

不同分子亚型乳腺癌组织中 TRAIL 蛋白表达及意义

陈欣欣¹, 罗海华², 张 辉^{2*}, 李晓曦^{1*}

(中山大学 1.附属第一医院乳腺外科;2. 人类病毒学研究所,广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨不同分子亚型乳腺癌组织中 TRAIL 蛋白(肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体, TRAIL)的表达差异及 TRAIL 与乳腺癌各临床病理因素之间的关系。【方法】采用 streptavidin-peroxidase (SP)法检测 110 例乳腺癌及 12 例乳腺良性病变组织中 TRAIL 蛋白的表达水平,分析不同分子亚型乳腺癌组织中 TRAIL 蛋白表达差异,以及 TRAIL 表达与乳腺癌临床分期、淋巴结转移以及 Ki-67 表达等临床因素的关系。【结果】与其他分子亚型相比较,TRAIL 蛋白在 Luminal B HER-2+ 型乳腺癌组织中的表达水平明显下调 ($P = 0.035$), 在 Ki-67 高表达的乳腺癌组织中也发现了 TRAIL 表达水平下调 ($P = 0.045$), 并且 TRAIL 在乳腺癌组织中的表达水平还受到肿瘤大小、淋巴结状态和 TNM 分期等因素影响 ($P = 0.004, P = 0.006, P = 0.001$), 而不受乳腺癌的病理类型、癌细胞分级、肿瘤有无坏死和神经浸润及患者年龄等因素的影响。【结论】TRAIL 蛋白在不同分子亚型乳腺癌组织中的表达有显著差异,并且其与乳腺癌的临床分期、肿瘤大小、淋巴结有无转移等临床特征密切相关,可能有助于判断乳腺癌的预后。

关键词:乳腺癌;TRAIL;分子亚型;临床分期;预后指标

中图分类号: R737.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2015)01-0065-06

Expression of TRAIL in Different Molecular Subtypes of Breast Cancer and Its Clinical Significance

CHEN Xin-xin¹, LUO Hai-hua², ZHANG Hui^{2*}, LI Xiao-xi^{1*}

(1.Department of Breast Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2.Institute of Human Virology, Key Laboratory of Tropical Disease Control of Ministry of Education, Zhongshan School of Medicine)

Corresponding author: LI Xiao-xi, E-mail: lixiaox2@163.com, ZHANG Hui, E-mail: zhangh92@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in breast cancer tissues of different subtypes and the correlation between TRAIL expression and clinicopathological features of breast cancer. 【Methods】 The expression of TRAIL was detected by streptavidin-peroxidase (SP) in 110 cases of breast cancer and 12 cases of benign breast disorders. TRAIL expression in different molecular subtypes and the relationship between TRAIL expression and clinical staging, lymph node metastasis and Ki-67 expression of breast cancer was studied. 【Results】 The expression of TRAIL was significantly decreased in Luminal B HER-2 positive breast cancer tissues compared to that in basal-like breast cancer tissues, HER-2 positive breast cancer tissues and luminal-A breast cancer tissues ($P = 0.035$). TRAIL expression was also significantly decreased in breast cancer with higher expression of Ki-67 ($P = 0.045$). The expression of TRAIL in breast cancer was affected by tumor size, lymph node metastasis, clinical stages ($P = 0.004, P = 0.006, P = 0.001$), but not by clinicopathological features like pathologic types, cancer cell differentiation, necrosis and age of the patient. 【Conclusions】 The expression of TRAIL shows significant difference among different molecular subtypes of breast cancer. It is also correlated with clinical stages, tumor size, lymph node metastasis, which indicates that TRAIL may be a prognostic biological marker in breast cancer.

Key words: breast cancer; molecular subtype of breast cancer; TRAIL; clinical stages; prognostic biological marker

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(1):65-70]

收稿日期:2014-10-28

基金项目:国家科技重大专项课题(2013ZX10001004)

作者简介:陈欣欣,博士生,医师,研究方向:乳腺癌, E-mail: janeche@163.com, * 通信作者:李晓曦,博士,教授,研究方向:乳腺疾病, E-mail: lixiaox2@163.com;张辉,教授, E-mail: zhangh92@mail.sysu.edu.cn

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 严重危害女性的生命。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), 又称凋亡素 2 配体 (APO2L), 隶属于肿瘤坏死因子超家族, 属于 II 型跨膜蛋白, 以三聚体的形式存在^[1], 因其具有特异性地诱导肿瘤细胞发生凋亡, 而不影响正常细胞的特点^[2], 使其成为肿瘤治疗中研究热点^[3]。TRAIL 主要在淋巴细胞表达, 具有维持 T 细胞稳态、自然免疫及肿瘤监视等多种功能。病毒感染宿主后, 可诱导死亡受体 (Death Receptor DR4、DR5) 在细胞表面表达, DR4、DR5 与 TRAIL 结合后激活自然免疫反应导致受感染细胞的凋亡; 与之相似, 肺、胰腺、结肠等器官的致瘤性转化也能够上调细胞表面 DR4、DR5 及 TRAIL 的表达; 在动物模型中, TRAIL 对结肠癌^[4]、神经胶质瘤^[5]、肺癌^[6]、前列腺癌^[7]、多发性骨髓瘤^[8] 都表现出抗肿瘤的作用, 这一作用与化疗药物^[6] 和放疗^[9] 有协同作用, 并且在宫颈癌^[10] 和结肠癌组织中^[11] TRAIL 在肿瘤细胞上的表达情况还与预后相关。本研究通过免疫组化的方法检测了 TRAIL 蛋白在浸润性乳腺癌组织中的表达情况, 主要观察 TRAIL 不同的分子亚型乳腺癌之间的表达差异情况, 并探讨其作为不同分子亚型预后指标的可能。

1 材料与方 法

1.1 病例资料

随机选取中山一院乳腺外科组织库原发性女性乳腺癌患者 110 例, 病理诊断明确, 年龄为 26~89 岁, 平均 48.8 岁。已征得患者同意使用其石蜡组织标本。

1.2 试 剂

一抗 TRAIL 抗体购自 Abcam 公司, 兔抗人, 此抗体和人的 TRAIL 蛋白有特异性的免疫反应。二抗 DAKO ChemMate EnVision 检测系统 K500711 检测试剂盒, 购自安捷伦科技公司。溶液: PBS 缓冲液 (pH 7.4); EDTA 抗原修复液 (pH 8.0); 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 由 Novocastra 公司提供, 按其说明书配制使用。

1.3 实验方法

采用 SP 法, 检测 TRAIL 的表达。设阳性对照 (为已知阳性的扁桃体切片, 公司推荐)、阴性对照 (已知阴性的正常乳腺组织)。

1.4 结果判读

由两位观察者在双盲状态下独立完成阅片。两位观察者对不同评判结果的样品 (有分歧的样本为总样本的 1%) 重新进行评估, 直至得到两位观察者意见一致的结果。对全片多个区域均染色强度较低的病例, 随机选取 5 个视野进行评分, 对全片染色强度较高病例, 随机选取一个视野进行评分。要求显微下每个 20 倍视野至少有 200 个可用于评价的细胞, 在 400× 视野下对所观察的每个目的细胞进行染色强度评分: 阴性=0 分 (未着色), 弱阳性=1 分 (浅黄色), 阳性=2 分 (黄色), 强阳性=3 分 (黄褐色)。然后, 计算每张切片的乳腺癌阳性细胞百分数 $[(\geq 1 \text{ 分的细胞数量} / \text{观察细胞总数}) \times 100]$ 。最后按文献报道的方法计算每张切片的 HSCORE 分值^[12]。HSCORE = $\sum (I \times PC)$, 其中 I 和 PC 分别代表阳性强度 (0, 1, 2, 3 分) 和该阳性强度的细胞百分数 (0 ~ 100%)。每张切片的 HSCORE 分最高为 300 分, 最低为 0 分。

1.5 统计学方法

采用 R 软件进行统计学处理, 两组间阳性细胞百分数比较、HSCORE 评分比较用 Wilcoxon 秩和检验, 对于 2 组以上用 Kruskal Wallis 秩和检验, 多组间两两比较采用 Holm 法校正 P 值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TRAIL 在乳腺癌组织中的表达

TRAIL 在乳腺癌组织中的表达的代表性染色见图 1。

2.2 不同分子亚型乳腺癌组织中 TRAIL 的表达

不同分子亚型的乳腺癌组织中 TRAIL 的表达水平有显著差异 ($P < 0.05$, 表 1)。其中, Luminal B HER-2+ 组 TRAIL 表达水平较低, 而 Luminal A 型的乳腺癌组织中 TRAIL 的表达水平较高。

2.3 Ki-67 在乳腺癌组织中的表达对 TRAIL 表达水平的影响

在 Ki-67 低表达 ($\leq 15\%$) 的乳腺癌组织中, TRAIL 的表达水平显著低于其在 Ki-67 高表达 ($\text{Ki-67} > 15\%$) 的乳腺癌组织, $P < 0.05$ 。

2.4 不同临床分期及不同肿瘤大小的乳腺癌组织中 TRAIL 的表达情况

不同临床分期 (0、I、II A、II B、III A、III B 期)

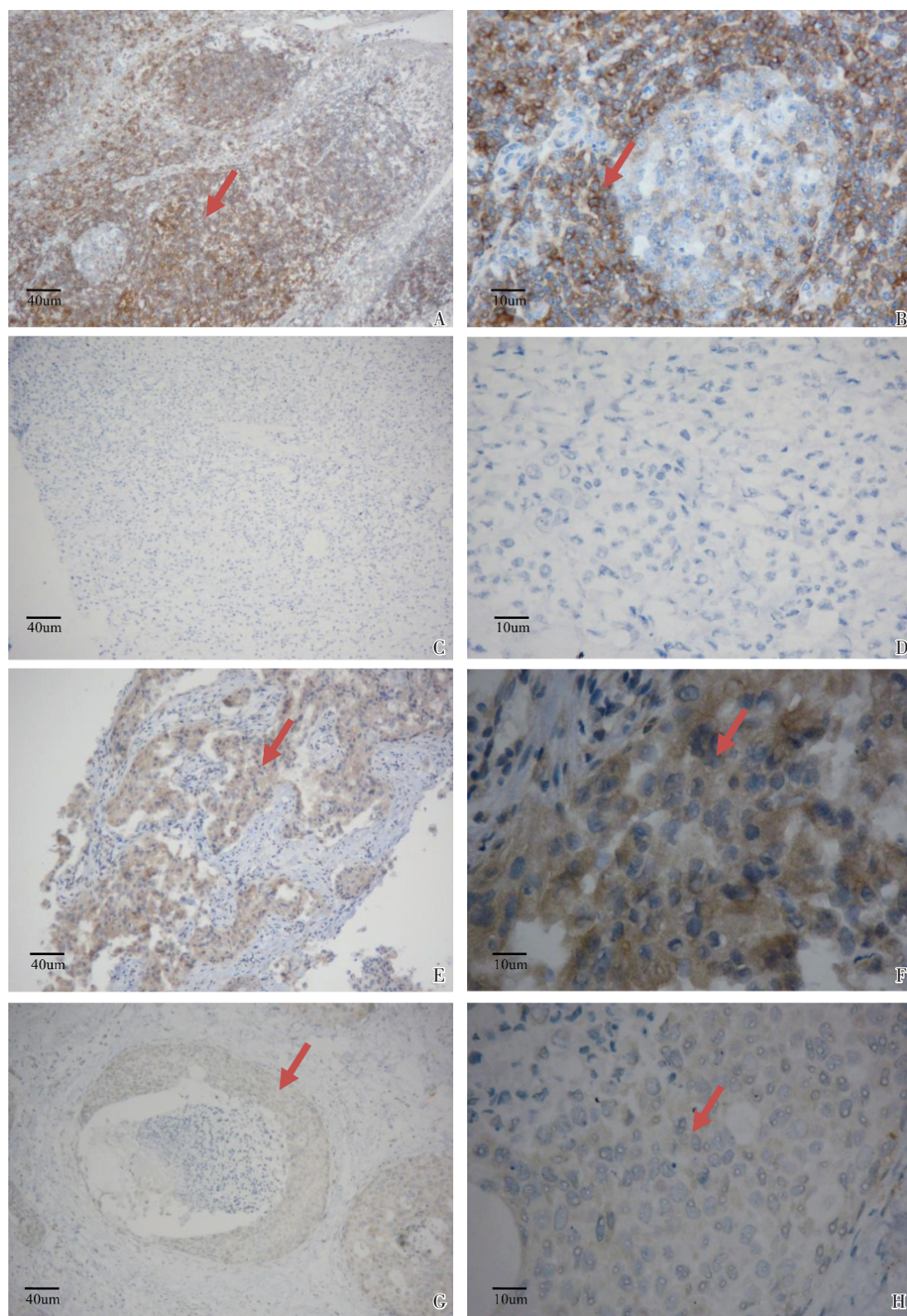


图 1 TRAIL 在乳腺癌组织中有代表性的染色情况

Fig.1 Representative immunohistochemical staining of TRAIL in breast cancer tissue. Staining was highlighted by arrow

A&B was tonsil tissue which was recommended by the manufacturers as a positive control; C&D was breast cancer tissue without TRAIL expression as a negative control; E&F shows strong positive staining of breast cancer cells; G&H shows weak positive staining of breast cancer cells. A. positive control 10 ×; B positive control 40 ×; C. negative control 10 ×; D. negative control 40 ×; E. strong positive 10 ×; F. strong positive 40 ×; G. weak positive 10 ×; H. weak positive 40 ×.

表 1 不同分子亚型乳腺癌组织中 TRAIL 的表达情况
Table 1 The expression of TRAIL in different subtypes of breast cancer tissues

Subtype of breast cancer	<i>N</i>	Median & quartile ¹⁾
Luminal A	26	60(30, 140)
Luminal B HER-2-	19	100(70, 125)
Luminal B HER-2+	17	30(0, 90)
HER-2+	21	100(60, 140)
Basal-like	27	80(30, 110)
<i>P</i> value		0.035

1)the median& quartile of HSCORE score (relative value) of TRAIL expression. The following is the same.

表 2 TRAIL 在低 Ki-67 表达水平 ≤15% 的乳腺癌组织中表达情况

Table 2 The expression of TRAIL in breast cancer tissue with different Ki-67 expression

Ki-67 expression	<i>N</i>	Median & quartile ¹⁾
≤15%	23	50(5, 120)
>15%	87	100(60, 140)
<i>P</i> value		0.045

1)the median& quartile of HSCORE score (relative value) of TRAIL expression. The following is the same.

的乳腺癌组织中的 TRAIL 的表达水平表现出显著差异, $P < 0.05$ (表 3), 但因 III C 期和 IV 期的乳腺癌样本量较少, 未能进行统计。对不同分期组别进行两两比较, 发现 TRAIL 的表达在 0、I、II A、II B 这几组中并无差异, 在 0、I、II A 与 III A、III B 期有显著差异, 而 II B、III A、III B 3 组间, TRAIL 的表达也没有差异, 因此, 不同临床分期组之间 TRAIL 表达的差异主要是由 0、I、II A 与 III A、III B 引起的 (表 4)。此外, 不同大小的肿瘤组织中 TRAIL 表达水平有差异, $P < 0.05$, 本研究对这一结果进行 *P* 值校正, 发现 TRAIL 的表达在 T1 和 T2 的肿瘤组织中没有差异, 在 T3 和 T4 的肿瘤组织中没有差异, 而 T1、T2 与 T3、T4 肿瘤组织中 TRAIL 的表达是有显著差异的, $P < 0.001$ (表 5)。

2.5 淋巴结状态对 TRAIL 表达的影响

有淋巴结转移的患者的乳腺癌组织中的 TRAIL 表达水平显著低于无淋巴结转移的患者, $P = 0.006$ (表 6)。

2.6 其他临床因素对 TRAIL 表达的影响

不同分化程度的癌细胞组织中 TRAIL 的表达

表 3 不同临床分期乳腺癌组织中 TRAIL 的表达情况
Table 3 The expression of TRAIL in breast cancer tissues with different clinical stages

Clinical stage	<i>N</i>	Median & quartile ¹⁾
0	9	100(60, 180)
I	35	90(35, 140)
II A	35	100(60, 140)
II B	6	80(50, 110)
III A	14	5(0, 80)
III B	8	35(10, 45)
III C ²⁾	1	
IV ³⁾	2	
<i>P</i> value		0.001

1)the median& quartile of HSCORE score (relative value) of TRAIL expression. The following is the same; 2) and 3) the number of patients in stage III C ($n = 1$) and stage IV ($n = 2$) was not enough for analysis.

表 4 对不同临床分期乳腺癌组织中 TRAIL 的表达情况进行两两比较

Table 4 The expression of TRAIL in breast cancer tissues with different clinical stages was analyzed between groups

	0	I	II A	II B	III A
I	1	NA	NA	NA	NA
II A	1	1	NA	NA	NA
II B	1	1	1	NA	NA
III A	0.038703	0.038082	0.003639	0.358384	NA
III B	0.040217	0.115835	0.013209	0.336357	1

Number in the table was *P* value of analysis between groups.

表 5 肿瘤大小对 TRAIL 表达的影响

Table 5 The relationship between TRAIL expression and tumor size and the expression of TRAIL between T1+T2 and T3+ T4 breast cancer tissues

Tumor size	<i>N</i>	Median & quartile ¹⁾
T1	37	90(40, 140)
T2	47	100(55, 140)
T3	16	50(0, 70)
T4	10	40(20, 100)
<i>P</i> value		0.004
T1+T2	84	100(45, 140)
T3+T4	26	40(0, 60)
<i>P</i> value		0.000

1)the median& quartile of HSCORE score (relative value) of TRAIL expression. The following is the same.

水平无明显差异, $P = 0.759$ 。癌组织有无坏死或神

经浸润并不影响癌组织中 TRAIL 的表达, $P = 0.367$ 。本研究未能发现乳腺良性病与乳腺癌中 TRAIL 的表达差异, $P = 0.086$ 。50 岁以上的患者与 50 岁以下(含 50 岁)乳腺癌组织中 TRAIL 的表达没有差异 $P = 0.410$ (表 7)。

表 6 淋巴结转移对 TRAIL 表达情况的影响

Table 6 The relationship between TRAIL expression and lymph node metastasis

Lymph node metastasis	N	Median & quartile ¹⁾
positive	25	40(0, 100)
Negative	85	100(50, 140)
P value		0.006

1) the median & quartile of HSCORE score (relative value) of TRAIL expression. The following is the same.

表 7 其他临床特征(年龄、细胞分化程度、病理类型和肿瘤有否坏死和神经浸润)对 TRAIL 表达情况的影响

Table 7 The correlation between TRAIL expression level and other clinicopathological features (cell differentiation, pathologic type and necrosis)

		N	Median & quartile ¹⁾	P value
Age	≤50 year	70	75(30, 120)	$P = 0.420$
	>50 year	40	95(40, 140)	
Cell	0	9	95(65, 160)	$P = 0.759$
Differentiation Degree	1-	11	100(40, 140)	$P = 0.367$
	2	40	100(30, 140)	
	3	30	80(60, 110)	
Necrosis & Nerve infiltration	Positive	35	100(40, 140)	$P = 0.367$
	Negative	75	80(30, 130)	
Benign or Malignant	Malignant	110	80(30, 135)	$P = 0.086$
	Benign hyperplasia	6	120(110, 130)	
	Fibroadenoma	6	60(50, 70)	

1) the median & quartile of HSCORE score (relative value) of TRAIL expression. The following is the same.

3 讨 论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。尽管目前手术联合放化疗能够帮助很大一部分患者获得缓解并提高这些患者的生存率, 但乳腺癌仍然是威胁女性生命和影响女性生活质量的重要因素。因此, 寻找新的治疗手段和生物学预后指标依旧是乳腺癌研究的热点问题。

乳腺癌的分子亚型是随着分子生物学的快速

发展与生物检测技术的不断提高, 以分子免疫、病理组织形态、生物学行为、基因表达差异为基础将乳腺癌分为 Luminal A 型, Luminal B HER-2 -型, Luminal B HER-2 +型, HER-2 过表达型以及 Basal-like 型的新的分类方法^[13]。该方法为我们明确乳腺癌的异质性、分期的合理性、预后判断的准确性及治疗方案的个体化等信息提供了重要的依据在这 5 型乳腺癌中。Luminal B 型乳腺癌对化疗的敏感性不如 Basal-like 型, 对内分泌治疗的反应不如 Luminal A 型, 大多数 luminal B 型乳腺癌被认为具有高 OncotypeDX 复发分数(RS)^[14]。有研究表明, luminal B Her-2 +肿瘤比 HER2 过表达型和三阴(basal-like)乳腺癌具有更低的 pCR 率^[15-16], 故而, Luminal B HER-2 +型的乳腺癌预后较差。本研究发现了 TRAIL 在 Luminal B HER-2 +型的乳腺癌组织中的表达较其他类型显著下降, 这与前人的报道认为 TRAIL 的高表达与患者的预后较好相符合^[12-13]。本研究对这 5 组间 TRAIL 的表达进行了 P 值校正, 认为这个差异主要存在于 Luminal B HER-2 +型, Luminal B HER-2 -型和 HER-2 过表达型之间, TRAIL 在 Luminal B HER-2 +乳腺癌组织中与预后较好的 Luminal A 型乳腺癌组织中的表达差异并不明显。本研究发现, TRAIL 在 Luminal A 型癌组织中的表达水平仅次于 Luminal B HER-2 +型, 而 Luminal A 型对化疗的反应较其他类型差, 这与之前所报道的低表达 TRAIL 的肿瘤细胞对化疗药易发生耐受, 上调 TRAIL 的表达能够增加肿瘤细胞对化疗药的耐受^[17]完全一致。

Ki-67 是一种增殖细胞相关的核抗原, 其功能与有丝分裂密切相关^[18], 在细胞增殖中是不可缺少的, 但其确切机制尚不清楚。Ki-67 作为标记细胞增殖状态的抗原, 其阳性说明癌细胞增殖活跃, 在乳腺癌中, Ki-67 高表达意味着预后不良。本研究也发现了在 Ki-67 高表达的乳腺癌组织中, TRAIL 的表达水平显著下调, 说明在增殖活跃的乳腺癌细胞中 TRAIL 的表达明显下调。

乳腺癌的临床分期是影响乳腺癌预后及治疗的重要因素, 晚期乳腺癌容易出现复发转移, 患者生存期明显下降。本研究中, 不同临床分期的患者, 其癌组织中 TRAIL 的表达有显著差异, 其中 I、II 期的患者的 TRAIL 的表达水平明显高于 III 期的患者, 肿块较小 (T1、T2) 的癌组织中 TRAIL 的表达也高于肿块较大的患者 (T3、T4),

有淋巴结转移的乳腺癌其 TRAIL 的表达也下调,说明 TRAIL 在预后较好的乳腺癌中高表达,这与 N.Reesink 等在宫颈癌中的研究相一致^[19],提示 TRAIL 可能是乳腺癌预后的生物学指标之一。然而,本研究尚未发现乳腺癌和乳腺纤维囊性乳腺病及乳腺纤维瘤组织中 TRAIL 的表达水平有差异,也未能发现不同病理类型的乳腺癌组织中 TRAIL 的表达有差异,这可能是由于本研究纳入的纤维囊性乳腺病例数太少,以及一些特殊类型的乳腺癌例数较少所导致的。

综上所述,TRAIL 的表达与乳腺癌的分子亚型, Ki-67 的状态,临床分期,肿瘤大小,淋巴结转移情况及预后存在密切的相关性,有可能成为乳腺癌预后的预测指标之一。

参考文献

- [1] Mongkolsapaya JG. Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation[J]. *Nature Structural Biology*, 1999, 6(11): 1048-1053.
- [2] Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2005, 5(11): 876-885.
- [3] Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, et al. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis[J]. *Cell*, 2009, 138(2): 377-388.
- [4] Naka TS. Agents on patients' colon tumors grown in scid mice ligand alone and in combination with chemotherapeutic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(20): 5800-5806.
- [5] Ian F, Pollack ME. Ligand Leads to selective killing of glioma cells apo2l/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing direct stimulation of apoptotic signaling by soluble [J]. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7(5): 1362-1369.
- [6] Jin HY. Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(14): 4900-4905.
- [7] Subrata RA. Factor-related apoptosis-inducing ligand and CPT-11 by combined treatment with apo2 ligand/tumor necrosis apoptosis induction in prostate cancer cells and xenografts[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15): 4713-4723.
- [8] Mitsiades CS. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications[J]. *Blood*, 2001, 98(3): 795-804.
- [9] Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, et al. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(4): 1754-1759.
- [10] Maduro JH, Noordhuis MG, Ten Hoor KA, et al. The prognostic value of trail and its death receptors in cervical cancer [J]. *Int J Radiation Oncology Biology Physics*, 2009, 75(1): 203-211.
- [11] Koomstra JJ, Kleibeuker JH, van Geelen CM, et al. Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas[J]. *J Pathology*, 2003, 200(3): 327-335.
- [12] Savitski MM, Mathieson T, Becher I, et al. H-score, a mass accuracy driven rescoring approach for improved peptide identification in modification rich samples[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(11): 5511-5516.
- [13] Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7(1): 96-98.
- [14] Tran BB. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets [J]. *Breast cancer research: BCR*, 2011, 13(6): 221-225.
- [15] Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ, et al. Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy[J]. *Cancer*, 2010, 116(6): 1431-1439.
- [16] Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16): 5678-5685.
- [17] Allen JE, Krigsfeld G, Mayes PA, et al. Dual Inactivation of Akt and ERK by TIC10 signals foxo3a nuclear translocation, trail gene induction, and potent antitumor effects [J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(171): 117r-171r.
- [18] Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential [J]. *The Lancet Oncology*, 2010, 11(2): 174-183.
- [19] Reesink-Peters N, Hougardy BM, van den Heuvel FA, et al. Death receptors and ligands in cervical carcinogenesis: an immunohistochemical study [J]. *Gynecologic Oncology*, 2005, 96(3): 705-713.