

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.10.014

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.10.014>

乳腺癌中 NGX6 表达与 BI-RADS 超声特征 及淋巴结转移的关系

刘梦涵, 肖际东

(中南大学湘雅三医院超声科, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 探讨NGX6在乳腺癌中的表达及与乳腺影像报告数据系统(breast imaging reporting and data system, BI-RADS)超声特征及淋巴结转移的关系。方法: 回顾性收集162例乳腺癌的超声声像图特征及临床资料, 参照BI-RADS标准予以分类。免疫组织化学法检测乳腺癌组织中NGX6的表达, 分析乳腺癌组织NGX6表达与BI-RADS超声特征及淋巴结转移的关系。结果: 在162例乳腺癌中, 92例(56.8%)NGX6阳性表达, 70例(43.2%)NGX6阴性表达。NGX6阴性表达组的乳腺癌肿块血流丰富、乳腺癌BI-RADS高类别发生率及淋巴结转移发生率均高于NGX6阳性表达组。NGX6表达与肿瘤血流量及BI-RADS超声分类呈负相关(分别 $P=0.043$, $P=0.020$, $P=0.005$)。结论: NGX6作为一个抑癌基因, 与乳腺癌BI-RADS超声分类及超声生物学特征相关, NGX6表达水平在一定程度上可反映乳腺癌生物学行为。

[关键词] 超声; 乳腺癌; NGX6; 乳腺影像报告数据系统; 淋巴结转移

Relationship of NGX6 expression with BI-RADS ultrasonographic features and lymph node metastasis in breast cancer

LIU Menghan, XIAO Jidong

(Department of Ultrasound, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract **Objective:** To investigate the relationship of NGX6 expression in breast cancer with BI-RADS ultrasonic features and lymph node metastasis. **Methods:** Ultrasonic features and clinical data of 162 breast cancer cases were retrospectively collected and classified according to BI-RADS criteria. The expression of NGX6 in breast cancer tissues was detected by immunohistochemistry. The relationship of NGX6 expression in breast cancer with BI-RADS ultrasonic features and lymph node metastasis was analyzed. **Results:** There were 92 (56.8%) NGX6 positive expressions and 70 (43.2%) NGX6 negative expressions in 162 breast cancers. Compared with

收稿日期 (Date of reception): 2022-04-14

通信作者 (Corresponding author): 肖际东, Email: jidongxiao1975@126.com

基金项目 (Foundation item): 湖南省自然科学基金 (2019JJ40459); 湖南省卫生健康委科研课题 (B2019177)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2019JJ40459) and the Project of Hunan Health Committee (B2019177), China.

the NGX6 positive group, the NGX6 negative group showed a higher incidence of abundant blood flow, lymph node metastasis, and higher BI-RADS ultrasound category. NGX6 expression was negatively correlated with the degree of tumor blood flow and BI-RADS ultrasound classification ($P=0.043$, $P=0.020$, $P=0.005$, respectively).

Conclusion: NGX6, as a tumor suppressor gene, is associated with BI-RADS ultrasound classification and ultrasound biological features of breast cancer, and NGX6 expression level can reflect the biological behavior of breast cancer to some extent.

Keywords ultrasound; breast cancer; NGX6; breast imaging reporting and data system; lymph node metastasis

乳腺癌是最常见的女性恶性肿瘤之一, 具有侵袭快、复发率高、病死率高的特点^[1-4]。NGX6是一个肿瘤抑制基因, 含有1个表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)样结构域, 这是NGX6基因最重要的生物学特性之一。研究^[5-9]表明: 含有类EGF结构域的蛋白质会影响多种恶性生物学行为, 如肿瘤的生长、侵袭和转移。然而, NGX6在乳腺癌中的表达与其恶性生物学行为影像特征的关系却知之甚少。超声是乳腺癌常见的诊断技术之一, 通过超声可显示乳腺癌各种生物学影像特征。乳腺影像报告数据系统(breast imaging reporting and data system, BI-RADS)由美国放射学会制定, 主要用于规范乳腺术语及描述标准, 指导诊断分类以及病灶的恶性概率评估等, 与单一指标及主观判断相比, BI-RADS分类能更加客观、全面地反映乳腺病变的生物学特征。本研究通过研究乳腺癌中NGX6表达与BI-RADS超声特征及淋巴结转移的关系, 探讨NGX6表达的差异性对乳腺癌生物学特征的影响, 为乳腺癌超声特征的分子病理提供参考。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2014年1月至2019年1月因乳腺触及肿块、乳头溢液、乳房疼痛等症状或体检发现肿块就诊的患者。纳入标准: 1) 乳腺肿块被常规超声诊断为BI-RADS 3类及以上, 经病理证实的乳腺癌患者, 临床与影像资料完整; 2) 术前或活检前未接受新辅助化疗、内分泌治疗、免疫治疗等。排除标准: 1) 乳腺内植入假体; 2) 常规超声难以显示的乳腺肿块; 3) 患者在孕期或哺乳期; 4) 超声检查图像不清晰; 5) 合并其他部位恶性肿瘤。最终纳入符合以上标准的162例患者, 年龄29~74(平均52.5)岁。本研究经中南大学

湘雅三医院医学伦理委员会审核批准(审批号: 2018-S237), 患者及其家属均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 超声检查

患者在术前进行常规超声成像, 使用超声扫描仪(ACUSON S2000, 德国西门子公司), 多频线性7~9 MHz探头。患者取仰卧位, 双手上举, 充分暴露双侧乳房及腋窝, 行双侧乳腺常规超声检查, 从乳房外上象限开始, 顺时针方向由乳头开始向乳房边缘扫查, 4个象限、乳晕区及腋窝分别进行多切面扫查。发现肿块后, 行十字交叉扫查。观察肿块形状、边缘、内部回声、有无点状强回声钙化、后方回声有无衰减, 有无腋窝淋巴结转移, 肿块血流分布及丰富程度等。常规超声诊断标准参照美国放射学会制定的BI-RADS进行分类^[10-11]。肿块具有良性特征, 比如边缘光整、椭圆形和平行位生长等, 则判定为BI-RADS 3类。肿块恶性特征表现为不规则形状、非平行方位生长、不可界定的边缘、微小钙化灶(直径 $<0.5\text{mm}$)、高回声晕、后方声影和周围组织异常。根据恶性程度分类: BI-RADS 4a类, 肿块具有1个恶性特征, 恶性概率 $>2\%$ 但 $\leq 10\%$; BI-RADS 4b类, 肿块具有2个恶性特征, 恶性概率 $>10\%$ 但 $\leq 50\%$; BI-RADS 4c类, 肿块具有3个恶性特征, 恶性概率 $>50\%$ 但 $<95\%$; BI-RADS 5类, 肿块具有4个及以上恶性特征, 恶性概率 $\geq 95\%$ 。设定BI-RADS 4b类及以上者为BI-RADS高类别组, BI-RADS 4a类及以下者为BI-RADS低类别组。血流信号的分级采用Adler分类法^[12-13]。

1.2.2 免疫组织化学

组织标本用甲醛固定, 石蜡包埋组织切片(4 μm 厚)脱蜡, 然后用乙醇梯度水化。组织抗原修复在10 mmol/L柠檬酸钠(pH 6.0)高压下进行, 时间5 min。将组织切片浸泡在3% H_2O_2 中10 min, 灭活内源性过氧化物酶。组织切片中加

入10%的山羊血清, 37℃孵育30 min。切片与兔抗NGX6单克隆抗体(1:200稀释, 美国Abcam公司)在4℃下孵育过夜, 随后与兔和小鼠免疫球蛋白的二抗(EnVision法, 丹麦DAKO公司)在37℃下孵育30 min。然后, DAB染色5 min, 细胞质和细胞膜呈黄褐色染色, 为阳性。在400倍显微镜下随机观察5个有代表性的区域, 每个观察区阳性细胞计数不少于200个。根据细胞染色强度和阳性细胞比例进行分类^[14]。阳性细胞数<10%为阴性, 阳性细胞数≥10%为阳性。免疫组织化学分析均由2位病理医生独立地进行评估。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用 t 检验; 计数资料以例(%)表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 相关性分析采用Spearman等级相关。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺肿块病理结果

在162例乳腺癌中, 浸润性导管癌139例(86.1%), 黏液腺癌3例(1.9%), 浸润性小叶癌9例(5.6%), 髓样癌5例(3.1%), 导管内原位癌

6例(4.9%)。

2.2 乳腺癌中NGX6的表达

在162例乳腺癌中, NGX6阳性表达92例(56.8%), 阴性表达70例(43.2%)。

2.3 乳腺癌超声BI-RADS超声特征及淋巴结转移情况

在162例乳腺癌患者中, 形态规则39例(24.1%), 平行位生长52例(32.1%), 边缘光整27例(16.7%), 边界清晰61例(37.7%), 微小钙化灶23例(14.2%), 后方回声衰减24例(14.8%), 周围组织异常37例(22.8%), 周边声晕33例(20.4%)。92例(56.8%)淋巴结转移, 62例(38.3%)血供丰富。在乳腺癌BI-RADS分类方面, BI-RADS 3类33例(20.4%), 4a类72例(44.4%), 4b类26例(16.0%), 4c类18例(11.1%), 5类13例(8.0%)。

2.4 NGX6表达与BI-RADS超声特征及淋巴结转移的关系

NGX6阴性表达组的乳腺癌血流丰富、乳腺癌BI-RADS高类别发生率及淋巴结转移发生率均高于NGX6阳性表达组(分别 $P=0.043$, $P=0.020$, $P=0.005$), NGX6表达与血流丰富及BI-RADS分类等呈负相关(分别 $r=-0.159$, $r=-0.218$; 图1、2, 表1)。

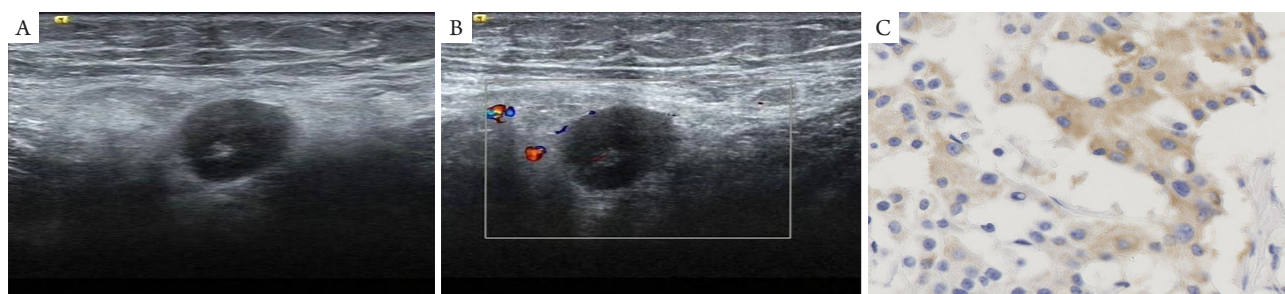


图1 NGX6阳性乳腺癌病灶超声声像图

Figure 1 Ultrasound imaging of lesion in NGX6 (+) breast carcinoma

(A)乳腺癌二维超声图像; (B)乳腺癌彩色血流图像; (C)NGX6表达阳性图像(IHC, $\times 100$)。患者为52岁女性, 右乳肿块, BI-RADS 4a, NGX6阳性, 超声声像图特征为形态规则, 边界清晰, 平行位, 周边结构无明显改变, 后方回声增强, 内部回声不均匀, 血流Adler 1级。

(A) Two-dimensional ultrasound image of breast cancer; (B) Color doppler flow image of breast cancer; (C) NGX6 expression positive image (IHC, $\times 100$). The patient was a 52-year-old female with a right breast mass, BI-RADS 4a, NGX6 (+), with ultrasound sonogram characterized by regular morphology, well-defined borders, parallel position, no significant changes in peripheral structures, posterior echo enhancement, internal echo unevenness, and Adler 1.

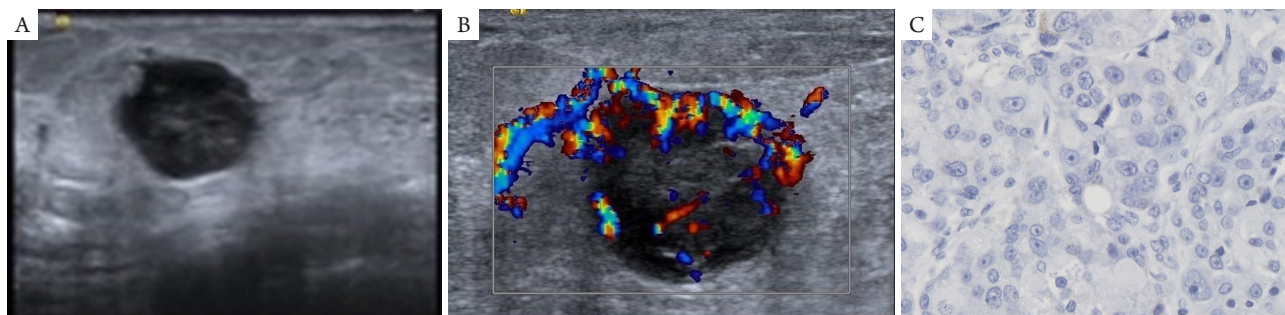


图2 NGX6阴性乳腺癌病灶超声声像图

Figure 2 Ultrasound imaging of lesion in NGX6 (-) breast carcinoma

(A)乳腺癌二维超声；(B)乳腺癌彩色血流；(C)NGX6表达阴性(IHC, ×100)。患者为56岁女性，右乳肿块，BI-RADS 4c，NGX6阴性，超声声像图特征为形态规则，类圆形，边界尚清晰，边缘毛刺，非平行位，部分伴强回声晕，可见侧方声影，后方回声增强，内部回声不均匀，血流Adler 3级。

(A) Two-dimensional ultrasound image of breast cancer; (B) Color doppler flow image of breast cancer; (C) NGX6 expression negative image (IHC, ×100). The patient was a 56-year-old female with right breast mass, BI-RADS 4c, NGX6 (-), with ultrasound sonogram characterized by regular morphology, round-like, still well-defined borders, burred margins, non-parallel position, partially with strong echo halo, visible lateral acoustic shadow, posterior echo enhancement, internal echo unevenness, and Adler 3.

表1 NGX6表达与BI-RADS超声特征及淋巴结转移的关系

Table 1 Relationship between NGX6 expression and BI-RADS ultrasonographic features and lymph node metastasis

BI-RADS超声特征	总计/例	NGX6表达/例		χ^2	P
		+	-		
形态				2.042	0.153
规则	39	26	13		
不规则	123	66	57		
生长方位				0.739	0.390
平行位	52	27	25		
非平行位	110	65	45		
边界				3.076	0.079
清晰	61	40	21		
不清晰	101	52	49		
微小钙化灶				1.936	0.164
有	23	10	13		
无	139	82	57		
周边声晕				2.17	0.141
有	33	15	18		
无	129	77	52		
后方回声衰减				2.626	0.105
有	24	10	14		
无	138	82	56		

续表1

BI-RADS超声特征	总计/例	NGX6表达/例		χ^2	P
		+	-		
周围组织异常					
有	37	16	21	3.586	0.058
无	125	76	49		
BI-RADS分类					
高	57	24	33	7.728	0.005
低	105	68	37		
淋巴结转移					
有	92	45	47	5.384	0.020
无	70	47	23		
血供					
0~1级	62	29	33	4.106	0.043
2~3级	100	63	37		

3 讨论

乳腺癌发生、发展、侵袭、转移与多种基因的突变或异常表达有关^[14-17]。NGX6低表达或低表达可引起血管生成,促进与抑制因子的平衡功能失调、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等血管生成促进因子水平增高,促进微血管生成,从而增加肿瘤转移的概率^[18-19]。超声检查是乳腺肿块良恶性诊断最常用的技术之一,可观察乳腺肿瘤发生的数量、形态、大小、边缘、内部回声、淋巴结转移等重要特征。本研究采用超声BI-RADS分类经典指标^[11],将乳腺癌中NGX6表达与超声图像相关联,探讨乳腺癌超声BI-RADS分类指标与NGX6表达之间的关系,对于乳腺癌超声分子病理基础研究具有重要价值。

本研究中,NGX6阴性表达组的乳腺癌淋巴结转移高于NGX6阳性表达组,提示NGX6表达与淋巴结转移等相关,NGX6可能参与了乳腺癌的侵袭、转移。彩色多普勒血流显像(Color Doppler Flow Imaging, CDFI)显示乳腺癌NGX6阴性表达组血流比NGX6阳性表达组更丰富。推测其原因可能为肿瘤的侵袭、转移都离不开新生血管的形成。为满足恶性肿瘤的代谢对营养物质的需求,肿瘤血管扩张,积极进行分枝和生长。研究^[18-19]显示:NGX6可能通过影响许多血管生成分子基因的

调控,如减少VEGF、上调p19和下调Eph-B4等参与抑制血管生成过程。连平等^[20]指出NGX6基因参与抑制血管原生成的过程。与非转染模型比较,NGX6转染肿瘤模型的微血管密度(microvascular density, MVD)明显下降,NGX6的表达与肿瘤血管丰度相关。上述研究进一步提示NGX6基因的失表达或低表达是乳腺癌的血管生成及浸润转移的机制之一,为探讨NGX6基因与乳腺癌侵袭、转移的关系提供了分子影像学依据。

BI-RADS超声分类是乳腺肿块良恶性判断的重要参考依据^[10-11]。BI-RADS超声分类中纳入的乳腺癌恶性特征评价指标主要包括肿瘤形态、后方声影、周围组织异常、生长方位、声晕等^[21]。与单一恶性特征评估肿瘤良恶性比较,BI-RADS分类能较全面评估乳腺癌的生物学行为^[10-11]。本研究根据BI-RADS分类中单个超声恶性特征指标有无进行分组,结果显示:有无恶性指标特征组间比较,NGX6表达无差异,这些恶性特征指标与NGX6表达无关。按照BI-RADS分类予以分组,结果显示:BI-RADS分类中的不同组别间,NGX6表达水平有差异,随着BI-RADS分类组别越高,NGX6阳性表达发生越低,乳腺癌中BI-RADS分类与NGX6表达有关。国内外研究^[10-11,22-23]显示:BI-RADS分类增加,病灶组织中促增殖、促侵袭基因表达量进一步增加,抗增殖、抗侵袭基因表达量进一步减少。随BI-RADS分类增加,乳腺肿块的恶性可能性

倍增。乳腺癌超声BI-RADS分级与癌细胞增殖、活性呈正相关。本研究发现乳腺癌中BI-RADS分类与NGX6表达有关,与上述报道一致。

本研究的局限性主要为:首先,样本数量及构成方面存在一定的不足,浸润性导管癌占恶性病例的大部分,其他类型的乳腺癌较少;其次,研究样本量不大,部分指标难以达到统计学意义;再次,在BI-RADS分类及特征描述过程中,超声医生主观进行分类评估,受限于个人经验、操作手法差异及不同仪器设备等因素,对癌灶的超声BI-RADS分类都会有一定的影响。因此在后续的研究中需要完善并加大样本量行进一步分析。

综上所述,NGX6是一个重要的抑癌基因,与乳腺癌BI-RADS超声分类及超声生物学特征相关,NGX6的表达水平在一定程度上可反映乳腺癌生物学行为。联合分子生物学与影像学技术共同探讨肿瘤侵袭、转移规律,可为乳腺癌的分子病理基础研究、基因治疗及预后评估等开辟新的途径。

参考文献

- Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e279-e289.
- Gahr S, Mayr C, Kiesslich T, et al. The pan-deacetylase inhibitor panobinostat affects angiogenesis in hepatocellular carcinoma models via modulation of CTGF expression[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(3): 963-970.
- Yu GR, Kim SH, Park SH, et al. Identification of molecular markers for the oncogenic differentiation of hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(5): 641-652.
- Mas VR, Maluf DG, Archer KJ, et al. Angiogenesis soluble factors as hepatocellular carcinoma noninvasive markers for monitoring hepatitis C virus cirrhotic patients awaiting liver transplantation[J]. *Transplantation*, 2007, 84(10): 1262-1271.
- Wang L, Ma J, Li J, et al. NGX6 gene inhibits cell proliferation and plays a negative role in EGFR pathway in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95(1): 64-73.
- Ma J, Zhou J, Fan S, et al. Role of a novel EGF-like domain-containing gene NGX6 in cell adhesion modulation in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(2): 281-291.
- 熊炜, 曾朝阳, 沈守荣, 等. 染色体9p21-22区域两个新的SNPs位点在湖南汉族人群中的多态分布[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2003, 20(3): 203-206.
- XIONG Wei, ZENG Chaoyang, SHEN Shourong, et al. Polymorphism of two novel SNPs, which locate on chromosome 9p21-22, in Han Chinese of Hunan[J]. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2003, 20(3): 203-206.
- Wu M, Li X, Li X, et al. Signaling transduction network mediated by tumor suppressor/susceptibility genes in NPC[J]. *Curr Genomics*, 2009, 10(4): 216-222.
- Liu M, Peng Y, Wang X, et al. NGX6 gene mediated by promoter methylation as a potential molecular marker in colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 160.
- Elverici E, Barça AN, Aktaş H, et al. Nonpalpable BI-RADS 4 breast lesions: sonographic findings and pathology correlation[J]. *Diagn Interv Radiol*, 2015, 21(3): 189-194.
- Kim EK, Ko KH, Oh KK, et al. Clinical application of the BI-RADS final assessment to breast sonography in conjunction with mammography[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2008, 190(5): 1209-1215.
- Adler DD, Carson PL, Rubin JM, et al. Doppler ultrasound color flow imaging in the study of breast cancer: preliminary findings[J]. *Ultrasound Med Biol*, 1990, 16(6): 553-559.
- Yang WT, Tse GM, Lam PK, et al. Correlation between color power Doppler sonographic measurement of breast tumor vasculature and immunohistochemical analysis of microvessel density for the quantitation of angiogenesis[J]. *J Ultrasound Med*, 2002, 21(11): 1227-1235.
- Kaur RP, Vasudeva K, Kumar R, et al. Role of p53 gene in breast cancer: focus on mutation spectrum and therapeutic strategies[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(30): 3566-3575.
- Romagnolo AP, Romagnolo DF, Selmin OI. BRCA1 as target for breast cancer prevention and therapy[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2015, 15(1): 4-14.
- Rossing M, Sørensen CS, Ejlersen B, et al. Whole genome sequencing of breast cancer[J]. *APMIS*, 2019, 127(5): 303-315.
- Xiao J, Zhou Y, Zhu W. Association of ultrasonographic features with NGX6 expression and prognosis in invasive ductal breast carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6458-6465.
- 张蕾, 薛永飞, 张敬伟, 等. NGX6与IL-17F在大肠癌及大肠腺瘤中的表达及其与VEGF的相关性分析[J]. *癌症进展*, 2018, 16(6): 754-756, 786.
- ZHANG Lei, XUE Yongfei, ZHANG Jingwei, et al. The expression of NGX6 and IL-17F in colorectal cancer and colorectal adenomas and their correlation with VEGF[J]. *Oncology Progress*, 2018, 16(6): 754-756, 786.
- Zhang L, Yang N, Park JW, et al. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12): 3403-3412.
- 连平, 郭勤, 彭娅, 等. 抑癌基因NGX6对结肠癌血管形成的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(25): 2577-2584.

- LIAN Ping, GUO Qin, PENG Ya, et al. Nasopharyngeal carcinoma-associated gene 6 inhibits tumor angiogenesis in colon cancer[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(25): 2577-2584.
21. Spak DA, Plaxco JS, Santiago L, et al. BI-RADS® fifth edition: a summary of changes[J]. Diagn Interv Imaging, 2017, 98(3): 179-190.
22. He P, Cui LG, Chen W, et al. Subcategorization of ultrasonographic BI-RADS category 4: assessment of diagnostic accuracy in diagnosing breast lesions and influence of clinical factors on positive predictive value[J]. Ultrasound Med Biol, 2019, 45(5): 1253-1258.
23. Yao MM, Joe BN, Sickles EA, et al. BI-RADS category 5 assessments at diagnostic breast imaging: outcomes analysis based on lesion descriptors[J]. Acad Radiol, 2019, 26(8): 1048-1052.

本文引用: 刘梦涵, 肖际东. 乳腺癌中NGX6表达与BI-RADS超声特征及淋巴结转移的关系[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(10): 2427-2433. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.10.014

Cite this article as: LIU Menghan, XIAO Jidong. Relationship of NGX6 expression with BI-RADS ultrasonographic features and lymph node metastasis in breast cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2022, 42(10): 2427-2433. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.10.014