

T/CMBA

团 体 标 准

T/CMBA 017—2022

人胃肠上皮组织类器官的构建与保藏 操作指南

Guideline of construction and preservation of organoids of gastrointestinal epithelial
tissues

2022 - 3 - 28 发布

2022 - 3 - 28 实施

中国医药生物技术协会 发 布

目次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 通则	2
5 操作流程	2
5.1 组织获取和类器官构建	2
5.2 类器官的传代与冻存	2
5.3 类器官的复苏	3
5.4 废弃类器官处置	3
6 质量控制	3
附录 A（资料性） 胃肠上皮类器官培养用主要试剂材料与操作要点	4
A.1 主要试剂材料	4
A.2 类器官构建流程	4
A.3 胃肠上皮类器官培养操作要点	5
附录 B（资料性） 胃肠上皮类器官鉴定	6
B.1 类器官显微镜下状态评估	6
B.2 单细胞悬液细胞定量评估	6
B.3 细胞活力评估	6
B.4 类器官的形态学及免疫标记鉴定	6
附录 C（资料性） 类器官的核酸与蛋白质提取	7
C.1 DNA 提取	7
C.2 RNA 提取	7
C.3 蛋白质提取	8
参考文献	9

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。

本文件由中国医药生物技术协会组织生物样本库分会提出。

本文件由中国医药生物技术协会归口。

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。

本文件起草单位：上海交通大学医学院附属瑞金医院、生物芯片上海国家工程研究中心、上海芯超生物科技有限公司。

本文件主要起草人：于颖彦、向臻、臧潞、燕然林、杨蕊馨、关颖欣、朱正纲、郜恒骏、张小燕。

人胃肠上皮组织类器官的构建与保藏操作指南

1 范围

本文件描述了从人胃肠道上皮活组织及其上皮起源的病变活组织提取上皮细胞构建类器官的原理、实验方法、传代、储存以及复苏方法。

本文件适用于科研用胃肠道上皮活组织及其上皮起源的病变活组织类器官的培养、类器官传代、类器官储存和复苏。

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/T 38736-2020 人类生物样本保藏伦理要求

T/NAHIEM 6 医学研究伦理委员会通用要求

3 术语和定义

GB/T 38736-2020 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

胃肠道上皮或上皮来源的病变活组织类器官 organoids of gastrointestinal epithelium and epithelial lesions

由正常胃肠道上皮组织或由上皮来源的病变组织中的上皮干细胞或者多能干细胞通过体外诱导分化而来的，在细胞成分、组织架构及功能上与胃肠道正常上皮或者上皮来源病变组织具有相似性的 3D 微小活组织结构。

3.2

胃肠道类器官培养基 culture medium of gastrointestinal organoid

可以实现体外模拟胃肠道上皮组织细胞生长所需微环境，能诱导胃肠道干细胞和多能干细胞分化为各种类型的胃肠道上皮细胞，同时能够持续维持胃肠道干细胞和多能干细胞的特性，实现体外胃肠道活组织类器官的长期存活的培养介质。

3.3

3D 培养基质胶 matrigel matrix

由层黏连蛋白、IV 型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白等组成，加入有生长因子和基质金属蛋白酶。3D 培养基质胶在室温条件下能够聚合形成具有生物学活性的三维基质，模拟体内细胞基底膜结构和功能，能够为胃肠道黏膜上皮细胞的生长提供支架。

3.4

传代 passage

将培养状态良好的类器官采用物理吹打和化学酶消化方法使其解离为单细胞悬液,再重新接种于与原培养条件相同的培养体系内,继续进行类器官培养。新一代类器官与原来类器官具有相同的形态功能特征。

3.5

冻存 cryopreservation

使暂时不需要进行实验研究的类器官脱离生长状态,但又可以保持其细胞组成、形态和功能特征的低温冷冻过程。

3.6

复苏 thawing

将处于深低温冻存的类器官取出恢复其继续生长状态的过程。

3.7

知情同意 informed consent

与组织细胞提供者签署书面的合法有效的知情同意书,包括但不限于合适条件下潜在研究应用、研究成果潜在的商业应用及其他问题所适用的内容。

注:伦理要求与隐私保护见 GB/T 38736-2020 第 3.7 条。

4 通则

4.1 胃肠道上皮类器官采集与处理应获得伦理委员会审批。

4.2 组织采集前应签署知情同意书,应在充分告知、尊重提供者权利的前提下签署知情同意书。

4.3 组织的处理宜采用可操作性强、成功率高、结果稳定的方法。

4.4 胃肠道上皮类器官采集与处理应由接受过专业培训的医护人员/工作人员进行。

5 操作流程

5.1 组织获取和类器官构建

5.1.1 组织的获取

肿瘤组织切取时应避开有明显坏死的区域,且组织块应不小于 $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ 。新鲜组织应在离体 30 min 内切取。

5.1.2 组织的清洗

切取的组织应进行振荡清洗,去除污浊。

5.1.3 类器官的构建

可采用酶消化法将人胃肠道上皮组织或者上皮来源的病变组织酶解分散为单个细胞悬液,再将上皮细胞与基质胶混合后形成 3D 培养空间结构,加入适用于胃肠道上皮细胞生长的类器官培养基进行培养,从而使其分化长成与胃肠道上皮组织结构及功能类似的胃肠道活组织类器官。相关耗材和操作方法见附录 A。

5.2 类器官的传代与冻存

5.2.1 类器官传代

应选择合适的类器官进行科学实验或传代,一般为生长 2 周左右,达到一定数目和体积的类器官。

5.2.2 类器官冻存

暂不使用的类器官应按相关规程处理，加入冻存液后移入低温环境冻存。

5.3 类器官的复苏

类器官复苏遵循速融原则。使用 37℃ 水浴令其尽快融化，选择合适的培养基进行培养、传代。

5.4 废弃类器官处置

类器官构建和传代过程中产生的废弃物应严格按照生物样本处置与管理规范操作。对于不合格的或者污染的类器官细胞应遵循生物医疗废弃物处理规范丢弃到指定地点。

6 质量控制

类器官的质量控制有别于传统的细胞培养，其内容包括但不限于类器官小球生长活力评估、类器官细胞悬液数量评估、类器官单细胞悬液活力评估以及类器官免疫学标记物的表达评估等。类器官培养状态鉴定见附录 B。类器官相关实验用 DNA、RNA 与蛋白质提取操作见附录 C。

附录 A

(资料性)

附录 A 胃肠上皮类器官培养用主要试剂材料与操作要点

A.1 主要试剂材料

A.1.1 培养基主要构成

表A.1 胃肠道上皮类器官培养基的主要成分表

中文名称	英文名称
Wnt-3a*	Wnt-3a*
头蛋白*	Noggin*
表皮生长因子*	EGF*
Wnt 信号通路激活剂*	R-Spondin1*
纤维母细胞生长因子 10*	FGF10*
胃泌素 I*	Gastrin I*
培养基*	Advanced DMEM/F12*
N-乙酰半胱氨酸*	N-acetylcysteine*
丙氨酸和 L-谷氨酰胺缩合二肽培养基*	GlutaMAX*
细胞培养无血清添加剂*	Serum-Free B27*
青霉素/链霉素	Penicillin/streptomycin
原代细胞抗生素	Primocin
4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液	HEPES
TGFβ 抑制剂	TGFβ inhibitor A83-01
ROCK 抑制剂	ROCK inhibitor Y-27632
注：*：胃肠道上皮类器官培养基核心成分，其余试剂可视情况加減。	

A.1.2 类器官培养3D支架材料

3D 基质胶提取自基底膜的基质，主要由层黏连蛋白、IV 型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白等组成，还包含生长因子和基质金属蛋白酶等。基质胶在室温条件下聚合形成具有生物学活性的三维支架，模拟体内细胞外基质的结构、组成、物理特性和功能。该结构不仅有利于体外细胞的培养和分化，而且能够为胃肠道上皮细胞的生长提供支架。基质胶在零度以下低温环境呈液态，故凡是涉及基质胶的实验操作皆应置冰盒操作。

A.1.3 组织消化酶

胃肠上皮组织消化中涉及的消化酶主要有 IV 型胶原酶（collagenase IV）与透明质酸酶（hyaluronidase）。其作用是水解结缔组织中的基质和胶原蛋白成分，从而使胃肠道上皮细胞从组织中充分分离出来，以利于制备为单细胞悬液或细胞团。

A.1.4 类器官冻存液

类器官冻存液为无血清冻存液，一般宜含有 10% 的二甲基亚砜(DMSO)。

A.2 类器官构建流程

A.2.1 组织块的清洗

将组织块用不少于 5 ml 含有抗生素的 PBS 缓冲液浸泡，每隔 5~10 min 在振荡器上振荡清洗一次，弃污浊清洗液，加入前述清洗液继续振荡清洗，此步骤不少于 4 次，总计时长不少于 30 min。

A.2.2 组织细胞的消化

用组织剪将组织剪碎至 $0.5\text{ mm} \times 0.5\text{ mm}$ 大小，加入适量 IV 型胶原酶和透明质酸酶置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中消化。在胃肠上皮类器官构建中，通常是加入 1 ml 的 IV 型胶原酶 (1.5 mg/ml) 和透明质酸酶 ($20\text{ }\mu\text{g/ml}$)，然后置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中消化适当时间（一般在 2 h 以内）。

A. 2.3 组织细胞消化物的过滤

选用 $70\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 的细胞过滤器进行过滤，去除组织液内的残渣。收集过滤液至 15 ml 无菌离心管，离心 ($200 \times g$, 5 min) 组织细胞消化物，弃上清，保留沉淀物。

A. 2.4 重悬离心沉淀物

加入 $80\text{ }\mu\text{l}$ 的 Advanced DMEM/F12 培养基重悬沉淀物。可依据沉淀物的量适当调整培养基的量。

A. 2.5 类器官种板培养物制备

将细胞重悬液与 3D 培养基质胶按照 1:1 混合。

A. 2.6 类器官培养物接种细胞培养板

吸取适量种板培养物（一般在 $80\sim 100\text{ }\mu\text{l}$ ）滴加至 24 孔培养板中，根据种板培养物的量做 2~3 复孔种板。然后将 24 孔板置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 $20\sim 30\text{ min}$ ，待基质胶充分凝固后向每孔加入类器官培养基 $500\sim 800\text{ }\mu\text{l}$ 。

A. 3 胃肠上皮类器官培养操作要点

A. 3.1 类器官污染的处置

胃肠上皮类器官培养过程中应定期观察、拍照。一般在第 2 天于倒置显微镜下可以观察到类器官小球，随着培养时间延长，类器官小球逐渐增多、增大。定期观察有利于及时发现污染。如果在培养 3 天内出现基质胶浑浊，提示可能有真菌和细菌污染，应及时做丢弃处理。在类器官培养过程中也有可能出现支原体污染。支原体在培养基上呈现团状、小球状生长，容易与类器官混淆，但支原体在显微镜下观察不到上皮的组织细胞结构。若发现可疑支原体污染，可加入支原体去除剂进行挽救，支原体去除剂可以抑制并消除支原体的生长，若仍不能去除支原体污染则做丢弃处理。

A. 3.2 类器官培养物接种注意事项

将获取的细胞悬液与 3D 基质胶按照 1:1 混匀吹打，吹打过程中切忌产生大量气泡，以免影响后续培养物接种。24 孔板可提前于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱预热 30 min ，以加速 3D 基质胶的凝固。24 孔板在培养物接种后可向周围多余空白孔内加入适量 PBS 缓冲液，以减少类器官培养基孵育过程中的液体挥发，保持一定湿度。

A. 3.3 类器官传代注意事项

胃肠上皮类器官可以连续传代超过 10 代或持续培养 6 个月以上。与类器官有关的实验研究宜在连续传代 10 代以内或者持续培养 6 个月内进行。

A. 3.4 类器官冻存注意事项

冻存前将类器官吸至试管内，加入 1 ml 无动物源性重组胰蛋白酶，使其消化成单细胞悬液 ($1\sim 2\text{ h}$)， $200 \times g$ 离心 5 min 。弃上清后加入适量类器官冻存液混匀 (1 ml 左右)，分装于 $500\text{ }\mu\text{l}$ 低温冻存管中，放入程序性冻存盒内于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 深低温冰箱过夜保存，次日将冻存管转移至液氮罐中长期保存。

A. 3.5 类器官复苏注意事项

从液氮罐中取出的类器官冻存管应快速放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中令其尽快融化。吸出类器官冻存物移至 15 ml 无菌离心管中，再加入 10 倍体积的 Advanced DMEM/F12 培养基混匀。之后操作同前述的类器官传代培养过程。

附录 B
(资料性)
胃肠上皮类器官鉴定

B.1 类器官显微镜下状态评估

将类器官培养皿置于倒置显微镜下，在 20 倍视野下计数类器官数目。类器官数目不少于 60 个/视野表明类器官生长状态良好。生长活力好的类器官平均直径为 160~200 μl 。若个别类器官体积过大（可达 1000 μl ）则提示类器官趋向衰老，应尽早传代，以防止衰老的类器官影响传代。

B.2 单细胞悬液细胞定量评估

在类器官传代前应用重组胰酶消化成单细胞悬液。可使用自动化细胞计数仪进行计数。将离心后的细胞沉淀用 Advanced DMEM/F12 培养基重悬（约 100 μl ），经吹打混匀后吸取 10 μl 细胞悬液进行细胞计数，以活细胞比例 > 90% 表示制备的细胞活力良好。类器官单细胞悬液细胞数不宜低于 $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ 。

B.3 细胞活力评估

在缺乏全自动细胞计数仪时，可采取台盼蓝 (Trypan blue) 染色进行活细胞计数。将离心后的细胞沉淀用 Advanced DMEM/F12 培养基重悬（约 100 μl ），经吹打均匀后吸取 18 μl 置于 1.5 ml 的 EP 管，向 EP 管中加入 2 μl 中的 0.4% 的台盼蓝染液充分混匀，染色 3 min，取 10 μl 细胞悬液加入血细胞计数板，在倒置显微镜 10 $\times$ 物镜下计数，分别计数四大格中未染成蓝色和染成蓝色的细胞总数。利用如下公式计算每 100 μl 体积中细胞总数和细胞存活率：

总数/100 μl = [(未染成蓝色细胞数 + 蓝色细胞数)/4] $\times 10^3 \times 1.11$

细胞存活比例 = 未染成蓝色细胞数/(蓝色细胞数 + 未染成蓝色细胞数) $\times 100\%$

活细胞比率应 > 90% 可用于类器官细胞培养。

B.4 类器官的形态学及免疫标记鉴定

B.4.1 胃黏膜上皮形态学与免疫学标记鉴定

胃黏膜上皮或者胃癌类器官成功构建后，通过制备冰冻切片或者石蜡包埋切片，进行苏木素/伊红染色 (H&E) 进行形态学鉴定，通过免疫荧光或者免疫组化染色进行生物标志物检测，从而确定类器官是否来自腺上皮细胞。正常胃上皮可以不同程度地表达 CDH1、MUC5AC、MUC6、H⁺/K⁺ ATPase、PGC 和 GKN1；胃腺癌可以不同程度地表达 CEA、CK19、CDH1、PCNA 和 Ki67。SMA 为肌源性标志物，在胃上皮类器官与胃癌类器官不表达 SMA。

B.4.2 肠黏膜上皮形态学与免疫学标记鉴定

肠黏膜与肠癌类器官构建成功后，通过制备冰冻切片或者石蜡包埋切片，苏木素/伊红染色 (H&E) 进行形态学鉴定，通过免疫荧光或者免疫组化染色进行生物标志物检测。正常肠上皮可不同程度地表达 CK20、CDX1、MUC2、TFF3 和 CDH1；肠腺癌可不同程度地表达 CEA、CDX2、CK20、PCNA 和 Ki67。SMA 为肌源性指标作为内部参照，在肠上皮类器官与肠癌类器官不表达 SMA。

附录 C (资料性) 类器官的核酸与蛋白质提取

C.1 DNA 提取

- a) 类器官需要先消化制备为细胞悬液,然后在 $11\,200\times g$ 离心 1 min,弃上清,加 200 μl 悬浮细胞缓冲液 GA,振荡使细胞彻底悬浮;
- b) 加入 20 μl 蛋白酶 K (Proteinase K) 溶液,混匀;
- c) 再加入 200 μl 核酸与蛋白分离缓冲液 GB,充分颠倒混匀,70 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min,溶液应当变清亮,简短离心以去除管盖内壁的水珠;
- d) 加入 200 μl 无水乙醇,充分振荡混匀 15 s,此时可能会出现絮状沉淀,简短离心以去除管盖内壁的水珠;
- e) 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中(吸附柱放入收集管中), $13\,400\times g$ 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放回收集管中;
- f) 向吸附柱 CB3 中加入 500 μl 去除蛋白质杂质缓冲液 GD(已按照说明加入无水乙醇), $13\,400\times g$ 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放入收集管中;
- g) 向吸附柱 CB3 中加入 600 μl 去盐漂洗液 PW(已按照说明加入无水乙醇), $13\,400\times g$ 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放入收集管中;
- h) 重复操作步骤 g);
- i) 将吸附柱 CB3 放回收集管中, $13\,400\times g$ 离心 2 min,倒掉废液。将吸附柱 CB3 置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液;
- j) 将吸附柱 CB3 转入一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 ~ 200 μl 的 DNA 洗脱缓冲液 TE,室温放置 2 ~ 5 min, $13\,400\times g$ 离心 2 min,将溶液收集到离心管中。

C.2 RNA 提取

- a) 收集细胞:待类器官长到一定的数量后,将 24 孔板中的培养基去除,加入 1 ml 的 PBS 清洗 1 遍。去除 PBS 后,加入 1 ml 的无动物源性重组胰酶,并用 1 ml 量程的移液枪将基质胶打散,以利于消化酶与类器官进行充分的接触与消化。30 min 后,将细胞溶液转移至 RNase-Free 的离心管中离心 ($300\times g$, 5 min),收集细胞沉淀,仔细吸除所有上清;
- b) 裂解处理:轻弹离心管底部,使细胞沉淀松散,加入适量裂解液 RL (350 μl),旋涡振荡;
- c) 将所有溶液转移至过滤柱 CS 上(过滤柱 CS 放在收集管中), $13\,400\times g$ 离心 2 min,收集滤液;
- d) 向滤液中加入 1 倍体积 70% 乙醇(通常为 350 μl 或 600 μl),混匀(此时可能会出现沉淀),得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中(吸附柱 CR3 放入收集管中), $13\,400\times g$ 离心 30 ~ 60 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CR3 放回收集管中;
- e) 向吸附柱 CR3 中加入 350 μl 去蛋白液 RW1, $13\,400\times g$ 离心 30 ~ 60 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CR3 放回收集管中;
- f) DNase I 工作液的配制:取 10 μl DNase I 储存液放入新的 RNase-Free 离心管中,加入 70 μl 去除 DNA 缓冲液 RDD,轻柔混匀;
- g) 向吸附柱 CR3 中央加入 80 μl 的 DNase I 工作液,室温放置 15 min;
- h) 向吸附柱 CR3 中加入 350 μl 去蛋白液 RW1, $13\,400\times g$ 离心 30 ~ 60 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CR3 放回收集管中;
- i) 向吸附柱 CR3 中加入 500 μl 漂洗液 RW(按照说明加入乙醇),室温静置 2 min, $13\,400\times g$ 离心 30 ~ 60 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CR3 放回收集管中;
- j) 重复步骤 i);
- k) 离心 ($13\,400\times g$, 2 min),倒掉废液。将吸附柱 CR3 置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液;

- 1) 将吸附柱 CR3 转入一个新的 RNase-Free 离心管中, 加入 30 ~ 100 μ l RNase-Free ddH₂O 室温放置 2 min, 离心 ($13\,400 \times g$, 2 min), 得到 RNA 溶液。

C.3 蛋白质提取

- a) 收集细胞: 待类器官长到一定的数量后, 将 24 孔板中的培养基去除, 加入 1 ml 的 PBS 进行清洗 1 遍。去除 PBS 后, 加入 1 ml 的无动物源性重组胰酶, 并用 1 ml 量程的移液枪将基质胶打散, 以利于消化酶与类器官进行充分的接触与消化。30 min 后, 将细胞溶液转移至 RNase-Free 的离心管中离心 ($300 \times g$, 5 min), 收集细胞沉淀, 仔细吸除所有上清;
- b) 裂解处理: 轻弹离心管底部, 使细胞沉淀松散, 加入适量裂解液 RIPA (50 μ l/孔) 及蛋白酶抑制剂, 旋涡振荡, 将其转移至 EP 管中, 置于冰上裂解 30 min;
- c) 蛋白收集: 离心 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\,000 \times g$, 15 min), 收集上层蛋白溶液;
- d) 蛋白定量: 使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量;
- e) 蛋白变性: 加入适量上样缓冲液, 金属浴 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min, 使蛋白变性。
- f) 蛋白储存: 短期内使用蛋白可置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存, 长期储存置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

参 考 文 献

- [1] Seidlitz T, Merker SR, Rothe A, et al. Human gastric cancer modelling using organoids. *Gut*, 2019, 68(2):207-217.
- [2] Nanki K, Toshimitsu K, Takano A, et al. Divergent routes toward Wnt and R-spondin niche independency during human gastric carcinogenesis. *Cell*, 2018, 174(4):856-869.e17.
- [3] Bartfeld S, Bayram T, van de Wetering M, et al. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology*, 2015, 148(1):126-136.e6.
- [4] van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*, 2015, 161(4):933-945.
- [5] 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.
- [6] Yan HHN, Siu HC, Law S, et al. A comprehensive human gastric cancer organoid biobank captures tumor subtype heterogeneity and enables therapeutic screening. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6):882-897.e11.
- [7] Barker N, Huch M, Kujala P, et al. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(1):25-36.
- [8] Almqdadi M, Mana MD, Roper J, et al. Gut organoids: mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317(3):C405-C419.
- [9] Xiang Z, Zhou Z, Song S, et al. Dexamethasone suppresses immune evasion by inducing GR/STAT3 mediated downregulation of PD-L1 and IDO1 pathways. *Oncogene*, 2021, 40(3):5002-5012.
- [10] Engel RM, Chan WH, Nickless D, et al. Patient-derived colorectal cancer organoids upregulate revival stem cell marker genes following chemotherapeutic treatment. *J Clin Med*, 2020, 9(1):128.
-