

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.017

· 综述 ·

染色体外DNA促进癌基因高表达和肿瘤异质性的研究进展

New discoveries of extrachromosomal DNA's effects in hyperexpression of oncogenes and tumor heterogeneity

徐博文, 李楠(海军军医大学 免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室, 上海 200433)

[摘要] 染色体外DNA(extrachromosomal DNA, ecDNA)是存在于肿瘤细胞中、可在有丝分裂中期被光镜观察到的游离于染色体外的环状DNA。ecDNA不仅携带高拷贝的癌基因,而且转录活跃,是癌基因表达的主要来源;另外其还是形成肿瘤异质性的关键。本文将就上述ecDNA对肿瘤的作用机制进行概述,并提出关于该领域的研究展望。

[关键词] 染色体外DNA;双微染色体(double minute chromatin bodies, DM);染色同质区域(homogeneously staining region, HSR);肿瘤;癌基因;异质性

[中图分类号] R730.2;R394 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2020)03-0321-06

染色体外DNA(extrachromosomal DNA, ecDNA)是近年来肿瘤学研究领域提出的新概念,它是一种存在于在染色体外,高度开放、高表达癌基因的环状DNA颗粒^[1]。目前的研究认为,ecDNA能够在有丝分裂中随机分配到子细胞,而其高表达的癌基因将赋予分配到更多ecDNA的子细胞选择优势,因此促进了肿瘤的异质性,进而使肿瘤在选择压力下逐渐产生耐药性^[2]。这些新观点对于一般认为癌基因主要表达于细胞染色体的传统观念产生了强大的冲击,揭示了癌基因在肿瘤细胞间具有极强的流动性,阐明了某些恶性肿瘤能够迅速产生耐药性的原理^[2]。相信这一概念的提出,会对未来研究肿瘤的生物行为、治疗靶点及治疗策略等产生深远影响。

1 ecDNA的定义

按照目前肿瘤学研究领域的主流观点,ecDNA的定义为:(1)是一种存在于多种肿瘤细胞的染色体外的DNA,正常细胞中不存在;(2)在细胞有丝分裂中期可被光镜观察到,大小从数百kb到数mb不等,成环形;(3)含一个或者多个含有功能基因的扩增子(amplicon),并且还有控制转录的调节区域,具有组蛋白,在高级结构上和染色体接近;(4)可自我复制,缺乏着丝粒,在有丝分裂中随机分配给子细胞。

尽管目前对肿瘤细胞“染色体外DNA颗粒”的研究是肿瘤学研究领域的新兴热点,但是由于历史原因,不同的研究团队之间对于“染色体外的DNA颗粒”还未形成统一的命名和名称使用规则,在不同论文中可能存在名称或概念接近的其他提法,容易混淆或疏漏。比如以下两个概念比较接近ecDNA的定义:(1)双微染色体(double minute chromatin bodies,

DM),指肿瘤细胞中在分裂中期可用光镜直接观察到的环状染色体颗粒,一般成对出现,故得名,大小在100 kb到数mb不等。事实上ecDNA的概念脱胎于对DM的研究,MISCHEL团队^[2-3]在观察了17种不同肿瘤的细胞分裂中期后,发现只有大约30%的“染色体外DNA颗粒”成对出现(即符合DM的形态描述),而更多的是以单体形式存在,因此指出DM的称呼并不恰当,提出了更广义的ecDNA概念;(2)染色体外环状DNA(extrachromosomal circles of DNA, eccDNA)是一个相对广义的概念,某一物种正常染色体以外的内源性环状DNA,都属于eccDNA。因此来源于不同种属(例如原核生物的质粒,植物的叶绿体DNA)、不同生理病理条件(正常细胞的线粒体DNA,肿瘤细胞的DM)的数目众多的“染色体外DNA颗粒”(表1)都可以被称作eccDNA^[4];但是外源性的环状DNA(例如存在于被乙型肝炎病毒感染的肝细胞内的环状病毒DNA)不属于eccDNA定义的范畴。在小鼠组织和人肿瘤细胞系中,大部分eccDNA长度在200~400 bp之间,被称为微DNA(microDNA)^[5]。目前认为,eccDNA可广泛存在于正常或肿瘤来源的多种人组织^[6]、外周血^[7]或细胞系^[8]中,大多数长度小于25 kb^[6],而较长的、1~3 mb的ecDNA存在于肿瘤细胞中^[3]。有研究^[9-10]发现,肿瘤来源的eccDNA能够释放到外周血中,有望成为液态活检(检测体液或其

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81872232, 81672798)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872232, 81672798)

[作者简介] 徐博文(1991-),男,上海人,硕士生,从事肿瘤和天然免疫的基础研究,E-mail: supernova.no1@hotmail.com

[通信作者] 李楠(LI Nan, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事免疫学基础研究,E-mail: linan@immunol.org

它组织液中肿瘤相关游离DNA的诊断方法)中新的诊断标志物。

eccDNA、ecDNA、DM 三者 在范围上是包含关系,如图 1 所示。“染色体外 DNA 颗粒”的构成非常复杂,在表 1 中罗列了其他不属于 ecDNA 的“染色体外 DNA 颗粒”。

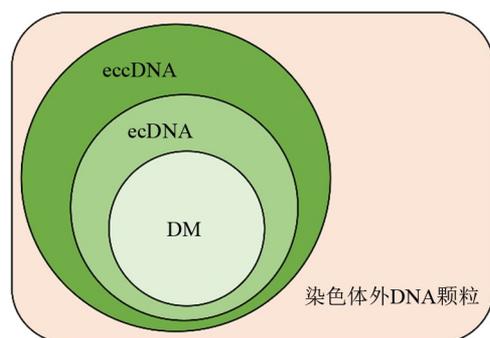


图1 染色体外DNA颗粒、eccDNA、ecDNA、DM 之间的包含关系

2 ecDNA 上高拷贝的癌基因有利于肿瘤细胞生存

ecDNA 的发现依赖于早期对肿瘤细胞中异常染色体的观察。1965 年,肿瘤生物学家首次发现在有丝分裂中期的肿瘤细胞中有非常小的病理性变异染色体,并进行了 6 个病例的报道(5 例胚胎瘤,1 例支气管癌)。这些异常染色体通常成对存在,因此当时

称其为 DM^[20]。后来在更多的人或鼠来源的肿瘤细胞系中找到了 DM^[21-23]。DM 展现出一些有趣的特性:DM 仅存在于肿瘤细胞,原代肿瘤细胞中的 DM 经过数代体外培养可能消失^[24];DM 的结构中不含着丝粒^[25],暗示了其遗传特性可能有别于正常染色体。但是 DM 为何特异性地出现在肿瘤细胞中? 其仅仅是来源于染色体碎裂的“无功能碎片”、或是畸形染色体复制的“副产物”,还是另有功能呢,当时尚不清楚。后来有学者^[26-27]发现,甲氨蝶呤耐药的肿瘤细胞有着高拷贝数的二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)基因,通过产生大量的 DHFR 竞争性结合甲氨蝶呤,从而降低甲氨蝶呤抑制肿瘤细胞 DNA 合成的抗肿瘤效果。随后,在 DM 上找到了更多的癌基因,为 DM 可以影响肿瘤的生存这一猜测提供了更多依据^[28-30]。同一时期,人们又发现了一种叫做染色同质区域(homogeneously staining region, HSR)的癌细胞特有结构。HSR 是指肿瘤细胞染色体经过胰酶-吉姆萨染色后,其上出现的染色强度较为均一的条带^[31],在多种肿瘤细胞中均观察到了 HSR^[32]。人们发现 HSR 同样含有 DHFR,可导致肿瘤细胞耐受甲氨蝶呤^[31]。于是人们进一步推测,HSR 和 DM 都是提供肿瘤细胞某种高拷贝基因的元件,出于不同的机制,使得一个存在于染色体上,另一个存在于染色体外,这在后来的实验中分别得到了证实^[33-34]。还有一些研究^[2,35]更加深刻地提示 DM 和 HSR 可互相转化。

表 1 不同于 ecDNA 的其他“染色体外 DNA 颗粒”

名称	来源	大小	功能/意义	参考文献
畸形染色体 (neochromosomes)	肿瘤细胞中染色质碎裂 (chromothripsis) 后重新融合 (fusion) 而形成通常包含着丝粒和端粒序列	通常数倍于正常染色体	肿瘤标志物	[11-12]
小额外标记染色体 (small supernumerary marker chromosomes, sSMC)	仅存在于 0.5% 人口,又被称为“第 47 条染色体”,它们可来自于 24 条正常染色体中的任何一条并且呈现出不同形状	约等于或小于分裂中期 20 号染色体的大小	三分之一的携带者有临床症状,而剩下的三分之二携带者可无任何表现型	[13-14]
端粒环 (telomeric circles)	端粒脱落	738 bp 的整数倍	通过同源重组保持端粒长度	[15]
微 DNA (microDNAs)	染色体不稳	<400 bp	产生 miRNA	[5, 16]
染色体外核糖体 DNA 环 (extra chromosomal rDNA circle)	串联重复染色体	2~20 kb	参与串联重复长度调整,增加染色体可塑性	[17]
小多形散布 DNA (Small polydispersed circular DNA, spcDNA)	染色体不稳	<500 bp	DNA 断裂产物	[18-19]

对 ecDNA 的研究是和 DM 一脉相承的, 是对 DM 研究的广义上的拓展(见前述)。近年来, 通过二代测序发现了大量位于 ecDNA 上的癌基因。例如 DECARVALHO 等人^[36]利用二代测序技术在成胶质细胞瘤(glioblastoma, GBM)细胞中发现了 MYC、MYCN、EGFR、PDGFRA、MET 等众多癌基因的 ecDNA 扩增子, 揭示了 ecDNA 对癌细胞生存和增殖的重要作用, 进一步证实了肿瘤细胞需要 ecDNA 承载癌基因是一个普遍现象。

3 ecDNA 是肿瘤细胞表达癌基因的主要来源

同样值得关注的是, ecDNA 是否具有更强的转录活性? 如果某一癌基因同时位于 ecDNA 和 HSR, 哪种结构会产生更多的癌基因转录本? 另外, 也无法排除有可能是 ecDNA 存在本身, 促进了 HSR 的转录。在肿瘤细胞中的真实情况如何? 有研究团队^[37]对多种不同类型的肿瘤细胞进行二代测序, 利用一款叫 AmpliconArchitect 的电脑算法自动识别 ecDNA 扩增子上下游的连接位点, 重建了可靠的扩增子结构, 并比较了 ecDNA 和 HSR 上的扩增子序列, 由此不仅证实了之前 ecDNA 可以结合到染色体上, 成为 HSR 的推测^[1,2], 更发现了在 ecDNA 上的癌基因转录活跃程度远大于来自染色体上的相同基因; 进一步研究后发现, ecDNA 上具有核小体, 并且启动子区富集有活跃修饰的组蛋白、缺乏抑制修饰的组蛋白, 染色质本身也是高度开放的。ecDNA 还存在类似染色体的 3D 功能结构域, 因为其成环形, 所以可产生染色体上通常无法发生的超远距离相互作用, 进一步促进了转录。上述机制使得位于 ecDNA 上的 EGFR、MYC、CDK4、MDM2 等癌基因成为整个肿瘤细胞基因组中转录最活跃的前 1% 基因。RICH 团队^[38]也发现 ecDNA 上的非编码 DNA, 可能是影响癌基因转录活性的关键, 其重要性不亚于癌基因本身, 例如胶质母细胞瘤的 EGFR ecDNA 上带有数个增强子, 这些增强子和 EGFR 共同扩增, 其中有些增强子位于 EGFR 附近, 但是还有部分增强子来自于基因组其他区域, 由于 ecDNA 成环状的特殊结构, 使得这些增强子可以共同作用于 EGFR, 促使其高表达; 如果用 CRISPR 基因编辑技术逐个沉默这些增强子, 发现每个增强子的失活都会降低 EGFR 的转录活性, 进而影响肿瘤细胞生存。这些工作证明了 ecDNA 不仅有众多的癌基因拷贝, 而且在多种机制的调控下可发生活跃转录, 因此 ecDNA 是肿瘤细胞癌基因转录本的主要来源。

4 ecDNA 是形成肿瘤异质性的关键分子

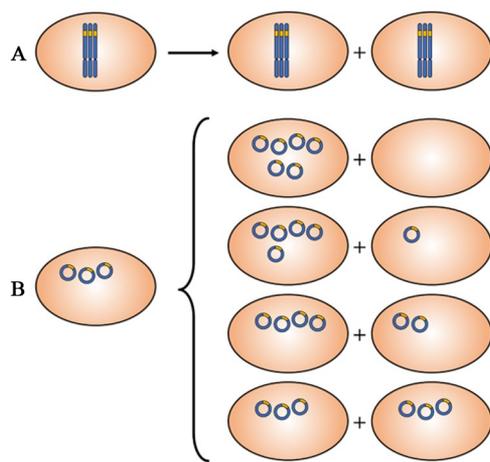
肿瘤细胞具有异质性, 体现在肿瘤细胞亚群的分布不均匀(空间异质性)和肿瘤细胞分子组成随时间变化(时间异质性)^[39], 这是肿瘤细胞发生、发展、侵袭、转移和耐药等恶性生物学行为的基础。

产生异质性的分子基础之一是肿瘤细胞基因组具有高不稳定性^[40]。是否因为在肿瘤细胞中某种高表达的癌基因扩增子拷贝不完全相同, 导致了这种不稳定性呢? VOGT 等人^[41]研究了成胶质细胞瘤中高表达且最常发生突变的癌基因 EGFR 后发现, 多拷贝的 EGFR 主要来自于 DM, 在每个病例中 EGFR 扩增子序列是相同的, 但是不同病例间的 EGFR 扩增子序列会有较大差异, 提示同一例肿瘤的扩增子最初都来自于同一个拷贝。因此, 肿瘤基因组不稳定, 应该是出于其他机制。

另有研究^[42]发现, 成胶质细胞瘤细胞间存在 EGFR 表达高低的异质性, EGFR 表达高的细胞增殖更快、凋亡率更低, 但是对靶向药物厄洛替尼(Erlotinib)更敏感。用厄洛替尼治疗荷瘤小鼠, 会分别产生有反应(response)和耐受(resistant)的个体, 这两者在给药后 EGFR 表达均显著降低, 但是耐受个体的成胶质细胞瘤在撤药后, EGFR 又会在 1~2 周内恢复到给药前的水平。进一步研究发现, 高表达的 EGFR 主要来自于 ecDNA, 在给药前, EGFR 的高表达有利于肿瘤的生长, 因此 EGFR^{high} 细胞成为优势群体, 而在药物厄洛替尼的作用下, EGFR^{high} 群体较为敏感, 发生死亡; 在抗性群体中, 绝大多数细胞均低表达 EGFR, 但是染色体上形成了 EGFR HSR 结构。而当药物撤除之后, EGFR HSR 重新转化为 EGFR ecDNA, 使得 EGFR^{high} 群体再次占据主导, 通过这种机制, 肿瘤细胞在保持了癌基因的同时保存了自我, 导致了耐药性的产生。由于在撤药后, EGFR 拷贝数和表达的回复相当之快, 在 1~2 周之内就接近给药前水平, 单纯用偶发的染色体不均一分配、染色体重组等以染色体主导的传统理论, 似乎很难解释这样快的速度, 因此人们猜测, 是 ecDNA 导致了肿瘤异质性的快速形成: ecDNA 可以自我复制, 并且由于其缺乏着丝粒, 因此在有丝分裂中将随机分配给子细胞^[36], 在竞争压力下, 分配到更多带有癌基因 ecDNA 的子细胞将获得优势存活下来, 其他子细胞被淘汰, 于是经过数代的选择, 携带有高拷贝数癌基因的肿瘤细胞又成为了主体细胞^[3]。而位于染色体的 HSR 在有丝分裂后往往只能获得和原本相同拷贝数的癌基因, 即使加上基因突变、融合等因素, HSR 在拷贝数上的变化相比于 ecDNA 仍然慢得多(图 2)。后来这一推测在计算机模拟和实验中都得到了证实^[2,36]。

综上, 可总结出 ecDNA、HSR 和肿瘤异质性存在

如下关系:ecDNA 高表达癌基因并且将癌基因数量随机地遗传给子细胞,直接导致了肿瘤异质性;HSR 可以稳定遗传癌基因并与 ecDNA 相互转化,它维持基本癌基因拷贝数,是癌基因的“种子库”,ecDNA 和 HSR 两者相辅相成,共同保证了肿瘤异质性。有异质性的肿瘤具有强大的适应环境的能力——面对变化的环境,总有更具竞争优势的细胞能成为主体,让肿瘤存活下去,并导致侵袭、转移、耐药等恶性生物学行为。



A: 染色体的遗传遵循平均分配原则;B: ecDNA 的遗传是随机分配的,在选择压力下,携带有高拷贝数癌基因的子代细胞更有可能获得竞争优势

图2 有丝分裂中染色体和ecDNA不同的遗传方式^[3]

5 研究展望

ecDNA 从首次被发现到目前成为肿瘤学研究领域受人关注的前沿热点及颇具潜力的治疗靶点,其间经历了将近半个世纪的时间跨度。虽然它的发现时间和质粒相当,是一个不折不扣的“老分子”,远不如 lncRNA、外泌体等“新分子”来得“朝气蓬勃”,但是其慢热的研究过程本身也彰显了 ecDNA 高度的复杂性——人们对 ecDNA 的了解还远远不够,因而有多个问题需要投入更多的精力来研究。

(1)ecDNA 如何产生。虽然有很多的证据指向染色体的断裂和 ecDNA 的生成有关,但是这只是一系列反应的第一个环节,ecDNA 原始片段如何成环,ecDNA 之间如何融合,又如何与 HSR 相互作用? 有研究^[41]指出,微同源依赖的非同源末端连接(microhomology-based nonhomologous end-joining, NHEJ)是一种可能的 ecDNA 形成机制,而有哪些分子参与调控了这过程尚需进一步阐明。研究^[43]发现,高浓度铜离子环境可以诱导酵母发生衰老并积累大量含抗铜离子基因 CUP1 的 eccDNA,他们证明了存在大量

串联重复的 CUP1 的过度转录会引发相应 eccDNA 的积累而无需表观水平的调控,这或许可以为探究肿瘤细胞如何形成高表达癌基因的 ecDNA 提供借鉴和参考。(2)肿瘤微环境与 ecDNA 的关系。人们很早就发现原代肿瘤细胞体外培养过程中 ecDNA 可能会逐渐消失^[24],然而肿瘤微环境如何影响 ecDNA 的维持目前尚不清楚。在厄洛替尼治疗荷瘤小鼠的实验^[42]中,提出的 ecDNA 消失和形成的分子机制也需要进一步探索验证。这些问题中很可能蕴含了通过调控 ecDNA 治疗肿瘤的新思路。(3)ecDNA 是否可用作肿瘤诊断指标? 虽然尚不清楚 ecDNA 是否可以通过外泌体或者坏死的肿瘤细胞释放到外周血当中,但是已有学者提出了 ecDNA 具有用于液体活检的潜力^[12]。KOCHE 等^[44]通过基因组学分析发现,成胶质细胞瘤 ecDNA 环化和重新整合到染色体的过程是引起染色体重塑的主要原因,并且这将带来不良的临床预后。未来还需要更多研究评估 ecDNA 作为分子诊断指标的可行性。(4)ecDNA 与非编码 RNA 的关系。目前研究 ecDNA 的转录产物主要为编码蛋白的 mRNA,然而是否有可能潜藏着一个巨大的 ecDNA 来源的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)库尚需进一步探索。(5)ecDNA 是否具有细胞通信机制。如果 ecDNA 通过某种机制(如外泌体或细胞坏死)逃逸到胞外,是否会被其他细胞吸收形成某种细胞间的通信机制,从而引起一系列生物学效应,例如引起免疫反应,或是把癌旁细胞驯化成癌症相关细胞?(6)研究技术方面。有学者^[45]提出在人类基因组计划和 ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements)计划等较早开始的大规模全基因组测序工作中,由于并未标注测序片段来源是染色体 DNA 还是 ecDNA,使得测序结果中可能存在 ecDNA 的冗余,这将为实施以个性化测序比对的精准医疗带来困扰。并且,肿瘤细胞中 ecDNA 上癌基因的拷贝数可能数倍于染色体上的同源基因,因此在测序时区分两者更为迫切。在未来有必要开发标准化的 ecDNA 测序技术,以更好地为肿瘤精准医疗服务。

涉及 ecDNA 的很多机制,目前看来都是肿瘤学研究领域的重大科学问题,它就像一座巨大的金山,等待着去发掘,希望上述问题可以抛砖引玉、启迪读者,在未来掀起 ecDNA 研究的更高的浪潮。

[参考文献]

- [1] 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. DOI:10.1038/s41586-019-1763-5.
- [2] TURNER K M, DESHPANDE V, BEYTER D, et al. Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic

- heterogeneity[J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 122-125. DOI:10.1038/nature21356.
- [3] VERHAAK R G W, BAFNA V, MISCHÉL P S. Extrachromosomal oncogene amplification in tumour pathogenesis and evolution[J]. *Nature Rev Cancer*, 2019, 19(5): 283-288. DOI:10.1038/s41568-019-0128-6.
- [4] PAULSEN T, KUMAR P, KOSEOGLU M M, et al. New discoveries of extrachromosomal circles of DNA in normal and tumor cells[J]. *Trends in genetics: TIG*, 2018, 34(4): 270-278. DOI:10.1016/j.tig.2017.12.010.
- [5] SHIBATA Y, KUMAR P, LAYER R, et al. Extrachromosomal microDNAs and chromosomal microdeletions in normal tissues[J]. *Science (New York, NY)*, 2012, 336(6077): 82-86. DOI:10.1126/science.1213307.
- [6] 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. DOI:10.1038/s41467-018-03369-8.
- [7] ZHU J, ZHANG F, DU M, et al. Molecular characterization of cell-free eccDNAs in human plasma[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10968. DOI:10.1038/s41598-017-11368-w.
- [8] SHOURA M J, GABDANK I, HANSEN L, et al. Intricate and cell type-specific populations of endogenous circular DNA (eccDNA) in *Caenorhabditis elegans* and *Homo sapiens*[J]. *G3 (Bethesda)*, 2017, 7(10): 3295-3303. DOI:10.1534/g3.117.300141.
- [9] 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): 1197-1205. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-17-0095.
- [10] KHATAMI F, LARIJANI B, TAVANGAR S M. The presence of tumor extrachromosomal circular DNA (eccDNA) as a component of liquid biopsy in blood[J]. *Med Hypotheses*, 2018, 114: 5-7. DOI:10.1016/j.mehy.2018.02.018.
- [11] GARSED D W, MARSHALL O J, CORBIN V D A, et al. The architecture and evolution of cancer neochromosomes[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 653-667. DOI:10.1016/j.ccell.2014.09.010.
- [12] MACCHIA G, SEVERGNINI M, PURGATO S, et al. The hidden genomic and transcriptomic plasticity of giant marker chromosomes in cancer[J]. *Genetics*, 2018, 208(3): 951-961. DOI:10.1534/genetics.117.300552.
- [13] LIEHR T, CLAUSSEN U, STARKE H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2004, 107(1/2): 55-67. DOI:10.1159/000079572.
- [14] LIEHR T. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC): a guide for human geneticists and clinicians[M]. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [15] HENSON J D, CAO Y, HUSCHTSCHA L I, et al. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity[J]. *Nature biotechnology*, 2009, 27(12): 1181-1185. DOI:10.1038/nbt.1587.
- [16] DILLON L W, KUMAR P, SHIBATA Y, et al. Production of extrachromosomal microDNAs is linked to mismatch repair pathways and transcriptional activity[J]. *Cell reports*, 2015, 11(11): 1749-1759. DOI:10.1016/j.celrep.2015.05.020.
- [17] COHEN S, AGMON N, SOBOL O, et al. Extrachromosomal circles of satellite repeats and 5S ribosomal DNA in human cells[J]. *Mob DNA*, 2010, 1(1): 11. DOI:10.1186/1759-8753-1-11.
- [18] COHEN S, REGEV A, LAVI S. Small polydispersed circular DNA (spcDNA) in human cells: association with genomic instability[J]. *Oncogene*, 1997, 14(8): 977-985. DOI:10.1038/sj.onc.1200917.
- [19] MOTEJLEK K, ASSUM G, KRONE W, et al. The size of small polydisperse circular DNA (spcDNA) in angiofibroma-derived cell cultures from patients with tuberous sclerosis (TSC) differs from that in fibroblasts[J]. *Hum Genet*, 1991, 87(1): 6-10. DOI:10.1007/bf01213083.
- [20] COX D, YUNCKEN C, SPRIGGS A I. Minute chromatin bodies in malignant tumours of childhood[J]. *Lancet*, 1965, 1(7402): 55-58. DOI:10.1016/s0140-6736(65)90131-5.
- [21] RADLOFF R, BAUER W, VINOGRAD J. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967, 57(5): 1514-1521. DOI:10.1073/pnas.57.5.1514.
- [22] MARK J. Double-minutes--a chromosomal aberration in rous sarcomas in mice[J]. *Hereditas*, 1967, 57(1): 1-22. DOI:10.1111/j.1601-5223.1967.tb02091.x.
- [23] DONNER L, BUBENIK J. Minute chromatin bodies in two mouse tumours induced in vivo by Rous sarcoma virus[J]. *Folia Biol (Praha)*, 1968, 14(1): 86-88.
- [24] LEVAN G, MANDAHL N, BENGTTSSON B O, et al. Experimental elimination and recovery of double minute chromosomes in malignant cell populations[J]. *Hereditas*, 1977, 86(1): 75-90. DOI:10.1111/j.1601-5223.1977.tb01214.x.
- [25] LEVAN G, MANDAHL N, BREGULA U, et al. Double minute chromosomes are not centromeric regions of the host chromosomes [J]. *Hereditas*, 1976, 83(1): 83-90. DOI:10.1111/j.1601-5223.1976.tb01573.x.
- [26] ALT F W, KELLEMS R E, BERTINO J R, et al. Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells[J]. *J Biol Chem*, 1978, 253(5): 1357-1370.
- [27] HABER D A, SCHIMKE R T. Unstable amplification of an altered dihydrofolate reductase gene associated with double-minute chromosomes[J]. *Cell*, 1981, 26(3 Pt 1): 355-362. DOI:10.1016/0092-8674(81)90204-x.
- [28] SCHWAB M, ALITALO K, VARMUS H E, et al. A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells[J]. *Nature*, 1983, 303(5917): 497-501. DOI:10.1038/303497a0.
- [29] KOHL N E, KANDA N, SCHRECK R R, et al. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas[J]. *Cell*, 1983, 35(2 Pt 1): 359-367. DOI:10.1016/0092-8674(83)90169-1.
- [30] GEORGE D L, POWERS V E. Cloning of DNA from double minutes of Y1 mouse adrenocortical tumor cells: evidence for gene amplification[J]. *Cell*, 1981, 24(1): 117-123. DOI:10.1016/0092-8674(81)90507-9.
- [31] BIEDLER J L, SPENGLER B A. Metaphase chromosome anomaly: association with drug resistance and cell-specific products[J]. *Science (New York, NY)*, 1976, 191(4223): 185-187. DOI:10.1126/science.942798.

- [32] LEVAN A, LEVAN G, MITELMAN F. Chromosomes and cancer [J]. *Hereditas*, 1977, 86(1): 15-30. DOI:10.1111/j.1601-5223.1977.tb01208.x.
- [33] NUNBERG J H, KAUFMAN R J, SCHIMKE R T, et al. Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homogeneously staining region of a single chromosome in a methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978, 75(11): 5553-5556. DOI:10.1073/pnas.75.11.5553.
- [34] KAUFMAN R J, BROWN P C, SCHIMKE R T. Amplified dihydrofolate reductase genes in unstably methotrexate-resistant cells are associated with double minute chromosomes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979, 76(11): 5669-5673. DOI:10.1073/pnas.76.11.5669.
- [35] CARROLL S M, DEROSE M L, GAUDRAY P, et al. Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion[J]. *Mol Cell Biol*, 1988, 8(4): 1525-1533. DOI:10.1128/mcb.8.4.1525.
- [36] DECARVALHO A C, KIM H, POISSON L M, et al. Discordant inheritance of chromosomal and extrachromosomal DNA elements contributes to dynamic disease evolution in glioblastoma[J]. *Nat Gen*, 2018, 50(5): 708-717. DOI:10.1038/s41588-018-0105-0.
- [37] DESHPANDE V, LUEBECK J, NGUYEN N-P D, et al. Exploring the landscape of focal amplifications in cancer using Amplicon Architect[J]. *Nature Commun*, 2019, 10(1): 392. DOI:10.1038/s41467-018-08200-y.
- [38] MORTON A R, DOGAN-ARTUN N, FABER Z J, et al. Functional enhancers shape extrachromosomal oncogene amplifications[J]. *Cell*, 2019, 179(6): 1330-1341 e13. DOI:10.1016/j.cell.2019.10.039.
- [39] DAGOGO-JACK I, SHAW A T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(2): 81-94. DOI:10.1038/nrclinonc.2017.166.
- [40] BEN-DAVID U, BEROUKHIM R, GOLUB T R. Genomic evolution of cancer models: perils and opportunities[J]. *Nature Rev Cancer*, 2019, 19(2): 97-109. DOI:10.1038/s41568-018-0095-3.
- [41] VOGT N, LEFEVRE S H, APIOU F, et al. Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(31): 11368-11373. DOI:10.1073/pnas.0402979101.
- [42] NATHANSON D A, GINI B, MOTTAHEDEH J, et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA[J]. *Science (New York, NY)*, 2014, 343(6166): 72-76. DOI:10.1126/science.1241328.
- [43] HULL R M, KING M, PIZZA G, et al. Transcription-induced formation of extrachromosomal DNA during yeast ageing[J]. *PLoS Biol*, 2019, 17(12): e3000471. DOI:10.1371/journal.pbio.3000471.
- [44] KOICHE R P, RODRIGUEZ-FOS E, HELMSAUER K, et al. Extrachromosomal circular DNA drives oncogenic genome remodeling in neuroblastoma[J]. *Nat Gen*, 2020, 52(1): 29-34. DOI: 10.1038/s41588-019-0547-z.
- [45] DENNIN R H. Overlooked: extrachromosomal DNA and their possible impact on whole genome sequencing[J]. *Malaysian J Med Sci*, 2018, 25(2): 20-26. DOI:10.21315/mjms2018.25.2.3.

[收稿日期] 2020-02-05

[修回日期] 2020-02-25

[本文编辑] 韩丹