

网络出版时间: 2020-3-30 17:09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200330.0846.018.html>

CBLC 在各分型分期乳腺癌中的表达差异及预后分析

李经纬¹, 肖 斌², 陆景润¹, 邓 淳¹, 李林海², 罗昭逊^{3,4}

摘要 目的 阐明 CBL 原癌基因 C (CBLC) 在乳腺癌中的生物学作用, 为乳腺癌的临床诊断与预后评估提供新的监测指标, 为乳腺癌的深入研究和治疗方案拟定提供指导性理论基础。方法 从 USCS Xena (<https://xenabrowser.net>) 中的 TCGA 数据集下载 1 104 例乳腺癌组织和 113 例癌旁组织的基因表达谱矩阵, 分析 CBLC 基因在乳腺癌各分子与病理分型、TNM 分期与肿瘤阶段中的表达差异及预后相关性; 利用免疫组化染色观察 CBLC 在 30 例乳腺癌患者肿瘤及其邻近正常组织中的表达水平; 利用 MCF7 乳腺癌细胞进行划痕实验、Transwell 实验及 CCK-8 实验, 观察 CBLC 对其增殖迁移的作用。结果 CBLC 在乳腺癌组表达量 ($P = 2.31 \times 10^{-20}$) 及 H-Score 评分 ($P = 0.014$) 均高于癌旁组, 在 Luminal

A 分子分型 ($P = 1.68 \times 10^{-4}$) 及黏液癌病理分型 ($P = 4.00 \times 10^{-5}$) 中表达量最高, 在乳腺癌 stage I 期至 stage II 期中表达量呈下降趋势 ($P = 0.0494$)。以中位数划分, CBLC 高表达组乳腺癌患者的生存率高于低表达组 ($P = 0.054$)。CBLC 过表达能够抑制乳腺癌细胞增殖和迁移。结论 CBLC 在乳腺癌各分型分期中的表达具有显著差异, 其在低恶性的 Luminal A 分子分型、高分化型的黏液癌组织病理分型、早期乳腺癌中高表达, 与乳腺癌患者生存良好呈正相关, 可抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移, 可能是新的乳腺癌分子诊断或靶向治疗的潜在靶标。

关键词 CBLC 蛋白; 乳腺癌; 分型分期; 预后影响

中图分类号 R 730.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0415-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.018

2020-02-01 接收

基金项目 国家自然科学基金 (编号: 81802634); 广东省自然科学基金 (编号: 2018A030310014); 军队后勤科研项目 (编号: CWH17C017)

作者单位: ¹ 贵州医科大学医学检验学院临床检验学教研室, 贵阳 550004

² 中国人民解放军南部战区总医院检验科, 广州 510010

³ 贵州医科大学附属贵州省儿童医学中心, 贵阳 550004

⁴ 贵州医科大学儿科学院, 贵阳 550004

作者简介: 李经纬, 女, 硕士研究生;

罗昭逊, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

luozhaoxun@gmc.edu.cn

近年我国乳腺癌发病率和死亡率急剧增加, 2015 年新发病例达 26.86 万, 死亡 6.95 万^[1]。目前, 基于乳腺癌分型的精准诊断方法逐渐完善, 但缺少有效且临床反应良好的治疗靶标。因此, 寻找一种针对乳腺癌分型分期、具预后评估效能的靶标对于乳腺癌靶向药物研发十分重要。Cbl Proto-Onco-gene 家族蛋白是一组 RF 泛素连接酶 (E3 Ubiquitin Ligases, E3), 哺乳动物细胞中有 3 种 CBL 家族蛋白: CBL、CBLB 和 CBLC (别名 CBL-3、CBL-SL 和

CON group, the offspring rats in CUMS group had more motion time in forced swimming test ($P < 0.05$) and less sugar preference rate in the sugar preference test ($P < 0.05$). The hippocampus CRH concentration increased ($P < 0.05$) and the neuropathological changes were characterized by decreased neuron number, loosed neurons and the soma condensation in CA3 field of hippocampus. Moreover, the expression of mTOR and p-mTOR both decreased in hippocampus ($P < 0.05$). Compared with the CUMS group, the offspring rats in CUMS + CRHR1 antagonist group had less motion time in forced swimming test ($P < 0.05$) and more sugar preference rate in the sugar preference test ($P < 0.05$). The level of CRH in hippocampus was down-regulated, the neuropathological damage in hippocampus CA3 region was improved and the expression of mTOR and p-mTOR both increased ($P < 0.05$). The results of hippocampal slices culture showed that the expression of mTOR decreased more in CRH group than that in Control group ($P < 0.05$). Low, middle and high concentration of CRHR1 antagonist could upregulate the decreased level of mTOR induced by CRH ($P < 0.05$). **Conclusion** Depression of male offspring caused by chronic prenatal stress may be associated with the increased level of CRH in the hippocampus which inhibit the expression of mTOR protein and cause the neuropathological damage in the CA3 field of hippocampus.

Key words chronic prenatal stress; corticotrophin-releasing hormone; CRHR1 antagonist; hippocampal CA3

RNF57)。相关研究^[2]表明,在肺腺癌细胞中 CBLC 与 CBL 竞争结合表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR),并维持其激活状态。目前 CBL 家族蛋白的研究集中于 CBL 及 CBLB,针对 CBLC 的研究主要围绕其在肺癌中的作用,其对乳腺癌的影响情况仍不清楚。该研究旨在阐明 CBLC 在不同乳腺癌分型分期中的表达水平,对乳腺癌细胞的增殖迁移影响及临床价值,为乳腺癌的诊治及预后评估提供潜在生物学标志物,为研究 CBLC 的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究所用数据下载自 USCS Xenabrowser (<https://xenabrowser.net>) 数据库的 TCGA 数据集,包括基因表达谱矩阵、样本临床信息和生存信息。将下载的 1 217 例样本分为 2 组:乳腺癌组织 1 104 例和癌旁组织 113 例;根据临床信息中乳腺癌雌激素受体、孕酮受体及 HER2 受体的免疫组化评分将具有完整组织分型信息的 707 个乳腺癌样本分为 4 组,其中 Luminal A 型 135 例、Luminal B 型 424 例、HER2+ 型 37 例、TNBC 型 111 例;根据不同病理组织类型将乳腺癌样本分为浸润性导管癌 882 例、浸润性小叶癌 211 例、髓样癌 8 例、化生性癌 9 例、混合组织型癌 39 例、黏液癌 18 例及其他组织类型乳腺癌 47 例。下载 1 203 例患者样本有相关的临床信息和基因表达信息用于预后性分析;从上海芯超生物购买货号为 HBrE-Duc060CS-03 的 30 例乳腺癌患者肿瘤组织及其邻近正常组织切片芯片;从南昌聚焦生物有限公司购买 MCF7 乳腺癌细胞、PCDH 空载质粒及 CBLC 质粒。

1.2 主要试剂及仪器 Transwell 细胞培养小室 (美国 Corning 公司,3422 型);转染试剂 (法国 PolyPlus-transfection 公司);DMEM 培养基及胎牛血清 (FBS) (以色列 BI 公司);细胞计数片及细胞计数器 (深圳 BodBoge 公司);倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司,DMI3000B 型);全自动酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司,YSK370)。

1.3 差异基因分析 箱线图展示不同分子类型、组织类型乳腺癌标本中 CBLC 基因的表达分布,通过 *t* 检验和 wilcoxon 秩和检验比较组间差异;柱状图展示不同分子类型、组织类型乳腺癌标本中 CBLC 基因的表达平均值,通过 *t* 检验和 wilcoxon 秩和检验比较组间差异;折线图展示不同分级分期乳腺癌标本中 CBLC 基因的表达分布,通过单因素方差分析及

TukeyHSD 多重比较检验比较组间差异;利用 Kaplan-Meier 法分析 CBLC 的表达与乳腺癌患者预后的相关性,并进行 log-rank 检验。

1.4 免疫组化 对 30 例乳腺癌患者肿瘤组织及其癌旁组织切片进行免疫组化染色,使用 3D HISTECH 公司的 Pannoramic MIDI 扫描仪获得组织切片上所有的染色信息,用 Pannoramic viewer 软件放大后观察,并截取代表性图片。再应用 Quant center 中的 densito quant 软件自动识别并进行染色评分判定。组织切片上所有的深棕色为强阳性,棕黄色为中度阳性,浅黄色为弱阳性,蓝色为阴性。进而对每个组织点进行识别,分析出强阳性、中度阳性、弱阳性及阴性的面积 (单位:像素) 根据阳性的百分比进行 H-SCORE 免疫组化评分, $H\text{-SCORE} = \sum (PI \times I) = (\text{弱阳性 } PI \times 1) + (\text{中度阳性 } PI \times 2) + (\text{强阳性 } PI \times 3)$ 式中 PI 表示阳性细胞数量占切片中所有细胞数量的百分数;I 代表着色强度。散点图展示每个切片的 H-Score 免疫组化评分。

1.5 细胞划痕实验 在普通 6 孔板中铺板 80 万/孔共 2 孔 MCF7 乳腺癌细胞,待细胞融合率为 70% 左右,向其中一孔转染 2 μg PCDH 空载质粒,向另一孔转染 2 μg CBLC 质粒,未转染质粒组为对照组,转染质粒组为实验组。之后进行细胞划痕实验:使用 200 μl 容量枪头笔直分别在两孔中划痕,0 h 及 48 h 拍摄同一划痕位置。

1.6 Transwell 细胞迁移实验 在普通 6 孔板中铺板 80 万/孔共 2 孔 MCF7 乳腺癌细胞,待细胞融合率为 70% 左右,向其中一孔转染 2 μg PCDH 空载质粒,向另一孔转染 2 μg CBLC 质粒,未转染质粒组为对照组,转染质粒组为实验组。两组分别消化,1 200 r/min 离心 5 min,收集细胞,2% 血清培养基重悬细胞,调整细胞浓度,于 Transwell 上室加入 5×10^5 个细胞,在下室中加入 0.5 ml 含血清的完全培养基;培养箱培养 24 h (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)。取出 Transwell 小室,弃去孔中培养液,用无钙的 PBS 洗 2 次,甲醇固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 20 min,用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,用 PBS 洗 3 次。100 及 200 倍显微镜下随机 6 个视野观察细胞,计数。

1.7 CCK-8 细胞增殖实验 在普通 6 孔板中铺板 8×10^5 个/孔,共 2 孔 MCF7 乳腺癌细胞,待细胞融合率为 70% 左右,向其中一孔转染 2 μg PCDH 空载质粒,向另一孔转染 2 μg CBLC 质粒,未转染质粒组为对照组,转染质粒组为实验组。两组分别消化,1 200 r/min 离心 5 min,收集细胞,在 96 孔板各孔

中配置 100 μl , 5 000 个细胞。培养箱培养 24 h (37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2) 后, 分别于 24、48、72 h 加入 CCK-8 试剂, 并孵育相同时间后检测吸光度 (optical density, OD) 值。共 3 次实验, 每次 3 个复孔, 取平均值。折线图显示结果。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间计量资料使用独立样本 t 检验或 wilcoxon 秩和检验, 生存曲线采用 log-rank 检验。检验结果均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CBLC 蛋白在乳腺癌及其癌旁组织中的表达水平 CBLC 蛋白在乳腺癌及其癌旁组织中的表达量不同。CBLC 在乳腺癌组织中的平均表达量为 $3.519\ 957 \pm 0.86$, 在癌旁组织的平均表达量为 $2.330\ 751 \pm 0.83$, 差异有统计学意义 ($P = 2.31 \times 10^{-20}$)。见图 1。

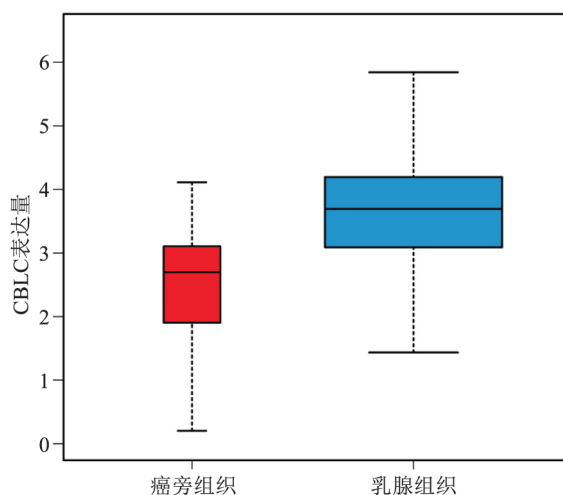


图 1 CBLC 蛋白在乳腺癌及其癌旁组织中的表达箱线图

箱线图中从下至上分别为最小值、下四分位数 (第 25 百分位数)、中位数 (第 50 百分位数)、上四分位数 (第 75 百分位数) 以及最大值。

2.2 CBLC 蛋白在不同乳腺癌分子分型中的表达水平 CBLC 在不同乳腺癌分子分型中的表达量均高于其癌旁组织。其中, CBLC 在 Luminal A 亚型 (ER + 或 PR +, HER2 -) ($P = 1.15 \times 10^{-20}$)、Luminal B 亚型 (ER + 或 PR +, HER2 +) ($P = 9.43 \times 10^{-7}$) 和 TNBC 亚型 (ER -, PR -, HER2 -) ($P = 8.20 \times 10^{-7}$) 中的表达量较癌旁组织升高显著, 在 HER2 + 亚型 (ER -, PR -, HER2 +) ($P = 0.32$) 中的表达较癌旁组织升高不明显; CBLC 在 Luminal A 亚型中表达量为 4 种乳腺癌分子分型中最高, 且与

CBLC 在其他 3 种乳腺癌分子分型中的表达量均存在显著差异, $P_{(\text{Luminal A vs Luminal B})} = 9.10 \times 10^{-4}$, $P_{(\text{Luminal A vs HER2})} = 2.56 \times 10^{-3}$, $P_{(\text{Luminal A vs TNBC})} = 4.03 \times 10^{-3}$; 而 CBLC 在 HER2 + 亚型中表达量较癌旁组织升高幅度最小。可见 CBLC 的表达水平与 ER +、PR +、HER2 - 的表达状态具有一定的相关性。见图 2、表 1。

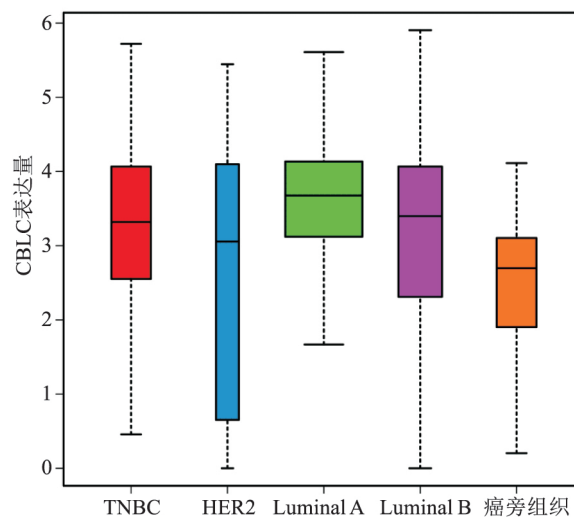


图 2 不同分子类型与正常组织中 CBLC 蛋白表达分布箱线图

表 1 不同分子类型与正常组织中 CBLC 蛋白表达平均值

分子类型	CBLC 蛋白表达平均值 (FPKM)
TNBC	$3.160\ 305\ 324 \pm 1.32$
HER2	$2.630\ 062\ 208 \pm 1.69$
Luminal A	$3.554\ 734\ 282 \pm 0.99$
Luminal B	$3.123\ 245\ 739 \pm 1.30$
癌旁组织	$2.330\ 750\ 653 \pm 1.18$

2.3 CBLC 蛋白在乳腺癌不同病理组织类型中的表达水平 在 5 种乳腺癌病理组织分型中, CBLC 蛋白在黏液癌中表达量最高, 其次是浸润性小叶癌, 在混合组织类型癌中的表达量最低。除浸润性小叶癌与黏液癌、浸润性导管癌与其他类型乳腺癌之间表达差异性不显著外, 其他病理组织类型之间均具有显著的表达差异, $P_{(\text{ILC vs IDC})} = 4.6 \times 10^{-9}$, $P_{(\text{MH vs IDC})} = 0.11$, $P_{(\text{MC vs IDC})} = 8.2 \times 10^{-3}$, $P_{(\text{ILC vs MH})} = 3.6 \times 10^{-5}$, $P_{(\text{ILC vs Other})} = 2.7 \times 10^{-2}$, $P_{(\text{MH vs MC})} = 1.9 \times 10^{-3}$, $P_{(\text{Other vs MH})} = 8.1 \times 10^{-2}$, $P_{(\text{Other vs MC})} = 0.059$ 。见图 3、表 2。

2.4 CBLC 表达与乳腺癌 TNM 及病理分期的相关性分析 CBLC 与 TNM 分期及乳腺癌临床分期的相关性不大, 其表达量在乳腺癌各分期中变

表2 不同病理组织类型组织标本中 CBLC 蛋白表达平均值

病理组织类型	CBLC 蛋白表达平均值
浸润性导管癌	3.332 733 244 ± 1.17
浸润性小叶癌	3.817 130 047 ± 0.90
混合组织学癌	2.988 244 946 ± 1.32
粘液癌	4.014 266 178 ± 0.62
其他类型癌	3.504 967 318 ± 0.95

化较大,趋势不一致。仅在 stage I 和 stage II 两个时期中表达变化差异显著,其中 stage I 包括 I A 期 (T1N0M0) 及 I B 期 (T0N1miM0 或 T1N1miM0), stage II 包括 II A 期 (T0N1M0 或 T1N1M0 或 T2N0M0) 及 II B 期 (T2N1M0 或 T3N0M0), CBLC 基因表达变化与 stage I 至 stage II 病理分期相关 ($P=0.0494$)。见图 4。

2.5 CBLC 表达与乳腺癌患者生存曲线分析 分别以平均数或中位数为阈值将乳腺癌样本划分为

CBLC 高表达组与 CBLC 低表达组,结果均显示 CBLC 高表达的患者预后生存率高于低表达的患者,这一差异在以平均数为阈值的分析中更为显著 ($P=0.054$)。见图 5。

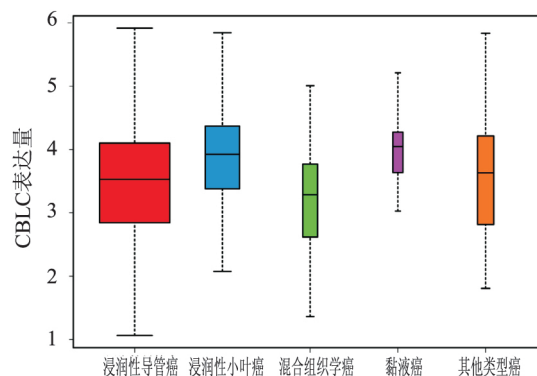


图3 不同病理组织类型组织标本中 CBLC 蛋白表达分布箱线图

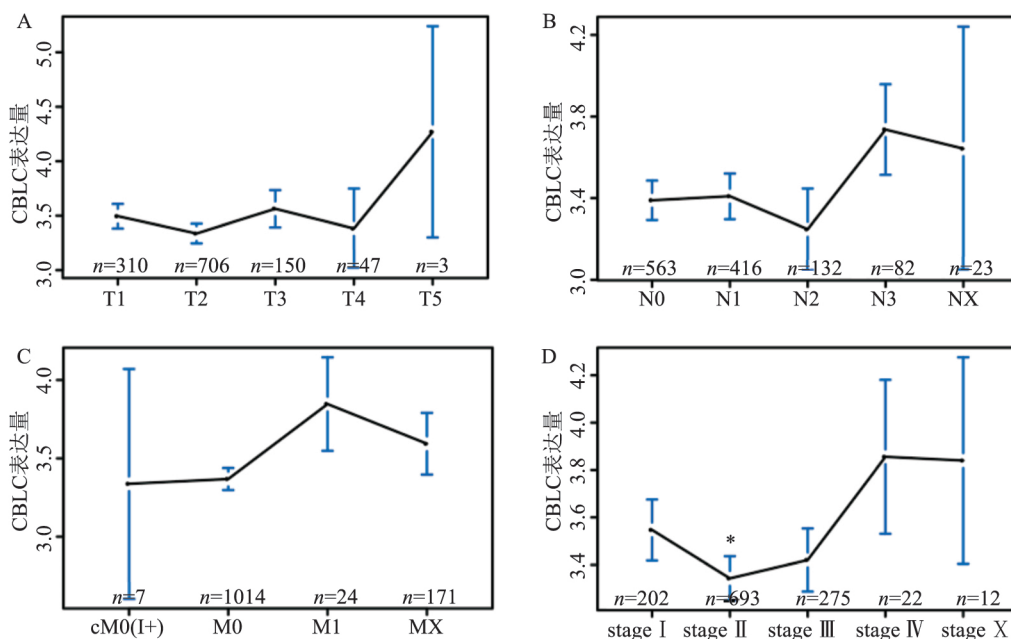


图4 不同分级、分期乳腺癌的 CBLC 蛋白在乳腺癌不同 TNM 分期中的表达水平

A: 原发灶病理分类; B: 淋巴结病理分类; C: 远处转移病理分类; D: 乳腺癌临床分期; 与 stage I 比较: * $P < 0.05$

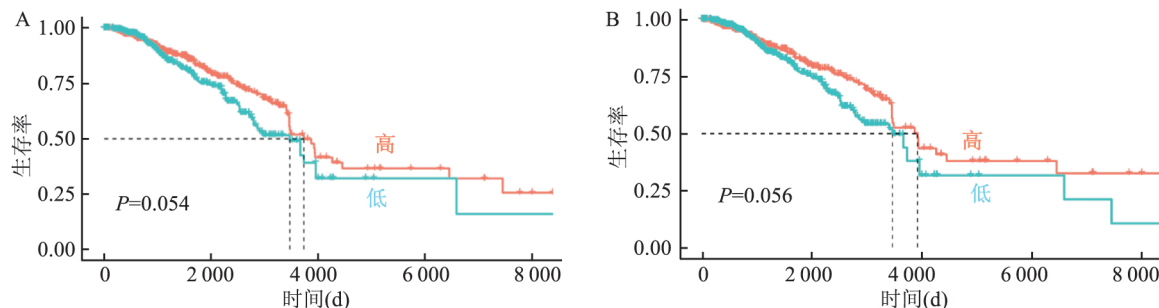


图5 CBLC 基因相关的乳腺癌患者生存曲线图

A: CBLC 表达量平均数为阈值; B: CBLC 表达量中位数为阈值

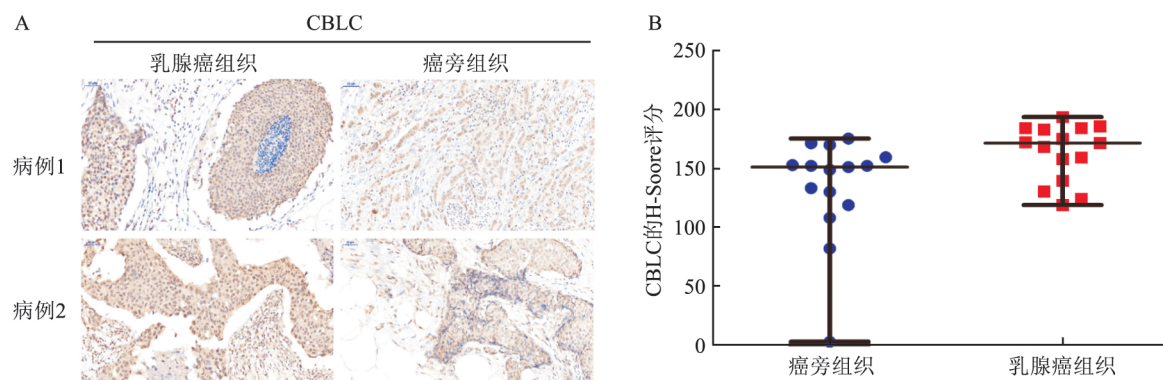


图6 30例肿瘤组织及其邻近正常组织的CBLC表达量免疫组化结果

A:代表性病例肿瘤组织及其邻近正常组织的染色结果 SP×400; B:肿瘤组织及邻近正常组织CBLC的H-Score散点图

2.6 CBLC表达水平的免疫组化评分 选取30例乳腺癌患者肿瘤组织及其癌旁组织切片进行免疫组化实验,染色结果显示CBLC在乳腺癌组织中的表达量显著高于正常组($P=0.014$)。每一组肿瘤组织中CBLC免疫组化H-Score评分均高于其对应的癌旁正常组织,且CBLC表达量在肿瘤组织中的分布较为集中,差异较小。见图6。

2.7 CBLC过表达的MCF7乳腺癌细胞表型实验

在MCF7乳腺癌细胞中分别转染CBLC质粒或空载PCDH质粒进行细胞划痕实验,结果表明:CBLC蛋白过表达的MCF7乳腺癌细胞48h后划痕愈合度显著低于PCDH组,见图7;Transwell迁移实验($P=0.04$)及CCK-8细胞增殖实验($P=0.003$)表明CBLC过表达能够明显抑制细胞增殖迁移,见图8、9。

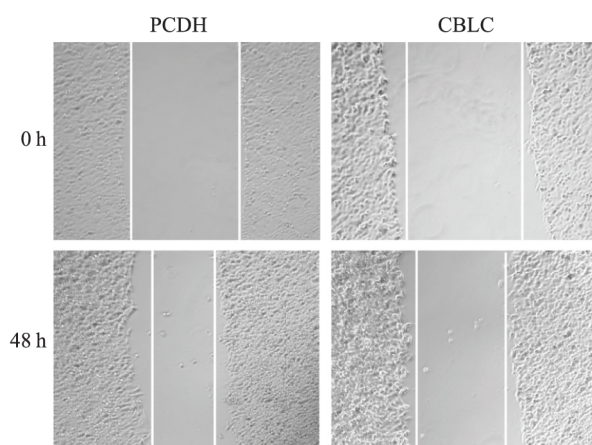


图7 CBLC蛋白刺激下MCF7乳腺癌细胞的划痕实验 ×100

3 讨论

乳腺癌是危害女性生命健康的主要恶性肿瘤之一,虽然在诊断和治疗方面已经取得了较大进步,但

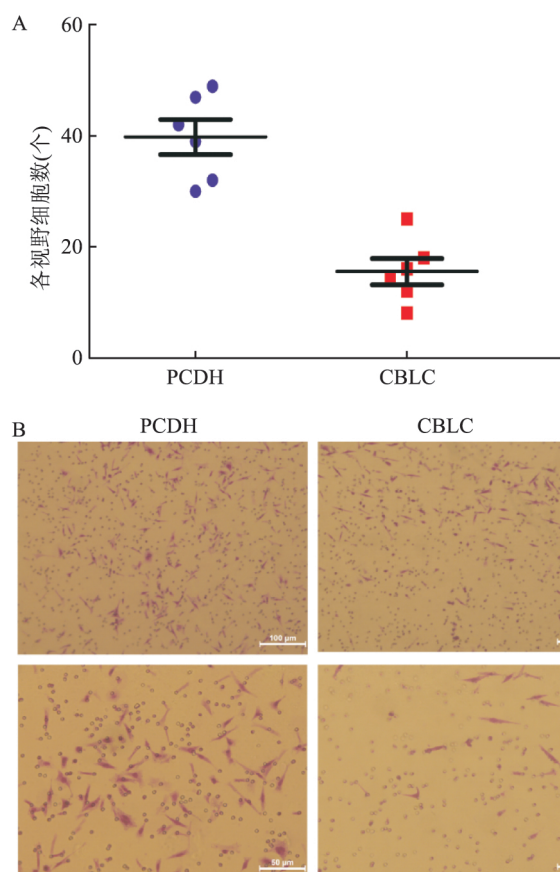


图8 CBLC蛋白刺激下MCF7乳腺癌细胞的Transwell迁移实验

A:6个视野CBLC蛋白过表达或PCDH空载MCF7Transwell细胞数散点图; B:CBLC蛋白过表达或PCDH空载MCF7Transwell迁移情况

诊疗现状仍难令人满意。乳腺癌是一种高度异质性恶性肿瘤,不同分子亚型及病理类型在基因特征、治疗敏感性和预后等方面存在差异^[3]。因此依据分子分型和病理分型寻找可靠的生物学标志物,对临床的个体化治疗非常重要。

CBLC参与负调控多种RTKs(如EGFR、MET和

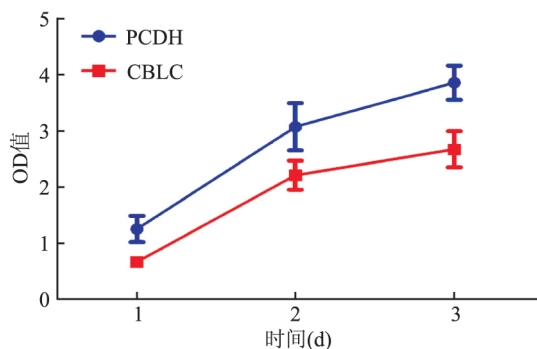


图9 CBLC蛋白刺激下MCF7乳腺癌细胞的CCK-8增殖实验

RET)及非受体依赖性酪氨酸激酶(如 Src)通过其上下游调控机制在乳腺癌的发生、发展、治疗及预后中发挥重要作用^[4]。

本研究显示,CBLC在乳腺癌组织中的表达量高于癌旁组织。相关原因可能为,CBLC的编码基因位于染色体19q13.32上,靠近卵巢癌、乳腺癌等恶性肿瘤的常见染色体高扩增区19q13.1。乳腺癌是位于乳腺腺上皮组织的恶性肿瘤,而CBLC仅表达于乳腺上皮细胞而不表达于乳腺脂肪细胞^[5]。

本研究结果显示在所述4种亚型中,CBLC在Luminal A型中表达量最高。有学者研究^[6]认为Luminal A型预后好,多属于早期。本研究结果显示CBLC在不同分子分型中表达量的高低排序与Onitilo et al^[7]研究显示的5年无病生存率LuminalA > LuminalB > Basal-like > HER2的排序一致。

本研究显示CBLC在不同乳腺癌组织病理分类中的表达量由高到低为黏液癌>浸润性小叶癌>浸润性导管癌>混合型癌。黏液腺癌属于浸润性特殊癌,分化程度较高,预后尚好。浸润性非特殊癌包括浸润性小叶癌、浸润性导管癌,一般分化较低,预后较上述类型差。其他罕见乳腺癌发展迅速,预后最差。

CBLC在Luminal A型(ER+或PR+,HER2-)中表达量较癌旁组织升高幅度为4种亚型中最大,在HER2+型(ER-,PR-,HER2+)中最小。曹颖等^[8]的免疫组化结果显示其所用的黏液癌组织标本ER和(或)PR均阳性,HER2均阴性。可见CBLC的高表达可能与ER、PR受体呈正相关,与HER2受体呈负相关。有研究^[9]证实ER、PR表达阳性的乳腺癌细胞恶性程度更低且细胞分化程度更高;而HER2过表达常提示肿瘤恶性程度高、预后差,在乳腺癌中被认为是仅次于淋巴结状况的乳腺癌独立预后指标。这也证明CBLC同时高表达于预

后较好的Luminal A型(ER+或PR+,HER2-)及黏液癌型乳腺癌可能与ER、PR、HER2的表达相关。提示CBLC在乳腺癌病理生理过程中发挥了重要作用,可能与乳腺癌发生发展进程密切相关。

本研究表明,CBLC高表达抑制了MCF7乳腺癌细胞的增殖迁移且CBLC高表达患者预后生存率高于低表达患者,这与Stephen et al^[4]针对CBLC表达量与乳腺癌患者KM生存曲线分析结果趋势一致。其原因可能是CBLC能够与受体酪氨酸激酶(rear-ranged during transfection proto-oncogene,RET)结合,并促进RET的泛素化和降解,从而抑制RET介导的下游ERK激活。虽然CBLC在乳腺癌发生发展中的作用报道较少,但CBLC在其他肿瘤中的生物学功能可供参考。有文献^[10]报道c-Src是一种非受体型蛋白酪氨酸激酶,能够激活许多信号蛋白并导致转化,促进肿瘤细胞增殖及侵袭迁移,与肾癌转移密切相关。CBLC通过降解泛素依赖蛋白,可抑制c-Src诱导的转化^[11]。乳腺癌中CBLC可能通过类似机制发挥作用。

综上所述,CBLC在乳腺癌各分型分期中的表达具有显著性差异,其在恶性程度低(LuminalA型)、分化程度高(黏液癌)及早期乳腺癌(stage I)中均高表达,并在乳腺癌stage I期至stage II期中表达量呈下降趋势,与乳腺癌进程负相关,其高表达与乳腺癌患者预后良好正相关。因此,CBLC可能是新的乳腺癌分子诊断或靶向治疗的潜在靶标,但具体的作用机制还需全面并大样本地深入研究。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China [J]. CA - Cancer J Clin 2016 66(2):115-32.
- [2] Hong S Y, Kao Y R, Lee T C, et al. Upregulation of E3 ubiquitin ligase CBLC enhances EGFR dysregulation and signaling in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2018 78(17):4984-96.
- [3] 曹明丽. 基于分子分型的乳腺癌流行病学新认识[J]. 中国肿瘤临床, 2017 44(9):449-51.
- [4] Stephen C, Marion M, Anand S. Enigma prevents Cbl-c-mediated ubiquitination and degradation of RETMEN2A [J]. PLoS One 2014 9(1):87116-26.
- [5] Chen D, Si W, Shen J, et al. miR-27b-3p inhibits proliferation and potentially reverses multi-chemoresistance by targeting CBLB/GRB2 in breast cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2018 9(2):188-200.
- [6] Van Der Hage J A, Mieog J S, Van De Velde C J, et al. Impact of established prognostic factors and molecular subtype in very young breast cancer patients: pooled analysis of four EORTC ran-

- domized controlled trials[J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(3): 68–78.
- [7] Onitilo A A, Engel J M, Greenlee R T, et al. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival[J]. *Clin Med Res*, 2009, 7(1–2): 4–13.
- [8] 曹颖, 张赞, 吴倩. 特殊类型浸润性乳腺癌病理组织学及免疫组化研究[J]. *贵州医药* 2013, 37(5): 387–91.
- [9] 周海丰, 范玉宏, 武雪亮, 等. IHC 和 FISH 检测乳腺癌 HER-2 与 ER、PR、淋巴结转移的相关性[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(2): 262–4.
- [10] 陈俊明. C-SRC 基因对肾癌细胞生物学特性的影响及其临床意义研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2015.
- [11] Kim M, Tezuka T, Tanaka K, et al. Cbl-c suppresses v-Src-induced transformation through ubiquitin-dependent protein degradation [J]. *Oncogene*, 2004, 23(9): 1645–55.

Expression differences and prognosis analysis of CBLC in breast cancer with different types and stages

Li Weiwei¹, Xiao Bin², Lu Jingrun¹, et al

(¹Dept of Basic Clinical Laboratory Medicine, School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004; ²Dept of Laboratory Medicine, General Hospital of Southern Theatre Command of PLA, Guangzhou 510010)

Abstract Objective To provide a new monitoring index for clinical diagnosis and prognosis evaluation of breast cancer, and to provide a guiding theoretical basis for further research and treatment program formulation of breast cancer by studying the expression of Cbl Proto-Oncogene C (CBLC) in breast cancer. **Methods** The gene expression spectrum matrix (FPKM) of 1104 breast cancer tissues and 113 adjacent tissues were downloaded from TCGA of USCS Xena (<https://xenabrowser.net>). The expression differences of CBLC gene in breast cancer molecular classification, histopathological type, TNM stages and tumor stages and the relationship of prognosis were analyzed. The expression of CBLC in 30 tumor tissues or para-carcinoma tissues were observed by immunohistochemical staining. MCF7 breast cancer cells were used for scratch test, Transwell test and CCK-8 test, and the effects of CBLC on proliferation and migration were observed. **Results** The expression level ($P = 2.31 \times 10^{-20}$) and H-Score ($P = 0.014$) of CBLC in the breast cancer group was higher than that in the para-carcinoma group. CBLC expression in Luminal A ($P = 1.68 \times 10^{-4}$) and mucinous carcinoma ($P = 4.00 \times 10^{-5}$) breast cancer was the highest among different breast cancer molecular types ($P = 1.68 \times 10^{-4}$). The expression level of CBLC decreased from stage I to stage II in breast cancer ($P = 0.0494$). The survival rate of breast cancer patients in the high CBLC expression group was higher than that in the low CBLC expression group on a median basis ($P = 0.054$). The high expression group of CBLC could inhibit the proliferation and migration of breast cancer cells. **Conclusion** The expression of CBLC in various breast cancer types and stages is significantly different, and it mainly expresses in Luminal A breast cancer which is low malignant molecular type, mucinous carcinoma which is high differentiated histopathological type and early breast cancer. It is positively correlated with survival and prognosis of breast cancer patients, and it can inhibit the migration and proliferation of breast cancer. CBLC may be a potential target for new molecular diagnosis or targeted treatment of breast cancer.

Key words CBLC protein; breast cancer; classification and staging; prognostic impact