

# 敲低TRAF6对白血病K562细胞增殖和凋亡的影响及其分子机制

张帅帅 鲜敬荣 邹琴 全静 金红君 高芃 叶晟 张伶\*  
(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 该文探讨了干扰肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)表达对人白血病K562细胞增殖、凋亡的影响及其分子机制。将靶向TRAF6基因的shRNA慢病毒载体感染K562细胞, 利用荧光显微镜观察感染效率; Western blot方法检测TRAF6蛋白表达的改变; CCK-8法检测体外细胞增殖活性; 流式细胞术分析细胞凋亡率; Western blot方法检测凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2表达和AKT磷酸化水平的变化。结果显示, TRAF6-shRNA慢病毒载体成功感染K562细胞, TRAF6蛋白表达水平明显下降。与空白对照组和TRAF6-NC组相比较, TRAF6-shRNA组细胞增殖能力明显受抑( $P < 0.05$ ), 而细胞凋亡率增加( $P < 0.05$ ); 同时, 促凋亡蛋白Bax表达升高、抗凋亡蛋白Bcl-2表达下降。此外, 干扰TRAF6可下调K562细胞p-AKT(T308)和p-AKT(S473)活性, 而总AKT水平未见明显变化。该研究表明, 干扰TRAF6表达可抑制K562细胞增殖和诱导细胞凋亡, 其机制可能与下调AKT活性有关, 提示TRAF6可作为白血病治疗的一个潜在靶点。

**关键词** TRAF6; 白血病; RNA干扰; 增殖; 凋亡; AKT

## The Effect of TRAF6 Knockdown on Proliferation and Apoptosis of K562 Leukemia Cells and Its Molecular Mechanism

Zhang Shuashuai, Xian Jingrong, Zou Qin, Quan Jing, Jin Hongjun, Gao Peng, Ye Sheng, Zhang Ling\*  
(College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics Designated by the Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** This work was aim to investigate the effect of TRAF6 knockdown on proliferation and apoptosis of human K562 leukemic cell line and its molecular mechanism. In this study, the shRNA targeting TRAF6 lentiviral vector was transfected into K562 leukemia cells. The efficiency of transfection was observed under fluorescence microscope. The change of TRAF6 protein level was confirmed by Western blot. The ability of cell proliferation were analyzed by CCK-8 method and the apoptosis rate were detected by flow cytometry. The expressions of apoptosis related proteins Bax, Bcl-2 and phosphorylated-AKT were detected by Western blot. The results demonstrated that TRAF6-shRNA was successfully transfected into K562 cells and knockdown of TRAF6 at the protein levels was confirmed. Compared with the blank control group and the TRAF6-NC group, the cell growth

收稿日期: 2015-07-27 接受日期: 2015-11-20

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81271913)和重庆市人力资源和社会保障局留学人员科技活动择优资助项目(批准号: 2013009)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485240, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

Received: July 27, 2015 Accepted: November 20, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81271913) and Scientific Research Advanced Programs for Returned Overseas Chinese Scholars of the Bureau of Human Resources and Social Security of Chongqing (Grant No.2013009)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485240, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2015-12-15 17:39:58 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151215.1739.004.html>

in the TRAF6-shRNA group was significantly inhibited ( $P < 0.05$ ). In addition, knockdown of TRAF6 promoted apoptosis by increasing the protein level of Bax and decreasing the Bcl-2. Furthermore, TRAF6 downregulation resulted in the decreases in levels of AKT phosphorylation at both residues Thr308 and Ser473, but no remarkable change in total AKT levels was observed. Taken together, our results revealed that TRAF6 knockdown might inhibit cell growth and induce apoptosis through downregulation of AKT activation, which indicates that TRAF6 may be a novel target for leukemia treatment.

**Keywords** TRAF6; leukemia; RNA interference; proliferation; apoptosis; AKT

肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)属于肿瘤坏死因子超家族,是调节肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体超家族和白细胞介素-1受体(interleukin-1 receptor, IL-1R)超家族信号转导通路的关键分子,在机体固有免疫和适应性免疫中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。近年来的研究发现,TRAF6在肿瘤的发生发展过程中也发挥了重要作用。在小鼠造血干、祖细胞中过表达TRAF6可促使小鼠发生骨髓增生异常综合征,甚至向急性髓系白血病转化<sup>[2]</sup>。体外实验表明,沉默TRAF6表达可诱导人急性髓系白血病原始细胞发生凋亡<sup>[3]</sup>,提示TRAF6与白血病的发生发展有密切的联系。然而,目前TRAF6在白血病细胞恶性转化中的生物学作用及其分子机制尚不清楚。本研究应用RNA干扰技术下调人白血病K562细胞中TRAF6的表达,观察抑制TRAF6表达对白血病细胞体外增殖和凋亡的影响,并初步探讨相关分子机制,为进一步阐明TRAF6在调控白血病发生发展中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人慢性髓系白血病K562细胞系购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源库。胎牛血清、RPMI 1640普通培养液购于Gibco公司。蛋白裂解液、BCA蛋白定量试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。ECL发光试剂盒及PVDF膜购于美国Millipore公司。鼠抗人TRAF6、兔抗人Bax、兔抗人Bcl-2购于美国Santa Cruz公司;兔抗人p-AKT(T473)、p-AKT(S308)、T-AKT抗体购于美国Cell Signal Technology公司;鼠抗人 $\beta$ -actin单抗、山羊抗鼠IgG二抗、山羊抗兔IgG二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司。CCK8试剂盒购于Biosharp公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 细胞用含10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 U/mL)的RPMI 1640普通培养液置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>温箱中培养。平均1~2 d传代,以保持细胞对数生长。每次实验使用对数生长期的细胞。

**1.2.2 慢病毒干扰载体的构建及包装** 携带靶向TRAF6基因的shRNA慢病毒载体(TRAF6-shRNA)和靶向无关序列的阴性对照慢病毒载体(TRAF6-NC)均由上海吉玛制药技术有限公司合成并包装,并进行测序鉴定和病毒滴度的测定。干扰载体和阴性对照载体均表达绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)。靶向TRAF6基因的特异性shRNA序列为: 5'-GCG CTG TGC AAA CTA TAT ATC-3'; 靶向的无关序列为: 5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3'。

**1.2.3 慢病毒感染K562细胞** 将K562细胞分成3个组:空白对照组(未经感染的K562细胞)、TRAF6-NC组(无关序列感染组)以及TRAF6-shRNA组(TRAF6-shRNA慢病毒感染组)。取对数生长期的K562细胞,以每孔 $1 \times 10^6$ 细胞数接种于12孔板,次日向各组细胞中分别添加相应的适量慢病毒溶液(感染复数均为50)和终浓度为5  $\mu$ g/mL的聚凝胺,进行病毒感染。24 h后换液,72 h后加入2  $\mu$ g/mL嘌呤霉素筛选细胞。继续培养6 d,获得稳定转染的K562细胞株。荧光显微镜下观察白血病细胞GFP的表达情况,确定病毒的感染效率。

**1.2.4 Western blot检测蛋白的表达水平** 分别收集空白对照组、TRAF6-NC组以及TRAF6-shRNA组的K562细胞,加入RAPI裂解液充分裂解细胞,提取总蛋白,BCA法检测蛋白质浓度。取50  $\mu$ g变性煮沸后的蛋白上样,经12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,通过湿转仪将蛋白转移到PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,分别加入一定比例稀释的抗

TRAF6、Bax、Bcl-2、p-AKT(T473)、p-AKT(S308)、AKT以及 $\beta$ -actin的抗体和相应的二抗进行孵育。加入ECL发光试剂后凝胶成像显影。以 $\beta$ -actin为内参,对条带用Quantity One软件进行统计分析。

**1.2.5 CCK-8检测细胞增殖** 收集空白对照组、TRAF6-NC组以及TRAF6-shRNA组的K562细胞,按照2 000/孔的细胞量接种于96孔板。每组设5个复孔,37 °C、5% CO<sub>2</sub>温箱中孵育,培养第1、2、3、4 d时每孔加入10  $\mu$ L的CCK-8溶液,继续培养1 h后,于450 nm波长下测定对应孔的吸光度(D)值,以吸光度值为纵坐标、培养时间为横坐标绘制细胞增殖曲线。

**1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 空白对照组、TRAF6-NC组以及TRAF6-shRNA组K562细胞,以 $1 \times 10^6$ /孔接种于6孔板中培养。取对数生长期的各组

细胞于离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,细胞经PBS洗涤2次,再用1 mL PBS重悬于EP管中,采用Annexin V-PI细胞凋亡检测试剂盒,通过流式细胞术检测细胞凋亡率。实验独立重复3次。

**1.2.7 统计学分析** 采用SPSS 19.0软件进行处理,数据以mean $\pm$ S.D.形式表示,两样本均数比较采用*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TRAF6 shRNA慢病毒感染K562细胞

将阴性对照病毒载体和TRAF6-shRNA病毒载体分别感染K562细胞,在荧光显微镜观察K562细胞的感染效率。结果显示,在TRAF6-NC组和TRAF6-shRNA组中,大部分K562细胞在镜下均可见绿色荧

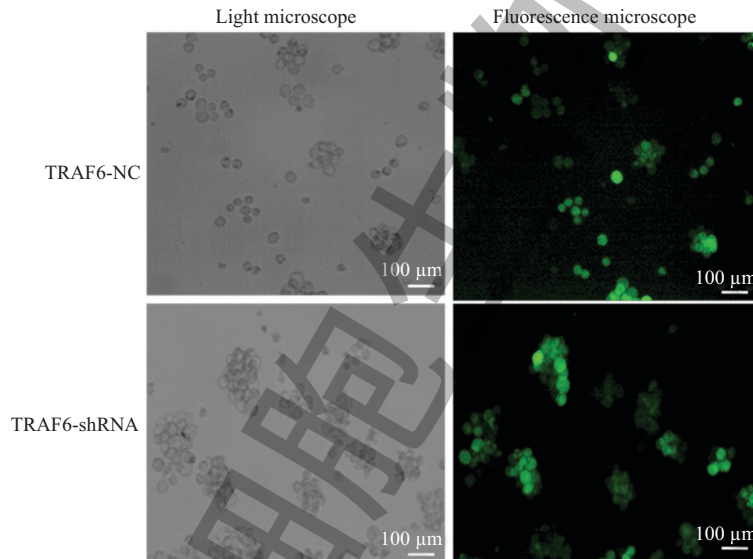
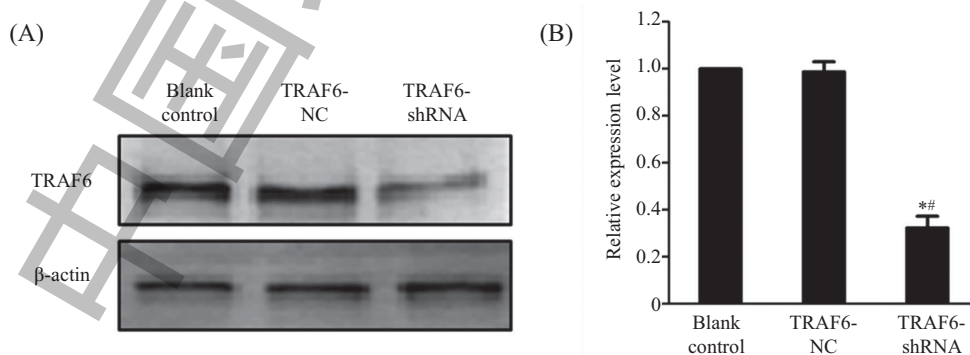


图1 TRAF6-shRNA慢病毒感染K562细胞

Fig.1 TRAF6-shRNA lentiviral vector transfection into K562 cells

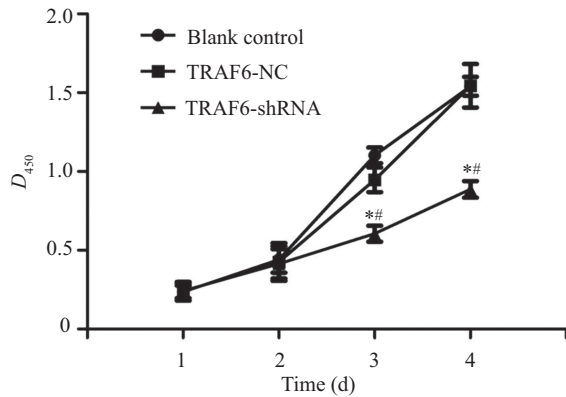


A: Western blot检测TRAF6蛋白水平; B: TRAF6蛋白相对水平。\* $P < 0.05$ ,与空白对照组比较; # $P < 0.05$ ,与TRAF6-NC组比较。

A: the level of TRAF6 protein in different groups analyzed by Western blot; B: the relative level of TRAF6 protein. \* $P < 0.05$  vs blank control group, # $P < 0.05$  vs TRAF6-NC group.

图2 TRAF6-shRNA慢病毒感染对K562细胞中TRAF6蛋白表达水平的影响

Fig.2 The Effect of TRAF6-shRNA transfection on the expression of TRAF6 protein in K562 cells



\* $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , 与TRAF6-NC组比较。

\* $P < 0.05$  vs blank control group, <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs TRAF6-NC group.

图3 下调TRAF6表达对K562细胞增殖的影响

Fig.3 The effect of knockdown of TRAF6 on the proliferation of K562 cells

光(图1), 提示两组细胞均有效感染了慢病毒载体。进一步采用有限稀释法获取单克隆细胞株, 细胞扩大培养后用于后续研究。

## 2.2 TRAF6 shRNA慢病毒感染对K562细胞中TRAF6蛋白表达的影响

为观察TRAF6 shRNA慢病毒载体对K562细胞

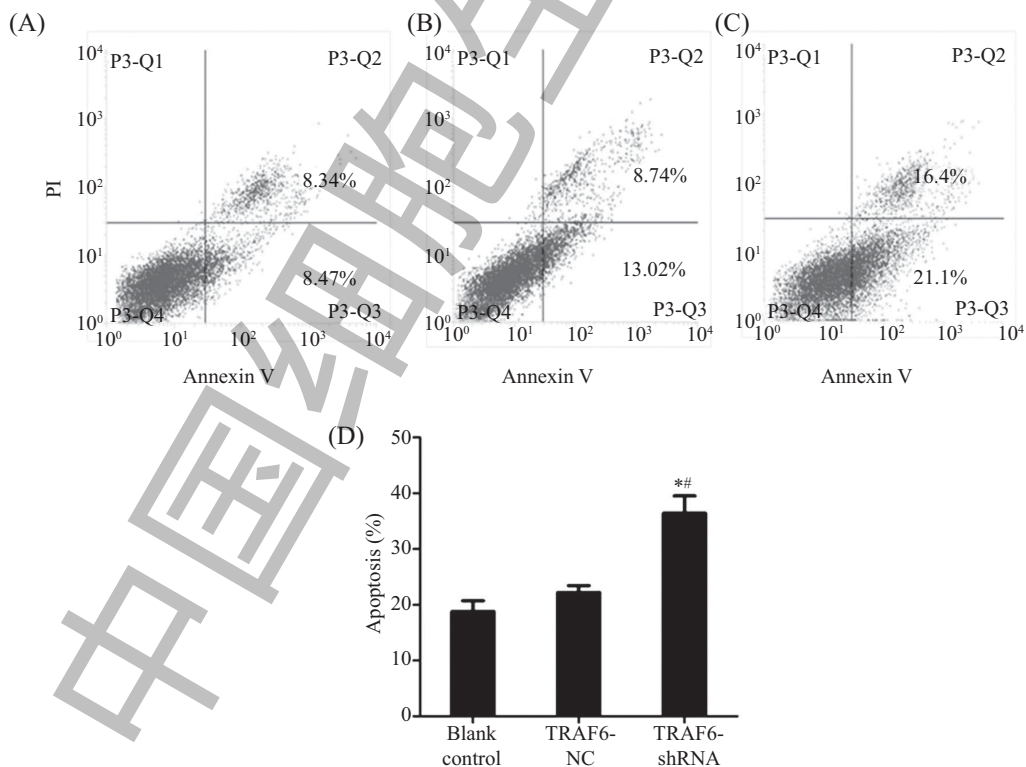
中TRAF6的干扰效果, Western blot检测K562细胞中TRAF6蛋白水平。结果显示, TRAF6-shRNA组中TRAF6蛋白水平明显低于空白对照组和TRAF6-NC组( $P < 0.05$ ), 而TRAF6-NC组与空白对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图2), TRAF6 shRNA慢病毒感染下调K562细胞中TRAF6蛋白表达, 提示成功建立了下调TRAF6蛋白水平的稳定白血病细胞株。

## 2.3 下调TRAF6表达对K562细胞增殖的影响

为探讨抑制TRAF6表达对K562细胞增殖能力的影响, 采用CCK-8法观察细胞的生长情况。结果显示, 与空白对照组比较, 体外培养2 d后, TRAF6-shRNA组D值显著降低( $P < 0.05$ ), 而TRAF6-NC组和空白对照组间的D值无明显差异( $P > 0.05$ )(图3), 提示下调TRAF6表达能够抑制K562细胞增殖。

## 2.4 下调TRAF6对K562细胞凋亡的影响

为观察下调TRAF6表达对K562细胞凋亡的影响, 利用流式细胞术检测Annexin V-PI染色后细胞的早期和晚期凋亡率。结果显示, TRAF6-shRNA组K562细胞凋亡率为(36.4±3.1)%, 显著高于空白对照组(18.8±1.9)%及TRAF6-NC组(22.2±1.2)%, 差异具

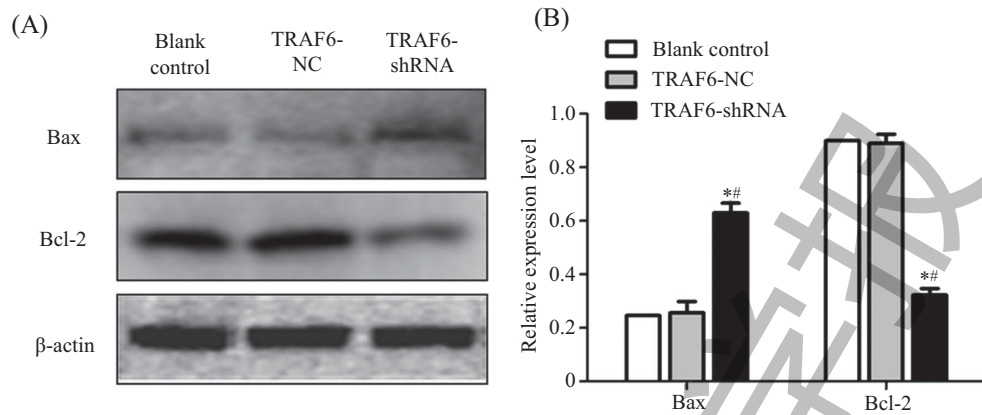


A: 空白对照组; B: TRAF6-NC组; C: TRAF6-shRNA组; D: 凋亡细胞的百分率。\* $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , 与TRAF6-NC组比较。

A: blank control group; B: TRAF6-NC group; C: TRAF6-shRNA group; D: the percentage of apoptosis cells. \* $P < 0.05$  vs blank control group, <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs TRAF6-NC group.

图4 下调TRAF6表达对K562细胞凋亡的影响

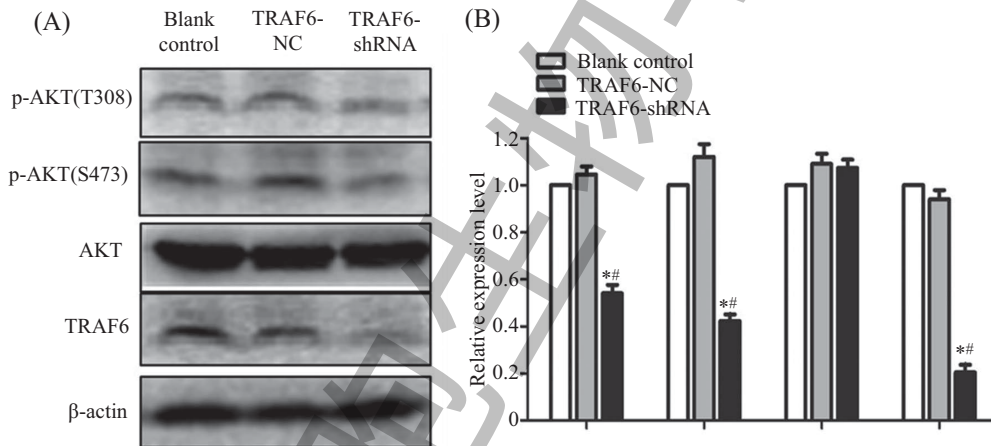
Fig.4 The effect of knockdown of TRAF6 on the apoptosis of K562 cells



A: Western blot检测Bax、Bcl-2蛋白质表达水平; B: Bax、Bcl-2相对表达水平分析。\* $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , 与TRAF6-NC组比较。  
A: the expression of Bax, Bcl-2 protein in different groups analyzed by Western blot; B: the relative expression of Bax, Bcl-2. \* $P < 0.05$  vs blank control group, <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs TRAF6-NC group.

图5 下调TRAF6对K562细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.5 Knockdown of TRAF6 modulated the expression of Bax and Bcl-2 in K562 cells



A: Western blot检测AKT磷酸化水平; B: p-AKT(T308)、p-AKT(S473)、AKT和TRAF6的相对表达水平。\* $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , 与TRAF6-NC组比较。

A: the levels of p-AKT(T308) and p-AKT(S473) in different groups analyzed by Western blot; B: the relative levels of p-AKT(T308), p-AKT(S473), AKT and TRAF6 protein. \* $P < 0.05$  vs blank control group, <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs TRAF6-NC group.

图6 干扰TRAF6对K562细胞AKT磷酸化水平的影响

Fig.6 The effect of TRAF6 knockdown on the phosphorylation levels of AKT in K562 cells

有统计学意义( $P < 0.05$ )。而TRAF6-NC组和空白对照组K562比较细胞凋亡率无显著性差异(图4), 提示下调TRAF6表达可以诱导K562细胞发生凋亡。

## 2.5 下调TRAF6对K562细胞凋亡相关蛋白表达的影响

为探讨下调TRAF6对K562细胞中凋亡相关分子表达的影响, 采用Western blot检测促凋亡蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-2表达的变化。结果显示, 与空白对照组和TRAF6-NC组相比, TRAF6-shRNA组K562细胞中Bax蛋白水平明显升高( $P < 0.05$ ), 而Bcl-2蛋白水平明显下降( $P < 0.05$ )(图5), 提示下调TRAF6促进细胞凋亡是通过调控Bax和Bcl-2蛋白水平而实现。

## 2.6 下调TRAF6对AKT磷酸化水平的影响

为了探讨TRAF6调控K562细胞增殖凋亡的分子机制, 利用Western blot检测磷酸化AKT水平的改变。结果发现, 与空白对照组和TRAF6-NC组相比, TRAF6-shRNA组K562细胞的p-AKT(T308)和p-AKT(S473)的水平均显著降低( $P < 0.05$ ), 而总AKT蛋白水平没有明显差异( $P > 0.05$ )(图6), 提示TRAF6可能通过调节AKT磷酸化水平来影响K562细胞增殖和凋亡。

## 3 讨论

病态造血细胞恶性增殖与凋亡抵抗是白血病

主要病理特征之一,因此,明确白血病细胞恶性增殖与凋亡抵抗的分子机制对于阐明白血病发病机制及制定有效的治疗策略具有十分重要的意义。近年来的研究发现,TRAF6参与调控血液肿瘤的发生发展,TRAF6可作为血液肿瘤治疗的潜在靶点<sup>[4]</sup>。为此,本研究探讨干扰TRAF6表达对人白血病K562细胞生物学表型的影响及其分子机制。

首先,我们利用RNA干扰技术将TRAF6-shRNA慢病毒载体感染人白血病K562细胞,成功构建稳定干扰TRAF6的白血病细胞株。本研究发现,TRAF6-shRNA组细胞的生长受到显著抑制,同时细胞凋亡率明显增加。Heng等<sup>[5]</sup>采用siRNA沉默TRAF6表达能够有效抑制结肠癌RKO细胞的体外增殖,促进凋亡。Zhang等<sup>[6]</sup>发现,在胶质瘤U-87MG细胞株中沉默TRAF6可以抑制其生长,促进其凋亡;而过表达TRAF6则促进其增殖,降低其凋亡。这些研究结合我们的实验结果提示,TRAF6在调节肿瘤细胞的增殖凋亡过程中发挥重要作用。Bcl-2和Bax是调控白血病细胞凋亡的关键分子<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,干扰TRAF6能够上调促凋亡蛋白Bax表达、抑制抗凋亡蛋白Bcl-2表达。而Huang等<sup>[8]</sup>在多发性骨髓瘤RPMI8226细胞株中沉默TRAF6也可使Bax表达上升和Bcl-2表达下降。这提示,干扰TRAF6可能通过上调促凋亡蛋白Bax、下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达来促进血液肿瘤细胞的凋亡。

信号转导通路异常在白血病的发病机制中具有重要作用。PI3K/AKT信号通路持续性激活与白血病的发生密切相关,靶向PI3K/AKT信号通路已经成为治疗白血病的重要途径之一<sup>[9-10]</sup>。为了探讨AKT信号分子是否参与了TRAF6对白血病细胞恶性表型的调控,本研究首先检测干扰TRAF6后K562细胞AKT磷酸化水平的变化。结果表明,干扰TRAF6可降低p-AKT(T308)和p-AKT(S473)的水平,而总AKT蛋白表达没有变化。以上结果提示,TRAF6可通过调节AKT的磷酸化活性来影响白血病细胞的恶性转化。Yang等<sup>[11]</sup>报道,TRAF6可以使AKT发生泛素化,进而增强AKT分子磷酸化活性,并且在前列腺癌PC-3细胞株中干扰TRAF6表达能下调AKT磷酸化水平,抑制细胞增殖。我们推测,下调TRAF6表达可能抑制了AKT的泛素化水平,从而使AKT磷酸化水平降低而发挥抗白血病效应。此外,Linares等<sup>[12]</sup>发现,TRAF6能上调AKT下游mTOR的活性来促进

肿瘤细胞的增殖。这些研究提示,TRAF6可能通过影响PI3K/AKT/mTOR信号通路来调控肿瘤细胞的恶性增殖。TRAF6作为细胞内的一种多功能信号接头分子,还参与调节NF- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B)和MAPK(mitogen-activated protein kinase)等多种信号通路的活性<sup>[13-14]</sup>。在对胰腺癌、骨肉瘤、肺腺癌的研究中发现,干扰TRAF6表达可降低NF- $\kappa$ B信号通路活性,抑制细胞增殖和诱导凋亡<sup>[15-17]</sup>。此外,TRAF6还能上调HIF-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ )表达促进肿瘤的血管生成<sup>[18]</sup>。因此,TRAF6调控白血病细胞的恶性表型可能还存在AKT之外的其他信号通路的共同参与。

综上所述,本研究构建了敲低TRAF6基因表达的细胞株,并发现TRAF6在维持髓系白血病细胞恶性增殖和凋亡抵抗中的重要作用,并初步证实了AKT信号分子的调控作用。随后,我们将观察白血病细胞中TRAF6与AKT的相互作用,以及在动物模型中观察干扰TRAF6对白血病发生的影响,深入地研究TRAF6的作用机制可能为白血病的治疗提供新的策略和靶点。

## 参考文献 (References)

- 1 Wu H, Arron JR. TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *BioEssays* 2003; 25(11): 1096-105.
- 2 Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, *et al.* Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med* 2010; 16(1): 49-58.
- 3 Fang J, Rhyasen G, Bolanos L, Rasch C, Varney M, Wunderlich M, *et al.* Cytotoxic effects of bortezomib in myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia depend on autophagy-mediated lysosomal degradation of TRAF6 and repression of PSMA1. *Blood* 2012; 120(4): 858-67.
- 4 Liu H, Tamashiro S, Baritaki S, Penichet M, Yu Y, Chen H, *et al.* TRAF6 activation in multiple myeloma: A potential therapeutic target. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2012; 12(3): 155-63.
- 5 Sun H, Li X, Fan L, Wu G, Li M, Fang J. TRAF6 is upregulated in colon cancer and promotes proliferation of colon cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 53: 195-201.
- 6 Peng Z, Shuangzhu Y, Yongjie J, Xinjun Z, Ying L. TNF receptor-associated factor 6 regulates proliferation, apoptosis, and invasion of glioma cells. *Mol Cell Biochem* 2013; 377(1/2): 87-96.
- 7 Brinkmann K, Kashkar H. Targeting the mitochondrial apoptotic pathway: a preferred approach in hematologic malignancies. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1098.
- 8 Huang HM, Wang XF, Liu XX, Xu RR, Shi W, Ding RS, *et al.* Effects of down-regulated TRAF6 gene expression on the

- proliferation and apoptosis in multiple myeloma cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2013; 34(11): 941-5.
- 9 Polak R, Buitenhuis M. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: Implications for therapeutic strategies in leukemia. *Blood* 2012; 119(4): 911-23.
- 10 Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, Capitani S, Shahjahani M, Ahmadzadeh A, *et al.* Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(12): 2337-47.
- 11 Yang WL, Wang J, Chan CH, Lee SW, Campos AD, Lamothe B, *et al.* The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science* 2009; 325(5944): 1134-8.
- 12 Linares JF, Duran A, Yajima T, Pasparakis M, Moscat J, Diaz-Meco MT. K63 polyubiquitination and activation of mTOR by the p62-TRAF6 complex in nutrient-activated cells. *Mol Cell* 2013; 51(3): 283-96.
- 13 Thomas R. The TRAF6-NF kappa B signaling pathway in autoimmunity: Not just inflammation. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(4): 170-3.
- 14 Yamashita M, Fathyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* 2008; 31(6): 918-24.
- 15 Rong Y, Wang D, Wu W, Jin D, Kuang T, Ni X, *et al.* TRAF6 is over-expressed in pancreatic cancer and promotes the tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Med Oncol* 2014; 31(11): 260.
- 16 Meng Q, Zheng M, Liu H, Song C, Zhang W, Yan J, *et al.* TRAF6 regulates proliferation, apoptosis, and invasion of osteosarcoma cell. *Mol Cell Biochem* 2012; 371(1/2): 177-86.
- 17 Zhong L, Cao F, You Q. Effect of TRAF6 on the biological behavior of human lung adenocarcinoma cell. *Tumour Biol* 2013; 34(1): 231-9.
- 18 Sun H, Li XB, Meng Y, Fan L, Li M, Fang J. TRAF6 upregulates expression of HIF-1alpha and promotes tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2013; 73(15): 4950-9.