

· 专家述评 ·

## 关注 *RB1* 基因突变检测在视网膜母细胞瘤诊疗及遗传咨询中的作用

陈大年 范依萌

610041 成都, 四川大学华西医院眼科学研究室(陈大年、范依萌); M5G IX5 多伦多, 多伦多大学眼科及西奈山医院研究所(陈大年)

通信作者: 陈大年, Email: danianchen2006@qq.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.10.002

**【摘要】** 视网膜母细胞瘤(RB)是人类遗传型肿瘤的原型,是常见的儿童眼内恶性肿瘤,其发生和发展与肿瘤抑制基因 *RB1* 基因的突变密切相关。*RB1* 基因突变检测和遗传咨询有助于为患者及其家庭提供理想的诊疗及随访方案。在 2017 年最新的第 8 版国际 TNM 肿瘤分期标准中,首次把遗传性(H)作为 RB 的临床分期标准,这是国际上首个 TNMH 分期标准。但目前由于 *RB1* 基因突变的复杂性、现有基因检测方式的局限性、遗传咨询人才的缺乏等原因,*RB1* 基因突变检测在中国的开展水平还比较低。在中国大力发展精准医学的时代,眼科医师应加倍努力,推动 *RB1* 基因突变检测在中国的应用。

**【关键词】** 视网膜母细胞瘤; *RB1* 基因; 基因突变; 基因检测; 遗传咨询

### Emphasizing on the importance of *RB1* genetic testing in diagnosis/treatment and genetic counseling of retinoblastoma

Chen Danian, Fan Yimeng

Research Laboratory of Ophthalmology and Vision Sciences, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Chen DN, Fan YM); Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Sinai Health System, Departments of Ophthalmology and Visual Science, and Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto M5G 1X5 Canada (Chen DN)

Corresponding author: Danian Chen, Email: danianchen2006@qq.com

**【Abstract】** Retinoblastoma (RB) is the prototype of hereditary neoplasms in humans. It is the most common intraocular malignancy in children, which is mainly caused by *RB1* gene mutation. *RB1* genetic testing and genetic counseling supports optimal care and follow-up plan for RB patients and their families. RB is the first cancer to officially acknowledge the seminal role of genetics in cancer, by incorporating "H" into the eighth edition of cancer staging (2017); those who carry the *RB1* cancer-predisposing gene are H1; those proven to not carry the familial *RB1* mutation are H0; and those at unknown risk are HX. However, due to the complexity of *RB1* gene mutation, the limitation of current genetic test, the lack of genetic counseling specialty, there is limited application of genetic testing and counseling in China. In the era of precision medicine, we need to advocate the application of *RB1* genetic testing in the management of RB patients in China.

**【Key words】** Retinoblastoma; *RB1* gene; Gene mutation; Genetic testing; Genetic counseling

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是常见的儿童眼内恶性肿瘤,是人类遗传性肿瘤的原型,RB的发生和发展与 *RB1* 基因突变密切相关。统计数据表明,全球每年新发 RB 病例约有 8 000 例<sup>[1]</sup>,中国每年新发病例则超过 1 100 例<sup>[2]</sup>。RB 分为遗传型和非遗传型<sup>[3]</sup>,遗传型主要为生殖细胞突变,表现为双侧 RB(占 80%)或单眼多发 RB(占 15%),其中约 5% 可伴

发颅内肿瘤,如松果体瘤及蝶鞍上或蝶鞍旁的原发性神经母细胞瘤,称为三侧性 RB(trilateral retinoblastoma, TRB)<sup>[4]</sup>。非遗传型 RB 为体细胞突变所致,多为单侧 RB。在所有 RB 病例中,遗传型 RB 约占 45%,非遗传型约占 55%,此外部分 RB 存活着,尤其是遗传型 RB 患者,若干年后多发生第二恶性肿瘤(second malignant neoplasm, SMN),其组织学类型包括肉瘤、上皮癌、TRB

和恶性黑色素瘤等<sup>[5]</sup>。通过 *RBI* 基因突变的检测分析,明确 RB 的遗传类型及临床 TNM 期,对于 RB 患者治疗方案的确(精准医学)、随访以及预防其家族成员再次罹患该病均有十分重要的作用,这在中国目前大力推进健康中国的大环境下显得尤为迫切,因此眼科医生应了解 *RBI* 基因突变相关知识、*RBI* 基因突变检测及相关研究的最新进展。

## 1 *RBI* 基因突变相关知识

### 1.1 *RBI* 基因及其主要功能

*RBI* 基因是人类发现的第一个肿瘤抑制基因,定位于 13q14,全长约 180 kb,共 27 个外显子,编码具有 928 个氨基酸残基的 RB 蛋白(pRB)<sup>[6]</sup>。pRB 调节细胞的分裂周期,非磷酸化状态的或低磷酸化状态的 RB 蛋白可以与转录因子腺病毒 E2 启动子结合因子(adenovirus E2 promoter binding factor, E2F)结合,从而抑制细胞分裂<sup>[7-9]</sup>。周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent protein kinases, CDKs)可使 RB 蛋白磷酸化,进而与转录因子 E2F 解离,从而激活细胞分裂过程<sup>[10]</sup>,因此 RB 蛋白的丢失会导致异常细胞分裂。很多细胞可以通过上调其他蛋白来代偿 RB 蛋白的缺失或失活,但部分细胞(如人视网膜视锥前体细胞)的补偿机制难以完全补偿 RB 蛋白的作用,pRB 功能失活就会导致细胞异常分裂及肿瘤的产生<sup>[11]</sup>。

### 1.2 *RBI* 基因突变的发生

目前仍然无法明确地解释 *RBI* 基因突变发生的原因,但有研究表明其突变可能与父母生育年龄及父母射线暴露史有关<sup>[1]</sup>。虽然大部分患者 *RBI* 基因突变是新发生的和独特的(de novo)<sup>[12-13]</sup>,但确实也在一些并无亲属关系的患者中发现了相同的 *RBI* 基因突变,如 22% 的 *RBI* 基因突变发生在该基因的 11 个 CpG 序列区<sup>[14]</sup>。新发生的 *RBI* 胚系突变既可以发生在受精前,也可发生于受精后。受精前发生的 *RBI* 突变可能由于精子分化过程中的细胞分裂比卵子更加活跃,所以突变通常发生于精子形成过程中<sup>[15-16]</sup>,这可能是高龄父亲的后代患 RB 的概率较高的原因<sup>[17]</sup>,其后代所有的细胞都携带有 *RBI* 基因突变,常表现为视网膜上存在 4~5 个 RB,且双眼受累。相反,若突变发生于受精后的胚胎形成过程中,那么胎儿只有部分细胞携带 *RBI* 突变基因,称为镶嵌突变<sup>[1]</sup>,而低水平的镶嵌突变给基因检测带来了不小的挑战。

### 1.3 *RBI* 基因突变具有多样性

*RBI* 基因突变主要有 4 种基本类型,即无功能突变、阅读框架移码突变、启动子突变(点突变和甲基

化)和杂合性丧失(loss of heterozygosity, LOH)<sup>[18]</sup>。Valverde 等<sup>[19]</sup>基于 RBGMdb 数据库对 932 例已报道的 *RBI* 突变进行分析,发现 *RBI* 突变谱特征包括:(1)RB 蛋白功能失活主要由无义突变和缺失突变引起;(2)40% 的 *RBI* 突变位于 16 个突变热点,包括 12 个无义突变、2 个错义突变和 3 个剪接突变。其他 60% 的 *RBI* 突变分布相对分散,主要集中于 9、10、14、17、18、20 和 23 这 7 个外显子区域;(3)不同种族、不同国家和地区的患者 *RBI* 无义突变和剪接突变发生率存在显著差异。

### 1.4 *RBI* 基因突变与 RB 的关系

Knudson<sup>[20]</sup>于 1971 年提出了“二次突变”理论来解释 RB 的形成过程,认为 *RBI* 基因通过 2 次突变使该基因失活是 RB 发生的关键限速过程。对于遗传型 RB,第一次 *RBI* 基因突变(M1)发生于包括生殖细胞在内的几乎所有细胞中,第二次突变(M2)发生在视网膜细胞,从而导致肿瘤的发生。常见的 M2 是正常 *RBI* 拷贝的丢失和 M1 突变基因的复制,称为杂合性丧失(loss of heterozygosity, LOH)<sup>[21]</sup>。在非遗传型 RB 中,98% 患者的 *RBI* 基因 M1 和 M2 突变同时存在于视网膜细胞,仅有 2% 的患者没有 *RBI* 基因突变,但存在 *N-MYC* 基因的扩增<sup>[21]</sup>。

越来越多的研究发现,单纯 2 次突变仅导致良性的视网膜瘤而不足以导致 RB 的发生,由视网膜瘤进一步发展为 RB 则需要第三次突变(M3),甚至更多次的突变<sup>[22-23]</sup>。所以在 RB 中除了有 *RBI* 基因的缺失,还可伴有其他基因拷贝数的改变,包括癌基因拷贝数增加[如 *MDM4*、*KIF14* (位于染色体 1q32)、*N-MYC* (位于染色体 2p24)、*DEK* 和 *E2F3* (位于染色体 6p22)]及抑癌基因拷贝数的减少[如 *CDH11* (位于染色体 16q22-24)]<sup>[24-26]</sup>。即使如此,携带胚系 *RBI* 基因突变的儿童约 90% 会发生 RB(外显率为 90%),有小部分家庭即使存在 *RBI* 基因突变,发生 RB 的可能性也较小或 RB 发生较晚,这部分 RB 患者为“低外显率 RB”。低外显率 RB 家族的 *RBI* 基因突变一般仅引起部分 pRB 功能的丧失,如突变位于 5' 末端的第 1~2 外显子或 3' 末端的第 24~27 外显子,或剪接突变/内含子突变等<sup>[27-30]</sup>。比较少见的一种情况是,如果 13 号染色体的严重缺失同时累及相邻位置的 *RBI* 基因和 *MED4* 基因,由于这 2 个基因同时缺乏的细胞无法存活,这种突变也导致低外显率 RB,但大多数情况下,累及 *RBI* 基因的大片段缺失均导致双侧 RB<sup>[31-32]</sup>。由于 *RBI* 基因是一个印迹基因,其表达受表观遗传因子的调控,主要是差异性 DNA 甲基化导致

一些 *RBI* 基因突变,表现出父源或母源的明显差异<sup>[33]</sup>。如 *RBI* 基因的 c. 607+1G>T 突变和 c. 1981C>T (p. Arg661Trp) 错义突变若来源于母系则表现为低外显率 RB,为 10%,若来源于父系则外显率可高达 68%<sup>[34-36]</sup>。

## 2 *RB* 基因突变检测

*RB* 患者基因的突变与临床诊断、风险判断、治疗方式的选择、预后等密切相关<sup>[37-38]</sup>。中国每年 *RB* 新发病例较多,建立快速有效的 *RBI* 基因检测平台是十分必要的。

### 2.1 *RB* 基因突变检测策略

对于双眼 *RB* 患者,目前的基因检测策略是先检测外周血标本中 DNA 的 *RBI* 基因突变,如果 DNA 质量可靠,97% 的患者外周血标本中可检测出 *RBI* 基因突变,但在大约 3% 的患者外周血标本中找不到胚系突变,应再对肿瘤组织进行 DNA 检测,以确定致病突变,包括低度的镶嵌突变<sup>[39-40]</sup>。对于单眼 *RB* 患者可先检测肿瘤组织中 DNA 的 *RBI* 基因突变,然后再在外周血 DNA 中寻找肿瘤的 *RBI* 基因突变。通过检测可以确定患者是遗传型还是非遗传型 *RB*,并判断具体的 *RBI* 基因突变类型。

### 2.2 *RB* 的基因突变检测技术

已有多项技术手段用于 *RBI* 基因突变的检测,传统的方法,如 Sanger 测序可以检测点突变以及小片段的插入或缺失,准确率高,但多样化的 *RBI* 基因突变时 Sanger 测序效率过低,也检测不到拷贝数变异<sup>[38]</sup>。基因捕获技术联合 Sanger 测序是针对致病基因多个目标区域进行高通量测序,可以降低测序成本,缩短检测时间<sup>[41]</sup>。多重连接依赖性探针扩增 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)、多重定量 PCR、微阵列-比较基因组杂交法 (array comparative genomic hybridization, array CGH) 可以用于检测 *RBI* 基因的大片段缺失和复制以及基因拷贝数的改变,如 N-MYC 扩增<sup>[38]</sup>。等位基因特异性 PCR (alleles specific PCR, AS-PCR) 的优势在于可以检测已知体细胞突变的低水平镶嵌状态<sup>[12,42]</sup>。新一代测序 (next-generation sequencing, NGS) 可以同时高通量地分析多个基因组序列,在检测未知的或新发生的突变基因方面有明显优势,但如何储存和分析 NGS 产生的海量数据仍是亟待解决的问题<sup>[37]</sup>。微卫星多态标记分析可比较肿瘤组织和血液 DNA 的微卫星位点,检测 LOH 的基因位点信息。逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 通过对 RNA 转录水平进行分析,检测

隐匿的内含子序列改变<sup>[38]</sup>或基因内缺失的镶嵌突变<sup>[30]</sup>。染色体水平的突变分析主要包括核型分析和荧光原位杂交技术 (fluorescence in situ hybridization, FISH),可对外周血淋巴细胞进行染色体水平分析,检测较大片段缺失和易位<sup>[38]</sup>。尤其是通过核型分析,可以检测到 13q14 缺失综合征患者的平衡转位<sup>[32]</sup>。

## 3 *RBI* 基因突变检测的应用

### 3.1 *RBI* 基因突变检测用于 *RB* 分期及 *RB* 治疗指导

*RB* 患者的基因突变情况是 *RB* 肿瘤的最新 TNMH 分期标准 (2017) 中的一个重要依据<sup>[43]</sup>。H1 是指有 *RB* 家族史、双侧性或三侧性 *RB*、高敏感性 *RBI* 基因突变检测阳性;HX 是指不明确是否携带 *RBI* 基因突变;H0 是指血标本中未检测到携带先证者 *RBI* 基因突变 (但仍可能有 <1% 的概率存在镶嵌突变)。明确 *RB* 的分型及分期有助于临床诊断、风险判断、治疗方式的选择及预后判断<sup>[37-38]</sup>,例如若是 H1 (遗传型) 不宜采用外放射疗法,这会明显增加发生 SMN 的概率。

### 3.2 *RBI* 基因突变检测用于遗传咨询

通过遗传咨询,患者及其家属可以了解病情、疾病的遗传方式、患者后代或其双亲再育子女罹患 *RB* 的风险,以帮助他们做出是否再次生育的决策<sup>[44]</sup>。一般可在瘤组织中发现 2 个突变 (可相同也可不同),如果在外周血白细胞中也存在其中的一个基因突变则可判断为遗传型 *RB*,如果在外周血白细胞中不存在突变则可判断为非遗传型 *RB*。对遗传型 *RB* 患者的亲戚可采血检查是否有相同的 *RBI* 基因突变,若有则其本人及子女有 90% 的患病风险,若无则风险较低。再行 DNA 检查进行遗传咨询时要注意镶嵌体和低外显率现象。

### 3.3 *RBI* 基因检测用于产前诊断

遗传型 *RB* 患者于妊娠 11~14 周取绒毛膜绒毛或于妊娠 28~30 周取羊水细胞作 *RBI* 基因突变检测可进行胎儿产前患病风险评估<sup>[45]</sup>,若存在 *RBI* 基因突变最好终止妊娠;若胎儿父母不愿终止妊娠,可于妊娠 33~35 周行经阴道 B 型超声检查,每周 1~2 次,观察胎儿眼内是否有肿瘤形成,若有可在妊娠 35 周引产并立即对肿瘤进行激光治疗<sup>[38]</sup>。有研究发现,携带家族 *RBI* 基因突变的胎儿进行早期引产可在肿瘤体积尚小时进行治疗,从而保留眼球及有用视力<sup>[46]</sup>。

### 3.4 *RBI* 基因检测可用于植入前基因诊断

部分国家通过体外授精技术和植入前基因诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 联合技术来避免将 *RBI* 基因突变传给下一代<sup>[47]</sup>。通常在胚胎发育



早期(多在 8 细胞阶段)检测胚胎是否携带家族性突变,选择未携带 *RBI* 基因突变的胚胎植入。然而,上述检测不能排除表观遗传学改变,推荐对这些胎儿也常规进行产前诊断<sup>[38]</sup>。

### 3.5 *RBI* 基因检测用于随访方案的制定

若患者携带胚系突变或镶嵌突变,则推荐接受至少 3 年的定期全身麻醉下眼底检查<sup>[38]</sup>。由于遗传型 RB 患者发生 SMN 风险高且一旦发生 SMN 预后很差,所以需要每年定期监测是否发生其他肿瘤<sup>[5]</sup>。若患者不携带胚系突变则无需对健眼进行 EUA,进行一般随访检查即可。

### 3.6 *RBI* 基因检测有助于 RB 发病机制及治疗研究

这些已知基因突变类型的患者可纳入临床试验进行纵向研究,有助于进行基因型-表型相关性分析,进一步理解 RB 的发生及发展机制,为靶向治疗、个体化治疗和精准医疗研究奠定基础<sup>[37]</sup>。

## 4 *RBI* 基因检测的覆盖率有待提高

美国、加拿大、德国等均有实验室开展高敏感性 *RBI* 基因突变检测<sup>[38]</sup>,但在发展中国家,由于专业的遗传咨询覆盖率低,很多家庭没有机会了解到基因检测和遗传咨询在 RB 治疗和随访中的重要性<sup>[1]</sup>。基因检测和遗传咨询在全球范围内的覆盖率仍然不高,可能与以下原因有关:(1)*RBI* 基因突变具有其复杂性

①*RBI* 基因有 27 个外显子,其突变具有多样性,涉及 DNA 水平、转录水平以及染色体水平的突变<sup>[13-14,48]</sup>。

②目前的检测手段难以捕捉低水平的镶嵌突变<sup>[12,49-50]</sup>。

③*RBI* 基因型和表型的差异性增加了基因诊断的难度<sup>[51]</sup>。15% 的遗传型 RB 仅累及单眼<sup>[1]</sup>,2% 的非遗传型 RB 患者的 *RBI* 基因没有突变<sup>[21]</sup>。由于低外显率的原因,*RBI* 突变基因携带者也不一定会发病<sup>[52]</sup>。

(2) 现有基因检测方式仍有其局限性 大部分检测技术繁琐而耗时;内含子序列内的突变同样影响剪接,导致外显子跳读和阅读框架移位,影响 pRB 功能;而这些内含子深处的突变却难以检测到<sup>[30,53-56]</sup>;区分低水平镶嵌突变和体细胞突变对遗传咨询十分重要,因为镶嵌突变属于遗传型 RB,而体细胞突变属于非遗传型 RB,但目前的检测技术有时难以区分<sup>[57]</sup>;有 2% 的非遗传型患者没有 *RBI* 基因突变,但存在 *N-MYC* 基因扩增现象,难以检测到<sup>[21]</sup>。(3) 基因检测需要眼科医师的参与,更需要团队的支持

①*RBI* 基因型和表型间存在差异,临床和实验室密切合作以沟通表型信息和基因突变的信息有助于基因型/表型差异的理解。②基因检测结果需要遗传咨询专家与患者和家属沟

通,如基因的外显率、表达性、杂合度等问题都需要遗传咨询专家进行解释。③RB 预后不佳,可能会诱发患者的心理问题。有研究表明,盲会触发患者的悲伤反应而导致抑郁<sup>[37]</sup>。因此,对患者及其家属的心理支持也十分重要,但目前缺乏相关人才,不足以支撑基因诊断的快速发展。(4) 政府的作用不容忽视 医疗保险多未覆盖基因检测项目,导致很多患者因经济原因而放弃基因检测,需要从国家政策层面给予足够的经济支持,如为临床试验研究提供充足的资金,购入功能强大的基因检测设备;向民众宣传 *RBI* 基因检测在 RB 诊疗中的重要性,以提高父母对 RB 的认识;培养包括遗传咨询专家在内的相关人才。

## 5 展望

高通量基因检测产生海量数据,这意味着一次 NGS 会带来以各种不同文件类型存储的数千兆字节原始数据<sup>[37]</sup>。如何长期储存这些数据,如何从海量的数据中提取有价值的信息都是不小的挑战。或许随着生物信息学技术和分析方法的进步,不需要再存储大量的原始数据,仅需要存储有意义的键信息<sup>[58]</sup>。即便到了那个阶段,这些数据在卫生服务机构间的共享和转移仍是一个问题。此外,基因检测还会带来伦理问题,如 NGS,尤其是全基因组测序,可提供除了 *RBI* 基因突变外其他基因的信息。如果在检测中意外发现可能会引起其他疾病的基因突变,尤其是那些现有医疗条件无法治愈的疾病,我们是否应该告知患者这些信息<sup>[59]</sup>?

虽然目前中国大力推进精准医学的发展,中国可进行肿瘤基因突变高通量测序的医院、基因检测公司或第三方临检机构很多,但检测结果存在准确性问题。由于 RB 患者总体数量较少且分散(每年约有 1 100 例),目前国内尚无专门开展 *RBI* 基因检测的机构<sup>[60]</sup>。少数单位开展的 *RBI* 基因检测主要还是从科研的角度,还没有真正用于 RB 患者的临床诊断、治疗及随访<sup>[41,61-65]</sup>。*RBI* 基因除了在 RB 肿瘤中有重要作用外,在多种成人肿瘤,如肝癌、小细胞肺癌、乳腺癌、前列腺癌的发生和发展中也有重要作用<sup>[66]</sup>,所以实际上开展 *RBI* 基因检测是有比较大的市场的,因此我们应该大力宣传开展 *RBI* 基因检测对于中国肿瘤防治的推动作用。总之,在中国开展 *RBI* 基因检测的机遇和挑战并存,这需要眼科医师、患者、其他相关科室、公司、政府通力合作,才能让这一技术更好地造福于中国 RB 患者及其家庭。

## 参考文献

- [1] Dimaras H, Corson TW, Cobrinik D, et al. Retinoblastoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1 : 15021-15029. DOI:10. 1038/nrdp. 2015. 21.
- [2] 陈大年, 李安仁, 罗成仁. 视网膜母细胞瘤 [M]//李凤鸣, 谢立信. 中华眼科学. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014 : 2391-2399.
- [3] Naumova A, Sapienza C. The genetics of retinoblastoma, revisited [J]. Am J Hum Genet, 1994, 54 (2) : 264-273.
- [4] de Jong MC, Kors WA, de Graaf P, et al. Trilateral retinoblastoma: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Oncol, 2014, 15 (10) : 1157-1167. DOI:10. 1016/S1470-2045 (14) 70336-5.
- [5] Temming P, Arendt M, Viehmann A, et al. How Eye-preserving therapy affects long-term overall survival in heritable retinoblastoma survivors [J]. J Clin Oncol, 2016, 34 (26) : 3183-3188. DOI:10. 1200/JCO. 2015. 65. 4012.
- [6] Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma [J]. Nature, 1986, 323 (6089) : 643-646. DOI:10. 1038/323643 a0.
- [7] Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer [J]. Hum Mol Genet, 2001, 10 (7) : 699-703.
- [8] Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control [J]. Oncogene, 2005, 24 (17) : 2796-2809. DOI:10. 1038/sj. onc. 1208619.
- [9] Sage J, Cleary ML. Genomics: the path to retinoblastoma [J]. Nature, 2012, 481 (7381) : 269-270. DOI:10. 1038/481269a.
- [10] Knudsen ES, Knudsen KE. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8 (9) : 714-724. DOI:10. 1038/nrc2401.
- [11] Xu XL, Singh HP, Wang L, et al. Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours [J]. Nature, 2014, 514 (7522) : 385-388. DOI:10. 1038/nature13813.
- [12] Rushlow D, Piovesan B, Zhang K, et al. Detection of mosaic RB1 mutations in families with retinoblastoma [J]. Hum Mutat, 2009, 30 (5) : 842-851. DOI:10. 1002/humu. 20940.
- [13] Richter S, Vandezande K, Chen N, et al. Sensitive and efficient detection of *RB1* gene mutations enhances care for families with retinoblastoma [J]. Am J Hum Genet, 2003, 72 (2) : 253-269. DOI:10. 1086/345651.
- [14] de Andrade AF, da Hora Barbosa R, Vargas FR, et al. A molecular study of first and second RB1 mutational hits in retinoblastoma patients [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2006, 167 (1) : 43-46. DOI:10. 1016/j. cancergencyto. 2005. 08. 017.
- [15] Zhu XP, Dunn JM, Phillips RA, et al. Preferential germline mutation of the paternal allele in retinoblastoma [J]. Nature, 1989, 340 (6231) : 312-313. DOI:10. 1038/340312a0.
- [16] Dryja TP, Morrow JF, Rapaport JM. Quantification of the paternal allele bias for new germline mutations in the retinoblastoma gene [J]. Hum Genet, 1997, 100 (3-4) : 446-449.
- [17] Toriello HV, Meck JM. Statement on guidance for genetic counseling in advanced paternal age [J]. Genet Med, 2008, 10 (6) : 457-460. DOI:10. 1097/GIM. 0b013e318176fabb.
- [18] Du W, Searle JS. The rb pathway and cancer therapeutics [J]. Curr Drug Targets, 2009, 10 (7) : 581-589. DOI:10. 2174/138945009788680392.
- [19] Valverde JR, Alonso J, Palacios I, et al. *RB1* gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database [J/OL]. BMC Genet, 2005, 6 : 53 [2018-07-21]. https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC1298292/. DOI:10. 1186/1471-2156-6-53.
- [20] Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971, 68 (4) : 820-823.
- [21] 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. DOI:10. 1016/s1470-2045 (13) 70045-7.
- [22] 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) : 1363-1372. DOI:10. 1093/hmg/ddn024.
- [23] 陈大年. 二十一世纪视网膜母细胞瘤研究: 希望与挑战 [J]. 中华眼底病杂志, 2007, 23 (5) : 310-313.  
Chen DN. Hopes and challenges: the research on retinoblastoma in 21st century [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2007, 23 (5) : 310-313.
- [24] Corson TW, Gallie BL. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2007, 46 (7) : 617-634. DOI:10. 1002/gcc. 20457.
- [25] Theriault BL, Dimaras H, Gallie BL, et al. The genomic landscape of retinoblastoma: a review [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2014, 42 (1) : 33-52. DOI:10. 1111/ceo. 12132.
- [26] Chen D, Gallie BL, Squire JA. Minimal regions of chromosomal imbalance in retinoblastoma detected by comparative genomic hybridization [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2001, 129 (1) : 57-63. DOI:10. 1016/S0165-4608 (01) 00427-7.
- [27] Sanchez-Sanchez F, Ramirez-Castillejo C, Weekes DB, et al. Attenuation of disease phenotype through alternative translation initiation in low-penetrance retinoblastoma [J]. Hum Mutat, 2007, 28 (2) : 159-167. DOI:10. 1002/humu. 20394.
- [28] Bremner R, Du DC, Connolly-Wilson MJ, et al. Deletion of RB exons 24 and 25 causes low-penetrance retinoblastoma [J]. Am J Hum Genet, 1997, 61 (3) : 556-570. DOI:10. 1086/515499.
- [29] Mitter D, Rushlow D, Nowak I, et al. Identification of a mutation in exon 27 of the *RB1* gene associated with incomplete penetrance retinoblastoma [J]. Fam Cancer, 2009, 8 (1) : 55-58. DOI:10. 1007/s10689-008-9198-4.
- [30] Zhang K, Nowak I, Rushlow D, et al. Patterns of missplicing caused by RB1 gene mutations in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression [J]. Hum Mutat, 2008, 29 (4) : 475-484. DOI:10. 1002/humu. 20664.
- [31] Dehainault C, Garancher A, Castera L, et al. The survival gene MED4 explains low penetrance retinoblastoma in patients with large RB1 deletion [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23 (19) : 5243-5250. DOI:10. 1093/hmg/ddu245.
- [32] Mitter D, Ullmann R, Muradyan A, et al. Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions [J]. Eur J Hum Genet, 2011, 19 (9) : 947-958. DOI:10. 1038/ejhg. 2011. 58.
- [33] Kanber D, Berulava T, Ammerpohl O, et al. The human retinoblastoma gene is imprinted [J/OL]. PLoS Genet, 2009, 5 (12) : e1000790 [2018-09-24]. https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC2791201/. DOI:10. 1371/journal. pgen. 1000790.
- [34] Klutz M, Brockmann D, Lohmann DR. A parent-of-origin effect in two families with retinoblastoma is associated with a distinct splice mutation in the *RB1* gene [J]. Am J Hum Genet, 2002, 71 (1) : 174-179. DOI:10. 1086/341284.
- [35] Schuler A, Weber S, Neuhauser M, et al. Age at diagnosis of isolated unilateral retinoblastoma does not distinguish patients with and without a constitutional *RB1* gene mutation but is influenced by a parent-of-origin effect [J]. Eur J Cancer, 2005, 41 (5) : 735-740. DOI:10. 1016/j. ejca. 2004. 12. 022.
- [36] Eloy P, Dehainault C, Sefta M, et al. A parent-of-origin effect impacts the phenotype in low penetrance retinoblastoma families segregating the c. 1981C>T/p. Arg661Trp mutation of RB1 [J/OL]. PLoS Genet, 2016, 12 (2) : e1005888. https://journals. plos. org/plosgenetics/article?id=10. 1371/journal. pgen. 1005888. DOI:10. 1371/journal. pgen. 1005888PGENETICS-D-15-01880.
- [37] Gillespie RL, Hall G, Black GC. Genetic testing for inherited ocular disease: delivering on the promise at last? [J] Clin Exp Ophthalmol, 2014, 42 (1) : 65-77. DOI:10. 1111/ceo. 12159.
- [38] Soliman SE, Racher H, Zhang C, et al. Genetics and molecular diagnostics in retinoblastoma—an update [J]. Asia Pac J Ophthalmol

- (Phila), 2017, 6(2): 197-207. DOI: 10.22608/apo.201711.
- [39] McEvoy J, Nagahawatte P, Finkelstein D, et al. *RBI* gene inactivation by chromothripsis in human retinoblastoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(2): 438-450. DOI: 10.18632/oncotarget.1686.
- [40] Astudillo PP, Chan HS, Heon E, et al. Late-diagnosis retinoblastoma with germline mosaicism in an 8-year-old [J]. *J AAPOS*, 2014, 18(5): 500-502. DOI: 10.1016/j.jaapos.2014.06.012 S1091-8531(14)00424-8.
- [41] 孟庆娣, 黄旅珍, 王斌, 等. 基因捕获技术在视网膜母细胞瘤患者 *RBI* 基因突变筛选的应用 [J]. *中华眼科杂志*, 2017, 53(6): 455-459. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2017.06.012.
- Meng QY, Huang LZ, Wang B, et al. Application of gene capture technology on mutation screening of *RBI* gene in retinoblastoma patients [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2017, 53(6): 455-459. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2017.06.012.
- [42] Zhou L, Palais RA, Smith GD, et al. Enrichment and detection of rare alleles by means of snapback primers and rapid-cycle PCR [J]. *Clin Chem*, 2010, 56(5): 814-822. DOI: 10.1373/clinchem.2009.142034.
- [43] Mallipatna A, Chévez-Barrios P, Lumbroso-Le Rouic L, et al. *Retinoblastoma* [M]//Amin MB ES, Greene FL. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th. New York: Springer International Publishing, 2017: 819-831.
- [44] Biesecker BB, Peters KF. Process studies in genetic counseling: peering into the black box [J]. *Am J Med Genet*, 2001, 106(3): 191-198. DOI: 10.1002/ajmg.10004.
- [45] Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, et al. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(1): 16-26. DOI: 10.1002/uog.14636.
- [46] Soliman SE, Dimaras H, Khetan V, et al. Prenatal versus postnatal screening for familial retinoblastoma [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(12): 2610-2617. DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.08.027.
- [47] Xu K, Rosenwaks Z, Beaverson K et al. Preimplantation genetic diagnosis for retinoblastoma: the first reported liveborn [J]. *Am J Ophthalmol*, 2004, 137(1): 18-23. DOI: 10.1016/S0002-9394(03)00872-9.
- [48] Sampieri K, Hadjistilianou T, Mari F, et al. Mutational screening of the *RBI* gene in Italian patients with retinoblastoma reveals 11 novel mutations [J]. *J Hum Genet*, 2006, 51(3): 209-216. DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.08.027.
- [49] Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. Chromosomal mosaicism goes global [J]. *Mol Cytogenet*, 2008, 1: 26 [2018-01-29]. DOI: 10.1186/1755-8166-1-26.
- [50] Sippel KC, Fraioli RE, Smith GD, et al. Frequency of somatic and germline mosaicism in retinoblastoma: implications for genetic counseling [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(3): 610-619. DOI: 10.1086/301766.
- [51] Hung CC, Lin SY, Lee CN, et al. Low penetrance of retinoblastoma for p.V654L mutation of the *RBI* gene [J]. *BMC Med Genet*, 2011, 12: 76-81. DOI: 10.1186/1471-2350-12-76.
- [52] Lohmann DR, Brandt B, Hopping W, et al. Distinct *RBI* gene mutations with low penetrance in hereditary retinoblastoma [J]. *Hum Genet*, 1994, 94(4): 349-354.
- [53] Nichols KE, Houseknecht MD, Godmilow L, et al. Sensitive multistep clinical molecular screening of 180 unrelated individuals with retinoblastoma detects 36 novel mutations in the *RBI* gene [J]. *Hum Mutat*, 2005, 25(6): 566-574. DOI: 10.1002/humu.20184.
- [54] Dehainault C, Michaux D, Pages-Berhouet S, et al. A deep intronic mutation in the *RBI* gene leads to intronic sequence exonisation [J]. *Eur J Hum Genet*, 2007, 15(4): 473-477. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201787.
- [55] Brichard B, Heusterspreute M, de Potter P, et al. Unilateral retinoblastoma, lack of familial history and older age does not exclude germline *RBI* gene mutation [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(1): 65-72. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.07.027.
- [56] Alonso J, Palacios I, Gamez A, et al. Molecular diagnosis of retinoblastoma: molecular epidemiology and genetic counseling [J]. *Med Clin (Barc)*, 2006, 126(11): 401-405. DOI: 10.1157/13086125.
- [57] Chen Z, Moran K, Richards-Yutz J, et al. Enhanced sensitivity for detection of low-level germline mosaic *RBI* mutations in sporadic retinoblastoma cases using deep semiconductor sequencing [J]. *Hum Mutat*, 2014, 35(3): 384-391. DOI: 10.1002/humu.22488.
- [58] Scholz MB, Lo CC, Chain PS. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(1): 9-15. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.11.013.
- [59] Bilguvar K, Ozturk AK, Louvi A, Kwan KY, Choi M, Tatli B, et al. Whole-exome sequencing identifies recessive *WDR62* mutations in severe brain malformations [J]. *Nature*, 2010, 467(7312): 207-210. DOI: 10.1038/nature09327.
- [60] 陈长征, 郁想想. 重视开展视网膜母细胞瘤的基因诊断工作 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(7): 617-620. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.07.001.
- Chen CZ, Yu XX. The importance of carrying out the gene diagnosis for retinoblastoma [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(7): 617-620. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.07.001.
- [61] 杜琴, 江悦华, Brenda LG. *RBI* 基因第 24 和 25 外显子缺失导致低外显性视网膜母细胞瘤 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19(5): 370-374.
- Du Q, Jiang YH, Brenda LG. Low-penetrance retinoblastoma due to exons 24 and 25 deletions in the *RBI* gene [J]. *Chin J Med Genetic*, 2002, 19(5): 370-374.
- [62] 盛迅伦, 吴伟民, 庄文娟, 等. 视网膜母细胞瘤患者 *RBI* 基因突变筛选 [J]. *国际眼科杂志*, 2005, 5(2): 243-245.
- Sheng XL, Wu WM, Zhuang WJ, et al. A constitutional mutation screening of the *RBI* gene in patients with retinoblastoma [J]. *Int J Ophthalmol*, 2005, 5(2): 243-245.
- [63] 徐萍, 黄倩. 变性高效液相色谱技术在视网膜母细胞瘤基因诊断中的应用 [J]. *中华眼科杂志*, 2007, 43(6): 564-566.
- Xu P, Huang Q. Denaturing high performance liquid chromatography and its application in retinoblastoma gene diagnosis [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2007, 43(6): 564-566.
- [64] 袁萍, 钟诚, 潘启豪, 王一鸣, 等. *RBI* 基因的一生殖细胞系新生突变致视网膜母细胞瘤 [J]. *中华眼底病杂志*, 2014(6): 616-618. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2014.06.019.
- [65] 薛康, 吴继红, 任慧, 等. 视网膜母细胞瘤低外显率一家系基因研究 [J]. *中华眼底病杂志*, 2015, 31(6): 553-555. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2015.06.010.
- Xue K, Wu JH, Ren H, et al. Analysis of gene mutation in a Chinese family with low penetrance retinoblastoma [J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2015, 31(6): 553-555. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2015.06.010.
- [66] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell* 2011, 144(5): 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

(收稿日期: 2018-02-17 修回日期: 2018-08-27)

(本文编辑: 尹卫靖)