

# 染色体外环状DNA的研究进展

王冯娟 渠爽 梁宏伟\*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198)

**摘要** 染色体外环状DNA(extrachromosomal circular DNA, eccDNA)是存在于真核生物染色体外的环状DNA分子, 由基因组中的DNA或细胞内的外源DNA形成。eccDNA是一类特殊的遗传物质, 可以携带完整的基因, 编码有功能的蛋白质或RNA。研究表明, eccDNA可以通过特殊的方式参与多种生理和病理过程, 例如: 衰老、肿瘤的发生等。该文综述了eccDNA的最新研究进展, 并对eccDNA与肿瘤的关系进行深入的阐述。

**关键词** 染色体外环状DNA; 肿瘤; 肿瘤的演化

## Research Advances on Extrachromosomal Circular DNA

WANG Fengjuan, QU Shuang, LIANG Hongwei\*

(School of Life Sciences and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**Abstract** eccDNA (extrachromosomal circular DNA) is a kind of circular DNA molecule in eukaryotes. It is a kind of special genetic material and carry complete genes which can express functional protein or RNA. eccDNA can be generated by DNA from endogenous genome and exogenous DNA in cells. Several studies have proved eccDNA can participate in various physiological and pathological processes, such as aging and tumorigenesis. In this paper, the authors review the research progress of eccDNA and elaborate the relationship between eccDNA and tumor.

**Keywords** extrachromosomal circular DNA; tumor; tumor evolution

真核生物体内的DNA分子长期以来一直被认为主要以线性的形式存在于细胞核中<sup>[1]</sup>。但是, 1965年HOTTA等<sup>[2]</sup>在小麦和猪的生殖细胞中发现一种存在于染色体外的环状DNA分子——染色体外环状DNA(extrachromosomal circular DNA, eccDNA)。然而, 历经一个世纪, eccDNA一直被认为是没有生物学功能的垃圾碎片。直到近期, 多项研究发现, eccDNA在正常细胞和肿瘤细胞中都普遍存在, 并且以特殊的方式参与肿瘤的发生和发展。与线性的染色体DNA相比, eccDNA结构开放、携带活跃的组蛋白修饰, 能够介导基因间的超远距离相互作用, 可以极大地增强基因的转录活性<sup>[3-4]</sup>。本文就eccDNA的

特点、研究历史、分类以及功能进行综述, 并深入探讨eccDNA与肿瘤的关系, 为开展eccDNA的相关研究, 尤其是肿瘤治疗方法的开发提供思路。

### 1 eccDNA的特点

eccDNA是一种普遍存在于真核生物中的、游离于染色体外的环状DNA分子。作为真核生物中增加基因异质性和表型差异性的染色体外遗传元素, eccDNA的分布十分广泛, 在人、鼠、酵母、黑腹果蝇、拟南芥等生物中都可以被检测到<sup>[5-7]</sup>。在不同的组织、细胞和个体中, eccDNA的大小、丰度和序列都存在差异; 此外, eccDNA的含量还受到发育、代

收稿日期: 2021-08-03

接受日期: 2021-09-16

国家自然科学基金青年项目(批准号: 31801088)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 19822621160, E-mail: hwliang@nju.edu.cn

Received: August 3, 2021

Accepted: September 16, 2021

This work was supported by the Youth Project of National Natural Science Foundation of China (Grant No.31801088)

\*Corresponding author. Tel: +86-19822621160, E-mail: hwliang@nju.edu.cn

谢等多种因素的调控<sup>[8-9]</sup>。近期研究表明, eccDNA在肿瘤细胞中广泛存在, 可以作为癌基因扩增的载体。由于一些eccDNA不遵循孟德尔分配定律, 因此携带癌基因和相关耐药基因的eccDNA可以在肿瘤中快速大量积累, 从而在肿瘤的发生和恶性进展中扮演着至关重要的角色<sup>[10]</sup>。

eccDNA的大小从几百bp到几十Mb不等<sup>[8,11]</sup>, 主要来源于基因组DNA或外源DNA。eccDNA可以由来源于基因组不同染色体位点的重复序列或非重复序列、编码区或非编码区产生<sup>[5]</sup>。例如, STOR-LAZZ及其同事<sup>[12]</sup>的研究发现, 急性髓系白血病患者8号染色体缺失的MYC基因出现在eccDNA上, 这不仅表明eccDNA序列可以来源于基因组, 还提示eccDNA与急性髓系白血病的发生有着密切的关系。此外, eccDNA还可以由染色体DNA和病毒基因组组成<sup>[13-14]</sup>。例如, 从丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)阴性者的外周血单核细胞中可以检测到包含HCV同源序列的eccDNA<sup>[14]</sup>。eccDNA也可以重新整合进基因组, 以均匀染色区(homogeneous staining region, HSR)的形式存在, 这可能会破坏抑癌基因的表达<sup>[11,15]</sup>。

eccDNA的大小、序列、来源不尽相同, 提示eccDNA的生成可能受到不同的机制驱动, 即使是来源于同一模板的eccDNA也可能经历不同的加工方式, 产生不同大小的环状DNA。与线性DNA和RNA相比, 环状的eccDNA能够抵御RNA酶和外切酶的消化, 所以eccDNA从细胞释放进血液后或许可以存在更长的时间<sup>[16]</sup>。eccDNA与肿瘤有着密不可分的关系, 目前在肿瘤中发现了spcDNA、端粒环、ecDNA、microDNA等<sup>[11,17]</sup>。其中, microDNA可以被肿瘤组织释放到循环中, 这提示eccDNA或许可以作为恶性肿瘤诊断和预后的生物标志物<sup>[16]</sup>。

## 2 eccDNA的简要研究历史

1868年冬天, 年轻的瑞士医生FRIEDRICH MIESCHER从白细胞中提取到一种富含磷元素的酸性化合物, 并将它命名为“核质”, 这是人们首次发现DNA<sup>[18]</sup>。随后, 科学家围绕DNA开展了一系列的研究。STAHL认为, 高等生物中的DNA可能被组织成一系列的环状结构, 细菌和病毒中环状DNA的发现暗示了这一猜想的正确性<sup>[2]</sup>。直到1965年, HOTTA等<sup>[2]</sup>报道在小麦细胞核和猪精子中鉴定出大小不一

的环状DNA, 才正式证明了这一猜想。同年, COX等<sup>[19]</sup>报道在神经母细胞瘤中发现了eccDNA, 这些eccDNA大小不等, 在不同细胞中数量不同。上世纪80年代左右, 随着分子克隆等技术的发展成熟, 陆续有科学家在不同的样本中发现癌基因(如: MYCN、EGFR)可以以eccDNA的形式进行扩增<sup>[20]</sup>, 同时还发现一些致癌物质和DNA复制抑制剂可以促进eccDNA的形成<sup>[5,21]</sup>。尽管已经发现癌基因与eccDNA有着密切的联系, 但是由于技术水平的限制, 科学家们未能对这些特殊的DNA分子进行深入的研究, 它们的形成机制以及它们对肿瘤发生发展的意义尚不明确。

直到高通量测序时代来临, 芯片微阵列分析和二代测序技术的进一步发展、成熟和改进, eccDNA的结构和遗传等特性才被慢慢揭示。2012年, SHIBATA等<sup>[22]</sup>在哺乳动物细胞中鉴定出了长度在200~400 nt的小型环状DNA分子, 即microDNA。2017年, TURNER等<sup>[23]</sup>通过全基因组测序、结构建模和细胞遗传学分析的方法, 分析了17种不同类型的癌症细胞, 发现eccDNA几乎在一半的癌症细胞中出现, 并且eccDNA在不同类型的癌症中出现的频率有较大的差异。2018年, MOLLER等<sup>[24]</sup>研究了16个健康人的血液和肌肉样本, 检测到了约十万种eccDNA, 其中大约一半eccDNA含有完整的基因或者基因片段。2019年, WU等<sup>[3]</sup>利用扫描透射电子显微镜在肿瘤样本中观察到了具有环状结构的eccDNA, 随后高通量测序发现这种eccDNA的结构疏松, 开放性高, 具有很高的转录活性。同年, MORTON等<sup>[4]</sup>发现eccDNA的环状结构能帮助非编码区的增强子调控eccDNA中癌基因的表达, 从而使得eccDNA上的癌基因的转录活性比染色体上的线性基因更强。

## 3 eccDNA的分类

eccDNA根据来源、大小、序列特征等被分为很多种类型, 如: microDNA、ecDNA(extrachromosomal DNA)、染色体外rDNA环(extrachromosomal rDNA circle, ERC)、端粒环(telomeric circle, t-circle)等(表1)<sup>[5-6]</sup>。

### 3.1 ecDNA

ecDNA是能自主复制的、缺乏可识别的着丝粒和端粒的染色体外环状元素<sup>[6]</sup>。ecDNA一般可达1~3 Mb, 平均大小约1.3 Mb, 可以包含多个完整的基因和调控区域, 用DAPI染色后在光学显微镜下可

表1 eccDNA的特征  
Table 1 Characteristics of eccDNA

eccDNA的分类 Classification of eccDNA	大小 Size	特征 Characteristic	潜在的功能 Potential function	参考文献 Reference
MicroDNA	100-400 bp	Mostly from non-repetitive sequences	Regulate gene expression	[25]
ecDNA	1-3 Mb	Accessible chromatin structure	Promote tumor deterioration	[20]
ERC	19.3-40.4 Kb	Contains rDNA units	Related to aging	[8]
t-circle	Multiples of 738 bp	Involves in alternative lengthening of telomeres	Maintain telomere length	[6]

见<sup>[3,6,26]</sup>。ecDNA有单体和双体两种形式<sup>[6]</sup>。它的双体形式是由染色质纤维连接两个相同的姐妹单体而形成的,被称为双微体<sup>[27]</sup>。1965年,COX等<sup>[19]</sup>首次描述了核型异常的神经母细胞瘤中双微体的大小、形态、数量。此后,随着高通量测序、细胞遗传学等相关技术的发展,进一步揭示了ecDNA的结构和遗传特性。ecDNA在癌细胞中普遍存在,常包含可以驱动癌症发生的原癌基因和耐药基因<sup>[6]</sup>,在推动肿瘤的异质性和进展方面起到至关重要的作用<sup>[20]</sup>。研究指出,ecDNA在神经母细胞瘤、食道癌和鳞状细胞肺癌中最为常见。许多基因,如: *EGFR*、*MYC*、*CCND1*、*CDK4*和*MDM2*已经被证实能够通过双微体扩增以增加拷贝数,从而增强癌细胞对不断变化的环境的适应性。

与基因组DNA相比,ecDNA具有更高的转录活性。染色体DNA通常与组蛋白八聚体紧紧缠绕在一起,开放程度较低。细胞需要利用转录因子等一系列的蛋白质进行染色质重塑之后,才能在细胞核中识别并读取一部分的DNA遗传指令<sup>[28]</sup>。ecDNA没有被高度压缩,其结构较疏松且具有很强的开放性,因此转录因子很容易接近启动子等顺式作用元件。此外,研究发现ecDNA上具有活跃型的组蛋白修饰,缺乏抑制型的组蛋白修饰,并且ecDNA的环状结构还可以介导超远距离的基因间相互作用。以上这些因素,都促使ecDNA上的癌基因相比染色体上的癌基因具有更强的转录活性<sup>[3]</sup>。

临床样本测试表明,ecDNA在恶性肿瘤中出现的频率高于良性肿瘤,并且在正常组织中的出现频率较低<sup>[11,26]</sup>,这提示在不远的将来或许可以利用这一特点来检测肿瘤的复发和转移。

### 3.2 microDNA

在鉴定分子内同源重组位点时,SHIBATA及其同事<sup>[22]</sup>从胚胎鼠的脑细胞核中分离出一种新型的

eccDNA,即: microDNA。microDNA以单链和双链两种形式存在于许多组织中,并可以由组织释放进入循环系统。microDNA的大小在60~2 000 bp,其中约有84%的microDNA集中在100~400 bp。通过富集环状DNA,经剪切、克隆、测序及鉴定DNA环化产生的连接标记,发现绝大多数microDNA来源于基因组的非重复序列<sup>[22,29]</sup>。且产生位点的分布具有选择性,常位于基因的5'UTR、3'UTR、富含CpG和外显子的区域、由活跃染色质修饰的启动子以及与RNA聚合酶II相关的基因区域<sup>[22,29]</sup>。

microDNA富含GC序列,且常被双核苷酸AA、AT、TT打断。拥有这种特征的序列往往倾向于组装成核小体。另外,肿瘤细胞中microDNA具有明显的150 bp的周期性,这两点表明microDNA可能是由核小体的DNA形成的<sup>[22]</sup>。此外,ecDNA具有排列疏松的核小体结构,表明microDNA除了可以由基因组序列产生外,或许还可以由ecDNA转化而来。换句话说,为了满足细胞生存的需求,不同种类的eccDNA在面对环境压力时或许可以相互转化,发挥不同的调节功能。研究发现,随着年龄的增长,一些启动子上的具有基因特异性的CpG二核苷酸可以被甲基化修饰<sup>[30]</sup>。这些被甲基化修饰的序列通常容易形成microDNA。因此,来源于甲基化的CpG位点的microDNA被认为可以通过控制转录的方式影响机体的衰老。

microDNA广泛存在于机体的各种组织<sup>[29]</sup>,由于microDNA非常小,因此它不能携带完整的编码蛋白质的基因序列,但是足以携带编码调节RNA的基因。PAULSEN等<sup>[25]</sup>根据已知的microDNA序列合成microDNA,发现这些microDNA的模拟物能够表达有功能的microRNA,并发挥基因沉默的作用。这暗示,或许microDNA的转录产物可以抑制基因表达,并与其他类型的eccDNA形成功能网络,从而影响机



体内基因数量和功能的平衡。例如: microDNA在肿瘤细胞内的数量显著上升,它的作用机制可能是microDNA转录产生的调节RNA促使抑癌基因沉默,从而导致相关癌基因不受控制大量表达<sup>[25]</sup>。

### 3.3 ERC

ERC是含有一个或多个rDNA单元、缺乏着丝粒的、能够自主复制的环状DNA分子<sup>[31-32]</sup>。它可以由核糖体DNA同源重组产生,然后作为rRNA转录的模板。核糖体DNA(ribosomal DNA, rDNA)是编码核糖体组分rRNA的基因序列。真核生物中的rDNA高度不稳定,以串联重复单元的形式存在<sup>[33]</sup>。每个rDNA单元上有一个DNA复制叉停顿点(replication fork barrier, RFB),可以避免DNA复制叉和rDNA转录复合物发生碰撞<sup>[34]</sup>。停滞的复制叉非常不稳定,复制叉阻断蛋白与RFB结合会高频率诱导DNA双链断裂(DNA double-strand break, DSB)<sup>[35]</sup>。如果断裂的rDNA通过染色单体内重组进行修复,就可以由染色单体上重复的rDNA位点产生含有一个或多个rDNA单元的ERC<sup>[36]</sup>。ERC的产生受到细胞代谢需求的影响。除此之外,ERC的产生还与rDNA的稳定性有关,受到rDNA总拷贝数的反馈调节<sup>[35]</sup>。

近些年的研究表明,ERC可能与细胞衰老有关,然而ERC与衰老的关系却存在着很大的争议。1997年, SINCLAIR和GUARENTE<sup>[32]</sup>发现ERC在衰老酵母中大量积累,因此推断ERC是促衰老因子。酵母的*fohl1*突变体产生ERC的数量减少,其寿命确实得到延长<sup>[37]</sup>。这些证据肯定了ERC促进衰老,缩短寿命这一推测。但是, GANLEY等<sup>[38]</sup>观察到ERC水平降低同样会导致寿命缩短。rDNA或许是基因组中最不稳定的区域。鉴于基因组的稳定性会影响哺乳动物细胞的寿命,他们进一步研究了其背后的分子机制,发现删除FOB1后的rARS $\Delta$ -3amp菌株的rDNA恢复了稳定性,酵母的寿命也恢复到了野生型的水平。这一研究表明,酵母寿命的长短取决于基因组是否稳定。最近有研究发现,ERCs是补救不稳定的基因组的物质。当酿酒酵母基因组不稳定导致rDNA缩短的时候,ERC会迅速扩增进行补偿,ERC还可以以一种剂量依赖的方式重新插入到基因组中以扩展rDNA<sup>[35]</sup>。ERC可以维持rDNA结构的稳定和总数的动态平衡<sup>[35]</sup>,同时参与细胞衰老的调控,暗示衰老的发生或许受到由环境因素和内在因素控制的基因组稳定性的影响<sup>[39]</sup>。

### 3.4 T细胞受体删除环

从骨髓迁移到胸腺内的前体T细胞经过阳性选择和阴性选择之后成熟为初始T细胞。在这一过程中,获得功能性的T细胞受体(T cell receptor, TCR)是T细胞成熟的关键,这对T细胞的活化和后续的分化至关重要<sup>[40]</sup>。TCR的成熟需要经历V(D)J重排。在这一过程中,V、D、J基因组装成能够识别抗原的T细胞受体V区<sup>[41-43]</sup>。在每一次紧密调控的基因重排过程中,当特定的基因片段连接时,核酸片段可以被删除形成稳定的eccDNA片段,即所谓的T细胞受体删除环(T-cell receptor excision circles, TRECs)<sup>[44]</sup>。

TRECs不易随时间降解,不能复制,在T淋巴细胞分裂增殖的过程中会被稀释<sup>[44]</sup>。胸腺中的初始T细胞成熟后会迁移到外周,TRECs能够反映胸腺功能的变化,可以用于监测胸腺的输出功能<sup>[42,44]</sup>。因此,TRECs被认为是淋巴细胞输出的标志<sup>[45]</sup>。TREC有许多应用,如:评估造血干细胞移植后的胸腺功能、检测与T细胞数量和功能异常有关的疾病<sup>[45-46]</sup>。TRECs的数量受到很多因素的影响,如:胸腺的输出功能、初始T细胞的寿命、外周血T细胞分裂和细胞死亡、遗传差异等。因此,虽然TRECs可以用作胸腺输出的度量,但是对于健康人和患者的TRECs数据的解释仍然需要慎重考量<sup>[42]</sup>。

## 4 eccDNA形成机制

目前,研究人员只是试图通过观察eccDNA的序列特征、研究促进或抑制环状DNA形成的因素等方式,解释eccDNA产生的原因<sup>[20]</sup>。然而,eccDNA形成的具体分子机制仍然不清楚,所以仍需要付出更多的努力。环状DNA的产生是一个多因素协同作用的复杂过程<sup>[5]</sup>。在这一过程中,DNA复制、RNA代谢、基因重排、DNA损伤修复(DNA damage repair, DDR)等都能够影响它的形成<sup>[11,22,44]</sup>。

eccDNA的形成受到基因稳定性的影响。研究表明,细胞暴露于致癌物甲基亚磺酸甲酯等DNA损伤剂之后,细胞内eccDNA的水平显著升高<sup>[47]</sup>。与细胞增殖有关的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路在恶性肿瘤细胞中经常被异常激活。MAPK信号通路中的蛋白ERK1/2被证实能驱动DNA环的生成,并最终形成双微体(double-minutes, DMs)。SUN等<sup>[48]</sup>发现,当用MAPK-ERK1/2的抑制剂U0126和PD98059处理肿瘤

细胞以抑制ERK1/2的组成性磷酸化时, DMs的数量明显下降。

RNA代谢很可能参与了 microDNA 的产生过程。倾向于形成R环的基因区域(如: 具有活跃染色质标记的转录起始位点)往往可以产生microDNA。microDNA的量常常随着转录产物的长度和外显子密度的增加而增加<sup>[29]</sup>。

由于多数的eccDNA都包含来源于串联重复序列的染色体DNA, 因此同源重组可能作为一种普遍的机制参与eccDNA的产生<sup>[49]</sup>。CAI等<sup>[50]</sup>发现, 在含DMs的甲氨蝶呤耐药细胞中, 同源重组活力衰减促使DMs的数量显著降低。DILLON等<sup>[29]</sup>发现, MSH3 DNA错配修复蛋白可以通过同源重组的方式促进microDNA的形成。1939年, 断裂-融合-桥循环(breakage-fusion-bridge cycle, BFB cycle)被首次提出<sup>[51]</sup>。MCCLINTOCK认为在每一次有丝分裂过程中, 由DNA损伤引起同一条染色体上基因拷贝数增加, 会导致基因以HSR或ecDNA的形式扩增<sup>[6,51-52]</sup>。这个理论解释了为什么扩增的基因常定位于DMs和HSR中。随后, 其他研究组也陆陆续续提出易位缺失扩增模型、ODIRA模型、“附加体”模型等解释eccDNA的形成<sup>[5-6,53]</sup>, 然而这些模型都只关注了eccDNA形成的某一个方面, 不能对eccDNA的产生给出全面的阐释。eccDNA的扩增是一个复杂的过程, 受到DNA序列的结构、组织等多种因素和机制的共同调控, 因此还需要进行深入研究以阐释eccDNA的形成机理。

## 5 ecDNA与肿瘤

### 5.1 帮助肿瘤演化

基因组处在持续变化的动态过程, 这种不稳定性是机体内的DNA积累自发突变的驱动力, 也是细胞内异质性的“燃料”<sup>[53]</sup>。基因突变受到外源因素和内源因素的影响, 可以以一种渐进式的方式随着时

间缓慢积累<sup>[54]</sup>。此外, 在细胞中还存在着大爆炸式的突变方式, 如: 染色体碎裂<sup>[54]</sup>。染色体碎裂是发生在细胞中的染色体畸变的灾难性事件, 以成簇的、大规模的基因重排为标志。在这一过程中, 一条或几条染色体在短时间内破碎, 成千上万的染色体片段被任意拼接, 形成“补丁”样的染色体。同时可能伴随着部分基因不精确的DNA修复机制而游离、环化产生ecDNA<sup>[15,55]</sup>。染色体碎裂可能会导致抑癌基因的破坏、癌基因的异常激活(强启动子和增强子的获得)、基因突变、癌基因的融合和高拷贝。这些异常的基因都可能以ecDNA的形式游离于基因组之外, 引起细胞不受控制地增殖, 推动肿瘤发生、维持和进展<sup>[15]</sup>。

ecDNA作为染色体碎裂的副产物, 多存在于以基因异常为特征的癌细胞中<sup>[23]</sup>。通过ecDNA扩增的癌基因能够赋予携带它们的肿瘤克隆生存优势, 驱动肿瘤克隆高水平扩增<sup>[23]</sup>。其中一个典型的例子就是肿瘤细胞获得抗药性(图1)。二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)基因是降低癌细胞对甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)敏感度的基因, 往往通过两个主要的拓扑结构: 游离的ecDNA和定位在染色体上的HSR扩增。与HSR相比, ecDNA能导致更高水平的DHFR转录、赋予癌细胞生存优势, 最终引起不利的化疗结果<sup>[6]</sup>。

与染色体DNA不同, 缺乏着丝粒和动粒的ecDNA因不会受到纺锤丝的牵引而被随机分配到子代细胞中<sup>[6,56]</sup>。这能够帮助癌细胞在短时间内快速大量积累某一个基因的拷贝。如果该基因是驱动癌症的原癌基因, 那么癌细胞就可能在某一选择性压力下获得超强的生存优势, 迅速发展成优势克隆。同时, ecDNA分配的随机性使得不同的子细胞携带不同数量的、包含不同基因的ecDNA, 这会造成具有不同遗传特征的癌细胞同时共存, 导致肿瘤异质

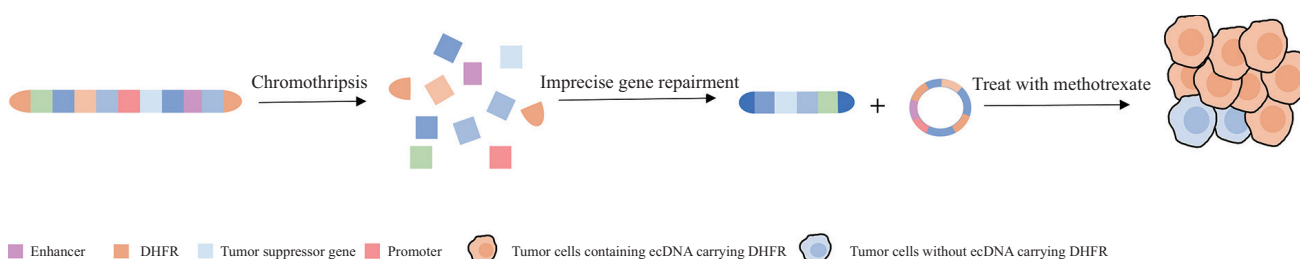


图1 染色体碎裂介导肿瘤细胞耐药

Fig.1 Chromothripsis mediates drug resistance of tumor cells

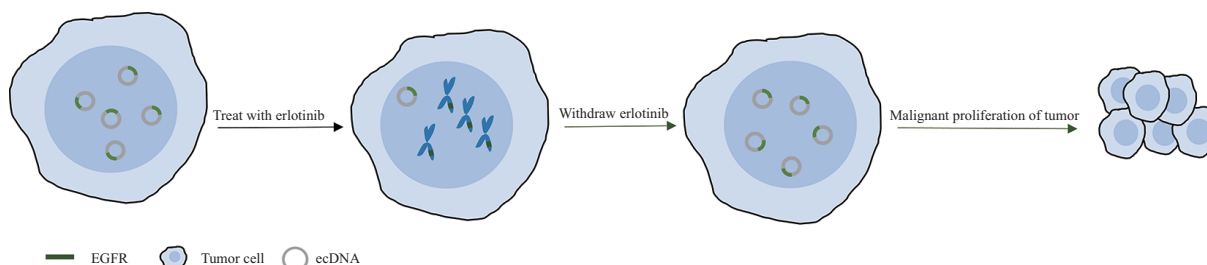


图2 厄洛替尼诱导EGFR基因的动态整合从而介导肿瘤细胞恶性增殖

Fig.2 Erlotinib induces the dynamic integration of EGFR gene and mediates the malignant proliferation of tumor cells

性的出现<sup>[57]</sup>。总之, ecDNA帮助肿瘤生存和动态演化, 是未来的临床实验设计和药物开发中面临的一个不可避免的难题。

### 5.2 eccDNA与癌基因表达

多年来, 在研究肿瘤驱动事件时, 注意力通常集中在鉴定基因编码区发生的变化<sup>[58]</sup>, 而染色质的拓扑结构、增强子以及癌基因边界以外的一些非编码区尚未得到研究<sup>[4]</sup>。近期的研究表明, 原癌基因可以和增强子共同环化形成ecDNA, 一方面削弱抑制基因表达的抑制子的抑制作用, 另一方面强化增强子的增强作用, 从而促进原癌基因的表达。例如, MORTON等<sup>[4]</sup>发现胶质母细胞瘤中的功能性增强子往往与癌基因如EGFR共同环化, 以削弱抑制子的抑制作用, 增强增强子的增强作用, 提高癌基因的转录效率。此外, 形成ecDNA的癌基因的组蛋白上往往会携带活跃的组蛋白修饰(如H3K9Ac、H3K4me3和H3K79me2), 很少出现抑制基因表达的组蛋白修饰<sup>[59]</sup>。WU等<sup>[3]</sup>通过高通量测序等手段在ecDNA上检测到多种活跃的组蛋白标记。

### 5.3 ecDNA的形态转化

ecDNA和畸形染色体都是癌基因在肿瘤中扩增的载体, 但目前对它们之间关系的研究仍然有限。畸形染色体是含有扩增的癌基因的环状染色体, 能为肿瘤细胞提供选择性的生长优势。2018年, L'ABBATE等<sup>[60]</sup>在研究急性髓细胞白血病中扩增子的结构和表达模式时, 发现双微体有向环状染色体进化的可能性。GARSEED等<sup>[61]</sup>在分化的脂肪肉瘤中观察到了同样的现象。此外, 在某些情况下, 聚集的DMs可以形成微核<sup>[27]</sup>。在有丝分裂间期的G<sub>1</sub>期, DMs定位在核外周。在有丝分裂间期的S期, DMs复制并重新定位到核中央。随后, 在正常情况下, DMs会结合在染色体上, 随染色体的分离进入子细胞。但如果用低浓度的DNA复制抑制剂处理细胞, 一部

分DMs就会聚集形成独立于染色体的微核<sup>[6,27,62]</sup>。微核的形成或许可以逆转肿瘤的恶性特征, 从而达到治疗的目的<sup>[6]</sup>。ecDNA还可以动态地重新整合到染色体中, 导致基因组重塑。2017年, TURNER等<sup>[23]</sup>将荧光原位杂交与二代测序结合, 分析了EGFRvIII扩增子的结构。他们工作中的一个关键发现就是在用厄洛替尼处理之后, 携带EGFRvIII的ecDNA会重新整合到染色体上。停止用厄洛替尼处理后, 携带EGFRvIII的ecDNA又可以从染色体中游离出来(图2)。我们认为, 这个令人惊异的现象可能和肿瘤休眠有关。肿瘤休眠指的是原发性肿瘤切除后很长时间才发生全身或局部的肿瘤复发。在这期间, 肿瘤生长几乎是静止的, 患者处于带瘤生存状态<sup>[63]</sup>。我们推断当肿瘤细胞受到剧烈的外部刺激时, 大量ecDNA转化成HSR插入染色体, 肿瘤进入休眠期; 而当解除环境刺激时, 肿瘤细胞内的ecDNA重新游离出来, 导致肿瘤再次活跃生长。这些发现不仅丰富了ecDNA的作用形式, 还为研究肿瘤发生和复发的分子机制提供了新的思路。

## 6 eccDNA的研究方法

对于eccDNA的研究, 目前还处于鉴定发现的阶段。为了鉴定和发现eccDNA, 常常需要利用高通量测序的手段对待检测的样本内eccDNA的种类和含量进行评估。由于eccDNA在细胞和组织内的含量比较低, 在研究eccDNA之前, 首先要对环状DNA进行富集纯化。目前富集纯化eccDNA的方法大多都依赖于eccDNA具有的特殊环状结构。一般来说, 在分离待检测细胞或组织内的总DNA后, 可以使用能够去除线性DNA而不会降解环状DNA的核酸酶去除线性化DNA<sup>[16]</sup>, 随后利用滚环扩增对eccDNA进行扩增<sup>[16,24]</sup>。扩增后的样品, 可以利用双端测序, 通过分析环状DNA独特的连接位点(如: Circle-Map)<sup>[64]</sup>



或拷贝数变异(如: Amplicon Architect)<sup>[65]</sup>来对 eccDNA 进行定量。还有一种方式不需要通过滚环扩增增加拷贝数, 而是利用 Tn5 转座酶切割 eccDNA<sup>[66]</sup>。这种酶切的方式与滚环扩增相比, 由于不需要扩增, 所以比较容易进行定量。滚环扩增的优点是便于定性, 缺点是反复扩增的 DNA 片段会增加信噪比, 导致不能定量<sup>[24,66]</sup>。最近, MEHTA 等<sup>[67]</sup>基于三代测序发明了一种可以检测环状 DNA 的新方法——环状 DNA 富集测序(circular DNA enrichment sequencing, CIDER-Seq)。MEHTA 等利用随机引物扩增环状 DNA 后, 通过 PacBio 长读长测序获得环状 DNA 的全长序列, 最后用 DeConcat 进行数据分析。与 Illumina 二代测序相比, CIDER-Seq 的测序读长增加。但是对于超过 8 Kb 的环状 DNA 分子, CIDER-Seq 测序精确度可能会有所下降。

目前除了用高通量测序鉴定 eccDNA 的种类和数量之外, 部分研究组还通过荧光原位杂交、染色质构象捕获等技术探究 eccDNA 的细胞内分布及与染色质相互作用的情况<sup>[3]</sup>。例如, MORTON 等<sup>[4]</sup>分别利用公开的 HiC 数据和 4C-seq 分析了线性染色体以及环状 DNA 上 *EGFR* 基因位点的相互作用状况, 发现 eccDNA 的环状结构能介导超远距离基因间相互作用, 同时削弱抑制子的边界效应, 最终促进癌基因的表达。

## 7 总结与展望

染色体外环状 DNA 是存在于真核生物中的具有单链或双链的闭合环状 DNA 分子, 在生理和病理过程中发挥至关重要的作用。目前, 科研人员已经根据一些现象对 eccDNA 的形成过程进行了合理推测, 并建立了相关模型。在 eccDNA 的功能方面也有了进一步的进展。尤其是 2019 年, WU 等<sup>[3]</sup>和 MORTON 等<sup>[4]</sup>报道 eccDNA 的染色质的开放性比染色体更强, 同时携带功能性的增强子, 导致 eccDNA 上的癌基因具有更强的转录活性。这两个发现颠覆了人们以往关于基因位于染色体上的认识, 为癌症治疗指出一个新的方向, 提出了一个全新的思路。然而现在仍然缺乏更新、更全面的方法研究 eccDNA 在调控生理和病理过程中的具体作用, 还有很多问题亟待解决。例如: eccDNA 的合成与消除的具体分子机制、后加工等过程还没有完全弄清楚。一个细胞里 eccDNA 的数量是有限的, 那么 eccDNA 的复制终

点是什么? 不同类型的 eccDNA 之间可以根据细胞的需要相互转化吗? 不同类型的 eccDNA 在整个细胞或者机体中是否发挥着联动功能? 如果 eccDNA 也可以从细胞中释放, 那么它可以发挥什么样的作用? 在肿瘤细胞中, eccDNA 是否可以传递肿瘤细胞的异常遗传物质给正常细胞, 从而改变它们的基因表达? 相信伴随着这些谜团的一步步揭开, 未来 eccDNA 会在疾病治疗、液体活检等方面得到越来越广泛的应用。

## 参考文献 (References)

- [1] KUJIRAI T, KURUMIZAKA H. Transcription through the nucleosome [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2020, 61: 42-9.
- [2] HOTTA Y, BASSEL A. Molecular size and circularity of DNA in cells of mammals and higher plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1965, 53: 356-62.
- [3] WU S, TURNER K M, NGUYEN N, et al. Circular ecDNA promotes accessible chromatin and high oncogene expression [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 699-703.
- [4] MORTON A R, DOGAN-ARTUN N, FABER Z J, et al. Functional enhancers shape extrachromosomal oncogene amplifications [J]. *Cell*, 2019, 179(6): 1330-41, e13.
- [5] PAULSEN T, KUMAR P, KOSEOGLU M M, et al. Discoveries of extrachromosomal circles of DNA in normal and tumor cells [J]. *Trends Genet*, 2018, 34(4): 270-8.
- [6] LIAO Z, JIANG W, YE L, et al. Classification of extrachromosomal circular DNA with a focus on the role of extrachromosomal DNA (ecDNA) in tumor heterogeneity and progression [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(1): 188392.
- [7] COHEN S, HOUBEN A, SEGAL D. Extrachromosomal circular DNA derived from tandemly repeated genomic sequences in plants [J]. *Plant J*, 2008, 53(6): 1027-34.
- [8] AIN Q, SCHMEER C, WENGERODT D, et al. Extrachromosomal circular DNA: current knowledge and implications for CNS aging and neurodegeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2477.
- [9] DENNIN R H. Overlooked: extrachromosomal DNA and their possible impact on whole genome sequencing [J]. *Malays J Med Sci*, 2018, 25(2): 20-6.
- [10] VERHAAK R G W, BAFNA V, MISCHER P S. Extrachromosomal oncogene amplification in tumour pathogenesis and evolution [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(5): 283-8.
- [11] YAN Y, GUO G, HUANG J, et al. Current understanding of extrachromosomal circular DNA in cancer pathogenesis and therapeutic resistance [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 124.
- [12] STORLAZZI C T, FIORETOS T, SURACE C, et al. MYC-containing double minutes in hematologic malignancies: evidence in favor of the episome model and exclusion of MYC as the target gene [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(6): 933-42.
- [13] SCHMIDT H, TAUBERT H, LANGE H, et al. Small polydispersed circular DNA contains strains of mobile genetic elements and occurs more frequently in permanent cell lines of malignant tumors than in normal lymphocytes [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(2):

- 393-400.
- [14] DENNIN R H, WO J E. DNA sequences homologous to hepatitis C virus (HCV) in the extrachromosomal circular DNA in peripheral blood mononuclear cells of HCV-negative subjects [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019, 20(8): 637-46.
- [15] STEPHENS P J, GREENMAN C D, FU B, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development [J]. *Cell*, 2011, 144(1): 27-40.
- [16] KUMAR P, DILLON L W, SHIBATA Y, et al. Normal and cancerous tissues release extrachromosomal circular DNA (eccDNA) into the circulation [J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(9): 1197-205.
- [17] WANG T, ZHANG H, ZHOU Y, et al. Extrachromosomal circular DNA: a new potential role in cancer progression [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 257.
- [18] DAHM R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research [J]. *Hum Genet*, 2008, 122(6): 565-81.
- [19] COX D, YUNCKEN C, SPRIGGS A. Minute chromatin bodies in malignant tumours of childhood [J]. *The Lancet*, 1965, 286(7402): 55-8.
- [20] BAILEY C, SHOURA M J, MISCHER P S, et al. Extrachromosomal DNA-relieving heredity constraints, accelerating tumour evolution [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(7): 884-93.
- [21] RUIZ J C, CHOI K H, VON HOFF D D, et al. Autonomously replicating episomes contain *mdr1* genes in a multidrug-resistant human cell line [J]. *Mol Cell Biol*, 1989, 9(1): 109-15.
- [22] SHIBATA Y, KUMAR P, LAYER R, et al. Extrachromosomal microDNAs and chromosomal microdeletions in normal tissues [J]. *Science*, 2012, 336(6077): 82-6.
- [23] TURNER K M, DESHPANDE V, BEYTER D, et al. Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity [J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 122-5.
- [24] MOLLER H D, MOHIYUDDIN M, PRADA-LUENGO I, et al. Circular DNA elements of chromosomal origin are common in healthy human somatic tissue [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1069.
- [25] PAULSEN T, SHIBATA Y, KUMAR P, et al. Small extrachromosomal circular DNAs, microDNA, produce short regulatory RNAs that suppress gene expression independent of canonical promoters [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(9): 4586-96.
- [26] CHIU R W K, DUTTA A, HENSSON A G, et al. What is extrachromosomal circular DNA and what does it do [J]? *Clin Chem*, 2020, 66(6): 754-9.
- [27] GU X, YU J, CHAI P, et al. Novel insights into extrachromosomal DNA: redefining the onco-drivers of tumor progression [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 215.
- [28] LUGER K, HANSEN J C. Nucleosome and chromatin fiber dynamics [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, 15(2): 188-96.
- [29] DILLON L W, KUMAR P, SHIBATA Y, et al. Production of extrachromosomal microDNAs is linked to mismatch repair pathways and transcriptional activity [J]. *Cell Rep*, 2015, 11(11): 1749-59.
- [30] ALISCH R S, BARWICK B G, CHOPRA P, et al. Age-associated DNA methylation in pediatric populations [J]. *Genome Res*, 2012, 22(4): 623-32.
- [31] NEUROHR G E, TERRY R L, SANDIKCI A, et al. Deregulation of the G1/S-phase transition is the proximal cause of mortality in old yeast mother cells [J]. *Genes Dev*, 2018, 32(15/16): 1075-84.
- [32] SINCLAIR D A, GUARENTE L. Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast [J]. *Cell*, 1997, 91(7): 1033-42.
- [33] EICKBUSH T H, EICKBUSH D G. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes [J]. *Genetics*, 2007, 175(2): 477-85.
- [34] HORIZOME C, KOBAYASHI T. Rejuvenation of ribosomal RNA gene repeats at the nuclear pore [J]. *Curr Genet*, 2020, 66(1): 7-13.
- [35] MANSISIDOR A, MOLINAR T, Jr, SRIVASTAVA P, et al. Genomic copy-number loss is rescued by self-limiting production of DNA circles [J]. *Mol Cell*, 2018, 72(3): 583-93, e4.
- [36] BURKHALTER M D, SOGO J M. rDNA enhancer affects replication initiation and mitotic recombination: Fob1 mediates nucleolytic processing independently of replication [J]. *Mol Cell*, 2004, 15(3): 409-21.
- [37] DEFOSSEZ P A, PRUSTY R, KAEBERLEIN M, et al. Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells [J]. *Mol Cell*, 1999, 3(4): 447-55.
- [38] GANLEY A R, IDE S, SAKA K, et al. The effect of replication initiation on gene amplification in the rDNA and its relationship to aging [J]. *Mol Cell*, 2009, 35(5): 683-93.
- [39] MORLOT S, SONG J, LEGER-SILVESTRE I, et al. Excessive rDNA transcription drives the disruption in nuclear homeostasis during entry into senescence in budding yeast [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(2): 408-22, e4.
- [40] DEL ZOTTO G, PRINCIPI E, ANTONINI F, et al. Comprehensive phenotyping of peripheral blood T lymphocytes in healthy mice [J]. *Cytometry A*, 2021, 99(3): 243-50.
- [41] JONES J M, GELLERT M. The taming of a transposon: V(D)J recombination and the immune system [J]. *Immunol Rev*, 2004, 200: 233-48.
- [42] HAZENBERG M D, VERSCHUREN M C, HAMANN D, et al. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation [J]. *J Mol Med*, 2001, 79(11): 631-40.
- [43] JUNG D, ALT F W. Unraveling V(D)J recombination [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 299-311.
- [44] KUTTLER F, MAI S. Formation of non-random extrachromosomal elements during development, differentiation and oncogenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17(1): 56-64.
- [45] SERANA F, CHIARINI M, ZANOTTI C, et al. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 119.
- [46] GABALLA A, CLAVE E, UHLIN M, et al. Evaluating thymic function after human hematopoietic stem cell transplantation in the personalized medicine era [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1341.
- [47] COHEN S, YACOBI K, SEGAL D. Extrachromosomal circular DNA of tandemly repeated genomic sequences in drosophila [J]. *Genome Res*, 2003, 13(6A): 1133-45.
- [48] SUN W, QUAN C, HUANG Y, et al. Constitutive ERK1/2 activation contributes to production of double minute chromosomes in tumour cells [J]. *J Pathol*, 2015, 235(1): 14-24.
- [49] COHEN S, MECHALI M. A novel cell-free system reveals a mechanism of circular DNA formation from tandem repeats [J].



- Nucleic Acids Res, 2001, 29(12): 2542-8.
- [50] CAI M, ZHANG H, HOU L, et al. Inhibiting homologous recombination decreases extrachromosomal amplification but has no effect on intrachromosomal amplification in methotrexate-resistant colon cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(5): 1037-48.
- [51] TANAKA H, WATANABE T. Mechanisms underlying recurrent genomic amplification in human cancers [J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(6): 462-77.
- [52] SHIMIZU N, SHINGAKI K, KANEKO-SASAGURI Y, et al. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 302(2): 233-43.
- [53] BREWER B J, PAYEN C, RAGHURAMAN M K, et al. Origin-dependent inverted-repeat amplification: a replication-based model for generating palindromic amplicons [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(3): e1002016.
- [54] VENKATESAN S, SWANTON C. Tumor evolutionary principles: how intratumor heterogeneity influences cancer treatment and outcome [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2016, 35: e141-9.
- [55] MCGRANAHAN N, SWANTON C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future [J]. *Cell*, 2017, 168(4): 613-28.
- [56] SACRISTAN C, AHMAD M U D, KELLER J, et al. Dynamic kinetochore size regulation promotes microtubule capture and chromosome biorientation in mitosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(7): 800-10.
- [57] AMIROUCHENE-ANGELOZZI N, SWANTON C, BARDELLI A. Tumor evolution as a therapeutic target [J]. *Cancer Discov*, 2017, doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0343.
- [58] KIM H, NGUYEN N P, TURNER K, et al. Extrachromosomal DNA is associated with oncogene amplification and poor outcome across multiple cancers [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(9): 891-7.
- [59] MITSUDA S H, SHIMIZU N. Epigenetic repeat-induced gene silencing in the chromosomal and extrachromosomal contexts in human cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0161288.
- [60] L'ABBATE A, TOLOMEO D, CIFOLA I, et al. MYC-containing amplicons in acute myeloid leukemia: genomic structures, evolution, and transcriptional consequences [J]. *Leukemia*, 2018, 32(10): 2152-66.
- [61] GARSEED D W, MARSHALL O J, CORBIN V D, et al. The architecture and evolution of cancer neochromosomes [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 653-67.
- [62] SHIMIZU N. Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements [J]. *Mutagenesis*, 2011, 26(1): 119-23.
- [63] ENDO H, INOUE M. Dormancy in cancer [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(2): 474-80.
- [64] PRADA-LUENGO I, KROGH A, MARETTY L, et al. Sensitive detection of circular DNAs at single-nucleotide resolution using guided realignment of partially aligned reads [J]. *BMC Bioinformatics*, 2019, 20(1): 663.
- [65] DESHPANDE V, LUEBECK J, NGUYEN N D, et al. Exploring the landscape of focal amplifications in cancer using AmpliconArchitect [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 392.
- [66] SIN S T K, JIANG P, DENG J, et al. Identification and characterization of extrachromosomal circular DNA in maternal plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(3): 1658-65.
- [67] MEHTA D, CORNET L, HIRSCH-HOFFMANN M, et al. Full-length sequencing of circular DNA viruses and extrachromosomal circular DNA using CIDER-Seq [J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(5): 1673-89.