

Review of Polyploid Giant Cancer Cells

Juan Yu, Renya Zhang, Wei Wang*

Department of Pathology, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining Shandong
Email: *wangwei1985@csu.edu.cn

Received: Dec. 23rd, 2018; accepted: Jan. 9th, 2019; published: Jan. 16th, 2019

Abstract

Polyploid giant cancer cells (PGCCs) is a special subgroup of cancer cells, often containing a single giant cell nucleus or multiple nuclei, and the nucleus is usually irregular. Compared with normal diploid cancer cells, PGCCs was different in cell cycle, proliferation pattern, differentiation ability, morphology, size, chromosomal abnormalities, tumorigenicity, radiotherapy and chemotherapy. PGCCs has not been valued in the past, and it is generally considered that PGCCs is at the edge of mitosis and the edge of apoptosis, which is not divided, so it is considered to be unviable. However, recent studies have found that PGCCs is not only viable but also has embryonic stem cell like characteristics. It produces multiple differentiations through asymmetric division of the progeny cells, and plays an important role in chemoresistance, proliferation, epithelial transformation and invasion and metastasis. In this paper, the research progress of PGCCs in recent years is reviewed, providing a new direction and method for clinical treatment.

Keywords

Polyploid Giant Cancer Cells, Multidirectional Differentiation, Chemoresistance, Epithelial Mesenchymal Transition, Invasion and Metastasis

多倍体肿瘤巨细胞研究进展

于娟, 张仁亚, 王卫*

济宁医学院附属医院病理科, 山东 济宁
Email: *wangwei1985@csu.edu.cn

收稿日期: 2018年12月23日; 录用日期: 2019年1月9日; 发布日期: 2019年1月16日

摘要

多倍体肿瘤巨细胞(PGCCs)是一种特殊类型的癌细胞亚群, 常含有单个巨大的细胞核或多个细胞核, 且

*通讯作者。

细胞核通常不规则。与普通二倍体肿瘤细胞相比,PGCCs细胞周期、增殖方式、分化能力、形态、大小、染色体异常、致瘤性、抵抗放化疗等方面均不相同。过去常认为PGCCs处于有丝分裂的阻滞期并且处于细胞凋亡的边缘,是无法存活的,因此不被重视。但是最近研究发现,PGCCs不仅是可生存的,而且具备胚胎干细胞样特性,通过不对称分裂产生子代细胞,进行多向分化,且在肿瘤耐药、上皮间质转化和侵袭转移中发挥重要作用。本文就PGCCs近年来的研究进展进行综述,为临床治疗提供一种新的方向和思路。

关键词

多倍体肿瘤巨细胞, 多向分化, 耐药, 上皮间质转化, 侵袭转移

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

恶性肿瘤是指肿瘤细胞处于去分化状态,其中一个显著特征是存在多个基因组DNA拷贝(多倍体)的巨型细胞,被称为多倍体肿瘤巨细胞(PGCCs) [1]。PGCCs是一种特殊的非典型癌细胞亚群,主要存在于实体肿瘤中,含单个巨大细胞核或多个细胞核,细胞核通常不规则。病理学家张诗武等[2]将细胞核体积与二倍体肿瘤细胞核的比例 ≥ 3 的细胞定义为PGCCs。PGCCs通常被认为是基因组不稳定性的中间产物。在形态、大小、染色体异常、致瘤性、抗放疗和抗化疗方面,PGCCs与普通二倍体癌细胞均有显著不同 [3]。这类细胞在体外培养过程中常被发现,但是过去不被重视,通常认为PGCCs是处于有丝分裂的阻滞期并且处于细胞凋亡的边缘的细胞,是不分裂且不能生存的。然而,最近研究发现,这些大的癌细胞不仅是可生存的,而且还可以通过不对称分裂产生具有癌症干细胞样特性的子代细胞[1] [4]。研究表明,四倍体细胞促进癌细胞存活并促进转化,在放射治疗、化疗和RAS致癌基因激活后,在衰老的成纤维细胞和癌细胞中观察到,多倍体肿瘤巨细胞出芽产生子代细胞而再生。多倍体可以促进衰老诱导的复制障碍,促进肿瘤的进展,甚至会导致转移[5]。多倍体比二倍体有多重优势,例如,与有丝分裂的细胞相比,PGCCs具有灵活性,对高度结构化的组织破坏性较小。此外,PGCCs基因组拷贝数增加,它们通常产生基因的相互作用、表观遗传变化、基因表达水平以及DNA重组,这些基因表达变化可能是癌细胞生命周期至关重要的因素,进行高效的DNA复制,更能适应肿瘤微环境的低氧和其他刺激,产生子代细胞更加高效,所有这些机制都可以协同工作,促进快速的恶性增长[4]。PGCCs促进了实体瘤的异质性并具有癌症干细胞的特性,PGCCs的数量通常随着病理分级和分期程度增高而增加[1] [2] [3] [4] [6] [7] [8] [9] [10]。大多数的PGCCs都存在于坏死区域周围以及在正常组织和肿瘤组织之间的浸润边界,这些地方的肿瘤细胞处于低氧微环境中[8] [9]。PGCCs通常在高级别癌症、化疗或靶向治疗后被发现,而且通常随着肿瘤分期、分级和治疗而增加[11]。然而,由于对PGCCs的生物学功能研究较少,PGCCs只在病理学家阅片的时候经常被发现,并没有引起肿瘤学家的广泛关注[4]。

2. PGCCs 形成机制

2.1. PGCCs 不是细胞衰老状态

传统认为多倍体细胞是细胞的衰老状态,而多倍体诱导则被认为是一种肿瘤抑制机制,因为多倍体

细胞被认为不能进行有丝分裂。S Zhang 等对 HEY、SKOv3 和 MDA-MB-23 形成的 PGCCs 进行 β -Gal 染色未发现阳性染色,表明 PGCCs 并不处于衰老状态[7]。研究已经证明 PGCCs 通过出芽产生子代细胞,而子细胞出芽则与衰老逃避有关[1]。PGCCs 可以通过形成一个非整倍性的后代来逃离衰老,这种后代具有增殖能力,且对抗癌治疗具有抗性,研究表明,紫杉诱导的有丝分裂和胞质分裂失败可以激活衰老程序并导致衰老 PGCCs 的形成,同时促进重新编程和基因组重组以产生新的耐药癌症细胞[11]。

2.2. 组蛋白表观遗传调控可能在 PGCCs 的形成过程中扮演重要角色

PGCCs 最显著的特征之一是有多个 DNA 拷贝,流式细胞术和荧光原位杂交(FISH)揭示了单个 PGCC 中多个 DNA 拷贝的存在[2]。但尚不清楚这些 DNA 在遇到组蛋白时如何组织成核体的。卵巢癌细胞系 HEY 和 SKOv3 在使用 CoCl_2 处理以后形成 PGCCs,通过蛋白质组分析 HEY 和 SKOv3 及其 PGCCs,PGCCs 中下调最显著的是参与核苷生成的组蛋白 H1 链蛋白家族。不同类型的组蛋白和组蛋白去乙酰化酶的表达在 HEY-PGCCs 中则显著升高,在 SKOv3-PGCCs 中,磷酸化的 H2AX,三甲基-H3 和 H1.3 的表达比普通 SKOv3 细胞要高。这些结果有力地表明,组蛋白介导的表观遗传调控可能在 PGCCs 的形成过程中扮演重要角色[4]。

为了确定 PGCCs 形成过程中所涉及的分子机制,N Niu 等对二倍体 HEY 细胞进行 H1B、Aurora A 和 γ -tubulin 染色后使用共聚焦扫描显微镜进行观察。在有丝分裂期间,H1B 被高度表达并与染色体共定位在细胞的中间平面上,在中心体的纺锤体极中发现了 Aurora A,而且在排列的染色体两端都很容易看到中心体 γ -tubulin。而在 PGCCs 中,没有发现任何纺锤体样的结构,而 α -tubulin 形成了一个微管状结构,围绕着伴有出芽的巨大细胞核。在一些细胞核中,只有零星的 H1B 阳性颗粒散在,这表明染色体并不是用组蛋白组装的。此外,没有 Aurora A 表达。出芽的细胞在横切面上由红色荧光标示的不连续的 α -tubulin 组成的微管网状结构围绕,在纵切面上,由微管状编织结构所围绕,并由纤细的纤维桥连接。此外,细胞核也分裂成大小不同的子核,它们连接到一个纤细的染色质桥上。这一过程并不涉及中心体的组装,因为缺乏 γ -tubulin 染色[5]。

2.3. 常见诱导剂及产生方式

PGCCs 可以通过失败的细胞周期(核内复制)或细胞融合产生[2] [3] [4] [12]。核内复制有两种主要的形式。第一种形式被称为核内周期,它由交替的 DNA 合成期(S)和间隙期(G)组成,在有丝分裂期(M)或细胞分裂期间没有染色体分离。另一种形式被称为核内有丝分裂,在这种情况下,细胞执行一种失败的有丝分裂,姐妹染色单体不会完全分离或细胞不会完全分裂,然后重新进入 S 期以产生多核细胞[11]。核内经历多轮 DNA 复制,而无有丝分裂,是一种进化上保守的方法产生多倍体细胞,在人滋养层细胞(为了满足胎儿发育的高氧需求)以及巨核细胞(产生血小板)中很常见。在癌症患者中,某些抗肿瘤化疗药物可以增加巨细胞的形成,这些细胞通常被认为处于有丝分裂的阻滞期,随后是细胞凋亡阶段。由于 PGCCs 绕过耗时且有序的有丝分裂事件,因此可以进行快速更新和繁殖[4]。

2.3.1. 氯化钴(CoCl_2)

一种化学缺氧模拟剂,可以选择性地杀死普通二倍体细胞,通过核内复制或细胞融合来诱导 PGCCs 的形成[2] [4] [6] [7] [9] [12]。 CoCl_2 通过稳定低氧诱导转录因子 1α (HIF- 1α)来模拟缺氧, CoCl_2 处理所得 PGCCs 中 HIF- 1α 的表达上调[7] [11]。张诗武等研究发现低氧诱导因子 HIF- 1α 及其已知的靶标 STC1 在人类卵巢癌细胞系 HEY 和 SKOv3 的 PGCCs 中被上调[4]。CSL 是典型的 Notch 信号传导的关键蛋白,CSL 的缺失导致常氧条件下的缺氧反应,导致 HIF- 1α 稳定不降解以及 PGCCs 产生,这表明在产生 PGCCs 和癌症发展方面,Notch 信号通路起了关键作用[11]。

2.3.2. 紫杉醇(PTX)

一种有丝分裂抑制剂, 通过抑制细胞分裂和诱导细胞凋亡而广泛应用于治疗癌症患者。紫杉醇处理的细胞在有丝分裂的纺锤体组装、染色体分离和细胞分裂等方面存在缺陷。紫杉醇稳定微管聚合物, 使细胞周期阻滞在 G2-M 期, 阻碍有丝分裂的发展, 从而形成多倍体肿瘤巨细胞 PGCCs [1] [10] [11]。

2.3.3. 中度剂量放疗

Puck 和 Marcus 根据人类 HeLa 宫颈癌细胞株暴露于电离辐射中, 发现基因毒性刺激可以引发巨细胞生成。细胞在接触到中度剂量的电离辐射(例如, 8 Gy)时观察到了类似的巨细胞形成。缺乏野生型 p53 功能的癌细胞暴露于电离辐射中, 孵育 3 天后会导致大量多核细胞(超过 50%)产生[13]。

2.3.4. 细胞融合

为了确定细胞融合是否与 PGCCs 的形成有关, S Zhang 等分别将标记为 eGFP 或 RFP 的普通 HEY 细胞混合培养, 然后用 CoCl_2 进行处理, 荧光显微镜观察发现黄色荧光(指示细胞融合)清晰可见。在 MDA-MB-231 和 SKOV3 细胞中也观察到 PGCCs 的形成, 这些细胞也被标记 eGFP 和 RFP。融合生成的 PGCCs 几乎占 PGCCs 总数的 10%~20% [7] [11]。

2.3.5. 核内复制

N Niu 等用 α -tubulin 与 eGFP 融合表达, histone-2B 与红色荧光蛋白(mCherry)融合和荧光泛素化细胞周期指标(FUCCI)标记卵巢癌细胞, 并利用活细胞成像技术对 PGCCs 的纺锤体和染色体动力学的时空变化进行了跟踪。他们发现, 用单剂量(500 nM)的 PTX 处理, 幸存下来的细胞形成了 PGCCs。而在单个 PGCCs 中观察到大量分裂的子核, 核膜在巨核和子核中都被检测到[5]。

2.3.6. JNK 和 Yorkie 通过抑制 CycB 促进核内复制

虽然化学药物可以诱导 PGCCs 形成, 但是 PGCCs 产生的分子机制还不清楚。Bojie Cong 等 [14] 前期研究发现在果蝇的上皮细胞中, 内吞基因 Rab5 突变导致细胞核扩大。并发现“肿瘤抑制因子”(neoplastic tumor-suppressors)基因, 如 Rab5、VPS2、erupted (ept)或 avalanche (avl)导致 PGCCs 的产生 [14]。Rab5 缺陷细胞的遗传分析表明 JNK 和 Yorkie 的协同激活, 通过内源复制产生多倍体巨细胞。分子机制: Yorkie 上调 Diap1, Diap1 与 JNK 协同下调 G2/M 细胞周期素 CycB, 从而诱导内复制。有趣的是, 由 RAS 激活和细胞极性缺陷诱导的恶性肿瘤也由 PGCCs 组成, 这也是由 JNK 和 Yorkie 介导的 CycB 下调所产生。令人兴奋的是, 通过阻断内复制, 从这种恶性肿瘤中消除多倍体巨细胞, 强烈抑制肿瘤生长和转移[14]。

3. PGCCs 的巨细胞周期-不对称分裂

3.1. 巨细胞周期

细胞周期代表细胞内发生的一系列事件以精确地复制遗传物质并将其分配给子细胞。细胞周期的适当调节是真核生物正常发育和预防瘤变的最基本机制。最著名的细胞周期是有丝分裂, 包括 DNA 合成期(S)、中间间隙期(G)和分裂期(M), 将复制的 DNAs 分布到两个相同的子细胞。然而, 在正常的发育和器官形成过程中, 细胞可以通过核内复制细胞周期: 只有 S/G 期, 没有有丝分裂, 或者进入有丝分裂, 但不能完成胞质分裂[5] [11]。通过核内复制细胞周期进行持续的 DNA 复制必然导致多倍体基因组和细胞体积的增加, 从而产生单核或多核的巨细胞。核内复制细胞周期在果蝇和植物发育中起着重要作用, 包括巨核细胞、肝细胞和胎盘在内的几种哺乳动物细胞、器官[5]。N Niu 等用 PTX 处理了卵巢癌细胞系 HEY、SKOV3 和 OVCAR433, 采用活细胞成像技术实时追踪染色体、纺锤体和细胞周期的动态, 最长

可达 31 天。数据表明, 使用 PTX 处理的癌细胞可以进入一种缓慢的自我更新状态, 并形成 PGCCs, 然后恢复到非多倍体生长[5]。

PGCCs 的增长和分裂涉及到一个多步骤的程序过程, 称为巨细胞周期, 有四个明显但重叠的阶段, 起始阶段, 自我更新阶段, 终止阶段和稳定阶段, 通过这个过程, PGCCs 产生新的癌症起始细胞[5] [11]。巨细胞周期的 1) 起始阶段, 失败的有丝分裂/胞质分裂激活了核内复制, 使细胞逃避衰老/凋亡; 2) 自我更新阶段, 多倍体细胞自主生长, 发育成卵裂球致密融合样、桑葚胚样和囊胚样的结构, 并产生内细胞群样的干细胞。3) 终止阶段, 多倍体生长结束, 内细胞群样干细胞芽生出小型胚胎样干细胞。4) 稳定阶段, 这些在不同发育层次捕获而获得了遗传、表观遗传突变的干细胞将逐渐获得有丝分裂的能力, 达到稳定的二倍体核型, 并发展成不同级别的肿瘤细胞(肿瘤异质性), 包括生殖细胞瘤。

去分化的程度根据刺激类型、刺激持续时间和细胞类型而不同: 巨细胞周期的时间越长, 结果越接近细胞的原始阶段, 更大层面上发展潜力成不同级别、类型的肿瘤[1]。巨细胞周期可能代表了一种基本的细胞机制, 以启动基因组重组, 并产生新的肿瘤起始细胞, 以应对化疗引起的刺激, 并导致疾病复发[5]。

3.2. PGCCs 细胞周期缓慢

EIF-2 α 是在缺氧微环境中蛋白质翻译的关键因素, 在普通卵巢癌 HEY 和 SKOv3 细胞中高表达, 而在 CoCl₂ 诱导的 PGCCs 中表达显著降低, 表明 PGCCs 蛋白合成率降低, 即 PGCCs 周期缓慢[4]。为了进一步描述 PGCCs 周期性, S Zhang 等将 PGCCs 荧光染色 PKH26 (通常在快速分裂的细胞中快速丢失)。他们在体外和体内监测了来自 PGCCs 的子细胞。首先, PGCCs 和子细胞被 PKH26 染色并观察了 5 天。PGCCs 在第 5 天展示了持续的荧光, 而在子细胞中, 荧光基本消失。进一步使用 nocodazole (一种细胞周期抑制剂)来抑制子细胞的生成, 荧光 PKH26 染色在第 10 天之后仍然保持在 PGCCs 中。在体内, 裸鼠皮下注射 3000 个染色 PKH26 的 PGCCs, 并在注射 28 天后观察肿瘤冰冻切片。在肿瘤组织中观察到一些带有红色荧光的 PGCCs, 但大多数肿瘤细胞已经失去了荧光, 证明了 PGCCs 在体内周期缓慢[7]。

3.3. 细胞周期蛋白

PGCCs 的形成涉及到细胞周期调节蛋白的失调。蛋白质激酶的表达, 包括磷酸化的 AKT (p-AKT(Thr308))、蛋白质激酶 C (PKC)、磷酸甘氨酸激酶 1 (PGK1)、p38 和有丝分裂激活蛋白激酶(MAPK), 在使用 CoCl₂ 处理前后不同。HEY-PGCCs 的 p-AKT (Thr308), PGK1 和 p38 的表达最高, 而 HEY 伴有出芽子细胞的 PGCCs 高表达 PKC 和 MAPK。在 SKOv3-PGCCs 中, PGK1 的表达高于对照细胞, 而对照 SKOv3 细胞的 p-AKT (Thr308)、PKC 和 MAPK 的表达则高于其 PGCCs。HEY 伴有出芽子细胞的 PGCCs 与对照细胞相比, TSG101, CDK6 和 Chk1 的表达水平更高, 而伴或不伴出芽的 PGCCs 的 c-myc、FOXM1、FBW7 和 cyclin A2 的水平比对照细胞要低。FOXM1 和 Chk2 在 SKOv3-PGCCs 和其对照细胞中显示了相反的模式[4]。S Zhang 等发现, cyclinE 和 cyclinD1 的表达在 HEY-PGCCs 比普通 HEY 细胞中明显升高, 伴有出芽的 HEYPGCCs 表达 CDK2 和 cyclin B1 最高。在 SKOv3 细胞中, CDK2 和 cyclinD1 的表达在 PGCCs 中增加, 但在 PGCCs 中, cyclinB1、cyclin E 和 CDK4 表达的水平比对照 SKOv3 细胞要低。这些结果表明, PGCCs 表达涉及细胞周期调节的蛋白质, 不同于亲代细胞[7]。Hongcheng Lv 等用 CoCl₂ 处理 HEY, WB 分析显示, PGCCs 比对照 HEY 相比上调 cyclin E、SKP2, 免疫细胞化学染色显示 PGCCs 比对照 HEY 相比上调 stathmin [12]。

此外, Hongcheng Lv 等[12]对 80 个石蜡包埋的浆液性卵巢肿瘤组织样本, 包括 21 例伴有转移瘤

的原发性癌(第一组)和相应的转移瘤(第二组), 26 例没有转移的原发性癌(第三组), 12 例交界性浆液性囊腺瘤(第四组)进行免疫组织化学染色, 发现 cyclin E、SKP2 和 stathmin 的表达水平随着卵巢肿瘤的恶性程度而增加, 且转移瘤的表达水平最高。N Niu 等发现有丝分裂相关的蛋白, 包括 stathmin、Histone 1.2、Histone 1.5、Aurora A 和 Aurora B, 在 PGCCs 中下调, 并在子细胞中重新表达, Cyclin D1 在 PGCCs 中有明显的上调, 在 HEY、SKOV3 和 OVCAR433 卵巢癌细胞三种细胞系的子细胞中都显著下调, 证明在 PGCCs 中有丝分裂机制被关闭, 亲代巨细胞中分离出来的子代细胞中重新恢复有丝分裂[5]。

4. PGCCs 分裂方式

4.1. 不对称分裂(出芽)

PGCCs 通过不对称分裂产生子细胞, 这是一种被称为去多倍体化的分裂过程。细胞不对称分裂通常发生在低等真核生物、植物和病毒中, 包括分裂、出芽和类似于破裂样的分裂方式[2]。在 PGCCs 中有两种不对称的细胞分裂模式: 出芽和破裂, 可以单独或一起发生。出芽通常发生在 PGCCs 的分支上, 而包含多个细胞核的 PGCCs 的胞体通常破裂, 随后是大量小子细胞的释放[7]。

4.2. PGCCs 的 DNA 传输

S Zhang 等在 HEY、MDA-MB-231 和从人类卵巢癌原始培养中获得的 PGCCs 中, 通过 Hoechst 33342 染色以追踪 PGCCs 的分支, 观察到分支上的 DNA 运输, 并提出 PGCCs 的分支可以作为 DNA 传输的容器[5]。

5. PGCCs 功能

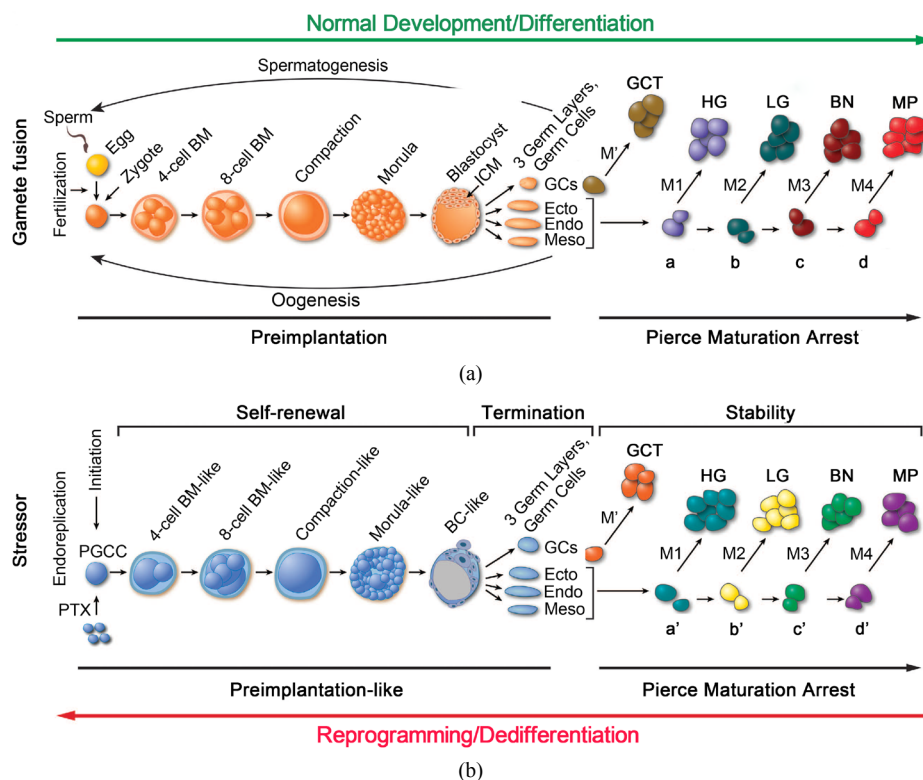
5.1. PGCCs 具备胚胎样干性

5.1.1. PGCCs 是卵裂球等价物

在胚胎植入前胚胎的卵裂球阶段, 由于失败的有丝分裂/细胞分裂和核内复制而导致的巨细胞形成是很常见的。通过光学显微镜、扫描电镜或三维共聚焦扫描显微镜观察, 从形态学上看, 来自 PGCCs 的早期球状体与卵裂球、多倍体卵裂球、卵裂球致密融合样胚胎、桑葚胚和囊胚等阶段的人类胚胎难以区分(图 1)。

在胚胎发生过程中, 单核或多核巨卵裂球通常被认为是由于频繁的有丝分裂/细胞分裂失败和核内复制, 而有丝分裂或细胞分裂失败可能代表一种正常的机制调节胚胎植入前胚胎的发育[1] [11]。

与卵裂球相似, PGCCs 可以向三个胚层分化。N Niu 等在卵巢癌细胞系 Hey 和 SKOV3 中研究了甲胎蛋白(AFP)、平滑肌肌动蛋白(SMA)和 β 3-tubulin(也称为 PAX6)的激活动力学, 分别是内胚层、中胚层和外胚层的标记物。在 Hey 细胞中, 从 PTX 处理的第一天开始, AFP 和 SMA 的 mRNA 水平增加, 在第 21 天达到顶峰, 在第 28 天减少, 这时 PGCCs 衍生的子细胞已经形成。相比之下, 在此期间, PAX6 的 mRNA 水平保持相对不变。这三种标记的蛋白质水平, Hey-PGCCs 表达最高, 而 Hey-PGCCs 子细胞要比普通 Hey 高得多。与普通 SKOV3 和子细胞相比, 在 SKOV3 的 PGCCs 中, SMA 和 β 3-tubulin 的蛋白质水平更高。然而, 在 SKOV3 的 mRNA 或蛋白质水平上, AFP 的表达没有变化。故 N Niu 等提出 PGCCs 代表的是卵裂球等价物, 这是迄今为止报告的最原始的癌症干细胞, 这揭示了一种体细胞中进化上保守的古老的胚胎程序, 可以被去抑制为肿瘤发生, 这也为癌症的起源和疾病的复发提供了一个新的范例[1]。



a. 胚胎发生过程。BM: 卵裂球, ICM: 内细胞团, GCs: 生殖细胞, Ecto: 外胚层, Endo: 内胚层, Meso: 中胚层, GCT: 生殖细胞肿瘤, M'和 M 分别代表胚胎或成体发育过程中生殖细胞和体细胞获得的不同遗传/表观遗传突变, a、b、c 和 d 代表正常发育中的不同层次, HG: 高级别肿瘤, LG: 低级别肿瘤, BN: 良性肿瘤, MP: 化生; b. PTX 引起有丝分裂失败后, 体细胞发起核内复制以生成 PGCCs, 而后成长为卵裂球样, 卵裂球致密融合样胚胎和桑葚胚, 然后分化成结构形态类似于含有内细胞团的囊胚, 再到三胚层和生殖细胞谱系, 即 PGCC 在 PTX 的刺激下, 通过体细胞的去分化诱导卵裂球介导的肿瘤发生, 模拟胚胎发生过程, 生殖细胞和原始干细胞在不同的发育层次停止生长, 产生生殖细胞肿瘤(GCTs)和恶性程度不同的体细胞肿瘤。a'、b'、c'和 d'对应于应激诱导去分化后的发育层次。(图片引自 Niu N 等. *Oncogene*, 2017, 36(34): 4887-4900 [1])

Figure 1. The blastomere model of the origin and recurrence of cancer

图 1. 癌症起源与复发的卵裂球模型示意图

在胚胎发生过程中, 单核或多核巨卵裂球通常被认为是由于频繁的有丝分裂/细胞分裂失败和核内复制, 而有丝分裂或细胞分裂失败可能代表一种正常的机制调节胚胎植入前胚胎的发育[1] [11]。

与卵裂球相似, PGCCs 可以向三个胚层分化。N Niu 等在卵巢癌细胞系 Hey 和 SKOV3 中研究了甲胎蛋白(AFP)、平滑肌肌动蛋白(SMA)和 β 3-tubulin(也称为 PAX6)的激活动力学, 分别是内胚层、中胚层和外胚层的标记物。在 Hey 细胞中, 从 PTX 处理的第一天开始, AFP 和 SMA 的 mRNA 水平增加, 在第 21 天达到顶峰, 在第 28 天减少, 这时 PGCCs 衍生的子细胞已经形成。相比之下, 在此期间, PAX6 的 mRNA 水平保持相对不变。这三种标记的蛋白质水平, Hey-PGCCs 表达最高, 而 Hey-PGCCs 子细胞要比普通 Hey 高得多。与普通 SKOV3 和子细胞相比, 在 SKOV3 的 PGCCs 中, SMA 和 β 3-tubulin 的蛋白质水平更高。然而, 在 SKOV3 的 mRNA 或蛋白质水平上, AFP 的表达没有变化。故 N Niu 等提出 PGCCs 代表的是卵裂球等价物, 这是迄今为止报告的最原始的癌症干细胞, 这揭示了一种体细胞中进化上保守的古老的胚胎程序, 可以被去抑制为肿瘤发生, 这也为癌症的起源和疾病的复发提供了一个新的范例[1]。

5.1.2. PGCCs Xist 表达缺失

胚胎干性的另一个公认特征是 Xist 表达缺失, Xist 基因的非编码性 RNA 是哺乳动物细胞中 X 染色体失活过程的关键性起始物, Xist 表达通常与体细胞的分化状态有关。N Niu 等发现 Xist 表达在紫杉醇

处理的卵巢癌细胞系 Hey 和 MDA-HGSC-1 形成的 PGCCs 中丢失, 并在 PGCCs 衍生的子细胞中重新获得, 进一步支持 PGCCs 获得胚胎干性[1]。

5.1.3. PGCCs 干细胞标记的表达

N Niu 等[1]将卵巢癌细胞系(HEY、SKOV3 和 MDA-HGSC-1)采用 PTX 诱发有丝分裂的失败。在第 7 天(球状体第 1 天(sD1)), PGCCs 用三维(3D)培养, 或者转移到干细胞培养基中, 以生长成球状体。从 sD1 到 sD21, 球状体在不同的时间点被收集, 并固定用以免疫荧光和免疫组织化学染色(IHC)。在 sD14, 球状体被重新附着在盖玻片上, 并在分化培养基中培养 14 天。在 sD28, 细胞分化通过免疫荧光和 IHC 进行评估。在 sD1, 在 HEY-PGCCs 被转移到无血清干细胞培养基中培养超过 14 天。SSEA1 的表达在 sD1 被激活, 在 sD7 中被限制在核或胞质, 并在 sD14 减少。OCT4 表达在 sD3 激活, 并在 sD14, 在 PGCCs 核中被激活。SOX2 和 NANOG 的表达在 sD1 被激活。MDAHGSC-1 的 PGCCs 的 OCT4、NANOG、SOX2 和 SOX4 表达都有所增加。WB 表明, 在 HEY 衍生的 PGCCs 中, OCT4 和 NANOG 的表达是从 sD1 上调, 在 sD14 上达到顶峰, 在 sD21 当 PGCCs 开始出芽时几乎消失。在 HEY 衍生的 PGCCs 中, SOX2 的表达从 sD7 上调, 在 sD14 上达到峰值, 然后 sD21 在子细胞开始出现时略微减少。在 SKOV3 的 PGCCs 中也观察到类似的表达方式。

并且 N Niu 等[1]推理, 应该能够观察到化疗后患者的卵巢癌中进行的去分化。他们检查了在化疗前后获得的人类卵巢癌的配对标本。尽管化疗前的标本具有相对同质的细胞, 但化疗后的标本中 PGCCs 和具有巨大奇形核的细胞数量增加了。化疗后的标本中可以看到小的子细胞从一个 PGCC 出芽和在 PGCC 细胞质中的红细胞状胞体。出芽子细胞的细胞核区域比化疗前的癌细胞要小得多。在化疗后, 38 个样本中有 3 个 OCT4 呈阳性(在细胞质和细胞核中), 有 12 个 NANOG 呈阳性(主要在细胞质中), 有 17 个 SOX2 (主要是细胞核)呈阳性, 在化疗之前, 没有任何病例对 OCT4 或 NANOG 呈阳性, 38 个病例中只有 2 个 SOX2 是阳性的(主要在细胞质中)。在化疗后有三个病例观察到 YAP 的核定位。这些发现表明, 癌细胞在化疗后表现出胚胎干细胞标记的表达增加。而且在化疗前, Xist 在癌细胞和基质细胞的细胞核中强烈的表达, 但在化疗后 PGCCs 细胞核中大量丢失, 进一步支持了 PGCCs 获得胚胎干性的观念[1]。

5.2. PGCCs 可进行多向分化

5.2.1. PGCCs 的分化能力取决于 YAP 的核位置

YAP 是一种重要的 Hippo 途径蛋白, 它参与了干细胞和癌症发展的调节, 并负责肿瘤抑制途径细胞分裂失败诱导的激活。N Niu 等[1]研究了 YAP 在对 PGCCs 的干性和分化的调节中所起的作用。卵巢癌细胞系 Hey 用紫杉醇处理以后, 发现 YAP 主要位于 HEY 及其子细胞的细胞质中, 但主要集中在 PGCCs 的细胞核中。用多巴酚丁胺来处理 PGCCs, 它能抑制 YAP 核转录, 消除 YAP 的核定位。由 HEY 衍生的 PGCCs 可以分化成内胚层(由 AFP、c-Kit 和 CXCR4 表达标记)及类似于星形胶质细胞的细胞(由 GFAP 表达标记), 但是多巴酚丁胺抑制了这种分化[1]。

5.2.2. 多向分化

人类癌症由上皮癌细胞和多种良性细胞组成, 包括成纤维细胞、内皮细胞、肌上皮细胞、炎症细胞和红细胞共同形成基质。这些基质细胞在肿瘤生长、入侵和转移中起着重要作用, 它们可以为肿瘤细胞提供营养和氧气, 以促进癌症的生长, 然而, 目前尚不清楚的是, 上皮癌细胞系是否能够产生多种良性的基质细胞谱系[10]。PGCCs 表现出比传统癌干细胞具有更高的可塑性, 可分化成多种组织, 包括脂肪组织、软骨、骨和其他基质细胞或成纤维细胞[11]。

张诗武等发现, PTX 处理后乳腺癌细胞系 MCF-7 形成球状结构。他们将球状结构进行包埋进行组织

学检查,观察到多细胞结构,命名为器官样结构(COSs),与在患者观察到的分化良好的导管癌相似,包括乳头状、腺样和血管状。COSs的IHC对广谱细胞角蛋白呈阳性,波形蛋白呈阴性,确认了COSs的上皮性质。并对COSs进行了CD31和平滑肌肌动蛋白(SMA)IHC。虽然在乳头状结构中只有少数细胞对CD31阳性,但在腺样和血管状结构中观察到丰富的CD31阳性细胞。在腺样和血管状结构周围的细胞中也观察到SMA阳性染色,但在乳头状结构上表现得很弱。证明这些上皮细胞在接受PTX处理后,已分化成内皮细胞和肌上皮细胞以形成器官样结构。并通过组织形态以及血红蛋白的表达证明癌细胞也能产生红细胞[10]。

N Niu等[1]为了确定在体内从PGCCs衍生的球状体中发展出来的肿瘤性质,他们用PTX处理卵巢癌细胞系HEY,并将绿色荧光蛋白(GFP)-泛素标记的对照HEY细胞衍生的球状体(10000个细胞)和PGCCs衍生的球状体(1000个细胞)(这些细胞是在成球培养第7天sD7收集的)注射到严重联合免疫缺陷小鼠的皮下或睾丸。所有球状体都形成了皮下或睾丸肿瘤,但是PGCCs衍生的球状体形成1厘米的肿瘤需要更长的时间(60~120天比30天)。为了进一步确定生殖细胞的成熟程度,他们连续切片进行IHC。对照细胞起源的癌表现出高级别的形态学特征、角蛋白的弱表达以及没有生殖细胞标记SALL4和OCT4的表达。由PGCCs衍生的球状体引起的无性细胞瘤和胚胎性癌展示了SALL4染色,以及细胞角蛋白和OCT4不同强度的阳性。而且PGCCs起源的球状体形成一系列的肿瘤,包括无性细胞瘤、胚胎性癌,伴有骨骼肌分化的无性细胞瘤,高级别癌,高级别和低级别混合的癌以及良性肿瘤等。上述发现表明,PGCCs能够分化成原始的生殖细胞和广泛的上皮肿瘤谱,包括从高级别肿瘤到良性肿瘤。

此外,他们研究了由HEY衍生的PGCCs的分化能力。当PGCCs衍生的球状体在干细胞培养基中培养时,检测出了AFP、SMA和 β -tubulin的表达,当球状体在脂肪生成培养基中培养时可以观察到油红染色,在软骨形成培养基中培养时观察到软骨形成的标志,即硫酸软骨素,当球状体在成骨培养基中培养时观察到片状骨生成阳性信号[1]。

S Zhang等[7]通过小鼠实验做了进一步的验证。他们对裸鼠皮下注射了10,000个PGCCs,并用脂肪生成培养基培养。对形成的肿瘤进行组织学检查显示大量的脂肪组织与肿瘤细胞混杂在一起。脂肪分化通过FABP4免疫组织化学染色证实。这些细胞的人类起源是由人类特有的vimentin确认的。

在软骨形成介质中进一步培养了PGCCs和普通的HEY细胞。虽然普通的细胞没有明显的形态变化,但PGCCs形成了软骨球,Alcian Blue和PAS强烈染色。接下来,他们在五只裸鼠的肋骨附近皮下注射了软骨球,并皮下注射到另外五只裸鼠的腹腔内。五只肋骨附近皮下注射的裸鼠都表现出半透明的肿瘤结节,类似于注射部位附近的软骨。5只腹腔注射的裸鼠中有4个形成了实体肿瘤。组织学检查显示肿瘤组织内的骨样结构。骨样分化通过Safranin O/Fast Green染色得到证实。骨样组织对anti-eGFP也是阳性的,确认骨组织的人类起源。有趣的是,5个腹腔注射的老鼠中有一只形成直径为1~2毫米的小而松散的肿瘤组织。这些松散的组织HE染色显示了组织中心的软骨状组织,且对骨蛋白素(osteopontin)是阳性的,证明了PGCCs可以分化成软骨和骨骼[7]。

5.2.3. PGCCs 产生红细胞并共同形成血管生成拟态(VMs)以供应肿瘤快速生长

PGCCs可以在体内、外产生红细胞。张诗武[8]等用 CoCl_2 处理乳腺癌细胞系BT-549,发现PGCCs产生了红细胞,这些红细胞对血红蛋白 α 、 $\beta/\gamma/\delta/\epsilon$ 、 ζ 、 δ 和胎儿血红蛋白的免疫组化染色呈不同程度的阳性,证明了其红细胞的身份。当BT-549细胞被注射到裸鼠体内时,在裸鼠的异种移植肿瘤中,BT-549癌细胞的细胞质中发现了大量的红细胞。且对人类特有的抗血红蛋白 ϵ 免疫组化染色呈阳性,确认了红细胞的人类起源。为了进一步验证上述发现,他们处理了其他细胞系,包括MDA-MB-231、hras-转化的输卵管上皮细胞株FTE187SV40hT-Hras以及Phoenix细胞,并通过 CoCl_2 诱导的球状体来检查红细胞的

生成。在所有这些细胞系中可以清楚地观察到红细胞。此外，他们培养了人类的卵巢癌组织。高级别卵巢癌细胞体外培养 2 周后，培养基中癌细胞的涂片证实红细胞的存在。石蜡包埋切片的组织学检查还显示，红细胞在高级别卵巢癌细胞的细胞质中出现。此外，在癌细胞的细胞质和周围也可以看到多个圆形、红色的胞体。卵巢癌组织连续切片免疫组织化学染色表明这些胞体对血红蛋白 ζ 呈阳性但对胎儿血红蛋白是阴性的。综上表明，PGCCs 能激活胎儿和胚胎血红蛋白，并能在体外和体内产生红细胞，并进一步支持 PGCCs 可能有类似于干细胞的属性。由于这些胚胎和胎儿血红蛋白与成人血红蛋白相比，更容易从周围的微环境中获取氧气，它们的激活将提高这些细胞获得氧气的的能力并促进正常组织和肿瘤的生长[8]。此外，不同的细胞系有不同的血红蛋白表达模式，不同的血红蛋白有不同的氧气结合和释放能力[8]。这些数据表明，在癌组织中存在胚胎造血机制，特别是当这些组织处于环境压力下，如缺氧[8]。

血管生成是一种生理过程，涉及到从已有血管中新血管的生长。血管生成是生长和发育的一个正常而重要的过程，在伤口愈合和造粒组织中也是如此。血管生成通常被认为是为肿瘤生长的系统循环提供血液所必需的。特别是肿瘤，被认为是经历了最初阶段的无血管生长然后是血管生成或血管生成拟态 (VMs) 与内皮依赖性血管 (EVs) 相连以获得足够的血液和氧气供应来供应肿瘤生长、入侵和转移[3] [8]。

据报道，有三种肿瘤供应模式，包括内皮依赖性血管 (EVs)、马赛克血管 (MVs) 和血管生成拟态 (VMs)，在肿瘤生长的早期阶段，VMs 是主要的血液供应模式。随着肿瘤大小的增加，在 VMs 血管壁上排列的肿瘤细胞被内皮细胞所取代。在 VMs 和 EVs 之间有一个过渡，MVs 成为肿瘤的主要血液供应模式。最后，EVs 成为了血液供应的主要模式。这三种微循环模式代表了肿瘤生长的一系列阶段，即从 VMs 开始，到 MVs，最终导致 EVs，且这三者的转换是受低氧微环境调节的，缺氧可以激活一些与侵袭、转移相关的肿瘤基因，包括 EPO、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 VEGF 受体 Fit-139，使细胞变得更具侵入性并形成 VM [8]。VMs 是一种替代性的肿瘤微循环模式并且在某些高级别恶性肿瘤中存在，包括炎性乳癌、前列腺癌以及肝细胞癌。

由 HE、CD31IHC 和 PAS 双重染色的结果表明，在浆液性卵巢癌中有伴梭形内皮细胞的 EVs。梭形内皮细胞对 CoD31 是阳性的，且 EVs 基底膜对 PAS 染色是阳性的。VMs 通道壁是由肿瘤细胞和红细胞组成的，基底膜可能存在也可能不存在。CD31 阳性的 EVs 和 CD31 阴性的 VMs 结构在卵巢肿瘤组织中共存[9]。VMs 结构可以由 PGCCs 和它们新生的红细胞组成。红细胞状的胞体通常位于癌细胞和 PGCCs 的细胞质或其周围，且对血红蛋白抗体染色阳性。为了进一步验证 VMs 与人浆液性卵巢肿瘤的生物学行为之间的关系，Li Zhang 等[9]分析了 80 例石蜡包埋的浆液性卵巢肿瘤样本，发现转移瘤的 VMs 数量最多，而交界性浆液性囊腺瘤 VMs 的数量是最低的。统计分析表明，这些组之间的 VMs 数量差异具有统计学意义。而且，转移瘤的 PGCCs 的数量也是最多的，这与 Fei Fei 等[2]在乳腺肿瘤中的发现是一致的。这表明 PGCCs 和 VMs 结构的数量与恶性等级有关，而 Yang Qu 等在神经胶质瘤[3]以及 Dan Zhang 等在结直肠癌中[6]也有同样的发现。

缺氧在 VMs 的形成过程中也扮演着重要的角色。对缺氧的正常反应是刺激新血管的生长。缺氧可以激活一些入侵和转移相关的肿瘤基因，包括红细胞生成素、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 VEGF 受体 Fit-1，使细胞变得更具侵袭性，并在恶劣条件下形成 VMs 结构。这些 VMs 通道可与 EVs 连接，以获得充足的血液供应[8] [9]。更有侵略性的肿瘤比低级别的肿瘤需要更多的血液供应来支持它们快速的细胞生长。在恶性肿瘤中，VM 的形成与肿瘤转移呈正相关[8]。VMs 越来越被认为是血管生成的一种模式[3]。因此，这些数据可能解释了传统的抗血管生成疗法对癌症的无效，因为肿瘤细胞有能力直接生成红细胞并适应低氧微环境。了解癌细胞产生红细胞的详细机制，可能有助于设计有效的癌症治疗策略[8]。VM 的存在表明抗血管生成疗法的有效性较低。VM 的存在是预后不良的一个指标，因为在恶性黑色素瘤、间皮肉瘤

和肺泡横肌肉瘤患者中,有 VM 存在的患者 5 年存活率较低[8]。

6. 肿瘤干性

6.1. 甲基化组蛋白转移酶(EZH2)表达

EZH2 是一个组蛋白的赖氨酸 N-甲基转移酶,在胚胎形成过程中起着关键作用,在许多类型的肿瘤干细胞中也很重要, Li Zhang 等[9]在 PGCCs 中检测发现 EZH2 表达上调,并检查了它与人类浆液性卵巢肿瘤恶性等级的关系。他们对 80 例石蜡包埋的浆液性卵巢肿瘤样本进行了分析, EZH2 的阳性染色定位在肿瘤细胞和癌症相关的成纤维细胞 CAFs 的细胞核中。转移性癌细胞 EZH2 染色指数最高,而交界性浆液性囊腺瘤则是最低的,并显示出在浆液性卵巢肿瘤中 EZH2 随恶性程度增加而表达增加的趋势。

用荧光激活细胞分选术检查肿瘤干细胞标记 ALDH1、CD133 和 CD117 的表达,显示 ALDH1-FITC 表达在 HEY-PGCCs 比普通癌细胞高, CD133 和 CD117 表达在 HEY-PGCCs 而普通癌细胞未检测出,这表明 PGCCs 表达肿瘤干细胞标记物[1],这在紫杉醇处理的乳腺癌细胞系 MCF-7 中得到了同样的结论[10]。姚开泰团队采用流式分选 CD133⁺鼻咽癌细胞 CNE2,发现 CD133⁺CNE2 细胞中有部分细胞为 PGCCs,而 CD133⁻CNE2 的鼻咽癌细胞中则没有 PGCCs [15]。表明 PGCCs 肿瘤干细胞的其中一个类型。

6.2. 致瘤能力

S Zhang 等发现单个 PGCC 具有形成球状体的能力。他们连续稀释 PGCCs,在 24 孔板的每一个孔的基质胶中种 3~5 个 PGCCs。单一的 PGCCs 可以在基质胶中于接种后的第五天形成球状体。用石蜡包埋球状体然后免疫组织化学染色,它们对 CD44 和 CD133 是阳性的[7]。他们也发现 PGCCs 具有高致瘤性。他们通过连续稀释分离出单个 PGCC,并将其注入老鼠体内。由此产生的肿瘤被切除并进行组织病理学检查。与各自的对照组相比,注射 HEY、SKOv3 和 MDA-MB-231 的 PGCCs 形成的肿瘤表现出间叶细胞的变化。就致瘤性而言,注射了由单一 PGCC 形成的球状体的 6 只裸鼠均形成肿瘤;注射了 10 个 HEY PGCCs 的 4 只老鼠有 3 只形成了肿瘤,但是注射了 10 个普通细胞的 4 只老鼠没有形成任何肿瘤,注射 100 个普通细胞的 4 只老鼠有一只形成肿瘤,注射 1000 个普通细胞的 4 只老鼠有 2 只形成肿瘤。肿瘤的形成能力也在小鼠 NOD. CS17-Prkdc SCID 中得到进一步确定。在注射后的第 25 天,注射了一个 HEY PGCC 的 4 只老鼠中有 3 只形成肿瘤,相比之下,注射了 10 个普通细胞的 4 只老鼠中只有 1 只形成肿瘤,但是在注射了 100 个和 1000 个普通细胞的 4 只老鼠中有 4 只形成肿瘤。注射了一个 SKOv3 PGCC 的 12 只裸鼠中有 7 只形成肿瘤,注射了一个 MDA-MB-231 PGCC 的 12 只裸鼠中有 8 只形成肿瘤。因此,注射单一 PGCC 后的肿瘤形成率比注射 10 个、100 个或 1000 个对照普通癌细胞后的肿瘤形成率要高。

然而张诗武等[10]发现, PTX 处理 MCF-7 形成的 PGCCs 比对照 MCF-7 细胞明显失去致瘤性。他们对 6 周龄的雌裸鼠注射对照乳腺癌细胞系 MCF-7 和紫杉醇处理的 MCF-7 细胞(每组 5 只老鼠)。两个月后,接受 MCF-7 注射的小鼠肿瘤平均直径为 0.8 厘米。然而,接受紫杉醇处理的 MCF-7 注射的小鼠,只有 3 只在注射后 3 个月形成直径为 0.5 厘米的肿瘤结节,肿瘤在静止状态下持续 2 个月,没有进一步增长的迹象。对这些肿瘤的组织学检查显示,对照 MCF-7 形成的肿瘤有丰富的上皮和很少的间质,而由紫杉醇处理的 MCF-7 细胞形成的肿瘤上皮细胞密度显著减少,周围是丰富的细胞外基质和胶原蛋白。此外, MTT 实验分析显示,与对照细胞相比,紫杉醇处理后的 MCF-7 细胞生长速度有所下降, woun-scratch 方法显示 MCF-7 在紫杉醇处理后迁移能力下降。

6.3. 上皮 - 间质转化

上皮 - 间质转变(EMT)被认为与肿瘤干细胞样细胞的产生有关。上皮 - 间质转化(EMT)导致了主要的分子变化,包括上皮细胞标记的丢失和间质细胞标记的过度表达。张诗武等[4]将人类卵巢癌细胞系 HEY 和 SKOv3 用 CoCl_2 处理,将对照组的普通 HEY、SKOv3 与 PGCCs 和伴有出芽子细胞的 PGCCs 进行免疫组化及 Western blot 分析。与对照 HEY 和 SKOv3 细胞相比,单独的 PGCCs 和伴有出芽子细胞的 PGCCs 具有较低的细胞角蛋白表达和更高的 vimentin 表达。Western blot 分析表明,伴有出芽子细胞的 PGCCs 表达 Snail, Twist-2 和 Slug 最高。免疫组织化学染色证实,与 HEY 细胞系的对照细胞相比,PGCCs 有更高的 N-cadherin 和 claudin 的表达,另一种与 EMT 相关的蛋白质 ZEB1,在 HEY PGCCs 和对照 HEY 细胞中并没有显著的差异。这些结果表明,伴有出芽子细胞的 PGCCs 变成了间叶细胞样的,一种肿瘤干细胞样的表型。Fei Fei 等[2]将乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 用 CoCl_2 处理,用 Western blot 来比较在伴有出芽子细胞的 PGCCs、PGCCs 和对照乳腺癌细胞之间 E-cadherin、N-cadherin 和 vimentin 的表达水平,得出了同样的结论。此外,Fei Fei 等[2]对 167 例石蜡包埋的乳腺肿瘤组织样本进行了分析,样本包括伴有淋巴结转移的 52 例原发性乳腺癌(第一组)和相应的淋巴结转移性肿瘤(第二组),52 例没有转移的原发性乳腺癌患者(第三组),11 例良性乳腺病变患者(第四组)。E-cadherin ($P = 0.000$)、N-cadherin ($P = 0.000$)和 vimentin ($P = 0.000$)的表达在这四组中有显著差异。第二组 N-cadherin 和 vimentin 的表达水平最高,以及 E-cadherin 的表达水平最低。且 IHC 染色显示这些蛋白质的表达与乳腺肿瘤淋巴结转移有关。Dan Zhang 等[6]用 CoCl_2 处理结肠直肠癌(CRC)细胞系 LoVo 和 HCT116 并进 EMT 分析。Vimentin 在对照 LoVo 细胞中是阴性的,而在 PGCCs 中是阳性的,与对照细胞相比,E-cadherin 在 CoCl_2 处理后的 LoVo 细胞中表达下降,而 N-cadherin 正好相反。此外,Western blot 分析表明 LoVo 和 HCT116 细胞在 CoCl_2 处理后的 PGCCs 及出芽的子细胞中 EMT 相关蛋白(Twist、Slug 和 Snail)的表达水平增加。Dan Zhang 等[6]在石蜡包埋的结肠癌标本中也进行了 Vimentin 的免疫组织化学染色,结果表明,在高分化的结肠癌中是阴性的,而在中分化、低分化的结肠癌及间质中是阳性的。

7. 侵袭、转移

张诗武等[4]用 CoCl_2 处理 HEY 和 SKOv3 细胞系,所得 PGCCs 中上调最显著的两种蛋白质是以涉及入侵和基质重塑而著名的两种蛋白酶 cathepsin B 和 cathepsin D4。他们研究了在 PGCCs 和对照细胞中几种转移相关蛋白的表达。cathepsin B 在 HEY PGCCs 中表达最高。伴有出芽子细胞的 HEY PGCCs 表达 osteopontin、annexin A2、HMGB1 和 14-3-3 epsilon 最高。PGCCs 比其对照 HEY 和 SKOv3 细胞表达 integrin β 2 更高。此外,在 SKOv3 PGCCs 中,HMGB1 的表达要比对照细胞更高,对照 SKOv3 细胞中 Osteopontin 和 annexin A2 的表达略高于 PGCCs。此外,肿瘤组织的免疫组织化学染色显示来源于 HEY PGCCs 的肿瘤组织 cathepsin B 细胞质阳性,而大多数由注射对照 HEY 产生的肿瘤细胞 cathepsin B 细胞核阳性,这表明形成 PGCCs 可能涉及这些蛋白质的亚细胞定位的变化。

Dan Zhang 等[6]认为来自血管或淋巴管中的肿瘤栓子常由 PGCCs 和其子细胞形成的。由于子细胞具有较高的迁移和侵袭能力,伴有出芽子细胞的 PGCCs 可以侵入这些管腔形成肿瘤栓子。研究发现,在 27.45%高分化,50%中分化和 90.20%低分化的结肠癌组织间质中存在伴随出芽的 PGCCs。此外,卵巢癌间质中存在伴随出芽的 PGCCs 其预测淋巴结转移的准确率为 85.71% (18/21) [12]。

此外,多倍体巨细胞的产生对于果蝇恶性肿瘤的生长和侵袭也是至关重要的,此外,YAP 信号促进了小鼠肝多倍体细胞分裂和肿瘤的发生,并与人类肝细胞癌的发展有关[14]。以上数据表明,多倍体的形成可能是肿瘤起始、复发和转移的关键步骤。

8. PGCCs 产生的子细胞的特性

在 CoCl_2 处理结肠癌细胞系 LoVo 9 天后, 单个 PGCCs 产生了数百个子细胞, 细胞总数发生了明显变化。这些结果表明, PGCCs 利用高效的 DNA 复制和细胞分裂机制来实现快速的恶性增长[6]。为了确定 PGCCs 衍生的子细胞是否与普通亲代细胞不同, N Niu 等[1]发现, 用 PTX 处理卵巢癌细胞系 HEY 和 SKOV3 形成的 PGCCs 所产生的子细胞比普通细胞有更多的多倍体细胞、更低的总凋亡百分比, 而且子细胞的紫杉醇和长春新碱 IC50 值明显高于普通对照细胞, 即子细胞具有药物抗性。

Dan Zhang 等[6]认为 PGCCs 的子代细胞可以通过表达 EMT 相关蛋白来促进淋巴结转移, 他们提出 PGCCs 的子细胞比二倍体细胞表现出更强的迁移和侵袭能力。而 N Niu 等[1]认为子细胞的侵袭性比普通癌细胞小。他们发现 PGCCs 和子细胞都表现为 CK、间叶细胞标记 vimentin、fibronectin 和 N-cadherin, 以及上皮间质转化调控转录因子 Snail、Slug 和 Twist 2 的表达增加, 而且 β -catenin 的表达减少。在异种移植中也观察到上皮间叶细胞转变的形态学特征。来自普通癌细胞的肿瘤生长速度快于来自 PGCCs 衍生的子细胞的肿瘤。普通癌细胞衍生的肿瘤主要是上皮细胞形态, 而由子细胞衍生的肿瘤具有间质型细胞, 具有增加的异质性, 这表明子细胞增殖活性减低并通过上皮间质转化获得分化能力。

N Niu 等[5]通过光谱核型(SKY)分析发现, 由 PGCCs 衍生的子细胞获得新的癌基因组。与亲代 Hey 和 SKOV3 细胞相比, 在子细胞中出现了新的染色体重组, 包括缺失和易位。在子宫颈癌细胞中, 分析了 111 个中期, 100 个(90%)染色体数目低于母细胞, 染色体数目从 55 到 75 不等, 11 个(10%)染色体数目接近二倍体染色体, 染色体数目从 35 到 51 不等。详细的 SKY 分析显示, 亲代 Hey 和子细胞只共享 5 个染色体重排: del (1)、del (3)、t (7;17)、t (9;18)和 del (12)。除了这些常见的标记外, Hey 亲代细胞有 10 个染色体重排, 而 Hey 子细胞有 29 个。SKY 分析显示, 亲代 SKOV3 细胞有 2 个染色体重排, t (2;4)和 t (15;14;16), SKOV3 子细胞也有两种重排, t (4;X)和 t (15;14;11), 而亲代和子细胞共享 11 个染色体重组。这些数据表明, 子细胞获得了一种新的核型, 在巨细胞周期后发生了大量的基因组改变。

9. 讨论与展望

PGCCs 含有单个巨大核或多个细胞核, 基因组含量显著增加, 而且治疗后 PGCCs 的数量显著增加。虽然 PGCCs 多处于休眠期, 不能形成单克隆, 但是在体外培养过程中, 它仍然具备代谢活性, 并能形成单克隆。目前大多数临床前(细胞和动物模型)药物发现方法可能不考虑延迟反应与休眠 PGCCs 相关的可能性, 这就造成 PGCCs 暴露于抗癌药物后幸存下来进而促进转移和癌症复发[13]。最近的数据表明, 多倍体巨细胞癌(PGCCS)可能已经获得了激活早期胚胎样程序以应对致癌和治疗应激产生重新编程[11]。

在果蝇中抑制内复可以显著的抑制肿瘤生长和转移[14], 或许能成为靶向 PGCCs 治疗人恶性肿瘤转移和复发的一种策略。

总之, 可以认为 PGCCs 是疾病起源、治疗抵抗和转移的强大而邪恶的根源。当在慢性刺激下, 包括炎症、衰老或急性损害, 如放疗或化疗时, 体细胞可以通过多倍体的形成来启动胚胎发生机制并产生癌症。PGCCs 获得了高潜能干性, 这是一把双刃剑。虽然 PGCCs 的形成促进了恶性肿瘤或耐药癌细胞的产生, 但同时, 获得的胚胎干性使它们容易分化。因此, 能够阻止 PGCCs 起始和自我更新以及促进其向良性谱系再分化的药物, 可能成为未来的新治疗策略。PGCCs 代表了早期的体细胞起源的胚胎, 这应该为药物筛选提供一个新的平台[11]。在癌症治疗中, 对 PGCC 形成的抑制是很重要的。首先, 针对 PGCCs 形成的潜在治疗试剂可能抑制肿瘤细胞的增殖和转移。其次, 由于 PGCCs 具有癌干细胞的特性, 小分子抑制剂可用于诱导 PGCCs 的良性分化。

PGCCs 和及其产生的红细胞促进了 VM 的形成, 抑制生成红细胞的 PGCCs 的产生的化学试剂也可用于治疗恶性肿瘤, 特别是化疗和放疗后复发的肿瘤。最近, FDA 首批的针对癌症血管生成的疗法, 一

种针对 VEGF 异形体的单克隆抗体(商业名称阿瓦斯汀), 已经被批准与已建立的化疗结合用于结肠直肠癌。然而, 当肿瘤干细胞能够产生自己的血管时, 阿瓦斯汀无法抑制早期分化, 此外, 基于血管生成的肿瘤治疗药物, 如血管抑制素和抑制内皮细胞的内皮抑制素, 对显示 VM 的肿瘤几乎没有影响, 因为其缺乏内皮细胞。相信, 了解肿瘤的红细胞生成过程, 并评估胎儿血红蛋白和红细胞生成在癌症中的作用, 将有助于抗癌策略的发展。针对构成 VM 结构的肿瘤细胞和生成红细胞的 PGCCs 的治疗方法在未来可能会很有希望[8]。越来越明显的是, 在巨细胞能够促进肿瘤重新生长之前, 靶向巨细胞可能是对抗癌症的有效策略。可以利用代谢途径的药理学调节器来靶向巨型细胞, 另外, 已经证明诱导细胞凋亡的药物激活剂(例如水杨酸钠)会触发巨癌细胞的死亡[13]。

因此, 针对 PGCCs 治疗的药物开发, 可能在应对肿瘤复发和转移中发挥重要的治疗作用。

基金项目

国家自然科学基金, 81802945; 山东省自然科学基金, ZR2016HQ28。

参考文献

- [1] Niu, N., Mercado-Uribe, I. and Liu, J. (2017) Dedifferentiation into Blastomere-Like Cancer Stem Cells via Formation of Polyploid Giant Cancer Cells. *Oncogene*, **36**, 4887-4900. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.72>
- [2] Fei, F., Zhang, D., Yang, Z., et al. (2015) The Number of Polyploid Giant Cancer Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition-Related Proteins Are Associated with Invasion and Metastasis in Human Breast Cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **34**, 158.
- [3] Qu, Y., Zhang, L., Rong, Z., et al. (2013) Number of Glioma Polyploid Giant Cancer Cells (PGCCs) Associated with Vasculogenic Mimicry Formation and Tumor Grade in Human Glioma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **32**, 75.
- [4] Zhang, S., Mercado-Uribe, I., Hanash, S., et al. (2013) iTRAQ-Based Proteomic Analysis of Polyploid Giant Cancer Cells and Budding Progeny Cells Reveals Several Distinct Pathways for Ovarian Cancer Development. *PLoS One*, **8**, e80120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080120>
- [5] Niu, N., Zhang, J., Zhang, N., et al. (2016) Linking Genomic Reorganization to Tumor Initiation via the Giant Cell Cycle. *Oncogenesis*, **5**, e281. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2016.75>
- [6] Zhang, D., Yang, X., Yang, Z., et al. (2017) Daughter Cells and Erythroid Cells Budding from PGCCs and Their Clinicopathological Significances in Colorectal Cancer. *Journal of Cancer*, **8**, 469-478. <https://doi.org/10.7150/jca.17012>
- [7] Zhang, S., Mercado-Uribe, I., Xing, Z., et al. (2014) Generation of Cancer Stem-Like Cells through the Formation of Polyploid Giant Cancer Cells. *Oncogene*, **33**, 116-128. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.96>
- [8] Yang, Z., Yao, H., Fei, F., et al. (2018) Generation of Erythroid Cells from Polyploid Giant Cancer Cells: Re-Thinking about Tumor Blood Supply. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **144**, 617-627. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2598-4>
- [9] Zhang, L., Ding, P., Lv, H., et al. (2014) Number of Polyploid Giant Cancer Cells and Expression of EZH2 Are Associated with VM Formation and Tumor Grade in Human Ovarian Tumor. *BioMed Research International*, **2014**, Article ID: 903542.
- [10] Zhang, S., Mercado-Uribe, I. and Liu, J. (2014) Tumor Stroma and Differentiated Cancer Cells Can Be Originated Directly from Polyploid Giant Cancer Cells Induced by Paclitaxel. *International Journal of Cancer*, **134**, 508-518. <https://doi.org/10.1002/ijc.28319>
- [11] Chen, J., Niu, N., Zhang, J., et al. (2018) Polyploid Giant Cancer Cells (PGCCs): The Evil Roots of Cancer. *Current Cancer Drug Targets*.
- [12] Lv, H., Shi, Y., Zhang, L., et al. (2014) Polyploid Giant Cancer Cells with Budding and the Expression of Cyclin E, S-Phase Kinase-Associated Protein 2, Stathmin Associated with the Grading and Metastasis in Serous Ovarian Tumor. *BMC Cancer*, **14**, 576.
- [13] Mirzayans, R., Andrais, B. and Murray, D. (2018) Roles of Polyploid/Multinucleated Giant Cancer Cells in Metastasis and Disease Relapse Following Anticancer Treatment. *Cancers (Basel)*, **10**, 118. <https://doi.org/10.3390/cancers10040118>

-
- [14] Cong, B., Ohsawa, S. and Igaki, T. (2018) JNK and Yorkie Drive Tumor Progression by Generating Polyploid Giant Cells in *Drosophila*. *Oncogene*, **37**, 3088-3097. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0201-8>
- [15] Jiang, Q., Zhang, Q., Wang, S., *et al.* (2015) A Fraction of CD133+ CNE2 Cells Is Made of Giant Cancer Cells with Morphological Evidence of Asymmetric Mitosis. *Journal of Cancer*, **6**, 1236-1244. <https://doi.org/10.7150/jca.12626>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-9049, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: wjcr@hanspub.org