

· 基础研究 ·

蛋白激酶 C δ 通过抑制自噬促进 TRAIL 诱导前列腺癌细胞凋亡

高飞, 刘荣华

(榆林市星元医院泌尿外科, 陕西榆林 719000)

Protein kinase C δ promotes TRAIL-induced apoptosis of prostate cancer cells by inhibiting autophagy

GAO Fei, LIU Rong-hua

(Department of Urology, Xingyuan Hospital of Yulin, Yulin 719000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of protein kinase(PK) C δ on autophagy in castration-resistant prostate cancer cells and to explore the possible mechanism. Methods Castration-resistant prostate cancer cell lines C4-2 and CWR22Rv1 were used as cell models, cultured and divided into DMSO control, BAF-A1, TRAIL, PMA and rottlerin groups. The cell survival was detected with MTT assay. The changes of mTOR pathway, autophagy-related protein markers and apoptosis-related protein markers were assessed with Western blot. The change of autophagy was determined with GFP-LC3. Results The autophagy of C4-2 and CWR22Rv1 cells was induced by TRAIL. PMA inhibited the autophagy by activating the mTOR signaling pathway and increasing the apoptosis sensitivity to TRAIL. PKC δ was a key molecule inhibiting autophagy in this process. Conclusion The PKC δ /AKT/mTOR pathway negatively regulates autophagy of C4-2 and CWR22Rv1 cells, and activation of this pathway promotes TRAIL-induced apoptosis.

KEY WORDS: prostate cancer; autophagy; PKC δ ; mTOR signaling pathway

摘要:目的 探讨蛋白激酶 C δ 在去势抵抗性前列腺癌细胞中对自噬的影响, 并研究其相关机制。方法 使用去势抵抗性前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 作为研究对象, 将细胞进行分组, 分别使用 DMSO 对照、BAF-A1、TRAIL、PKC δ 激活剂 PMA 和 PKC δ 抑制剂 rottlerin 对细胞进行处理。用 MTT 检测各组药物处理后细胞存活状况; 用 Western blot 检测各组药物处理后 mTOR 通路、自噬相关蛋白和凋亡相关蛋白的变化; 用 GFP-LC3 荧光蛋白标记检测细胞内自噬作用的变化。结果 TRAIL 诱导去势抵抗性前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 自噬作用增强。PMA 可以通过激活 mTOR 通路抑制自噬并提高细胞对 TRAIL 的凋亡敏感性。PKC δ 在此过程中是抑制自噬作用的关键分子。结论 本研究证实在去势抵抗性前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 中, PKC δ /AKT/mTOR 通路对细胞自噬的负向调节作用, 激活该通路可以促进 TRAIL 诱导的细胞凋亡现象。

关键词: 前列腺癌; 自噬; PKC δ ; mTOR 信号通路

中图分类号: R737.25

文献标志码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1009-8291.2019.02.014

前列腺癌是全球癌症相关死亡的主要原因之一。在前列腺癌的早期阶段, 雄激素剥夺治疗是首选疗法。然而大多数肿瘤将在大约 2 年内复发, 并形成去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC)。在这个疾病阶段, 前列腺癌不再对雄激素剥夺治疗有反应, 其发生和发展与多种遗传学因素有关。然而, 大部分该过程的相关分子机制仍然未知, 目前仍对其缺乏有效的治疗手段。但一些药物可以刺激诱导前列腺癌细胞发生凋亡, 因此研究其相关机制有可能成为治疗去势抵抗性前列腺癌的突破手段^[1]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 TNF 相关的细胞凋亡诱导配体 (tumour

necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 是死亡受体配体超家族的成员, 并被认为是潜在的抗前列腺癌药物。其中, TRAIL 可以与受体结合后形成死亡复合体活化 Caspase 8, 促进死亡受体下游效应蛋白的激活, 从而诱导细胞发生凋亡, 而不会对正常细胞产生显著的毒性, 是一个极具前景的肿瘤治疗药物^[2]。然而, 单独对去势抵抗性前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 使用 TRAIL 却并不能使细胞发生凋亡现象。其原因是因为细胞中的自噬可以通过调节 Caspase 8 来决定细胞对 TRAIL 受体的应答现象, 高活性的自噬作用会导致前列腺癌细胞对 TRAIL 的耐药性, 而抑制细胞自噬作用可以促进 TRAIL 诱导的细胞死亡^[3-5]。

在前列腺癌细胞中低浓度的丙二醇甲醚醋酸酯 (PHORBOL-12-MYRISTATE-13-ACETATE, PMA)

收稿日期: 2018-04-16

修回日期: 2018-08-22

作者简介: 高飞 (1982-), 男 (汉族), 本科, 主治医师, 研究方向: 泌尿外科。E-mail: 819005353@qq.com

可以促进 TRAIL 诱导的细胞凋亡^[6]。PMA 是蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的激活剂, 而 PKC 在调节各种细胞过程中起重要作用, 包括分化、增殖等。蛋白激酶 C 家族包括经典型 (α 、 β I、 β II 和 γ)、新型 (δ 、 ϵ 、 η 和 θ) 和非典型 (ζ 和 λ /i), 它们分别在不同的细胞和组织中呈现不同的分布以及发挥独特的功能^[7]。PMA 可以有效激活经典型和新型 PKC 从而引发各种的细胞反应。此过程取决于细胞类型和不同 PKC 同功酶的相对表达量^[8]。因此, 研究 PKC 参与何种信号通路的调节有助于了解 PKC 同功酶在癌细胞中发挥的作用。

在本研究中, 我们发现 PKC δ 为前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 细胞自噬过程的关键调节因子。实验结果显示 PKC δ 可以通过使蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 也称为 AKT) 磷酸化上升, 诱导哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路的活化来抑制细胞自噬, 从而增强细胞对 TRAIL 的敏感性, 对将来改善药物对去势抵抗性前列腺癌的治疗效果有一定帮助。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 TNF 相关凋亡诱导配体 TRAIL、溶酶体降解抑制剂巴佛洛霉素 A1 (Bafilomycin A1, BAF-A1)、细胞存活检测试剂噻唑蓝 (MTT)、PKC δ 选择性抑制剂 rottlerin, 美国 sigma 公司; PMA, 上海碧云天生物技术公司; RPMI-1640 培养基, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清, 美国 Gibco 公司; 抗体 p-mTOR、mTOR、p-p70、p70、LC3-A、LC3-B、ATG3、p-AKT、AKT、PKC δ 、PARP, 美国 Cell Signaling 公司; 抗体 β -actin, 美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养 人前列腺癌细胞株 C4-2、CWR22Rv1 引自美国 ATCC 并培养于 RPMI 1640 (含 5%~10% 胎牛血清) 细胞培养基中, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。

1.3 GFP-LC3 转染 细胞接种于 24 孔板中, 使细胞贴壁后密度为 50%~60%, 每种细胞设置 3 个重复孔。按照说明书使用 X-tremeGENE HP DNA 转染试剂转染 GFP-LC3 质粒, 放回 37 °C、5% CO₂ 培养箱 48 h 后加药, 待处理细胞根据实验过程分组。TRAIL 诱导前列腺癌细胞自噬作用实验中分为 4 组 (图 1A): DMSO 对照 (20 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L)、DMSO (10 nmol/L) + BAF-A1 (10 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L) + BAF-A1 (10 nmol/L); rottlerin 抑制 PKC δ 在前列腺癌细胞的抑自噬实验中分为 4 组 (图 3C): DMSO 对照 (20 nmol/L)、

TRAIL (10 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L) + PMA (1 nmol/L); TRAIL (10 nmol/L) + PMA (1 nmol/L) + rottlerin (10 nmol/L)。5% CO₂, 37 °C 孵育 24 h 后, 置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.4 MTT 法检测存活细胞 收集对数期细胞, 使细胞悬液浓度为 5×10^5 个/mL, 将悬液加入 96 孔板使待测细胞数量至每孔 5 000 个/mL, 待细胞贴壁后加药, 待处理细胞根据实验过程分组。低剂量 PMA 抑制前列腺癌细胞自噬作用实验中分为 4 组 (图 2A): DMSO 对照 (20 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L)、PMA (1 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L) + PMA (1 nmol/L); rottlerin 抑制 PKC δ 在前列腺癌细胞的抑自噬实验中分为 4 组 (图 3B): DMSO 对照 (20 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L) + PMA (1 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L) + PMA (1 nmol/L) + rottlerin (10 nmol/L)。每组设 3~5 个复孔。5% CO₂、37 °C 孵育 24 h 后, 每孔换液加入浓度 5 mg/mL MTT 200 μ L, 继续培养 4 h 后, 弃去孔内培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 在酶联免疫检测仪上测定 490 nm 波长处各孔吸光度值, 记录实验结果, 计算细胞生长抑制率。

1.5 Western blot 实验 收集对数期细胞制成细胞悬液, 将悬液加入 10 cm 培养皿中, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 细胞在培养皿中生长达到 70%~90% 时加药, 待处理细胞根据实验过程分组。TRAIL 诱导前列腺癌细胞自噬作用实验中分为 4 组 (图 1B): DMSO 对照 (20 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L)、DMSO (10 nmol/L) + BAF-A1 (10 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L) + BAF-A1 (10 nmol/L); 低剂量 PMA 抑制前列腺癌细胞自噬作用实验中分为 4 组 (图 2B): DMSO 对照 (20 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L)、PMA (1 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L) + PMA (1 nmol/L); rottlerin 抑制 PKC δ 在前列腺癌细胞的抑自噬实验中分为 4 组 (图 3A): DMSO 对照 (20 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L) + PMA (1 nmol/L)、TRAIL (10 nmol/L) + PMA (1 nmol/L) + rottlerin (10 nmol/L)。5% CO₂、37 °C 孵育 24 h 后提取蛋白。加入 RIPA 裂解液置于冰上裂解 10 min, 15 000 r/min 4 °C 离心 15 min, 小心将上清液移入新 EP 管中, 加入 6 \times loading buffer 并振荡混匀, 置入 100 °C 的沸水中 5 min 使其变性。取适量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 并转至 NC 膜上, 室温封闭 1 h。加入目的蛋白一抗抗体 4 °C 孵育过夜。用 TBST 洗膜后, 加入相应的二抗抗体, 室温孵育 1 h。TBST 洗膜后, 使用 ECL 显影。根据发

光强弱选择合适的曝光时间。

1.6 统计学方法 数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 TRAIL 诱导去势抵抗性前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 自噬作用增强 为了验证在 TRAIL 刺激下的去势抵抗性前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 中

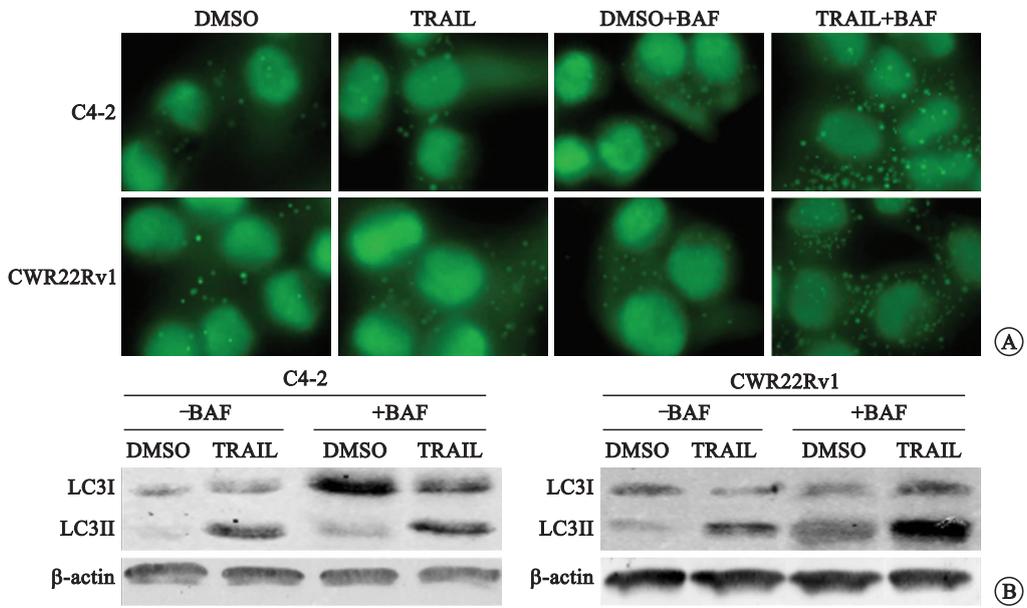


图1 TRAIL 诱导抵抗型前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 自噬作用增强

A: C4-2 和 CWR22Rv1 细胞转染 GFP-LC3 质粒后加药处理,在荧光显微镜下观察结果;

B: C4-2 和 CWR22Rv1 细胞药物处理后提取蛋白并用 Western blot 检测相关指标。

2.2 低浓度 PMA 通过激活 mTOR 通路抑制自噬并提高细胞对 TRAIL 的敏感性 为了明确 PKC δ 与前列腺癌细胞自噬之间是否有相互作用并且是否影响凋亡,本研究检测了 PKC δ 的激活下自噬及其相关通路的活性以及细胞凋亡情况。图 2A 中 MTT 实验结果显示在低浓度 PMA 和 TRAIL 的共同作用下,前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 发生凋亡的细胞数量有明显上升,而单独使用低浓度 PMA 或者 TRAIL 刺激却不能使细胞发生凋亡。图 2B 所示 Western Blot 结果中,PARP 剪切体的出现提示了细胞凋亡的增多。在此实验中,为了观察 PKC δ 对 mTOR 通路以及下游自噬现象是否有影响,我们检测了相应的蛋白指标。如图所示,在加入 PMA 的 C4-2 和 CWR22Rv1 细胞中,PKC δ 蛋白表达上调的同时,AKT 蛋白的磷酸化程度也有所升高。而磷酸化的 AKT 可以活化 mTOR 蛋白使其磷酸化。同时 p70S6K 蛋白作为 mTOR 下游的蛋白分子,其磷酸化水平的上升也反映了 mTOR 通路的活性增加。在加入 PMA 的细胞中,我们均可以观察到相应蛋白磷酸

自噬是否可以发挥作用,本研究检测了在 TRAIL 刺激下细胞自噬的活性。如图 1A 所示,在转染了 GFP-LC3 的 C4-2 和 CWR22Rv1 细胞中,荧光点数量在 TRAIL 的刺激下明显上升。图 1B 中 Western blot 检测结果也显示,在 TRAIL 的刺激下,细胞内 LC3I 型蛋白向 LC3II 型蛋白转化增多。这些结果都表明了 TRAIL 可以使细胞内自噬效果明显增强,提示自噬促进细胞的存活作用。

化的现象,而未加入 PMA 的细胞则未观察到 mTOR 通路的激活。已知 mTOR 通路作为自噬的关键调节通路,其增强会明显抑制细胞内的自噬作用,而 LC3I 蛋白向 LC3II 的转化可以体现自噬作用的增强。结果显示在 TRAIL 的刺激下,LC3I 蛋白向 LC3II 的转化增多,提示细胞的自噬过程的发生。而在加入 PMA 之后,mTOR 通路激活,Western blot 结果显示 LC3I 蛋白向 LC3II 的转化减少,提示细胞的自噬过程被阻断。

2.3 PKC δ 在前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 中是抑制自噬作用的关键分子 之前的实验已经说明 PMA 可以使 C4-2 和 CWR22Rv1 细胞中蛋白 PKC δ 、蛋白 AKT 以及 mTOR 通路被激活,但 mTOR 通路的激活是否由 PKC δ 控制仍需进一步确认。此实验中,我们在 PMA 的刺激下加入了 PKC δ 的抑制剂 rottlerin 以阻断 PKC δ 的激活。如图 3A 所示,在 TRAIL 的作用下,细胞 LC3I 蛋白向 LC3II 的转化增多,加入 PMA 后蛋白 AKT 以及 mTOR 通路蛋白磷酸化增多,LC3I 蛋白向 LC3II 的转化减少。

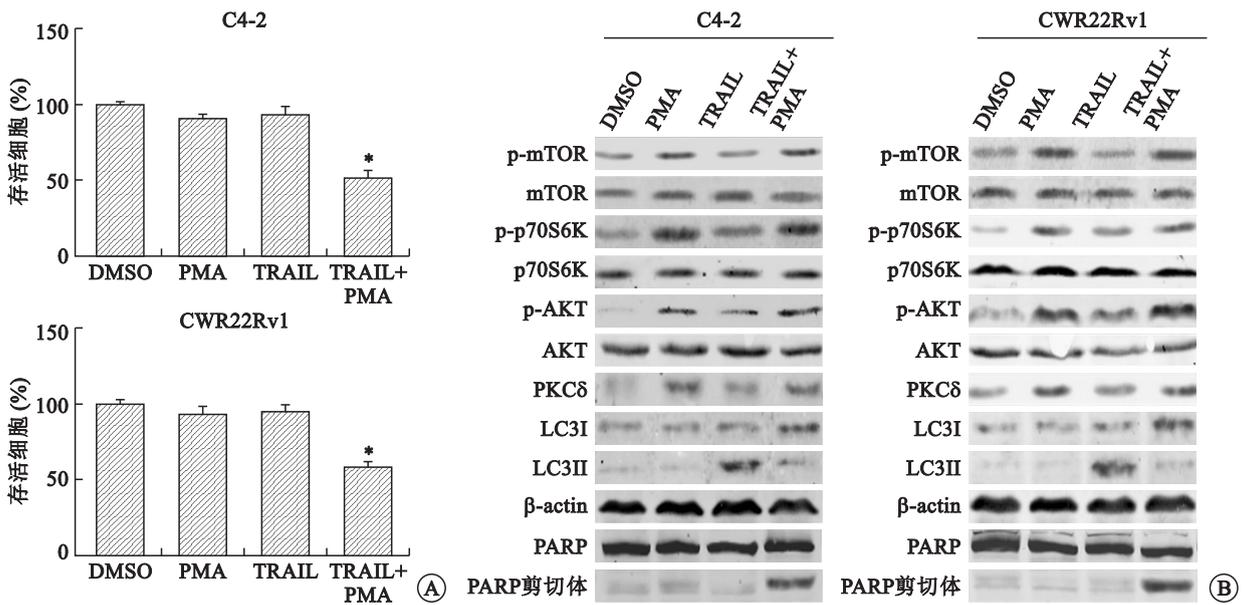


图2 PMA通过激活mTOR抑制自噬并提高细胞对TRAIL的凋亡敏感性

A: C4-2和CWR22Rv1细胞药物处理后MTT检测各组细胞的存活细胞数, * $P < 0.05$; B: C4-2和CWR22Rv1细胞药物处理后提取蛋白并用Western blot检测相关指标。

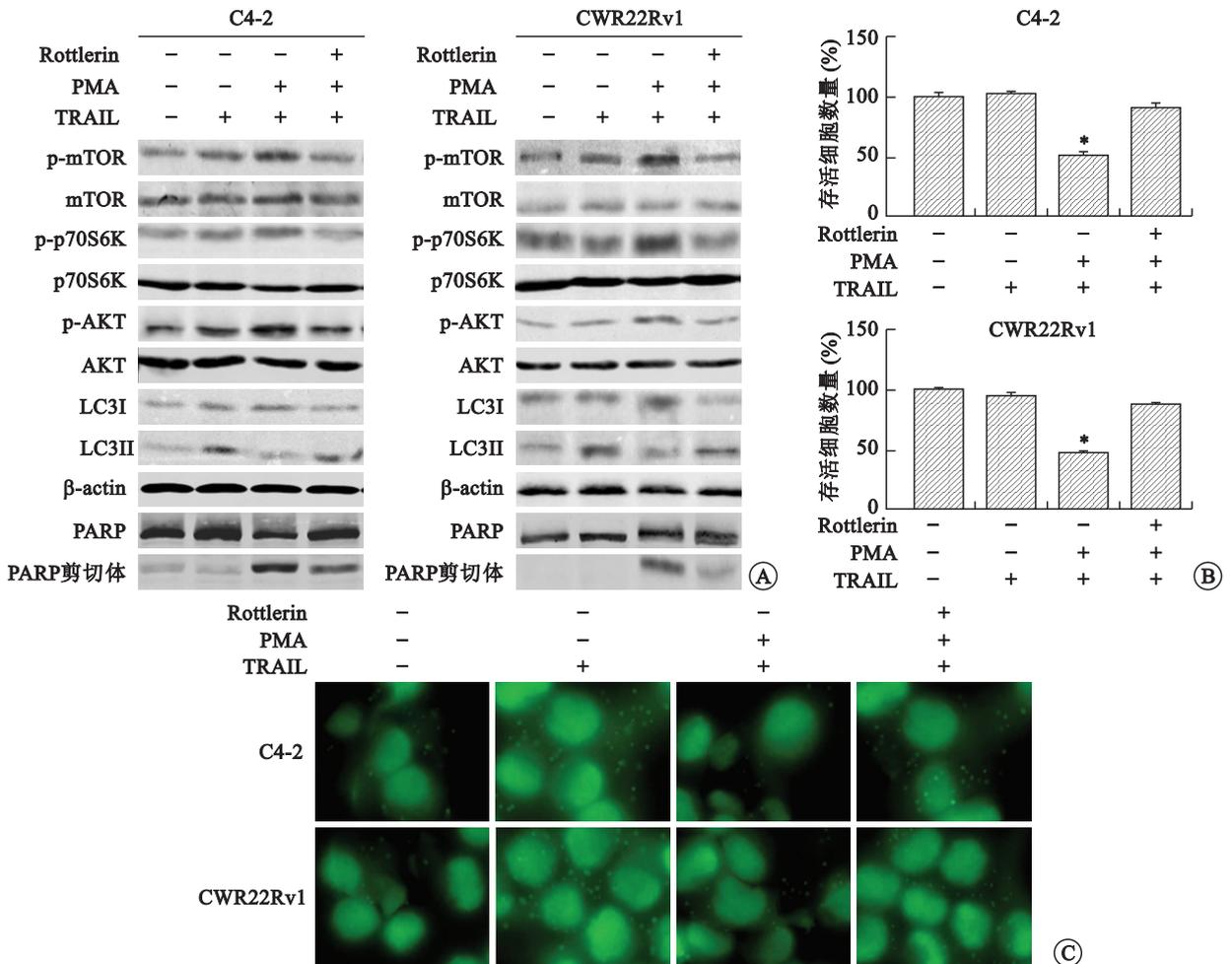


图3 PKCδ在前列腺癌细胞C4-2和CWR22Rv1中是抑制自噬作用的关键分子

A: C4-2和CWR22Rv1细胞药物处理后提取蛋白并用Western blot检测相关指标; B: C4-2和CWR22Rv1细胞药物处理后使用MTT检测各组细胞的存活细胞数, * $P < 0.05$; C: C4-2和CWR22Rv1细胞转染GFP-LC3质粒后加药处理, 在荧光显微镜下观察结果。

此结果与之前实验结果一致。而进一步加入 PKC 抑制剂 rottlerin 后,其抑制了下游蛋白 AKT 及 mTOR 通路的活性,蛋白 AKT 及其下游蛋白 mTOR 磷酸化水平降低,同时蛋白 p70S6K 的磷酸化水平降低也反映了 mTOR 通路的活化被抑制,LC3I 蛋白向 LC3II 的转化增加提示了自噬作用被重新激活。而 PARP 的剪切体的减少则提示了最终细胞凋亡效应的降低。细胞凋亡的结果也与图 3B 中 MTT 的结果相一致,提示 rottlerin 阻断了 PMA 对 TRAIL 在细胞中的粗凋亡作用。图 3C 显示,在荧光显微镜下,低浓度 PMA 和 TRAIL 降低了细胞内 GFP-LC3 的荧光点数量,但在 rottlerin 的参与下其数量有明显恢复。以上结果都说明抑制 PKC δ 可以恢复细胞自噬的功能,从而阻断 PMA 促进细胞对 TRAIL 的凋亡应答的现象。

3 讨论

前列腺癌是男性死亡的重要死因之一。通过手术或雄激素剥夺治疗可以有效地治疗局部前列腺癌。然而晚期出现的去势抵抗性前列腺癌却往往是致命的。促细胞凋亡剂 TRAIL 作为抗肿瘤药物具有很大的潜力,因为它具有选择性诱导癌细胞凋亡的特性^[9-11]。但去势抵抗性前列腺癌细胞如 C4-2, CWR22Rv1 却对 TRAIL 诱导的凋亡有明显的抵抗作用,而自噬在此过程中发挥了至关重要的作用。研究表明,自噬作用是细胞对外界环境变化例如饥饿的应激反应,可以使细胞器、蛋白质和细胞质被消化并再循环利用以维持代谢的过程。在不同的肿瘤细胞系中自噬往往会发挥不同的作用,在高级别的肿瘤中,肿瘤细胞可以利用自噬提高其生存能力,可以通过抑制细胞凋亡的发生,并提高肿瘤细胞的转移能力。自噬除了在化疗过程中维持细胞稳态之外,还能平衡化疗药物产生的细胞压力提供能量。因此,自噬抑制已经成为诱导前列腺癌细胞死亡的潜在治疗方法^[5]。

mTOR 是调节细胞生长和增殖的重要因子,同时,它也是自噬启动阶段的关键调节因子,其活化可以抑制自噬发生。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,参与细胞发育、核糖体生成和代谢调控等生物学过程,它是由两种 mTOR 复合物 mTORC1 和 mTORC2 组成的,每种复合物都具有不同的蛋白质组分与功能。其中,mTORC1 是自噬相关的主要负调节因子,mTORC1 通过磷酸化 Atg13,可以使其与 Atg1 的亲合力下降,使 Atg1 激酶的活性降低,阻止 Atg 复合物的形成,从而负向调控细胞自噬体的形

成^[12]。因此可以通过影响 mTOR 的活性程度来影响自噬水平。而 PI3K/ AKT 通路是 mTORC1 上游的主要调节因子。酪氨酸激酶受体接受上游生长因子的信号后通过磷酸化激活,进而激活 PI3K-I 通路,在细胞膜上生成第二信使 PIP3。PIP3 与信号蛋白 AKT 和 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1) 结合,促使 AKT 磷酸化活性上升。在哺乳动物细胞中,PI3K/AKT 的激活会抑制下游蛋白复合体 TSC1/TSC2,从而激活 mTORC1,引起 mTOR 的激活^[13]。因此,PI3K/ AKT/ mTOR 信号通路是肿瘤调节自噬的重要驱动因素,激活通路可以抑制细胞的自噬作用从而降低其生存能力,将此信号通路最为替代治疗的信号靶点。已经有研究证实,高浓度的 AKT 和 mTOR 抑制剂的治疗可以引起细胞剧烈的形态变化,例如细胞的空泡化,同时也伴有 LC3I 向 LC3II 转化的明显增加^[14],指示细胞自噬和自体吞噬体的形成。在膀胱癌细胞中,使用 AKT 抑制剂可以确实诱导细胞自噬的发生^[15]。

PKC 作为 AKT 的上游分子,可以激活 AKT 蛋白的磷酸化活性。PKC 家族由多个丝氨酸/苏氨酸激酶同工型组成,其中一些在结构上或功能上不同的。一些 PKC 亚型在调节细胞生长或死亡过程中的作用是相当有争议的,这取决于细胞类型或细胞所处的环境。例如,PKC α 、 β 、 δ 在调控肿瘤发展或程序性细胞死亡中具有双重作用^[16-18],这些都反映了这些同功酶的复杂性。在淋巴细胞中证明 PKC 和 Ras 信号通路具有相互作用。有丝分裂刺激后,T 淋巴细胞中 PKC 的 SH2 结合位点被磷酸化,然后通过 Grb2/SOS 招募其他信号转导因子形成复合物,导致 Ras 信号的激活^[19]。在携带过表达活性 AKT 的前列腺癌细胞和携带突变型 K-ras 的胰腺癌细胞中,通过特异性抑制 PKC α 和 β 亚型可以使细胞凋亡敏感性增加^[20]。PKC δ 参与调节各种细胞过程,包括细胞凋亡、细胞存活、侵袭迁移和细胞增殖^[20-23]。而在不同的细胞类型中 PKC δ 的发挥不同的功能。已经有研究报道可以通过 PKC δ 调控自噬,但这些研究的结果并不一致。在 2008 年的一项关于急性缺氧性应激研究中,PKC δ 通过 JNK1 介导的 Bcl-2 的磷酸化促进自噬的激活^[24]。相反的,在胰腺癌细胞中,PKC δ 却可以抑制细胞自噬的发生^[25]。但 PKC δ 如何造成这些差别以及如何调节自噬的机制仍然不是非常明确。

本研究证实,在去势抵抗性前列腺癌细胞 C4-2 和 CWR22Rv1 中,PKC δ /AKT/mTOR 通路对细胞自噬的负向调节作用。低剂量的 PMA 可以激活

PKC δ ,磷酸化蛋白 AKT 并激活下游 mTOR 以抑制 Atg 复合物的形成,阻止 LC3I 向 LC3II 的转化,抑制自噬小体的形成,从而导致自噬的抑制。而在 TRAIL 刺激去势抵抗性前列腺癌细胞过程中,自噬可以抵抗凋亡的作用从而促进细胞存活。在使用 PKC δ 特异性阻断剂 rottlerin 后,PKC δ /AKT/mTOR 通路活性被抑制,LC3I 向 LC3II 的转化升高,细胞自噬现象恢复,从而使细胞重新抵抗对 TRAIL 诱导的凋亡。本研究在实验的条件下揭示了蛋白激酶 C δ 通过抑制自噬促进 TRAIL 诱导前列腺癌细胞凋亡的分子通路机制。使用靶向 PKC δ 分子信号通路和化疗药物的方法可能比单一使用化疗药物的治疗方式更具有潜力,其机制研究也为将来进一步完善治疗效果提供了理论依据。

参考文献:

- [1] TANG DG, PORTER AT. Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer[J]. *Prostate*, 1997, 32(4): 284-293.
- [2] ABDULGHANI J, EL-DEIRY WS. TRAIL receptor signaling and therapeutics[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(10): 1091-1108.
- [3] WU Z, CHANG PC, YANG JC, et al. Autophagy blockade sensitizes prostate cancer cells towards src family kinase inhibitors [J]. *Genes & cancer*, 2010, 1(1): 40-49.
- [4] JIN Z, LI Y, PITTI R, et al. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling[J]. *Cell*, 2009, 137(4): 721-735.
- [5] SINGH K, SHARMA A, MIR MC, et al. Autophagic flux determines cell death and survival in response to Apo2L/TRAIL (dulanermin)[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 70.
- [6] SHI Q, JIA J, HUI K, et al. KLF5 promotes apoptosis induced by phorbol ester as an effector of the autocrine factor TNF α in LNCaP prostate cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2): 1847-1854.
- [7] ALTMAN A, KONG KF. Protein Kinase C Enzymes in the Hematopoietic and immune systems[J]. *Annu Rev Immunol*, 2016, 34: 511-538.
- [8] ISAKOV N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 48: 36-52.
- [9] GASPARIAN ME, BYCHKOV ML, YAGOLOVICH AV, et al. The effect of cisplatin on cytotoxicity of anticancer cytokine TRAIL and its receptor-selective mutant variant DR5-B(1)[J]. *Dokl Biochem Biophys*, 2017, 477(1): 385-388.
- [10] WEI B, LIANG J, HU J, et al. TRAF2 is a valuable prognostic biomarker in patients with prostate cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 4192-4204.
- [11] WEI B, RUAN J, MI Y, et al. Knockdown of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) modulates in vitro growth of TRAIL-treated prostate cancer cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 462-469.
- [12] KIM YC, GUAN K L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 25-32.
- [13] OCANA A, VERA-BADILLO F, AL-MUBARAK M, et al. Activation of the PI3K/mTOR/AKT pathway and survival in solid tumors: systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95219.
- [14] NORMAN LL, BRUGUES J, SENGUPTA K, et al. Cell blebbing and membrane area homeostasis in spreading and retracting cells[J]. *Biophys J*, 2010, 99(6): 1726-1733.
- [15] DICKSTEIN RJ, NITTI G, DINNEY CP, et al. Autophagy limits the cytotoxic effects of the AKT inhibitor AZ7328 in human bladder cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(13): 1325-1338.
- [16] COOKE M, MAGIMAIDAS A, CASADO-MEDRANO V, et al. Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(6): 1531-1542.
- [17] ZHOU X, SHEN L, PARRIS T, et al. Regulation of the viability of Nf1 deficient cells by PKC isoforms[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(21): 10709-10717.
- [18] KIM H, NA YR, KIM SY, et al. Protein Kinase C Isoforms Differentially Regulate Hypoxia-Inducible Factor-1 α Accumulation in Cancer Cells[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(3): 647-658.
- [19] KAWAKAMI Y, KITAURA J, YAO L, et al. A Ras activation pathway dependent on Syk phosphorylation of protein kinase C [J]. *Proceed Nation Acad Sci USA*, 2003, 100(16): 9470-9475.
- [20] CONLEY-LACOMB M K, SALIGANAN A, KANDAGATLA P, et al. PTEN loss mediated Akt activation promotes prostate tumor growth and metastasis via CXCL12/CXCR4 signaling[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 85.
- [21] BERARDI D E, FLUMIAN C, RODRIGUEZ C E, et al. PKC δ inhibition impairs mammary cancer proliferative capacity but selects cancer stem cells, involving autophagy [J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(3): 730-740.
- [22] HAFEEZ A, ELMADHOUN O, PENG C, et al. Reduced Apoptosis by Ethanol and Its Association with PKC- δ and Akt Signaling in Ischemic Stroke[J]. *Aging Dis*, 2014, 5(6): 366-372.
- [23] MARQUINA-SANCHEZ B, GONZALEZ-JORGE J, HANSBERG-PASTOR V, et al. The interplay between intracellular progesterone receptor and PKC plays a key role in migration and invasion of human glioblastoma cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 172: 198-206.
- [24] CHEN JL, LIN HH, KIM KJ, et al. PKC δ signaling: a dual role in regulating hypoxic stress-induced autophagy and apoptosis [J]. *Autophagy*, 2009, 5(2): 244-246.
- [25] SINGH BN, KUMAR D, SHANKAR S, et al. Rottlerin induces autophagy which leads to apoptotic cell death through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway in human pancreatic cancer stem cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(9): 1154-1163.

(编辑 柯小琴)