

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.07.003

· 基础研究 ·

TRAF6在粪肠球菌感染人成骨样细胞炎症反应中的作用

卢煜, 刘成霞, 刘忠俊

南方医科大学口腔医院牙体牙髓科, 广东 广州(510280)

【摘要】 目的 探讨肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)在粪肠球菌引发的人成骨样细胞MG63炎症反应中的作用。方法 采用siRNA瞬时干扰沉默MG63细胞的TRAF6基因,用粪肠球菌灭活全菌及其脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)刺激MG63细胞不同时间,定量PCR检测细胞中Toll样受体2(toll-like receptor 2, TLR2)和TRAF6的表达量;ELISA法检测MG63细胞产生的致炎因子白细胞介素1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达量。结果 粪肠球菌及其LTA感染MG63细胞,TLR2受体和TRAF6的基因水平都有不同程度的上升($P < 0.05$)。IL-1 β 和TNF- α 的表达量都显著增高($P < 0.05$)。用siRNA抑制MG63细胞TRAF6表达后,促炎因子IL-1 β 和TNF- α 的表达量显著下降($P < 0.05$)。结论 MG63细胞主要通过TLR2受体来识别粪肠球菌及其毒性成分。粪肠球菌引起的根尖周感染中,其主要毒力因子是其细胞壁上的LTA。

【关键词】 粪肠球菌; 脂磷壁酸; Toll样受体2; 人成骨样细胞; 肿瘤坏死因子受体相关因子6

【中图分类号】 R781.05 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)07-0420-06

【引用著录格式】 卢煜, 刘成霞, 刘忠俊. TRAF6在粪肠球菌感染人成骨样细胞炎症反应中的作用[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(7): 420-425.

Role of TRAF6 in inflammatory responses of human osteoblast-like cells with *Enterococcus faecalis* LU

Yu, LIU Chengxia, LIU Zhongjun. Department of Endodontics, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: LU Yu, Email: killtan@126.com, Tel: 0086-20-84403983

【Abstract】 **Objective** Explore the role and status of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) in the inflammatory response of human osteoblast-like cells MG63 which was triggered by *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) and its lipoteichoic acid (LTA). **Methods** SiRNA technology was applied to silence the TRAF6 gene of MG63 cells, Using *E. faecalis* and its LTA to stimulate the silence MG63 cells with different hours. After that, using real-time PCR technology to detect toll-like receptor 2 (TLR2) and TRAF6 gene expression and using ELISA assay to detect pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β and TNF-alpha expression levels. **Results** When MG63 cells was infected by *E. faecalis*, its LTA, TLR2 and TRAF6 gene level has increased to varying degrees ($P < 0.05$); interleukin-1 β and TNF-alpha expression was significantly higher ($P < 0.05$). When TRAF6 gene of MG63 cells was silenced by siRNA, pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin -8 and TNF-alpha expression decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** *E. faecalis* and its toxic components is identified by MG63 cells mainly through TLR2 receptors. The major virulence factor in periapical infections caused by *E. faecalis* is LTA.

【Key words】 *E. faecalis*; LTA; TLR2; Human osteoblast-like cells; TRAF6

【收稿日期】 2017-03-06; **【修回日期】** 2017-04-26

【基金项目】 广东省医学科学技术研究基金(B2014028)

【通信作者】 卢煜, 主治医师, 博士, Email: killtan@126.com

牙髓根尖周病是常见的口腔疾患,其最好的处理方法就是进行完善的根管治疗。但是根管治疗后,由于各种原因,有时会发生持续性的根尖周病变不愈合,根尖出现脓肿、肉芽肿和囊肿^[1],这些失败的主要原因,被认为是在充填后的根尖区域残留了致病微生物的缘故^[1-2]。和初次感染不同,根管治疗后的继发性感染通常是由一种或者少数几种细菌导致的^[2-3]。粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*),不但会定植在未治疗的根管中,更常见于根管治疗失败的病例中,是根管治疗后根尖周长期病变不愈合的主要致病因素^[1]。肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF),在多种信号传导通路中发挥重要作用,现在已发现有7种成员(TRAF1~TRAF7)^[4-5]。其中TRAF6作为上游Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)通路和下游NF- κ B通路的关键分子,在根尖周炎的发展中也起着重要的作用。Tang^[6]等发现,在牙龈卟啉单胞菌及其LPS引发的人牙周膜成纤维细胞炎症中,TRAF6可以调控下游的促炎细胞因子的表达,但其在粪肠球菌感染的根尖周炎症中的作用还未见报道。本研究拟探讨TRAF6在粪肠球菌及其脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)引发的人成骨样细胞炎症反应中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

人成骨样细胞MG63细胞株(ATCC CRL-1427)和粪肠球菌标准株(ATCC 29212)(均由四川大学华西口腔医学院口腔疾病研究国家重点实验室提供),*E. faecalis* LTA(Sigma,美国),IL-1 β 和TNF- α ELISA试剂盒(R&D Systems,美国),兔抗人TRAF6单克隆抗体(Abcam,美国),对照IgG(Abcam,美国);TRAF6 Silencer[®] Select siRNA(Ambion,美国),PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time)(Takara,中国),SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(Perfect Real Time)(Takara,中国),BD Cytotfix/Cytoperm[™] 细胞固定/通透液试剂盒(BD Bioscience,美国),7300型荧光定量PCR仪(ABI,美国),GelDoc XR System凝胶成像系统(BioRad,美国)。

1.2 细菌培养

将粪肠球菌标准株接种BHI液体培养基中,厌氧条件下增菌培养24 h。涂片染色观察无污染物,离心收集,用PBS以10 000 g离心5 min清洗两次细菌,并用PBS重悬细菌。调整细菌悬液浓度近似于

1×10^8 CFU/mL。将计数好的*E. faecalis*菌悬液分装在离心管内进行热灭活备用。

1.3 流式细胞术和Western blot检测siRNA转染MG63后TRAF6蛋白表达

用含10%胎牛血清和双抗的RPMI1640培养液常规培养MG63细胞,消化收集细胞,计数后配为 2×10^5 个/mL细胞悬液,接种于6孔培养板,每孔加入2 mL细胞悬液。置37℃孵箱中培养24 h后,去除原培养基,用 $1 \times$ PBS冲洗2次后换用无血清无双抗的RPMI1640饥饿24 h后备用。

在进行转染实验的前一天,将培养的MG63细胞接种至6孔板内,每孔加入 2×10^5 个细胞,加入无双抗的RPMI1640进行培养。当细胞的融合度达到70%~90%时开始进行转染实验。TRAF6siRNA及对照siRNA转染运用Lipofectamine[®] 2000转染试剂盒,按说明书操作。

TRAF6的沉默效率用流式细胞技术检测,分别在0 h、24 h和36 h三个时间点检测沉默后TRAF6的表达水平,选取沉默效率最高的时间进行下一步实验。转染后TRAF6的蛋白表达情况,用Western blot检测siRNA转染MG63后TRAF6的沉默效率。

1.4 *E. faecalis*及其LTA刺激MG63细胞

将灭活后的*E. faecalis*细菌悬液计数后在10 000 g离心5 min后弃上清,加入适量RPMI1640配成 2×10^7 个/mL,吹打混匀后备用。

将*E. faecalis*的LTA用RPMI1640溶解稀释为10 μ g/mL后备用。

将培养皿中原培养基去除,每孔加入*E. faecalis*灭活全菌悬液2 mL,使MOI为100;或*E. faecalis*的LTA溶液2 mL,分别培养0 h、6 h、24 h。分组如下:①空白对照组;②转染对照组(转染对照siRNA);③转染组(转染TRAF siRNA)。

1.5 Real-time PCR检测MG63细胞中的TLR2和TRAF6基因表达

按Trizol试剂操作说明,提取全细胞总RNA。用PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒,按说明操作,将总RNA逆转录为cDNA备用。采用SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(Perfect Real Time)荧光定量PCR试剂盒按说明书操作进行PCR反应,待测分子的引物序列见表1。应用ABI PRISM 7300荧光定量PCR仪对样本进行PCR反应。本实验采用标准曲线法,用各自基因的PCR产物按浓度梯度稀释: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ 建立标准曲线。待测基因的表达水平通过ABI PRISM 7300软件利用标准

曲线的线性回归计算得出,并与各自样本相对应的内参(GAPDH)标准化后得出最后结果。待测的基因表达水平表现为与对照组相比较的倍数关系。

TLR2 引物序列:上游 5'-GGAGCTGGAGA-ACTTCAATCC-3';下游 5'-CTTGCACCACTCACTCTTCAC-3';片段长度 160 bp。TRAF6 引物序列:上游 5'-GATGCAGAGGAATCACTTGGC-3';下游 5'-GGTCTGTCTTACAAGGCGAC-3';片段长度 167 bp。GAPDH 引物序列:上游 5'-GTCTTCACCACCATG-GAGAAG-3';下游 5'-GTTGTCATGGATGACCTTGGC-3';片段长度 201 bp。

1.6 ELISA 检测 *E. faecalis* 及其 LTA 刺激 MG63 细胞培养上清液中促炎细胞因子的表达

在 0 h、8 h、24 h,吸取 6 孔板中培养上清液,

2 500 rpm,离心 20 min,取上清检测 IL-1 β 和 TNF- α 两个促炎因子。ELISA 检测方法均按照试剂盒说明书进行。

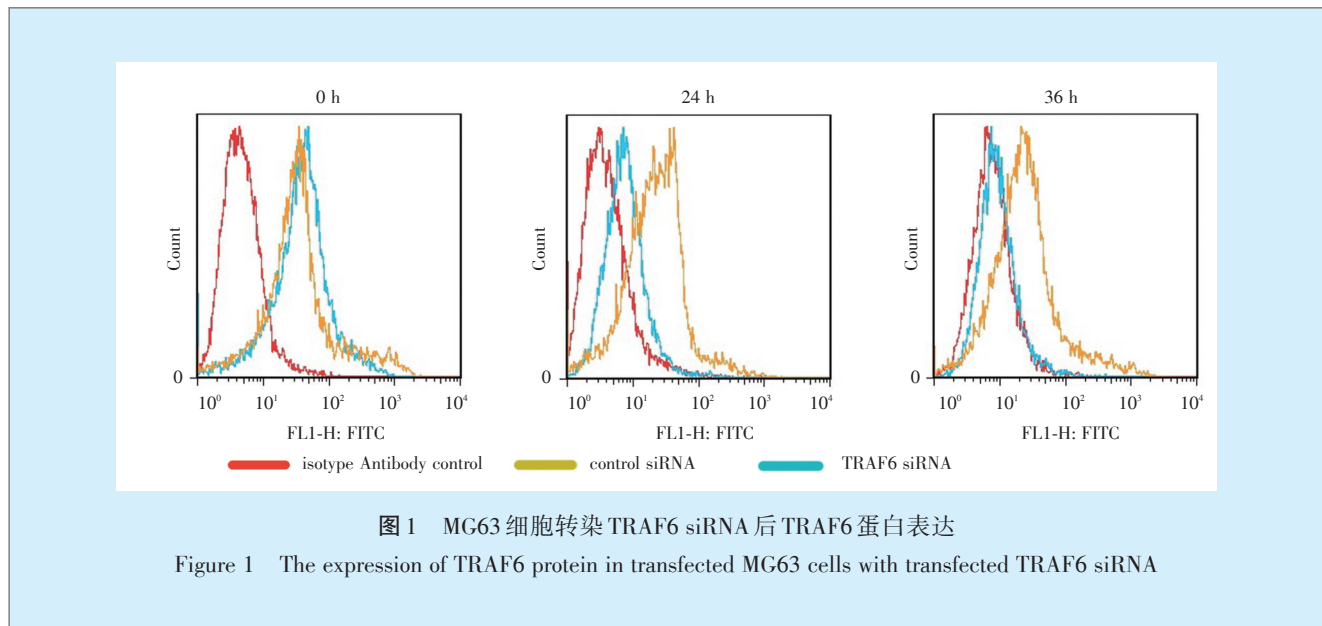
1.7 统计学分析

所有实验至少重复 3 次,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 21.0 软件进行数据分析。采用成组 Student *t* 检验,检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 流式细胞术和 Western blot 检测 TRAF6 蛋白的表达

在 0 h、24 h 和 36 h 后,用流式细胞技术检测 MG63 细胞内 TRAF6 的表达水平,在 TRAF6 siRNA 转染 36 h 后,TRAF6 表达最低(图 1)。



分别将 TRAF6 siRNA 和对照 siRNA 转染 MG63 细胞 36 h,然后用 *E. faecalis* 及其 LTA 刺激 MG63 细胞。用 Western blot 检测 TRAF6 的沉默效率,转染 TRAF6 siRNA 的 MG63 细胞中 TRAF6 蛋白条带浓度不随时间增强(图 2)。

2.2 定量 PCR 检测 *E. faecalis* 及其 LTA 感染 MG63 细胞时 TLR2 和 TRAF6 基因的表达情况

在 *E. faecalis* 及其 LTA 感染 MG63 细胞不同时间段后,全菌刺激的空白对照组、转染对照组和转染组 3 组细胞 TLR2 基因水平均有显著增高(表 1)。空白对照组和转染对照组的 TRAF6 基因表达水平显著增高,而转染组 TRAF6 基因表达在不同时间段基本没变化(表 1),说明 TRAF6 基因已

经完全被抑制。

2.3 TRAF6 沉默抑制 *E. faecalis* 及其 LTA 诱导 MG63 细胞致炎细胞因子表达

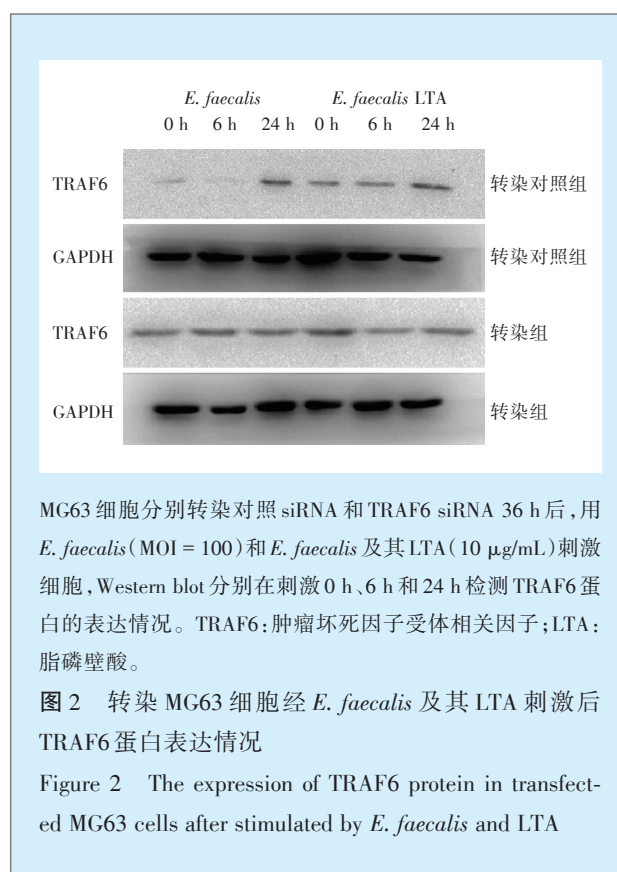
在不同时间段的 *E. faecalis* 及其 LTA 感染 MG63 细胞时,全菌刺激的空白对照组、转染对照组和转染组 3 组细胞 IL-1 β 的产生在 8 h 升高 4.23 倍、4.09 倍和 1.77 倍,在 24 h 升高 8.75 倍、8.46 倍和 2.34 倍。LTA 刺激的 3 组细胞 TNF- α 的产生在 8 h 升高 3.66 倍、3.55 倍和 1.48 倍,在 24 h 升高 5.53 倍、5.28 倍和 2.05 倍。无论在 8 h 还是 24 h,无论是全菌还是 LTA 刺激,当 TRAF6 被抑制后,细胞分泌 IL-1 β 的能力都被显著抑制($P < 0.05$)(表 2)。

在不同时间段的 *E. faecalis* 及其 LTA 感染 MG63 细胞时,全菌刺激的空白对照组、转染对照组和转染组 3 组细胞 TNF- α 的产生在 8 h 升高 10.97 倍、10.93 倍和 5.07 倍,在 24 h 升高 7.03 倍、7.01 倍和 3.81 倍。LTA 刺激的 3 组细胞 TNF- α 的产生在 8 h 升高 8.55 倍、9.25 倍和 3.77 倍,在 24 h 升高 5.58 倍、5.83 倍和 2.76 倍。在 0 h、8 h、24 h 时,转染组 TNF- α 的分泌都被显著抑制 ($P < 0.05$) (表 2)。

3 讨论

3.1 TRAF6 沉默抑制 *E. faecalis* 及其 LTA 诱导 MG63 细胞致炎细胞因子表达

在未治疗的感染根管中,一般不存在或者只有少量存在粪肠球菌^[7],而在伴有根尖周病变的根充后患牙标本中,有 24%~77% 可检出粪肠球菌^[2, 8-10]。由于粪肠球菌的生物学特性^[11-13],常规的药物冲洗、超声波清理、根管消毒以及的根管充填都不能保证完全杀死所有的细菌^[14-15];宿主的免疫细胞也不能完全消灭它^[16-17];所以粪肠球菌的存在,会造成很多治疗失败的病例。



MG63 细胞分别转染对照 siRNA 和 TRAF6 siRNA 36 h 后,用 *E. faecalis* (MOI = 100) 和 *E. faecalis* 及其 LTA (10 μ g/mL) 刺激细胞,Western blot 分别在刺激 0 h、6 h 和 24 h 检测 TRAF6 蛋白的表达情况。TRAF6:肿瘤坏死因子受体相关因子;LTA:脂磷壁酸。

图 2 转染 MG63 细胞经 *E. faecalis* 及其 LTA 刺激后 TRAF6 蛋白表达情况

Figure 2 The expression of TRAF6 protein in transfected MG63 cells after stimulated by *E. faecalis* and LTA

表 1 *E. faecalis* 及其 LTA 刺激 MG63 细胞 TLR2、TRAF6 基因表达

Table 1 Gene expression level of TLR2 and TRAF6 by *E. faecalis* and its LTA-infected MG63 cells $\bar{x} \pm s, n = 3$

分组	刺激物	TLR2						TRAF6							
		0 h	6 h	t_1 值	P_1 值	24 h	t_2 值	P_2 值	0 h	6 h	t_3 值	P_3 值	24 h	t_4 值	P_4 值
空白对照组	<i>E. faecalis</i>	1.00 \pm 0.14	11.26 \pm 1.00	2.92	0.002	12.11 \pm 0.52	2.92	0.0004	1.00 \pm 0.10	28.25 \pm 3.63	2.92	0.003	17.47 \pm 2.45	2.92	0.004
	<i>E. faecalis</i> LTA	1.00 \pm 0.11	9.35 \pm 0.96	2.92	0.002	12.66 \pm 1.40	2.92	0.0024	1.00 \pm 0.26	36.62 \pm 3.13	2.92	0.001	26.52 \pm 4.73	2.92	0.006
转染对照组	<i>E. faecalis</i>	1.00 \pm 0.15	12.37 \pm 1.20	2.92	0.002	13.57 \pm 1.52	2.92	0.002	1.00 \pm 0.18	22.18 \pm 4.98	2.92	0.009	21.98 \pm 2.72	2.92	0.003
	<i>E. faecalis</i> LTA	1.00 \pm 0.14	9.42 \pm 1.31	2.92	0.004	10.14 \pm 0.14	2.13	0.001	1.00 \pm 0.12	28.33 \pm 3.30	2.92	0.002	21.67 \pm 3.25	2.92	0.004
转染组	<i>E. faecalis</i>	1.00 \pm 0.16	10.35 \pm 1.73	2.92	0.006	6.17 \pm 1.25	2.92	0.005	1.00 \pm 0.21	1.03 \pm 0.23	2.13	0.431	1.17 \pm 0.13	2.35	0.166
	<i>E. faecalis</i> LTA	1.00 \pm 0.33	14.56 \pm 2.39	2.92	0.01	10.67 \pm 0.94	2.92	0.002	1.00 \pm 0.12	0.98 \pm 0.12	2.13	0.449	1.04 \pm 0.24	2.13	0.408

注 t_1 和 P_1 值: TLR2 表达 6 h vs TLR2 表达 0 h; t_2 和 P_2 值: TLR2 表达 24 h vs TLR2 表达 0 h; t_3 和 P_3 值: TRAF6 表达 6 h vs TRAF6 表达 0 h; t_4 和 P_4 值: TRAF6 表达 24 h vs TRAF6 表达 vs 0 h。LTA: 脂磷壁酸; TLR2: Toll 样受体 2; TRAF6: 肿瘤坏死因子受体相关因子 6。

表 2 *E. faecalis* 及其 LTA 刺激 MG63 细胞产生 IL-1 β 、TNF- α

Table 2 IL-1 β and TNF- α secretion by *E. faecalis* and its LTA-infected MG63 cells $\bar{x} \pm s, n = 3, \text{pg/mL}$

组别	IL-1 β						TNF- α					
	0 h		8 h		24 h		0 h		8 h		24 h	
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecelis</i> LTA	<i>E. faecelis</i>	<i>E. faecelis</i> LTA	<i>E. faecelis</i>	<i>E. faecelis</i> LTA	<i>E. faecelis</i>	<i>E. faecelis</i> LTA	<i>E. faecelis</i>	<i>E. faecelis</i> LTA	<i>E. faecelis</i>	<i>E. faecelis</i> LTA
空白对照组	22.42 \pm 2.91	22.42 \pm 2.91	94.82 \pm 9.90	82.09 \pm 6.31	196.27 \pm 11.18	123.93 \pm 6.56	42.69 \pm 7.81	42.69 \pm 7.81	468.39 \pm 37.26	365.05 \pm 16.30	300.08 \pm 37.05	237.98 \pm 25.01
t_1 值			2.92	2.13	2.35	2.35			2.13	2.13	2.92	2.92
P_1 值			0.005	0.001	0.001	0.001			0.001	0.001	0.015	0.009
转染对照组	22.85 \pm 0.71	22.85 \pm 0.71	93.58 \pm 12.91	81.05 \pm 6.89	193.25 \pm 8.56	120.70 \pm 10.60	46.47 \pm 2.87	46.47 \pm 2.87	507.79 \pm 49.15	429.89 \pm 28.00	325.67 \pm 25.55	270.88 \pm 36.17
t_2 值			2.92	2.35	2.35	2.92			2.35	2.13	2.92	2.92
P_2 值			0.01	0.001	0.001	0.004			0.002	0.005	0.001	0.011
转染组	31.71 \pm 0.35	31.71 \pm 0.35	56.24 \pm 2.40	46.77 \pm 6.21	74.30 \pm 7.07	65.06 \pm 3.78	46.70 \pm 7.49	46.70 \pm 7.49	237.54 \pm 30.58	176.06 \pm 21.48	178.20 \pm 6.79	129.06 \pm 4.91

注 t_1 和 P_1 值: 空白对照组 vs 转染组升高的倍数; t_2 和 P_2 值: 转染对照组 vs 转染组升高的倍数。LTA: 脂磷壁酸; IL-1 β : 白细胞介素 1 β ; TNF- α : 肿瘤坏死因子 α 。

作为最主要的类型识别受体(pattern recognition receptors, PPRs)之一的TLRs,能够识别多种配体,在感染发生的初期即可转导信号,启动机体的防御反应。其中TLR2主要是G⁺菌及其胞壁成分、支原体脂蛋白、分枝杆菌及真菌的信号受体^[18]。TLR2与相应配体结合后,通过MyD88通路把信号转导到下游,活化NF- κ B,最终产生炎症细胞因子的分泌。而TRAF6是MyD88通路的关键连接蛋白。TRAF6在多种炎症发展的过程中发挥了关键的作用,Ahmad等发现TRAF6在介导关节炎的IL-1的分泌中发挥了主要的作用,敲除了TRAF6基因的小鼠关节炎中,IL-1的分泌大大减少^[19]。TRAF6在肾小管肾炎中也是介导炎症细胞因子的关键分子,敲除了TRAF基因的小鼠肾小管细胞在LPS刺激下,炎症细胞因子的分泌降低^[20]。动脉粥样硬化的发展中,TRAF6也是必不可少的,Lutgens等发现阻断TRAF6通路,可以降低动脉粥样硬化的炎症反应^[21]。在小鼠脓毒血症的模型中,TRAF6也介导了关键的步骤^[22]。Zhang等^[23]发现TRAF6可以调控粪肠球菌介导的人牙周膜成纤维细胞的炎症过程,但TRAF6在牙槽骨感染中的作用还未见报道。

本研究建立粪肠球菌感染MG63细胞的模型,模拟体内根尖周炎骨质破坏的病理过程。本研究证明了:①粪肠球菌及其主要毒力成分LTA可以刺激MG63细胞的TRAF6基因表达升高;②当TRAF6基因被沉默后,粪肠球菌仍然能够刺激人牙髓成纤维细胞表达TLR2受体,这说明这些受体是在TRAF6基因的上游,不会受到TRAF6沉默与否的影响,他们启动的信号转导通路,仍然是在向下传导;③当TRAF6基因被沉默后,下游的炎症细胞因子IL-1 β 和TNF- α 的表达显著降低,说明在粪肠球菌造成的根尖周骨质破坏中,TRAF6是这条信号通路上的一个关键分子,发挥着重要的作用;④当TRAF6基因被沉默后,炎症细胞因子的表达并未完全消失,而是有少许增加,推测是否TLR2也可以部分通过其他途径作用于下游,这还需要后续的研究。

3.2 MG63细胞来源及特性

直接从人体来源的成骨细胞对于骨改建的研究是最好的,但由于人类离体骨获取途径较少,给实验的重复性和连续性造成了一定的困难。MG63细胞是人成骨样细胞,来源于人骨肉瘤,具有钙结节形成、ALP染色阳性等成骨细胞具有的大部分表

型特征,具有永生化特征,体外传代快,多次传代后细胞活性良好,近年来已广泛应用成骨细胞的基础研究中^[24]。本实验中采用MG63细胞模拟体内根尖病变过程,可以短时间内获取足量的细胞,缩短了实验时间,但其和成骨细胞仍然存在差异,在下一步的工作中,应尽量采用人成骨细胞进行实验。

参考文献

- [1] Evans M, Davies JK, Sundqvist G, et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide[J]. Int Endod J, 2002, 35(3): 221-228.
- [2] Delboni MG, Gomes BP, Francisco PA, et al. Diversity of enterococcus faecalis genotypes from multiple oral sites associated with endodontic failure using repetitive sequence - based polymerase chain reaction and arbitrarily primed polymerase chain reaction [J]. J Endod, 2017, 43(3): 377-382.
- [3] Hancock HH 3rd, Sigurdsson A, Trope M, et al. Bacteria isolated after Unsuccessful endodontic treatment in a North Am population [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2001, 91(5): 579-586.
- [4] Wixted JH, Rothstein JL, Eisenloh LC. Identification of functionally distinct TRAF proinflammatory and phosphatidylinositol3-kinase/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (PI3K/MEK) transforming activities emanating from RET/PTC fusion on coprotein[J]. J Biol Chem, 2012, 287(6): 3691-3703.
- [5] Avila M, Martinez-Juarez A, Ibarra-Sanchez A, et al. Lynkinase controls TLR4-dependent IKK and MAPK activation modulating the activity of TRAF-6/TAK-1 protein complex in mast cells[J]. Innate Immun, 2012, 18(4): 648-660.
- [6] Tang L, Zhou XD, Wang Q, et al. TNF receptor-associated factor 6 suppression inhibits inflammatory response to *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament cells[J]. Quintessence Int, 2011, 42(9): 787-796.
- [7] Moraes SR, Siqueira JF Jr, Colombo AP, et al. Comparison of the effectiveness of bacterial culture: 16s rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fuso bacterium nucleatum* in endodontic infections[J]. J Endod, 2002, 28(2): 86-89.
- [8] Engstrom B. The significance of *Enterococci* in root canal treatment [J]. Odontol Revy, 1964, 15(1): 87-106.
- [9] Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, et al. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment[J]. J Endod, 2016, 42(7): 1022-1028.
- [10] 周琦, 李军心, 钟波, 等. 不同感染程度根管内微生物群落宏基因分析的对比研究[J]. 口腔疾病防治, 2016, 24(9): 519-523.
- [11] Elkarrim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007, 103(4): 560-568.

- [12] Meire MA, Coenye T, Nelis HJ, et al. Evaluation of Nd: YAG and Er: YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms[J]. Int Endod J, 2012, 45(5): 482-491.
- [13] Pladisai P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Effectiveness of different disinfection protocols on the reduction of bacteria in *Enterococcus faecalis* biofilm in teeth with large root canals[J]. J Endod, 2016, 42(3): 460-464.
- [14] Adigüzel Ö, Yiğit-Özer S, Kaya S, et al. Effectiveness of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and MTAD on debris and smear layer removal using a self-adjusting file[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011, 112(6): 803-808.
- [15] Ganesh C, Koshy PA, Devi LS, et al. Comparative evaluation of the effect of proton pump inhibitors associated with calcium hydroxide on *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* study[J]. Endodontol, 2016, 28(1): 7-10.
- [16] Ballal NV, Yegneswaran PP, Mala K, et al. In vitro antimicrobial activity of maleic acid and ethylene diamine tetraacetic acid on endodontic pathogens[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011, 112(5): 696-700.
- [17] Du T, Wang Z, Shen Y, et al. Combined antibacterial effect of sodium hypochlorite and root canal sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals[J]. J Endod, 2015, 41(8): 1294-1298.
- [18] Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins[J]. J Immunol, 2002, 169 (1): 10-14.
- [19] Ahmad R, Sylvester J, Zafarullah M. MyD88, IRAK1 and TRAF6 knockdown in human chondrocytes inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase-13 gene expression and promoter activity by impairing MAP kinase activation[J]. Cell Signal, 2007, 19(12): 2549-2557.
- [20] Liu S, Lutz J, Chang J, et al. TRAF6 knockdown promotes survival and inhibits inflammatory response to lipopolysaccharides in rat primary renal proximal tubule cells[J]. Acta Physiologica, 2010, 199(3): 339-346.
- [21] Lutgens E, Lievens D, Beckers L, et al. Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile[J]. J Exp Med, 2010, 207(2): 391-404.
- [22] Li XM, Zhang S, He XS, et al. Nur77-mediated TRAF6 signalling protects against LPS-induced sepsis in mice[J]. J Inflamm, 2016, 13 (4): 416-427.
- [23] 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]. J Endod, 2015, 41(12): 1997-2001.
- [24] Tian YG, Zhang XL, Zhang K, et al. Effect of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on apoptosis in human osteoblast-like cells[J]. J Endod, 2013, 39(5): 632-637.

(编辑 张琳,张兆强)

· 短讯 ·

《口腔医学》2017年杂志征稿及征订启事

《口腔医学》杂志创刊于1981年,为国内继中华口腔医学杂志全国发行的第二本口腔专业杂志。南京医科大学口腔医学院主办,山东大学口腔医学院、同济大学口腔医学院、浙江大学医学院等多所高校联办。2003年杂志进入中国科技论文统计源期刊,成为中国科技核心期刊,并被美国《化学文摘》(CA)及俄罗斯《文摘杂志》等国内外重要数据库收录。

本刊既注重基础研究,又注重对临床有指导意义的研究论文,对有基金项目资助的论文及有前瞻性、创新性的文章开辟“绿色通道”,优先发表,本刊设有基础研究、临床研究、调查研究、病案分析、综述等栏目,欢迎投稿。

本刊为月刊,页码96页,采用铜版纸图片彩色印刷,定价为12.00元/期。欢迎广大读者订阅。邮发代号28-78,当地邮局订阅,单本也可直接与本刊编辑部联系。

地址:江苏省南京市汉中路136号,南京医科大学口腔医学院《口腔医学》杂志编辑部,邮政编码:210029,电话/传真:(025)86658322,85031902,E-mail:kqyx@njmu.edu.cn,网址:http://www.stomatology.cn/或http://kqyx.chinajournal.net.cn/。