼蓝染料用于死细胞的着色，在光学显微镜下可以通过颜色区分死活细胞。使用细胞消化液将类器官解离成单细胞，使用台盼蓝染液进行染色，染色后的细胞转移至血球计数板，置于光学显微镜下统计未染色细胞总数和着色细胞总数，根据公式：活细胞比率(%) = 未染色细胞总数 / (未染色细胞总数 + 着色细胞总数) \times 100% 计算分析活细胞比率。一般情况下，计算或统计出的类器官活细胞比率 > 90% 时则表示培养类器官活力优秀，质量良好。

B.3.2 羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 染色法

CFSE 能够轻易穿透细胞膜，在活细胞内与胞内蛋白共价结合，水解后释放出绿色荧光，而死细胞无法着色。具体检测步骤包括：类器官消化成单个细胞后，离心弃上清，沉淀用 Advanced DMEM/F12 培养基重悬 (约 1 mL)，吹打混匀后加入 CFSE 溶液 (终浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ ~ 5 $\mu\text{mol/L}$)，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中孵育 10min。用 40% 体积的预冷小牛血清立即终止染色标记 10min。离心洗涤两次后，用适量的完全培养液重悬细胞。取 100 μL 左右细胞悬液置于干净的细胞培养皿中，放置于倒置显微镜下，使用 488 nm 激发光观察细胞着色情况。同时，剩余的单细胞悬液可以使用流式细胞仪进行细胞活性定量分析。

一般情况下，计算及统计出的类器官活细胞比率 > 90% 时则表示培养类器官活力优秀，质量良好。

B.4 类器官组织学特征分析

B.4.1 样品准备

从来源组织中切取 1 ~ 2 块具有代表性的组织块，用组织固定液进行固定保存。建议选取直径大于 100 μm 的类器官用于组织学分析。

B.4.2 石蜡包埋及切片

石蜡包埋及切片处理步骤如下：

- 使用吸头将包含类器官的基质材料从培养器皿上剥离，尽可能保持基质材料的完整性，放入组织盒中，用组织固定液 (建议 4% 多聚甲醛) 对类器官进行固定；
- 梯度乙醇脱水 (建议使用浓度为 70%、80%、95% 以及 100% 的乙醇依次处理，每个梯度 5min ~ 10min)，二甲苯透明处理大约 5min，直至类器官呈半透明状态；
- 完成石蜡包埋，制作类器官切片，建议每张切片厚度在 5 μm 左右。

B.4.3 苏木素&伊红 (H&E) 染色

苏木素&伊红（H&E）染色步骤如下：

- a) 将类器官切片置于烘片机上烘烤，增加类器官的黏附，防止在后续染色过程中类器官脱落；
- b) 脱蜡：依次将类器官切片浸泡于二甲苯溶液中 3 次，100% 乙醇溶液中 3 次，95% 乙醇溶液中 3 次，每次 3min，再置于超纯水中 3min，使组织细胞间的石蜡完全置换为水；
- c) 细胞核染色：在类器官上滴加苏木精染料，用量以覆盖整个组织为宜（约 40 μ L），时间约 10s；
- d) 在流水下冲洗数分钟洗去浮色，再依次利用盐酸酒精溶液及碳酸氢钠溶液进行返蓝处理；
- e) 细胞质染色：放入伊红溶液中浸泡，时间约 10s；
- f) 接着依次浸泡于 95% 乙醇溶液中 3 次，100% 乙醇溶液中 3 次，二甲苯溶液中 3 次中，每次 3min；
- g) 用中性树脂封片保存；
- h) 光学显微镜下观察拍照，分析染色结果。

B. 4. 4 免疫组化检测

免疫组化检测步骤如下：

- a) 将类器官切片（B. 4. 2）置于烘片机上烘烤，增加类器官的黏附，防止在后续染色过程中类器官脱落；
- b) 脱蜡：依次将类器官切片浸泡于二甲苯，100% 乙醇，95% 乙醇，每次 3min，以上步骤重复 3 次，再置于超纯水中 3min，使组织细胞间的石蜡完全置换为水；
- c) 取出切片放入装有抗原修复液的容器中，加热容器使溶液沸腾后，置于通风处自然冷却至室温；
- d) 转移至装有 0. 3% Triton X-100 PBS 溶液的染缸中，浸泡 20min；
- e) 建议用 PBS 浸洗 3 次，每次 5min；
- f) 滴加山羊血清，覆盖类器官为宜（约 40 μ L），封闭 30min ~ 60min；
- g) 吸去山羊血清，滴加一定比例的用封闭液稀释的一抗（浓度根据不同抗体而定），以覆盖类器官为宜（约 40 μ L），置于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；
- h) 吸去一抗，将切片再次放入染缸中，用 PBS 浸洗切片 3 次，每次 5min；
- i) 加反应增强液，覆盖类器官为宜（约 40 μ L），室温孵育 20min；
- j) 吸去反应增强液，将切片再次放入染缸中，用 PBS 浸洗切片浸洗 3 次，每次 5min；
- k) 选择对应一抗的辣根过氧化物酶联二抗试剂，滴加于类器官上，覆盖类器官为宜（约 40 μ L），室温孵育 1 h；
- l) 弃除二抗，滴加 DAB 反应液，覆盖类器官为宜（约 40 μ L）。当类器官呈棕色后迅速放入流水下冲洗 3min 左右；
- m) 加苏木精染料进行细胞核染色，约 10s，在流水下冲洗 5min ~ 10min；
- n) 切片放入盐酸酒精溶液和碳酸氢钠溶液，各 1min，进行返蓝处理；
- o) 流水下冲洗后，依次浸泡于 95% 乙醇、100% 乙醇、二甲苯中，每次 3min，以上步骤重复 3 次；
- p) 中性树脂封片保存；
- q) 光学显微镜下观察拍照，分析染色结果。

B. 5 类器官分子分型鉴定

对于乳腺癌而言，建议分为几种临床常见分子分型如管腔 A 型、管腔 B 型、HER2 过表达型、三阴型等，通常以 ER、PR、HER2、Ki67 等标志物所占肿瘤细胞比例划分。乳腺癌类器官可根据上述免疫组化步骤进行 ER、PR、HER2、Ki67 等指标的检测，并与原代肿瘤组织进行比较。

正常乳腺上皮细胞进一步分为管腔谱系（表达 KRT8/18、CD24）和基底/肌上皮谱系（表达 ATAC2、CNN1、MME），分别构成乳腺导管系统的内层和外层。在管腔谱系中，基于 GABRP、KIT 和 ALDH1A3 的表达被标记为管腔祖细胞，基于 AGR2、ANKRD30A、ESR1、FOXA1 和 PGR 的表达被标记为成熟管腔细胞。在基底/肌上皮细胞谱系中，基于 ITGA6、KRT5/6B、KRT14 和 TP63 的表达，分别被标记为基础祖细胞和肌上皮细胞。以上识别乳腺癌或者正常乳腺上皮细胞的生物标志物均可用于分子层面的鉴

定，包括但不限于 RNA-seq 或者荧光定量 PCR 实验用于检测目标基因的转录水平变化，免疫印迹实验用于检测目标蛋白表达水平变化等。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国国务院. 中华人民共和国人类遗传资源管理条例. 2019-05-28.
- [2] 中国细胞生物学学会. T/CSCB 0001-2020 干细胞通用要求. 北京:中国标准出版社, 2020.
- [3] 国家肿瘤质控中心乳腺癌专家委员会, 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤药物临床研究专业委员会. 中国晚期乳腺癌规范诊疗指南(2020版). 中华肿瘤杂志, 2020, 42(10):781-797.
- [4] 中国抗癌协会肿瘤多学科诊疗专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤内分泌专业委员会. 肿瘤类器官诊治平台的质量控制标准中国专家共识(2022年版). 中国癌症杂志, 2022, 32(7):657-668.
- [5] 孙利兵, 杨文涛. 正常乳腺相关的组织学变化在病理诊断中的意义. 诊断病理学杂志, 2018, 25(5):380-383.
- [6] 国家药品监督管理局, 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 药物临床试验质量管理规范. 2020-04-23.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2020. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会医政医管局. 全国临床检验操作规程. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [9] Sachs N, de Ligt J, Kopper O, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell*, 2018, 172(1-2):373-386.e10.
- [10] Dekkers JF, van Vliet EJ, Sachs N, et al. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids. *Nat Protoc*, 2021, 16(4):1936-1965.
- [11] Rosenbluth JM, Schackmann RCJ, Gray GK, et al. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages. *Nat Commun*, 2020, 11(1):1711.
- [12] Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science*, 2019, 364(6444):952-955.
- [13] Guillen KP, Fujita M, Butterfield AJ, et al. A human breast cancer-derived xenograft and organoid platform for drug discovery and precision oncology. *Nat Cancer*, 2022, 3(2):232-250.
- [14] Mollica PA, Booth-Creech EN, Reid JA, et al. 3D bioprinted mammary organoids and tumoroids in human mammary derived ECM hydrogels. *Acta Biomater*, 2019, 95:201-213.
- [15] Campaner E, Zannini A, Santorsola M, et al. Breast cancer organoids model patient-specific response to drug treatment. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(12):3869.
- [16] Dekkers JF, Whittle JR, Vaillant F, et al. Modeling breast cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human breast organoids. *J Natl Cancer Inst*, 2020, 112(5):540-544.
- [17] Goldhammer N, Kim J, Timmermans-Wielenga V, et al. Characterization of organoid cultured human breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1):141.
- [18] Bhatia S, Kramer M, Russo S, et al. Patient-derived triple-negative breast cancer organoids provide robust model systems that recapitulate tumor intrinsic characteristics. *Cancer Res*, 2022, 82(7):1174-1192.
- [19] Yang L, Liu B, Chen H, et al. Progress in the application of organoids to breast cancer research. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(10):5420-5427.
- [20] Jin X, Ge LP, Li DQ, et al. LncRNA TROJAN promotes proliferation and resistance to CDK4/6 inhibitor via CDK2 transcriptional activation in ER+ breast cancer. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):87.
- [21] Yu J, Huang W. The progress and clinical application of breast cancer organoids. *Int J Stem Cells*, 2020, 13(3):295-304.
- [22] Goldhammer N, Kim J, Timmermans-Wielenga V, et al. Characterization of organoid cultured human breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1):141.
- [23] Hu L, Su L, Cheng H, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the cellular origin and evolution of breast cancer in *BRCA1* mutation carriers. *Cancer Res*, 2021, 81(10):2600-2611.