

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.05.0622

乳腺癌血清标志物的 TMT 标记定量蛋白质组学筛选及分析

李曦洲, 方敏, 盛媛, 于恩达*

第二军医大学长海医院普外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨乳腺癌患者血清中蛋白的表达变化, 筛选并分析乳腺癌诊断的生物学标志物。 **方法** 采用定量蛋白质组学串联质量标签(TMT)标记技术对 68 例 II 期乳腺癌患者及 62 例健康女性的血清蛋白进行检测, 并进行蛋白质定量分析, 筛选乳腺癌患者血清中发生显著变化的差异蛋白。利用 UniProt 数据库和 Proteome Discoverer 软件及在线工具 STRING 对差异蛋白进一步行生物信息学分析, 应用蛋白质印迹法和 qPCR 对变化倍数显著的差异蛋白 VIME(上调为健康对照女性的 3.918 倍)和 RAF1(下调为健康对照女性的 0.251)进行验证。 **结果** 共获得 67 种差异蛋白, 其中 26 种表达上调, 41 种表达下调。基因本体论(GO)注释分析和功能聚类分析显示上述差异蛋白与肿瘤的血管生成、新陈代谢进程、生物黏附能力等相关。蛋白质印迹法和 qPCR 验证结果显示 RAF1 蛋白和 mRNA 在 II 期乳腺癌患者血清中的表达水平均低于健康对照女性, 而 VIME 蛋白和 mRNA 的表达均高于健康对照女性, 与筛选结果一致。 **结论** 定量蛋白质组学 TMT 法能有效筛选 II 期乳腺癌患者血清中的差异蛋白, 其中 VIME 和 RAF1 蛋白有望成为乳腺癌淋巴结转移的候选血清标志物。

[关键词] 乳腺肿瘤; 蛋白质组学; 串联质量标签; 生物学肿瘤标志物

[中图分类号] R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)05-0622-06

TMT-based quantitative proteomics analysis and identification of serum biomarkers of breast cancer

LI Xi-zhou, FANG Min, SHENG Yuan, YU En-da*

Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the different expression of serum proteins of the patients with breast cancer and to screen the diagnostic biomarkers. **Methods** Tandem mass tag (TMT)-based quantitative proteomics technology was used to detect and quantitatively analyze the serum proteins of 68 stage II breast cancer patients and 62 healthy females; the differentially expressed proteins were screened. Bioinformatics analysis of the differentially expressed proteins were performed by UniPort Knowledgebase, Proteome Discoverer software and online software STRING (<http://www.string-db.org>). The protein and mRNA expressions of screened proteins, vimentin (VIME, up-regulated 3.918 folds than that of healthy females) and Raf-1 threonine-protein kinase (RAF1, down-regulated 0.251 folds) were detected by Western blotting and qPCR, respectively. **Results** We screened and identified 67 differentially expressed proteins, with 26 significantly up-regulated and 41 significantly down-regulated. Gene ontology (GO) and enrichment analysis showed that the differentially expressed proteins were related to tumor angiogenesis, metabolism and bioadhesive capacity. The protein and mRNA expressions of RAF1 in the patients with stage II breast cancer were significantly lower than those in healthy females, and the protein and mRNA expressions of VIME were significantly higher, which was similar to the results of screening analysis. **Conclusion** TMT-based quantitative proteomics can effectively identify the differentially expressed proteins of stage II breast cancer. VIME and RAF1 may be potential serum biomarkers of lymph node metastasis of breast cancer.

[Key words] breast neoplasms; proteomics; tandem repeat sequences; biological tumor markers

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(5): 622-627]

[收稿日期] 2017-01-28 **[接受日期]** 2017-03-31

[基金项目] 国家自然科学基金(8150111616). Supported by National Natural Science Foundation of China (8150111616).

[作者简介] 李曦洲, 博士生, 主治医师. E-mail: 85858121@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161612, E-mail: yuenda@163.com

乳腺癌是影响全世界妇女健康的主要恶性肿瘤,发病率位居女性恶性肿瘤之首。研究表明,诊断乳腺癌时的肿瘤分期是影响乳腺癌预后的重要因素;I、II、III、IV期乳腺癌患者的5年生存率分别约98%、85%、60%和20%,其中I期乳腺癌患者的10年无病生存率是进展期乳腺癌的9倍以上^[1]。早期发现和确诊对乳腺癌患者的预后具有决定性的影响^[2]。目前,我国筛查发现的无症状患者逐渐增多,早期乳腺癌的检出率逐渐升高,保乳比例不断增加,患者的5年生存率也明显提高。但由于我国筛查体系不健全、民众预防意识不足、诊断延迟导致晚期病例比例偏高等情况,使我国乳腺癌患者的生存率与发达国家相比仍存在差距。因此寻找特异性和灵敏度高的肿瘤标志物对乳腺癌的诊断和治疗具有重要意义。

近年来乳腺癌在基因组学和转录组学水平上被研究与临床紧密结合^[3],而其蛋白质组学的相关特征少有报道。蛋白质作为生物功能的直接执行者,更多反映了肿瘤的微环境及肿瘤的特异性翻译后修饰,更适合作为肿瘤标志物^[4]。血清蛋白质组学为寻找有效的临床肿瘤标志物提供了有效方法。本研究应用定量蛋白质组学(quantitative proteomics)串联质量标签(tandem mass tag, TMT)标记技术筛选了II期乳腺癌患者血清中发生变化的关键差异蛋白,并进行了信息分析和初步实验验证,为后续研究乳腺癌发生、发展进程中的分子机制及寻找临床乳腺癌诊断和治疗的潜在靶点提供依据。

1 材料和方法

1.1 标本来源与采集 血清标本取自2014年1月至2015年12月第二军医大学长海医院乳腺外科收治的乳腺癌患者及同期在体检中心行体格检查的健康女性。乳腺癌患者68例均为美国癌症联合委员会(AJCC)乳腺癌TNM II期乳腺浸润性导管癌,年龄21~64岁,平均(40.4±2.6)岁。健康女性62例,均自愿参与本研究,年龄31~67岁,平均(48.2±2.2)岁。本研究经第二军医大学长海医院伦理委员会审查通过,患者采血前均签署知情同意书。所有研究对象在采血前均未接受过任何治疗。血清采集及保存:清晨采集空腹静脉血4 mL,4℃静置1 h,1 336×g离心5 min后分离血清,-80℃冰箱保存备用。所有血清标本在行质谱检测前避免反复冻融。

1.2 主要试剂与仪器 BCA蛋白定量试剂盒、TMT试剂购于美国Thermo Fisher Scientific公司,十二烷基磺酸钠购于美国Amresco公司,乙腈购于美国J. T. Baker公司,胰酶购于美国Gibco公司,测序级胰蛋白酶购于美国Promega公司,HRP/TRITC/FITC标记二抗购于美国SouthernBiotech公司,0.22 μm滤膜与超滤管(截留相对分子质量为3 000)购自美国Millipore公司。其余试剂至少为国产分析纯级别。1.5 mL FRESCO 21型离心机购于美国Thermo Fisher Scientific公司,1.5、2 mL离心管均购于美国Axygen公司;Model 680型酶标仪购于美国Bio-Rad公司;PRO25型电动匀浆器购自美国Kimble Chase公司。

1.3 蛋白提取 取每例II期乳腺癌患者的血清各2 μL混合均匀,健康女性血清做相同处理;稀释后分别测定蛋白浓度。取96孔板,每孔加入标准品或待测样品10 μL,再加入工作液80 μL,振荡器混匀。37℃摇床中孵育30 min,冷却至室温后酶标仪检测570 nm波长处的光密度(D)值。绘制标准曲线并根据标准曲线计算待测样品的浓度。

取250 μg蛋白对应的血清量悬空滴于超滤管(截留相对分子质量为10 000)中,加入200 μL尿素后13 000×g离心30 min。弃去上清液,膜上加200 μL尿素,13 000×g离心25 min。弃去上清液后加100 μL碘乙酰胺(尿素溶解),振荡摇匀,避光室温静置2 h,13 000×g离心25 min。加100 μL尿素,13 000×g离心25 min,重复1次;加100 μL NH₄HCO₃溶液,13 000×g离心25 min,重复1次。将超滤管移入新离心管,加胰酶(NH₄HCO₃溶液稀释),37℃摇床200 r/min酶解过夜,离心收集肽段。滤膜用60 μL 0.5 mol/L NaCl浸泡,离心,再次收集肽段,重复1~2次。加入0.1% CF₃COOH酸化肽段,肽段脱盐,抽干并冷冻保存。

1.4 TMT标记 使用100 mmol/L三乙胺硼烷溶解上述样品(pH≈8.5)。每管TMT试剂分别用41 μL的乙腈溶解,取TMT-126标记试剂加入健康女性血清肽段中、TMT-128标记试剂加入乳腺癌患者血清肽段中,混匀,摇床室温孵育4 h。加入8 μL的5%羟胺(hydroxylamine, HDX)终止反应,摇床室温孵育20 min。等量混合,酸化样品后脱盐、抽干。

1.5 LC-LTQ-MS/MS(液相色谱质谱联用)分析及质谱数据检索 取TMT标记的样品用10 μL

2% 甲酸溶解,13 800×g 离心 5 min,上样进行 LC-MS/MS 分析。HPLC 反向柱层析系统选择 300 nL/min 流速、5%~32% 乙腈梯度洗脱分离样品。分离样品经 LTQ Orbitrap XL 质谱检测,从一级谱图中选取信号最强的 3 个母离子行高能碰撞诱导裂解 (higher-energy collisional dissociation, HCD),所得数据使用 Proteome Discoverer 1.4 蛋白质组学软件进行检索分析。

1.6 生物信息学分析 对从数据库检索得到的所有蛋白质进行分析,筛选表达变化在 1.5 倍以上 (fold change 大于 1.5 为上调,小于 0.67 为下调)的蛋白质为差异蛋白,在 GeneCoDis3 中对差异蛋白进行基因本体论 (gene ontology, GO) 注释分析和功能聚类分析,利用在线工具 STRING (<http://www.string-db.org>) 对差异蛋白进行蛋白相互作用分析。在 UniProt 数据库中检索筛选所得的差异蛋白质,并对其进行分类与分析。

1.7 蛋白质印迹法验证差异蛋白 使用裂解液 [50 mmol/L Tris (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1 mmol/L 正钒酸钠, 150 mmol/L 氟化钠, 0.5 mol/L EDTA, 1 mmol/L 亮抑蛋白酶肽] 裂解样品,测定蛋白浓度后,取 20~30 μg 蛋白行 SDS-PAGE,然后将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜,5% 脱脂奶粉封闭,加入一抗孵育,洗膜,再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗孵育。采用化学发光法显示蛋白条带。

1.8 qPCR 检测差异表达基因 选取差异表达基因,在 7300 型定量 PCR 仪 (ABI 公司) 上采用 SYBR Green I 法进行 qPCR 验证。反应体系 (20 μL): SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10 μL, ROX 参比染料 0.4 μL, cDNA (50 ng/μL) 1 μL, 正、反向引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, ddH₂O 7.8 μL。扩增条件: 95 °C 预变性 10 s; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。反应结束后由 PCR 扩增曲线得到样品的 Ct 值,采用 ΔΔCt 法计算目的基因转录水平的变化,并以 β-actin 作为内参。引物序列如下: RAF1 上游 5'-CCG AAC AAG CAA AGA ACA GTG-3', 下游 5'-GAC GCA GCA TCA GTA TTC CAA T-3'; VIM 上游 5'-AGT CCA CTG AGT ACC GGA GAC-3', 下游 5'-CAT TTC ACG CAT CTG GCG TTC-3'。

1.9 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5 软件进

行数据分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 乳腺癌患者的血清总蛋白及差异蛋白 利用 MaxQuant 软件在 IPI (International Protein Index) 数据库中检索质谱鉴定所得的数据,结果在 II 期乳腺癌患者中共定量得 359 种蛋白,其中筛选到 26 种蛋白表达上调,41 种表达下调,部分差异蛋白见表 1。

表 1 II 期乳腺癌患者血清中的部分差异表达蛋白
Tab 1 Several differentially expressed proteins in patients with stage II breast cancer

Protein name	UniProtKB	Fold change
Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type 1β	PI51B_HUMAN	4.307
Tyrosine-protein kinase Fer	FER_HUMAN	4.179
Vimentin	VIME_HUMAN	3.918
Serine protease 27	PRS27_HUMAN	3.739
β-2-Microglobulin	B2MG_HUMAN	3.275
αInaD-like protein	INADL_HUMAN	3.271
Coagulation factor XIII A chain	F13A_HUMAN	0.286
Histone H2A, Z	H2AZ_HUMAN	0.258
Raf-1 threonine-protein kinase	RAF1_HUMAN	0.251
Integrin α II b	ITA2B_HUMAN	0.243
AP-1 complex subunit α3	AP1S3_HUMAN	0.220
Thymosin β4	TYB4_HUMAN	0.217

2.2 差异蛋白的 GO 功能注释与显著性富集分析 GO 功能注释与显著性富集分析结果 (图 1) 显示,筛选得到的差异蛋白主要为血液凝固、细胞骨架结合蛋白,位于细胞外区、细胞质,且富集程度较高。

2.3 差异蛋白相互作用分析 结果 (图 2) 显示,部分差异蛋白之间具有相互作用。F13A1、TMSB4X、SERPINF2、PPBP、PF4 蛋白形成主要的相互作用网络,其功能聚类于分子结合方面。此外, VCL、GAPDH、RAF1 蛋白处于相互作用网络中的关键位置, VIM 基因也参与到复杂的调控网络中。

2.4 蛋白质印迹法验证差异蛋白 选取变化倍数显著的波形蛋白 (VIME) 和 RAF1 蛋白行蛋白质印迹分析,结果 (图 3) 显示 RAF1 在 II 期乳腺癌患者血清中的表达水平低于健康对照女性,而 VIME 表达高于健康对照女性,与质谱鉴定结果一致。

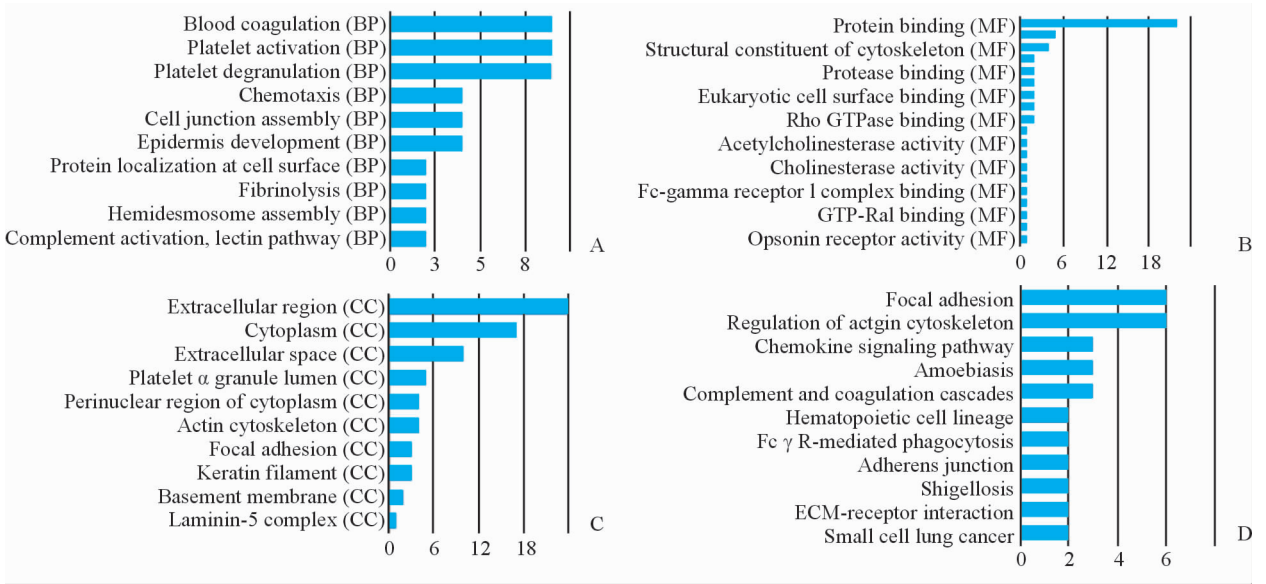


图 1 II 期乳腺癌患者血清中差异蛋白的显著性富集分析

Fig 1 Significant enrichment analysis of differentially expressed proteins in patients with stage II breast cancer

The vertical axis is the gene ontology (GO) category and the horizontal axis is the $-\lg(P \text{ value})$ of these GO terms. A: Biological process (BP); B: Molecular function (MF); C: Cellular component (CC); D: Signal pathway. GTP: Guanosine triphosphate; ECM: Extracellular matrix

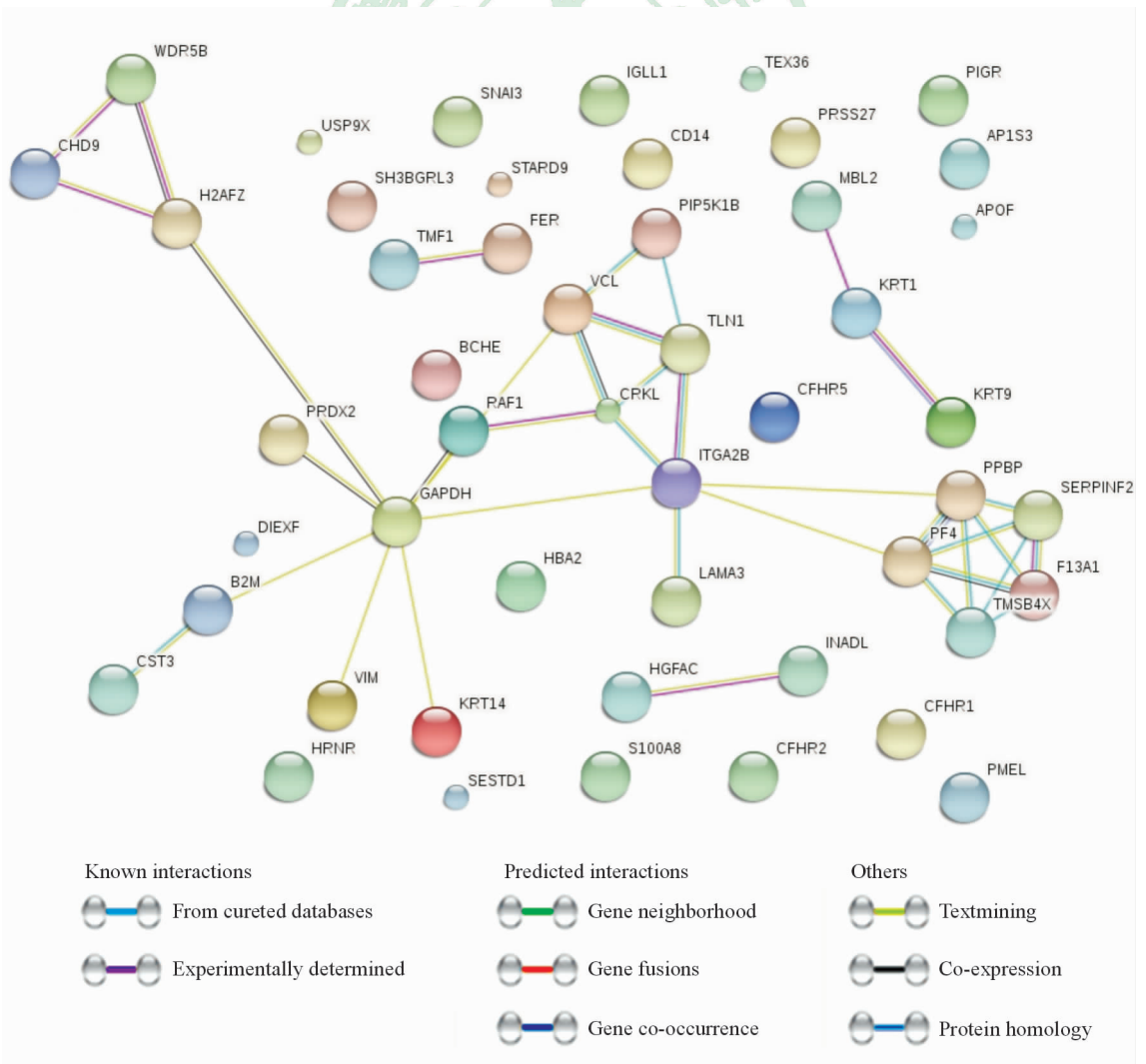


图 2 差异蛋白间相互作用分析

Fig 2 Interaction analysis of differentially expressed proteins

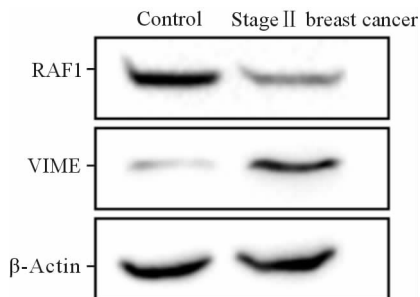


图3 蛋白质印迹法检测 VIME 和 RAF1 蛋白的表达
Fig 3 VIME and RAF1 expressions detected by Western blotting

VIME: Vimentin; RAF1: Raf-1 threonine-protein kinase

2.5 qPCR 验证差异蛋白 qPCR 结果(图4)表明, VIM 基因在 II 期乳腺癌患者血清中的表达较健康对照女性上调($P < 0.01$), 而 RAF1 基因表达较健康对照女性下调($P < 0.01$), 与蛋白质印迹法验证结果及质谱鉴定结果一致。

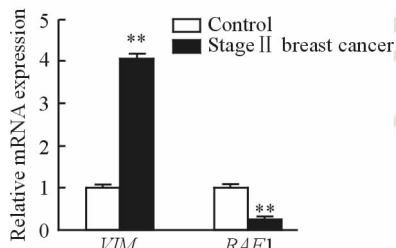


图4 qPCR 检测 VIM 和 RAF1 mRNA 的表达水平
Fig 4 Expressions of VIM and RAF1 mRNA detected by qPCR

VIM: Vimentin; RAF1: Raf-1 threonine-protein kinase. ** $P < 0.01$ vs control. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

基因组学揭示了人类遗传学图谱的基本特点, 为人类认识基因和遗传物质带来了根本性的变革。然而基因组学并不能揭示所有基因的功能及其调控机制。因为绝大部分基因的功能都依赖于其编码的蛋白质, 所以对细胞或者机体蛋白质进行研究有助于揭示细胞的代谢过程和机体生命活动的规律。定量蛋白质组学可以实现一次实验中对成百上千种蛋白质的定量和分析, 为规模化发现和验证生物标志物、发现新的治疗靶标提供了重要手段^[5]。

VIME 是中间丝状体家族的重要组成部分, 属于支架和连接蛋白^[6-7]。VIME 在维持细胞结构、细胞质的完整性及细胞支架的相互连接中显示出不同作用, 此外它还参与调控细胞迁移、增殖、信号转导, 且在许多肿瘤中表达增高, 但其在肿瘤进展中的机制尚未阐明^[8]。本研究中 VIME 蛋白在乳腺癌患者血清中的表达明显上调(为健康对照女性的 3.918 倍), 与研究显示 VIME 蛋白在乳腺癌肿瘤组织中表达升高^[9]的结论一致。VIME 蛋白上调是上皮间

质转化(EMT)标志, 而 EMT 与肿瘤细胞的分化、生长、浸润及转移相关^[10-11]。此外, 还有研究表明 VIME 蛋白的表达水平与乳腺癌细胞的迁移能力呈正相关^[12]。

RAF1 基因最初发现于小鼠肉瘤和禽的癌病毒中, 其在导管上皮高表达并且在不同级别的乳腺肿瘤中呈不同程度的表达, 对肝癌的发生、发展有抑制作用^[13]。本研究中, RAF1 蛋白在乳腺癌患者血清中的表达显著下调(为健康对照女性的 0.251), 而有研究表明 RAF1 蛋白在存在淋巴结转移的乳腺癌肿瘤组织中表达下调, 表明其表达下调可能是乳腺癌淋巴结转移的生物学标志^[14]。RAF1 调控肿瘤的机制可能是阻断磷酸化作用和促有丝分裂蛋白激酶(MAPK)的激活^[15-16], 也可能是在肿瘤坏死因子(TNF) α 和白介素 1 β 的刺激下, 通过阻断核因子 kappa B(NF- κ B)的激活来调节肿瘤的淋巴结转移^[17]。然而 RAF1 并不是在所有肿瘤中均表达下调, 也有报道称 RAF1 过表达与鳞状细胞癌和肺癌的进展相关^[18]。本课题组前期使用免疫组化法研究发现 RAF1 在预后较差的基底样型乳腺癌中过表达, 且 RAF1 表达增高对患者的腋窝淋巴结转移和总生存率具有较差的预后影响, 分析其原因可能是 RAF1 对 Ras/Raf/MEK/ERK 经典信号通路具有激活作用^[19]。RAF1 在不同肿瘤中表达不同, 甚至在不同类型的相同肿瘤中表达也不相同, 其机制有待进一步探讨。RAF1 蛋白是与肿瘤发生和转移相关的重要蛋白, 在今后研究中应阐明其机制, 为肿瘤发生、发展及抗癌药物敏感性预测提供潜在的生物学标志物。

本研究的蛋白质相互作用关联图显示, 乳腺癌患者有几个生物学进程的基因呈现明显变化: (1) 血液凝固进程, 在高严谨筛选条件下共有 2 种蛋白(PLF4、CXCL7)上调为健康对照女性的 1.92~2.08 倍, 7 种蛋白(A2AP、ITA2B、VINC、FLNA、F13A、TLN1、TYB4)下调为健康对照女性的 0.22~0.66。其中 PLF4 可刺激 DNA 合成、有丝分裂、糖酵解、细胞内营积累, 呈上调趋势; TYB4 参与了细胞-基质黏附和细胞-细胞黏附, 调节细胞表面钙黏蛋白的表达, 并通过钙黏蛋白复合体增强传导作用, 呈下调趋势。(2) 细胞连接装配进程, 有 2 种蛋白(INAD、LAMA3)上调为健康对照女性的 2.47~3.27 倍, 2 种蛋白(FLNA、K1C14)下调为健康对照女性的 0.25~0.43。其中 FLNA 在血管生成过程中具有调节细胞间通信、黏附和连接的作用, 呈下调趋势。

生物信息学分析(蛋白质组学)可以从众多差异蛋白中筛选可能有意义的蛋白, 而对这些蛋白进行验证是筛选目的蛋白的第一步。本研究根据差异蛋

白鉴定分析结果显示 VIME 蛋白和 RAF1 蛋白的变化倍数较显著,且 RAF1 与其他蛋白关联较多,结合 GO 注释分析和功能聚类分析与文献检索示这 2 种蛋白与肿瘤相关,蛋白质印迹法和 qPCR 结果显示 RAF1 和 VIME 蛋白的表达与蛋白质组学质谱鉴定结果一致,验证了蛋白质组学结果,表明其在乳腺癌发生、发展中的作用值得研究。

综上所述,定量蛋白质组学技术能有效筛选出乳腺癌患者血清中的差异蛋白,对其相应的生物学分析有助于了解它们参与的乳腺癌发生、发展相关生物学过程和代谢通路,为乳腺癌的研究提供了新方法和研究思路。

[参考文献]

- [1] CHIARI D, ORSENIGO E, GUARNERI G, BAIOCCHI G L, MAZZA E, ALBARELLO L, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on HER-2 expression in surgically treated gastric and oesophagogastric junction carcinoma: a multicentre Italian study[J]. *Updates Surg*, 2017, 69: 35-43.
- [2] GONZÁLEZ-REYMUNDEZ A, DE LOS CAMPOS G, GUTIÉRREZ L, LUNT S Y, VAZQUEZ A I. Prediction of years of life after diagnosis of breast cancer using omics and omic-by-treatment interactions [J/OL]. *Eur J Hum Genet*, 2017. doi:10.1038/ejhg.2017.12. [Epub ahead of print]
- [3] CHEN Y, BRITTON D, WOOD E R, BRANTLEY S, MAGLIOCCO A, PIKE I, et al. Quantitative proteomics of breast tumors: tissue quality assessment to clinical biomarkers[J/OL]. *Proteomics*, 2017. doi: 10.1002/pmic.201600335. [Epub ahead of print]
- [4] JIANG Z, SHEN H, TANG B, CHEN H, YU Q, JI X, et al. Identification of diagnostic markers involved in the pathogenesis of gastric cancer through iTRAQ-based quantitative proteomics[J]. *Data Brief*, 2017, 11: 122-126.
- [5] SIMICEVIC J, DEPLANCKE B. Transcription factor proteomics—tools, applications, and challenges [J/OL]. *Proteomics*, 2017. doi: 10.1002/pmic.201600317. [Epub ahead of print]
- [6] JONES C, MACKAY A, GRIGORIADIS A, COSSU A, REIS-FILHO J S, FULFORD L, et al. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 3037-3045.
- [7] VAN DE RIJN M, PEROU C M, TIBSHIRANI R, HAAS P, KALLIONIEMI O, KONONEN J, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161: 1991-1996.
- [8] SATELLI A, LI S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68: 3033-3046.
- [9] DOWLING P, MELEADY P, DOWD A, HENRY M, GLYNN S, CLYNES M. Proteomic analysis of isolated membrane fractions from superinvasive cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 177: 93-101.
- [10] JOHANN D J, RODRIGUEZ-CANALES J, MUKHERJEE S, PRIETO D A, HANSON J C, EMMERT-BUCK M, et al. Approaching solid tumor heterogeneity on a cellular basis by tissue proteomics using laser capture microdissection and biological mass spectrometry[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8: 2310-2318.
- [11] ULIRSCH J, FAN C, KNAFL G, WU M J, COLEMAN B, PEROU C M, et al. Vimentin DNA methylation predicts survival in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 137: 383-396.
- [12] VUORILUOTO K, HAUGEN H, KIVILUOTO S, MPINDI J P, NEVO J, GJERDRUM C, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2011, 30: 1436-1448.
- [13] TAN W J, LAI J C, THIKE A A, LIM J C, TAN S Y, KOH V C, et al. Novel genetic aberrations in breast phyllodes tumours: comparison between prognostically distinct groups[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 145: 635-645.
- [14] HAGAN S, AL-MULLA F, MALLON E, OIEN K, FERRIER R, GUSTERSON B, et al. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 7392-7397.
- [15] REDDY K B, NABHA S M, ATANASKOVA N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, 22: 395-403.
- [16] JERIC I, MAURER G, CAVALLO A L, RAGUZ J, DESIDERI E, TARKOWSKI B, et al. A cell-autonomous tumour suppressor role of RAF1 in hepatocarcinogenesis [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13781.
- [17] YEUNG K C, ROSE D W, DHILLON A S, YAROS D, GUSTAFSSON M, CHATTERJEE D, et al. Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 7207-7217.
- [18] XU Z H, HANG J B, HU J A, GAO B L. RAF1-MEK1-ERK/AKT axis may confer NSCLC cell lines resistance to erlotinib[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6: 1493-1504.
- [19] WU P, LI X, WU Y, HU W, WANG Y, GAO L, et al. Overexpression of Raf-1 in basal-like carcinoma of the breast: correlation with clinicopathology and prognosis[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2014, 18: 391-395.