

TGFBI在婴幼儿血管瘤组织中的表达水平及其对婴幼儿血管瘤生物学行为的影响

李名扬^{1,2} 杨恩黎^{1,2} 李易铭^{1,2} 耿一鸣^{1,2} 吴海威^{1,2} 张东升^{1,2}

1. 山东大学齐鲁医学院口腔医学院, 济南 250012;

2. 山东第一医科大学附属省立医院口腔科, 济南 250021

[摘要] **目的** 探索TGFBI在不同时期婴幼儿血管瘤组织中的表达水平, 并研究质粒转染使TGFBI过表达、小干扰RNA转染使TGFBI敲低对增殖期婴幼儿血管瘤中血管瘤内皮细胞(HemECs)生物学行为的影响。**方法** 通过免疫荧光检测TGFBI在不同时期血管瘤组织中的表达水平。构建TGFBI过表达质粒和阴性对照质粒, 并分别将其转染至HemECs细胞中; 构建TGFBI小干扰RNA及其阴性对照, 并将其转染至HemECs细胞中。通过蛋白质印迹(Western blot)检测TGFBI在TGFBI过表达组(OE组)及其阴性对照组(NC组)、TGFBI敲低组(si-TGFBI组)及其阴性对照组(si-NC组)HemECs中的表达水平以验证其转染效果。通过CCK-8试验检测转染后各组细胞的活性, EdU实验检测细胞的增殖率, Transwell检测细胞的迁移能力, 管腔形成实验检测细胞的管腔形成能力, 细胞外酸化速率(ECAR)试验检测细胞糖酵解水平。**结果** 免疫荧光结果显示, TGFBI在增殖期婴幼儿血管瘤组织中的表达高于消退期。Western blot结果显示, OE组TGFBI表达水平高于NC组, si-TGFBI组TGFBI表达水平低于si-NC组。细胞实验中, OE组细胞活力、增殖率、迁移能力及管腔形成能力高于NC组, si-TGFBI组HemECs细胞活性、增殖率、迁移能力及管腔形成能力低于si-NC组。ECAR试验中, OE组糖酵解水平高于NC组。**结论** TGFBI在增殖期血管瘤组织中表达高于消退期。TGFBI的表达上调促进了细胞活性、增殖、迁移和管腔形成能力, 且细胞内糖酵解水平上升。TGFBI可能是通过增强糖酵解促进血管瘤发生发展的重要影响因子, 是潜在治疗靶点。

[关键词] 婴幼儿血管瘤; TGFBI; 质粒; 增殖; 迁移; 管腔形成; 糖酵解

[中图分类号] R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2023.01.004



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Expression of TGFBI in infantile hemangioma tissues and its effect on the biological characteristics of hemangioma endothelial cells Li Mingyang^{1,2}, Yang Enli^{1,2}, Li Yiming^{1,2}, Geng Yiming^{1,2}, Wu Haiwei^{1,2}, Zhang Dongsheng^{1,2}. (1. School and Hospital of Stomatology, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Stomatology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, China)

Supported by: The National Natural Science Foundation of China (81901022); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020QH157, ZR2021MH353). **Correspondence:** Zhang Dongsheng, E-mail: ds63zhang@163.com.

[Abstract] **Objective** This study aimed to investigate the expression of TGFBI in infantile hemangioma (IH) of proliferative stage or involuting stage and detect the effects of TGFBI overexpression or knockdown on the biological behavior of hemangioma endothelial cells (HemECs) from proliferative IH by using plasmid and siRNA. **Methods** TGFBI expression levels in proliferative IH and involuting IH were detected by immunofluorescence. TGFBI overexpression plasmid and negative control plasmid were constructed and transfected into HemECs. siRNA for TGFBI and its negative control siRNA were constructed and transfected into HemECs. Western blot was used to detect the expression of TGFBI in the TGFBI overexpression group (OE group) and its negative control (NC group), as well as TGFBI knockdown group (si-TGFBI group) and its negative con-

[收稿日期] 2022-07-04; **[修回日期]** 2022-09-13

[基金项目] 国家自然科学基金(81901022); 山东省自然科学基金(ZR2020QH157, ZR2021MH353)

[作者简介] 李名扬, 硕士, E-mail: 202016551@mail.sdu.edu.cn

[通信作者] 张东升, 主任医师, 博士, E-mail: ds63zhang@163.com

control siRNA were constructed and transfected into HemECs. Western blot was used to detect the expression of TGFBI in the TGFBI overexpression group (OE group) and its negative control (NC group), as well as TGFBI knockdown group (si-TGFBI group) and its negative con-

trol (si-NC group), to confirm the efficiency of transfection. CCK-8 assays were performed to assess the viability of HemECs. EdU assays were conducted to investigate the proliferation ability of HemECs. Transwell assays were used to detect the migration ability of HemECs. Tube formation assays were carried out to assess the angiogenic capacity of HemECs. Extracellular acidification rate (ECAR) assays were performed to investigate the glycolysis level of HemECs.

Results The results of immunofluorescence showed that TGFBI expression was significantly elevated in proliferative IH compared with that in involuting IH. Western blot showed that TGFBI expression in the OE group was upregulated compared with that in the NC group, and TGFBI expression in si-TGFBI was downregulated compared with that in the si-NC group. The viability, cell proliferation, migration ability, and angiogenic capacity of HemECs were promoted in the OE group compared with those in the NC group, whereas these biological behaviors were inhibited in the si-TGFBI group compared with those in the si-NC group. In ECAR assays, the glycolysis level of HemECs in the OE group was enhanced compared with that in the NC group. **Conclusion** TGFBI is upregulated in proliferative IH. TGFBI overexpression enhanced the viability, cell proliferation, migration ability, and angiogenic capacity of HemECs, which indicated that TGFBI might play a key role in IH progression by accelerating glycolysis. Thus, targeting TGFBI might be an effective therapeutic strategy for IH.

[Key words] infantile hemangioma; TGFBI; plasmid; proliferation; migration; tube formation; glycolysis

婴幼儿血管瘤 (infantile hemangioma, IH) 是婴幼儿最常见的脉管源性肿瘤, 发病率5%~10%, 尤以女性多见^[1-2]。未经及时合理治疗的IH常会导致出血、感染、呼吸道阻塞等严重并发症, 严重危害婴幼儿的身心健康^[1,3]。药物治疗是IH的主要治疗方式。普萘洛尔作为治疗IH的一线药物, 在临床广泛使用, 但其副作用显著、治疗效果个体差异大、药物利用率低等问题难以解决^[4]。由于IH的发生发展机制不明, 新药物的开发速度缓慢, 因此迫切需要研究IH的发生发展机制, 以寻找有效的治疗靶点, 为新药物的开发提供研究基础。

TGFBI (transforming growth factor beta induced) 基因编码定位于细胞外基质的相对分子质量为 68×10^3 的分泌蛋白。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 信号通路的激活可诱导TGFBI转录水平的上升, 因此TGFBI通常被认为是TGF- β 信号通路的下游反应基因。TGFBI包含4个FAS1结构域和1个羧基端RGD序列, 他们共同调节TGFBI和细胞外基质以及细胞表面受体之间的相互作用^[5-6]。TGFBI在肿瘤细胞及组织中被认为发挥了重要的促瘤作用。TGFBI可通过其RGD模体结合于肿瘤细胞表面的 $\alpha v \beta 5$ 整合素受体, 激活其下游的Src、FAK、PI3K以及AKT信号通路, 发挥其促瘤作用^[7-8]。在血管生成过程中, TGFBI可通过整合素受体通路, 调节内皮细胞的增殖和出芽过程, 调控血管生成^[9-10]。TGFBI同时具有促进肿瘤发展和血管生成的作用, 目前尚无其在IH中功能机制的研究, 因此本课题检测TGFBI在不同时期IH中的表达水平, 并进一步通

过过表达质粒上调血管瘤内皮细胞 (hemangioma endothelial cells, HemECs) 中TGFBI的表达水平, 研究TGFBI过表达对HemECs细胞增殖、迁移、管腔形成能力、糖酵解水平等生物学行为的影响, 为治疗IH提供新的治疗靶点和思路。

1 材料和方法

1.1 临床标本和细胞提取

在符合手术指征、患者家属知情同意、选择手术切除IH的病例中, 根据临床特征选取颜色鲜艳、发展迅速的增殖期IH与颜色消退、体积缩小的消退期IH新鲜组织样本各10例, 手术切除, 包埋蜡块。经免疫组织化学、苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色确定其病理特征与发展阶段后, 用于后续组织免疫荧光实验。取1例增殖期IH组织样本, 手术切除后浸泡于新鲜配制的ECM培养基中, 保存于4℃低温, 转移至无菌操作台中, 反复冲洗后, 去除表面血凝块及坏死组织, 剪碎后放置于6 cm培养皿中, 使用PBS反复冲洗后, 浸泡于中性蛋白酶II, 放置于4℃低温过夜消化。次日弃中性蛋白酶II, 加入ECM培养基润湿。加入0.2% I型胶原酶和DNA酶混合消化液, 37℃水浴消化2 h, 每15 min震荡混匀一次, 800 g离心5 min。弃上清, 重悬于ECM并使用无菌滤网过滤。600 g离心5 min后, 弃上清, 重悬于ECM培养基并转移至培养瓶培养。待细胞增殖至80%~90%时, 传代培养, 并进行其他实验。本实验已获山东省立医院伦理委员会批准 (批准号:

2021-249)。

1.2 主要材料和试剂

兔抗人TGFBI抗体、Tubulin抗体、山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司),ECM培养基、青-链霉素、胎牛血清(Sciencell公司,美国),胰蛋白酶、Opti-MEM培养基(Gibco公司,美国),CCK-8试剂盒(同仁公司,日本),EdU试剂盒(广州锐博生物科技有限公司),Matrigel基质胶(BD公司,美国),Transwell 24孔板(Corning公司,美国),山羊抗兔荧光二抗(Abcam公司,美国),Lipofectamine 3000(Thermo公司,美国),总蛋白提取试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司),Seahorse XF糖酵解压力试剂盒(Agilent Technologies公司,美国)。

1.3 方法

1.3.1 免疫荧光 将组织置于0.3%Triton X-100中处理20 min后,使用5%山羊血清封闭1 h。弃封闭液,加入一抗4℃过夜孵育。次日弃一抗,使用PBS冲洗,室温避光孵育荧光二抗1 h。弃二抗,PBS冲洗后,加入DAPI染液避光孵育15 min。PBS冲洗后,倒置荧光显微镜下拍照。使用ImageJ软件对荧光区域、面积以及荧光整合强度进行量化分析。

1.3.2 过表达质粒及小干扰RNA的合成 TGFBI过表达质粒、阴性对照质粒选取pcDNA3.1载体,由上海吉满生物有限公司合成。TGFBI小干扰RNA序列:CCUUUACGAGACCCUGGGA,由上海吉满生物有限公司合成。

1.3.3 细胞培养 将HemECs细胞培养于含5%胎牛血清、1%青链霉素混合的ECM培养基中,置于37℃、5%CO₂孵箱中,2 d换液一次,细胞生长至80%~90%时,使用含EDTA的胰酶消化,并传代。

1.3.4 细胞转染及效果验证 消化HemECs,调整细胞密度 1×10^5 个·mL⁻¹,接种于六孔板中。按照Lipofectamine 3000说明书将2 μg质粒(或0.025 nmol小干扰RNA)和5 μL P3000™ Reagent(小干扰RNA转染时不加入该试剂)、5 μL Lipofectamine 3000分别于Opti-MEM中混匀孵育5 min后,将质粒(或小干扰RNA)、P3000™ Reagent(小干扰RNA转染时不加入该试剂)及Lipofectamine 3000混合至同一管内,共同孵育20 min,加入至细胞已贴壁且状态良好的6孔板中。6 h后换液,于48~72 h进行转染效率验证及后续的功能实验(各组同时操作,时间统一)。

1.3.5 蛋白质印迹(Western blot)检测 提取转染后HemECs的总蛋白,通过BCA法确定蛋白浓度,确定上样量。电泳、转膜后,室温摇床上牛奶封闭1 h, TBST缓冲液冲洗10 min,重复冲洗3次后,放入对应一抗(1:2 000)中,4℃摇床孵育过夜。TBST洗膜3次,每次10 min,加入二抗(1:5 000),室温摇床孵育1 h, TBST洗膜3次,每次10 min,曝光显影,分别检测TGFBI和微管蛋白(Tubulin)的蛋白表达水平。

1.3.6 实验分组 将转染了TGFBI过表达质粒的细胞记为OE组,将转染了阴性对照质粒的细胞记为NC组。将转染了TGFBI小干扰RNA的细胞记为si-TGFBI组,转染了阴性对照小干扰RNA的细胞记为si-NC组。

1.3.7 CCK-8试验检测细胞活性 消化细胞,并稀释细胞至 5×10^4 个·mL⁻¹,每孔接种100 μL于96孔板内,每组重复5孔,经转染后,在不同时间点(0、24、48、72、96 h)加入10 μL CCK-8试剂,细胞孵箱内继续培养2 h后,使用酶标仪于450 nm波长处,检测光密度(optical density, OD)值。

1.3.8 EdU试验检测细胞增殖率 消化细胞,并稀释细胞至 5×10^4 个·mL⁻¹,每孔接种100 μL于96孔板内,每组重复3孔,经转染后,加入EdU试剂(50 μmol·L⁻¹)孵箱内孵育2 h后, PBS冲洗细胞5 min;弃PBS后,每孔加入4%多聚甲醛,室温固定30 min,弃固定液;每孔加入50 μL甘氨酸(2 mg·mL⁻¹),脱色摇床孵育5 min,弃甘氨酸;每孔加入100 μL PBS冲洗一次,脱色摇床孵育5 min;每孔加入100 μL 0.5%TritonX-100,脱色摇床孵育10 min;PBS冲洗一次,脱色摇床孵育5 min;每孔加入100 μL Apllo染色反应液,避光室温孵育30 min;弃反应液,每孔加入100 μL 0.5%TritonX-100,脱色摇床孵育10 min,重复2次。弃TritonX-100,每孔加入100 μL双苯并咪唑H33342三盐酸盐(Hoechst33342)反应液进行DNA染色,避光、室温于脱色摇床孵育30 min,弃反应液;PBS冲洗2次后,倒置荧光显微镜下拍照,记录阳性细胞比例。

1.3.9 Transwell实验检验细胞迁移能力 将OE组与NC组、si-TGFBI组与si-NC组细胞饥饿处理24 h后,消化细胞,使用无血清培养基稀释至 5×10^4 个·mL⁻¹,并取300 μL接种于上室。下室加入500 μL含10%血清的培养基。孵箱中培养24 h后,弃培养基, PBS冲洗一次;擦去上室内未迁移细胞,4%多聚甲醛室温固定30 min;PBS冲洗一次;

结晶紫室温染色 20 min; PBS 冲洗一次, 奥林巴斯显微镜镜下拍照, 记录迁移细胞数目。

1.3.10 管腔形成实验 检验细胞的管腔形成能力 将高浓度基质胶 1:1 稀释后, 取 50 μL 加入 96 孔板, 重复 5 孔, 放入孵箱孵育 30 min, 等待凝固。消化细胞, 稀释细胞至 7.5×10^4 个 \cdot mL⁻¹, 每孔 200 μL 接种于基质胶已凝固的 96 孔板。每 1 h 在显微镜下拍照记录管腔形成状态。使用 ImageJ 软件对镜下照片进行分析, 统计分析其节点数、网眼数和分支长度。

1.3.11 细胞外酸化速率 (extracellular acidification rate, ECAR) 试验检测糖酵解水平 消化细胞, 并稀释细胞至 5×10^4 个 \cdot mL⁻¹, 每孔接种 100 μL 于 96 孔板内, 经转染后, 放入无 CO₂ 孵箱孵育 1 h。依次向探针板内加入葡萄糖、寡霉素、2-脱氧葡萄糖 (2-deoxy-glucose, 2-DG), 并与细胞板同时放入代谢检测仪, 设置程序分别于 1 min 时开始程序, 14 min 时加入葡萄糖, 34 min 时加入寡霉素, 54 min 时加入 2-DG。使用 Seahorse XF96 Wave 软件分析代谢数据, 通过获取不同时间点的 ECAR

数据, 使用 Seahorse XF96 Wave 软件程序计算并比较各组细胞的糖酵解速率 (glycolysis)、糖酵解容量 (glycolytic capacity)、糖酵解储备 (glycolytic reserve)。计算公式: 糖酵解速率=加入寡霉素前的最大 ECAR-加入葡萄糖前最后时间的 ECAR; 糖酵解容量=加入寡霉素后的最大 ECAR-加入葡萄糖前最后时间的 ECAR; 糖酵解储备=糖酵解容量-糖酵解速率。

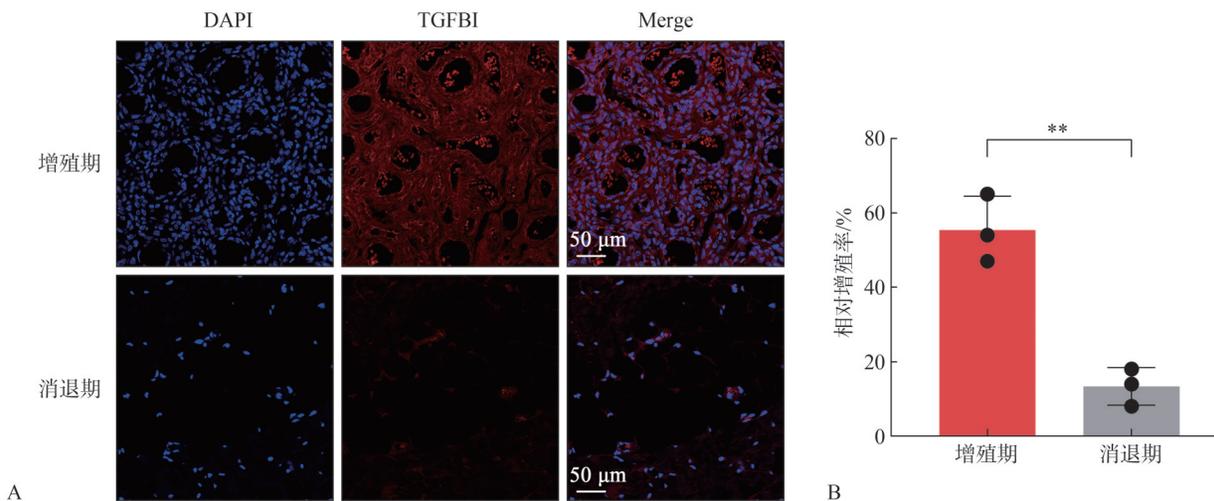
1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行处理和分析。计量资料采用均数±标准差表示。组间差异比较采用 t 检验, P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGFBI 在增殖期和消退期 IH 中的表达

TGFBI 广泛表达于胞质和细胞外基质内 (图 1A), 在增殖期 IH 的表达水平高于消退期 IH (P<0.01) (图 1B)。



A: 免疫荧光染色; B: 相对增殖率, **P<0.01。

图 1 IH 组织 TGFBI 表达

Fig 1 The expression levels of TGFBI in IH samples

2.2 细胞转染效率

Western blot 检测结果显示, OE 组 TGFBI 表达

水平高于 NC 组, si-TGFBI 组 TGFBI 表达水平低于 si-NC 组 (图 2)。

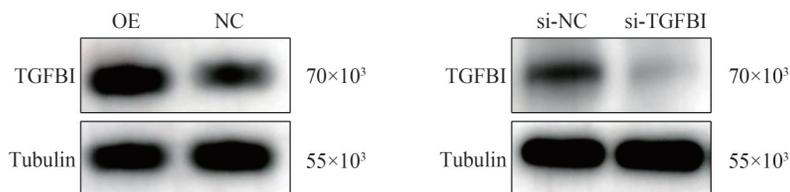


图 2 Western blot 检测 HemECs 转染效率

Fig 2 Western blot showed the transfection efficiency of TGFBI in HemECs

2.3 细胞活力比较

CCK-8 试验结果显示, OE 组细胞活力高于

NC 组 ($P<0.01$), si-TGFBI 组细胞活力低于 si-NC 组 ($P<0.01$) (图3)。

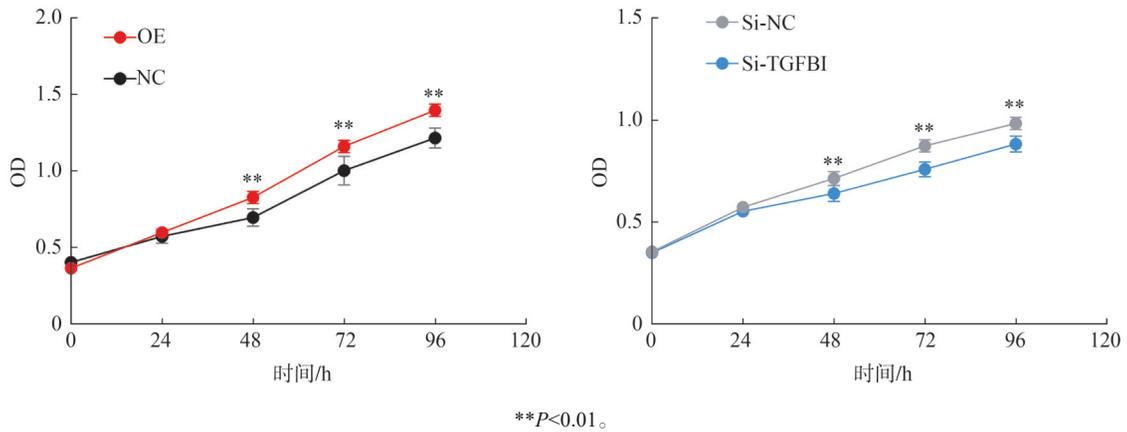


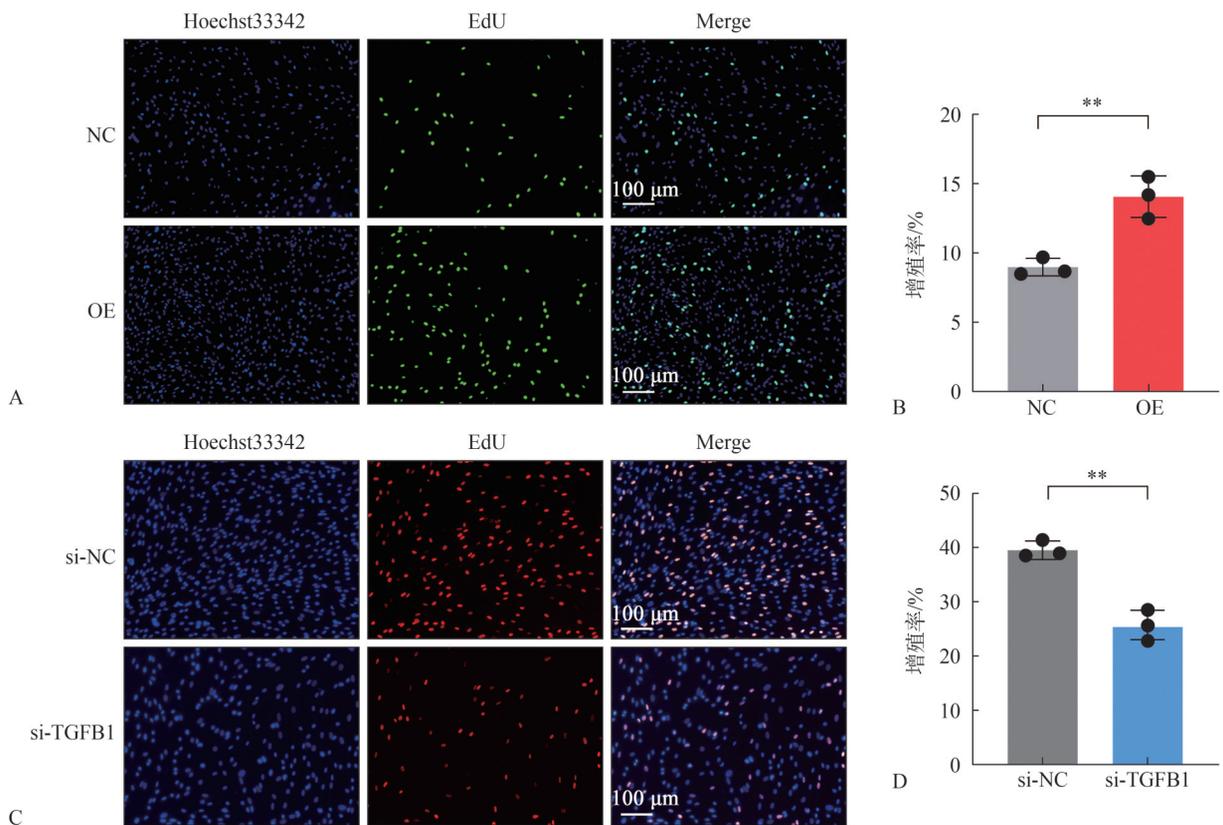
图 3 CCK-8 试验检测 HemECs 活性

Fig 3 CCK-8 assay results showed the viability of HemECs

2.4 细胞增殖率比较

EdU 试验结果显示, OE 组阳性细胞数多于 NC 组, 细胞增殖率升高 ($P<0.01$) (图 4A、B);

si-TGFBI 组阳性细胞数显著少于 si-NC 组 ($P<0.01$) (图 4C、D)。



A、C: 倒置荧光显微镜; B、D: 增殖率, ** $P<0.01$ 。

图 4 EdU 试验检测 HemECs 增殖率

Fig 4 EdU assay results showed the proliferation ability of HemECs

2.5 细胞迁移能力比较

Transwell 细胞迁移试验结果显示, OE 组迁移细胞数高于 NC 组, 迁移能力增强 ($P<0.01$) (图 5A、B); siTGFBI 组迁移细胞数低于 si-NC 组, 迁

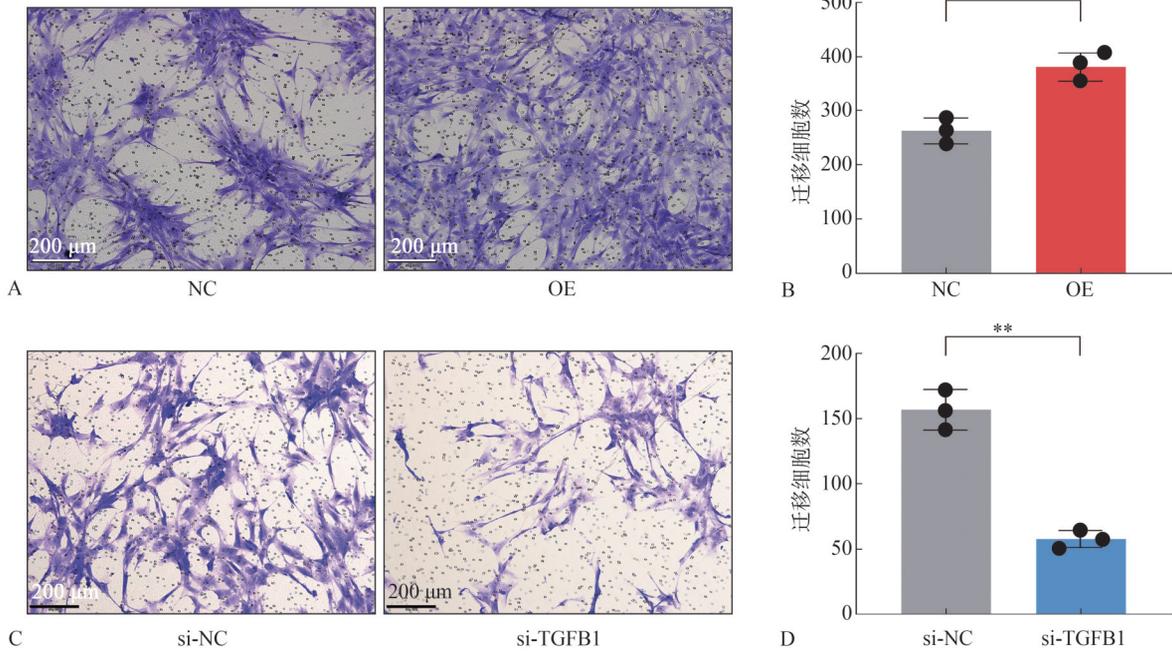
移能力减弱 ($P<0.01$) (图 5C、D)。

2.6 细胞管腔形成能力比较

管腔形成试验结果显示, OE 组管腔结构形态优于 NC 组 (图 6A), 节点数 (图 6B)、网眼数

(图 6C)、分支长度 (图 6D) 高于 NC 组 (* P < 0.05, ** P <0.01); si-TGFB1 组管腔结构形态劣于

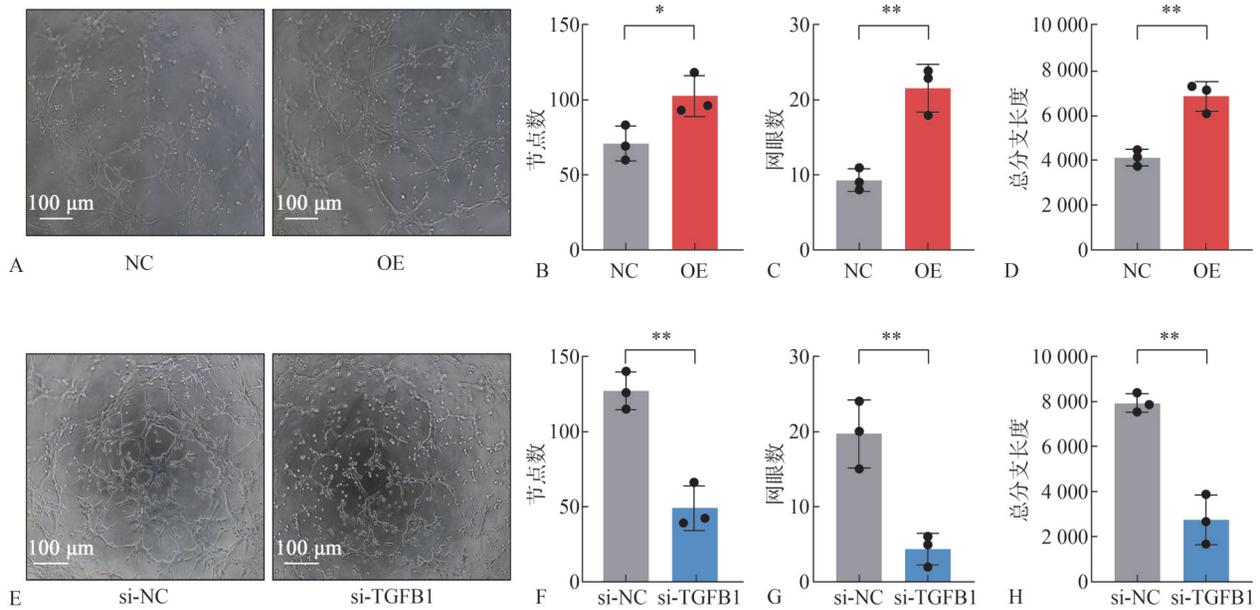
si-NC 组 (图 6E), 节点数 (图 6F)、网眼数 (图 6G)、分支长度 (图 6H) 低于 si-NC 组 (P <0.01)。



A、C: Transwell 试验; B、D: 迁移细胞数, ** P <0.01。

图 5 Transwell 试验检测 HemECs 迁移能力

Fig 5 Transwell assay results showed the migration ability of HemECs



A、E: 管腔形成试验; B、F: 节点数分析; C、G: 网眼数分析; D、H: 分支长度分析。* P <0.05, ** P <0.01。

图 6 管腔形成实验检测 HemECs 管腔形成能力

Fig 6 Tube formation assay results showed the angiogenic capacity of HemECs

2.7 细胞糖酵解水平比较

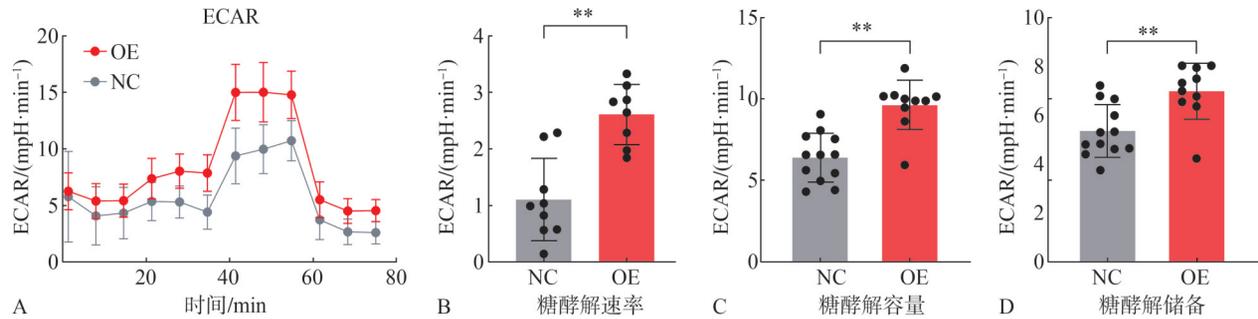
ECAR 试验结果显示, OE 组糖酵解水平高于 NC 组 (图 7A)。OE 组糖酵解速率 (图 7B)、糖酵解容量 (图 7C)、糖酵解储备 (图 7D) 均高于 NC 组 (P <0.01)。

3 讨论

IH 是婴幼儿颌面部最常见的脉管源性肿瘤, 发病率 5%~10%, 通常表现为血管新生和血管生

成的失调^[11]。未经治疗的IH常会导致瘢痕、出血、感染、呼吸道阻塞等严重并发症^[2]。目前IH的治疗方式主要为药物治疗,其中普萘洛尔是一线首选药。然而普萘洛尔在临床应用过程中依旧存在许多问题,如不良反应明显,存在潜在神经

毒性,治疗效果个体差异大,药物利用率低等^[4,12]。然而由于IH的发生发展机制不明,新药物的开发陷于停滞。因此研究IH的发生发展机制,寻找有效的治疗靶点对于IH的治疗至关重要。



A: ECAR 试验; B: 糖酵解速率分析; C: 糖酵解容量分析; D: 糖酵解储备分析。* $P<0.01$ 。

图 7 ECAR 试验检测 HemECs 糖酵解水平

Fig 7 ECAR assays results showed the glycolysis level of HemECs

研究^[13-14]发现,在低氧条件下,HemECs中低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, HIF-1 α)表达升高,并上调其下游蛋白基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloprotein 9, MMP-9)、血管内皮生长因子A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、胰岛素样生长因子2 (insulin-like growth factor 2, IGF-2)和葡萄糖转运蛋白1 (glucose transporter 1, GLUT-1)等,这些因子都起到了促进血管生成的作用。因此,低氧及其诱导的HIF-1 α 通路的激活被认为是IH的起始因素。其中被HIF-1 α 激活的VEGF/VEGFR信号通路,则被认为是调控IH发展最重要的途径之一^[15]。HemECs与IH干细胞之间相互作用的VEGF/VEGFR-2轴,激活了下游MAPK/ERK、phospholipase C- γ /intracellular Ca²⁺/PKC、PI3K/Akt等一系列对促进血管生成起重要作用的通路^[16-18]。

TGFBI是TGF- β 通路的下游反应蛋白,通常分布于细胞外基质,在许多肿瘤组织中高表达,可参与调控肿瘤细胞的多种生物学行为^[19]。TGFBI对于肿瘤发展的促进作用,主要通过其RGD模体,与肿瘤细胞膜表面的 $\alpha v\beta 5$ 受体结合,激活其下游的整合素受体通路,促进肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等能力^[7-8]。研究^[8]显示,TGFBI也同时参与肿瘤细胞的葡萄糖代谢。TGFBI与 $\alpha v\beta 5$ 受体结合后,激活FAK信号通路,调节HIF-1 α 的表达,并最终增强细胞内的糖酵解水平。糖酵解是HemECs重要的能量来源,IH的细胞增殖、迁移、管腔形成能

力都与其细胞的糖酵解水平密切相关^[20]。这些研究提示,TGFBI可能对IH的发生发展也起到重要的调节作用。

本研究结果显示,TGFBI在增殖期的表达显著高于消退期,这表明TGFBI可能参与调控IH发生发展。IH在快速增殖期迅速发展,与细胞增殖加快密不可分。当通过过表达质粒使TGFBI在HemECs内过表达后,CCK-8试验和EdU细胞增殖实验结果表明,TGFBI的过表达可诱导HemECs的增殖速度加快,促进IH的进展。细胞迁移在血管生成过程中起到重要作用,因此进行细胞迁移试验检测HemECs的迁移能力变化。Transwell结果表明,TGFBI的过表达也可诱导HemECs的迁移能力增强。管腔形成实验直接反映了HemECs的管腔形成能力和体外血管形成能力,是最重要的检测指标。管腔形成实验结果表明,TGFBI的过表达,可显著增强HemECs形成管腔的能力,这有力的证明了TGFBI在促进IH血管生成和发生发展过程中起到的重要作用。使用小干扰RNA对TGFBI进行敲低,并重复上述实验,发现敲低TGFBI抑制了细胞的活力、增殖、迁移和成管能力。在ECAR实验中,TGFBI的过表达增强了HemECs的糖酵解速率、糖酵解容量和糖酵解储备,这提示TGFBI对HemECs生物学行为的促进作用,可能是通过上调细胞内糖酵解水平实现的。

综上所述,本研究通过组织和细胞水平实验,发现了TGFBI在增殖期IH中的高表达水平,证实了TGFBI在促进IH发展过程中起到的重要作用,

并进一步探究了TGFBI对HemECs糖酵解能力的增强作用,并预测TGFBI可能是通过调控糖酵解来影响IH进展的。靶向抑制TGFBI的表达可能成为抑制IH快速发展的新的有效的方式,这为IH的治疗提供了新的思路和方向。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Leaute-Labreze C, Harper JJ, Hoeger PH. Infantile haemangioma[J]. *Lancet*, 2017, 390(10089): 85-94.
- [2] Itinteang T, Withers AH, Davis PF, et al. Biology of infantile hemangioma[J]. *Front Surg*, 2014, 1: 38.
- [3] Zavras N, Dimopoulou A, Machairas N, et al. Infantile hepatic hemangioma: current state of the art, controversies, and perspectives[J]. *Eur J Pediatr*, 2020, 179(1): 1-8.
- [4] Koh SP, Leadbitter P, Smithers F, et al. B-blocker therapy for infantile hemangioma[J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2020, 13(8): 899-915.
- [5] Skonier J, Neubauer M, Madisen L, et al. cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta[J]. *DNA Cell Biol*, 1992, 11(7): 511-522.
- [6] Thapa N, Lee BH, Kim IS. TGFBIp/betaig-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(12): 2183-2194.
- [7] Ma C, Rong Y, Radloff DR, et al. Extracellular matrix protein betaig-h3/TGFBI promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(3): 308-321.
- [8] Costanza B, Rademaker G, Tiamiou A, et al. Transforming growth factor beta-induced, an extracellular matrix interacting protein, enhances glycolysis and promotes pancreatic cancer cell migration[J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(6): 1570-1584.
- [9] Chiavarina B, Costanza B, Ronca R, et al. Metastatic colorectal cancer cells maintain the TGFβ program and use TGFBI to fuel angiogenesis[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1626-1640.
- [10] Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varnier JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(8): 604-617.
- [11] Laken PA. Infantile hemangiomas: pathogenesis and review of propranolol use[J]. *Adv Neonatal Care*, 2016, 16(2): 135-142.
- [12] Goelz R, Poets CF. Incidence and treatment of infantile haemangioma in preterm infants[J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2015, 100(1): F85-F91.
- [13] Drolet BA, Frieden IJ. Characteristics of infantile hemangiomas as clues to pathogenesis: does hypoxia connect the dots[J]. *Arch Dermatol*, 2010, 146(11): 1295-1299.
- [14] Boye E, Olsen BR. Signaling mechanisms in infantile hemangioma[J]. *Curr Opin Hematol*, 2009, 16(3): 202-208.
- [15] Przewratil P, Sitkiewicz A, Andrzejewska E. Local serum levels of vascular endothelial growth factor in infantile hemangioma: intriguing mechanism of endothelial growth[J]. *Cytokine*, 2010, 49(2): 141-147.
- [16] Przewratil P, Kobos J, Wnęk A, et al. Serum and tissue profile of VEGF and its receptors VEGFR1/R2 in children with infantile hemangiomas on systemic propranolol treatment[J]. *Immunol Lett*, 2016, 175: 44-49.
- [17] Gupta K, Kshirsagar S, Li W, et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 247(2): 495-504.
- [18] Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(46): 30336-30343.
- [19] Corona A, Blobel GC. The role of the extracellular matrix protein TGFBI in cancer[J]. *Cell Signal*, 2021, 84: 110028.
- [20] Chen J, Wu D, Dong Z, et al. The expression and role of glycolysis-associated molecules in infantile hemangioma[J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118215.

(本文编辑 李彩)