

## 综述

## 视网膜母细胞瘤发生机制和肿瘤模型研究进展

车虹昱<sup>#</sup> 王祥<sup>#</sup> 杨春华 姜文国 米佳 田梗 齐东来<sup>\*</sup>

(滨州医学院药学院, 山东分子靶向智能诊疗技术创新中心, 烟台 264003)

**摘要** 视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是一种罕见的多发于儿童时期的视网膜肿瘤, 占儿童恶性肿瘤的2%~4%, 是眼部常见的原发肿瘤。全球新生儿RB发病率约为1/16 000, 且近年来发病率有所上升, 每年预计新增约8 000例。如果治疗不及时RB可能具有致死性, 其中低收入国家有70%的致死率。作为最早发现的有遗传病因的肿瘤, RB已经为人类认识肿瘤形成提供了很多视角, 如第一个肿瘤抑制基因(*RBI*)的鉴定。RB的发生起始于*RBI*基因的突变, 但初期形成的良性视网膜瘤(retinoma)向恶性肿瘤的转化机理仍有待明确。近期研究还发现RB很有可能源自视锥前体细胞。在肿瘤形成的诱发基因和起源细胞已知的情况下, 基于起源细胞构建肿瘤发生发展模型, 探究RB肿瘤发生发展的分子机制将为肿瘤早期诊断、预防和治疗提供潜在策略。

**关键词** 视网膜母细胞瘤; *RBI*; 肿瘤发生机制; 细胞起源; 肿瘤模型; 良性视网膜瘤

**Retinoblastoma: from Mechanisms of Tumorigenesis to Cancer Modeling**CHE Hongyu<sup>#</sup>, WANG Xiang<sup>#</sup>, YANG Chunhua, JIANG Wenguo, MI Jia, TIAN Geng, QI Donglai<sup>\*</sup>

(School of Pharmacy, Shandong Technology Innovation Center of Molecular Targeting and Intelligent Diagnosis and Treatment, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China)

**Abstract** RB (retinoblastoma) is a rare retinal tumor that is often diagnosed in the first a few years of life, accounting for 2%-4% of childhood malignancies. It is the most common childhood intraocular cancer, and about 8 000 children are newly diagnosed every year worldwide (1/16 000 live births). RB can be fatal if left untreated. The mortality rate is 70% in low- and middle-income countries. As the first identified cancer with genetic etiology, RB has provided many key insights on tumor formation, such as identification of the first tumor suppressor gene (*RBI*). RB initiates in response to biallelic loss of *RBI*, early proliferation may then trigger cellular senescence that leads to benign retinoma. However, the mechanisms underlying the eventual tumor formation remain unclear. It becomes increasingly clear that RB originates from cone precursors. Hence, a known initiating driver mutation and cell of origin make it possible to establish a RB model and dissect the molecular mechanism of tumorigenesis more precisely. These will finally contribute to early diagnosis, cancer prevention and development of potential therapeutic strategy.

**Keywords** retinoblastoma; *RBI*; tumorigenesis; cell origin; cancer modeling; retinoma

收稿日期: 2022-01-11

接受日期: 2022-04-17

泰山学者建设工程资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: 15298771930, E-mail: reticargenii@outlook.com

Received: January 11, 2022

Accepted: April 17, 2022

This work was supported by Taishan Scholars Construction Engineering

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-15298771930, E-mail: reticargenii@outlook.com

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是一种最常见的儿童眼内肿瘤, 其全球总体生存率小于 30%<sup>[1-2]</sup>, 早期诊断至关重要, 如果治疗及时这类肿瘤可以被治愈从而保住患者的眼球和视力。RB 一直以来被认为是一种经典的常染色体显性遗传疾病, 直到上世纪七十年代才发现视网膜母细胞瘤的发生是由双等位基因 *RB1* 的失活 (*RB1*<sup>-/-</sup>患者)<sup>[3]</sup> 诱发而形成的。在少数情况下, *MYCN*(*RB1*<sup>+/+</sup> *MYCN*<sup>A</sup>患者) 扩增也能引起 RB 肿瘤<sup>[4]</sup>。双等位基因 *RB1* 失活是诱导大多数视网膜母细胞瘤发生的必要条件, 但只有这样可能是不够的, 因为良性视网膜病变(视网膜瘤) 同样涉及两个 *RB1* 等位基因的丢失<sup>[5-6]</sup>, 其要发展成视网膜母细胞瘤, 还需要额外的改变, 虽然全基因组测序发现视网膜母细胞瘤中罕有除 *RB1* 外的其他基因突变<sup>[7]</sup>。哪些额外因素驱动了恶性 RB 的形成仍有待深入探究。

不同类型的细胞往往需要不同的基因缺陷诱导肿瘤形成, 探究这种现象发生的分子基础, 搞清肿瘤的起源细胞以及基因缺陷如何利用特定的细胞环境实现诱导癌化的过程, 将有助于准确鉴定肿瘤发生起始事件和从癌前病变到肿瘤形成过程中的后续基因变化, 从而促进针对特定肿瘤细胞的治疗方案开发。*Rb1* 突变小鼠曾被广泛用来研究 RB 的细胞起源, 但其肿瘤特征在很多方面和人视网膜母细胞瘤大相径庭, BOGENMANN 等<sup>[8]</sup> 发现人 RB 大量表达视锥体细胞 (cone) 标志物, 而小鼠 RB 则多呈现其他类型细胞的特征。近年来, 越来越多的证据支持 RB 来自视锥前体细胞。我们的研究证实, *RB1* 敲低能够诱导已分化视锥前体细胞的体外增殖, 而增殖细胞可以在原位移植的小鼠眼内形成肿瘤<sup>[9-10]</sup>。临床观察早期发现的小肿瘤很多都更集中在外核层 (outer nuclear layer, ONL)<sup>[11]</sup>, 这也与 RB 起源于视锥前体细胞的结论相吻合。研究发现有一例很小的肿瘤似乎以内核层 (inner nuclear layer, INL) 为中心<sup>[12]</sup>, 可能的解释是 RB 功能缺失的视锥前体细胞移动到了内核层, 内核层的血管和星形细胞能够促进肿瘤细胞生长<sup>[13]</sup>。

肿瘤模型是肿瘤生物学研究的重要工具, 构建一个能够有效模拟肿瘤发生发展过程的模型是探究肿瘤形成分子机制的关键, 也为药物和疗法开发测试提供平台。RB 由单一基因突变诱发, 对于模型构建研究来说是一个很好的模式肿瘤。遗传工程改造小鼠模型广泛应用于肿瘤研究, 利用该模型能

够追踪肿瘤发生发展全过程, 但 *Rb1* 突变并不会导致小鼠形成视网膜肿瘤, 而是形成垂体瘤和甲状腺 C 细胞癌<sup>[14]</sup>, *Rb1* 突变结合 *Rb* 相关基因突变后能够导致视网膜肿瘤形成, 但这些肿瘤在很多方面不同于人视网膜母细胞瘤。异种移植 (xenograft) 模型也有广泛的应用, 但通常植入的是完全转化的细胞或长时间培养后的细胞系, 这类细胞系难以模拟肿瘤形成早期的状态, 然而使用稳定细胞系也有同样的问题。近年来, 通过胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 或人工诱导多潜能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 诱导视网膜类器官形成的研究有很大进展, 基于类器官的 RB 肿瘤模型, 也为肿瘤发生过程的研究提供了一个全新的角度<sup>[15-17]</sup>。我们实验室通过直接操作人胚胎视网膜细胞, 构建 RB 肿瘤模型, 这些模型与人 RB 的很多特征相似<sup>[10,18]</sup>, 基于它们的后续研究对阐明 RB 肿瘤发生机制和细胞起源具有重要意义 (尚未发表数据)。

## 1 视网膜母细胞瘤形成的分子基础

上世纪七十年代人们通过对 RB 遗传机制的研究提出了肿瘤抑制基因失活的 Two-Hit 理论: 遗传性 RB 的发生来自一个遗传自生殖细胞的基因突变和一个后期获得的体细胞突变, 而非遗传性 RB 需要细胞中一个肿瘤抑制等位基因的两个体细胞突变<sup>[19]</sup>。后来的研究在肿瘤样本中发现了 13 号染色体 13q14 的部分丢失, 和一个病例中 *RB1* 外显子序列的缺失, 这些最终导致了 *RB1* 基因的克隆<sup>[20]</sup>。*RB1* 是最早被发现的肿瘤抑制基因之一, 是细胞增殖的关键调控因子, 其产物 RB 蛋白在大多数癌症中都有功能失活情况<sup>[21-23]</sup>。RB 通过调节 E2F 转录因子的活性来调节细胞周期进程中的 G<sub>1</sub>/S 转变<sup>[24]</sup>。细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin dependent kinases, CDKs) 使 RB 磷酸化, 导致 RB 从 E2F 上解离, 并解除 RB 对 E2F 功能的抑制作用<sup>[25]</sup>。除了调节细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期的过程外, RB 还参与了其他细胞过程, 包括调节细胞凋亡、细胞终末分化和肿瘤形成<sup>[1,26-28]</sup>。

对于绝大多数视网膜母细胞瘤发生, *RB1* 等位基因的失活是必需条件, 但很可能是不足够的。在一些临床样本中发现了和恶性肿瘤同时存在的良性视网膜瘤 (retinoma), 良性视网膜瘤中也存在 *RB1* 等位基因的缺失<sup>[6,29-30]</sup>, 并高表达细胞衰老相关的标志物 p16 和 p130 等<sup>[6]</sup>。因此, 可能的情况是已经分化的

表1 导致RB形成的备选癌基因和肿瘤抑制基因

Table 1 Candidate oncogenes and tumor suppressor genes in RB

备选基因 Candidate genes	基因组变异 Genomic changes	参考文献 References
<i>KIF14</i> , <i>MDM4</i>	chr.1q gain	[33-34]
<i>MYCN</i>	chr.2p gain	[35]
<i>E2F3</i> , <i>DEK</i> , <i>ID4</i> , <i>SOX4</i>	chr.6p gain	[36]
microRNA clusters miR-106b-25	chr.7q gain	[2]
microRNA clusters miR-17-92	chr.13q gain	[2]
<i>RBL2</i> , <i>CDH11</i>	chr.16q loss	[37-38]
<i>BCOR</i>	chr.Xp gain	[7]
<i>CREBBP</i>	chr.16p gain	[39]

胚胎视网膜细胞在RB功能丢失后重新回到细胞循环开始初期增殖,绝大多数增殖细胞随即启动p53介导的监察机制而退出细胞循环进入衰老(即良性瘤)状态,以此防止肿瘤的发生。某些细胞则可能由于RB丢失导致的基因组不稳定或表观遗传失调而逃脱衰老状态,进而无限增殖形成肿瘤。

因而,了解促进初期增殖细胞进入或跨过视网膜瘤阶段的关键因素至关重要。这些因素包括了基因组和表观遗传的改变。基因组的改变主要集中在染色体1q、2p、6p、7q和13q的获得以及16q的丢失<sup>[31-32]</sup>上,染色体获得所涵盖的备选致癌基因包括位于chr.1q32上的*KIF14*<sup>[33]</sup>、*MDM4*<sup>[34]</sup>,位于chr.2p24上的*MYCN*<sup>[35]</sup>,位于chr.6p22上的*E2F3*、*DEK*、*ID4*、*SOX4*<sup>[36]</sup>,以及分别位于chr.7q22和chr.13q31上的致癌microRNA clusters miR-106b~25和miR-17~92<sup>[2]</sup>。染色体16q的丢失涉及肿瘤抑制基因*RBL2*(chr.16q12)<sup>[37]</sup>和*CDH11*(chr.16q22)<sup>[38]</sup>(表1)。全基因组和外显子测序发现视网膜母细胞瘤中除了*RB1*外,其他的基因突变非常少见,*BCOR*<sup>[7]</sup>和*CREBBP*<sup>[39]</sup>分别在10%~13%和4%的视网膜母细胞瘤中发生突变<sup>[7,39]</sup>。近期一项对32例儿童肿瘤的测序分析中发现,在41%的样本中存在除*BCOR*外的突变,包括*ARID1A*、*MGA*、*FAT1*和*ATRX*突变<sup>[40]</sup>。ZHANG等<sup>[7]</sup>还发现在一些肿瘤样本中检测不到基因突变,这暗示很多突变可能并不是肿瘤形成的驱动因素,而是在肿瘤后续发展过程中获得的<sup>[41]</sup>。表观遗传的改变可能通过诱导*H3K4*的三甲基化以及*H3K9*和*H3K14*的乙酰化促进致癌基因*SYK*的高表达<sup>[7]</sup>。以上是一些当前技术条件下发现的相对高频率的基因变化,所有这些基因变化当中除*RB1*缺失外哪些真正驱动了肿瘤发生(driver mutations),哪

些是肿瘤发展进化过程中由于基因组的不稳定和快速增殖而获得的改变(passenger mutations)是今后研究的主要方向之一。RB家族基因除了*RB1*(又称*p105*)外,还包括*RBL1*(又称*p107*)和*RBL2*(又称*p130*)。它们序列相似,都参与调节细胞循环,抑制肿瘤发生,但在人体细胞中这些家族基因之间似乎并不构成冗余基因,功能不完全相同<sup>[42-43]</sup>。它们最初被发现都和DNA肿瘤病毒致癌蛋白SV40大T抗原、腺病毒E1A和人乳头瘤病毒E7结合在一起<sup>[44]</sup>,这种结合抑制了它们的肿瘤抑制基因的功能而促进了肿瘤形成。人RB中p130丢失很常见,而p107丢失很罕见<sup>[45]</sup>。XU等<sup>[10]</sup>发现,RB的起源细胞(视锥前体细胞)有丰富的p130和很少的p107表达,而在由*RB1*敲低诱导的视锥前体细胞增殖中,p130有抑制作用,相反,p107则促进这种细胞增殖,这些可能说明人RB中*p130*作为肿瘤抑制基因存在而*p107*则发挥癌基因功能。如前所述,良性视网膜瘤高表达细胞衰老标志物p130,在*RB1*丢失后,p130可能与p16INK4等相互作用,介导G<sub>1</sub>期细胞循环捕获导致细胞衰老从而抑制肿瘤发生。我们通过构建RB肿瘤发生模型证实了相关推测,*RB1*敲低诱导正常胚胎视网膜细胞增殖并最终使肿瘤形成,形成的早期肿瘤中p130表达显著下调,说明在某些细胞中*RB1*的敲低可致p130表达量降低,使得这些细胞获得了逃脱生长捕获的能力,最终形成能够持续稳定增殖的肿瘤细胞。*RB1*和p130共同敲低也能够诱导肿瘤形成,而且*RB1*敲低和*RB1/p130*共敲低这两种肿瘤的细胞形态和基因表达谱非常相似,暗示*RB1*敲低和*RB1/p130*共敲低能够诱导同一类型肿瘤的形成。因此,在人RB的形成过程中*p130*可能是除*RB1*外的第二个驱动突变基因之一。



## 2 视网膜母细胞瘤的细胞起源

肿瘤的起源细胞一直是癌症研究的难点。研究通常从中晚期肿瘤中表达的标记物出发寻找起源细胞, 常用材料包括实验室条件下经过长期传代培养形成的稳定细胞系或来自于病人的肿瘤样本。它们很多都是已经发展到一定阶段的肿瘤, 很多又经过了疗法处理, 难以准确反映肿瘤形成之初的状态, 而且癌细胞本身从最初的正常细胞状态到疾病状态也经历了细胞转化过程。因此这类研究的结论经常是有争议的。

视网膜是由视网膜多能干/祖细胞分化发育成的视锥感光细胞、视杆感光细胞、水平细胞、双极细胞、无长突细胞、神经节细胞和Müller胶质细胞这7种细胞组成的<sup>[46]</sup>。祖细胞具有多能性, 如果RB来自祖细胞, 这似乎合理解释了不同病人或同一个肿瘤表达多种视网膜细胞标志物的特点。在早期的小鼠研究中的确发现, *Rb1*失活的分裂期祖细胞形成了多位点侵入式的视网膜母细胞瘤, 这些肿瘤表达大量祖细胞标志物和分化标志物<sup>[47]</sup>。然而, CHEN等<sup>[48]</sup>报道小鼠视网膜中*Rb1*和*p107*的特异性缺失可导致水平细胞和无长突细胞的增殖, 并最终在60%的受试小鼠眼睛中形成有无长突细胞特征的肿瘤。MACPHERSON等<sup>[49]</sup>也得到了类似结论: *Rb1/p130*突变的小鼠视网膜可形成与*Rb1/p107*敲除相似的肿瘤, 且这两类肿瘤都具有水平细胞和无长突细胞的分化特征。另外一项值得一提的研究发现, 在*Rb1*和*p130*都缺失而保留一个拷贝*p107*的小鼠中, 水平前体细胞似乎在经历末端分化的同时仍保留增殖能力, 并且该小鼠与*Rb1/p107*缺失以及*Rb1/p130*缺失小鼠相比可更早地形成肿瘤<sup>[50]</sup>。Müller胶质细胞也是可能的视网膜母细胞瘤起源细胞, GARLLIE等<sup>[51]</sup>的研究通过在鼠视网膜中特异性表达SV40大T抗原抑制RB蛋白的表达, 从而形成具有分化的Müller胶质细胞特征的视网膜肿瘤。小鼠事实上并不是阐释人RB细胞起源的良好模型, 因为*Rb1<sup>+/+</sup>*小鼠并不自发形成RB, 而是形成垂体瘤和甲状腺C细胞癌<sup>[44]</sup>, *Rb1<sup>+/+</sup>*小鼠需要额外的Rb家族基因失活等其他因素才能诱发RB, 且形成的RB中视网膜细胞表达谱也不同, 人RB大量表达视锥体细胞标志物, 小鼠RB则多表达内核层神经元标志物。此外, 人RB的组织学染色往往呈现Flexner-Wintersteiner花结, 它是RB肿瘤的特征, 其他类型人类肿瘤不形成这类结构。小鼠RB则缺乏Flexner-Wintersteiner花结, 而形成Homer-Wright花结,

且Homer-Wright花结在小鼠中并不是RB特有的, 在大多数神经肿瘤中都存在<sup>[18]</sup>。这些都暗示人体中对*RBI*功能缺失异常敏感的细胞和小鼠中的细胞不同, 或者*RBI*基因在人和小鼠中有不同的功能。

与成人肿瘤不同, 儿童肿瘤的形成往往需要较少的基因突变, 这可能暗示肿瘤起源细胞已经存在某些类似肿瘤的特征。有趣的是, 视锥前体细胞虽已从细胞循环退出并分化, 但却高表达致癌蛋白MDM2和MYCN<sup>[9]</sup>。MYCN的表达通常在发育期的视网膜中上调以促进正确的细胞生长和增殖, 一旦细胞成熟MYCN表达量就会下降以维持细胞稳态平衡。在这一点上视锥前体细胞显然是特殊的, 这可能使其在RB1功能丧失时更易被转化而诱发肿瘤形成。早期研究发现, 人RB细胞培养物表达视锥体细胞标志物的RNA<sup>[8]</sup>, 并且具有视锥体细胞而不是视杆细胞的光传导能力<sup>[52]</sup>。RB肿瘤在视网膜上的分布有类似于L/M视锥体细胞分布的水平视觉条纹特征<sup>[53]</sup>, 这暗示了视锥前体细胞作为RB起源细胞的可能性。很多视锥前体细胞还有很高的MDM2表达水平, 这有可能是视网膜母细胞瘤通常保有野生型*p53*的潜在原因之一。正常情况下RB抑制转录因子E2F的表达, RB丢失则激活E2F, 从而诱导其靶标ARF的表达, 高表达的ARF抑制MDM2并上调*p53*, 从而促进了*p53*介导的程序性细胞死亡, 防止了肿瘤的形成<sup>[54]</sup>。与此一致的是, 研究发现良性视网膜瘤中确实存在ARF的高表达<sup>[6]</sup>。而视锥前体细胞中异常高表达的MDM2可能破坏了ARF诱导的程序性细胞死亡从而导致了肿瘤的形成。XU等<sup>[9]</sup>发现, RB中视锥细胞特异性转录因子RXR $\gamma$ 调节MDM2的表达, 这可能是MDM2在视锥前体细胞中高表达的原因之一。更有趣的是, 研究表明RB中MDM2可促进MYCN蛋白的翻译过程<sup>[55]</sup>, 这些研究解释了作为已分化的视锥前体细胞为什么高表达致癌蛋白MDM2和MYCN。RB在发育期视网膜中广泛表达以确保视锥前体细胞及时退出细胞循环完成末端分化, 人视觉小窝分化中的视锥前体细胞与其他类型视网膜细胞相比存在更高的RB表达水平<sup>[56]</sup>, 这也暗示这种细胞更需要RB以保证具有潜在“癌化”特征的细胞能够正常分化, 防止它们异常增殖。RB源自于视锥前体细胞的更直接证据来自于诱导胚胎视网膜细胞形成肿瘤的实验<sup>[10]</sup>, 该实验中*RBI*的敲低能够诱导分化的视锥前体细胞增殖, 而Müller胶质细胞和祖细胞在*RBI*敲低后会很快进入程序性细胞死亡, 其他类型细

胞则维持原有分化状态。一些增殖的视锥前体细胞在原位异种移植实验中形成有分化特征的RB。随后, SINGH等<sup>[18]</sup>通过在体外整体培养的人胚胎视网膜组织中敲低*RBI*诱导了肿瘤的发生,发现RB缺失可导致成熟中的视锥前体细胞形成肿瘤,并揭示了组织发育阶段在肿瘤发生中的重要性。近期, LIU等<sup>[19]</sup>通过基因编辑在人胚胎干细胞中功能突变或敲除*RBI*基因,诱导胚胎干细胞分化形成视网膜类器官,*RBI*缺失的类器官最终形成肿瘤,且单细胞RNA测序分析也提示这些肿瘤可能来自于成熟中的视锥前体细胞。我们基于人胚胎视网膜细胞构建的RB1敲低和RB1/p130共敲低离体肿瘤在形成早期和近1年的长期培养中均持续表达视锥前体细胞标志物,这为阐明人RB的视锥细胞起源提供了更加有力的证据(尚未发表数据)。

### 3 视网膜母细胞瘤的肿瘤研究模型

癌症被认为是基因组异常引发的疾病。基因的突变、异常的表现遗传调节导致正常细胞转化,形成恶性肿瘤。生命过程中的各种因素诱导本来正常的野生型细胞积累基因突变,当然也有遗传而来的某些倾向于诱发肿瘤的突变,例如*RBI*。随着大规模测序技术广泛用于肿瘤研究,我们认识到肿瘤基因组的复杂性甚至是杂乱性,从大量基因突变中准确鉴定肿瘤发生的驱动因素,是探究肿瘤发生机制、寻找早期诊断靶标和疗法干预靶标的关键所在。构建一个能够准确模拟肿瘤发生过程、可追踪且易于操作的体外模型可以帮助鉴定这些基因突变事件在肿瘤形成过程中的发生顺序。

迄今为止的很多RB研究使用了商业渠道购买或者实验室培养病人肿瘤样本建立的细胞系,比较常见的包括Y79、Weri-1等。然而这些稳定细胞系都经历了实验室培养条件下的长期筛选而产生了和初代RB肿瘤相比显著的变化<sup>[57]</sup>。URI等<sup>[58]</sup>对来自两个顶级实验室的106个人类细胞系进行了综合基因组分析,发现同一细胞系的不同培养物之间发展出了广泛的基因组差异,而且基因组的变化与基因表达程序的差异性激活相关并影响了细胞的形态和生长。这可能是很多已发表实验结果无法重复的潜在原因之一。来自RB患者的肿瘤样本是另一常见的实验材料来源,对它们的分析直接提供了大量癌症基因组相关数据,然而从摘除的眼球中分离得到的肿瘤往往都代表了肿瘤发展的高级阶段,很

多经历过激光、化学等疗法的处理,难以从中得出关于初期肿瘤发生机制的可信结论。这种模型的另一个问题是样本往往只能在眼球摘除后获得,这限制了它的广泛应用。尽管如此,基于这些病人肿瘤样本构建的异种移植模型对于研究肿瘤的后期发展、转移以及药物等疗法处理仍具有很高价值。

成人肿瘤相对复杂,通常由多个驱动基因突变相互作用而诱发。儿童肿瘤的基因组往往很干净,呈现较少的突变。至今为止的大量证据表明,单一基因*RBI*的突变会导致视网膜母细胞瘤形成,因而通过定向操作基因突变,构建肿瘤发生模型,诱导人工肿瘤的工作就显得非常有吸引力。遗传工程小鼠对于肿瘤生物学研究是很好的模型,能够追踪肿瘤发生发展演化的全过程,也可整体测试模型对于药物疗法的反应,加上RB由单个基因突变诱发,与多基因突变肿瘤构建相比受发育阶段因素影响较小,因此上世纪八九十年代很多实验室进行了RB小鼠模型构建工作,其中的3个实验室随后发现,与人不同,*Rb1*杂合体小鼠由于家族基因*p107*或*p130*的功能互补作用并不能形成视网膜母细胞瘤<sup>[59-63]</sup>。*Rb1/p107* DKO、*Rb1/p130* DKO、*Rb1/p107/p130* TKO等缺陷型小鼠则可以不同频率形成肿瘤<sup>[64]</sup>,肿瘤抑制基因*p53*或*Pten*的失活和*MDM4*的过表达均可以加快肿瘤形成过程<sup>[64-65]</sup>。然而,如前所述,这些小鼠RB模型在组织学形态、细胞起源、基因表达谱等诸多层面与人RB有很大差异,目前看来它们并不能成为人RB肿瘤生物学研究的良好模型。另外,人视网膜母细胞瘤中存在很少的一类肿瘤保有野生型*RBI*基因,而*MYCN*的扩增诱导了该肿瘤的形成<sup>[66]</sup>。TRAN等<sup>[67]</sup>发现,在人胚胎视网膜的完整培养物中过表达*MYCN*的确可以诱导视锥前体细胞扩增形成肿瘤,而在小鼠视网膜细胞中过表达*Mycn*却不能形成肿瘤,需要在*Rb*丢失的情况下*Mycn*才会诱导肿瘤发生<sup>[68]</sup>。这进一步说明在RB形成方面小鼠与人存在很大不同,难以通过小鼠模型模拟人RB的肿瘤发生。

人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)具有无限的自我增殖能力和分化成任何类型细胞的潜力,为研究发育和疾病形成过程提供了很好的平台。hPSCs包括人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)和诱导多能干细胞(iPSCs)。近年来很多研究尝试使hPSC分化形成视网膜类器官,模拟RB发生过程。AVIOR等<sup>[69]</sup>利用CRISPR/Cas9介导的



基因编辑构建 *RB1* 缺失的 hESCs 克隆, 诱导了畸胎瘤 (Teratoma) 的发生, 该肿瘤带有延展的神经结构, 这种结构与三侧 (trilateral) RB 肿瘤中的颅内神经肿瘤很相似, 然而该研究没有进行视网膜的分化实验, 该模型能否模拟 RB 肿瘤形成仍是个疑问。另一个相似的研究中, ZHENG 等<sup>[15]</sup>将 *RB1* 敲除的 hESC 分化成视网膜类器官, 发现 *RB1* 的缺失促进了类器官细胞进入 S 期并增殖, 但增殖的细胞随后产生了广泛的细胞凋亡, 在体外或免疫缺陷小鼠的玻璃体中不会导致视网膜母细胞瘤的形成, 暗示仅 *RB1* 缺失不足以导致肿瘤的形成。然而, 随后的一项研究在相同的 hESC 细胞系 H9 中突变或敲除 *RB1* 并使该细胞分化形成视网膜类器官, 而这些类器官在体外培养后期发育出和人 RB 在组织结构、基因表达谱等方面相似的肿瘤<sup>[16]</sup>。值得一提的是, 这两项研究虽然都使用了日本科学家 SASAI 实验室<sup>[70]</sup>建立的 3D 视网膜类器官诱导方法, 但 ZHENG 等<sup>[15]</sup>的研究在 SASAI 方法基础上作了改进以提高类器官形成的效率。胚胎干细胞分化过程中的很多信号通路和肿瘤发生相关, 而该研究中 *RB1* 缺失未能形成肿瘤是否与分化方法改进有关仍是一个潜在需要探讨的问题。2007 年 YAMANAKA 等<sup>[71]</sup>向世界展示了实验室条件下通过体外操作表达 4 个转录因子将已分化体细胞重编程诱导形成 iPSCs 的研究, 整个科学界对这个重大突破感到兴奋, 因为 iPSCs 可以不受限地产生病人个体特异的各种细胞类型用于再生医疗。在基础研究方面, 通过诱导 iPSCs 分化可以解析早期胚胎发育机制, 模拟针对特定病人和特定基因突变的疾病表型, 探索疾病成因。这同时也避免了使用胚胎干细胞的相关研究所带来的伦理方面的问题。最近, NORRIE 等<sup>[17]</sup>利用 15 位携带生殖系 *RB1* 突变的遗传性 RB 受试者皮肤或外周血细胞诱导 iPSCs, 使其分化形成视网膜类器官, 并将体外培养 45 天后的类器官细胞移植入小鼠玻璃体中, 发现与人 RB 样本有相似分子、细胞、基因组和表观遗传特征的肿瘤 1 年后在个别株系中形成。值得一提的是, 该研究还修

复了两个 iPSCs 株系中的生殖系 *RB1* 突变, 发现它们最终没能导致肿瘤形成, 这似乎暗示 *RB1* 丢失足以诱导肿瘤形成, 然而潜在问题之一是: 这两个携带生殖系 *RB1* 突变的 iPSCs 株系中的一个本身并没有自发地形成肿瘤。因而, 基于该研究推断 *RB1* 丢失足以诱导 RB 肿瘤形成仍缺乏足够证据。前面两项同样通过 *RB1* 缺失的 H9 细胞诱导肿瘤的研究产生了相反的结果, 更增加了业内对这一问题长期以来的疑问: *RB1* 丢失是否足以诱导肿瘤形成? 对于这类探究肿瘤形成机制的研究, 受试样本是否更接近肿瘤形成的真实环境至关重要, 基于 hESCs 和 iPSCs 的诱导分化等涉及大量体外操作的模型显然存在各种不确定因素, 而且目前诱导得到的视网膜类器官通常难以形成不同神经的丛状层结构 (OPL、IPL), 且光受体不能有效产生外节段以进行光检测, 因此类器官难以准确模拟生物视网膜。人的胚胎视网膜虽然材料较难获得, 但为肿瘤形成的研究提供了更趋近于真实情况的环境, 基于此的相关研究也揭示了目前被广泛认可的 RB 的视锥前体细胞起源理论和人特异的视网膜发育阶段在肿瘤发生中的重要性<sup>[10,18]</sup>。我们实验室的研究以人胚胎视网膜为基础 (图 1), 通过慢病毒感染敲低或过表达 RB 样本中反复出现的驱动突变事件, 诱导已分化细胞重新进入细胞循环, 进而使其开始初期增殖, 并持续培养增殖细胞得到具有无限增殖能力的早期肿瘤培养物, 以获取不同时期的肿瘤样本, 构建完整的肿瘤发生模型。这使得我们有能力对这些早期样本进行基因组、转录组和蛋白组等的相关分析, 通过对比病人肿瘤样本, 鉴定肿瘤形成中的驱动事件以及事件的发生顺序, 更准确地探究肿瘤发生发展以及后期演化的分子机制。目前我们成功构建了几种针对不同基因的肿瘤模型, 通过对前面提到的两种模型 (*RB1* 敲低和 *RB1/p130* 共敲低) 的研究我们得到了充分的证据支持: *RB1* 自身的敲低能够在体外诱导视网膜肿瘤形成。虽然 *RB1* 缺失不足以诱导肿瘤, 但 *RB1* 敲低介导的 *p130* 表达下调可能是肿瘤形成的驱动事件之一, 这

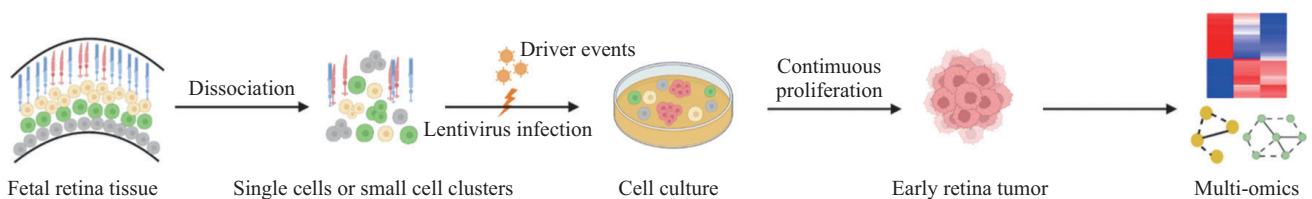


图1 基于人胚胎视网膜的RB肿瘤模型构建

Fig.1 Establishment of an *in vitro* RB model using fetal retina

与p130在很多RB样本中呈现低表达相吻合(尚未发表数据)。这些结果体现了基于胚胎视网膜的模型在肿瘤发生机理研究中的重要价值。尽管如此,需要说明的是这些模型也存在可能的问题,比如,研究过程中需要将视网膜从眼底结构中剥离,并将细胞通过胰酶等处理打散后,在普通细胞培养条件下用于慢病毒感染操作,这使得不同神经元细胞失去了相互间以及与胶质细胞间的作用,而胶质细胞可能为肿瘤细胞的生长提供微环境,这可能会导致肿瘤模型与人RB之间的差异。建立和完善基于3D技术的整体视网膜培养方法可能会在这方面有所帮助。此外,目前的肿瘤诱导效率较低,可能的原因是*RBI*敲低水平不足,人视网膜形成肿瘤需要缺失两个*RBI*等位基因。通过CRISPR介导的基因编辑敲除*RBI*或引入功能丧失突变将促进这一问题的解决。

#### 4 总结与展望

综上,基于发育中的人胚胎视网膜细胞,构建一个实验室条件下易于操作的RB肿瘤形成平台将是未来RB机理研究的方向之一。通过这类平台,可以在不同的时间和空间背景下,测试各种已知的基因突变和表观遗传改变事件,并追踪事件发生过程及发生后视网膜细胞的后续反应。这类平台的建立将使我们能够更加准确地解析RB发生发展和进化的分子机制,并最终构建一个有效的、针对肿瘤发展不同阶段的药物筛选和疗法开发平台。

#### 参考文献 (References)

- [1] DIMARAS H, KIMANI K, DIMBA E A, et al. Retinoblastoma [J]. *Lancet*, 2012, 379(9824): 1436-46.
- [2] DIMARAS H, CORSON T W, COBRINIK D, et al. Retinoblastoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15021.
- [3] KNUDSON A G, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68(4): 820-3.
- [4] RUSHLOW D E, MOL B M, KENNETT J Y, et al. Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: genomic, gene expression, and clinical studies [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(4): 327-34.
- [5] THERIAULT B L, DIMARAS H, GALLIE B L, et al. The genomic landscape of retinoblastoma: a review [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 42(1): 33-52.
- [6] DIMARAS H, KHETAN V, HALLIDAY W, et al. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma [J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(10): 1363-72.
- [7] ZHANG J, BENAVENTE C A, MCEVOY J, et al. A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses [J]. *Nature*, 2012, 481(7381): 329-34.
- [8] BOGENMANN E, LOCHRIE M A, SIMON M I. Cone cell-specific genes expressed in retinoblastoma [J]. *Science*, 1988, 240(4848): 76-8.
- [9] XU X L, FANG Y, LEE T C, et al. Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1018-31.
- [10] XU X L, SINGH H P, WANG L, et al. Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours [J]. *Nature*, 2014, 514(7522): 385-8.
- [11] BERRY J L, COBRINIK D, KIM J W. Detection and intraretinal localization of an 'Invisible' retinoblastoma using optical coherence tomography [J]. *Ocul Oncol Pathol*, 2016, 2(3): 148-52.
- [12] ROOTMAN D B, GONZALEZ E, MALLIPATNA A, et al. Hand-held high-resolution spectral domain optical coherence tomography in retinoblastoma: clinical and morphologic considerations [J]. *Br J Ophthalmol*, 2013, 97(1): 59-65.
- [13] XU X L, LEE T C, OFFOR N, et al. Tumor-associated retinal astrocytes promote retinoblastoma cell proliferation through production of IGFBP-5 [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(1): 424-35.
- [14] HU N, GUTSMANN A, HERBERT D C, et al. Heterozygous Rb-1 delta 20/+ mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance [J]. *Oncogene*, 1994, 9(4): 1021-7.
- [15] ZHENG C, SCHNEIDER J W, HSIEH J. Role of RB1 in human embryonic stem cell-derived retinal organoids [J]. *Dev Biol*, 2020, 462(2): 197-207.
- [16] LIU H, ZHANG Y, ZHANG Y Y, et al. Human embryonic stem cell-derived organoid retinoblastoma reveals a cancerous origin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(52): 33628-38.
- [17] NORRIE J L, NITYANANDAM A, LAI K, et al. Retinoblastoma from human stem cell-derived retinal organoids [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4535.
- [18] SINGH H P, WANG S, STACHELEK K, et al. Developmental stage-specific proliferation and retinoblastoma genesis in RB-deficient human but not mouse cone precursors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(40): E9391-E400.
- [19] COMINGS D E. A general theory of carcinogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70(12): 3324-8.
- [20] BERRY J L, POLSKI A, CAVENEE W K, et al. The RB1 story: characterization and cloning of the first tumor suppressor gene [J]. *Genes*, 2019, 10(11): 879.
- [21] BOOKSTEIN R, LEE W H. Molecular genetics of the retinoblastoma suppressor gene [J]. *Crit Rev Oncog*, 1991, 2(3): 211-27.
- [22] MARSHALL C J. Tumor suppressor genes [J]. *Cell*, 1991, 64(2): 313-26.
- [23] WEINBERG R A. The retinoblastoma protein and cell cycle control [J]. *Cell*, 1995, 81(3): 323-30.
- [24] NEVINS J R. The Rb/E2F pathway and cancer [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(7): 699-703.
- [25] SHELDON L A. Inhibition of E2F1 activity and cell cycle progression by arsenic via retinoblastoma protein [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(21): 2058-72.
- [26] SACHDEVA U M, O'BRIEN J M. Understanding pRb: toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(2): 425-34.
- [27] YANG Q E, GWOST I, OATLEY M J, et al. Retinoblastoma protein (RB1) controls fate determination in stem cells and progeni-

- tors of the mouse male germline [J]. *Biol Reprod*, 2013, 89(5): 113.
- [28] PAPPAS L, XU X L, ABRAMSON D H, et al. Genomic instability and proliferation/survival pathways in RB1-deficient malignancies [J]. *Adv Biol Regul*, 2017, 64: 20-32.
- [29] GALLIE B L, ELLSWORTH R M, ABRAMSON D H, et al. Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation [J]? *Br J Cancer*, 1982, 45(4): 513-21.
- [30] SHAH P K, NARENDRAN V, MANAYATH G J, et al. Atypical retinocytoma with diffuse vitreous seeds: an insight [J]. *Oman J Ophthalmol*, 2011, 4(2): 81-3.
- [31] KOOI I E, MOL B M, MASSINK M P, et al. A meta-analysis of retinoblastoma copy numbers refines the list of possible driver genes involved in tumor progression [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153323.
- [32] COOK R, ZOUMPOULIDOU G, LUCZYNSKI M T, et al. Direct involvement of retinoblastoma family proteins in DNA repair by non-homologous end-joining [J]. *Cell Rep*, 2015, 10(12): 2006-18.
- [33] CORSON T W, HUANG A, TSAO M S, et al. KIF14 is a candidate oncogene in the 1q minimal region of genomic gain in multiple cancers [J]. *Oncogene*, 2005, 24(30): 4741-53.
- [34] LAURIE N A, DONOVAN S L, SHIH C S, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma [J]. *Nature*, 2006, 444(7115): 61-6.
- [35] LEE W H, MURPHREE A L, BENEDICT W F. Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma [J]. *Nature*, 1984, 309(5967): 458-60.
- [36] GASEMANN C, GRATIAS S, STEPHAN H, et al. Gains and overexpression identify DEK and E2F3 as targets of chromosome 6p gains in retinoblastoma [J]. *Oncogene*, 2005, 24(42): 6441-9.
- [37] TOSI G M, TRIMARCHI C, MACALUSO M, et al. Genetic and epigenetic alterations of RB2/p130 tumor suppressor gene in human sporadic retinoblastoma: implications for pathogenesis and therapeutic approach [J]. *Oncogene*, 2005, 24(38): 5827-36.
- [38] MARCHONG M N, CHEN D, CORSON T W, et al. Minimal 16q genomic loss implicates cadherin-11 in retinoblastoma [J]. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(9): 495-503.
- [39] KOOI I E, MOL B M, MASSINK M P, et al. Somatic genomic alterations in retinoblastoma beyond RB1 are rare and limited to copy number changes [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25264.
- [40] AFSHAR A R, PEKMEZCI M, BLOOMER M M, et al. Next-generation sequencing of retinoblastoma identifies pathogenic alterations beyond RB1 inactivation that correlate with aggressive histopathologic features [J]. *Ophthalmology*, 2020, 127(6): 804-13.
- [41] KOOI I E, MOL B M, MOLL A C, et al. Loss of photoreceptor-ness and gain of genomic alterations in retinoblastoma reveal tumor progression [J]. *EBioMedicine*, 2015, 2(7): 660-70.
- [42] CLAUDIO P P, HOWARD C M, BALDI A, et al. p130/pRb2 has growth suppressive properties similar to yet distinctive from those of retinoblastoma family members pRb and p107 [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(21): 5556-60.
- [43] COBRINIK D. Pocket proteins and cell cycle control [J]. *Oncogene*, 2005, 24(17): 2796-809.
- [44] CLASSON M, DYSON N. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 264(1): 135-47.
- [45] PRIYA K, JADA S R, QUAH B L, et al. High incidence of allelic loss at 16q12.2 region spanning RBL2/p130 gene in retinoblastoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(8): 714-7.
- [46] BASSETT E A, WALLACE V A. Cell fate determination in the vertebrate retina [J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(9): 565-73.
- [47] ZHANG J, GRAY J, WU L, et al. Rb regulates proliferation and rod photoreceptor development in the mouse retina [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(4): 351-60.
- [48] CHEN D, LIVNE-BAR I, VANDERLUIT J L, et al. Cell-specific effects of RB or RB/p107 loss on retinal development implicate an intrinsically death-resistant cell-of-origin in retinoblastoma [J]. *Cancer Cell*, 2004, 5(6): 539-51.
- [49] MACPHERSON D, CONKRITE K, TAM M, et al. Murine bilateral retinoblastoma exhibiting rapid-onset, metastatic progression and N-myc gene amplification [J]. *EMBO J*, 2007, 26(3): 784-94.
- [50] AJIOKA I, MARTINS R A, BAYAZITOV I T, et al. Differentiated horizontal interneurons clonally expand to form metastatic retinoblastoma in mice [J]. *Cell*, 2007, 131(2): 378-90.
- [51] PAJOVIC S, CORSON T W, SPENCER C, et al. The TAg-RB murine retinoblastoma cell of origin has immunohistochemical features of differentiated Muller glia with progenitor properties [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(10): 7618-24.
- [52] VIRTANEN I, KIVELA T, BUGNOLI M, et al. Expression of intermediate filaments and synaptophysin show neuronal properties and lack of glial characteristics in Y79 retinoblastoma cells [J]. *Lab Invest*, 1988, 59(5): 649-56.
- [53] MUNIER F L, BALMER A, VAN MELLE G, et al. Radial asymmetry in the topography of retinoblastoma. Clues to the cell of origin [J]. *Ophthalmic Genet*, 1994, 15(3/4): 101-6.
- [54] IAQUINTA P J, LEES J A. Life and death decisions by the E2F transcription factors [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(6): 649-57.
- [55] QI D L, COBRINIK D. MDM2 but not MDM4 promotes retinoblastoma cell proliferation through p53-independent regulation of MYCN translation [J]. *Oncogene*, 2017, 36(13): 1760-9.
- [56] LEE T C, ALMEIDA D, CLAROS N, et al. Cell cycle-specific and cell type-specific expression of Rb in the developing human retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(12): 5590-8.
- [57] LAURIE N, MOHAN A, MCEVOY J, et al. Changes in retinoblastoma cell adhesion associated with optic nerve invasion [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(23): 6268-82.
- [58] BEN-DAVID U, SIRANOSIAN B, HA G, et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response [J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 325-30.
- [59] JACKS T, FAZELI A, SCHMITT E M, et al. Effects of an Rb mutation in the mouse [J]. *Nature*, 1992, 359(6393): 295-300.
- [60] LEE E Y, CHANG C Y, HU N, et al. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis [J]. *Nature*, 1992, 359(6393): 288-94.
- [61] CLARKE A R, MAANDAG E R, VAN ROON M, et al. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development [J]. *Nature*, 1992, 359(6393): 328-30.
- [62] MACPHERSON D, SAGE J, KIM T, et al. Cell type-specific effects of Rb deletion in the murine retina [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(14): 1681-94.
- [63] DONOVAN S L, SCHWEERS B, MARTINS R, et al. Compensation by tumor suppressor genes during retinal development in



- mice and humans [J]. *BMC Biol*, 2006, 4: 14.
- [64] MCEVOY J, FLORES-OTERO J, ZHANG J, et al. Coexpression of normally incompatible developmental pathways in retinoblastoma genesis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(2): 260-75.
- [65] XIE C, LU H, NOMURA A, et al. Co-deleting Pten with Rb in retinal progenitor cells in mice results in fully penetrant bilateral retinoblastomas [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 93.
- [66] SOLIMAN S E, RACHER H, ZHANG C, et al. Genetics and molecular diagnostics in retinoblastoma: an update [J]. *Asia Pac J Ophthalmol*, 2017, 6(2): 197-207.
- [67] TRAN H N, SINGH H P, GUO W, et al. Reciprocal induction of MDM2 and MYCN in neural and neuroendocrine cancers [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 563156.
- [68] WU N, JIA D, BATES B, et al. A mouse model of MYCN-driven retinoblastoma reveals MYCN-independent tumor reemergence [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(3): 888-98.
- [69] AVIOR Y, LEZMI E, YANUKA D, et al. Modeling developmental and tumorigenic aspects of trilateral retinoblastoma via human embryonic stem cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(5): 1354-65.
- [70] NAKANO T, ANDO S, TAKATA N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 771-85.
- [71] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72.