

苯己异硫氰酸酯通过抑制组蛋白去乙酰化和诱导去甲基化来抑制 MDS 细胞生长

林祥华 刘 洁 唐晶晶 刘玉萍 乔仁伟

摘 要 **目的** 为了探索治疗骨髓增生异常综合征 (myelodysplasia syndrome, MDS) 新的一类靶向药物, 笔者研究了苯己异硫氰酸酯 (phenylhexyl isothiocyanate, PHI), 1 种合成的萝卜硫素 (sulforaphate, SFN) 衍生物对 MDS 细胞作用。**方法** MDS 细胞株 SKM-1 经过不同浓度 PHI 处理 3 个平行孔后使用台盼蓝拒染法测定细胞活力, 流式细胞术分析细胞周期相, 荧光染料 JC-1 检测线粒体膜电位改变; 甲基化特异性 PCR 检测去甲基化改变, Western blot 法蛋白印迹分析 p15 基因表达和组蛋白乙酰化程度, 以及 ELISA 法测定细胞培养上清中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的含量。**结果** 经过 $5\mu\text{mol/L}$ PHI 处理后 MDS 细胞增殖受到抑制和产生凋亡, 在诱导浓度低至 $10\mu\text{mol/L}$ 细胞增殖减少了 50%, 和细胞周期分析显示 MDS 细胞停滞在细胞 G_1 期, PHI 诱导 p15 基因去甲基化呈现浓度依赖性, 进一步证明也以浓度依赖方式 PHI 诱导组蛋白 H3 高乙酰化。同时也表明, PHI 抑制 MDS 细胞中 VEGF 产生, 以及通过破坏线粒体膜电位诱导细胞凋亡。**结论** PHI 可以诱导 p15 基因去甲基化和组蛋白 H3 高乙酰化, 具有对 MDS p15 基因去甲基化和组蛋白高乙酰化的双重表观遗传效应, 从而启动了靶向途径抑制 MDS 细胞增殖。

关键词 苯己异硫氰酸酯 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 DNA 甲基化 骨髓增生异常综合征

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.028

Phenylhexyl Isothiocyanate Can Inhibit MDS Cell Growth as Histone Deacetylase Inhibitor and Hypomethylating Agent. Lin Xianghua, Liu Jie, Tang Jingjing, et al. Department of Hematology, Fuzhou First Municipal Hospital, Fujian 350001, China

Abstract Objective A new class of chemotherapeutic agents is being developed for myelodysplasia syndrome (MDS). In this study we examined whether phenylhexyl isothiocyanate (PHI), one kind of synthetic sulforaphate (SFN) derivatives, has its effects on MDS cells. **Methods** SKM-1 of MDS cell line were exposed to PHI at various concentrations and cell viability was determined from at least triplicate cultures by trypan blue exclusion method. Analysis of cell cycle phases was performed using a BD FACScan Flow Cytometry. The effects of PHI treatment on mitochondrial membrane potential was measured using a potential sensitive dye JC-1. Both p15 hypomethylation and histone H3 hyperacetylation in PHI treated SKM-1 cell line by using methylation specific PCR (MS-PCR) and Western blot analyses. The contents of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in the culture supernatants were determined with ELISA kit. **Results** PHI inhibited the proliferation of the MDS cells and induced apoptosis in a concentration as low as $5\mu\text{mol/L}$. Cell proliferation was reduced to 50% of control with PHI concentration of $10\mu\text{mol/L}$. Cell cycle analysis revealed that PHI caused G_1 -phase arrest of SKM-1 cells. PHI induced p15 hypomethylation in a concentration-dependent manner. PHI was further shown to induce histone H3 hyperacetylation in a concentration-dependent manner. It was also demonstrated that PHI inhibited VEGF production in the SKM-1 cells, and It was found that PHI induced apoptosis through disruption of mitochondrial membrane potential. **Conclusion** It shows that PHI can induce both p15 hypomethylation and histone H3 hyperacetylation in SKM-1 cell line. PHI has dual epigenetic effects on p15 hypomethylation and histone hyperacetylation in MDS cells and targets several critical processes of MDS proliferation.

Key words Phenylhexyl isothiocyanate; Histone deacetylase inhibitor; DNA methylation; Myelodysplasia syndrome (MDS)

随着我国老年化日趋加重, 老年病日益突出, 其

中血液病中的骨髓增生异常综合征 (MDS) 就越来越多, 已经成为如贫血、出血凝血障碍一样的常规疾病。传统上把 MDS 当作癌前病变进行观察, 至多输血来支持治疗, 待发展到白血病, 要么不治死亡, 要么化疗死亡。至于骨髓移植, 由于相关病死率高, 老年人不适合。

基金项目: 福建省福州市科技计划项目 (2012-S-154-3); 福建省厦门市海沧科技局项目 (GMRPG1E0061)

作者单位: 361028 厦门长庚医院血液肿瘤科 (林祥华、刘玉萍); 350001 福州市第一医院血液肿瘤科 (刘洁、唐晶晶); 10595 纽约, 美国纽约医学院血液肿瘤科 (乔仁伟)

通讯作者: 林祥华, 电子邮箱: xianghualin2002@hotmail.com

随着基础医学进步,从细胞、分子遗传学上进行有效分类,有针对性开展去甲基化和染色质重塑化的表观遗传学治疗已经成为共识。这成为继通过杀伤细胞的细胞毒性药物、诱导细胞分化的分化剂、促进细胞凋亡的凋亡剂之后,一个抑制肿瘤细胞增生异常的新机制剂,可称表观遗传学的靶向修饰剂。它基于有效肿瘤抑制基因或其他抑制增殖基因的高甲基化和组蛋白去乙酰化,导致这些表观基因沉默,致使细胞异常或无限增殖。可以归纳为两个方面的内容,其一是基因组 DNA 和转录本 LcnRNA 的甲基化;其二染色质重塑化,是组蛋白去乙酰化改变了基因转录中的 DNA 结构。MDS 就有常见的启动子基因 DNA 广泛甲基化和组蛋白去乙酰化,因此,就有如今 FDA 批准了针对 MDS 两类药物,一类是 DNA 甲基转移酶抑制剂如阿扎胞苷(5 - azacytidine, AZA)和地西他滨(5 - aza - 2 - deoxy - cytidine, decitabine)促进 DNA 去甲基化,容许被沉默的肿瘤抑制增殖基因的表达;另一组蛋白去乙酰化酶抑制剂如伏立诺他(SAHA)、丙戊酸(valproic acid, VPA)、和丁酸苯酯(phenylbutyrate)恢复染色质结构引起的基因表达。

在国外研究报道了人工合成的苯己异硫氰酸酯(PHI)是组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)的抑制剂,能够抑制组蛋白去乙酰化,从而导致白血病细胞和前列腺癌细胞的生长抑制和凋亡,也报道了 PHI 也是甲基化转移酶的抑制剂,引起多发性骨髓瘤抑制基因的去甲基化^[1-3]。至此,发现了 PHI 既有抑制组蛋白去乙酰化又有去甲基化的双重作用。基于治疗 MDS 需要具有这两类表观遗传学的靶向修饰剂,为此,研究 PHI 对 MDS 细胞株 SKM - 1 的作用,为进一步探索新合成 SFN 衍生物 PHI 类似物和治疗 MDS 的新口服制剂提供基础。

材料与方法

1. 化学试剂和细胞培养: PHI 按已前报告方法制备,人 MDS 细胞株 SKM - 1 来自 ATCC(Manassas, VA)^[3,4]。0.3 × 10⁶/ml 细胞接种在 RPMI1640 培养基,添加终浓度 10% 热灭活的胎牛血清、100IU/ml 的青霉素和 100μg/ml 的链霉素,并保持在含有 5% CO₂ 和饱和湿润的 37℃ 浮箱中。对数生长期细胞孵育在 75% 甲醇和 PBS 制备的不同浓度 PHI 中,对照组添加含有相同浓度甲醇的培养基^[3]。采用至少 3 次台盼蓝拒染法测定细胞活力,每毫升的活细胞数来计算细胞密度。

2. 甲基化特异性 PCR: 甲基化特异性 PCR

(MS - PCR)应用文献报告的程序执行^[5]。处于对数生长 MDS 细胞均经过不同浓度 PHI 和 AZA 处理 10 天,从细胞中提取的 DNA 和双硫酸盐转化后 MS - PCR 分析。p15 甲基化形式引物 5' - GCGTTCG-TATTTTGC GTT - 3' (正义链)和 5' - CGTACAATA-ACCGAACGACCGA - 3' (反义链), P15 非甲基化形式引物 5' - TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT - 3' (正义链)和 5' - CCATACAATAACCAAACAACCAA - 3' (反义链)。甲基化 PCR 产物 148bp 包括从 40bp 延伸至 188bp,未甲基化 PCR 产物 154bp 是从 34bp 延伸到 188bp^[6]。PCR 是在热循环仪(hot start key, Qiagen)按如下程序进行:95℃ 15min 后,接着 40 次循环(95℃ 15s, 60℃ 30s, 72℃ 30s),最后 72℃ 10min。每一个样本至少进行两次独立的 PCR 扩增。

3. 细胞周期和 VEGF 的测量: 细胞周期相是用 Becton - Dickinson (BD) 流式细胞仪进行分析,根据文献描述的方法将收集的细胞置于干冰中,加入冰浴的浓度为 50μg/ml 碘化丙啶(propidium iodide, PI)溶液染色,对每个经过处理的样本至少含有 1 × 10⁴ 个细胞进行了分析^[3]。VEGF 的测量,0.3 × 10⁶ 细胞/毫升 SKM - 1 细胞经过特定 PHI 浓度和时间孵育培养,用 ELISA 试剂盒测定细胞培养上清中 VEGF 的含量(R&D system minneapolis, MN, USA),计算和比较 PHI 处理组和对照组的细胞 VEGF 的含量百分比变化。

4. 线粒体膜电位和细胞凋亡的测量: 使用一种电位敏感的染料 JC - 1 (5,5',6,6' - tetrachloro - 1,1',3,3' - tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)测定 PHI 对线粒体膜电位的影响。由于 JC - 1 染料带有游离的正电荷,可通过完整的线粒体膜电位所建立的负电荷,进入线粒体基质^[7,8]。在健康的细胞中,JC - 1 染料由于形成的聚集体把线粒体染红色,而在细胞凋亡所导致线粒体膜电位崩溃,JC - 1 染料以单体的形式积累在细胞质呈绿色荧光。JC - 1 染料由 DMSO 制备 JC - 1 原液(1mg/ml)和提供的检测缓冲液新鲜稀释配置而成。细胞在含有 JC - 1 (10μg/ml)培养基 37℃ 孵育 15min,经 PBS 洗涤后的细胞重新悬浮于 0.5ml 缓冲液,使用 BD 流式细胞仪检测其荧光,同时使用终浓度为 25μmol/L 的羰基氰化物 4 - 三氟甲氧基 - 苯胺(CCCP),线粒体氧化磷酸化的解偶联剂,作为阳性对照。凋亡细胞通过其形态特征观察,并通过脱氧核糖核酸末端转移酶介导的荧光素标记的 dUTP (TUNEL) 检测 DNA 链降解片段。原位细胞凋亡是由罗氏公司 TUNEL 试剂盒进行

检测,涂片细胞标本用 4% 多聚甲醛固定并在 Triton 溶液干冰孵育 4 min,缺乏脱氧核糖核酸末端转移酶溶液孵育的细胞作为阴性对照。玻片用 5% 甲基绿染色后在光镜下进行细胞计数,从多个视野至少计数 500 个细胞,来计算凋亡细胞百分率。

5. Western blot 法蛋白印迹分析: MDS 细胞 P15 蛋白表达水平,Western blot 法蛋白印迹检测使用文献所述标准操作程序^[3]。由各条件培养细胞与含有新鲜制备的蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液混合,所产生的总蛋白,以 BSA 作为标准品,用 BioRad 蛋白检测试剂盒测定裂解细胞的其含量。接着蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转移至硝酸纤维素膜上,用特异性抗体进行免疫印迹,其中乙酰化组蛋白 H3 抗体购自 Upstate 生物技术公司,P16、P15 抗体购自 Santa Cruz 公司,加载 β 肌动蛋白抗体作为内对照。再使用相应的 HRP 标记的第 2 次抗体来显示反应蛋白,尔后均采用可视化 ECL 系统观察拍照。

6. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析,多个独立的实验数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,结果是由各自双边配对的统计差异 t 检验来评估,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PHI 使细胞生长停滞在 G_1 期从而抑制 MDS 增殖:经过不同浓度 PHI 培养处理后,MDS 细胞株 SKM-1 生长抑制程度与 PHI 浓度和孵育时间呈正相关。图 1 观察到 PHI 浓度低至 $5\mu\text{mol/L}$ 就可获得显著的生长抑制作用,培养细胞密度减少了 37.1%,当 PHI 浓度升到 $10\mu\text{mol/L}$ 细胞增殖抑制进一步降低至对照组的 50%,且培养的细胞呈停滞状态。观察到 PHI 孵育后 MDS 细胞发生形态改变,出现染色质浓缩,质膜起皱,细胞皱缩,呈现凋亡细胞特性。TUNEL 法测定 DNA 链断裂降解显著增加,证实了细胞凋亡(数据未显示)。应用流式细胞仪分析不同细胞周期阶段的细胞分布,图 2 显示经过 48h $10\mu\text{mol/L}$ PHI 处理后在 S 和 G_2M 期复制细胞明显减少,96h 后 S 加 G_2M 期细胞比例下降至 23.9%,与对照组 80.3% 比较,细胞增殖约减少了 3 倍。随着 S 和 G_2M 期细胞减少, G_1 期细胞随之增加,这与 G_1 期停滞是一致的。

2. PHI 诱导 p15 基因去甲基化和 P15 蛋白表达增加:检测了肿瘤抑制基因 P15 的蛋白表达与 DNA 甲基化情况。阿扎胞苷(AZA)或地西他滨(decitabine)是一个已知的 DNA 甲基化抑制剂,作为阳性对

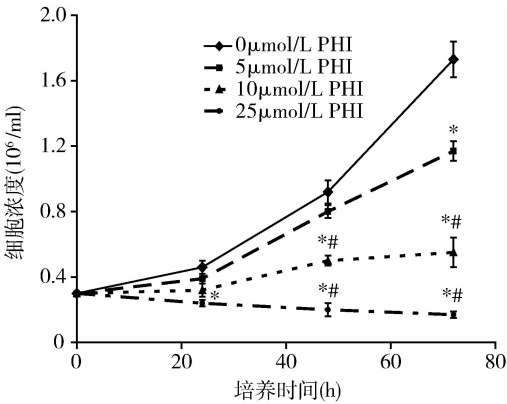


图 1 PHI 抑制 MDS 细胞 SKM-1 的增殖
与空白组比较,PHI $5\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $25\mu\text{mol/L}$ 分别在 72、48、24h 抑制增长,* $P < 0.05$;PHI $25\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$ 与 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $5\mu\text{mol/L}$ 比较,# $P < 0.05$

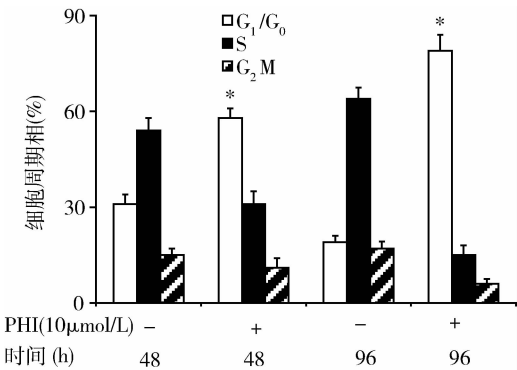


图 2 PHI 对细胞 SKM-1 生长周期影响, 阻断在细胞周期中的 G_1 期
与空白组比较,PHI $10\mu\text{mol/L}$ 分别在 48 和 96h G_1 阻滞,* $P < 0.05$

照。MDS 细胞由于 CpG 岛异常甲基化产生 p15 基因失活^[9]。图 3、4 显示了用甲基化特异性 PCR 检测 DNA 甲基化状态和 P15 蛋白表达情况,未经处理的细胞只有 p15 甲基化形式,而没有检测到 p15 去甲基化形式和蛋白表达。经 $10\mu\text{mol/L}$ PHI 10 天处理后细胞,去甲基化的形式和蛋白表达显现出来与地西他滨介导的相类似。去甲基化 p15 DNA 增加与经处理

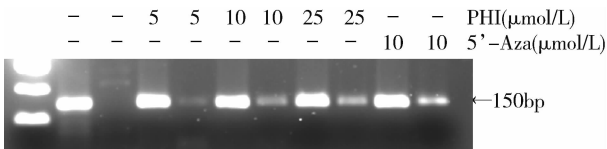


图 3 PHI 诱导 MDS 细胞 SKM-1 的 p15 基因 DNA 去甲基化
与空白组比较,PHI 作用 10 天后产生的去甲基化 DNA 带亮度随浓度增高逐渐增加

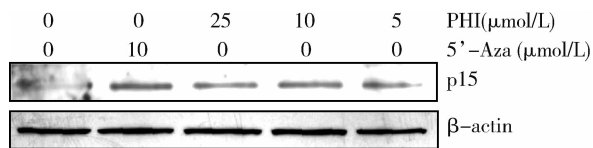


图4 PHI 诱导 MDS 细胞 SKM - 1 p15 基因 DNA 去甲基化后 P15 蛋白的表达

与对照组比较, PHI 产生 p5 蛋白印迹表达带

细胞的 PHI 浓度增高有正相关, 结果表明 PHI 诱导 p15 DNA 去甲基化呈现剂量依赖性。

3. PHI 抑制组蛋白去乙酰化: 已经表明 PHI 可以抑制组蛋白去乙酰化酶诱导 HL - 60 白血病、多发性骨髓瘤、和前列腺癌细胞的组蛋白高乙酰化^[1-4]。检测了 MDS 细胞经 PHI 处理后组蛋白的乙酰化状态, 图 5 显示组蛋白 H3 的乙酰化显著增加与 PHI 浓度呈正相关。

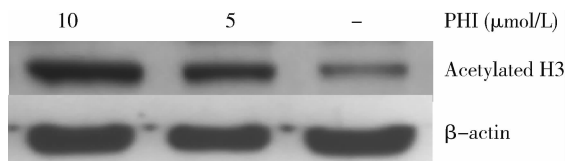


图5 PHI 抑制 SKM - 1 组蛋白去乙酰化

与对照组比较, 随 PHI 浓度增加产生的 H3 乙酰化增强

4. PHI 抑制 MDS 细胞 VEGF 的生成: MDS 与其他血液恶性肿瘤一样是克隆病, 血管生成也是 MDS 发生进展的一个重要因素, 能够引起 MDS 细胞克隆的不断增殖。PHI 对 MDS 细胞株 VEGF 的产生影响的分析也是十分必要, 图 6、7 显示了 PHI 抑制 VEGF 的产生呈现浓度和时间依赖的方式, 在 25 μmol/L PHI 处理 24h 后观察到 VEGF 表达与对照组比较降低了 30% ($P < 0.05$), 48h 后接近减少 70% ($P < 0.05$)。

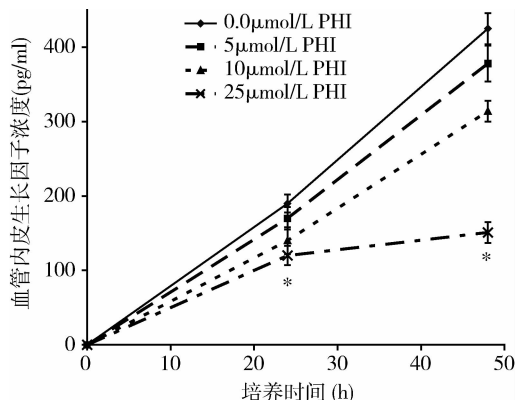


图6 PHI 在不同时间和不同浓度抑制 SKM - 1 细胞 VEGF 产量

与空白组比较, 仅 25 μmol/L PHI 在 24h 和 48h 抑制量, * $P < 0.05$

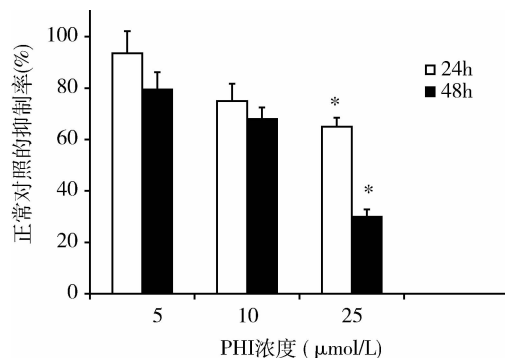


图7 PHI 在不同浓度和不同时间对 SKM - 1 细胞 EGFR 抑制率

与空白组比较, 仅 25 μmol/L PHI 在 24h 和 48h 抑制百分率, * $P < 0.05$

5. PHI 诱导线粒体膜电位裂解: 已经表明 PHI 通过激活 caspase - 9 诱导细胞凋亡, 这往往是线粒体膜电位裂解的结果, 其后引起的效应分子释放而凋亡^[8]。为了进一步研究 PHI 诱导 MDS 细胞凋亡特征机制。流式细胞方法根据不同的线粒体膜电位与 JC - 1 染料染色后是否形成一个新聚集彩色, 来检测线粒体膜电位的状态。已知的 CCCP, 能裂解破坏线粒体膜电位, 作为阳性对照。图 8 显示经 PHI 处理后引起 SKM - 1 细胞从红色荧光到绿色荧光迁移百分数增加, 线粒体膜电位的裂解破坏, 且呈现浓度依赖性。观察到经 10 μmol/L PHI 处理 48h 后线粒体膜电位破坏细胞的数量增加 1.9 倍, 升至 25 μmol/L 后增加了 3.1 倍。结果表明 PHI 诱导的细胞凋亡是通过涉及线粒体膜电位裂解而实现的。

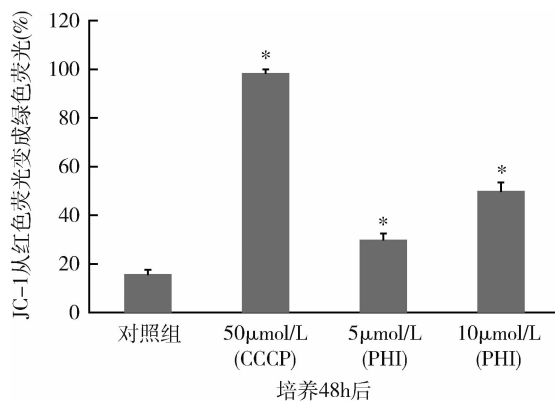


图8 PHI 处理 2 天后由红色荧光向绿色荧光移动产生的百分比量

与对照组比较, 阳性组 50 μmol/L CCCP, 5 μmol/L 和 10 μmol/L PHI 产生绿色荧光百分率, * $P < 0.05$

讨 论

这项研究表明 PHI 可以抑制 MDS 细胞株的增

殖,且在浓度低至 $5\mu\text{mol/L}$ 就能诱导细胞发生凋亡,当浓度升至 $10\mu\text{mol/L}$ 时大部分细胞出现凋亡,与笔者以前报道 PHI 所需要的抑制 HL60 白血病细胞和前列腺癌细胞的生长和诱导细胞凋亡的浓度一样^[1,2,4]。笔者研究表明上述浓度 PHI 对正常人外周血单个核细胞是无毒性不良反应^[1]。且已经启动了一个方案探讨 PHI 是否有对直接从骨髓增生异常综合征患者获得的原代细胞作用活性。

与文献报告的一致,笔者发现 MDS 细胞株 SKM-1 p15 基因存在有高甲基化,而 p16 基因却没有^[9~11]。PHI 诱导 p15 去甲基化,DNA 呈现浓度依赖性,其去甲基化程度与已被批准用于治疗骨髓增生异常综合征的诱导去甲基化药物地西他滨相当^[11]。而 p15 抑癌基因重新激活可至少部分起到 MDS 细胞 G_1 周期停滞和细胞凋亡作用。因为其他肿瘤抑癌基因高甲基化,如 SOCS-1、E-cadherin、DAP 激酶、MGMT 经常可在 MDS 细胞株以及患者临床标本检测出,可能还有其他基因和通路可由 PHI 诱导去甲基化而激活^[9~11]。目前也已经证明了 PHI 诱导 p15 去甲基化与抑制 DNA 甲基转移酶有关,这能够说明后者是 PHI 靶位点,PHI 是 DNA 甲基转移酶抑制剂^[12]。

已经检验了几种 HDAC 抑制剂作为治疗人类血液恶性淋巴细胞肿瘤新一类的潜在有效的药物^[13,14]。首先,笔者已经报道 PHI 是一种 HDAC 抑制剂,可选择性诱导人白血病细胞组蛋白乙酰化和去甲基化的改变^[3,4]。此项研究也表明,PHI 可诱导组蛋白 H3 高乙酰化和 p15 基因启动子去甲基化。这些发现提示 PHI 具有对 DNA 和染色质双重的表观遗传调控作用,证明一种单剂 PHI 对 DNA 和染色质的双重效应能在重新激活 p15、p16 和其他抑癌基因提供潜在协同效应,必然将比其他单一效能靶向药物如 AZA、Decitabine、SAHA、VPA 等作用于 MDS 等产生更有效和持续效应。其次,根据文献报道 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化一起作用引起表达基因沉默,甲基化 CpG 结合蛋白 (MECP2) 招集 HDACs 到特定的启动子区域,导致抑制的染色质结构的形成和转录抑制^[5]。这将研究 PHI 和阿扎胞苷或地西他滨 (AZA 或 Decitabine) 的结合对 MDS 细胞的抑制作用是否具有协同作用变得有意义。再次,结合使用 HDAC 抑制剂和去甲基化药物已经开始临床试验用于治疗白血病和骨髓增生异常^[15]。以前的研究结果显示,当两个 HDAC 抑制剂,SAHA 和 TSA,进行组合,对骨髓

瘤细胞的杀伤效应增强,细胞凋亡部分是由于 HDAC 抑制剂裂解和破坏线粒体膜电位产生^[3,8]。本研究与上述思路一致,由于 PHI 诱导 DNA 去甲基化和组蛋白乙酰化的具有双重作用,期望 PHI 和 SAHA 或 VPA 的组合更可提高对 MDS 细胞的细胞毒作用。最后,笔者已经联合 PHI 与化疗药物治疗乳腺癌,并取得良好效果,可以预期为将来探索联合化疗进一步作用于 MDS 细胞株奠定基础^[16,17]。

文献报告证实了另一个 HDAC 抑制剂丙戊酸 (VPA) 可抑制骨髓瘤细胞产生 VEGF,其他血管生成抑制剂,沙利度胺和来那度胺在治疗 MDS 也已经是一类探索扩大适应证的有效的药物,这项研究也表明 PHI 可以减少 MDS 细胞株 SKM-1 的细胞因子 VEGF 产生。总之,PHI 具有对 MDS 存活和增殖的几个关键途径靶向作用,可以预见不断探索和发展的表观遗传学,必将会更加有效和治疗 MDS^[18]。但是,无论如何仍需要开展深入的研究来进一步了解它对表观遗传过程的调节特性,为其在临床潜在试验提供服务。

参考文献

- 1 Ma X, Fang Y, Beklemisheva A, *et al.* Phenylhexyl isothiocyanate inhibits histone deacetylases and remodels chromatin to induce growth arrest in human leukemia cells [J]. *Intl J Oncol*, 2006, 28(5): 1287-1293
- 2 Beklemisheva A, Fang Y, Feng J, *et al.* Epigenetic mechanism of growth inhibition induced by phenylhexyl isothiocyanate in prostate cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(2A): 1225-1230
- 3 Lu Q, Lin X, Feng J, *et al.* Phenylhexyl isothiocyanate has dual function as histone deacetylase inhibitor and hypomethylating agent and can inhibit myeloma cells growth by targeting critical pathways [J]. *J Hematol Oncol*, 2008, 1(1): 6-15
- 4 Lu L, Liu D, Ma X, *et al.* The phenylhexyl isothiocyanate induces apoptosis and inhibits leukemia cell growth in vivo [J]. *Oncol Reports*, 2006, 16(6): 1363-1367
- 5 Wong IH, Ng MH, Lee JC, *et al.* Transcriptional silencing of the p16 gene in human myeloma-derived cell lines by hypermethylation [J]. *Brit J Haematol*, 1998, 103(1): 168-175
- 6 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, *et al.* Methylation-specific PCR: A novel assay for methylation status of CpG islands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9821-9826
- 7 Cossarizza A, Baccarani - Contri M, Kalashnikova G, *et al.* A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potentials using the J aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 197(1): 40-45

综上所述,笔者认为多田公式法可用于初步估算颅内血肿体积,而Mimics血肿3D成像测量法计算不规则血肿体积更加准确可靠,避免了多田公式法的误差。另外利用软件进行3D模拟重建,根据重建结果对血肿进行定位实现手术入路的设计也是目前临床手术学的研究重点,值得临床广泛推广应用。

参考文献

- 1 Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, *et al.* Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990 – 2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(9): 913 – 924
- 2 Liu M, Wu B, Wang WZ, *et al.* Stroke in China: epidemiology, prevention and management strategies [J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(5): 456 – 464
- 3 Hemphill JC, Greenberg SM, Anderson CS, *et al.* Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. *Stroke*, 2015, 24(5): 659 – 667
- 4 Bhatia R, Singh H, Singh S, *et al.* A prospective study of in-hospital mortality and discharge outcome in spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. 2013, 61(3): 244 – 248
- 5 Wang CW, Juan CJ, Liu YJ, *et al.* Volume – dependent overestimation of spontaneous intracerebral hematoma volume by the ABC/2 formula [J]. *Acta Radiol*, 2009, 50(3): 306 – 311
- 6 Divani AA, Majidi S, Luo X, *et al.* The ABCs of accurate volumetric measurement of cerebral hematoma [J]. *Stroke*, 2011, 42(6): 1569 – 74
- 7 徐兴华, 陈晓雷, 张军, 等. 多田公式计算脑内血肿体积的准确性和可靠性 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2015, 41(2): 87 – 91
- 8 Webb AJ, Ullman NL, Morgan TC, *et al.* Accuracy of the ABC/2 score for intracerebral hemorrhage: Systematic review and analysis of MIS-TIE, CLEAR – IVH, CLEAR III [J]. *Stroke*, 2015, 46(9): 2470 – 2476
- 9 张遣, 张仲衍. 新尝试“假设法脑出血测量”与常用方法的对比 [J]. *医学与哲学*, 2011, 32(8): 47 – 48
- 10 Huttner HB, Steiner T, Hartmann M, *et al.* Comparison of ABC/2 estimation technique to computer – assisted planimetric analysis in warfa-

- rin – related intracerebral parenchymal hemorrhage [J]. *Stroke*, 2006, 37(37): 404 – 408
- 11 曾文, 陈奕, 王大满, 等. 改良体积公式计算颅内血肿量的实验性研究 [J]. *吉林医学*, 2016, 37(6): 1321 – 1323
- 12 陆晓, 陆文. 应用改良体积公式计算颅内血肿量 [J]. *法医学杂志*, 2010, 26(3): 177 – 180
- 13 Zhao KJ, Liu Y, Zhang RY, *et al.* A precise, simple, convenient and new method for estimation of intracranial hematoma volume – the formula 2/3Sh [J]. *Neurol Res*, 2009, 31(10): 1031 – 1036
- 14 Yang W, Feng Y, Zhang Y, *et al.* Volume quantification of acute infratentorial hemorrhage with computed tomography: validation of the formula 1/2ABC and 2/3Sh [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(4): e62286
- 15 张永哲. 精准神经外科: 微侵袭神经外科新理念 [J]. *中国培训*, 2016, (18): 279
- 16 中华医学会神经病学分会. 中国脑出血诊治指南 (2014) [J]. *中华神经科杂志*, 2015, 8(6): 435 – 444
- 17 Fujii Y, Tanaka R, Takeuchi S, *et al.* Hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. *J Neurosurg*, 1994, 80(1): 51 – 57
- 18 盛波, 陈松, 吕发金, 等. 体视学法在颅内血肿体积测量的应用 [J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*, 201, 14(1): 5 – 7
- 19 张遼, 云德波. 颅内血肿体积的定量方法及研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(1): 63 – 66
- 20 Zhao KJ, Zhang RY, Sun QF, *et al.* Comparisons of 2/3Sh estimation technique to computer – assisted planimetric analysis in epidural, subdural and intracerebral hematomas [J]. *Neurol Res*, 2013, 32(9): 910 – 917
- 21 冯玉兰, 蒋爱华, 颜静, 等. 脑血肿体积评估 3 种方法的比较研究 [J]. *实用临床医药杂志*, 2014, 18(11): 26 – 30
- 22 Yan J, Zhao K, Sun J, *et al.* Comparison between the formula 1/2ABC and 2/3Sh in intracerebral parenchyma hemorrhage [J]. *Neurol Res*, 2013, 35(4): 382 – 388
- 23 王娇, 刘洋, 张晓玲, 等. Mimics 软件在医学图像三维重建中的应用 [J]. *医疗卫生装备*, 2015, 36(2): 115 – 118
- 24 江晓兵, 黄伟权, 庞智晖, 等. 基于 Mimics 软件计算椎体强化术后椎体内骨水泥体积及骨水泥/椎体体积比的新方法 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2013, 23(3): 238 – 243

(收稿日期: 2017 – 03 – 23)

(修回日期: 2017 – 04 – 20)

(接第 119 页)

- 8 Fandy TE, Shankar S, Ross RD, *et al.* Interactive effects of HDAC inhibitors and trail on apoptosis are associated with changes in mitochondrial functions and expression of cell cycle regulatory genes in multiple myeloma [J]. *Neoplasia*, 2005, 7(7): 646 – 657
- 9 Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, *et al.* Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5 – Aza – 2' – deoxycytidine (decitabine) treatment [J]. *Blood*, 2002, 100(8): 2957 – 2964
- 10 Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, *et al.* Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes [J]. *Cancer*, 2006, 106(8): 1794 – 1803
- 11 Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, *et al.* Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(10): 2429 – 2440
- 12 Jiang S, Ma X, Huang Y, *et al.* Reactivating aberrantly hypermethylated P15 gene in leukemic T cell by a phenylhexyl isothiocyanate mediated inter – active mechanism on DNA and chromatin [J]. *J Hemtol Oncol*, 2010, 3(1): 48 ~ 53
- 13 Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, *et al.* Molecular sequelae

- of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells [J]. *Blood*, 2003, 101(10): 4055 – 4062
- 14 Catley L, Weisberg E, Tai YT, *et al.* NVP – LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma [J]. *Blood*, 2003, 102(7): 2615 – 2622
- 15 Estey E. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(14): 1908 – 1915
- 16 Cang S, Ma Y, Chiao JW, *et al.* Phenethyl isothiocyanate and paclitaxel synergistically enhanced apoptosis and alpha – tubulin hyperacetylation in breast cancer cells [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2014, 3(1): 5 – 10
- 17 Liu K, Cang S, Ma Y, *et al.* Synergistic effect of paclitaxel and epigenetic agent phenethyl isothiocyanate on growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1): 10
- 18 Cang S, Xu X, Ma Y, *et al.* Hypoacetylation, hypomethylation, and dephosphorylation of H2B histones and excessive histone deacetylase activity in DU – 145 prostate cancer cells [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 9(1): 3 – 6

(收稿日期: 2017 – 04 – 20)

(修回日期: 2017 – 04 – 29)