文章编号:1000-5404(2010)14-1529-05

论著

雷帕霉素联合嘧啶亚硝脲抑制 U87-MG 胶质瘤细胞增殖

杨鹏宇,张建生,李 强,丁永忠,任 军 (730000 兰州,兰州大学第二医院神经外科)

[摘要] 目的 探讨联合运用雷帕霉素及嘧啶亚硝脲(尼莫司汀)作用于人 U87-MG 胶质瘤细胞的效果及相互作用,并探讨其可能的机制。**方法** MTT 法检测雷帕霉素和尼莫司汀单药或联用抑制胶质瘤细胞增殖的效果并用改良寇式法计算各自的半数抑制浓度(IC_{50});等辐射法评价两药联合作用的相互关系;流式细胞术检测用药前后细胞周期分布和凋亡;吖啶橙及单丹(磺)酰戊二胺荧光染色检测细胞自噬;透射电镜观察细胞超微结构。**结果** MTT 检测显示单用或联合运用雷帕霉素及尼莫司汀均可抑制 U87-MG 胶质瘤细胞生长[雷帕霉素 IC_{50}为(0.726±0.063) μmol/L,尼莫司汀 IC_{50}为(26.900±2.300) μg/ml],等辐射法分析显示两药联合有协同效应;流式细胞术检测显示 ACNU 可诱导代表凋亡的亚 G_1 峰出现(20.6%),而 RAP 可诱导细胞发生 G_1期阻滞(64.8%),但无明显的亚 G_1峰,两药联合作用后 G_1期细胞比例明显增多(76.0%),亚 G_1峰也略有增加(27.5%);吖啶橙及单丹(磺)酰戊二胺荧光染色结果表明 RAP 可诱导细胞发生自噬,ACNU 则不明显,两药联用后自噬囊泡较单用 RAP 组明显增多;透射电镜可观察到两药联用后同一细胞内自噬体及凋亡同时出现。**结论** 雷帕霉素及尼莫司汀联合作用于人 U87-MG 胶质瘤细胞可起协同效应,抑制 U87-MG 胶质瘤细胞的生长及增殖。

[关键词] 雷帕霉素;尼莫司汀;自噬;胶质瘤
[中图法分类号] R73-361;R730.264;R979.1 **[文献标志码]** A

Rapamycin combined with nimuatine suppresses growth and proliferation of human U87MG glioma cells

Yang Pengyu, Zhang Jiansheng, Li Qiang, Ding Yongzhong, Ren Jun (Department of Neurosurgery, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of combining use of rapamycin (RAP) and ACNU (nimuatine) on human glioma cell line U87-MG and their interaction. **Methods** Modified Karber's method was used to test the lethal dose 50% (IC_{50}) of RAP or ACNU to U87-MG cells. Then the cells were divided into control group, RAP groups (0.01, 0.1, 1, 10 or 100 μmol/L), ACNU groups (0.1, 1, 10, 100 or 1 000 μg/ml), and combining groups (ACNU at above doses combined with RAP 1/4, 1/2 or 3/4 IC_{50}). Cell vitality of different groups was determined by MTT assay. The combined effect of RAP plus ACNU in inhibition of U87-MG cells was analyzed by isobolographic analysis. Cell cycle and apoptosis of U87-MG cells were evaluated by flow cytometry. Acridine orange and MDC staining were conducted to detect the autophagy of U87-MG cells. Ultrastructure of the cells was observed by transmission electron microscopy. **Results** As MTT assay showed, the tumor cell survival rate was inhibited significantly afer treatment of rapamycin alone or plus ACNU. IC_{50} was 0.726±0.063 μmol/L in the RAP group, and 26.9±2.3 μg/ml in the ACNU group. Isobolographic analysis demonstrated that RAP and ACNU in combination had a synergistic effect during treatment. Although ACNU significantly induced apoptosis in U87-MG cells when compared with control group, no significant apoptosis was found in RAP groups. In RAP group, cells were arrested in G_1 phase. More apoptosis cells and cells arrested in G_1 phase were detected in combining RAP and ACNU group. Staining of acridine orange and MDC demonstrated that RAP induced autophagy alone, which was enhanced by ACNU treatment. Autophagosomes and apoptosis were found in combining groups by transmission electron microscopy. **Conclusion** RAP and ACNU had synergistic interactions in suppressing the growth and proliferation of U87-MG cells.

[Key words] rapamycin; nimuatine; autophagy; glioma cells

Corresponding author, Zhang Jiansheng, Tel: 86-931-8942755, E-mail: drzhang0931@163.com

[通信作者] 张建生,电话:(0931)8942755,E-mail:drzhang0931@163.com

胶质瘤是最常见的颅内原发肿瘤。目前,胶质瘤的标准治疗方案是手术治疗加放疗,但是恶性胶质瘤患者的平均生存期 < 1 年,2 年生存率不超过20%[1]。尼莫司汀[alkylating agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea, ACNU]属于亚硝基脲类化疗药,易透过血脑屏障,能使胶质瘤细胞 DNA 烷基化,是临床较常使用的治疗颅内恶性胶质瘤的化疗药物。但其抗药性的产生以及严重的副作用使得临床上单用亚硝脲类药物治疗胶质瘤受到很大的限制。

雷帕霉素(rapamycin,RAP)是一种抗真菌的大环内酯类抗生素,它是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)的特异性抑制剂。近年来国外越来越多的研究表明 mTOR 抑制剂及其衍生物对肝癌、胰腺癌、泌尿系肿瘤及神经胶质瘤具有显著的抗肿瘤效应,部分已进入Ⅲ期临床试验[2]。本研究运用雷帕霉素联合尼莫司汀联合作用于人 U87-MG 胶质瘤细胞,研究两药联用能否抑制肿瘤细胞生长及增殖,并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及实验分组

人脑胶质瘤细胞系 U87-MG 购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液中,置于 37 ℃、体积分数为 5% 二氧化碳细胞培养箱中培养,每 1 ~ 2 天换液 1 次。待细胞铺满培养瓶底 90% 后,以消化液(含质量浓度为 0.25% 胰蛋白酶和 0.05% EDTA)消化,1∶2比例稀释、培养。实验分 4 组:①对照组;②雷帕霉素组(分为 10 nmol/L,100 nmol/L,1 μmol/L,10 μmol/L,100 μmol/L 5 个浓度);③ACNU 组(分为 100 ng/ml,1 μg/ml,10 μg/ml,100 μg/ml,1 mg/ml 5 个浓度);④联合组(试验性地将不同浓度的 ACNU 与 RAP 1/4 IC_{50},1/2 IC_{50},3/4 IC_{50} 剂量联用)。

1.2 MTT 法检测细胞活性等辐射法分析两药对肿瘤细胞的相互作用

采集对数生长期的 U87-MG 细胞,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔加入上述细胞悬液 200 μl,置于 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度培养箱继续培养,培养 24 h 后,按照分组浓度分别给药,每组均设 8 个平行孔。对照组加 200 μl 含与 RAP 相应浓度的 DMSO 的培养液,空白对照组加 200 μl 培养液,加药后 48 h 常规行 MTT 法测定各孔光吸收密度值,并计算细胞生长抑制率。用改良寇式法分别计算 RAP 及 ACNU 的半数抑制浓度(IC_{50}),然后分别测定 RAP 1/4、1/2、3/4 IC_{50} 剂量与不同浓度 ACNU 联合作用于 U87-MG 胶质瘤细胞时的 IC_{50},用等辐射分析法[3]分析 RAP 和 ACNU 的相互作用,将把 RAP 单用的 IC_{50} 标在 X 轴上,ACNU 单用的 IC_{50} 标在 Y 轴上,两点相连即为相加线,并把两药合用的 IC_{50} 标在坐标轴上,并标上其 95% 可信区间。根据位置可判断其相互作用,如联用时的 IC_{50} 落在相加线的左侧,则两药为协同效应,如落在相加线右侧则两药为拮抗作用,如落在相加线上,则为相加作用。

1.3 流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡率

取对数生长期的 U87MG 胶质瘤细胞,分别按上述分组及药物浓度处理 48 h 后,消化液消化、收集单细胞悬液,磷酸盐缓冲液冲洗 2 次,-20 ℃预冷的 70% 乙醇固定,过夜。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,1 ml 磷酸盐缓冲液重悬,按照周期流式细胞分析试剂盒产品说明(BD 公司,美国)标记细胞;Annexin V/碘化丙啶(BD 公司,上海)染色后使用 FACSCalibar(BD 公司,美国)流式细胞仪分别检测细胞周期分布和细胞凋亡,每组试验重复 3 次。

1.4 吖啶橙染色检测细胞自噬

吖啶橙是一种荧光染料,可以自由的穿过生物膜。吖啶橙在酸性细胞组件中聚集,产生亮的红色荧光,在自噬溶酶体内酸性磷酸酶活性增强时显著着以亮红色荧光[4]。取对数生长期 U87MG 细胞,细胞浓度为 1×10^4 ml,接种于 24 孔板,次日加药,浓度如实验分组中所述,在给药 48 h 后用含吖啶橙(1 μg/ml)的新鲜培养基于 37 ℃、5% CO_2 孵育 15 min,用冰冷的 PBS 洗涤 2 次,于倒置荧光显微镜下观察、摄片。

1.5 单丹(磺)酰戊二胺(monodansylcardeverine,MDC)荧光染色检测自噬囊泡

MDC 染色法是一种可在分子水平分析自噬发生机制的特异性检测方法[4]。取对数生长期 U87-MG 细胞,细胞浓度为 1×10^4 ml,接种于 24 孔板,次日加药,浓度如实验分组中所述,加药 48 h 后用含 MDC(50 μmol/L)的新鲜培养基于 37 ℃、5% CO_2 孵育 10 min,PBS 洗涤 2 次,于倒置荧光显微镜下观察、摄片。

1.6 透射电镜观察细胞超微结构

常规培养于 100 ml 培养瓶中的 U87-MG 胶质瘤细胞,细胞铺满培养瓶底 80% 后分别加入 RAP 及 ACNU,于用药后 48 h 低浓度消化液消化,4 ℃预冷的 PBS 冲洗 1 遍,弃上清,加入 0.5% 戊二醛 4 ℃固定 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 3% 戊二醛固定,1% 四氧化锇 4 ℃固定 1 h,丙酮逐级脱水,Epon812 包埋,半薄切片光学定位,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色,透射电镜下观察、摄片。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 MTT 法检测用药后 U87MG 细胞增殖及 IC_{50}

MTT 检测结果显示,不同浓度的 RAP 及 ACNU 对体外胶质瘤 U87-MG 细胞的生长均有明显的抑制作用,应用改良寇式法计算得出单用 RAP 的 IC_{50} 为(0.726 ± 0.063)μmol/L,单用 ACNU 的 IC_{50} 为(26.9 ± 2.3)μg/ml,分别检测用 RAP 1/4、1/2、3/4 IC_{50} 剂量与不同浓度 ACNU 联合作用于 U87-MG 胶质瘤细胞时的 IC_{50}(依次用点 A、B、C 表示),用等辐射法分析 RAP 和 ACNU 的相互作用并绘图(图 1)。由图 1 可见,随着 RAP 剂量的逐渐上升,ACNU 的 IC_{50} 逐渐呈非线性下降,单用和联用 RAP 1/4、1/2、3/4 IC_{50} 剂量时 ACNU 的 IC_{50} 分别为:(26.9 ± 2.3)、(19.5 ± 1.7)、(6.52 ± 0.32)、(2.63 ± 0.18) μg/ml。联合用药组中 A 点位于相加线的 95% 可信区间内,而 B 点和 C 点与相

加线的95%可信区间不重叠且位于其左侧。

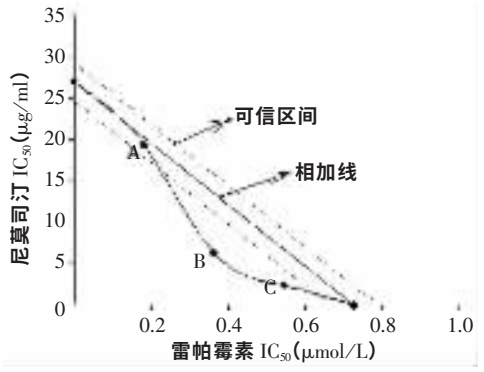


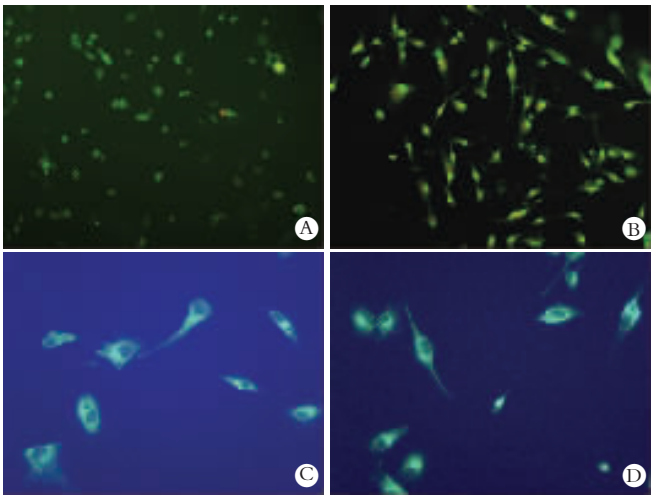
图 1　雷帕霉素-尼莫司汀的相互作用

2.2　流式细胞术检测细胞周期分布及凋亡率

流式细胞仪分析细胞周期发现，与 U87-MG 细胞对照组相比，RAP 组细胞 G_1 期为 64.8%，较对照组细胞(51.6%)明显上升，而 RAP 组细胞 S 期(29.8%)及 G_2/M 期(5.4%)比例较对照组(S 期 38.8%，G_2/M 期 9.6%)则明显下降。RAP 与 ACNU 联合组 G_1 期为 76.0%，明显高于单用 RAP 组，S 期(18.8%)及 G_2/M 期(5.2%)均低于对照组相应比例。联合组与 ACNU 组相比，sub-G_1 期细胞略有升高(联合组为 27.5%，ACNU 组为 20.6%)，联合组与 RAP 组相比，G_1 期比例明显上升，S 期及 G_2/M 期比例均有所下降。

2.3　吖啶橙染色及 MDC 染色检测细胞自噬

U87-MG 对照组吖啶橙活细胞染色显示，在细胞质中无明显的荧光颗粒的聚集，细胞质中不存在明显的自噬囊泡(AVs)。细胞经 ACNU 处理48 h，可见有少量 AVs 出现。随着 RAP 浓度逐渐增加，细胞中荧光颗粒也随之增加，浓度为 1 μmol/L 时大量细胞死亡脱落，仅存的少数细胞质中 AVs 明显。ACNU 与不同浓度的 RAP 联合作用 48 h，细胞质中荧光颗粒明显增加，AVs 大量出现，并与 RAP 的浓度成剂量依赖关系。对比相应的 RAP 不同浓度单药作用，双药联合作用效果明显增强(图 2)。



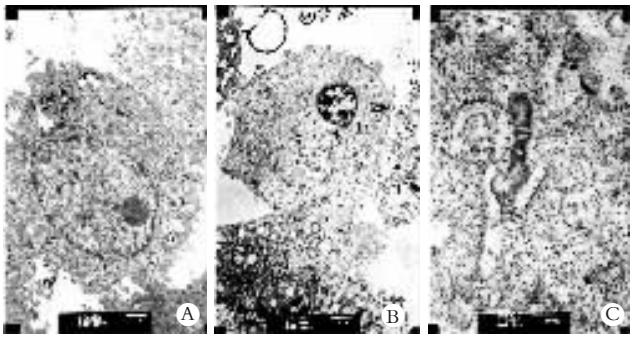
A：对照组(吖啶橙 ×40)；B：联合组(吖啶橙 ×40)；C：对照组(MDC ×100)；D：联合组(MDC ×100)

图 2　吖啶橙及 MDC 荧光染色观察用药后细胞自噬

U87-MG 对照组行 MDC 活细胞染色显示，在细胞质中没有明显荧光颗粒的聚集，细胞质中不存在明显的自噬囊泡。细胞经 ACNU 处理48 h，细胞质中荧光颗粒也很少。随着 RAP 浓度逐渐增加，细胞中荧光颗粒也逐渐增加，荧光强度增强。ACNU 与不同浓度的 RAP 联合作用 48 h，随着 RAP 的浓度增加细胞质中的荧光颗粒明显增加，荧光强度逐渐增强，提示自噬囊泡大量出现，对比对应浓度的 RAP 单药作用，MDC 染色的荧光颗粒明显增多(图 2)。

2.4　透射电镜观察细胞超微结构

对照组的 U87-MG 细胞，细胞核大而不规则，核仁明显，染色质分均匀，核膜清晰，细胞质内可见线粒体、粗面内质网、核糖体等细胞器，细胞膜不规则，表面有丰富的微绒毛。ACNU 处理的 U87-MG 细胞(图 3)可观察到微绒毛明显减少，胞膜皱缩，细胞核固缩，核仁碎裂，但细胞膜仍保持完整，呈典型的凋亡细胞形态。RAP 处理组见图中央为线粒体，左右两侧为包绕尚未降解的细胞器的自噬体(图 3)。



A：对照组(×5 000)；B：ACNU 诱导凋亡组(×3 000)；C：RAP 诱导自噬组(×40 000)

图 3　透射电镜观察用药后细胞超微结构

3　讨论

肿瘤的分子靶向治疗成为近年来的研究热点[5]。mTOR 是细胞生长和增殖的关键调控因子，它是细胞的生长、分裂、存活、迁移、自我更新和细胞周期进程等生理过程的中心调控器。mTOR 的下游效应器包括真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 1(the eIF4E-binding protein 1，4E-BP1)和核糖体蛋白 S6 激酶(ribosomal protein S6 kinases，S6Ks)。这两条信号通路控制着真核生物的翻译起始并编码细胞周期蛋白 D1、细胞周期依赖蛋白 CDK 等。mTOR 抑制剂可抑制上述两条信号通路而导致细胞周期阻滞发挥其抗肿瘤作用[6]。mTOR 抑制剂雷帕霉素具有抗肿瘤活性，已应用于大鼠胶质瘤细胞[7]，但因其具有复杂的免疫抑制作用国内集中用于器官移植后的抗排斥反应[8]及药物洗脱支架。近年来，随着人们对 mTOR 信号通路研究的深入和对雷帕霉素及其衍生物抑制多种肿瘤的基础及临床研究进展，应用 mTOR 抑制剂治疗胶质瘤有

望成为一条新的临床治疗胶质瘤的有效途径。

为降低肿瘤细胞耐药性的产生及减少毒副作用，我们联合运用雷帕霉素和ACNU作用于U87-MG胶质瘤细胞，并用等辐射分析法判断两药的相互作用，结果发现，随着雷帕霉素剂量的上升，ACNU的IC_{50}逐渐呈非线性下降，与单用ACNU相比，联用RAP 1/4、1/2、3/4 IC_{50}剂量后ACNU的IC_{50}分别下降了28%，76%，90%。由图1可见，联合用药组三点，A点位于相加线的95%可信区间内，表明两药在此浓度范围有相加效果，而B点和C点与相加线的95%可信区间不重叠且位于其左侧，提示两药联用有较明显的协同效应。国外Tanaka等[9]2007年应用雷帕霉素联合盐酸尼莫司汀作用于胶质瘤细胞U-251MG模型裸鼠，发现联合用药组胶质瘤细胞生长及增殖的抑制效应更显著，而裸鼠肿瘤模型的中位生存期也从单一治疗组的23.4 d上升至30.5 d，具有显著的统计学意义。这与我们在试验中得出的结论是一致的。另外，Goudar等[10]将雷帕霉素衍生物RAD001和EGFR和VEGFR双重酪氨酸激酶抑制剂AEE788联合作用于D54MG胶质瘤细胞，发现联合用药可明显抑制肿瘤细胞生长及增殖。联合用药组胶质瘤模型鼠的中位生存期明显高于单用AEE788组或单用RAD001组。Takeuchi等[11]的研究证实，将雷帕霉素与mTOR的上游调节分子PI3K/Akt抑制剂分别联合运用，可显著致敏雷帕霉素介导的细胞自噬，并有放射增敏作用。由此可见，mTOR抑制剂雷帕霉素或其衍生物可与其他药物或其他治疗方式联合作用有效地抑制肿瘤细胞的生长和增殖。

近年国外研究发现，应用mTOR抑制剂可使胶质瘤细胞发生G_1期细胞阻滞，从而发挥显著的抗肿瘤效果。2007年Hjelmeland等[12]研究发现，应用mTOR抑制剂RAD001 72 h后可检测到胶质瘤G_1期细胞数量明显增加，而S期、G_2期及M期等细胞周期的细胞数均可见减少，得出结论mTOR抑制剂RAD001可诱导胶质瘤细胞发生G_1期细胞阻滞，从而抑制肿瘤的生长。我们在研究中发现，与对照组相比，单用雷帕霉素可明显增加U87-MG胶质瘤G_1期细胞所占百分比，而与ACNU联用后，这种G_1期细胞阻滞作用更加显著，且两药联用后亚G_1期细胞数量也明显增加。因此我们可推断两药可通过诱导G_1期细胞阻滞和增加亚G_1期细胞数量两条途径协同抑制U87-MG胶质瘤细胞的增殖。

我们同时发现，单用雷帕霉素仅能诱导胶质瘤细胞发生G_1期阻滞，对代表细胞凋亡的亚G_1峰几乎没有影响，由此推断，雷帕霉素可能并不是通过诱导细胞凋亡发挥其抗肿瘤作用。Bogler等[13]认为恶性胶质瘤细胞本身对凋亡有抵抗，药物对胶质瘤的治疗很可能通过其他非凋亡如细胞自噬等机制而达到抗肿瘤效果。Kanzawa等[14]的研究发现，目前已普遍应用于临床的新型胶质瘤化疗药替莫唑胺，也是通过诱导胶质瘤细胞发生自噬，而不是诱导其凋亡而发挥其抗肿瘤作用。

自噬又称Ⅱ型程序性死亡，是指细胞通过单层或双层膜包裹细胞质内待降解物形成自噬体，然后运送到溶酶体形成自噬溶酶体并进行多种酶的消化及降解，以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新的过程[15]。自噬过程对维持细胞的自身稳态有重要意义，同样，在某些肿瘤疾病中，诱导肿瘤自噬可明显抑制肿瘤生长及增殖。我们在实验中用吖啶橙染色及MDC染色检测结果发现，单用雷帕霉素能够诱导U87-MG胶质瘤细胞中出现酸性囊泡样细胞器，且随雷帕霉素剂量的增加，荧光颗粒的量逐渐增加，两药联用后增加更加明显。上述结果提示，雷帕霉素与ACNU联合作用于U87-MG胶质瘤细胞增加了酸性囊泡样细胞器（自噬泡）的形成。而自噬泡的形成是自噬性细胞死亡的主要特征，故可认为两药联合可协同抑制胶质瘤细胞。

同时在实验中我们还运用透射电镜观察细胞超微结构发现单用雷帕霉素组的细胞有典型的自体吞噬泡，而并未发现凋亡细胞应有的染色质凝集或碎裂等特征性表现。由此看见，mTOR抑制剂主要通过诱导细胞自噬而不是凋亡而发挥抗胶质瘤作用。

我们应用雷帕霉素和尼莫司汀联合作用于U87-MG胶质瘤细胞株的体外研究证明：①雷帕霉素和尼莫司汀均可抑制U87-MG胶质瘤细胞生长增殖，且两药联合有协同效应；②雷帕霉素主要通过诱导细胞发生G_1期阻滞，促使细胞发生自噬性死亡而发挥其抗肿瘤作用，合用尼莫司汀后可增强这种效应；③单用雷帕霉素并不能诱导细胞发生凋亡；④为脑胶质瘤的靶向治疗及新的化疗用药方案提供实验依据。

参考文献：

[1] Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2005, 64(6): 479-489.

[2] Seeliger H, Guba M, Kleespies A, *et al*. Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutical target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(3/4): 611-621.

[3] 陈鸿，潘宁玲，王国林. 等辐射分析法的原理及应用[J]. 国外医学. 麻醉学与复苏分册，2004，25(5)：267-269.

[4] Klionsky D J, Abeliovich H, Agostinis P, *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes[J]. Autophagy, 2008, 4(2): 151 – 175.
[5] 刘柏麟, 章翔. 胶质细胞瘤的侵袭机制及分子靶向治疗研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2007, 6(6): 568 – 571.
[6] Kim D H, Sarbassov D D, Ali S M, *et al*. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery[J]. Cell, 2002, 110(2): 163 – 175
[7] Houchens D P, Ovejera A A, Riblet S M, *et al* . Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model[J]. Eur J Cancer Clin Oncol, 1983, 19(6): 799 – 805.
[8] 刘宏, 赵洪雯, 李敛, 等. 肾移植术后雷帕霉素初始治疗疗效的初步分析[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 644 – 646.
[9] Tanaka K, Sasayama T, Mizukawa K, *et al*. Specific mTOR inhibitor rapamycin enhances cytotoxicity induced by alkylating agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea (ACNU) in human U251 malignant glioma cells[J]. J Neurooncol, 2007, 84(3): 233 – 244.
[10] Goudar R K, Shi Q, Hjelmeland M D, *et al*. Combination therapy of inhibitors of epidermal growth factor receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (AEE788) and the mammalian target of rapamycin (RAD001) offers improved glioblastoma tumor growth inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(1): 101 – 112.
[11] Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, *et al*. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3336 – 3346.
[12] Hjelmeland A B, Lattimore K P, Fee B E, *et al*. The combination of novel low molecular weight inhibitors of RAF (LBT613) and target of rapamycin (RAD001) decreases glioma proliferation and invasion [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(9): 2449 – 2457.
[13] Bogler O, Weller M. Apoptosis in gliomas, and its role in their current and future treatment[J]. Front Biosci, 2002, 7: e339 – e353.
[14] Kanzawa T, Germano I M, Komata T, *et al*. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4): 448 – 457.
[15] 王树彦, 周易明, 陈宗祐. 自噬与肿瘤的发生和治疗研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2008, 35(6): 928 – 934.

(**收稿**:2009-12-17;**修回**:2010- 01-24)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2010)14-1533-01

个案与短篇

双侧卵巢浆液性腺纤维瘤合并多囊卵巢综合征 1 例

孙沛琳, 薛 敏 (410013 长沙, 中南大学湘雅三医院妇产科)

[关键词] 卵巢肿瘤; 腺纤维瘤; 多囊卵巢综合征
[中图法分类号] R737.31 **[文献标志码]** B

卵巢腺纤维瘤(ovary adenofibroma, OAF)为卵巢少见的实体良性肿瘤, 双侧发生更为罕见。本例患者同时合并多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS), 现报告如下。

1 临床资料

患者, 女性, 23 岁, 因月经稀发 10 余年, 未避孕未孕 1 年余, 发现 PCOS 半年就诊, 妇科检查未扪及明显异常, B 超提示: 左侧卵巢 48 mm × 25 mm × 40 mm, 卵泡计数 > 80 个, 右侧卵巢 45 mm × 24 mm × 40 mm, 卵泡计数 > 70 个。女性激素全套大致正常。曾用药物调经治疗, 无明显疗效, 因患者有生育要求, 拟行体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)术, 建议行手术治疗, 术前诊断考虑: PCOS、原发不孕。

术中见双侧卵巢均增大, 白膜厚, 可见较多卵泡, 直径约 7 ~ 8 cm, 肿瘤与正常卵巢组织无明显分界, 形态不规则, 呈分叶状, 质坚韧, 表面可见数个小菜花状赘生物, 质较软, 粉红色(图 1)。肿块切开为实性乳头表面被覆浆液性上皮, 纤维性间质增生显著, 腺体较少。行双侧卵巢肿瘤及赘生物切除 + 低频电凝打孔术。病理结果示: 卵巢浆液性腺纤维瘤、部分卵巢组织呈胶原纤维组织瘤样增生, 可见较多原始卵泡(图 2)。术后诊断: PCOS、双侧卵巢浆液性腺纤维瘤、原发不孕。术后半年随访患者, 其月经稀发症状无明显好转, 一直未避孕也未孕。



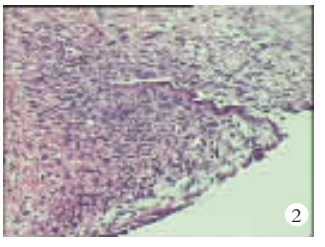


图 1 双侧卵巢浆液性腺纤维瘤合并多囊卵巢综合征患者术中所见
图 2 双侧卵巢浆液性腺纤维瘤组织病理学观察 (HE × 100)

2 讨论

OAF 是卵巢上皮性肿瘤的一种特殊类型, 是卵巢少见肿瘤之一[1], 占全部卵巢肿瘤的 1.0% ~ 1.3%。其发病年龄多在 23 ~ 70 岁[2], 该病临床上缺乏特殊症状, 大部分患者往往在妇科检查或 B 超等辅助检查时才被发现, 以单侧发病占绝大多数, 双侧少见。肿瘤为实性, 表面光滑或有分叶、呈结节状, 活动度好。肿瘤与囊性腺纤维瘤在形态结构上有明显的区别[3], 故被划为独立的一类。因肿瘤呈实性, 在诊断时应注意与浆膜

(下转 1538 页)

[通信作者] 薛 敏, 电话: (0731)88618021, E-mail: xuemin5908@sina.com