

TRAF6 基因沉默对人视网膜母细胞瘤细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

薛雨顺, 石蕊, 杨乐, 周海燕, 陈丽萍, 柴蓉

基金项目: 陕西省科技厅社会发展攻关计划 (No. 2017SF-249)
作者单位: (710068) 中国陕西省西安市, 陕西省人民医院眼科
作者简介: 薛雨顺, 毕业于西安医科大学, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 白内障、眼底疾病。
通讯作者: 薛雨顺. xue257758@sina.com
收稿日期: 2017-08-03 修回日期: 2018-04-11

Effect of silencing TRAF6 gene on proliferation, apoptosis and invasion of retinoblastoma Y79 cells

Yu-Shun Xue, Rui Shi, Le Yang, Hai-Yan Zhou, Li-Ping Chen, Rong Chai

Foundation item: Science & Technology Project for Social Development of Shaanxi Province in China (No. 2017SF-249)
Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Yu-Shun Xue. Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China. xue257758@sina.com
Received: 2017-08-03 Accepted: 2018-04-11

Abstract

• AIM: To investigate the effect of tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6) on proliferation, apoptosis and invasion of retinoblastoma Y79 cells.
• METHODS: The Y79 cells were divided into three groups: blank control group, negative control group and TRAF6 siRNA group. After TRAF6 siRNA transfection, the levels of TRAF6 mRNA and protein in Y79 cells were examined by RT-PCR and Western blotting. MTT assay was used to detect cell proliferation. Flow cytometry was employed to detect changes in cell cycle and apoptosis. Cell invasiveness was detected by the Transwell method.
• RESULTS: Expression of TRAF6 mRNA and protein in the TRAF6 siRNA group significantly decreased compared with the negative and blank control groups. Following the silencing of TRAF6, cell proliferation was inhibited and the apoptosis rate increased; the cell cycle was arrested at G0/G1 phase; the number of cells in S phase was reduced, while the invasion ability of cancer cells decreased.
• CONCLUSION: Silencing TRAF6 may inhibit the proliferation of Y79 cells, promote cell apoptosis, arrest the cell cycle at G0/G1 phase and decrease the invasive ability. Thus, TRAF6 may be a potential target in therapy

for retinoblastoma.

• KEYWORDS: retinoblastoma; tumor necrosis factor receptor associated factor 6; proliferation; apoptosis; invasion

Citation: Xue YS, Shi R, Yang L, et al. Effect of silencing TRAF6 gene on proliferation, apoptosis and invasion of retinoblastoma Y79 cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(5):796-800

摘要

目的: 探讨体外沉默肿瘤坏死因子受体相关因子6 (TRAF6) 基因对人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。

方法: 靶向 TRAF6 基因的小干扰 RNA (TRAF6 siRNA) 转染 Y79 细胞, 采用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测转染效果, MTT 比色法及细胞克隆实验测定沉默 TRAF6 对 Y79 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期, Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力。

结果: Y79 细胞经 TRAF6 沉默后, TRAF6 mRNA 和蛋白表达水平与对照组相比均明显降低, 细胞存活率、克隆形成率均明显低于对照组细胞, 细胞凋亡率明显高于对照组, 同时细胞周期发生明显变化, G0/G1 期细胞数目增多, S 和 G2/M 期细胞数目减少, 且侵袭细胞数目、迁移细胞数目相对对照组明显减少。

结论: 沉默 TRAF6 后能显著抑制视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的生长, 促进肿瘤细胞的凋亡, 同时抑制其侵袭和迁移能力, TRAF6 可能是视网膜母细胞瘤治疗的新靶点。

关键词: 视网膜母细胞瘤; 肿瘤坏死因子受体相关因子6; 增殖; 凋亡; 侵袭

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.5.06

引用: 薛雨顺, 石蕊, 杨乐, 等. TRAF6 基因沉默对人视网膜母细胞瘤细胞增殖、凋亡和侵袭的影响. 国际眼科杂志 2018;18(5):796-800

0 引言

视网膜母细胞瘤常见于婴幼儿, 严重危害患儿的视力和生命, 5 岁以下儿童发病率较高。视网膜母细胞瘤常见的治疗方法有手术治疗、外部放疗等, 这些治疗手段虽然大大提高了患儿的生存率, 但是治疗失败的病例仍然很多, 其中国际视网膜母细胞瘤分类 D 类治疗失败率约高达 77%^[1-2]。探讨视网膜母细胞瘤的发病机制, 寻找有效的抗肿瘤辅助方法, 提高视网膜母细胞瘤患者的生存率是目前研究的重点。肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6, TRAF6) 是肿瘤

坏死因子受体家族中的成员,因其能够与肿瘤坏死因子结合而得名,其通过调控成骨细胞分化、神经系统发育等生理过程,参与糖尿病、肿瘤等疾病的发生发展过程^[3-4]。有研究表明,TRAF6在卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌等癌症组织中的蛋白表达水平高于正常组织,并与肿瘤的发生发展和预后息息相关^[5-8]。本研究运用MTT法、细胞克隆、流式细胞术、Transwell小室等多种实验方法,探讨沉默TRAF6对人视网膜母细胞瘤细胞增殖、凋亡和侵袭能力的影响,以期为临床治疗视网膜母细胞瘤提供新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 视网膜母细胞瘤 Y79 细胞购自中国科学院细胞库;TRAF6、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物由金斯瑞生物科技有限公司合成;Lipofectamine 2000 转染试剂为美国 Invitrogen 公司产品;RPMI 1640 培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素为美国 Gibco 公司产品;qRT-PCR 试剂盒为美国 GeneCopoeia 公司产品;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度检测试剂盒为碧云天生物技术研究所产品;TRAF6 单克隆抗体、GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物标记的二抗均为美国 Cell Signaling 公司产品;TRAF6 小干扰 RNA (TRAF6 siRNA) 和阴性对照序列 (siRNA control) 为上海义森生物科技有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 Y79 细胞自液氮中取出,迅速放到 37℃ 的水浴锅中,使细胞在 1min 内融化后,加入 10 倍体积的细胞培养液(含有 100U/mL 青霉素,100μg/mL 链霉素,10% 胎牛血清,80% RPMI 1640 培养基),800r/min 离心 10min,以 2×10^5 个/mL 种植于细胞培养瓶,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2d,细胞密度超过 80% 时,转移细胞悬液至离心管中,1000r/min 离心 10min,弃去细胞培养液,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞两次,加入 5mL 细胞培养液,接种到细胞培养瓶中培养。

1.2.2 细胞转染 取对数生长期的 Y79 细胞,离心后,收集细胞,接种于 6 孔板中,实验分组为对照组、NC 组 (siRNA control)、干扰组 (TRAF6 siRNA)。转染序列如下:(1) TRAF6A: Sense 5'-GCCUAAUCAUUAUGAUCUATT-3', Anti-sense 5'-UAGAUCUAAUGAUUAGGCAT-3'; (2) siRNA control: Sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', Anti-sense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。用 Lipofectamine 2000 将 TRAF6 siRNA 和 siRNA control 转染至细胞中,并分别标记为干扰组和 NC 组,同时设置未处理的细胞作为对照组。

1.2.3 qRT-PCR 检测 TRAF6 的表达 取干扰组、NC 组、对照组对数生长期的 Y79 细胞,培养 24h,收集细胞,加入 1mL Trizol 裂解后(每 10cm² 细胞加入 1mL Trizol),室温静置 5min,转移细胞裂解液至 EP 管中,加氯仿 200μL,震荡混合 15s,室温静置 3min,12000r/min,4℃ 离心 15min,吸取上清,加入等体积异丙醇混匀,室温静置 10min,12000r/min,4℃ 离心 15min,弃上清液,加入 500μL 75% 乙醇溶液,10000r/min,4℃ 离心 15min,弃上清液,将 RNA 保存于 -80℃。用紫外分光光度计检测提取的 RNA 浓度及纯度。qRT-PCR 检测细胞中 TRAF6 水平。TRAF6 上游引物:5'-GAATCACTTGGCAGCAGACATT-3';下游引物:

5'-GAGTTTCCATTTTGGCAGTCA-3'。GAPDH 上游引物:5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3';下游引物:5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'。反应程序为:94℃,5min(1 个循环),94℃,30s,58℃,30s,72℃,30s,共 35 个循环,72℃,5min。内参基因为 GAPDH,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 TRAF6 mRNA 水平。

1.2.4 Western blot 法检测 TRAF6 表达 取干扰组、NC 组、对照组对数生长期的 Y79 细胞,培养 24h,收集细胞,加入裂解液,4℃ 孵育 30min。吸取细胞裂解液,12000r/min,4℃ 离心 10min。吸取蛋白上清,BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测提取的蛋白浓度。将提取的蛋白与 5×Loading buffer 充分混合(4:1),100℃ 煮沸 5min 使蛋白变性,按照每个上样孔加入 50μL 变性蛋白样品 110V 恒压电泳 2h。4℃,100V 转膜 1h。5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 1h。一抗(1:1000)4℃ 孵育过夜。二抗(1:2000)37℃ 孵育 1h。显色、曝光,采用 Image 图像分析软件分析蛋白表达水平。目的蛋白相对表达水平 = 目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值。

1.2.5 MTT 法检测细胞活力 取干扰组、NC 组、对照组细胞,以 2000 个/孔接种到 96 孔板中,以加入细胞培养液、无细胞的组为空白组,每组设置 5 个复孔。24h 后每孔中加 20μL MTT 溶液(5mg/mL),孵育 4h,加入二甲基亚砷溶液 150μL,震荡混合 10min,观察结晶物完全溶解,酶标仪检测 490nm 处每孔的光密度值(A)值。细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.2.6 克隆形成实验检测克隆形成能力 取干扰组、NC 组、对照组细胞培养 24h 后,按照 500 个/孔接种细胞至 6 孔板,培养 14d,甲醇固定 15min,吉姆萨染色 10min,自然风干后拍照(×200)并计数分析。克隆形成率 = 克隆数目/接种细胞数 × 100%。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期 (1) 干扰组、NC 组、对照组细胞培养 24h 后,取 1×10^6 个细胞与 500μL 的结合缓冲液混合后,加碘化丙啶(propidium iodide, PI)和膜联蛋白 V-FITC(Annexin V-FITC)各 5μL,避光环境下反应 20min,加结合缓冲液 100μL,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。(2) 干扰组和 NC 组、对照组细胞培养 24h 后,收集细胞,加入预冷的 70% 乙醇溶液,4℃ 静置 24h, PBS 洗涤细胞 2 次,2000r/min 离心 5min,吸除上清液,加入 1mL PI,混合后室温静置 15min,流式细胞仪检测细胞周期,分析周期分布情况。

1.2.8 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力 (1) 取对数生长期干扰组、NC 组、对照组细胞,调整细胞密度为 5×10^6 个/mL,在 Transwell 小室的下室加入 600μL 细胞培养液,上室加入细胞悬液 100μL。在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24h 后,取出 Transwell 小室,将多余的细胞擦掉。收集下室的细胞,在显微镜下(×200)计数,计算细胞迁移数。(2) Matrigel 基质胶以 50μL/孔加入到 24 孔的 Transwell 小室中,4℃ 过夜晾干。侵袭实验前 60min,在小室内加不含血清的培养液孵育 30min。调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,每孔加 200μL 细胞悬液至小室的上室,500μL 细胞培养液加入下室,培养 24h。吸除多余的培养液,棉签擦除未穿膜的细胞,甲醇固定 30min,染色 2h, PBS 洗涤 3 次,去除基质膜,放置于盖玻片上,甘油固定,显微镜下(×200)观察侵袭细胞数量。

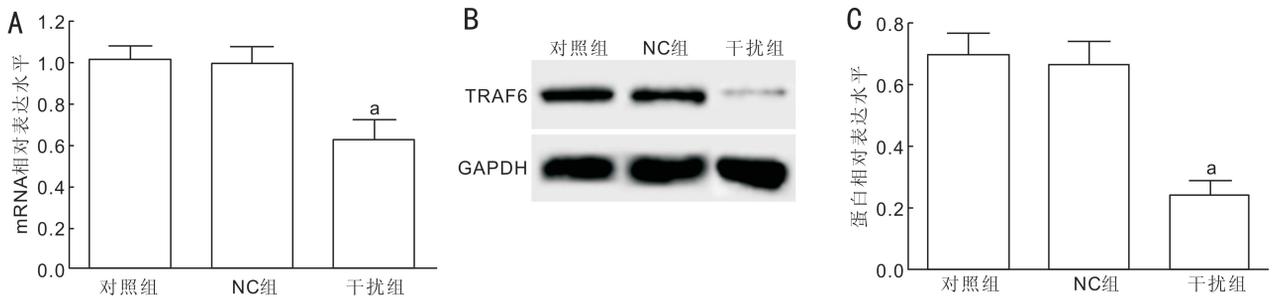


图1 各组细胞中 TRAF6 mRNA 及蛋白表达水平 A:TRAF6 mRNA 相对表达水平;B:Western blot 检测蛋白表达;C:TRAF6 蛋白相对表达水平。^a $P < 0.05$ vs 对照组。

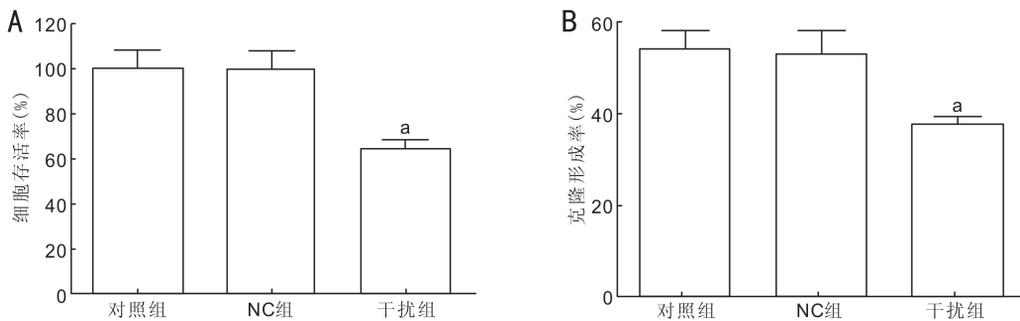


图2 TRAF6 对细胞增殖能力影响 A:各组细胞存活率;B:各组细胞克隆形成率。^a $P < 0.05$ vs 对照组。

统计学分析:用 SPSS 22.0 统计软件分析实验数据。

计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用 one-way ANOVA 分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞中 TRAF6 表达情况 各组细胞中 TRAF6 mRNA 和蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义($F = 29.272, 85.775, P < 0.001$)。qRT-PCR 检测结果显示,对照组、NC 组和干扰组 TRAF6 mRNA 相对表达量分别为 $1.02 \pm 0.03, 0.99 \pm 0.05$ 和 0.62 ± 0.06 (图 1A),对照组与 NC 组比较差异无统计学意义($P = 0.648$),干扰组 TRAF6 mRNA 表达水平显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,对照组、NC 组和干扰组 TRAF6 蛋白相对表达量分别为 $0.707 \pm 0.048, 0.723 \pm 0.027, 0.254 \pm 0.044$ (图 1B,C),对照组与 NC 组比较差异无统计学意义($P = 0.696$),干扰组 TRAF6 蛋白表达水平显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果表明,TRAF6 siRNA 能够有效抑制视网膜母细胞瘤 Y79 细胞中 TRAF6 的表达。

2.2 各组细胞增殖情况 对照组、NC 组和干扰组细胞存活率分别为 $(100.18 \pm 4.87)\%、(99.58 \pm 6.33)\%、(63.53 \pm 4.14)\%$,差异有统计学意义($F = 76.659, P < 0.001$;图 2A);对照组与 NC 组比较,细胞存活率差异无统计学意义($P = 0.859$);干扰组与对照组、NC 组比较,细胞存活率均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。对照组、NC 组和干扰组细胞克隆形成率分别为 $(56.78 \pm 5.63)\%、(54.18 \pm 6.91)\%、(37.40 \pm 2.95)\%$,差异有统计学意义($F = 18.816, P < 0.001$;图 2B);对照组与 NC 组比较,克隆形成率差异无统计学意义($P = 0.463$);干扰组与对照组、NC 组比较,克隆形成率均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果表明,沉默 TRAF6 能显著抑制 Y79 细胞的增殖。

表1 各组细胞周期检测情况

组别	G0/G1	S	G2/M
对照组	56.68 ± 8.35	36.58 ± 2.91	6.74 ± 2.32
NC 组	59.65 ± 9.47	35.46 ± 4.67	4.89 ± 3.25
干扰组	80.18 ± 6.28	16.25 ± 2.81	3.54 ± 1.35
<i>F</i>	79.142	65.221	31.590
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:对照组:未处理的 Y79 细胞;NC 组:转染 siRNA control 的 Y79 细胞;干扰组:转染 TRAF6 siRNA 的 Y79 细胞。

2.3 各组细胞凋亡发生情况 对照组、NC 组和干扰组细胞凋亡率分别为 $(9.89 \pm 0.33)\%、(10.80 \pm 0.15)\%、(32.05 \pm 3.11)\%$,差异有统计学意义($F = 96.107, P < 0.001$);NC 组与对照组比较,细胞凋亡率差异无统计学意义($P = 0.631$);干扰组与对照组比较,细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。结果表明,干扰 TRAF6 能够促进视网膜母细胞瘤 Y79 细胞凋亡。

2.4 各组细胞周期检测情况 各组细胞 G0/G1、S、G2/M 期分布情况比较,差异均有统计学意义($P < 0.001$);对照组与 NC 组比较,各周期细胞所占比例差异均无统计学意义($P = 0.753, 0.882, 0.329$);TRAF6 siRNA 干扰 Y79 细胞后,G0/G1 期的细胞增多,S 期和 G2/M 期细胞减少,与对照组、NC 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 1),提示干扰 TRAF6 能够阻滞视网膜母细胞瘤 Y79 细胞周期,将细胞周期阻滞在 G0/G1 期。

2.5 各组细胞迁移和侵袭能力 对照组、NC 组和干扰组 Transwell 小室中穿过聚碳酸酯膜迁移到膜背面的细胞数分别为 $95.8 \pm 4.4, 95.0 \pm 6.3, 58.6 \pm 7.4$ 个,差异有统计学意义($F = 57.010, P < 0.001$);对照组与 NC 组比较,迁移细胞数差异无统计学意义($P = 0.860$);与对照组和 NC 组比较,干扰组迁移细胞数显著降低,差异均有统计学意义

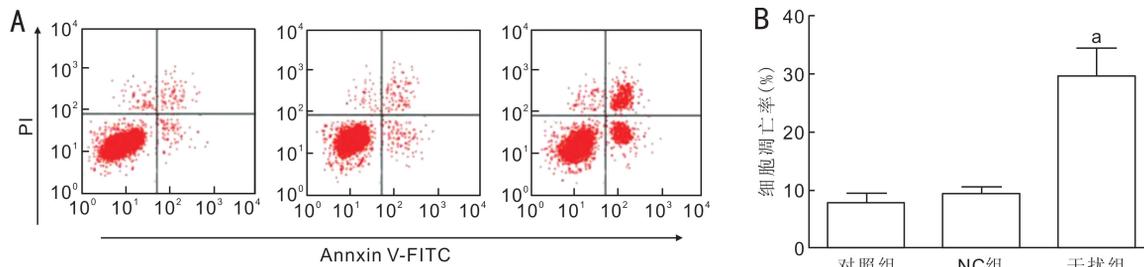


图3 TRAF6对细胞凋亡的影响 A:流式细胞仪检测结果;B:各组细胞凋亡率。^a $P < 0.05$ vs 对照组。

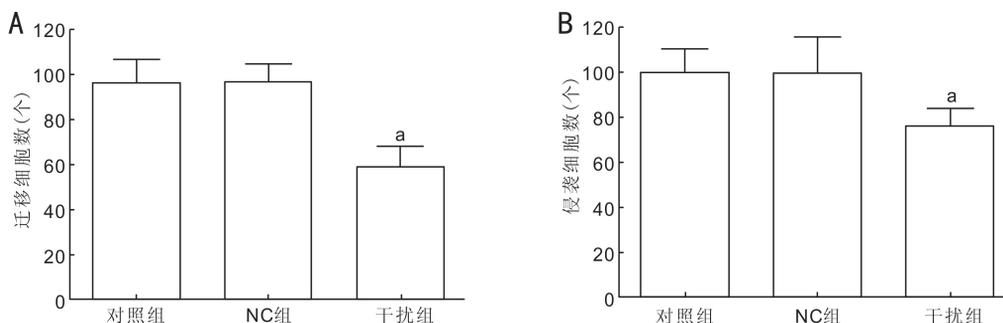


图4 TRAF6对细胞迁移和侵袭能力的影响 A:各组迁移细胞数目;B:各组侵袭细胞数目。^a $P < 0.05$ vs 对照组。

($P < 0.05$)。对照组、NC组和干扰组穿透 Matrigel 胶侵袭至膜背面的细胞数分别为 99.8 ± 4.9 、 97.2 ± 8.7 、 73.0 ± 8.6 个,差异有统计学意义 ($F = 18.552$, $P < 0.001$);对照组与NC组比较,侵袭细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与对照组和NC组比较,干扰组侵袭细胞数显著降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见图4。以上结果表明,干扰TRAF6能够显著抑制视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的迁移和侵袭能力。

3 讨论

TRAF6 基因定位于 11p13,其编码的蛋白质含有 511 个氨基酸,分子量约 60kDa,因其含有特殊的结构能够参与细胞内多种信号通路的转导,在细胞免疫等过程中发挥重要作用^[9-11]。研究表明,TRAF6 调控细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移等过程^[12-13]。Zhang 等^[14]通过免疫组化、RT-PCR 法检测结直肠癌组织和正常组织中 TRAF6 的表达水平,结果发现,在结直肠癌组织中 TRAF6 mRNA 和蛋白表达水平均高于正常的癌旁组织,干扰 TRAF6 表达的结直肠癌细胞侵袭和迁移能力均下降。石琳等^[15]在 102 例卵巢癌组织中发现 TRAF6 的阳性表达率高达 68%,而在正常的卵巢组织中阳性率仅为 20%,并且与卵巢癌的病理分期等有关。He 等^[16]通过细胞转染 TRAF6 干扰表达载体发现,宫颈癌细胞 HeLa、SiHa、CaSki 细胞的增殖、迁移、侵袭能力均明显降低,细胞凋亡比例均升高。吴娟等^[17]发现 TRAF6 蛋白的表达与乳腺癌细胞的侵袭能力有关。张刘平等^[18]研究表明,TRAF6 参与肿瘤恶病质骨髓肌炎症的发生。这些研究结果均表明,TRAF6 与肿瘤的发生发展及转移有关。

正常情况下,细胞的增殖和凋亡处于动态平衡状态,当细胞发生癌变时,细胞异常增殖,凋亡减少。细胞凋亡的发生受到多种基因的严格调控,是一个极为复杂的过程,提高肿瘤细胞凋亡率,减少细胞增殖是多种抗肿瘤药物及抗癌基因作用的典型特征^[19]。本研究通过细胞转染 TRAF6 siRNA,采用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测干扰效果,结果显示,转染 TRAF6 siRNA 后的视

网膜母细胞瘤 Y79 细胞中 TRAF6 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降,提示成功构建了干扰 TRAF6 表达的视网膜母细胞瘤 Y79 细胞系。通过 MTT 比色法、细胞克隆实验、流式细胞术检测发现,干扰 TRAF6 后 Y79 细胞的增殖受到抑制,凋亡率增加,细胞 G0/G1 期比例增多,表明干扰 TRAF6 能够抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,阻滞细胞周期。

细胞迁移和侵袭是肿瘤转移的重要生物学特性。肿瘤细胞侵袭至周围组织中是肿瘤转移的第一步,肿瘤细胞通过微血管和淋巴管进入微循环,进而进入到邻近组织中发生肿瘤的转移^[20]。本研究通过 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力,结果发现干扰 TRAF6 能够减少 Y79 细胞迁移和侵袭数目,提示干扰 TRAF6 能够抑制视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的迁移和侵袭能力。

综上所述,干扰 TRAF6 能抑制视网膜母细胞瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力,阻滞细胞周期,促进细胞凋亡。本研究结果仅在体外探讨了 TRAF6 的作用,后续会在体内进一步研究 TRAF6 的作用及机制。本研究为后续探讨 TRAF6 的作用机制奠定了基础,为视网膜母细胞瘤的治疗提供了新思路。

参考文献

- Zaldua N, Llaverro F, Artaso A, et al. Rac1/p21-activated kinase pathway controls retinoblastoma protein phosphorylation and E2F transcription factor activation in B lymphocytes. *FEBS J* 2016;283(4):647-661
- Shields CL, Lally SE, Manjandavida FP, et al. Diffuse anterior retinoblastoma with globe salvage and visual preservation in 3 consecutive cases. *Ophthalmology* 2016;123(2):378-384
- Zhang X, Li CF, Zhang L, et al. TRAF6 Restricts p53 Mitochondrial Translocation, Apoptosis, and Tumor Suppression. *Mol Cell* 2016;64(4):803-814
- Tenekeci U, Poppe M, Beuerlein K, et al. K63-Ubiquitylation and TRAF6 Pathways Regulate Mammalian P-Body Formation and mRNA Decapping. *Mol Cell* 2016;62(6):943-957
- 王玉萍,王玲玲,胡玉娜,等. TRAF6 在食管癌中的表达及临床意义. *中国免疫学杂志* 2015;31(12):1692-1694

6 Yu J, Yun H, Shin B, *et al.* Interaction of Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 (TRAF6) and Vav3 in the Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) Signaling Complex Enhances Osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2016;291(39):20643-20660

7 Tikhonovich I, Kuravi S, Artigues A, *et al.* Dynamic arginine methylation of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6 regulates Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2015;290(36):22236-22249

8 Huang B, Baek S H. Trim13 Potentiates Toll-Like Receptor 2-Mediated Nuclear Factor κ B Activation via K29-Linked Polyubiquitination of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6. *Mol Pharmacol* 2017;91(4):307-316

9 Stack J, Hurst TP, Flannery SM, *et al.* Poxviral protein A52 stimulates p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by causing tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) self-association leading to transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) recruitment. *J Biol Chem* 2013;288(47):33642-33653

10 Li X, Xiao M, Yu Q, *et al.* Effect of tumor necrosis factor receptor associated factor 6 gene silencing by small interfering RNA on proliferation of odontoblast cells. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2014;49(7):428-433

11 Secreto F, Manske M, Price-Troska T, *et al.* B-cell activating factor-receptor specific activation of tumor necrosis factor receptor associated factor 6 and the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in lymphoma B cells. *Leuk Lymphoma* 2014;55(8):1884-1892

12 Walsh MC, Lee JE, Choi Y. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol Rev* 2015;266(1):72-92

13 Zhang L, Wang T, Lu Y, *et al.* Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 plays a role in the inflammatory responses of human periodontal ligament fibroblasts to enterococcus faecalis. *J Endod* 2015;41(12):1997-2001

14 Zhang T, Wang H, Han L. Expression and Clinical Significance of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 in Patients With Colon Cancer. *Iran Red Crescent Med J* 2016;18(1):e23931

15 石琳, 李丽. TRAF6在卵巢癌组织中的表达及临床意义. *中国免疫学杂志* 2015;31(12):1695

16 He A, Ji R, Shao J, *et al.* TLR4-MyD88-TRAF6-TAK1 Complex-Mediated NF- κ B Activation Contribute to the Anti-Inflammatory Effect of V8 in LPS-Induced Human Cervical Cancer SiHa Cells. *Inflammation* 2016;39(1):172-181

17 吴娟, 黄宇帆, 吴迪. TRAF6与乳腺癌细胞迁移的关系. *广东医学* 2013;34(5):682-684

18 张刘平, 郑曰勇, 寇耀, 等. TRAF6在肿瘤恶病质骨骼肌炎症反应中的作用研究. *中国现代医学杂志* 2013;23(8):22-27

19 孙宝胜, 孟凡旭, 于士龙, 等. GRIM-19蛋白在taurolidine诱导宫颈癌细胞凋亡中的作用. *中国老年学杂志* 2015;35(2):424-426

20 Yoshii T, Geng Y, Peyton S, *et al.* Biochemical and biomechanical drivers of cancer cell metastasis, drug response and nanomedicine. *Drug Discov Today* 2016;21(9):1489-1494