

Vialinin A 对肝癌耐药细胞生长和 TNF- α /TRAF6/NF- κ B 信号通路的影响

林自中^{1,2,3}, 王家瑞^{1,2}, 时慧娟^{1,2}, 黄金艳², 蒋利和^{1,2,3,4*}

(1. 右江民族医学院基础医学院, 广西 百色 533000, 2. 广西医科大学, 广西高校人体发育与疾病研究重点实验室, 广西南宁 530021; 3. 广西开元垠东医院, 广西南宁 530023; 4. 广西大学医学院, 广西南宁 530005)

摘要: **目的** 探究 Vialinin A 对肝癌耐药细胞 HepG2/ADM 生长的抑制作用。**方法** CCK-8 法筛选 Vialinin A 干预浓度, 同时检测阿霉素、5-氟尿嘧啶、顺铂、长春新碱的抑制作用。将 HepG2/ADM 细胞分为对照组和 Vialinin A 20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 组, CCK-8 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期, RT-qPCR 法检测细胞 *BCRP*、*MDR1*、*MRP1* mRNA 表达, Western blot 法检测细胞 BCRP、MDR1、MRP1、TNF- α 、TRAF6、TAK1、NF- κ B p65、cleaved-Caspase-3 蛋白表达。同时验证 TNF- α 对 Vialinin A 的逆转作用。**结果** Vialinin A 可以抑制 HepG2/ADM 细胞增殖活力, IC₅₀ 值为 (31.52 $\pm$ 2.76) $\mu\text{mol/L}$ 。与对照组比较, Vialinin A 20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2/ADM 细胞凋亡率升高 ($P<0.01$), 细胞周期阻滞在 G₂/M 期, BCRP、MDR1、MRP1 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); Vialinin A 30、40 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 TNF- α 、TRAF6、TAK1、NF- κ B p65 蛋白表达降低 ($P<0.01$), cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 并呈浓度依赖性。使用 10 ng/mL TNF- α 处理细胞 48 h 后可以有效逆转 30 $\mu\text{mol/L}$ Vialinin A 的作用。**结论** Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞生长的抑制作用可能与抑制耐药基因表达和 TNF- α /TRAF6/NF- κ B 信号通路有关。

关键词: Vialinin A; 肝癌; 耐药; HepG2/ADM 细胞; TNF- α /TRAF6/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)08-2748-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.043

肝细胞癌是男性恶性肿瘤的第二大死因, 我国的发病和死亡例数约占全球总数的 50%。目前, 顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶、长春新碱是临床上治疗原发性肝癌的主要化疗药物, 但肝癌细胞容易产生耐药性, 致使化疗失败^[1]。因此, 如何有效降低肝癌耐药性已成为肝癌治疗的研究热点。

Vialinin A 最初是从云南省的一种可食用蘑菇莲座革菌中分离得到的小分子化合物, 通过光谱研究及化学方法发现, Vialinin A 是肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 抑制剂^[2], 也是一种半选择性的泛素特异性蛋白酶抑制剂, 对泛素特异性肽酶 (ubiquitin specific peptidase 4, USP4)、USP5/异肽酶 T、泛素 C 末端水解酶 L1 去泛素化酶的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 值分别为 1.5、5.9、22.3 $\mu\text{mol/L}$ ^[3]。Vialinin A 具有抗肿瘤活性, Norikura 等^[4]研究表明, Vialinin A 可抑制人肝癌、结肠癌细胞的活力, 且对正常肝细胞没有毒性。此

外 Vialinin A 浓度依赖性阻止血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导的人脐静脉内皮细胞生长, 抑制 VEGF 诱导核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 核转位以及 DNA 结合活性^[5]。为验证 Vialinin A 对耐药肝癌细胞的活性, 本实验通过检验 Vialinin A 对 HepG2/阿霉素 (adriamycin, ADM) 细胞的生长活力、迁移能力、细胞凋亡和周期影响, 以期开发使用 Vialinin A 提供科学数据。

1 材料

1.1 细胞 肝癌细胞株 HepG2、耐药细胞株 HepG2/ADM 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 试剂与药物 Vialinin A (货号 10010519, 纯度 $\geq 98\%$) 购自美国 Cayman Chemical 公司; ADM (国药准字 H44024359) 购自深圳万乐药业有限公司; 5-氟尿嘧啶 (国药准字 H31020593) 购自上海旭东海普药业有限公司; 顺铂 (国药准字 H20046375) 购自山东罗欣药业集团股份

收稿日期: 2025-05-13
基金项目: 2023 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (202310599009); 南宁市青秀区重点研发项目 (2020023); 广西高校人体发育与疾病研究重点实验室项目 (RTFY202303); 右江民族医学院高层次引进人才项目 (yy2021sk002)
作者简介: 林自中 (1975—), 男 (壮族), 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药药理学。Tel: 1353093330, E-mail: 1353093330@qq.com
* 通信作者: 蒋利和 (1976—), 男, 博士, 研究员, 教授, 研究方向为中药药理学。E-mail: jianglihe@ymun.edu.cn

有限公司；长春新碱（CAS 号 2068-78-2）购自上海易恩化学技术有限公司；TNF- α （货号 AF-315-01A）购自美国 Pepro Tech 公司；胎牛血清（货号 A5256701）购自美国 Gibco 公司；CCK-8（货号 HY-K0301）购自美国 MedChemExpress 公司；凋亡试剂盒、周期试剂盒（货号 BD559763、BD556547）均购自美国 BD 公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白上样缓冲液、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂（货号 PC0020、P1040、R0010、A8260）均购自北京索莱宝科技有限公司；ECL 化学发光试剂盒、0.22 μm PVDF 膜（货号 1705060、1620177）均购自美国 Bio-Rad 公司；乳腺癌耐药蛋白（breast cancer resistance protein, BCRP）、多耐药基因 1（multi drug resistance 1, MDR1）、药耐药相关蛋白 1（multidrug resistance-associated protein 1, MRP1）、受体相关蛋白 6（TNF receptor associated factor 6, TRAF6）、TGF- β -活化蛋白激酶 1（transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1）、NF- κB p65、GAPDH 抗体、二抗（货号 27286-1-AP、22336-1-AP、27825-1-AP、KHC1157、12330-2-AP、10745-1-AP、10494-1-AP、SA00001-2）均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 仪器 Galaxy48R 型 CO₂ 恒温培养箱购自德国 Eppendorf 公司；Microfuge 20/20R 型低温离心机购自广州吉迪仪器有限公司；BG-power300 型电泳仪购自四川贝斯恩生物科技有限公司；51119180ET 型酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司；CYTTOMITSFC500 型流式细胞仪购自贝克曼库尔特国际贸易（上海）有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养 HepG2、HepG2/ADM 细胞使用含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的高糖 DMEM 完全培养基，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱内培养。HepG2/ADM 细胞培养基中加入 1 $\mu\text{g/mL}$ ADM 保持细胞耐药性。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力 将 HepG2、HepG2/ADM 细胞以 $5\times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板中，每孔 100 μL ，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h，待细胞贴壁后弃去培养液，分别加入含 0、4、8、16、32、64 $\mu\text{mol/L}$ Vialinin A、ADM、5-氟尿嘧啶、顺铂、长春新碱的 DMEM 培养基继续培养 48 h，每组设置 3 个复孔，弃去培养基，加入含 10% CCK-8 的 DMEM 培养基培养 1 h，以仅有 DMEM 培养基为空白组，在 450 nm 波长处检测光密度（OD）值，计算细胞抑制率，公式为细胞抑制率=（1-OD_{药物组}/OD_{空白组}） $\times$ 100%。利用 SPSS 16.0 软件计算 IC₅₀ 值。

2.3 流式细胞术检测细胞周期 将对数生长期的 HepG2/ADM 细胞以 $5\times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 6 孔板中，每孔 100 μL ，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。设置对照组和 Vialinin A 20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 组，对照组不加任何溶液，Vialinin A 各剂量组加入含相应药物的 0.1% DMSO，每组设置 3 个复孔，培养 24 h。收集各组细胞，加入 5 μL PI 和 500 μL Binding Buffer 缓冲液重悬细胞，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育

25 min，用流式细胞仪检测细胞周期。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 取对数生长期 HepG2/ADM 细胞，按“2.3”项下方法分组培养 24 h 后收集各组细胞，PBS 洗涤 2 次，1 200 r/min 离心 3 min，加入 500 μL Binding Buffer 缓冲液重悬细胞，加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 混合均匀，充分吹打散开，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 15~30 min，用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 RT-qPCR 法检测细胞 *BCRP*、*MDR1*、*MRP1* mRNA 表达 收集各组细胞，用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA，检测总 RNA 浓度。采用反转录试剂盒进行逆转录反应，qPCR 试剂盒进行扩增反应，反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，95 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s，共 40 个循环，68 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 1 min，以 *GAPDH* 为内参，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，序列见表 1。使用 2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 法进行相对定量分析。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
<i>BCRP</i>	正向 TCAGCAGCTCTTCGCCTTGC	112
	反向 TTCCAACCTTGGACTCTGCCACT	
<i>MDR1</i>	正向 AAGCTTAGTACCAAAGAGGCTCTG	243
	反向 GGCTAGAAACAATAGTGAAAAACA	
<i>MRP1</i>	正向 AGGTCAAGCTTTCGGTGTACTG	174
	反向 GGACTTTCGTGTGCTCCTGA	
<i>GAPDH</i>	正向 AACAGCGACACCCACTCCTC	116
	反向 ACCACCCGTGTGCTGTAGCC	

2.6 Western blot 法检测细胞 *BCRP*、*MDR1*、*MRP1*、TNF- α 、TRAF6、TAK1、NF- κB p65、cleaved-Caspase-3 蛋白表达 收集各组细胞，用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解，每孔加入 200 μL 。将裂解后的细胞转移至 EP 管中，4 $^{\circ}\text{C}$ 冰上裂解 40 min 提取蛋白，BCA 法检测蛋白含量，取等质量蛋白进行变性，加入蛋白上样缓冲液后冷冻保存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5% BSA 室温封闭 1 h，加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，次日加入二抗室温孵育 70 min，ECL 发光显影，凝胶分析成像仪进行条带显影，以 *GAPDH* 为内参，通过 Image J 软件计算蛋白条带灰度值。

2.7 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Vialinin A 与化疗药物对 HepG2/ADM 细胞增殖的影响 由表 2 可知，干预 48 h 后，Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞的 IC₅₀ 值为（31.52 $\pm$ 2.76） $\mu\text{mol/L}$ ，抑制效果强于 ADM、5-氟尿嘧啶、顺铂、长春新碱。

3.2 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞凋亡率的影响 由图 1 可知，与对照组比较，Vialinin A 20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2/ADM 细胞凋亡率升高（*P*<0.01），并呈浓度依赖性。

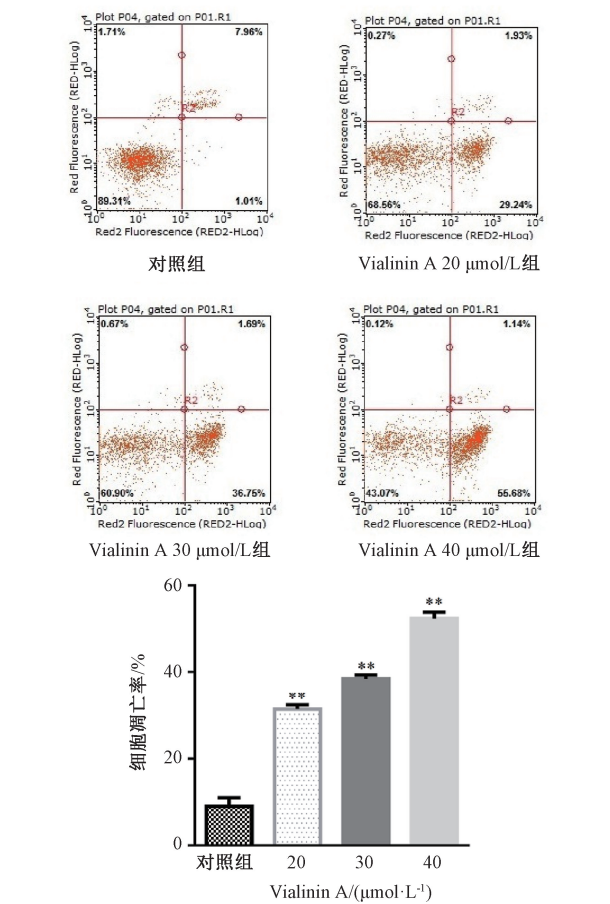
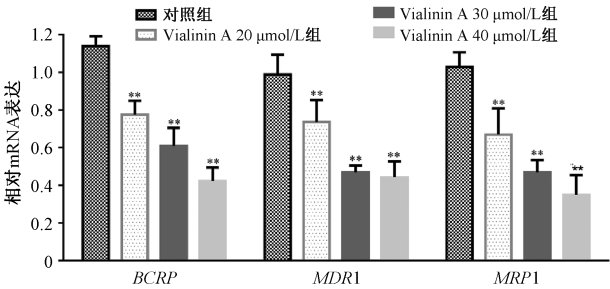


图 1 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

表 3 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	G ₀ /G ₁ 期/%	S 期/%	G ₂ /M 期/%
对照组	65.35±2.45	19.86±2.75	14.88±1.68
Vialinin A 20 μmol/L 组	56.38±3.94 **	22.57±2.69	20.45±2.38 **
Vialinin A 30 μmol/L 组	41.64±3.58 **	28.21±2.79 **	30.15±1.59 **
Vialinin A 40 μmol/L 组	33.29±3.82 **	31.26±2.29 **	35.32±3.48 **

注：与对照组比较，** $P<0.01$ 。



注：与对照组比较，** $P<0.01$ 。

图 3 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞 BCRP、MDR1、MRP1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

较，Vialinin A 20、30、40 μmol/L 组 HepG2/ADM 细胞 BCRP、MDR1、MRP1 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 并呈浓度依赖性。

表 2 Vialinin A 与化疗药物对 HepG2/ADM 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

药物	IC ₅₀ 值/(μmol·L ⁻¹)	
	HepG2 细胞	HepG2/ADM 细胞
ADM	2.57±0.36	84.47±6.56
5-氟尿嘧啶	12.85±2.43	72.52±5.43
顺铂	64.23±5.49	293.34±10.87
长春新碱	18.75±2.69	96.26±8.94
Vialinin A	9.34±1.56	31.52±2.76

3.3 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞周期的影响 由图 2、表 3 可知，随着 Vialinin A 浓度的增加，HepG2/ADM 细胞被阻滞在 G₂/M 期，并呈浓度依赖性。

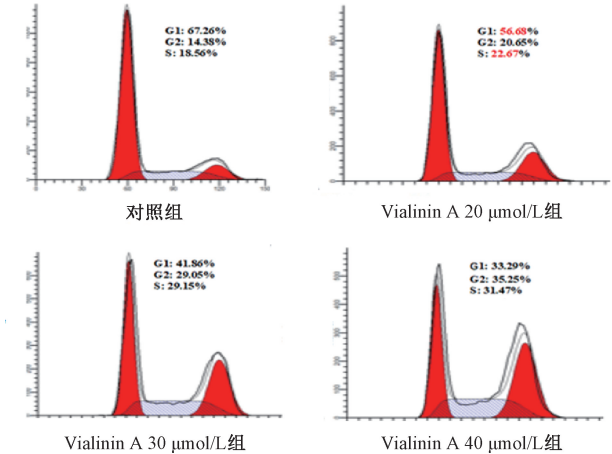
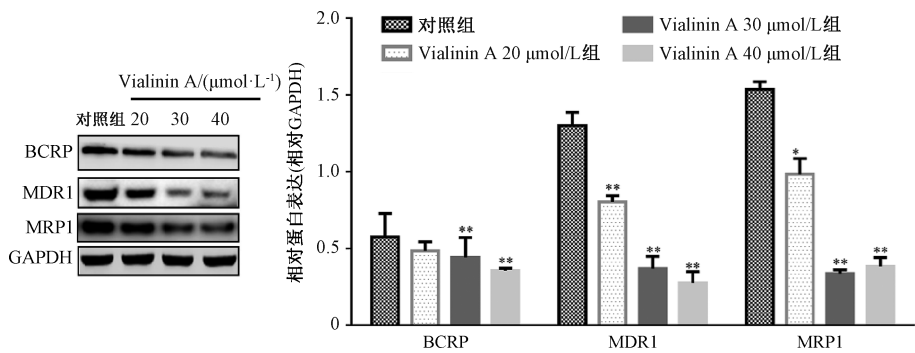


图 2 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞周期数目比例分布图

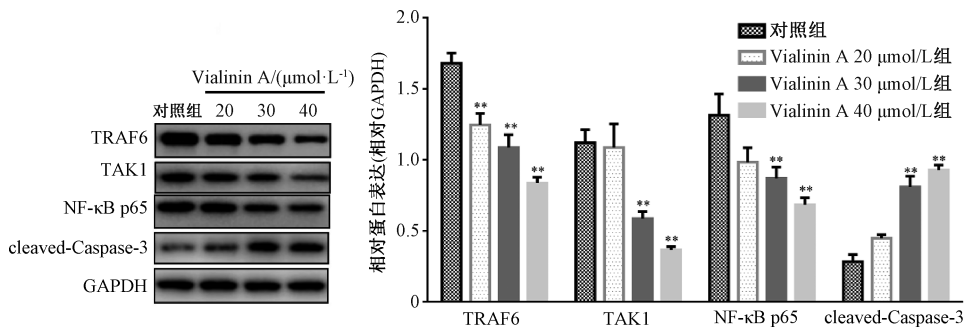
3.4 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞 BCRP、MDR1、MRP1 mRNA 和蛋白表达的影响 由图 3~4 可知，与对照组比

3.5 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞 TNF-α、TRAF6、TAK1、NF-κB p65、cleaved-Caspase-3 蛋白表达的影响 由图 5 可知，与对照组比较，Vialinin A 30、40 μmol/L 组 HepG2/ADM 细胞 TNF-α、TRAF6、TAK1、NF-κB p65 蛋白表达降低 ($P<0.01$), cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 并呈浓度依赖性。

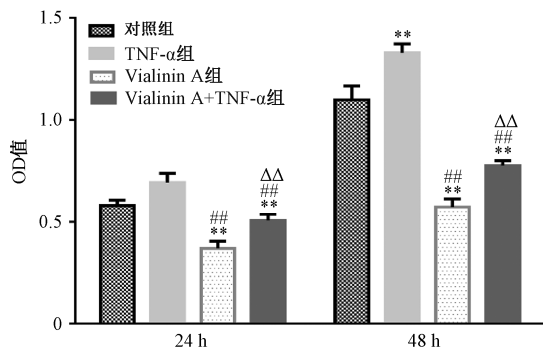
3.6 Vialinin A 通过 TNF-α 对 TRAF6/NF-κB 信号通路的影响 由图 6~7 可知，干预 48 h 后，与 TNF-α 组比较，Vialinin A 组和 TNF-α+Vialinin A 组 HepG2/ADM 细胞增殖率升高 ($P<0.01$), TRAF6、TAK1、NF-κB p65 蛋白表达降低 ($P<0.01$), 表明 TNF-α 能逆转 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞生长的抑制效应，并能促进 TRAF6/NF-κB 信号通路的激活。



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。
图 4 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞 BCRP、MDR1、MRP1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



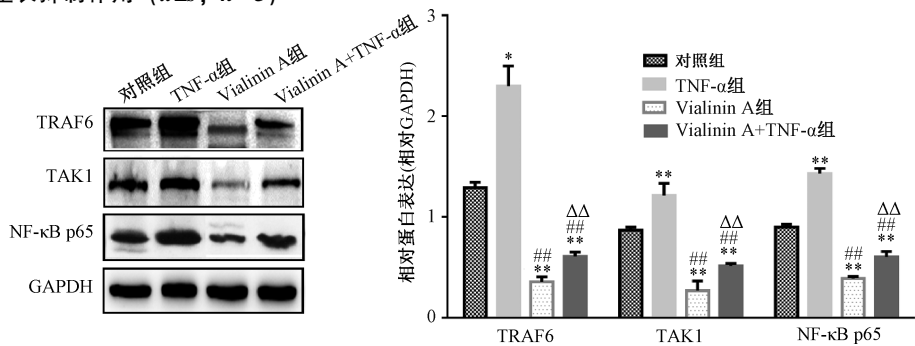
注：与对照组比较，** $P < 0.01$ 。
图 5 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞 TNF-α、TRAF6、TAK1、NF-κB p65、cleaved-Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与 TNF-α 组比较，## $P < 0.01$ ；与 Vialinin A 组比较， $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。
图 6 TNF-α 能逆转 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

肝细胞癌患者可受益于 ADM、5-氟尿嘧啶、长春新碱、铂类、索拉非尼等药物^[6]。然而，肝癌细胞容易产生多重耐药性^[7]，因此，探索具有抑制肝细胞癌耐药功能的化合物对肝癌治疗具有重要意义。Vialinin A 是对三苯化合物，具有抗氧化作用，是 TNF-α、USP4、USP5 等的有效抑制剂，还可以通过抑制 TGF-β/Smad 信号通路影响，阻止瘢痕细胞增殖^[8]，促进大鼠脂肪干细胞内 ALP、OPN mRNA 表达^[9]。在高糖条件下，Vialinin A 可抑制人视网膜微血管内皮细胞存活^[10]。此外，Vialinin A 还通过抑制 USP4 介导的去泛素化来加速 Keap1 的降解，从而缓解缺血性卒中后的氧化应激和神经元损伤^[11]。在动物体内，Vialinin A 可减少卵清蛋白诱导的小鼠肺部的炎性细胞浸润^[12]。



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与 TNF-α 组比较，## $P < 0.01$ ；与 Vialinin A 组比较， $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。
图 7 TNF-α 能逆转 Vialinin A 对 TRAF6/NF-κB 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

本实验发现, Vialinin A 能抑制 HepG2/ADM 细胞生长, 其抑制效果强于 ADM、5-氟尿嘧啶、顺铂、长春新碱, 而且还能诱导 HepG2/ADM 细胞凋亡, 使细胞周期阻滞在 G₂/M 期无法进行后续有丝分裂。耐药主要由磷酸腺苷结合盒转运蛋白介导, 包括 MDR1 和 MRP 家族成员^[13]。Vialinin A 能抑制 BCRP、MDR1、MRP1 mRNA 和蛋白表达, 提示 Vialinin A 具有逆转 HepG2/ADM 耐药的潜力, 可能这是 HepG2/ADM 对 Vialinin A 比其他化疗药物更敏感的原因之一。

TRAF6 是 E3 泛素连接酶激活 IκB 激酶, 可导致 IκBα 降解和 p65 核转位, 表明 TRAF6 在 NF-κB 激活中发挥重要作用^[14-15]。此外, TRAF6 下游信号传导的激活, 在介导的肿瘤发生中具有重要作用^[16-17]。本实验发现, Vialinin A 能抑制 TRAF6/NF-κB 信号通路相关蛋白表达, 升高 cleaved-Caspase-3 蛋白表达。同时, 考虑到 Vialinin A 是 TNF-α 的抑制剂, 本实验结果表明, TNF-α 能逆转 Vialinin A 对 HepG2/ADM 细胞生长抑制作用, 及对 RAF6/NF-κB 信号通路的抑制, 提示 Vialinin A 可能是通过抑制 TNF-α/TRAF6/NF-κB 信号通路来抑制细胞生长。

TNF-α 在肝细胞癌中的表达高于正常肝组织。研究发现, 肾细胞癌中 TNF-α 的高表达与舒尼替尼的耐药性有关^[18], 提示 TNF-α 可能是肝细胞癌患者索拉非尼敏感性的一个新的预测因子。索拉非尼联合乌司他丁可提高 TNF-α 高表达患者肝细胞癌的治疗效果^[19-20]。但肝癌细胞中 TNF-α 与耐药基因的关系还需要进一步确定。同样, Vialinin A 是否通过抑制 TNF-α 而减低耐药基因表达也有待进一步研究。

综上所述, Vialinin A 对肝癌耐药细胞株 HepG2/ADM 具有一定的抑制作用, 其机制可能与抑制 TNF-α/TRAF6/NF-κB 信号通路有关。

参考文献:

[1] Kyoko O, Asahiro M, Sae H, *et al.* The roles of epigenetic regulation and the tumor microenvironment in the mechanism of resistance to systemic therapy in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2805.

[2] Xie C, Koshino H, Esumi Y, *et al.* A novel potent inhibitor of TNF-alpha production, isolated from an edible mushroom, *Thelephora vialis*[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 12: 5424-5426.

[3] Okada K, Ye Y Q, Taniguchi K, *et al.* Vialinin A is an ubiquitin-specific peptidase inhibitor[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(15): 4328-4331.

[4] Norikura T, Fujiwara K, Narita T, *et al.* Anticancer activities of thelephantin O and vialinin A isolated from *Thelephora aurantiotincta*[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59 (13): 6974-6979.

[5] Sonowal H, Shukla K, Kota S, *et al.* Vialinin A, an edible mushroom-derived p-terphenyl antioxidant, prevents VEGF-Induced neovascularization *in vitro* and *in vivo*[J]. *Oxid Med*

Cell Longev, 2018, 2018: 1052102.

[6] Wei L, Wang X W, Lv L Y, *et al.* The emerging role of microRNAs and long noncoding RNAs in drug resistance of hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 147.

[7] Zhou X T, Ding J, Li H Y, *et al.* Hedgehog signaling mediates drug resistance through targeting TAP1 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(7): 4298-4311.

[8] 陈 燕, 章 杰. 泛素特异性蛋白酶 4 对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响[J]. *重庆医学*, 2017, 46 (15): 2021-2023; 2026.

[9] 卢跃峰, 孙 睿, 王丽娜, 等. 泛素特异性蛋白酶 4 对脂肪干细胞成骨分化的影响. *口腔颌面外科杂志*[J]. 2019, 29(2): 69-76.

[10] Chen Z G, Liu G Q, Liu W M, *et al.* Inhibition of viability of human retinal microvascular endothelial cells by vialinin A under high glucose condition[J]. *Int J Ophthalmol*, 2024, 17(10): 1809-1815.

[11] Mao M, Xia Q, Zhan G F, *et al.* Vialinin A alleviates oxidative stress and neuronal injuries after ischaemic stroke by accelerating Keap1 degradation through inhibiting USP4-mediated deubiquitination[J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155304.

[12] Hou X X, Zhu F M, Ni Y M, *et al.* USP4 is pathogenic in allergic airway inflammation by inhibiting regulatory T cell response[J]. *Life Sci*, 2021, 281: 119720.

[13] Zhang X, Wu L S, Xiao T, *et al.* TRAF6 regulates EGF-induced cell transformation and cSCC malignant phenotype through CD147/EGFR[J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(2): 17.

[14] Chen L, Li Y C, Wu L, *et al.* TRAF6 regulates tumour metastasis through EMT and CSC phenotypes in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(2): 1337-1349.

[15] Hu Y L, Feng Y, Chen Y Y, *et al.* SNHG16/miR-605-3p/TRAF6/NF-κB feedback loop regulates hepatocellular carcinoma metastasis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7637-7651.

[16] Wan C H, Wu M M, Zhang S S, *et al.* α7nAChR-mediated recruitment of PP1γ promotes TRAF6/NF-κB cascade to facilitate the progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(11): 1626-1639.

[17] Chuang M J, Sun K H, Tang S J, *et al.* Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(5): 905-913.

[18] Mikami S, Mizuno R, Kosaka T, *et al.* Expression of TNF-alpha and CD44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136 (7): 1504-1514.

[19] Tan W L, Luo X, Li W D, *et al.* TNF-α is a potential therapeutic target to overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma[J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 446-456.

[20] Wang H M, Liu J M, Hu X M, *et al.* Prognostic and therapeutic values of tumor necrosis factor-alpha in hepatocellular carcinoma[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 3694-3704.