

上海交通大学医学院



学者介绍

Author introduction



贾仁兵 博士

主任医师、研究员、博士生导师

ORCID ID: 0000-0001-6642-7451

JIA Ren-bing

Ph.D

Professor, Chief Physician, Doctoral Supervisor

ORCID ID: 0000-0001-6642-7451

贾仁兵 (1976—), 上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科副主任。2006 年获上海交通大学医学院博士学位。2011 年 1 月—2012 年 1 月于美国斯隆凯特琳癌症研究中心做访问学者。2012 年被聘为上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科副主任医师, 2014 年被聘为眼科行政副主任, 2016 年破格晋升为上海交通大学医学院研究员, 2017 年被聘为九院眼科主任医师。现任国际眼肿瘤学会会员、亚太眼肿瘤眼病理学会委员、中华医学会眼科分会青年委员、中华医学会眼科分会眼病理学组委员、中华医学会眼科分会眼整形眼眶病学组秘书、中国抗癌协会眼肿瘤专业委员常委兼秘书长、海医会眼科委员会视网膜母细胞瘤学组委员兼秘书。

• 长期致力于眼肿瘤、眼眶病的临床和基础研究, 以通信作者或第一作者在 *Genome Biol*、*Nucleic Acids Res*、*Mol Cancer*、*Cancer Lett*、*JAMA Ophthalmol*、*BJO*、*IOVS* 等杂志发表 SCI 收录论文 34 篇。主持国家自然科学基金 4 项, 其他课题 7 项。入选 2011 年上海市青年科技启明星计划、2014 年上海市曙光学者计划。2012 年及 2017 年获上海市科技进步奖一等奖, 2013 年获上海市卫生系统银蛇奖。曾获上海市卫生计生工作先进个人。

JIA Ren-bing born in 1976, deputy director of Department of Ophthalmology of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. He received his Ph.D from Shanghai Jiao Tong University School of Medicine in 2006. From Jan. 2011 to Jan. 2012, he performed collaborative research as a visiting investigator at Memorial Sloan Kettering Cancer Center. He was promoted as an associated chief physician of Department of Ophthalmology in Shanghai Ninth People's Hospital in 2012, deputy director of Department of Ophthalmology in 2014, and professor of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine in 2016. He was promoted as a chief physician in 2017. He is the member of International Society of Ocular Oncology (ISOO) and Asia Pacific Society of Ocular Oncology & Pathology (APSOOP). Besides, he is the member of Youth Commission of Chinese Ophthalmological Society, the member of Ophthalmic Pathology Society and the secretary of Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery Society of China. Moreover, he is the standing committee and secretary-general of Ocular Oncology China Anti-cancer Association, the member and secretary of Chinese Retinoblastoma Society.

• Dr. JIA's main research interest focuses on ocular oncology and orbital diseases. He has published 34 peer-reviewed research papers in international journals as the first author or corresponding author, including *Genome Biol*, *Nucleic Acids Res*, *Mol Cancer*, *Cancer Lett*, *JAMA Ophthalmol*, *BJO*, *IOVS* and etc. He has been supported by 4 National Natural Science Foundation of China and other 7 grants. He was enrolled into "Shanghai Rising-Star Program" in 2011 and "Shanghai Aurora Plan" in 2014. Furthermore, he has won the first prize of "Shanghai Science and Technology Advancement Award" in 2012 and 2017, and "Shanghai Foundation for Eminent Youth Award of Health Care System" in 2013. Also, he has obtained the honorary titles of "Outstanding Individual of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning Work" and so on.



论著·基础研究

1 株 $RB1^{+/+}$ 的中国汉族人视网膜母细胞瘤细胞系的建立与基因组特征研究

袁晓玲^{1,2}, 何晓雨^{1,2}, 李甬芸^{1,2}, 柴佩韦^{1,2}, 王惠学^{1,2}, 贾若冰^{1,2}, 徐扬帆^{1,2}, 商庆丰^{1,2}, 赵鸿波^{1,2}, 贾仁兵^{1,2}

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科, 上海 200011; 2. 上海市眼眶病眼肿瘤重点实验室, 上海 200011

[摘要] **目的**·建立 1 株新的中国汉族人视网膜母细胞瘤细胞系, 并研究其基本特征。**方法**·在无菌环境中, 从 1 例视网膜母细胞瘤患者瘤体标本中分离原代肿瘤细胞, 进行培养、纯化与传代。通过细胞免疫荧光、免疫组织化学染色、DNA 短片段重复序列 (short tandem repeat, STR) 检测、核型分析和全外显子测序等方法, 观察并鉴定该细胞系和肿瘤组织形态学特征、遗传学特征及表面标志物。**结果**·将该细胞系命名为 SNPH-Rb-C24, 其主要特征为神经起源的肿瘤细胞, 表达神经细胞黏附分子 1 和突触素; STR 分型与原肿瘤组织个体来源一致; 染色体核型发生复杂改变, 但未发现 13 号染色体长臂改变; 与原肿瘤组织皆表现为 $RB1^{+/+}$ 特征, 且基因突变谱相似; 具有体内成瘤能力。**结论**·成功建立 1 株起源于 $RB1^{+/+}$ 中国汉族人视网膜母细胞瘤细胞系 SNPH-Rb-C24, 该细胞系保留了原肿瘤组织的生物学和遗传学特征。

[关键词] 视网膜母细胞瘤; 原代细胞系; $RB1$ 基因; 核型分析; 全外显子测序

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.08.003 **[中图分类号]** R739.7 **[文献标志码]** A

Establishment and genomic characterization of a novel retinoblastoma cell line without $RB1$ mutation derived from a Han Chinese donor

YUAN Xiao-ling^{1,2}, HE Xiao-yu^{1,2}, LI Yong-yun^{1,2}, CHAI Pei-wei^{1,2}, WANG Hui-xue^{1,2}, JIA Ruo-bing^{1,2}, XU Yang-fan^{1,2}, SHANG Qing-feng^{1,2}, ZHAO Hong-bo^{1,2}, JIA Ren-bing^{1,2}

1. Department of Ophthalmology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Orbital Diseases and Ocular Oncology, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective**·To develop and characterize a novel retinoblastoma cell line from a Han Chinese patient. **Methods**·Cells were dispersed from tumor tissue harvested from an enucleated eyeball harbouring retinoblastoma under sterile conditions. The dissociated cells were cultured, purified and passaged *in vitro*. Morphologic and genetic analysis and detection of surface biomarkers were performed on the cell line and primary tumor by immunofluorescence, immunohistochemical staining, DNA short tandem repeat (STR) analysis, karyotype analysis, and exome sequencing. **Results**·This human retinoblastoma cell line was designated as SNPH-Rb-C24. It expressed neural cell adhesion molecule 1 and synaptophysin, which confirmed its neuronal derivation. DNA STR analysis showed an identical match between SNPH-Rb-C24 and primary tumor. Karyotype analysis showed complex chromosomal abnormalities in SNPH-Rb-C24, while no alteration in 13q was observed. Comparative exome sequencing identified common mutated genes and $RB1^{+/+}$ in both SNPH-Rb-C24 and primary tumor. Orthotopic xenograft tumors derived from early passage cells were established. **Conclusion**·A human retinoblastoma cell line (SNPH-Rb-C24) derived from a Han Chinese patient with $RB1^{+/+}$ retinoblastoma is developed, which retains critical biological and genomic features of the donor tumor.

[Key words] retinoblastoma; primary cell line; $RB1$ gene; karyotype analysis; exome sequencing

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是儿童最常见的眼内恶性肿瘤^[1-2], 主要起源于神经外胚层, 在男性及女性人群中发病率相近, 且中国 RB 发病率和患者数量均居世界前列。RB 约 1/3 为遗传型, 2/3 为散发型; 遗传型患者多为双眼发病, 而散发型仅累及单眼。RB 可导致视

力下降、丧失, 甚至死亡, 严重影响患者生活质量, 威胁患者生命。RB 主要致病原因为 $RB1$ 双等位基因突变^[3-4], 其作用机制基本明确。但部分 RB 患者瘤体中未发现 $RB1$ 突变^[5], $RB1^{+/+}$ RB 的病因学和发病机制尚未阐明。

为深入认识 $RB1^{+/+}$ RB 的生物学特征、揭示发病机制

[基金项目] 卫生部公益性行业科研专项 (201402014); 国家自然科学基金 (81372902); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20152223); 上海市重点实验室 (17DZ2260100) (Scientific Research Program for Public Welfare Industry of Ministry of Health of China, 201402014; National Natural Science Foundation of China, 81372902; Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant, 20152223; Shanghai Municipal Key Laboratory, 17DZ2260100)。

[作者简介] 袁晓玲 (1991—), 女, 硕士生; 电子信箱: xiaoling_yuan@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 贾仁兵, 电子信箱: renbingjia@sjtu.edu.cn。



并建立治疗新方法, 本实验室自 1 位经化学治疗(简称化疗)的 $RBI^{+/+}$ 家族性 RB 患者术后新鲜肿瘤标本中分离 RB 原代细胞, 建立细胞系, 并鉴定该细胞系的基本生物学和遗传学特征。

1 材料和方法

1.1 患者临床资料和治疗经过

患儿为汉族女童, 3.5 岁, 有 RB 家族史, 其姐姐因 RB 转移至颅内死亡。患儿 1.5 岁时在外院确诊为双眼 RB, 先后行静脉化疗、局部激光治疗、经玻璃体肿瘤切除手术等治疗。随后至上海交通大学医学院附属第九人民医院就诊, 发现患者左眼球萎缩、右眼为新生血管性青光眼, 遂行双眼眼球摘除术。术后病理检查结果表明, 左眼肿瘤侵袭脉络膜和巩膜, 右眼肿瘤侵袭脉络膜和视神经根部。

1.2 原代细胞培养和细胞系建立

根据《赫尔辛基宣言》原则, 按照上海交通大学医学院附属第九人民医院伦理委员会核准的建议采集肿瘤标本。捐献者监护人术前签署书面知情同意书。在手术室无菌环境中, 用标本收集培养基, 即含 DMEM-F12 (Gibco, 美国) 基础培养基、1% 胎牛血清 (FBS, Gibco, 美国) 和 1% 青霉素/链霉素 (P/S, Invitrogen, 美国), 收集肿瘤组织, 密封于 50 mL 离心管 (Corning, 美国) 中后立即置于冰上运输至实验室, 在超净工作台内进行肿瘤原代细胞分离。经 3 次 DPBS (Gibco, 美国) 清洗后, 轻柔吹打松散的肿瘤标本, 将其吹散成细胞悬液。用 70 μ m 细胞筛 (Corning, 美国) 滤过细胞悬液, 将未滤过的小块肿瘤组织于细胞筛表面用无菌的 1 mL 注射器芯杆橡胶柱塞轻柔研磨, 冲洗细胞筛后收集滤过的细胞悬液, 于 15 mL 离心管中进行离心。用红细胞裂解液 (Biosharp, 合肥) 重悬细胞沉淀, 去除红细胞成分。经 3 次 DPBS 清洗后, 用原代细胞系培养基, 即含 IMDM (Gibco, 美国) 基础培养基、15% FBS、55 μ mol/L β 巯基乙醇、1 \times 胰岛素-转铁蛋白-硒添加剂 (Gibco, 美国), GlutaMAX™-I (1 \times) (Gibco, 美国) 和 1% P/S, 重悬细胞悬液, 并种植于 T25 培养瓶中, 置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的湿化培养箱中进行长期培养。

分离的原代细胞呈贴壁-悬浮双相生长模式。经 5 ~ 7 d 后, 悬浮生长的肿瘤细胞转移至含 6 mL 培养基的新培养瓶中继续悬浮培养。贴壁生长的间质细胞经 0.25% 胰酶 EDTA (Gibco, 美国) 于 37 $^{\circ}$ C 消化 15 min 后, 铺种于另一新培养瓶中继续贴壁培养。每隔 5 d, 对悬浮细胞进行半量换液, 即取出的一半细胞悬液传代至

新培养瓶中, 分别加入 3 mL 新鲜培养基。约经 3 次传代后, 悬浮细胞的培养瓶中再无贴壁细胞, 并将该悬浮细胞命名为 Shanghai Ninth People's Hospital Retinoblastoma C24 (SNPH-Rb-C24)。经 6 次传代后, 将该原代细胞培养基逐渐更换为 RB 扩增培养基, 即含 RPMI1640 培养基 (Gibco, 美国)、10% FBS 和 1% P/S。

1.3 形态学和生长动力学检测

应用倒置相差显微镜 (ECLIPSE Ni, Nikon, 日本) 拍摄 SNPH-Rb-C24 细胞形态, 观察其形态学改变。应用 CCK-8 试剂盒 (Dojindo, 日本) 行 3 次独立重复试验, 测定细胞生长曲线。将细胞以 1.5×10^4 个/mL 的密度种植于 96 孔板中, 每孔 200 μ L 细胞悬液, 培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的湿化培养箱中。经培养 24、48、72、96、120 和 144 h 后, 每孔加入 20 μ L CCK-8 溶液, 继续培养 4 h 后, 应用酶标仪 (Biotech, 美国) 检测每孔内 540 nm 波长处吸光值 [$D(540 \text{ nm})$]。

1.4 核型分析检测

收集第 10 代对数增长期 SNPH-Rb-C24 细胞, 用 0.04 μ g/mL 的秋水新碱诱导有丝分裂阻滞, 3 h 后离心。用 37 $^{\circ}$ C 预热的 75 mmol/L 氯化钾溶液重悬细胞沉淀, 并固定于甲醇-乙酸 (3:1) 混合液中。用乙醇-乙醚 (1:1) 混合液短暂冲洗玻片后, 滴加细胞沉淀于玻片上, 并置于 60 $^{\circ}$ C 孵育过夜。以 0.6% 胰酶处理玻片 25 s, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻柔冲洗 2 次, 进行 Giemsa 染色 3.5 min。应用 2005 年人类细胞遗传学国际命名体制 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN) 进行 G 带染色体核型分析。

1.5 DNA 短串联重复序列检测

应用 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) 提取第 6 代 SNPH-Rb-C24 细胞和原肿瘤组织 DNA, 检测 20 个短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 位点, 即 D5S818、D13S317、D7S820、D16S539、VWA、TH01、AMEL、TPOX、CSF1PO、D12S391、FGA、D2S1338、D21S11、D18S51、D8S1179、D3S1358、D6S1043、PENTAE、D19S433、PENTAD, 对比确认两者的一致性, 并在美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)、德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ)、日本生物资源保藏中心 (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, JCRB) 和日本理化学研究所 (RIKAGAKU KENKYUSHO/Institute of Physical and Chemical Research,



RIKEN) 细胞库中进行检测有无匹配细胞系。

1.6 全外显子测序

应用 QIAamp DNA Mini Kit 提取第 6 代 SNPH-Rb-C24 细胞和原肿瘤组织 DNA, 各取 3 μg DNA, 于上海欧易公司的 Illumina HiSeq X Ten 测序平台进行全外显子测序。

1.7 免疫组织化学染色

将原肿瘤组织进行固定、脱水与透明、包埋、切片、展片和烤片后进行苏木精-伊红 (H-E) 染色和免疫组织化学 (免疫组化) 染色。将石蜡切片于二甲苯中脱蜡、梯度乙醇中脱水。用 3% 过氧化氢浸泡 10 min 灭活内源性过氧化物酶; 用 pH 6.0 的热柠檬酸修复液浸泡 20 min 进行抗原修复。用正常羊血清室温封闭 30 min。分别用抗人神经细胞黏附分子 1 (human neural cell adhesion molecule 1, NCAM1) (14255-1-AP, Proteintech, 美国)、突触素 (synaptophysin, SYN) (ab16659, Abcam, 英国) 和 Ki67 (ab92742, Abcam, 英国) 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 经二抗孵育、二氨基联苯胺/过氧化氢显色及苏木精复染后进行封片、保存。

1.8 细胞免疫荧光染色

收集 3×10^4 个 SNPH-Rb-C24 细胞, 调整细胞密度为 1.5×10^5 个/mL, 每 10 μL 细胞悬液在黏附载玻片上铺种 1 个直径 1 cm 的圆形斑域。在超净工作台内静置约 15 min, 待培养基蒸发后, 细胞黏附于载玻片上, 立即用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15 min, 0.3% Triton X-100 进行细胞破膜 15 min。应用 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭 1 h 去除背景, 滴加一抗, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境孵育过夜。次日, 滴加荧光二抗室温孵育 1 h, 用抗荧光淬灭封片剂 (含 4',6-二脒基-2-苯基吡啶, DAPI) 进行封片、保存。

1.9 原位移植瘤模型构建

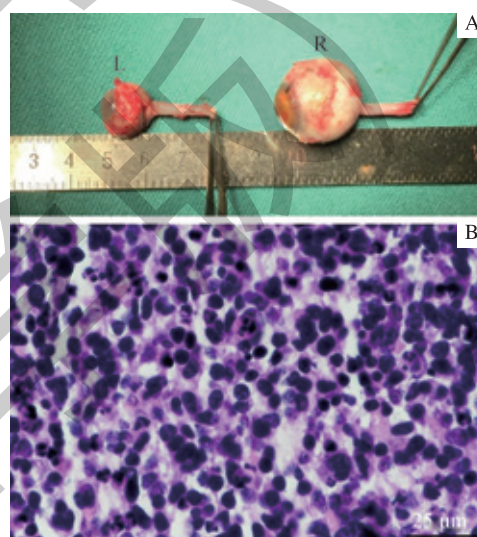
动物实验研究严格符合眼科和视觉研究协会 (Association for Research in Vision & Ophthalmology, ARVO) 所规定的《眼视觉研究动物使用声明》, 遵守国际实验动物评估和认可委员会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC) 的《实验动物使用与福利国际指南》。该异种移植瘤实验操作经上海交通大学医学院附属第九人民医院中心实验室实验动物管理委员会审阅及批准, 使用许可证号为 SYXK (沪) 2016-0016。

选取 4 周龄雄性 SPF 级无胸腺裸鼠, 将该细胞系制备为细胞密度 5×10^4 个/ μL 的细胞悬液, 以每眼 2 μL 的细胞量, 按照文献^[6]报道的操作方法移植入裸鼠视网膜下。实验动物购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 生产许可证号为 SCXK (沪) 2013-0016。实验动物在操作前 2 d 至操作后 2 周内, 在经辐照饲料中给予羟氨苄青霉素以预防感染。成瘤后, 取一部分荷瘤动物眼球, 按照文献^[6-7]报道方法进行固定与包埋。

2 结果

2.1 原肿瘤组织形态学分析

SNPH-Rb-C24 细胞起源于患者右眼球内肿瘤组织 (图 1A), 肿瘤组织切片经 H-E 染色, 可见大量核大、细胞质少的嗜碱性、低分化细胞 (图 1B), 呈经典的 RB 组织病理学特征。



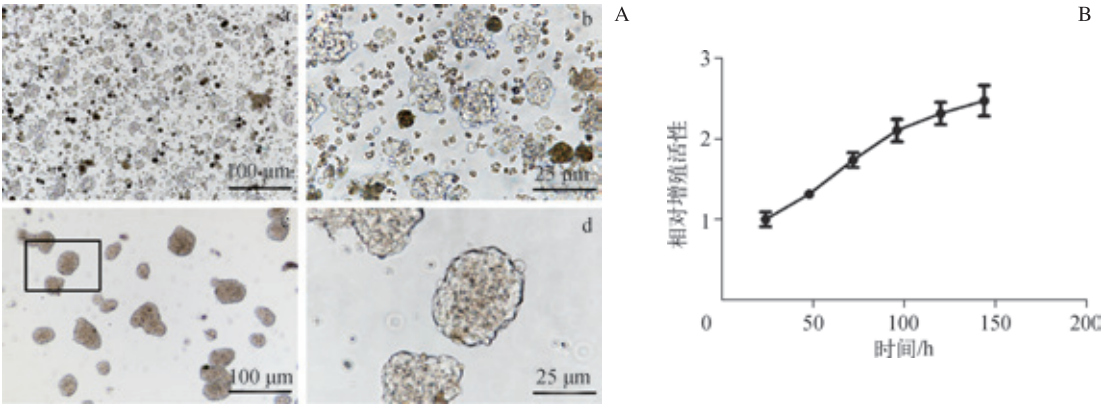
注: A. 大体病理学, 左眼球 (L) 萎缩, 用于细胞系分离与培养的新鲜肿瘤组织采集于右眼 (R) 内瘤体; B. 代表性的原肿瘤组织 H-E 染色切片。

图 1 人视网膜母细胞瘤大体病理学及组织形态学特征

Fig 1 Gross pathology and morphology characteristic of original tumor

2.2 SNPH-Rb-C24 的形态学与生长特征检测

SNPH-Rb-C24 经分离后为悬浮小圆细胞, 成团生长, 于原代培养基中培养至第 3 日, 在显微镜下观察可见肿瘤细胞聚集呈葡萄串状, 高倍镜下可见细胞形态为圆形。经传代培养后, 细胞生长良好, 细胞团进一步增大, 但单个细胞形态未发生改变 (图 2A)。经半年体外培养后, 该细胞系每 3 ~ 4 d 进行传代, 现已传至第 54 代。在培养过程中, 细胞形态未发生改变。经生长曲线测定分析, 该细胞系倍增时间为 (73.8 ± 5.6) h (图 2B)。



注: A. a、b 为 SNPH-Rb-C24 原代培养第 3 日, c、d 为 SNPH-Rb-C24 细胞传代至第 10 代; B. SNPH-Rb-C24 的生长曲线。

图 2 SNPH-Rb-C24 在体外的细胞形态学特征及生长曲线
Fig 2 Cell morphology and growth curve of SNPH-Rb-C24 *in vitro*

2.3 SNPH-Rb-C24 与原肿瘤组织 DNA STR 表达谱分析

检测 20 个 STR 位点 (AMEL、D5S818、D13S317、D7S820、D16S539、VWA、TH01、TPOX、CSF1PO、D12S391、FGA、D2S1338、D21S11、D18S51、D8S1179、D3S1358、D6S1043、PENTAE、D19S433、PENTAD), 确认 SNPH-Rb-C24 与原肿瘤组织的 STR 表达谱一致, 并且在 ATCC、DSMZ、JCRB 和 RIKEN 等细胞库中未发现 STR 检测结果与该细胞系匹配的细胞系 (表 1)。

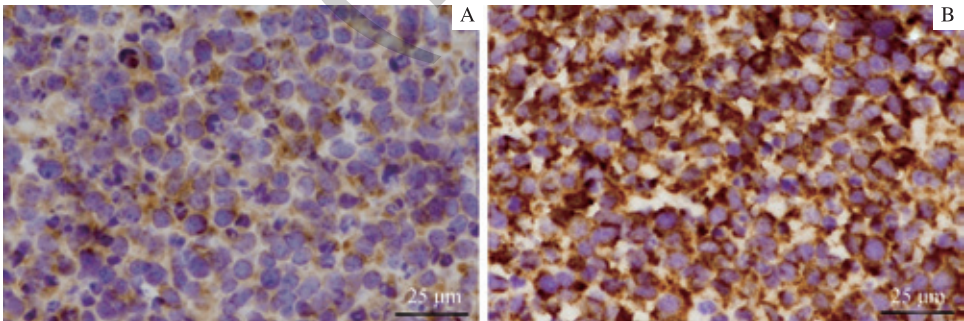
表 1 SNPH-Rb-C24 和原肿瘤组织的 STR 检测
Tab 1 STR result of SNPH-Rb-C24 and original tumor

样本	AMEL	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	TPOX	CSF1PO	D12S391
患者瘤体	X,X	11,12	10,10	11,12	9,11	17,18	6,7	11,11	10,12	19,21
SNPH-Rb-C24	X,X	11,12	10,10	11,12	9,11	17,18	6,7	11,11	10,12	19,21

样本	FGA	D2S1338	D21S11	D18S51	D8S1179	D3S1358	D6S1043	PENTAE	D19S433	PENTAD
患者瘤体	22,23	23,23	29,30	13,13	15,16	15,15	12,19	11,18	12,14	10,13
SNPH-Rb-C24	22,23	23,23	29,30	13,13	15,16	15,15	12,19	11,18	12,14	10,13

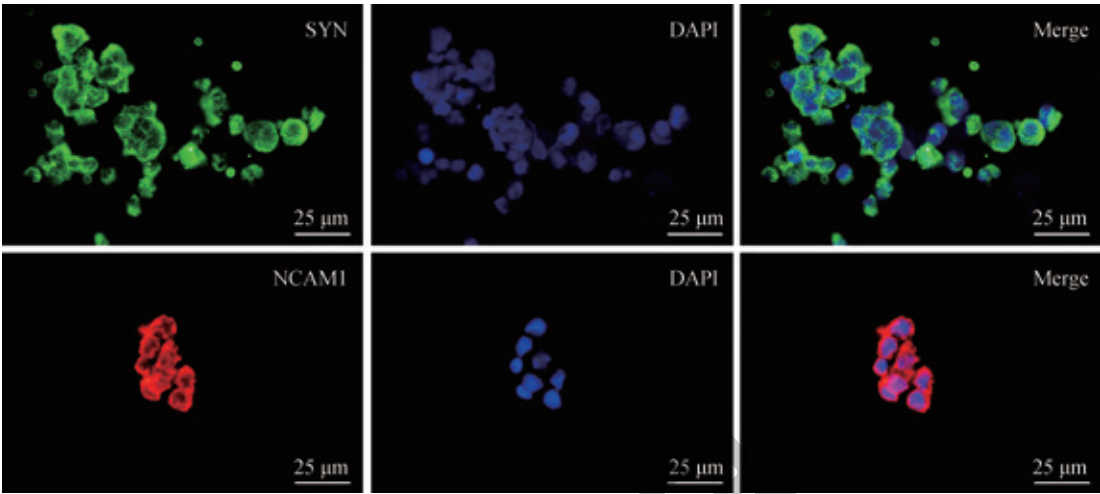
2.4 SNPH-Rb-C24 神经标志物表达

免疫组化 (图 3) 和细胞免疫荧光染色 (图 4) 发现, SNPH-Rb-C24 与原肿瘤组织均高表达 SYN 和 NCAM1 (CD56)。



注: A. SYN 阳性染色; B. NCAM1 阳性染色。

图 3 原肿瘤组织免疫组化结果
Fig 3 Result of immunohistochemical staining of original tumor



注: Merge 为将左边图和中间图进行重叠合并。
图 4 SNPH-Rb-C24 免疫荧光染色结果
Fig 4 Result of immunofluorescence of SNPH-Rb-C24

2.5 SNPH-Rb-C24 核型分析

经 G 带显色分析, SNPH-Rb-C24 中有 3 种二倍体细胞核型, 在所有经检测的 20 个细胞中均存在 2p、16p、19p 和 22q 未知染色体片段插入, 以及 20q 部分染色体片段缺失。12 个细胞在 8p 有染色体片段缺失, 4 个有 10q 部分染色体片段缺失。SNPH-Rb-C24 的核型为: 46, XX[20], add (2) (p10) [20], del (8) (p12) [12], add (10) (q26) [4], add (16) (p13) [20], add (19) (p13) [20], del (20) (q11) [20], add (22) (q13) [20] (图 5A)。

2.6 全外显子测序分析

经全外显子测序分析, 对比 SNPH-Rb-C24 细胞系与原肿瘤组织的基因突变谱, 发现两者共有的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 突变数量为 53 693, 达 96.79%, 插入缺失标记 (InDel) 为 5

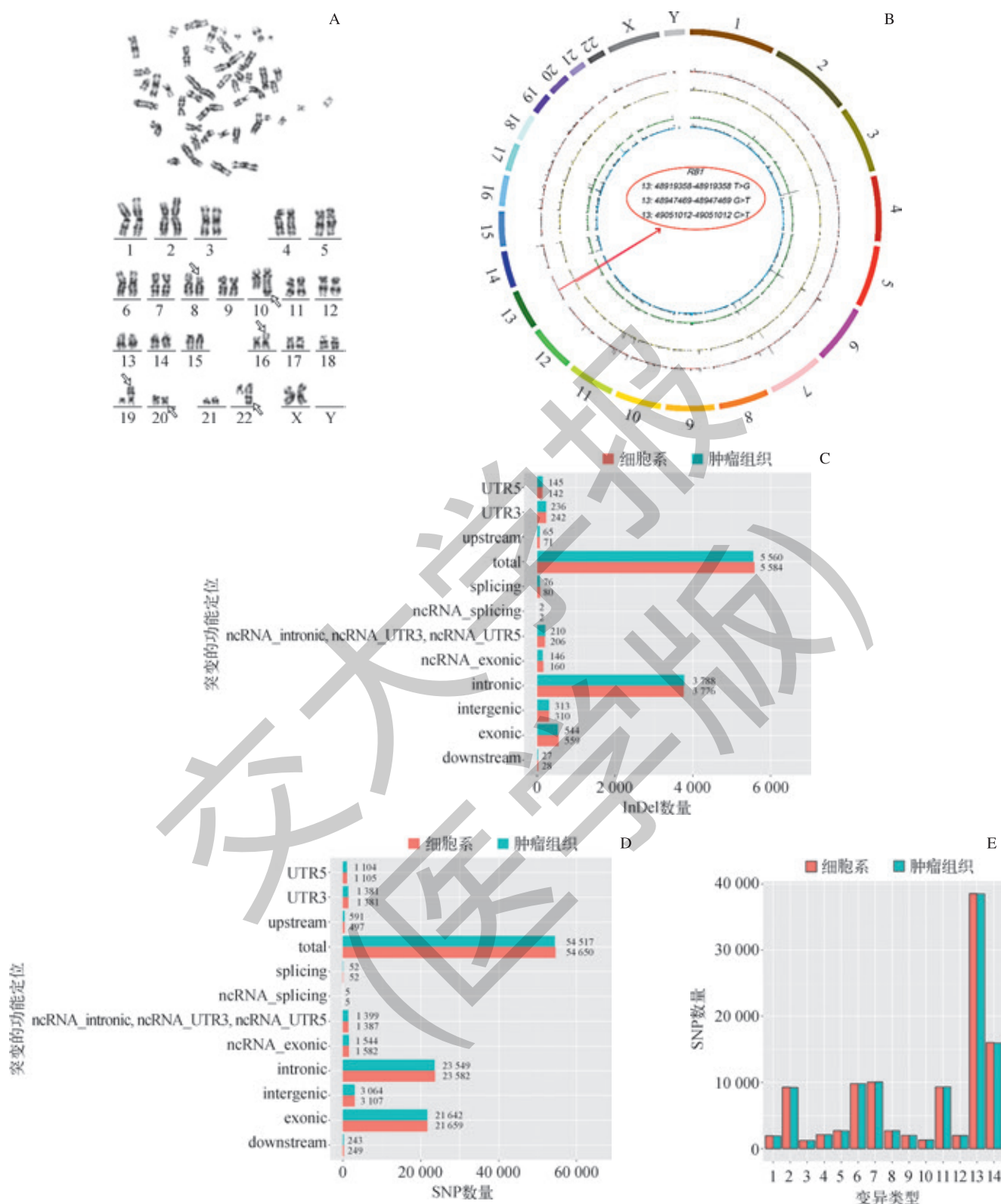
101, 达 84.41%, 其中 96.11% 的 SNP 突变和 94.52% 的 InDel 突变为肿瘤相关的基因突变, 两者基因突变谱高度一致 (表 2, 图 5B ~ E)。与 hg19 基因组比较, 在两者的 *RBI* 基因突变中都仅发现 3 个内含子 SNP 改变, 即 13:48919358-48919358 T>G、13:48947469-48947469 G>T 和 13:49051012-49051012 C>T, 但这 3 个位点的内含子 SNP 改变出现在所有中国人群中, 与 RB 的发生无关。SNPH-Rb-C24 细胞系的测序深度为 118.01, 覆盖率为 99.97%; 患者肿瘤组织的测序深度为 122.15, 覆盖率为 99.97% (图 6)。

2.7 SNPH-Rb-C24 的体内成瘤能力检测

SNPH-Rb-C24 原位异种移植到裸鼠视网膜下 4 周后, 6 只动物全部成瘤。与对照眼相比, 动物荷瘤眼表现为白瞳症 (图 7A)。经组织病理学检查可见, 移植瘤组织形态与原肿瘤组织相近 (图 7B、C)。

表 2 SNPH-Rb-C24 与人视网膜母细胞瘤原肿瘤组织的基因组突变谱比较
Tab 2 Comparative genomic mutation spectrum of SNPH-Rb-C24 and original tumor

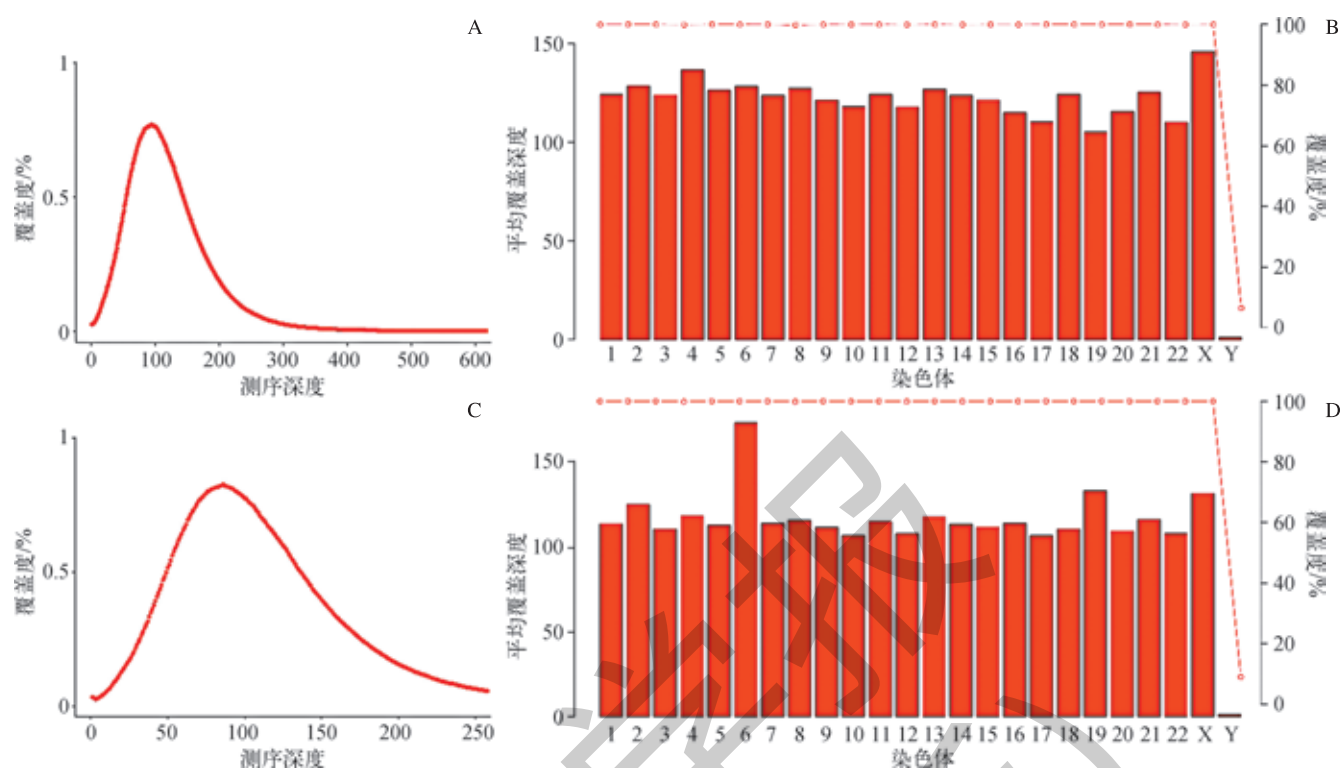
分类	所有突变 /n (%)		肿瘤相关突变 /n (%)	
	SNP	InDel	SNP	InDel
肿瘤和细胞系共有突变	53 693 (96.79)	5 101 (84.41)	617 (96.11)	276 (94.52)
肿瘤特有突变	824 (1.49)	459 (7.60)	12 (1.87)	10 (3.42)
细胞系特有突变	957 (1.73)	483 (7.99)	13 (2.02)	6 (2.05)



注: A. 代表性的 SNPH-Rb-C24 染色体核型分析 (箭头所指为异常染色体); B. 全外显子测序分析比较 SNPH-Rb-C24 (外侧环) 与原肿瘤组织 (内侧环) 基因突变谱, 内侧两环为 SNP, 外侧两环为 InDel, 对照基因组为 hg19 (箭头所指为 *RB1* 的基因突变); C. D. 比较 SNPH-Rb-C24 与原肿瘤组织中在各个功能定位的 InDel (C) 和 SNP (D) 的突变数量; E. 比较 SNPH-Rb-C24 与原肿瘤组织中发生的不同变异类型的 SNP 数量。UTR5 表示 5' 非翻译区, UTR3 表示 3' 非翻译区, upstream 表示基因上游, total 表示基因组, splicing 表示剪接点, ncRNA_splicing 表示剪接非编码 RNA, ncRNA_intronic 表示内含子非编码 RNA, ncRNA_UTR3 表示 3' 非编码区非编码 RNA, ncRNA_UTR5 表示 5' 非编码区非编码 RNA, ncRNA_exonic 表示外显子非编码 RNA, intronic 表示内含子, intergenic 表示基因间, exonic 表示外显子, downstream 表示基因下游。1 为 A-C, 2 为 A-G, 3 为 A-T, 4 为 C-A, 5 为 C-G, 6 为 C-T, 7 为 G-A, 8 为 G-C, 9 为 G-T, 10 为 T-A, 11 为 T-C, 12 为 T-G, 13 为碱基转换 (transition), 14 为碱基颠换 (transversion)。

图 5 SNPH-Rb-C24 细胞遗传学分析

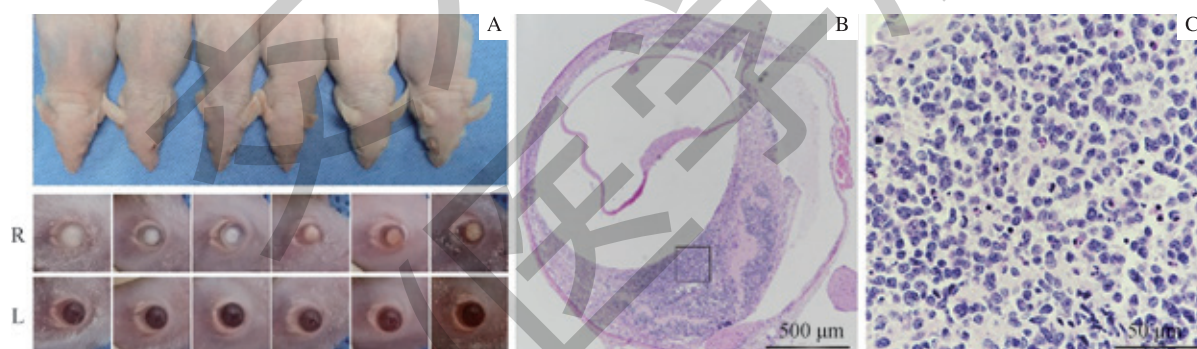
Fig 5 Cytogenetic analysis of SNPH-Rb-C24



注: A、B. 患者肿瘤组织样本全外显子测序深度图 (A), 样本染色体上外显子的平均覆盖深度柱形图 (左侧坐标) 和覆盖度折线图 (右侧坐标) (B); C、D. SNPH-Rb-C24 细胞样本全外显子测序深度图 (C), 样本染色体上外显子的平均覆盖深度柱形图 (左侧坐标) 和覆盖度折线图 (右侧坐标) (D)。每条染色体外显子测序深度 = 每条染色体的测序数据量 / 每条染色体的外显子区域总长度。覆盖度 = 每条染色体外显子被覆盖的总长度 / 每条染色体上外显子区域的总长度。

图 6 SNPH-Rb-C24 和原肿瘤组织的测序比对结果质量评估

Fig 6 Quality evaluation of exome sequencing comparison of SNPH-Rb-C24 and original tumor



注: A. 原位移植瘤裸鼠外观, 荷瘤眼为右眼 (R), 对照眼为左眼 (L); B. 代表性的荷瘤动物眼球 H-E 染色图; C. 高倍镜下可见与原肿瘤组织相近的经典的 RB 小圆细胞形态。

图 7 SNPH-Rb-C24 在裸鼠体内原位异种移植成瘤

Fig 7 Orthotopic xenograft of SNPH-Rb-C24 in nude mice

3 讨论

由于缺少合适、可靠的体外研究模型, 针对 RB 治疗新策略的研究受到极大限制^[8]。构建并鉴定来源于这种罕见肿瘤类型的细胞系具有重要作用^[9-10]。本研究报道了 1 株来源于家族性 RB 患者的 $RBI^{+/+}$ 人 RB 细胞系的建立及鉴定过程。该 SHPH-Rb-C24 细胞系是核大质少的小圆细胞, 呈葡萄串状悬浮生长, 符合 RB 的典型形态学特征^[11], 并

在体外培养与传代过程中始终保持不变。SNPH-Rb-C24 的倍增时间约为 74 h, 介于 Y79 (33 h) 和 WERI-Rb-1 (96 h) 细胞^[12]之间。本研究进一步鉴定了该细胞系的表面标志物、细胞遗传学特征和体内成瘤能力。该细胞系与亲代肿瘤组织拥有共同的谱系和分子特征。众所周知, RB 是神经系统起源的肿瘤。本研究结果显示, SYN 在该细胞系和原肿瘤组织中皆为高表达^[13-14], NCAM1 在两者中的高表达也反映了该细胞系起源于神经外胚层^[15]。此外,

SNPH-Rb-C24 在裸鼠体内具有成瘤能力。以上结果表明, 新建立的细胞系保留了原肿瘤组织的生物学特征。

一般认为, *RB1* 双等位基因突变导致 RB 的发生^[4, 16], 但部分临床确诊的 RB 中未发现 *RB1* 突变^[5], 该类 RB 发生机制尚不清晰。现今可用的细胞系, 如 Y79 和 WERI-Rb-1, 均起源于 *RB1* 基因缺陷的 RB^[11, 17]。本研究细胞核型分析显示, SNPH-Rb-C24 的 13q 未发现染色体异常改变; 外显子测序分析表明, 与 hg19 基因组比较, SNPH-Rb-C24 和原肿瘤组织 *RB1* 基因中仅发现 3 个普遍存在于中国人群中的内含子 SNP 突变, 未发现 *RB1* 基因突变。细胞遗传学研究^[8]表明, RB 具有复杂的染色体改变, 尤其是 *RB1*^{+/+} 肿瘤常发生 19p、19q、17p、17q、2p 未知染色体片段插入和 9q 端粒末端未知染色体片段插入。本研究中, SNPH-Rb-C24 的特征性核型改变为 add (2) (p10) 和 add (19) (p13), 与上述研究报道一致。此外, SNPH-Rb-C24 还发生了 16p、20q 和 22q 染色体改变。

先进的二代测序技术能够对细胞系和原肿瘤组织进行详尽的基因组分析, 并通过计算机分析预测与肿瘤发生相

关的关键基因或分子改变^[18]。应用现有细胞系进行科学研究的一个主要限制因素是, 缺少与其原肿瘤组织之间的鉴定与对比^[19-20]。获得原肿瘤组织与新建立的细胞系基因组间的测序对比, 对发现和鉴定潜在关键致病基因、研究 RB 生物学及治疗均具有重要意义。SNPH-Rb-C24 和原肿瘤组织共有的突变基因, 不仅可为肿瘤研究提供新的候选基因, 也证实了该细胞系高度保留原肿瘤组织基因组特征^[8, 21-22]。例如, 两者共有与癌症发生相关的突变基因, 包括 *ALK*、*CDKN2A*、*PAX5* 和 *APC* 等, 可作为研究 RB 发病机制的新的候选基因^[21, 23-27]。

化疗是 RB 的主要治疗方法, 可保留部分患者眼球甚至有用视力。但是, 很多晚期患者对化疗反应差, 产生化疗耐药, 导致其保眼失败甚至失去生命。本研究建立的细胞系来自化疗后 RB 瘤体, 后续将有望利用该细胞系寻找新的化疗敏感药物, 提高 RB 的化疗效果。

综上所述, SNPH-Rb-C24 能够模拟原肿瘤组织的生长和成瘤特性, 并保留其包括 *RB1*^{+/+} 在内的基因组特征和组织形态学特征, 可作为 RB 研究的重要工具。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Dimaras H, Kimani K, Dimba EA, et al. Retinoblastoma[J]. Lancet, 2012, 379(9824): 1436-1446.
- [2] Shuangshoti S, Chaiwun B, Kasantikul V. A study of 39 retinoblastomas with particular reference to morphology, cellular differentiation and tumour origin[J]. Histopathology, 1989, 15(2): 113-124.
- [3] Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1971, 68(4): 820-823.
- [4] Xu XL, Singh HP, Wang L, et al. Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours[J]. Nature, 2014, 514(7522): 385-388.
- [5] Rushlow DE, Mol BM, Kennett JY, et al. Characterisation of retinoblastomas without *RB1* mutations: genomic, gene expression, and clinical studies[J]. Lancet Oncol, 2013, 14(4): 327-334.
- [6] Xu XL, Fang Y, Lee TC, et al. Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling[J]. Cell, 2009, 137(6): 1018-1031.
- [7] Xu XL, Fang Y, Lee TC, 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): 5590-5598.
- [8] Dömcke S, Sinha R, Levine DA, et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2126.
- [9] Chifenti B, Morelli M, Zavaglia M, et al. Establishment and characterization of 4 new human pancreatic cancer cell lines: evidences of different tumor phenotypes[J]. Pancreas, 2009, 38(2): 184-196.
- [10] Ku JL, Shin YK, Kim DW, et al. Establishment and characterization of 13 human colorectal carcinoma cell lines: mutations of genes and expressions of drug-sensitivity genes and cancer stem cell markers[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(6): 1003-1009.
- [11] Busch M, Philippe C, Weise A, et al. Re-characterization of established human retinoblastoma cell lines[J]. Histochem Cell Biol, 2015, 143(3): 325-338.
- [12] McFall RC, Sery TW, Makadon M. Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma[J]. Cancer Res, 1977, 37(4): 1003-1010.
- [13] Katsetos CD, Herman MM, Frankfurter A, et al. Neuron-associated class III β -tubulin isotype, microtubule-associated protein 2, and synaptophysin in human retinoblastomas *in situ*. Further immunohistochemical observations on the Flexner-Wintersteiner rosettes[J]. Lab Invest, 1991, 64(1): 45-54.
- [14] He W, Hashimoto H, Tsuneyoshi M, et al. A reassessment of histologic classification and an immunohistochemical study of 88 retinoblastomas. A special reference to the advent of bipolar-like cells[J]. Cancer, 1992, 70(12): 2901-2908.
- [15] Kyritsis AP, Tsokos M, Triche TJ, et al. Retinoblastoma: origin from a primitive neuroectodermal cell?[J]. Nature, 1984, 307(5950): 471-473.
- [16] Di FR, D'Anneo A, Tesoriere G, et al. RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(8): 1676-1687.
- [17] Madreperla SA, Bookstein R, Jones OW, et al. Retinoblastoma cell lines Y79, RB355 and WERI-Rb27 are genetically related[J]. Ophthalmic Paediatr Genet, 1991, 12(1): 49-56.
- [18] Volchenboum SL, Li C, Li S, et al. Comparison of primary neuroblastoma tumors and derivative early-passage cell lines using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis[J]. Cancer Res, 2009, 69(10): 4143-4149.
- [19] Brenner JC, Graham MP, Kumar B, et al. Genotyping of 73 UM-SCC head and neck squamous cell carcinoma cell lines[J]. Head Neck, 2010, 32(4): 417-426.
- [20] Qiu Z, Zou K, Zhuang L, et al. Hepatocellular carcinoma cell lines retain the genomic and transcriptomic landscapes of primary human cancers[J]. Sci Rep, 2016, 6: 27411.
- [21] Hartmann C, Klüwe L, Lücke M, et al. The rate of homozygous *CDKN2A/p16* deletions in glioma cell lines and in primary tumors[J]. Int J Oncol, 1999, 15(5): 975-982.
- [22] Wistuba II, Bryant D, Behrens C, et al. Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(5): 991-1000.
- [23] Liu GJ, Cimmino L, Jude JG, et al. Pax5 loss imposes a reversible differentiation block in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia[J]. Gene Dev, 2014, 28(12): 1337-1350.
- [24] Eberhard D, Busslinger M. The partial homeodomain of the transcription factor Pax-5 (BSAP) is an interaction motif for the retinoblastoma and TATA-binding proteins[J]. Cancer Res, 1999, 59(7 Suppl): 1716s-1725s.
- [25] Dirks WG, Fährnich S, Lis Y, et al. Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene in tumor cell lines[J]. Int J Cancer, 2002, 100(1): 49-56.
- [26] Martinelli P, Bonetti P, Sironi C, et al. The lymphoma-associated *NPM-ALK* oncogene elicits a p16INK4a/pRb-dependent tumor-suppressive pathway[J]. Blood, 2011, 117(24): 6617-6626.
- [27] Ramanujan A, Tiwari S. APC/C and retinoblastoma interaction: cross-talk of retinoblastoma protein with the ubiquitin proteasome pathway[J]. Biosci Rep, 2016, 36(5). DOI: 10.1042/BSR20160152.

[收稿日期] 2018-03-13

[本文编辑] 瞿麟平

