

网络出版时间: 2019-1-11 14:06 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.009.html>

Smad4 对 HEC 凋亡的影响及机制研究

李 飞, 周志强, 吴成稳, 康海涵, 梁晓丹, 蔡亚征, 张 毅

摘要 目的 探讨胰腺癌缺失基因(DPC4/Smad4)对增生期血管瘤内皮细胞(HEC)凋亡的影响。方法 分离培养 HEC 在细胞中转染 Smad4 真核表达载体, qRT-PCR 和 Western blot 法检测转染后的细胞中 Smad4 mRNA 及蛋白表达。MTT 法测定 Smad4 对 HEC 增殖的影响, 流式细胞仪测定 Smad4 对 HEC 周期和凋亡的影响, Western blot 法检测细胞中剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved Caspase-3) 和细胞周期依赖性蛋白激酶 4 (CDK4)、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 蛋白水平, 二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA)法检测 Smad4 对 HEC 中活性氧(ROS)水平的影响。结果 Smad4 真核表达载体能够促进 HEC 中 Smad4 mRNA 和蛋白表达。过表达 Smad4 后的 HEC 增殖活性降低, G0/G1 期细胞增多, 细胞凋亡率也升高, 细胞中 Cleaved Caspase-3 水平升高, 细胞中 CDK4、Cyclin D1 蛋白水平下降, 细胞中 ROS 水平升高, 与正常培养的 HEC 比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Smad4 诱导 HEC 凋亡, 抑制 HEC 增殖, 阻滞细胞周期, 机制与促进 Caspase-3 活化并减少 CDK4、Cyclin D1 蛋白表达, 促进细胞合成 ROS 有关。

关键词 增生期 HEC; 凋亡; Smad4; 周期

中图分类号 R 730.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)02-0207-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.009

血管瘤(hemangioma, HEM)是一种良性肿瘤, 不仅影响患者的容貌, 还能够影响相关组织器官正常功能的发挥, HEM 有较为明显的消退期、平台期和增生期, 头颈部的发病率最高, 血管瘤内皮细胞(hemangioma endothelial cells, HEC)是 HEM 发生主要原因, 诱导 HEC 凋亡是治疗 HEM 的重要途径^[1-2]。胰腺癌缺失基因(deleted in pancreatic cancer locus 4, DPC4/Smad4)有诱导细胞凋亡, 抑制细胞生长的作用, 在白血病细胞、前列腺癌细胞、脐静脉内皮细胞等多种细胞中已经证实^[3-5]。Smad4 在增生期 HEM 组织中的表达水平低于退化期 HEM

组织, Smad4 可能参与 HEC 凋亡^[6]。该实验通过体外分离培养增生期的 HEC, 通过细胞转染的方法上调 HEC 中 Smad4 的表达, 探讨 Smad4 在增生期 HEC 凋亡中的作用, 为明确 HEM 发生机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)法活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量测定试剂盒购自上海翊圣生物公司; pcDNA3.1-Smad4 由郑州大学第二附属医院中心实验室构建; Lipofectamine 2000 购自美国 invitrogen 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司; ECL 显色试剂购自北京 Solarbio 公司; 细胞周期测定试剂盒、细胞凋亡测定试剂盒购自上海碧云天公司; 剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, Cleaved Caspase-3) 抗体购自美国 CTS 公司; 细胞周期依赖性蛋白激酶 4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 抗体购自天津 saierbio 公司; Smad4 抗体购自美国 ABACM 公司。

1.2 HEC 分离培养及分组 新鲜增生期 HEM 组织标本来自郑州大学第二附属医院, 组织采集经患者及家属同意。增生期 HEC 分离培养步骤同文献^[7]。取增生期 HEM 组织, 用 PBS 反复洗涤至溶液清亮, 把周围的皮肤和脂肪组织去除, 剪成大小约为 1~2 cm³ 的组织碎块, 置于 0.25% 的胰蛋白酶中, 在 37 ℃ 的水浴中消化 20 min。用含胎牛血清的 M199 终止消化, 把消化后的组织块剪碎成 ≤1 mm × 1 mm × 1 mm 的小碎块, 种植到培养瓶内, 把培养瓶倒置培养 10 min 后, 加入培养液, 使培养液完全覆盖组织块, 3 d 后换液, 6 d 后把组织块清除掉, 9 d 传代培养(0.25% 胰蛋白酶传代)。HEC 中转染 pcDNA3.1、pcDNA3.1-Smad4 记为 pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-Smad4 组, 同时把未做转染处理的 HEC 记为 Control 组, 具体转染方法同 Lipofectamine 2000 脂质体转染说明书。

2018-09-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81171986)

作者单位: 郑州大学第二附属医院血管外科, 郑州 450000

作者简介: 李 飞, 男, 医师, 硕士;

周志强, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: qiang6364@soho.com

1.3 qRT-PCR 测定 HEC 中 Smad4 表达 Control、pcDNA3.1、pcDNA3.1-Smad4 组细胞培养 24 h，以每 10⁶ 个细胞添加 1 ml 的 TRIzol 将各组 HEC 裂解以后，与 200 μl 的氯仿混合后，吸取上层水相溶液，再与 500 μl 的异丙醇混合，低温，高速离心后，用 75% 的乙醇洗涤 RNA，用 RNase-free 水溶解后，测定吸光度 (optical density, OD) 值 260 nm 和 OD 280 nm 的比值，比值介于 1.8 ~ 2.0 之间。逆转录合成 cDNA，反应条件为：25 °C、5 min；42 °C、60 min；75 °C、5 min。取 cDNA，进行荧光定量 PCR 扩增，步骤同试剂盒说明书，用 2^{-ΔΔCt} 法计算各组样品中 Smad4 水平，GAPDH 为参照。

1.4 Western blot 测定 HEC 中 Smad4 表达 Control、pcDNA3.1、pcDNA3.1-Smad4 组细胞培养 24 h，用预冷的 PBS 洗涤后，每个细胞瓶中添加含有 PMSF 的裂解液 500 μl，放在冰上裂解 30 min 后，低温高速离心 10 min。把上清液转移至 EP 管中，用 BCA 法检测蛋白浓度，进行 SDS-PAGE 蛋白电泳，电泳电压为 90 V，每孔上样量为 30 μg。用半干法把凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上，100 mA 电流转膜 50 min。用 5% 牛血清白蛋白封闭后与抗体孵育，Smad4 一抗 1 : 600 稀释，GAPDH 一抗 1 : 1 000 稀释，二抗 1 : 2 000 稀释，DAB 显色。对蛋白条带进行半定量分析，目的蛋白同 GAPDH 内参蛋白灰度值的比值表示目的蛋白水平。

1.5 MTT 测定 HEC 增殖活性 Control、pcDNA3.1、pcDNA3.1-Smad4 组细胞种植到 96 孔板中，在第 24、48、72、96 小时取出培养板，在细胞内加 MTT 溶液，培养 4 h，将上清液去掉，再添加 DMSO，用酶标仪检测每孔在 490 nm 的 OD 值。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期 Control、pcDNA3.1、pcDNA3.1-Smad4 组细胞在转染以后 24 h，用胰蛋白酶消化，转移到流式管内，低速离心 10 min，把上清液去掉，添加 75% 甲醇，置于 4 °C 过夜反应，低速离心 10 min，加入 PI，置于 4 °C 反应 30 min，流式细胞仪测定 HEC 周期。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 Control、pcDNA3.1、pcDNA3.1-Smad4 组细胞在转染以后 24 h，用胰蛋白酶消化，与 400 μl 的结合缓冲液混合后，再与 PI 和 Annexin V-FITC 反应后，流式细胞仪检测 HEC 凋亡。

1.8 Western blot 检测细胞中 Cleaved Caspase-3、CDK4、Cyclin D1 蛋白水平 Control、pcDNA3.1、pcDNA3.1-Smad4 组细胞在转染以后 24 h，用胰蛋

白酶消化，Western blot 法检测 Cleaved Caspase-3、CDK4、Cyclin D1 蛋白水平，Cleaved Caspase-3、CDK4、Cyclin D1 一抗以 1 : 600 稀释，其他步骤同上。

1.9 DCFH-DA 法检测细胞中 ROS 水平 Control、pcDNA3.1、pcDNA3.1-Smad4 组细胞在转染以后 24 h，用 DCFH-DA 法检测细胞中 ROS 水平，步骤同 ROS 含量测定试剂盒，以 Control 组为 1，分析各组细胞 ROS 水平。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组差异比较用单因素方差分析，组间比较用 LSD-t 检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞转染后 HEC 中 Smad4 表达 HEC 中转染 pcDNA3.1-Smad4 后，细胞中 Smad4 mRNA 和蛋白水平均升高，而转染 pcDNA3.1 对 HEC 中 Smad4 mRNA 和蛋白水平没有影响，见图 1、表 1。

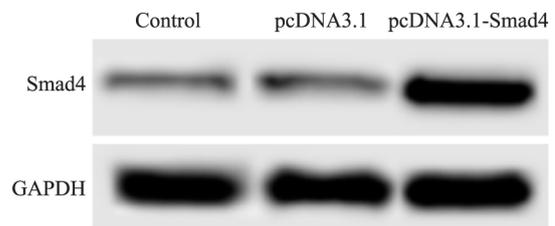


图 1 Western blot 测定转染后的 HEC 中 Smad4 蛋白表达情况

表 1 各组 HEC 中 Smad4 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Smad4 mRNA	Smad4 蛋白
Control	1.00	0.15 ± 0.06
pcDNA3.1	1.01 ± 0.13	0.17 ± 0.05
pcDNA3.1-Smad4	2.78 ± 0.25*	0.76 ± 0.09*
F 值	119.044	76.120
P 值	0.000	0.000

与 Control 组比较：* *P* < 0.05

2.2 Smad4 对 HEC 增殖的影响 HEC 中转染 pcDNA3.1-Smad4 后，细胞 OD 值降低，而转染 pcDNA3.1 对 HEC OD 值没有影响，见表 2。过表达 Smad4 可以降低 HEC 的增殖活性。

2.3 Smad4 对 HEC 周期的影响 HEC 中转染 pcDNA3.1-Smad4 后，细胞 G₀/G₁ 期比例升高，而转染 pcDNA3.1 对 HEC 周期没有影响，见表 3。过表达 Smad4 可以将 HEC 周期阻滞在 G₀/G₁ 期。

2.4 Smad4 对 HEC 凋亡的影响 HEC 中转染 pcD-

表2 各组 HEC OD 值($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	0.21 ± 0.02	0.43 ± 0.08	0.79 ± 0.07	0.93 ± 0.08
pcDNA3.1	0.23 ± 0.05	0.43 ± 0.07	0.80 ± 0.05	0.90 ± 0.12
pcDNA3.1-Smad4	0.16 ± 0.02*	0.23 ± 0.04*	0.28 ± 0.03*	0.29 ± 0.04*
F 值	6.091	9.302	95.892	52.406
P 值	0.036	0.015	0.000	0.000

与 Control 比较: * $P < 0.05$

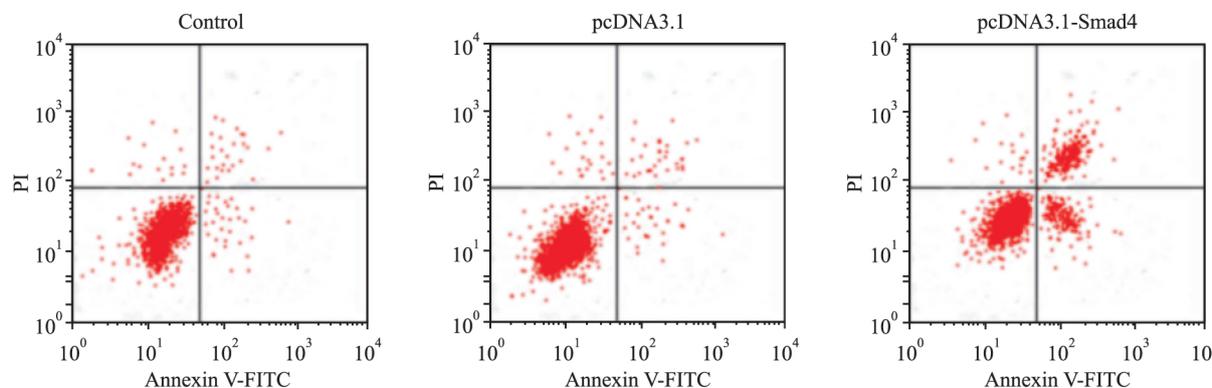


图2 流式细胞仪测定 Smad4 诱导的 HEC 凋亡情况

NA3.1-Smad4 后,细胞凋亡率升高,而转染 pcDNA3.1 对 HEC 凋亡率没有影响,见图2、表4。过表达 Smad4 诱导 HEC 凋亡。

表3 各组 HEC 周期($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期		
	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
Control	56.63 ± 4.17	25.93 ± 3.45	16.44 ± 1.04
pcDNA3.1	55.32 ± 6.85	26.49 ± 3.67	17.19 ± 1.26
pcDNA3.1-Smad4	72.73 ± 5.78*	18.64 ± 1.46	11.63 ± 1.28
F 值	8.658	6.276	19.017
P 值	0.017	0.034	0.003

与 Control 组比较: * $P < 0.05$

表4 各组 HEC 凋亡率($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率 (%)
Control	10.32 ± 1.25
pcDNA3.1	10.05 ± 0.83
pcDNA3.1-Smad4	32.64 ± 2.87*
F 值	144.241
P 值	0.000

与 Control 组比较: * $P < 0.05$

2.5 Smad4 对 HEC 中 Caspase-3、CDK4、Cyclin D1 表达的影响 HEC 中转染 pcDNA3.1-Smad4 后,细胞中 Cleaved Caspase-3 水平升高,CDK4、Cyclin D1 蛋白水平下降,而转染 pcDNA3.1 对 HEC 中 Cleaved Caspase-3、CDK4、Cyclin D1 蛋白水平没有

影响,见图3、表5。过表达 Smad4 诱导 HEC 中 Caspase-3 活化,减少细胞中 CDK4、Cyclin D1 蛋白表达。

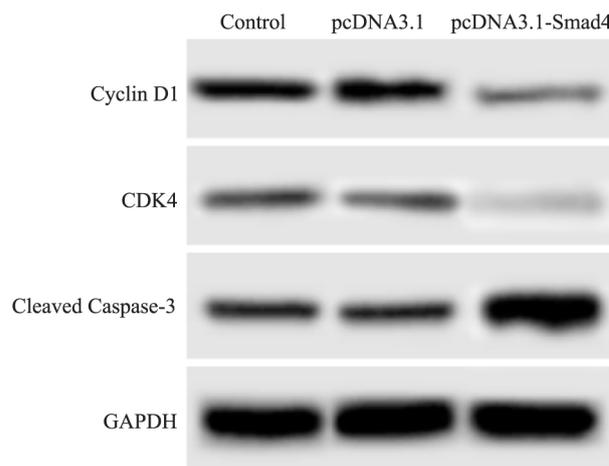


图3 Western blot 检测 HEC 中 Cleaved Caspase-3、CDK4、Cyclin D1 蛋白水平

2.6 Smad4 对 HEC 中 ROS 水平的影响 Control、pcDNA3.1、pcDNA3.1-Smad4 组细胞中 ROS 水平依次为:1.00、(1.01 ± 0.07)、(1.76 ± 0.18) 3 组比较差异有统计学意义 ($F = 45.853, P = 0.000$)。HEC 中转染 pcDNA3.1-Smad4 后,细胞中 ROS 水平升高,而转染 pcDNA3.1 对 HEC 中 ROS 水平没有影响,见图4。过表达 Smad4 诱导 HEC 中 ROS 合成。

表5 各组 HEC 中 Cleaved Caspase-3、CDK4、Cyclin D1 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Cleaved Caspase-3	CDK4	Cyclin D1
Control	0.34 ± 0.06	0.25 ± 0.04	0.51 ± 0.06
pcDNA3.1	0.32 ± 0.05	0.23 ± 0.08	0.52 ± 0.04
pcDNA3.1-Smad4	0.91 ± 0.08*	0.11 ± 0.02*	0.20 ± 0.03*
F 值	80.808	6.143	48.836
P 值	0.000	0.035	0.000

与 Control 组比较: * P < 0.05

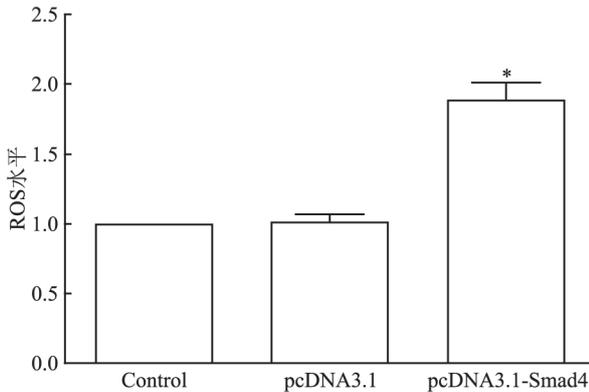


图4 各组 HEC 中 ROS 水平
与 Control 组比较: * P < 0.05

3 讨论

本实验的结果显示, Smad4 过表达后的 HEC 中 CDK4 和 Cyclin D1 蛋白表达水平降低, 细胞周期被阻滞在 G₀/G₁ 期, 提示 Smad4 通过减少 CDK4 和 Cyclin D1 表达阻滞 HEC 周期, 抑制 HEC 增殖; 同时结果还表明, Smad4 过表达后的 HEC 中 Caspase-3 活化增多, 细胞凋亡率升高, 提示 Smad4 可以通过激活 Caspase-3 的活化诱导 HEC 凋亡; Smad4 诱导 HEC 中 ROS 水平升高, 这可能是 Smad4 诱导 HEC 凋亡的机制之一。

Smad 名字来源于果蝇 Mad 蛋白和线虫 Sma 蛋白, Smad 蛋白家族在信号转导中发挥重要作用, 是与转化生长因子 β (transforming growth factor-β, TGF-β) 有关的效应因子, 参与细胞内信号转导过程。在哺乳动物体内发现了至少 9 种 Smad 蛋白成员, Smad4 是目前确认的共同通道型 Smad, 是一种抑癌基因, 可以与几乎所有的活化途径 Smad 蛋白相结合, 形成低聚体的复合物, 在 TGF-β 信号调节中发挥关键作用^[8]。Smad4 含有一个 MH2 结构域, MH2 由 β 片层夹心、三环 α 螺旋和三螺旋束构成, 这个区域的氨基酸序列高度保守, 在分子识别中具

有重要作用, 而这个区域内蛋白与蛋白之间作用界面是突变发生的重要区域, 多数肿瘤在该区域内均有不同程度的突变^[9]。Smad4 的异常表达与胰腺癌等肿瘤的发生有关, 并且可以诱导细胞的凋亡, 降低细胞的增殖能力^[10]。TGF-β 与 HEC 的生长和凋亡有关, 而 Smad4 在增生期的 HEM 组织表达水平低于退化期的 HEM 组织, 提示 Smad4 可能参与 HEC 的凋亡^[6]。本实验结果证实了 Smad4 在 HEM 内皮细胞凋亡中的作用, 这与上述研究结果一致。

细胞周期可以分为细胞间期和分裂期, 而间期又可以分为 G₁ 期 (DNA 合成前期)、S 期 (DNA 合成期) 和 G₂ 期 (DNA 合成后期), M 期是细胞分裂期, G₀ 期是细胞停止分裂, 处于发挥其生物学功能阶段的细胞, 细胞周期的调控与细胞内周期蛋白有关, 其中 CDK4 和 Cyclin D1 表达减少可以诱导细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, Cyclin D1 能够与 CDK4 形成复合物, 诱导细胞进入 S 期^[11]。研究^[12]显示, Smad4 可以抑制子宫内膜癌细胞生长, 把细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 发挥抗肿瘤作用。Caspase 参与细胞凋亡调控, 是一个半胱氨酸蛋白酶家族, 几乎参与所有的细胞凋亡信号转导, 其蛋白家族的成员组成一个类似瀑布的反应, 诱导细胞凋亡的发生。Caspase-3 是该蛋白家族的重要成员之一, 在正常细胞和肿瘤细胞中其以没有活性的酶原存在, 而当诱导细胞凋亡的信号转导至 Caspase 反应后, Caspase-3 被激活, 诱导细胞凋亡发生^[13]。Smad4 可以激活 Caspase-3 最终诱导乳腺癌、胶质瘤等细胞凋亡^[14]。ROS 广泛存在于细胞内, 其既可以作用一种信号转导分子调控细胞生物学行为, 又可以维持细胞内的氧化平衡, 而当细胞内的 ROS 水平过度升高后, 会打破细胞内的氧化平衡状态, 对细胞造成损伤, 引起细胞凋亡发生^[15]。本实验结果证实 Smad4 可以通过提高 HEC 中 ROS 水平激活 Caspase 凋亡反应, 通过影响细胞周期调控蛋白的表达抑制 HEC 增殖, 这可能是 Smad4 抗 HEC 生长的机制。

综上所述, Smad4 在 HEM 生长中发挥抑制作用, Smad4 可能通过阻滞细胞周期抑制 HEC 增殖, 通过促进细胞中 ROS 积累激活 Caspase 凋亡反应诱导 HEC 凋亡发生, 这对于研究 Smad4 在 HEM 发生中的作用机制奠定了基础, 为研究 HEM 发生的作用机制提供了参考。本实验存在一定的局限性, Smad4 具体的靶向作用机制尚未研究, Smad4 的作用机制没有在体内进行验证, 后续实验将对上述部分进行探讨。

参考文献

- [1] Darrow D H, Greene A K, Mancini A J, et al. Diagnosis and management of infantile hemangioma [J]. *Pediatrics*, 2015, 136(4):786-91.
- [2] Keel S B, Rosenberg A E. Hemorrhagic epithelioid and spindle cell hemangioma: a newly recognized, unique vascular tumor of bone [J]. *Cancer*, 1999, 85(9):1966-72.
- [3] Zhong H, Wang H R, Yang S, et al. Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF- β pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line [J]. *Int J Hematol*, 2010, 92(1):129-35.
- [4] Jiang W, Zheng Y, Huang Z, et al. Role of SMAD4 in the mechanism of valproic acid's inhibitory effect on prostate cancer cell invasiveness [J]. *Int Urol Nephrol*, 2014, 46(5):941-6.
- [5] Zhou Q, Heinke J, Vargas A, et al. ERK signaling is a central regulator for BMP-4 dependent capillary sprouting [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 76(3):390-9.
- [6] 熊建明, 黄建华, 刘光强 等. TGF β R II 和 Smad4 在血管瘤组织中的表达 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(6):460-2.
- [7] Tsuneki M, Hardee S, Michaud M, et al. A hydrogel-endothelial cell implant mimics infantile hemangioma: modulation by survivin and the Hippo pathway [J]. *Lab Invest*, 2015, 95(7):765-80.
- [8] Whyte J, Glover J D, Woodcock M, et al. FGF, Insulin and SMAD signaling cooperate for Avian primordial germ cell self-renewal [J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 5(6):1171-82.
- [9] Cheng H, Fertig E J, Ozawa H, et al. Decreased SMAD4 expression is associated with induction of epithelial-to-mesenchymal transition and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(8):1252-8.
- [10] Blackford A, Serrano O K, Wolfgang C L, et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(14):4674-9.
- [11] Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, et al. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation [J]. *Mol Cell Biol* 2002, 22(12):4309-18.
- [12] 纪国欣, 王欣, 赵兴波 等. TGF- β 1 和 Smad4 基因转染对子宫内膜癌细胞 HHUA 体外增殖和凋亡的研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2007, 16(11):822-6.
- [13] 魏国丽, 周宇. 原花青素对结肠癌 HT-29 细胞凋亡及 Survivin、Caspase-3 和 Stat3 基因 mRNA 的影响 [J]. *广东医学院学报*, 2015, 33(3):255-7.
- [14] 刘楠楠, 李玉林, 李荣贵 等. 沉默 Smad4 基因对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2017, 43(5):887-92.
- [15] Jacquemin G, Margiotta D, Kasahara A, et al. Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(5):862-74.

Effect of Smad4 on apoptosis of HEC and its mechanism

Li Fei Zhou Zhiqiang, Wu Chengwen et al

(Dept of Vascular Surgery, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)

Abstract Objective To investigate the effect of Smad4 on the apoptosis of endothelial cells in hyperplastic hemangioma. **Methods** Endothelial cells of hemangioma were isolated and cultured in hyperplastic hemangioma, transfection of Smad4 eukaryotic expression vector in cells, the expression of Smad4 mRNA and protein in the transfected cells was detected by qRT-PCR and Western blot; MTT assay was used to determine the effect of Smad4 on the proliferation of endothelial cells in hemangioma; Flow cytometry was used to determine the endothelial cell cycle and apoptosis of hemangioma by Smad4; The level of Cleaved Caspase-3 and CDK4, Cyclin D1 protein in cells were detected by Western blot; The effect of Smad4 on the ROS level in endothelial cells of hemangioma was detected by DCFH-DA method. **Results** Smad4 eukaryotic expression vector could promote the expression of Smad4 mRNA and protein in endothelial cells of hemangioma, the proliferation activity of endothelial cells in hemangioma after overexpression of Smad4 reduced, cell proliferation in G₀/G₁ phase and the rate of apoptosis also increased, the level of Cleaved Caspase-3 in the cells elevated, the level of CDK4 and Cyclin D1 protein in the cells decreased, the level of ROS in the cells elevated, compared with the endothelial cells of normal cultured hemangioma, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Smad4 induces apoptosis, inhibition cell proliferation and block cell cycle of endothelial cells in hemangioma, mechanism related to promotion of Caspase-3 activation, reduction of CDK4, Cyclin D1 protein expression and promotion of cell synthesis of ROS.

Key words hyperplastic hemangioma endothelial cells; apoptosis; Smad4; cycle