

人肿瘤扩增子形成机制的研究进展

李 洁, 孟祥宁

(哈尔滨医科大学医学遗传学研究室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘 要: 基因扩增形成的扩增子可增加细胞中致癌基因的转录和表达, 常见于多种人类肿瘤, 并且与肿瘤的发生、发展及耐药等密切相关。因此, 扩增子形成机制的研究对于肿瘤的治疗具有重要意义。扩增子形成的机制非常复杂, 涉及染色体的断裂和重新连接。文章综述了现已发现的与扩增子形成相关的染色体重组机制及已建立的扩增子形成机制模型, 希望为进一步的科学研究和临床上肿瘤的靶向治疗提供新的思路。

主题词: 扩增子; 肿瘤; 染色体

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)05-0423-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.05.B016

Study on Formation Mechanisms of Amplicons in Human Cancers

LI Jie, MENG Xiang-ning

(Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract: Amplicons, which come from gene amplification, may enhance oncogene transcription and expression, and are often found in various cancer cells. Emerging evidence suggests that amplicons have an important role in cancer development, progression and drug resistance. Understanding the mechanisms of amplicons formation could be of great significance for clinical treatment of cancers. Chromosome breakage and rejoining are proven to be involved in complex amplicons formation. This review summarizes current understanding of amplicons formation related chromosome recombination and models, and provides new ideas for further scientific research and clinical targeted therapy of cancers.

Subject words: amplicon; neoplasms; chromosome

基因扩增是染色体畸变的一种表现形式, 通过重组使基因组中特定区域的拷贝数增加, 形成扩增子, 常见于多种人类肿瘤, 与基因组不稳定及肿瘤的发生、恶性程度和耐药等密切相关^[1]。肿瘤细胞的扩增子主要有 3 种细胞遗传学表现形式, 分别是位于染色体内的均质染色区 (homogeneously staining regions, HSR), 染色体外成对出现、无着丝粒和中心粒、可自主复制的双微体 (double minutes, DMs) 以及大的染色体外元件 (large extrachromosomal elements, LEE)。

目前, 扩增子的形成机制还未彻底研究清楚。

但通过对扩增子的结构和进化研究, 可揭示扩增子的形成机制。本文就现已发现的与扩增子形成相关的染色体重组机制及已建立的扩增子形成机制模型作简要综述。

1 与扩增子形成相关的染色体重组机制

目前, 已经发现的与扩增子形成相关的染色体重组机制有非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ)、同源重组 (homologous recombination, HR)、V(D)J 重组和回文序列介导的重组。

1.1 NHEJ

NHEJ 通路是一种 DNA 双链断裂的修复机制, 根据是否依赖序列的同源性可分为经典的非同源末端连接 (classical-NHEJ, C-NHEJ) 和微同源介导的

基金项目: 国家国际科技合作专项 (2013DFA31610); 国家自然科学基金 (81372784, 81101646)

通讯作者: 孟祥宁, 教授, 硕士生导师, 博士; 哈尔滨医科大学医学遗传学研究室, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 157 号 (150081); E-mail: mengxiangn@ems.hrbmu.edu.cn

收稿日期: 2014-12-11; **修回日期:** 2015-02-02

非同源末端连接 (microhomology-mediated non-homologous end joining, MMEJ)。C-NHEJ 不依赖 DNA 的同源性, 可将 DNA 双链断裂的两个末端直接相连, 又称为 DNA-PK 依赖的 NHEJ (DNA-PK-dependent NHEJ, D-NHEJ)。MMEJ 又称为候补 NHEJ (backup NHEJ, B-NHEJ) 或选择性的 NHEJ (alternative-NHEJ, A-EHEJ)^[2]。NHEJ 机制形成的断裂融合接头具有微同源、小片段插入或平末端连接的特点。

Meng 等^[3]对含 DMs 的氨甲蝶呤耐药的结肠癌 HT-29 细胞系进行研究, 发现其 NHEJ 通路相关蛋白的表达比不含 DMs 的非耐药细胞明显升高, 敲降或者抑制 NHEJ 通路的核心蛋白 DNA-PKcs 后, *DHFR* 基因拷贝数下降, DMs 数量减少, 这提示 NHEJ 机制在 DMs 形成过程中起到了重要作用。Bignell 等^[4]在侵袭性导管癌、小细胞肺癌和肺神经内分泌瘤细胞的多个扩增子中测序得到了 133 个断裂融合接头, 其中 25 个接头为平末端 DNA 直接融合, 82 个接头中包含一个微同源的短区域, 21 个接头中含有小片段的插入序列, 且接头两侧序列缺乏同源性, 说明 NHEJ 机制介导了扩增子的重组。此外还有几个接头比较特殊, 它们具有比较长的微同源序列 (可达 32bp) 和反向的 Alu 重复序列, 且接头两侧更长的区域内 80% 以上的序列相似, 这样长的相似序列在具有短的微同源序列接头中未有发现, 这种连接模式更符合非等位 HR 机制。Vogt 等^[5]在胶质瘤扩增子中也获得了 105 个断裂融合接头, 同样的, 半数以上的接头位于非重复序列, 并且符合 NHEJ 机制的特点, 也有接头位于长散在重复序列 (LINE)、短散在重复序列 (SINE) 或长末端重复序列 (LTR) 上, 则可能是 HR 机制发挥了作用。Malhotra 等^[6]对 64 个肿瘤基因组的断裂点文库进行分析, 也发现微同源对复杂基因组重组过程中接头的形成具有重要作用。由此可见, NHEJ 机制可介导基因重组, 与扩增子的形成密切相关。

1.2 HR

HR 是指发生在非姐妹染色单体间、同一染色体上含同源序列的 DNA 分子之间或分子之内的重新组合, 是一种无误的 DNA 双链断裂修复机制^[7]。HR 机制形成的接头两侧序列具有同源性。Narayanan 等^[8]研究发现, HR 可通过 DNA 双链断裂处的发夹结构的作用介导双着丝粒染色体形成

HSR, 该途径须依赖 Rad52 与 Rad51 蛋白的功能。Marotta 等^[9]研究结直肠癌 Colo320DM 细胞系的扩增子发现, 两个反向 Alu 序列在 HR 机制的介导下形成了 3 个具有回文序列的接头, 并且 DNA 序列的同源性可使复制后的 DNA 断端折回加帽, 从而促进断裂融合桥 (breakage-fusion-bridge, BFB) 循环中姐妹染色单体的融合。

1.3 V(D)J 重组

V(D)J 重组是免疫细胞用于产生各种抗体和 T 细胞受体的一种特殊的 DNA 重排反应。V(D)J 片段的两端为重组信号序列 (recombination signal sequences, RSS), RSS 以“七聚体-12bp 或 23bp 长的间隔序列-九聚体”的形式组成, 在重组酶的作用下, 带有 12bp 间隔序列的 RSS 只能与带有 23bp 间隔序列的 RSS 结合, 从而完成重排。Merelli 等^[10]筛选出了 33 个位于抗体与 T 细胞受体的基因座外的 RSS 序列, 这些 RSS 位点可能被重组酶识别而发生错误的 V(D)J 重组。Gibaud 等^[11]通过研究 DMs 断裂融合接头的侧翼序列, 发现序列中含有 RSS 变体, 从而推测 V(D)J 重组介导了扩增子的形成。

1.4 回文序列介导的重组

回文序列即为双链 DNA 中的反向重复序列, 一般可分为三种类型, 分别是: 完美的回文序列——可形成干型或十字形发夹, 结构不稳定; 有间隔的反向重复序列——可形成具有中心环结构的发夹, 结构稳定; 和有缺陷的反向重复序列。回文序列常常与 DNA 重排和基因扩增有关, 在乳腺癌中, 回文序列在肿瘤发生关键区域的基因扩增中发挥重要作用^[12]。Zhu 等^[13]对卵巢癌细胞系 UACC-1598 的 DMs 结构进行研究, 获得了 3 个断裂融合接头的 DNA 序列, 深入分析后发现, 3 个接头序列处均含有重排产生的短回文序列, 可形成发夹结构, 可能是扩增子边界连接的纽带, 具有促进扩增子形成的作用; 同时这些接头序列或为平末端直接连接, 或有小片段 DNA 插入, 符合 NHEJ 机制的连接特点。

在复杂的扩增子形成过程中, 往往有多种染色体重组机制共存的现象。例如多种肿瘤细胞 DMs 形成过程中 NHEJ 与 HR 共存^[4,14]; 胶质瘤扩增子形成时 NHEJ 和 V(D)J 重组共存^[11]; 卵巢癌 UACC-1598 细胞 DMs 形成时 NHEJ 与回文序列介导的重组共存^[13]等。在这多种染色体重组机制中, NHEJ 机制介

导形成的断裂融合接头几乎在各种肿瘤的各种扩增子中均有出现,数量也最多,因此推测,NHEJ 机制可能在扩增子形成过程中起主导作用。

2 扩增子形成的机制模型

扩增子存在的形式多样、结构各异,形成过程中所依赖的重组机制也各不相同。为了解释各种扩增子的形成过程,研究者们建立了各种不同的机制模型,以探寻介导扩增子形成的共同根本的机制。

2.1 HSR 形成的机制模型

HSR 是染色体内基因扩增形成的一段基因组区域,因在显带染色时有别于正常区带呈均匀的涂染区域而得名。现有的解释 HSR 形成机制的模型有 BFB 循环模型和 DMs 重插入到染色体形成 HSR。

2.1.1 BFB 循环模型

BFB 循环是解释 HSR 形成的经典模型,是一种染色体畸变的过程,由染色单体的断裂开始,经复制和桥连接,形成具有双着丝粒的染色体,分裂后期染色体向两极移动时,双着丝粒染色体会发生断裂,断裂的染色体复制后还可再次形成双着丝粒染色体,多次循环后,往往会形成一个染色体上的 DNA 片段扩增,另一染色体上 DNA 片段缺失。BFB 循环介导的扩增会出现一些特殊的畸变,分别为后期桥、具有双着丝粒的染色体、反向重复序列和端粒近侧区的丢失。在紫杉醇耐药的肺癌细胞系 PTX250 中含 *MDR1/ABCB1* 基因座区域扩增的 HSR 和 26 个口腔鳞癌细胞系中含 11q13 区域扩增的 HSR 等扩增子上,均发现了这些特殊的畸变,说明 DNA 片段可能通过 BFB 循环扩增而形成 HSR^[15,16]。

2.1.2 DMs 重插入到染色体形成 HSR

Storlazzi 等^[17]对神经母细胞瘤的两个亚克隆 STA-NB-10/dms 和 STA-NB-10/hsr 进行研究,发现两者的扩增子结构完全相同,STA-NB-10/hsr 的一条 5 号染色体上有来源于 2 号染色体的 *MYCN* 基因形成的 HSR,而 STA-NB-10/dms 的 5 号染色体上无任何 *MYCN* 基因信号,因此,HSR 可能是由 DMs 重插入到染色体形成。Gibaud 等^[18]对恶性胶质瘤和结肠癌进行研究,也发现通过 NHEJ 通路的介导,染色体外的 *MYC* 扩增子易位插入到 17 号染色体形成 HSR。

2.2 DMs 形成的机制模型

由于 DMs 的结构存在着异质性,现有的解释 DMs 形成的机制模型多种多样,主要有 G₁ 期和 G₂ 期染色体片段环出模型、附加体切除模型、“易位—断裂—扩增”模型和灾难性事件模型。

2.2.1 G₁ 期和 G₂ 期染色体片段环出模型

Toledo 等^[19]用荧光原位杂交的方法研究发现,细胞中 *AMPD2* 基因的早期扩增来源于有丝分裂时基因的不均等分离,而不是在原位置基因过度复制造成,并且发现了扩增的环状染色体,因此提出了 G₁ 期与 G₂ 期染色体片段环出模型来解释产生单一的扩增子,且不发生进一步的染色体重排的现象。如环出发生在 G₁ 期,环出序列在染色体相应位置上缺失;如环出发生在 G₂ 期,环出序列在相应染色体上缺失和不缺失的可能性各占 50%。基因扩增来源于有丝分裂时 DMs 的不均等分离,不含扩增基因的细胞由于无生长优势而被淘汰^[19,20]。

2.2.2 附加体模型

附加体模型为 DNA 片段从染色体上删除,通过相互重组的方式环化和扩增,从而产生 DMs。该模型的特点为 DMs 上扩增的基因在原染色体的相应位置上缺失,扩增子“头—尾”排列。Storlazzi 等^[17,21]在血液系统恶性肿瘤、神经母细胞瘤和小细胞肺癌的多个扩增子上均发现了支持附加体模型的证据。

2.2.3 “易位—断裂—扩增”模型

“易位—断裂—扩增”模型用于解释含有多个染色体来源的 DMs 形成。Van Roy 等^[22]应用荧光原位杂交联合 SNP 芯片等方法,研究了神经母细胞瘤 SJNB-12 细胞系中含 *MYC* 和 *ATBF1* 基因共扩增的 DMs 结构,提出这种含不同染色体起源的扩增子可能来源于一系列复杂事件:多处 DNA 双链断裂,引起 8 号和 16 号染色体的相互易位,易位断裂点处的片段脱离形成 DMs。

2.2.4 灾难性事件模型

灾难性事件模型即为染色体片段化过程中产物环化^[23]。Korbel 等^[24]总结了单步的灾难性事件模型解释扩增子形成的标准:①具有拷贝数数值在两种或三种状态下震荡的典型状态;②高拷贝区域片段保留杂合性;③断裂点成簇,50kb 的基因组间隔中含有 5 至 10 个断裂点;④具有衍生染色体,从而排除了巢式重排的可能性;⑤随机的 DNA 片段顺序和

碎片连接方向。在含 *MYC* 基因扩增的 DMs 的小细胞肺癌细胞系中, Stephens 等^[25]发现该细胞系含有 1 条高度重排的衍生的 8 号染色体, 因此用单步的灾难性事件模型解释 DMs 的形成。而 L'Abbate 等^[26]对 7 种肿瘤细胞系不同染色体来源的含 *MYC* 基因的扩增子进行研究后发现, 拷贝数震荡的状态超过 3 种, 至少 1 个高扩增区域在染色体上杂合性缺失, 未发现高水平的断裂点成簇, 具有巢式重排, 即一些片段在 DMs 和 HSR 扩增中反复出现, 以及断裂点具有保守的连接顺序, 从而推测在扩增子形成过程中发生了多步进化, 需要涉及多种机制模型。

2.3 LEE 形成的机制模型

LEE 是缺乏着丝粒序列的染色体外异常结构, 非成对存在。Hirano 等^[27]在急性骨髓细胞白血病细胞系 HL-60 的终末分化过程中, 发现并分离得到了 LEE, 在每个细胞中的数量为 1 至 4 个不等, 而早期存在的 DMs 此时仅有少量的残留。LEE 上含有 *MYC* 的扩增, 长度约为人 21 号染色体的 25%, 远大于 DMs 的片段长度。对 DMs 和 LEEs 的结构进行深入研究后发现, LEEs 的不连续结构与早期阶段的 DMs 相同, 两者主要区别在于拷贝数不同, 因此推测 LEEs 是由 DMs 多聚化形成。

3 总结与展望

扩增子的形成机制是扩增子研究中的关键问题。基因扩增形成的扩增子与人类肿瘤的发生发展与预后等密切相关, 阐明扩增子的形成机制, 对于理解基因扩增机制、DMs 等扩增子和基因组的可塑性以及指导肿瘤的治疗等都具有重要意义。由于扩增子存在形式多样, 结构各异, 现有的重组机制或者形成模型都有其适用与局限之处。可能有多种机制共同参与了各种扩增子的形成, 也可能在扩增子异质性的掩盖之下还存在着适用于各种扩增子的某种共通的机制, 这还有待于研究者们进一步的深入发现。

参考文献:

- [1] Albertson DG. Gene amplification in cancer [J]. Trends Genet, 2006, 22(8): 447-455.
- [2] Mladenov E, Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways[J]. Mutat Res, 2011, 711 (1-2): 61-72.
- [3] Meng X, Qi X, Guo H, et al. Novel role for non-homologous end joining in the formation of double minutes in methotrexate-resistant colon cancer cells[J]. J Med Genet, 2015, 52(2): 135-144.
- [4] Bignell GR, Santarius T, Pole JC, et al. Architectures of somatic genomic rearrangement in human cancer amplicons at sequence-level resolution[J]. Genome Res, 2007, 17 (9): 1296-1303.
- [5] Vogt N, Gibaud A, Lemoine F, et al. Amplicon rearrangements during the extrachromosomal and intrachromosomal amplification process in a glioma [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42 (21): 13194-13205.
- [6] Malhotra A, Lindberg M, Faust GG, et al. Breakpoint profiling of 64 cancer genomes reveals numerous complex rearrangements spawned by homology-independent mechanisms[J]. Genome Res, 2013, 23 (5): 762-776.
- [7] Daley JM, Kwon Y, Niu H, et al. Investigations of homologous recombination pathways and their regulation[J]. Yale J Biol Med, 2013, 86 (4): 453-461.
- [8] Narayanan V, Lobachev KS. Intrachromosomal gene amplification triggered by hairpin-capped breaks requires homologous recombination and is independent of nonhomologous end-joining[J]. Cell Cycle, 2007, 6 (15): 1814-1818.
- [9] Marotta M, Chen X, Watanabe T, et al. Homology-mediated end-capping as a primary step of sister chromatid fusion in the breakage-fusion-bridge cycles[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(21): 9732-9740.
- [10] Merelli I, Guffanti A, Fabbri M, et al. RSSsite: a reference database and prediction tool for the identification of cryptic Recombination Signal Sequences in human and murine genomes[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38 (Web Server Issue): W262-W267.
- [11] Gibaud A, Vogt N, Hadj-Hamou NS, et al. Extrachromosomal amplification mechanisms in a glioma with amplified sequences from multiple chromosome loci [J]. Hum Mol Genet, 2010, 19 (7): 1276-1285.
- [12] Guenthoer J, Diederichs SJ, Tanaka H, et al. Assessment of palindromes as platforms for DNA amplification in breast cancer[J]. Genome Res, 2012, 22 (2): 232-245.
- [13] Zhu J, Yu Y, Meng X, et al. De novo-generated small palindromes are characteristic of amplicon boundary junction of double minutes[J]. Int J Cancer, 2013, 133 (4): 797-806.
- [14] Vogt N, Gibaud A, Lemoine F, et al. Amplicon rearrangements during the extrachromosomal and intrachromosomal ampli-

- cation process in a glioma[J]. *Nucleic Acids Res*,2014,42(21): 13194–13205.
- [15] Kitada K,Yamasaki T. The complicated copy number alterations in chromosome 7 of a lung cancer cell line is explained by a model based on repeated breakage-fusion-bridge cycles [J]. *Cancer Genet Cytogenet*,2008,185 (1): 11–19.
- [16] Reshmi SC,Roychoudhury S,Yu Z,et al. Inverted duplication pattern in anaphase bridges confirms the breakage-fusion-bridge (BFB) cycle model for 11q13 amplification [J]. *Cytogenet Genome Res*,2007,116 (1–2):46–52.
- [17] Storlazzi CT,Lonoce A,Guastadisegni MC,et al. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors:origin and structure [J]. *Genome Res*,2010,20 (9):1198–1206.
- [18] Gibaud A,Vogt N,Brison O,et al. Characterization at nucleotide resolution of the homogeneously staining region sites of insertion in two cancer cell lines[J]. *Nucleic Acids Res*,2013,41 (17):8210–8219.
- [19] Toledo F,Buttin G,Debatisse M. The origin of chromosome rearrangements at early stages of AMPD2 gene amplification in Chinese hamster cells [J]. *Curr Biol*,1993,3 (5):255–264.
- [20] Coquelle A,Toledo F,Stern S,et al. A new role for hypoxia in tumor progression:induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs[J]. *Mol Cell*,1998,2(2):259–265.
- [21] Storlazzi CT,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):933–942.
- [22] Van Roy N,Vandesompele J,Menten B,et al. Translocation-excision-deletion-amplification mechanism leading to nonsyntenic coamplification of MYC and ATBF1[J]. *Genes Chromosomes Cancer*,2006,45 (2):107–117.
- [23] Sen S,Hittelman WN,Teeter LD,et al. Model for the formation of double minutes from prematurely condensed chromosomes of replicating micronuclei in drug-treated Chinese hamster ovary cells undergoing DNA amplification[J]. *Cancer Res*,1989,49 (23):6731–6737.
- [24] Korbel JO,Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes[J]. *Cell*,2013,152(6):1226–1236.
- [25] Stephens PJ,Greenman CD,Fu B,et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development[J]. *Cell*,2011,144 (1):27–40.
- [26] L'Abbate A,Macchia G,D'Addabbo P,et al. Genomic organization and evolution of double minutes/homogeneously staining regions with MYC amplification in human cancer [J]. *Nucleic Acids Res*,2014,42 (14):9131–9145.
- [27] Hirano T,Ike F,Murata T,et al. Genes encoded within 8q24 on the amplicon of a large extrachromosomal element are selectively repressed during the terminal differentiation of HL-60 cells[J]. *Mutat Res*,2008,640 (1–2): 97–106.

郑重声明

本刊作者谨防商务网站虚假征稿

《肿瘤学杂志》官网网址为:<http://www.chinaoncology.cn> 请作者直接点击进入网页,注册并登录采编系统进行投稿。如有疑问请致电 0571-88122280,88122281,13758247950,13757142507 查询。本刊邮箱为 zlxzz04@126.com 不再接受邮件投稿,所有稿件均通过采编系统管理,作者可通过采编系统查阅稿件审理进展。通过百度、谷歌等搜索后出现的注有《肿瘤学杂志》字样的代理征稿等相关信息,本刊均未同其签订过委托、授权或合作协议,敬请作者谨防上当!