

DOI: 10.13376/j.cbls/2022046

文章编号: 1004-0374(2022)04-0392-09

免疫原性微核的起源与生物医学意义

张 城, 汪 旭, 郭锡汉*

(云南师范大学生命科学学院, 生物能源持续开发与利用教育部工程研究中心, 昆明 650500)

摘 要: 微核 (micronuclei, MN) 是独立于细胞核的小型类核结构, 常见于肿瘤细胞。MN 在结构和遗传活性方面表现出巨大异质性, 相当部分的 MN 具有结构缺陷且倾向于破裂的核被膜 (micronuclear envelope, mNE)。mNE 破裂后, MN 可启动染色体碎裂和固有免疫通路, 暗示免疫原性 MN (immunogenic MN, iMN) 具有广泛的生物医学意义。该文首先讨论 MN 的起源、mNE 易破裂的结构基础以及两个主要的分子和细胞模型, 随后梳理出 MN 破裂后诱发染色体碎裂与激活 cGAS-STING 固有免疫通路的分子过程, 最后总结了 iMN 在抗肿瘤活性和促肿瘤演化过程中所表现出的复杂作用及相应机制。iMN 的研究为 MN 领域注入了全新的学术理论和思想。解析 mNE 不稳定的分子与结构基础以及 iMN 对肿瘤双向作用 (iMN 悖论) 的机制将是未来几年细胞生物学和遗传学领域的研究热点之一。

关键词: 核被膜; cGAS-STING 通路; 染色体碎裂; 染色体外环状 DNA; 肿瘤

中图分类号: Q24; R392.1 **文献标志码:** A

The origin and biomedical implications of immunogenic micronucleus

ZHANG Cheng, WANG Xu, GUO Xi-Han*

(Engineering Research Center for Sustainable Development and Utilization of Bioenergy, Ministry of Education, College of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China)

Abstract: Micronuclei (MN) are small nucleus-like structures separated from the nucleus. MN are common in tumor cells and display a great heterogeneity in their structure and genetic activity. Due to the structural defects, micronuclear envelope (mNE) is rather prone to rupture, which triggers chromothripsis and innate immune responses. These findings suggest that immunogenic MN (iMN) has a wide range of biomedical implications. In this review, we firstly discuss the origin of MN, the structural basis of rupture-prone mNE, and two molecular and cellular models underlying mNE structural defects. Secondly, we explore the molecular mechanisms contributing to the induction of chromothripsis and activation of cGAS-STING innate immune pathway in ruptured MN. Finally, we summary the complicated roles and the corresponding mechanisms of iMN in suppressing tumor growth and promoting tumor evolution. As a new chapter in MN field, iMN has brought us new academic theories and ideas about MN. Dissecting the complexities of the molecular and structural origins of mNE instability, as well as the mechanisms for the dual roles of iMN in tumor (that is, iMN paradox), will be one of next frontiers in the fields of cell biology and genetics in the upcoming years.

Key words: nuclear envelope; cGAS-STING innate pathway; chromothripsis; extrachromosomal circular DNA; tumor

收稿日期: 2021-11-23; 修回日期: 2022-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31900410、31860301); 云南省基础研究计划项目(202001AU070055、202101AT070112); 云南师范大学优秀青年学者项目

*通信作者: E-mail: guo_xihan@163.com

19 世纪末至 20 世纪初, William Howell 和 Justin Jolly 首次发现人的部分淋巴细胞的细胞核周围存在一个或多个细小的核状结构, 并将其命名为微核 (micronuclei, MN)(图 1)。通常, MN 因细胞在有丝分裂后末期染色体片段或整条染色体滞后而产生, 故而是遗传毒性的生物指标^[1]。相较于核被膜 (nuclear envelope, NE), 相当部分 MN 的被膜 (micronuclear envelope, mNE) 易发生不可逆的破裂。mNE 破裂促进 MN 内的染色体发生碎裂 (chromothripsis), 同时部分 DNA 碎片外流至细胞质并激活胞质 DNA 感应蛋白环 GMP-AMP 合酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS), 并合成第二信使环 GMP-AMP (cGAMP)。cGAMP 进一步激活干扰素刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING), 启动固有免疫通路^[1]。

近年来, 大量研究显示具有免疫原性的 MN (immunogenic MN, iMN) 介导了炎症反应、抗肿瘤作用和促癌症转移等下游途径, 提示 MN 在癌症等病理性过程中发挥重要作用^[1]。因此, iMN 可能是除非整倍体 (aneuploidy) 外架通基因组不稳定与肿瘤等疾病的另一个关键桥梁。MN 的起源及其生物医学意义已逐渐成为细胞生物学的研究热点之一。本文就 MN 的起源、mNE 倾向于破裂的结构基础与诱发机制以及 iMN 与肿瘤相互关系的复杂性进行综述, 以期对 iMN 的理论创新以及在生物医学领域的实践应用提供思路。

1 MN的起源

对于高等真核生物而言, 有丝分裂最根本的目的是将已复制好的染色体完整且均等地分配至两个子代细胞。为此, 细胞在有丝分裂前需要确保所有染色体已完成精确的复制, 在有丝分裂中确保染色体进行正确的动粒-微管连接、排布和分离, 在有丝分裂之后确保所有的染色体彼此聚合形成单一的

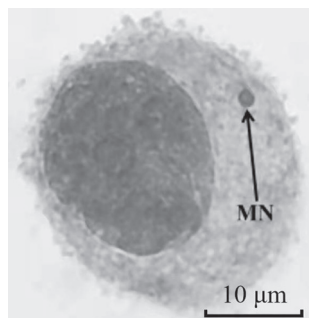


图1 含有MN的人脐静脉内皮细胞

细胞核。上述过程出现异常均会形成 MN。因此, MN 是一种较为灵敏的遗传毒性指标。

根据诱发 MN 的异常事件在细胞周期中所处时期, 可将 MN 的起源分为有丝分裂前起源、有丝分裂中起源和有丝分裂后起源^[1]。有丝分裂前出现的异常事件, 如复制压力和中心体过度复制, 可显著诱发 MN^[2-3]。有丝分裂中诱发 MN 的主要因素是纺锤体组装检查点 (spindle assembly checkpoint, SAC) 紊乱。SAC 处于中期和后期之间, 用于防止含有动粒-微管异常结合的中期细胞提前进入后期。研究发现, 干扰任何一种 SAC 相关基因表达, 在不同程度上都能显著诱发 MN^[1]。我们的研究显示, 植食性化合物和微营养素的暴露或缺乏主要是通过调控 SAC 活性诱发或抑制 MN 的产生^[4-8]。有丝分裂后的 MN 起源方式研究相对较少。Samwer 等^[9]发现末期染色体需要 BAF (barrier-to-autointegration) 因子的包裹和交联, 以形成紧凑的染色质团, 敲除 *BAF1* 基因之后, 子代染色体则形成多个大小不一的 MN。Serra-Marques 等^[10]发现纺锤体蛋白 NuMA 发挥了类似 BAF 的功能。此外, 细胞进入间期后, 部分染色体可通过核膜出芽的方式从主核内分离而形成 MN^[11]。

综上所述, MN 在起源上具有很高的异质性。以不同方式起源的 MN 在结构和功能上有着较大的分化, 同时在自身的命运和对宿主细胞所产生的生理/病理作用等方面存在鲜明的差异^[1, 12]。

2 mNE的结构

NE 包括核膜、核纤层和核孔复合体 (nuclear pore complexes, NPCs)^[13]。核膜分为包裹核质的内核膜和面朝胞质并与内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 相连的外核膜, 二者通过负责胞质和核质交换与信息交流的 NPCs 相互融合^[13]。由核纤层蛋白构成的核纤层网络结构与内核膜紧密相连。在哺乳动物中, 核纤层蛋白主要分为 A 型 (lamin A 和 lamin C) 和 B 型 (lamin B1 和 lamin B2)^[14]。其中, A 型核纤层调控 NE 的刚性, B 型核纤层调控 NE 的完整性^[15]。此外, 核纤层蛋白与多种蛋白质相互结合以维持 NE 稳定性, 如位于 NE 外围的核纤层蛋白 B 受体 (lamin B receptor, LBR) 和 Emerin 等^[16]。

有丝分裂末期的滞后染色体是 MN 的主要来源^[1]。这个时期, 正常分离的子代染色体聚集成圆盘状并进一步向细胞两极运动, NE 组分开始围绕染色质盘的边缘准备重建 (图 2)。两个子代染色质

盘相对的内部中心区域分布有中心纺锤体微管 (central spindle microtubule, CSM), 而染色质盘相对的外部区域存在中心体微管。因此, 这些与微管接触的区域称为“核心”区域, 而染色质盘外围边缘则称为“非核心”区域^[17]。当 NE 重建时, 核膜首先包裹染色质盘, 不同的蛋白质组分从核心或非核心区域被输送到核膜中, 之后通过核膜运动促使核心和非核心蛋白在 NE 中的分散和匀化^[17]。如果末期细胞存在分离滞后的染色体或染色体片段, NE 组分便会将其包裹形成独立的 mNE。

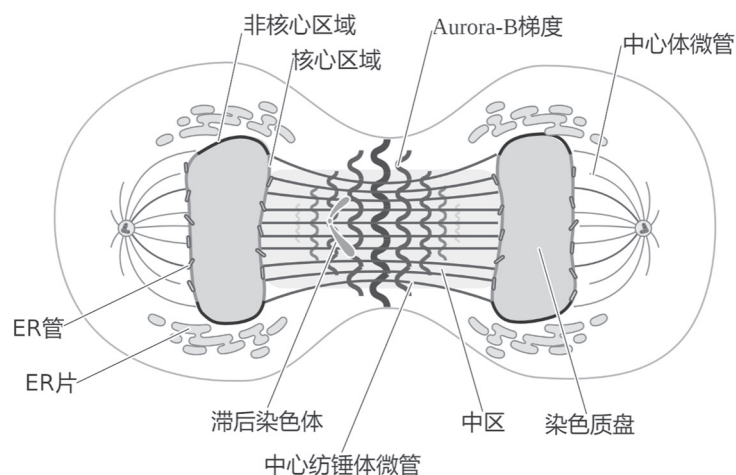
mNE 组建过程与 NE 重建高度类似, 但二者在部分非核心蛋白的组成上存在明显差异。Liu 等^[18]发现: 核心蛋白, 包括 lamin A/C、Lap2 α 、Emerin 等, 在 mNE 中的组装较为完整; 而多种非核心蛋白, 如核孔蛋白、lamin B、LBR 等, 在 mNE 中存在缺陷。利用活细胞成像和免疫荧光技术, 他们发现 mNE 中的 NPCs 和其他非核心蛋白的组装密度较低, 导致 MN 内外物质交换和信息交流缺陷^[18]。此外, 利用延时成像技术, Hatch 等^[19]发现约 60% 的 MN 中 lamin B1 完整性缺失。

由于 NE 的完整性对细胞核内的一系列分子生物学过程至关重要, 可以推断 mNE 结构的缺陷会给 MN 带来巨大的影响。的确, 研究发现 mNE 破裂改变了 MN 内染色体 DNA 的结构与功能, 由此引发大规模的 DNA 损伤和基因表达异常^[19]。mNE 蛋白质组分的异质性暗示不同的 MN 可能存在不同

的起源方式和表现出不同的基因活性, 并在后续的发展中对宿主细胞的命运产生不同程度和不同性质的影响。

3 mNE结构缺陷的两种分子模型

对于 mNE 结构缺陷的分子机制, 目前主要有两种模型。第一种模型是由蛋白激酶 Aurora-B 介导。在中期向后期过渡时, Aurora-B 从中区 (midzone) 的中轴线开始向两极形成由大到小的浓度梯度 (图 2)^[20]。在果蝇细胞中, Aurora-B 梯度可监测分裂轴上染色体的位置, 并通过在染色体上的凝聚素 I (condensin I) 磷酸化来防止过早的染色体去凝缩^[21]。因此, Aurora-B 磷酸化梯度是一种防止滞后染色体过早发生 mNE 组建的监管机制。这种机制的存在为滞后染色体重新整合到子代染色体团中赢得了时间, 防止其形成 MN^[21]。同样的机制在果蝇细胞的无着丝粒片段上也被发现。Karg 等^[22]通过在 X 染色体末端附近的 rDNA 位点上特异性地诱导 DNA 双链断裂而产生无着丝粒片段, 发现虽然无着丝粒片段与主染色体之间以 DNA 细丝 (tether) 相连, 但是在后期会出现分离滞后。利用 RNA 干扰降低 Aurora-B 表达时, 滞后的无着丝粒片段上核纤层蛋白的数量急剧增加。该现象表明 Aurora-B 磷酸化梯度可阻止滞后的无着丝粒片段进行 mNE 组建。近期, Orr 等^[23]在人 U2OS 细胞株中证实 Aurora-B 磷酸化梯度延缓了滞后染色体上的 mNE 组建并预



在有丝分裂末期细胞内, 子代染色体(染色质盘)被中心体微管进一步拉向两极, 并在中区形成Aurora-B磷酸化梯度和中心纺锤体微管。之后, ER以管状和片状的形式分别被输送到染色质盘的核心区和非核心区, 开始NE重建。受损染色体则会发生分离滞后, 从而被包裹在Aurora-B磷酸化梯度和中心纺锤体微管中, 二者可独立干扰滞后染色体上的mNE组建, 最终产生mNE缺陷的MN (该图通过Biorender.com绘制)。

图2 有丝分裂末期的细胞形态图

防其形成 MN。因此, 虽然中区内的 Aurora-B 磷酸化梯度被认为是一种演化上保守、用于防止滞后染色体形成 MN 的重要机制, 但是它导致了少数未被整合并最终形成 MN 的滞后染色体上发生缺陷性 mNE 组建。

第二种模型是由 CSM 介导。通过在人 hTERT RPE-1 细胞中过表达能促进微管稳定性及成核过程的微管相关蛋白 TPX 2, Naso 等^[24]发现异常稳定的 CSM 可以干扰细胞核重建和 lamin B1 的组装, 导致子代细胞核呈现中空圆环状(又称多娜形核, donut-shaped nuclei)。这一发现表明微管的存在会严重干扰 NE 重建的秩序性。因滞后染色体通常位于密集的 CSM 中, CSM 是否是造成 mNE 缺陷的关键因素呢? Liu 等^[18]研究发现, 滞留在中区的染色体可以高效组装核心蛋白, 而非核心蛋白(包括 NPCs、LBR、Nup133 等)的组装效率相对较低。当利用微管解聚剂将 CSM 破坏后, 滞后染色体上非核心蛋白的组装恢复到正常水平^[18]。而来自中区以外的游离染色体则具有正常的非核心蛋白水平以及正常的 DNA 复制等活性^[18]。重要的是, 共同使用 Aurora-B 抑制剂(ZM447439)和紫杉醇与单独使用紫杉醇处理结果却相同, 说明 CSM 对非核心蛋白组装的抑制作用独立于 Aurora-B 磷酸化梯度^[18]。以上研究结果暗示 CSM 可以通过干扰非核心蛋白在滞后染色体上的组装影响 mNE 组建。但是, CSM 如何干扰非核心蛋白组装仍需进一步研究。可能的机制是有丝分裂前期 NE 解聚后, 非核心蛋白富集在较大的 ER 片状结构中, 而核心蛋白富集在较小的 ER 管状结构中(图 2)^[25]。在末期时, ER 片因太大无法穿透 CSM 而未能有效参与 mNE 组建, ER 管因相对较小能顺利进入 CSM 而参与 mNE 组建^[25]。

上述两种模型均提示, 滞后染色体在形成 MN 前所处的微环境导致了 mNE 组建过程不可避免地产生蛋白质组分缺陷。结构缺陷的 mNE 易发生不可逆转的破裂, mNE 破裂是诱发 iMN 及其下游分子通路的关键^[26]。有意思的是, 上述两种模型彼此独立, 且在不同时空下发挥作用^[18, 23]。此外, 在某些情况下, mNE 也可以很稳定。驱动蛋白 KIF18A 对 mitosis 中期染色体的正确排布具有关键作用。近期的一项研究指出, *Kif18a* 功能缺失突变小鼠虽然含有很高的 MN 率, 但大部分 MN 却具有稳定的 mNE^[27]。因此, mNE 的形成和稳定性的调控机制还需要更深入的研究。

4 mNE破裂诱发染色体碎裂与cGAS-STING固有免疫通路

一方面, mNE 破裂导致 MN 内的染色体因失去保护而发生损伤。染色体碎裂是指一条或几条染色体在发生大范围断裂后以无序的方式被重新组装的生物学过程^[28]。对来自 28 类肿瘤的 2 658 份样本进行全基因组测序后, Cortes-Ciriano 等^[29]发现染色体碎裂存在明显的组织特异性, 例如脂肪肉瘤中的染色体碎裂检出率为 100% (18/18), 而在毛细细胞型星形细胞瘤 (0/78) 和髓性白血病 (0/16) 中几乎未检测到。该研究还发现同一肿瘤内和不同肿瘤间染色体碎裂的大小和复杂程度是高度可变的^[29]。此外, 虽然在骨肉瘤中染色体碎裂能同时影响 5 条染色体, 但在 40% 的检出样本中染色体碎裂只发生在一条染色体内^[29]。

为什么染色体碎裂仅限于基因组内一条或少数几条染色体? 通过活细胞成像和单细胞基因组测序相结合的方法, Zhang 等^[30]证实 MN 内的染色体会发生染色体碎裂, 而背后的诱因是 mNE 破裂或功能受损导致 S 期的 MN 不能正常募集 DNA 复制因子和修复蛋白。利用含有胸苷的培养基阻断 MN 化细胞的 DNA 复制, Crasta 等^[31]发现 MN 内的 DNA 损伤显著下降, 表明 MN 内 DNA 异常复制是导致 MN 中 DNA 损伤的主因。此外, 他们用 BrdU 标记 DNA 复制, 发现 MN 内的 DNA 复制效率低下, 且与主核异步^[31]。MN 表现出 DNA 复制范围的减少和速率的延迟, 使得当主核进入 M 期时, MN 仍处于 S 期。进入 M 期的主核产生大量的染色体凝缩信号, 导致 MN 内发生染色体过早凝集 (premature chromosome compaction)。染色体过早凝集对复制中的 DNA 产生强大的机械应力, 推动了 MN 内染色体大范围断裂^[32]。

MN 内断裂的染色体片段又是如何连接的呢? Ly 等^[33]通过分子遗传学手段在 DLD-1 细胞中使 Y 染色体特异性地发生 MN 化, 并利用 RNA 干扰技术分别抑制非同源末端连接、同源重组和微同源末端连接各途径中的核心蛋白的表达, 发现仅抑制非同源末端连接就能阻断 MN 内染色质片段的重组, 提示非同源末端连接介导了 MN 内染色体片段重接形成一条新生染色体 (neochromosome)。由于非同源末端连接的易错性, 这些片段的连接是高度随机的。与此同时, 一些未被连接到新生染色体上的 DNA 短片段发生环化而形成染色体外环状 DNA

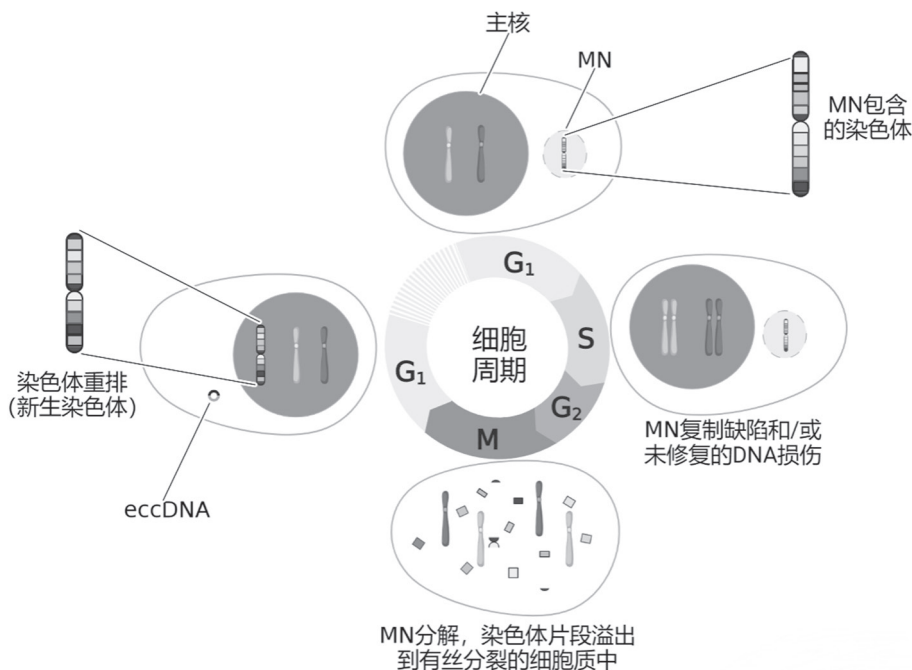
(extrachromosomal circular DNA, eccDNA)(图3)^[33]。近期,研究发现 eccDNA 可进一步促进肿瘤的遗传异质性。Rosswog 等^[34]在神经母细胞瘤内发现 eccDNA 之间通过反复的环形重组(circular recombination)进行大范围扩增,进而形成双微体(double minutes)或形成新染色体整合到癌基因组内。由于该类型扩增的模式图类似于地震波,故被命名为地震式扩增(seismic amplification)。

另一方面, mNE 破裂使得胞质中的 cGAS 进入 MN 内并被其中的 DNA 激活。cGAS 通常作为非活性蛋白存在于细胞中,当 cGAS 与胞质中的 DNA 结合后被激活,以 ATP 和 GTP 为底物催化产生 cGAMP。cGAMP 随即被 ER 上的 STING 检测到,激活后的 STING 被转运到高尔基体膜上并激活 TBK1 (TANK-binding kinase 1)^[37]。然后, TBK1 将自身和 STING 磷酸化,随后磷酸化 IRF3 (interferon regulatory factor 3) 转录因子。IRF3 随即发生二聚化并进入细胞核触发 I 型干扰素(type I interferon)的产生,后者刺激基因表达并介导抗细菌防御机制和炎症反应^[38](图4)。

2017年, Mackenzie 等^[35]和 Harding 等^[36]通过

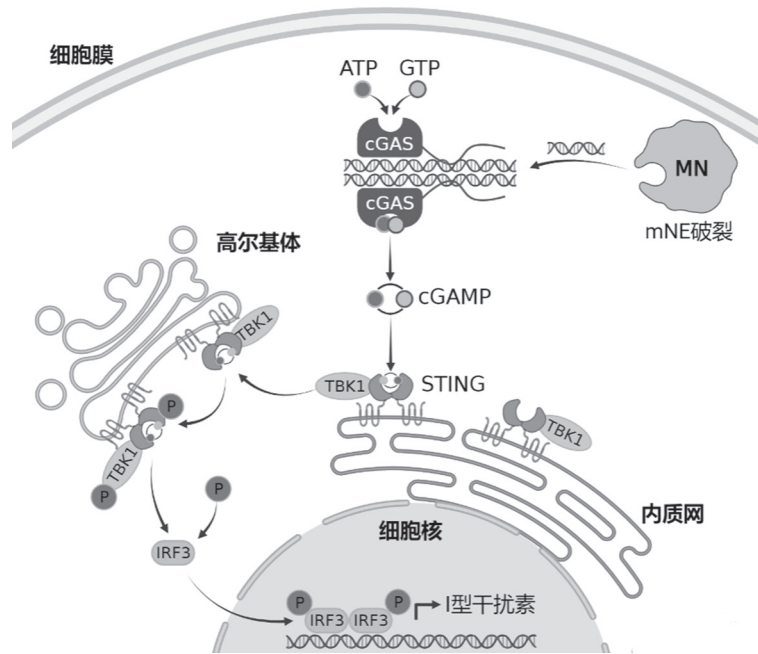
cGAS 和 DNA 示踪技术,首次发现 cGAS 能与 MN 结合。在 U2OS 细胞中, cGAS 阳性 MN 通常缺乏核标记物 Rb 蛋白,证明大部分 cGAS 阳性 MN 存在 mNE 破裂^[35]。因此, mNE 破裂的 MN 与 cGAS 结合形成 iMN, 并进一步激活 cGAS 依赖的促炎反应。2021年, Wang 等^[39]发现 eccDNA 具有极高的免疫活化作用。这一发现暗示 MN 内发生染色体碎裂而形成的 eccDNA 的多与寡可能是决定 MN 免疫原活性高与低的关键因素。

当 iMN 产生时,细胞可通过多种途径限制其产生的危害。Lan 等^[40]发现,核酸酶 *DNase 2a* 基因敲除的小鼠肺成纤维细胞大量形成 iMN 并表现出较强的炎症信号。此外, Bartsch 等^[41]发现在分离自核酸酶 *RNase H2* 基因敲除小鼠的胚胎成纤维细胞中存在大量 lamin B1 水平较低的 iMN, 且伴有 cGAS 和 STING 表达上调。因此,胞质中部分核酸酶通过降解 iMN 释放出来的染色质片段,阻止 cGAS 被自身 DNA 激活。当上述核酸酶表达缺陷时,自噬体标记蛋白 LC3-II 和溶酶体蛋白 LAMP 1 水平升高,提示细胞启动了自噬程序将 iMN 降解^[40-41]。近期, Zhao 等^[42]通过共聚焦显微镜观察到 cGAS



MN化细胞在经历S期时, mNE的功能缺陷导致MN复制效率下降,使MN中的DNA复制滞后于主核。当主核进入M期时, MN 内正在复制的染色体过早凝集,发生大范围断裂。有丝分裂结束, MN 内的染色体碎片进入子代细胞主核并由非同源末端连接完成随机重排后形成新生染色体。部分未被整合的染色体片段形成 eccDNA。如这条新生染色体包含有功能的着丝粒,则其可稳定遗传;如未包含有活性的着丝粒,则其会在下一个有丝分裂周期再次形成 MN。因此,一条受损伤的染色体可能通过“MN化-重排-MN化”循环达到染色体序列和结构的快速演化。该现象在癌细胞内十分常见(该图通过 Biorender.com 绘制)。

图3 MN内发生染色体碎裂的机制图



mNE完整性缺失会导致MN内的DNA释放。胞质内的cGAS识别这些DNA并形成二聚体。活化的cGAS产生第二信使cGAMP,后者与STING相互结合,促进TBK1磷酸化。随后,IRF3转录因子被TBK1磷酸化并被转运至细胞核。二聚化的IRF3通过产生I型干扰素促进抗菌防御和炎症反应(该图通过Biorender.com绘制)。

图4 iMN激活cGAS-STING通路的分子过程

与自噬关键调节因子LC3B在MN上相互作用,并以不激活cGAS-STING通路的方式作为自噬受体介导MN自噬(micronucleophagy)。

综上所述,mNE破裂不仅破坏了MN内染色体的完整性(促进染色体碎裂),还扰乱了MN化细胞的稳态(激活固有免疫)。为此,细胞已演化出了多层途径降解MN。当这些途径出现异常时,大量积累的MN诱发基因组不稳定、炎症反应、自体免疫,甚至促进肿瘤等疾病的发生发展^[43-44]。

5 肿瘤与iMN悖论

MN的存在会降低肿瘤细胞的存活能力。Utani等^[2]通过活细胞成像技术观察到,在羟基脲处理下,含MN的HeLa细胞的凋亡率(30%)明显高于无MN的细胞(12%),表明MN可能是细胞死亡的强烈诱因。Huang等^[45]利用活细胞成像技术监测经X射线照射处理的鼻咽癌CNE-1细胞,发现细胞所含的MN越多,其死亡或发生周期阻滞的可能性越大。含有MN的细胞更倾向于发生凋亡的原因尚不明确。理论上可能存在三级层面的机制。第一,作为一种遗传压力的生物指标,MN的存在表明该宿主细胞存在高水平的基因组损伤,一旦该损伤水平超越癌细胞能够承受的阈值,将会迫使癌细胞发

生凋亡。第二,mNE缺陷导致进入MN的染色体的遗传活性降低或丢失,使得该染色体上对于癌细胞生存至关重要的基因(如抗凋亡基因)无法表达,诱发癌细胞凋亡。第三,部分MN自身(如iMN)可诱发一些降低细胞适合度(fitness)和/或促进细胞凋亡的信号通路,最终导致宿主细胞死亡。

当前的研究主要集中在第三类机制。Lohard等^[46]在体外和PDX(patient-derived xenograft)动物模型实验中发现,紫杉醇可以通过cGAS-STING通路激活三阴乳腺癌细胞的促凋亡分泌表型,而这一过程依赖于紫杉醇通过干扰有丝分裂产生的iMN。Hu等^[47]结合体外实验和患者样本分析,进一步发现紫杉醇通过诱发iMN在cGAS⁺三阴乳腺癌中依次激活急性促炎反应,诱导巨噬细胞极化为M1经典活化型,募集大量的肿瘤浸润淋巴细胞,最终达到抗肿瘤作用。此外,Chao等^[48]发现,利用细胞周期检查蛋白CHEK1/2抑制剂AZD7762和电离辐射联合处理可以在MCF10A细胞中大量诱发iMN。对携带皮下异源移植肿瘤(由B16-F10黑色素瘤细胞形成)的C57BL/6小鼠进行AZD7762和电离辐射联合处理后,肿瘤增殖被有效抑制;同时,肿瘤细胞内的iMN增加,且肿瘤内CD8⁺T细胞数量显著上升^[48]。因此,体外和体内试验结果提示,抗有

丝分裂药物诱发的 iMN 可能通过激活 cGAS-STING 通路促使肿瘤细胞凋亡并激活体内抗肿瘤免疫。

然而,相比于正常细胞,肿瘤细胞内自发性 MN 频率显著升高,且高 MN 率与肿瘤患者的不良预后密切相关^[1]。既然 MN 具有诱发细胞凋亡的作用,为何肿瘤细胞中却有着更高的 MN 率? Samanta 等^[49]为评估 MN 作为生物标志物在不同的肿瘤前病变和肿瘤病变中的作用,统计了不同阶段肿瘤细胞内的 MN 率,并发现良性肿瘤中 MN 率远低于恶性肿瘤。这一现象说明 MN 在肿瘤演化过程中可能扮演重要作用。Bakhom 等^[50]的一项重要研究发现, iMN 激活的 cGAS-STING 通路可进一步激活 NF- κ B 信号通路的非典型机制,进而促进肿瘤的扩散和转移。最近, Wörmann 等^[51]在胰腺导管腺癌患者中发现肿瘤内抗病毒酶脱氨酶 APOBEC3A 的高表达显著降低患者的生存期。在小鼠模型中,他们发现高表达的 APOBEC3A 利用非脱氨酶活性诱发大量的 iMN,进而促进肿瘤细胞的传播和转移^[51]。

除激活 cGAS-STING 通路外, MN 还可能通过诱发染色体碎裂促进肿瘤细胞间遗传异质性(图 3)^[52]。Shoshani 等^[53]对形成化疗抗药性的癌细胞进行全基因组测序,发现这些细胞主要通过断裂-融合-桥 (breakage-fusion-bridge, BFB) 循环产生 MN;同时,无着丝粒染色体片段也是抗药性癌细胞产生 MN 的来源。重要的是, MN 介导的染色体碎裂可通过产生 eccDNA 促进相关癌基因的突变和扩增^[53]。因此,通过反复的 BFB 循环和/或 MN 化-重排-MN 化循环(图 3),肿瘤细胞内多条染色体可在几个周期内快速完成复杂的结构演化,产生大量含有癌基因的 eccDNA,从而确保肿瘤细胞在面对不同的化疗条件时快速产生耐受力 and 抗药性^[53]。因此, iMN 可以通过遗传和非遗传手段促进肿瘤细胞的演化。

近期,一项研究表明非 iMN 对肿瘤发生具有中性作用。Sepaniac 等^[27]发现 *Kif18a* 功能缺失小鼠虽然产生大量 MN,但其基因组相对稳定且自发性肿瘤发生率未增加;进一步研究发现, *Kif18a* 突变小鼠健康组织内的 MN 含较为稳定的 mNE。因此, mNE 稳定的 MN 可能因不能诱发染色体碎裂和促炎反应而未促进肿瘤发生。

综上所述,当前证据表明肿瘤细胞内的自发型 iMN 可以促进肿瘤的发生、演化和抗药性的产生,而经药物/化合物诱发的 iMN 可以作为抗肿瘤作用的靶点。人们将 iMN 对肿瘤的这种双向效应称为“iMN 悖论 (iMN paradox)”。

6 总结与展望

过去一个多世纪以来, MN 一直被笼统地认为是染色体不稳定的标志。因 MN 具有敏感性高、易辨认等优点,使得 MN 试验在传统的遗传毒理学研究中享有突出地位。近十年来,随着技术的发展,逐渐认识到 iMN 对宿主细胞具有遗传和非遗传层面的影响。iMN 的遗传层面影响包括诱发染色体碎裂和 eccDNA 等一系列复杂的,发生在染色体和 DNA 层面的重组和扩增事件;而 iMN 的非遗传层面影响则是通过激活 cGAS-STING 介导的固有免疫,启动不同的下游信号通路,最终产生促炎、促凋亡或促转移等不同生物学过程。

随着研究的深入,参与 iMN 的遗传和非遗传层面影响的作用方式和途径将会不断被丰富。例如,最近发表在预印本 *bioRxiv* 上的一项研究发现 iMN 的遗传层面影响还包括表观遗传作用。Agustinus 等^[54]系统性揭示了 iMN 内组蛋白的翻译后修饰被严重破坏,使得 iMN 内染色质可及性在启动子区域显著增加,而在内含子和基因间隔序列等区域显著降低,表明 iMN 内发生了由组蛋白修饰改变所介导的表观遗传重编程。这一现象在小鼠和人细胞以及肿瘤和非癌变细胞内均被观测到,表明其在演化过程中十分保守且在生理/病理背景下促进 iMN 内的基因表达。此外,利用诱导型 Y 染色体特异 MN 化体系,该研究进一步发现 Y 染色体 MN 化后产生的异常可及性在 Y 染色体被重新整合到细胞核内之后的很长一段时间仍然存在,表明 iMN 内的表观遗传重编程现象具有长期效应^[54]。因此, iMN 内还有很多结构和功能性改变尚待深入研究。

mNE 的不稳定性是联系 MN 遗传和非遗传层面影响的纽带,而这两方面的影响共同决定了肿瘤的 iMN 悖论。因此,利用先进的二代测序和生物信息学手段对 iMN 进行深层次的剖析为 MN 研究领域注入了全新的学术理论和思想。mNE 不稳定的分子与结构基础以及 iMN 的病理/生理功能存在背景特异性,甚至 iMN 悖论的分子和细胞学机制将是未来该领域的研究重点。

需要指出的是, iMN 也广泛存在于其他生理/病理条件下,如衰老和神经退行性疾病^[1]。因此,进一步探究 iMN 在衰老和神经退行性疾病中的作用将会为这些生物医学过程带来新的启发。此外, cGAS 仅是细胞内的 DNA 感受因子之一,其他因子,如 AIM2^[55] 和 KU70/KU80 复合体^[56] 在不同的背景

下亦可作为DNA感受因子,介导炎症反应或细胞凋亡。AIM2或KU复合体是否,以及在何种条件下可以应答胞质中存在的iMN,并介导何种下游生物学过程等科学问题还需要进一步的研究。此外,鉴于iMN所表现出的生物医学作用以及MN在毒理学中的广泛应用,将iMN的测定应用到毒理学领域可同时检测受试化合物可能存在的遗传毒理和免疫毒理作用。

[参 考 文 献]

- [1] Guo X, Ni J, Liang Z, et al. The molecular origins and pathophysiological consequences of micronuclei: new insights into an age-old problem. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2019, 779: 1-35
- [2] Utani KI, Kohno Y, Okamoto A, et al. Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress. *PLoS One*, 2010, 5: e10089
- [3] Guo X, Wang C, Tian W, et al. Extract of bulbous *Fritillaria cirrhosa* induces spindle multipolarity in human-derived colonic epithelial NCM460 cells through promoting centrosome fragmentation. *Mutagenesis*, 2021, 36: 95-107
- [4] Guo X, Dai X, Ni J, et al. Geraniin differentially modulates chromosome stability of colon cancer and noncancerous cells by oppositely regulating their spindle assembly checkpoint. *Environ Mol Mutagen*, 2019, 60: 254-68
- [5] Guo X, Ni J, Dai X, et al. Biphasic regulation of spindle assembly checkpoint by low and high concentrations of resveratrol leads to the opposite effect on chromosomal instability. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2018, 825: 19-30
- [6] Guo X, Ni J, Xue J, et al. Extract of bulbous *Fritillaria cirrhosa* perturbs spindle assembly checkpoint, induces mitotic aberrations and genomic instability in human colon epithelial cell line. *Exp Toxicol Pathol*, 2017, 69: 163-71
- [7] Guo X, Ni J, Zhu Y, et al. Folate deficiency induces mitotic aberrations and chromosomal instability by compromising the spindle assembly checkpoint in cultured human colon cells. *Mutagenesis*, 2017, 32: 547-60
- [8] Guo X, Wang X. *Phyllanthus emblica* fruit extract activates spindle assembly checkpoint, prevents mitotic aberrations and genomic instability in human colon epithelial NCM460 cells. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 1437
- [9] Samwer M, Schneider MWG, Hoefler R, et al. DNA cross-bridging shapes a single nucleus from a set of mitotic chromosomes. *Cell*, 2017, 170: 956-72.e23
- [10] Serra-Marques A, Houtekamer R, Hintzen D, et al. The mitotic protein NuMA plays a spindle-independent role in nuclear formation and mechanics. *J Cell Biol*, 2020, 219: e202004202
- [11] Utani K, Okamoto A, Shimizu N. Generation of micronuclei during interphase by coupling between cytoplasmic membrane blebbing and nuclear budding. *PLoS One*, 2011, 6: e27233
- [12] Hintzsche H, Hemmann U, Poth A, et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2017, 771: 85-98
- [13] Ungricht R, Kutay U. Mechanisms and functions of nuclear envelope remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 229-45
- [14] Cho S, Vashisth M, Abbas A, et al. Mechanosensing by the lamina protects against nuclear rupture, DNA damage, and cell-cycle arrest. *Dev Cell*, 2019, 49: 920-35. e5
- [15] Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem*, 1993, 268(22): 16321-6
- [16] Haraguchi T, Koujin T, Hayakawa T, et al. Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J Cell Sci*, 2000, 113: 779-94
- [17] Lajoie D, Ullman KS. Coordinated events of nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 46: 39-45
- [18] Liu S, Kwon M, Mannino M, et al. Nuclear envelope assembly defects link mitotic errors to chromothripsis. *Nature*, 2018, 561: 551-5
- [19] Hatch EM, Fischer AH, Deerinck TJ, et al. Catastrophic nuclear envelope collapse in cancer cell micronuclei. *Cell*, 2013, 154: 47-60
- [20] Fuller BG, Lampson MA, Foley EA, et al. Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature*, 2008, 453: 1132-6
- [21] Afonso O, Matos I, Pereira AJ, et al. Feedback control of chromosome separation by a midzone Aurora B gradient. *Science*, 2014, 345: 332-6
- [22] Karg T, Warecki B, Sullivan W. Aurora B-mediated localized delays in nuclear envelope formation facilitate inclusion of late-segregating chromosome fragments. *Mol Biol Cell*, 2015, 26: 2227-41
- [23] Bernardo O, Filipe DS, Margarida GA, et al. An anaphase surveillance mechanism prevents micronuclei formation from frequent chromosome segregation errors. *Cell Rep*, 2021, 37: 109783
- [24] Naso FD, Sterbini V, Crecca E, et al. Excess TPX2 interferes with microtubule disassembly and nuclei reformation at mitotic exit. *Cells*, 2020, 9: 374
- [25] Matthias S, Gerlich DW. A core problem in nuclear assembly. *Nature*, 2018, 561: 467-8
- [26] Guo X, Dai X, Wu X, et al. Understanding the birth of rupture-prone and irreparable micronuclei. *Chromosoma*, 2020, 129: 181-200
- [27] Sepaniac LA, Martin W, Dionne LA, et al. Micronuclei in *Kif18a* mutant mice form stable micronuclear envelopes and do not promote tumorigenesis. *J Cell Biol*, 2021, 220: e202101165
- [28] Kolb T, Ernst A. Cell-based model systems for genome instability: dissecting the mechanistic basis of chromothripsis in cancer. *Int J Cancer*, 2021, 149: 754-9
- [29] Cortés-Ciriano I, Lee JJ, Xi R, et al. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using

- whole-genome sequencing. *Nat Genet*, 2020, 52: 331-41
- [30] Zhang CZ, Spektor A, Cornils H, et al. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature*, 2015, 522: 179-84
- [31] Crasta K, Ganem NJ, Dagher R, et al. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*, 2012, 482: 53-8
- [32] Terzoudi GI, Karakosta M, Pantelias A, et al. Stress induced by premature chromatin condensation triggers chromosome shattering and chromothripsis at DNA sites still replicating in micronuclei or multinucleate cells when primary nuclei enter mitosis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015, 793: 185-98
- [33] Ly P, Teitz LS, Kim DH, et al. Selective Y centromere inactivation triggers chromosome shattering in micronuclei and repair by non-homologous end joining. *Nat Cell Biol*, 2017, 19: 68-75
- [34] Rosswog C, Bartenhagen C, Welte A, et al. Chromothripsis followed by circular recombination drives oncogene amplification in human cancer. *Nat Genet*, 2021, 53: 1673-85
- [35] Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, et al. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*, 2017, 548: 461-5
- [36] Harding SM, Benci JL, Irianto J, et al. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature*, 2017, 548: 466-70
- [37] Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*, 2013, 498: 380-4
- [38] Ablasser A, Chen ZJ. cGAS in action: expanding roles in immunity and inflammation. *Science*, 2019, 363: eaat8657
- [39] Wang Y, Wang M, Djekidel MN, et al. eccDNAs are apoptotic products with high innate immunostimulatory activity. *Nature*, 2021, 599: 308-14
- [40] Lan YY, Londoño D, Bouley R, et al. Dnase2a deficiency uncovers lysosomal clearance of damaged nuclear DNA via autophagy. *Cell Rep*, 2014, 9: 180-92
- [41] Bartsch K, Knittler K, Borowski C, et al. Absence of RNase H2 triggers generation of immunogenic micronuclei removed by autophagy. *Hum Mol Genet*, 2017, 26: 3960-72
- [42] Zhao M, Wang F, Wu J, et al. CGAS is a micronucleophagy receptor for the clearance of micronuclei. *Autophagy*, 2021, 17: 3976-91
- [43] Qiao Y, Zhu S, Deng S, et al. Human cancer cells sense cytosolic nucleic acids through the RIG-I-MAVS pathway and cGAS-STING pathway. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 1668
- [44] Paul BD, Snyder SH, Bohr VA. Signaling by cGAS-STING in neurodegeneration, neuroinflammation, and aging. *Trends Neurosci*, 2021, 44: 83-96
- [45] Huang Y, Hou H, Yi Q, et al. The fate of micronucleated cells post X-irradiation detected by live cell imaging. *DNA Repair*, 2011, 10: 629-38
- [46] Lohard S, Bourgeois N, Maillet L, et al. STING-dependent paracrine shapes apoptotic priming of breast tumors in response to anti-mitotic treatment. *Nat Commun*, 2020, 11: 259
- [47] Hu Y, Manasrah BK, Mcgregor SM, et al. Paclitaxel induces micronucleation and activates pro-inflammatory cGAS-STING signaling in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20: 2553-67
- [48] Chao HH, Karagounis IV, Thomas C, et al. Combination of CHEK1/2 inhibition and ionizing radiation results in abscopal tumor response through increased micronuclei formation. *Oncogene*, 2020, 39: 4344-57
- [49] Samanta S, Dey P, Nijhawan R. Micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma. *Acta Cytol*, 2011, 55: 42-7
- [50] Bakhoun SF, Ngo B, Laughney AM, et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*, 2018, 553: 467-72
- [51] Wörmann SM, Zhang A, Thege FI, et al. APOBEC3A drives deaminase domain-independent chromosomal instability to promote pancreatic cancer metastasis. *Nat Cancer*, 2021, 2: 1338-56
- [52] Guo X, Dai X, Wu X, et al. Small but strong: mutational and functional landscapes of micronuclei in cancer genomes. *Int J Cancer*, 2021, 148: 812-24
- [53] Shoshani O, Brunner SF, Yaeger R, et al. Chromothripsis drives the evolution of gene amplification in cancer. *Nature*, 2021, 591: 137-41
- [54] Agustinus A, Raviram R, Dameracharla B, et al. Epigenetic dysregulation from chromosomal transit in micronuclei. *bioRxiv*, 2022: 01.12.475944
- [55] Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, 2009, 458: 509-13
- [56] Wang Y, Fu Z, Li X, et al. Cytoplasmic DNA sensing by KU complex in aged CD4⁺ T cell potentiates T cell activation and aging-related autoimmune inflammation. *Immunity*, 2021, 54: 632-47.e9