

HPV阴性宫颈癌的瑞典人群队列研究

Malin Kaliff, M.Sc., Mats G. Karlsson, M.D., Ph.D., Bengt Sorbe, M.D., Ph.D.,
Louise Bohr Mordhorst, M.D., Ph.D., Gisela Helenius, Ph.D., and Gabriella Lillsunde-Larsson, Ph.D.

摘要： 尽管人们普遍认为人乳头状瘤病毒 (HPV) 是宫颈癌 (CC) 发生的必要条件，但仍有相当数量的宫颈癌患者 HPV 检测呈阴性。目前，许多国家通过 HPV 检测初筛宫颈癌，因此提高对 HPV 阴性宫颈癌人群的认识具有重要意义。本研究的目的是对 HPV 初筛阴性或无效结果的宫颈肿瘤进行重新评估。在重复基因分型 (L1 靶点) 的评估之后，对现有的或额外的肿瘤样本采用另一种方法 (E6/E7 靶点) 进行分析。对仍然阴性的肿瘤进行组织学评估，排除肿瘤细胞成分少或缺乏、检测结果持续无效或怀疑非宫颈原发的病例。对 HPV 阴性者进行免疫组化染色 (CK5、广谱 CK、p63、p16 和 p53)。重新评估后 HPV 阴性病例的比例可以减少一半 (14%-7%)。这些重新归类为阳性的样本常常是通过增加后期聚合酶链反应 (PCR) 循环数，选择不同的 (E6/E7) 或相同的 (L1) 靶点，或缩短扩增子长度的方法进行检测获得的。明确的 HPV 阴性与患者预后较差、发病年龄较高、样本保存时间较长以及腺癌组织学类型显著相关。部分 HPV 阴性病例呈弥漫强阳性 p16 免疫反应，提示这部分病例是假阴性。在本队列中研究的 HPV 假阴性主要与分析宫

颈癌样本方法学的局限性有关。即使存在很小比例的 HPV 真阴性的腺癌病例，也不足以成为修改 HPV 检测作为宫颈癌初筛的理由。

关键词： 子宫颈肿瘤；乳头瘤科；人乳头状瘤病毒 DNA 检测；福尔马林固定石蜡包埋组织；假阴性反应

(*IJGP* 2020 May; 39(3): 279–288)

子 宫颈癌 (CC) 是由于人乳头瘤病毒 (HPV) 持续性感染所导致。尽管一般认为 HPV 是 CC 发展中所必需的^[1]，但在许多研究中，相当一部分宫颈癌 HPV 检测呈阴性。

HPV 阴性的病例通常被解释为实验样本欠佳和检测方法局限。早在 1999 年，Walboomers 和他的同事在一项包括组织学类型的世界范围宫颈癌队列研究（主要是鳞状细胞癌，>90%）显示，增加检测分析方法和排除组织学样本不充足后，HPV 阴性率从 7% 下降到 0.3%^[1]。

在一个大型国际性浸润性宫颈癌队列研究中，有 15% 的肿瘤用常规方法检测为 HPV 阴性。HPV 阴性率在不同的组织学类型中有所区别，其中腺癌 (ACs) HPV 阳性率通常比鳞状细胞癌 (SCCs) 的低^[2]。腺鳞癌和普通型腺癌比其他不常见的组织学亚型（如透明细胞癌、浆液性癌和子宫内膜样癌）的 HPV 阳性率更高^[3]。

尽管事实上 HPV 阴性的检测结果通常可以用技术缺陷来解释，与 HPV 阳性的宫颈癌相比，HPV 阴性者仍然具有独特临床病理学表现，且预后较差^[4,5]。

在许多国家，包括瑞典，年轻女性通过计划免疫接种 HPV 疫苗，联合国家宫颈癌筛查项目，进行宫颈癌的预防。有几项研究^[6]显示，联合应用 HPV 检测与细胞学筛查作为初筛比单独应用细胞学筛查对宫颈癌及其癌前病变有更好的预防作用。以 HPV 检测为基础的筛查已得到大家的共识，并且在瑞典的许多地区以及国际上开始实施。

From the Departments of Laboratory Medicine (M.K., M.G.K., G.H., G.L.-L.); Oncology (B.S., L.B.M.), Faculty of Medicine and Health, Örebro University; and School of Health Sciences, Örebro University (G.L.-L.), Örebro, Sweden.
Supported by Örebro country council research committee in Sweden.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

The authors declare no conflict of interest.

Address correspondence to Malin Kaliff, MSc, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine and Health, Örebro University, Örebro SE-701 82, Sweden. E-mail: malin.kaliff@regionorebrolan.se.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

关于优先 HPV 筛查的修订将是对宫颈癌预防的一个重要改进。然而，这可能会导致 HPV 阴性宫颈癌病例的漏诊。鉴于此，我们需要更多地了解真正的 HPV 阴性病例，及其与不同组织学类型的关系。为了进一步提高对宫颈癌的预防，还需要对产生假阴性检测结果的原因进行全面的分析。此外，宫颈癌的整体发病率以及与鳞癌的相对比例都在增加^[7,8]，因此对于研究 HPV 阴性宫颈癌所占比例也是十分重要的。

最近发表的 209 例宫颈癌病例系列研究的结果表明 HPV 阴性率为 7%，这是基于 3 种不同的方法进行基因分型，并由病理学家重新评估肿瘤样本后得出的结论^[9]。本文采用了同样的研究方法，以讨论 HPV 阴性肿瘤的一些特征。

材料和方法

在最初分析的 209 例肿瘤中，37 例样本检测为 HPV 阴性或无效，也包含在重新研究组中。所有女性均于 1992 年至 2014 年间在瑞典厄勒布鲁大学医院肿瘤科确诊宫颈癌并接受放射治疗（外照射治疗和近距离放疗）。样本来自厄勒布鲁大学医院、乌普萨拉大学医院以及位于埃斯基尔斯图纳、法伦、耶夫勒和卡尔斯塔德市的中心医院。肿瘤的分期是采用国际妇产科联盟提出的分期系统（FIGO，蒙特利尔 1994），临床患者数据来自厄勒布鲁大学医院肿瘤科。病人的肿瘤样本是活组织检查或外科手术切除、福尔马林固定石蜡包埋存档标本。DNA 提取及实时定量 PCR 实验方法均参考最近发表的文献^[9]。

重新评估的过程

在重新评估的过程中（图1），先前用 Anyplex II HPV28（Seegene）进行基因分型后 HPV 阴性或无效的 CC（n=37）被包括在内。Anyplex 采用实时定量 PCR 方法针对 28 个基因型（HPV6、11、16、18、26、31、33、35、39、40、42、43、44、45、51、52、53、54、56、58、59、61、66、68、69、70、73 和 82）用 L1 基因和人类 *HBB* 基因杂交。扩增长度在 100 到 200bp 之间。30、40 和 50 个周期后的融解曲线半定量分析给出阳性结果，但基因扩增不足（超过 40 个周期）会导致无效的检测结果。

在步骤 1 中，所有 37 例样本用相同的方法、同样的 DNA 提取产物。结果仍为阴性或无效的进入步骤 2。在这一步中，使用了另一种方法，即针对 12 种高风险和 2 种低风险基因型（HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、6 和 11）的病毒癌基因 E6 或 E7 以及人类基因 *ACTB* 的内

部实时定量 PCR 方案。扩增子长度在 84-134bp 之间，PCR 曲线在 35 个周期时使用阈值进行手动评估，以获得阳性结果。

对于应用实时定量 PCR 检测 HPV 持续阴性且有备用的组织学蜡块的患者，将用同样的方法进行再次检测（步骤3，L1x2以及E6/E7）。无备用组织块或在分析备用肿瘤组织时结果仍为阴性的患者样本由病理学家进行评估（步骤4）。在第 2 步 E6/E7 基因分型后重复无效的检测结果将导致该病例被排除。

最后，在第 4 步骤中，剩下的 HPV 阴性样本由病理学家进行评估。最终评估后，肿瘤数量和质量不足或怀疑非宫颈原发的样本将被剔除。

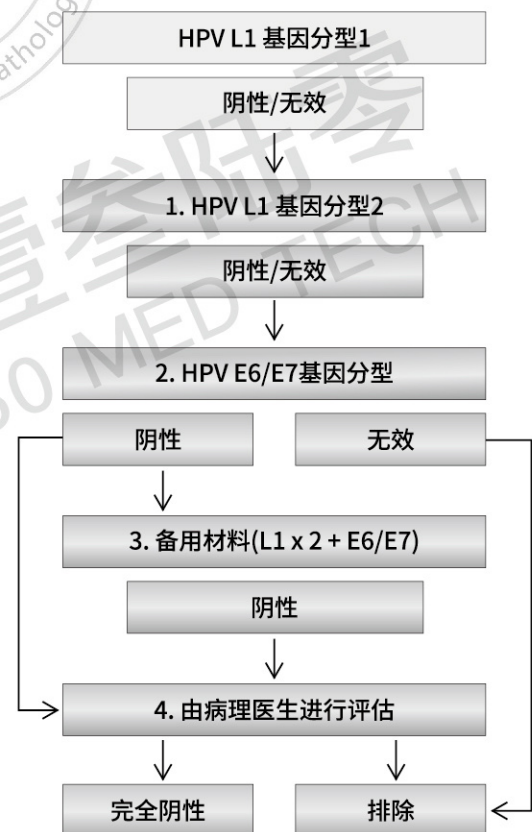


图1. 重新分析流程图。

第1步，使用相同的方法重新分析先前测试为阴性或无效的样本（AnyplexTM II HPV28，靶点L1）。

第2步，改变靶点（Real-time PCR，靶点E6/E7）。

第3步，持续人乳头状瘤病毒（HPV）阴性的样本，改用备用的肿瘤组织块，使用与上述相同的方法（L1×2+E6/E7）分析。

第4步，HPV仍然为阴性的病例由病理医师进行评估。

检测结果始终无效、样本中肿瘤组织缺乏、可疑非宫颈原发的样本将被排除。

免疫组织化学与组织学评价

复阅符合条件的所有病例的嗜伊红染色切片，根据 WHO 最新分类^[10]标准进行重新分类，包括明确腺癌的亚型。随后，对 HPV 阴性的病例进行免疫组化染色（免疫标记物包括 CK5、广谱 CK、P63、P16 和 P53），其目的（A）通过 CK5 和 P63 证实鳞状细胞分化；（B）描述 P16 和 P53 的免疫表型。

简单而言，将4μm厚、福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片，放置于 Omnis（Agilent技术公司，CA）或 Benchmark ULTRA（Ventana医疗系统公司，AZ）自动免疫组化染色系统，依据操作指南，完成免疫组化染色（见表1）。

排除标准

组织学评估时，肿瘤若出现以下 3 种原因将予以排除出组：（A）基于切片的形态学检查发现，蜡块中可用于分子检测的肿瘤成分（质量和/或数量）不足；（B）回顾临床资料发现，先前存在的非宫颈恶性肿瘤可能为原发肿瘤，或全子宫切除术后 10 年；（C）持续无效的检测结果。

总L1，MGP5+/6+引物检测HPV病毒

应用 L1，MGP5+/6+ 引物系统^[11]对样本（n=30，不包括 7 例已被排除的样本）进行最终分析。其目的是为了进一步分析在重新研究过程中出现不一致结果的可能原因，并应用常规方法检查阴性样本。分析了 25μL 复制样本，同时应用 MGP 和人类控制基因 *HBB* 作为阴性和阳性对照。样本反应体系包

括 1 份 Quantitect SYBR green master mix (德国, QIAGEN), 0.3μM *HBB* 的正向和反向引物，或 0.3μM *MGP* 正向和反向引物混合物以及 50ng DNA，手动加样于 96 孔板上。随后在 7500 快速 Real-time PCR 系统（荷兰, Applied Biosystems）中，按照如下标准程序对仪器进行设置并进行检测：95°C 变性 10 分钟，然后 95°C 处理 0.5 分钟进行 5 个循环，42°C 处理 0.5 分钟，72°C 处理 0.75 分钟，95°C 处理 0.5 分钟进行 45 个循环，64°C 处理 0.5 分钟，72°C 处理 0.75 分钟，72°C 处理 10 分钟。之后将得到的实验数据通过 7500 快速系统 SDS 软件（Applied Biosystems）进行分析，并根据 35 个周期的阳性结果作为阈值，人工绘制评估曲线。每次检测分析均设立阳性和阴性对照。

伦理批准

这项研究得到了瑞典乌普萨拉地区伦理委员会理事会的批准（D nr 2008/122）。

统计学分析

生存分析采用 Kaplan-Meier 法，生存比较采用对数秩和分析。比例比较采用 Pearson χ^2 检验，平均数比较采用独立 t 检验。采用 Cox 比例风险回归法对预后因素进行多因素分析。在所有的统计检验中， $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。统计分析使用 Statistica 软件（版本13，2015；StatSoft Inc., Tulsa, OK）。百分比已四舍五入到最接近的整数，由此导致总数可能不是 100%。

表1. 免疫组化方法概述

抗体	克隆号	生产商	工作液 (RTU)/稀释比例	系统	评定标准
P16	E6H4	Ventana	RTU	Ventana	阳性（胞核/胞浆强阳性）>25%；不确定和阴性 肿瘤细胞阳性 肿瘤细胞阳性 肿瘤细胞阳性 肿瘤细胞阳性，>30%
CK5	XM26	Leica	1:100	Omnis	
panCK	AE1/AE3	Agilent	RTU	Omnis	
P63	DAK-P63	Agilent	RTU	Omnis	
P53	DO-7	Agilent	RTU	Omnis	

对所有 HPV 阴性病例（n=14）进行免疫组化染色，其目的是为了证实鳞状分化和/或描述 P1 和 P53 的免疫表达类型。染色在相应制造商的自动染色系统上进行。
CK5：细胞角蛋白5；P63：蛋白63；panCK：广谱细胞角蛋白。

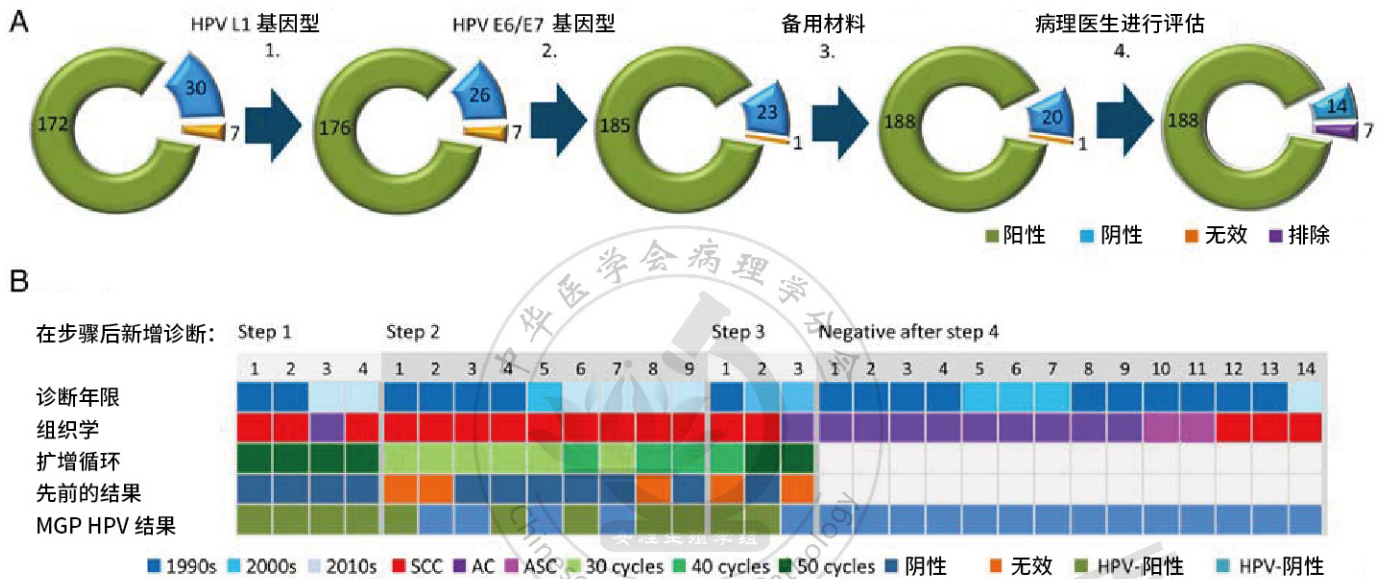


图2. 对37例人乳头状瘤病毒 (HPV) 先前检测阴性或无效的样本重新分析。

(A) 所有样本用相同的方法重新测试 (步骤1), 持续阴性的样本用另一种替代方法测试 (步骤2)。有备用肿瘤组织块的病例用两种方法进行分析, 即L1*2+E6/E7 (步骤3), 依旧阴性结果的病例由病理医生进行评估 (步骤4)。检测结果持续无效、肿瘤样本缺乏或怀疑非宫颈原发的病例将被排除。

(B) 按照重新分析的流程图, 依次完成第1步至第3步的分析后, 有16例样本检测为HPV阳性, 完成第4步之后, 14例样本仍为HPV阴性。彩色图表概述了样本保存时间 (诊断年限)、肿瘤组织学类型、重复分析时出现阳性结果的扩增循环数、重复分析前的结果以及使用MGP进行HPV分析的结果。

结果

患者和肿瘤特征

重新分析了209例确诊为宫颈癌并接受放射治疗的患者中先前 HPV 检测阴性或无效的样本, 合计 37 例。该项研究, 平均年龄 66 岁 (范围: 31-90岁)。肿瘤组织学类型构成: 鳞状细胞癌 (51%, 19/37), 腺癌 (43%, 16/37), 腺鳞癌 (5%, 2/37); 大部分肿瘤为 FIGO II 期 (51%, 19/37), 而后依次为 I 期 (27%, 10/37), III 期 (11%, 4/37), IV 期 (11%, 4/37)。

重新分析导致HPV阴性率从14%下降到7%

先前使用 Anyplex HPV28 进行的 HPV 基因分型结果显示, HPV 阴性率为 14% (30/209); 第一次检测中 7 例为无效样本。本研究重复基因型分析 (步骤1)、替代方法分析基因型 (步骤2)、检测备用样本 (步骤3), 经过此流程, HPV 阴性率下降到 10% (20/209) (图2A)。在结合免疫组化评估肿瘤样本后, 又有 6 例被排除: 4 例样本因肿瘤细

胞缺乏, 2 例样本因临床病史复杂, 其中 1 例尽管临床表现为宫颈/宫颈旁肿块, 但可疑子宫颈非原发部位而被排除。还有 1 例因 HPV 持续无效而被排除。因此最终排除的总体样本数为 7 例, 最终 HPV 阴性率为 7% (14/202)。

新增的 HPV 阳性样本为典型的鳞状细胞癌, 或于 PCR 循环后期阶段观察到或改变基因型分析方法后获得

依次完成重新分析流程中的步骤 1 至 3, 新增 16 例 HPV 阳性样本 (图2B)。改变检测病毒基因的靶点后新增 9 例阳性样本, 采用相同方法重复实验后新增 4 例阳性标本, 更换组织块、重新提取 DNA 后采用相同方法检测新增 3 例阳性标本。新增阳性样本为典型的鳞状细胞癌 (12/14)。采用相同方法重新分析时, 通常在 PCR 循环的后期阶段观察到阳性结果; 但当改变病毒检测的靶点后, 上述结论不适用。检测新增阳性样本的基因型分布如下: HPV16 (n=2)、HPV18 (n=3)、HPV33 (n=1)、HPV39 (n=1)、HPV45 (n=7)、HPV51 (n=1) 和 HPV18+33 (n=1)。

经过重新分析，有 14 例宫颈肿瘤样本的 HPV 检测结果依旧阴性。这些病例大多是自 20 世纪 90 年代以来留存的样本（10/14，71%），主要由腺癌组成，64%（9/14 腺癌、2/14 腺鳞癌和 3/14 鳞状细胞癌）。

使用总 L1，MGP5+/6+ 系统进行进一步分析，没有发现新增的 HPV 阳性样本

所有重新分析的病例，除了先前被排除的 7 例样本，均采用 MGP5+/6+ 引物系统进行分析，并没有新增的 HPV 阳性样本。然而，16 例新增阳性样本中有 11 例使用该方法检测为阳性（图 2B）。

组织学评估导致整个队列中组织学类型分布的微调

经组织学评估和重新分类后，整个队列研究（202 例，不包括 7 例已排除病例）的组织学分布略有改变，其分布为：鳞状细胞癌 169 例（84%），腺癌 27 例（13%），腺鳞癌 4 例（2%），小细胞神经内分泌癌 2 例（1%）。腺癌亚型如下：普通型 9 例；非特殊型（NOS）4 例；粘液性非特殊型 2 例；胃型 4 例；绒毛管状型 3 例；透明细胞型 2 例；浆液性 3 例。

HPV 阴性的鳞状细胞癌（3 例）、腺鳞癌（2 例），通过免疫组化检测广谱 CK、CK5 和 p63，证实与上皮和鳞状上皮起源有关。5 例肿瘤中 4 例呈鳞状分化，1 例仅广谱 CK 表达；组

织形态上，为毛玻璃细胞癌^[12]，根据目前 WHO 分类属于腺鳞癌亚型。关于 HPV 阴性的腺癌（9 例），4 例为普通型，2 例为浆液性，非特殊型、胃型和绒毛管状型各 1 例（表 2）。

结合已在其他文献发表的^[9]、关于这组病例的基因分型数据和新的组织学分类，腺癌中 HPV 阳性率为 67%（18/27）。普通型腺癌中，56%（5/9）呈 HPV 阳性；非普通型腺癌中，在 HPV 阴性、代表性的组织学亚型（腺癌 NOS、胃型、绒毛管状和浆液性）中的阳性率为 69%（9/13）；在所有非普通型腺癌中（腺癌 NOS、粘液性 NOS、胃型、绒毛管状、透明细胞和浆液性癌）（13/17），HPV 阳性率为 72%。

免疫组化 P16 在 HPV 阴性样本中的表达提示仍然存在 HPV 假阴性的宫颈癌

在 HPV 阴性的鳞状细胞癌和腺鳞癌中，5 例均为 P16 阳性。腺癌组（n=9）P16 染色阳性 4 例，不确定 3 例，阴性 2 例，与组织学亚型无相关性（表 2）。在 9 例 HPV 阴性的腺癌中，3 例 P53 阳性表达，6 例阴性。

HPV 阴性与平均年龄增加、组织学类型为腺癌和样本储存时间较长有相关性

在整个队列研究中（n=202），HPV 阴性组患者平均年龄（70.3 岁）明显高于 HPV 阳性组（59.5 岁）（表 3）。HPV 阴性与阳性两组间肿瘤大小及分期分布无明显差异，但 HPV 阳性组与阴性组的组织学类型（Pearson χ^2 检验； $P<0.00001$ ）及诊断年限（Pearson χ^2 检验； $P=0.001$ ）存在显著差异。20 世纪 90 年代以后保存的样本在 HPV 阴性组（71%）中比 HPV 阳性组（26%）更常见。

HPV 阴性肿瘤患者预后更差，与其组织学类型多为腺癌有关

全组病例原发治愈率 95%。原发治愈率与 HPV 状态（HPV 阳性与 HPV 阴性； χ^2 ， $P=0.095$ ）无显著相关性。全组病例复发率为 29%，以远处复发为主（20%）。在复发率方面 HPV 阴性肿瘤（50%）和 HPV 阳性肿瘤（27%）仅存在数值上的差异，但无统计学差异（ χ^2 检验， $P=0.061$ ）（表 3）。肿瘤特异性 5 年生存率，HPV 阴性的患者（27%）显著低于 HPV 阳性的患者（69%）（时序检验， $P=0.009$ ）。然而，当只比较组织学类型为腺癌，HPV 阳性与阴性患者的生存率无显著差异（时序检验， $P=0.667$ ）。

表 2. 对所有确诊的 HPV 阴性标本（n=14）进行 P16 和 P53 免疫组化分析

No			P16	P53
1	AC	非特殊型	+	-
2	AC	普通型	+	-
3	AC	普通型	(+)	-
4	AC	普通型	(+)	-
5	AC	普通型	-	-
6	AC	胃型	-	+
7	AC	绒毛管状型	(+)	+
8	AC	浆液性	+	+
9	AC	浆液性	+	-
10	ASC	毛玻璃细胞	+	
11	ASC	毛玻璃细胞	+	
12	SCC		+	
13	SCC		+	
14	SCC		+	

表格中列出了 HPV 阴性病例的不同组织学类型。AC，腺癌；ASC，腺鳞癌；NOS，非特殊型；SCC，鳞状细胞癌。+，强阳性染色；(+)，不确定；-，阴性。

在 Cox 比例风险回归分析中, 组织学类型为腺癌是一个独立的预后因素【HR=4.232 (95%可信区间: 2.184-8.200)】(腺癌与鳞状细胞癌), 而 HPV 状态 (HPV 阳性与 HPV 阴性) 并不是一个独立的预后因素【HR=1.004 (95% 可信区间: 0.421-2.393)】。

讨 论

本研究结果与先前研究的数据一致, 采用替代方法和病毒靶点对 HPV 阴性宫颈癌进行扩展分析, 进而降低了宫颈癌中 HPV 阴性占比^[5,13]。涉及 HPV 阴性的宫颈癌, 方法学因素的影响需要考虑。已报道, HPV 阴性率会因地理区域、组织学亚型、患者年龄和样本储存时间不同而有所变化^[14]。阴性的测试结果可以归咎于一系列原因, 其中一些可能会导致假阴性结果。原因之一是肿瘤样本的质量, 这一点非常重要, 尤其是

经福尔马林固定、石蜡包埋的样本, 随时间推移, 蛋白质交联、核酸降解^[15]可能会影响分析。重新分析后, 我们发现 HPV 检测阳性的肿瘤 (n=188) 与 HPV 检测阴性的肿瘤 (n=14) 在保存时间上有显著性差异 (P=0.001), 大多数 HPV 阴性的病例 (10/14) 是在 90 年代以后保存的。该结论与之前的报道一致, 即较长的储存时间与 HPV 检测的阴性结果存在相关性^[14]。

此前有报道, 病毒整合后 L1 基因常常丢失, 可能由此导致 HPV 检测为阴性结果^[16]。本研究显示, 16 例新增阳性样本中有 9 例通过检测癌基因 E6/E7 而转阳。再次以 L1 为靶点, 用第三种方法 (MGP5+/6+), 第二种检测 L 靶基因的方法, 对 HPV 阳性的 9 例进行检测, 有 5 例阳性。最终未检测到 L1 的 4 例样本, L1 的丢失可作为解释这些肿瘤 HPV 初始检测为阴性结果的原因。故同样检测 L1, 不同方法间的结果差异可能与引物/探针区域基因组的差异有关。

步骤 1 和步骤 3 中对相同或备用组织块, 在 Anyplex (L1) 上重复基因分型检测, 于 PCR 循环的后期阶段才观察到 HPV。这提示 DNA 可能有降解, 或病毒载量低所致。然而本研究除了 1 例, 所有病例在应用 MGP5+/6+ (L1) 作为引物后, 于 PCR 循环的早期阶段即检测出阳性, 由此推测似乎是一个方法学问题。与 Anyplex 相比, MGP 引物的扩增子稍短 (150 bp vs. 100-200 bp) 可能是一个决定性因素。

某些基因亚型在重新分析组中的分布与全队列研究有所不同 (先前公布的数据)。尤其 HPV45, 其在重新分析组 (7/16, 44%) 比全队列研究组 (17/218, 8%) 更为常见, 且常在 PCR 循环的后期阶段检测到。如果将新增的 HPV45 阳性病例归咎于分析中的污染, 似乎不太可能。因为诊断时, 大多数病例常规进行了分析 (数据未显示)。HPV16 与 HPV45 相反, HPV45 在全队列中的检出率 (93/218, 43%) 高于重新分析组 (2/17, 12%)。上述发现提示某些基因分型所用的检测方法存在敏感性差异。

样本中肿瘤成分含量低, 之前被描述为宫颈癌 HPV 检测阴性的一个重要原因, 而存在宫颈外原发肿瘤则是次要原因^[1]。这也是本次队列研究中的一个问题, 重新分析组最初的 37 个病例, 7 例样本被排除: 4 例是因为肿瘤含量少, 2 例是因为怀疑非宫颈原发。

宫颈腺癌与鳞状细胞癌有几点不同之处。宫颈腺癌常为 HPV 18、45 阳性^[2], 与易出现淋巴结转移、卵巢受累和远处

表3. 整个研究队列中的患者和肿瘤特征:
HPV 阳性与 HPV 阴性肿瘤

	HPV阳性	HPV阴性	统计
平均年龄 (yr)	59.5	70.3	t test; P=0.016
平均肿瘤大小 (mm)	42.0	45.2	t test; P=0.383
组织学类型			
SCC	166	3	χ^2 test; P<0.00001
AC	18	9	
ASC	2	2	
SCNC	2	0	
Total	188	14	
肿瘤分期			
早期 (FIGO I-II)	157	12	χ^2 test; P=0.830
进展期 (FIGO III-IV)	31	2	
Total	188	14	
原发治愈率	96%	86%	χ^2 test; P=0.095
总复发率	27%	50%	
肿瘤特异性生存率 (5年)	69%	27%	Log-rank test; P=0.009
诊断年限			
1990s	49	10	χ^2 test; P=0.001
2000s	77	3	
2010s	62	1	
Total	188	14	

HPV 阳性 (n=188) 组和 HPV 阴性 (n=14) 组患者在平均年龄、组织学类型、肿瘤样本保存年限和肿瘤特异性 5 年生存率方面显示出显著差异。然而肿瘤大小、分期、原发治愈率和总生存率在两组之间没有显著差异。

AC: 腺癌; ASC: 腺鳞癌; NOS: 非特殊型; SCC: 鳞状细胞癌。

转移^[17,19]存在相关性。与鳞状细胞癌^[20]相比, 宫颈腺癌似乎对放疗敏感性较低。在大多数研究中, 不考虑肿瘤样本和检测方法, 宫颈癌 HPV 检测阴性都占有一定比例。HPV 阴性病例主要是腺癌; 然而几篇深入研究 HPV 阴性鳞状细胞癌病例的报道显示, 该类型通常高分化, 角化型, 不伴有癌前病变 CIN^[21,22]。本研究经重新分析后, 仍然存在 14 例 HPV 阴性的肿瘤。大多数组织学类型为腺癌 (4 例普通型, 1 例非特殊型, 1 例胃型, 1 例绒毛管状型, 2 例浆液性), 还有 2 例毛玻璃细胞癌, 3 例鳞状细胞癌。在大型流行病学研究中, HPV 阳性常见于普通型腺癌 (72-90%), 较少见于形态学为非普通型的腺癌 (0%-30%)^[3,14]。本研究腺癌 HPV 的检出率为 67%, 其中普通型腺癌 HPV 阳性率为 56%, 非普通型腺癌 HPV 阳性率为 69%。本队列研究中的 HPV 阳性率不同于大型流行病学研究; 本研究显示普通型腺癌 HPV 的阳性率低于非普通型。主要由于本队列研究人群数量少, 每个组织学亚型的病例数少, 因此很难按比例比较。

Molijn^[23]等人的数据提出, 既往研究中腺癌的 HPV 阳性率可能被高估了。他们采用全组织切片和激光捕获显微切割法从宫颈腺癌的肿瘤标本中提取 DNA, 检测 HPV。激光捕获显微切割法检测 HPV 的阳性率较低, 部分病例 HPV 可定位于邻近宫颈黏膜。非普通型腺癌 (腺癌 NOS、微偏/胃型腺癌、透明细胞癌、宫内膜样癌和浆液性癌) 中, 只有 0% 到 24% 的样本全组织切片法检测 HPV 阳性, 激光捕获显微切割法依旧保持阳性。这可能意味着非普通型腺癌与 HPV 感染无关。

为进一步评估本研究 HPV 阴性组的样本, 进行了 P16 和 P53 的免疫组化检测。在 HPV 相关的肿瘤中, 由于 HPV E6 可诱导 P53 表达下调, P53 蛋白水平通常降低。因此, P53 在宫颈癌^[29]中通常没有突变。研究显示, P53 在 HPV 阴性的宫颈腺癌中的表达率比 HPV 阳性的病例高^[30]。P16 是已知且常用的 HPV 替代标记物, 在本队列研究中, 所有 HPV 阴性的鳞状细胞癌和腺癌都有强/弥漫的 P16 表达。之前一些已发表的关于角化型、高分化鳞状细胞癌的文献, 证实为 HPV 阴性的鳞状细胞癌, 但其中有的病例未经 P16 分析, 有的病例 P16 完全阴性^[22]。本队列研究中 HPV 阴性的鳞状细胞癌, 没有 1 例表现出与先前描述相似的特征, 并且有 1 例曾经常规检测显示 HPV16 阳性 (数据未提供)。因此, 鳞状细胞癌和腺癌病例 P16 阳性表明它们与 HPV 相关, 如果 HPV 检测结果阴性, 很可能为假阴性。

本研究 HPV 阴性的宫颈腺癌, 既有普通型, 也有非普通

型。4 例样本呈强/弥漫的 P16 阳性 (2 例浆液性, 1 例普通型和 1 例 NOS)。普通型和非特殊型腺癌 P16 强表达, 很可能是 HPV 诱导的宫颈癌的标志^[24,25]。2 例浆液性癌, P16 阳性不一定是宫颈癌与 HPV 相关的标志。相反, 据报道浆液性癌常常 HPV 阴性, P16 和 P53 阳性, 当然也有例外^[26]。其余 5 例样本 P16 染色呈中等强度或完全缺失 (3 例普通型, 1 例绒毛管状型和 1 例胃型)。已报道, 胃型腺癌多为 HPV 阴性, 典型的为 P16 阴性, P53 阳性^[10], 本组病例中有 1 例确实如此。4 例普通型和绒毛管状型 (被公认为 HPV 阳性的组织学亚型) 的样本, P16 阳性的同时伴有野生型 P53 的表达, P53 染色呈中等或低水平^[27]。免疫组化 P16 阴性或 P53 阳性的样本提示为 HPV 不相关的宫颈癌, 但这只是高度推测。

如本研究所述, HPV 阴性宫颈癌与预后不良相关^[5,28-30]。然而, 在多变量分析中, 组织学亚型为腺癌似乎是影响生存的关键因素, HPV 阴性与预后的相关性不再存在。若单独比较腺癌, HPV 阳性和 HPV 阴性患者的肿瘤特异性生存率无显著性差异。关于 HPV 阴性是否是影响患者预后的决定因素, 与之前的结论存在冲突。其他与 HPV 感染相关的恶性肿瘤, 如接受放疗的头颈部^[31]和阴道的癌^[32], HPV 阳性被认为与预后良好相关。这与两组间的分子差异以及 HPV 阳性的肿瘤被认为对放疗敏感有关。

Banister^[33]等人对 HPV 阴性的宫颈癌提出另一种可能的解释, 其中 HPV 感染引发的癌症在晚期可能成为 HPV 非依赖性的癌。研究显示, 某一 HPV 阳性的宫颈癌亚型, E6/E7 癌基因呈低表达或缺失时, 称之为 HPV 失活性宫颈癌。该组呈现出不同于 HPV 激活性宫颈癌组的基因表达、病毒和体细胞甲基化模式。比较上述两组几个方面的不同, 反映了 HPV 阳性和 HPV 阴性宫颈癌之间的不同。他们的发现可解释一部分最初 HPV 依赖的肿瘤可能发展为 HPV 阴性的肿瘤。该领域的进一步研究应集中在分析 HPV 阴性宫颈癌患者的存档筛查样本, 以便更好地了解 HPV 与这组病例进展为癌的关系。

本队列研究中新增 HPV 阳性的基因型 (HPV 16、18、33、39、45、51) 均为 IARC 1 分类的基因型。这个结果是令人满意的, 证明该分类涵盖了所有常用的 HPV 筛查方法。然而, 由于这些都是已确诊的宫颈癌病例, HPV 假阴性很可能是样本长期储存和方法学限制所导致, 因此不能反映筛查的状态。

HPV 真阴性的宫颈癌前病变的发生率最近有所报道。Petry^[34]等在 ATHENA 研究中对 HPV 阴性的 CIN2 以上病变

(CIN2, CIN3, AIS) 进行了评估, 其中所有阴性结果都可以解释为假阴性(用另一种方法 HPV 阳性, 非 CIN2 以上病变, 或 P16 免疫组化染色阳性), 并且他们未发现任何真正的 HPV 阴性的 CIN2 以上病变。这一结论支持如下观点, 即 HPV 阴性的宫颈癌并没有癌前病变, 或者癌前病变迅速进展为癌, 以至于难以被检测到或被筛查出。

鉴于相当数量的腺癌和罕见的鳞状细胞癌在研究中被证实 HPV 阴性, 因此有人质疑通过 HPV 检测筛查宫颈癌的能力。考虑到细胞学筛查对宫颈腺癌的检出率较鳞状细胞癌^[35]低, 应用 HPV 检测进行筛查的初衷是提高宫颈癌筛查中对腺癌的筛查能力^[6]。HPV 阴性的癌前病变与 HPV 阴性的腺癌, 都不应该作为怀疑 HPV 筛查能力的理由, 尤其宫颈癌筛查策略出现变化, 即由先细胞学筛查转变为先 HPV 筛查。相信随着对 HPV 阴性宫颈癌这一小组疾病认识的深入, 未来有助于进一步提高对宫颈癌的预防。

结论

经过对 HPV 阴性和无效样本的重新分析, HPV 阴性肿瘤的占比在本队列研究中减少一半(14%-7%)。本组病例已证实 HPV 阴性与预后差、发病年龄高、肿瘤组织保存时间长以及组织学类型为腺癌有关。HPV 阳性与阴性的宫颈癌预后差异似乎取决于组织学类型而不是 HPV 状态。部分 HPV 阴性病例可出现强/弥漫性 p16 表达, 提示可能存在部分假阴性病例。

参考文献

- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
- de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010;11:1048-56.
- Holl K, Nowakowski AM, Powell N, et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution in cervical glandular neoplasias: results from a European multinational epidemiological study. *Int J Cancer* 2015;137:2858-68.
- Harima Y, Sawada S, Nagata K, et al. Human papilloma virus (HPV) DNA associated with prognosis of cervical cancer after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:1345-51.
- Rodriguez-Carunchio L, Soveral I, Steenbergen RD, et al. HPV-negative carcinoma of the uterine cervix: a distinct type of cervical cancer with poor prognosis. *BJOG* 2015;122:119-27.
- Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 2014;383:524-32.
- Bray F, Carstensen B, Moller H, et al. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2191-9.
- Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, et al. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States—a 24-year population-based study. *Gynecol Oncol* 2000;78:97-105.
- Kaliff M, Sorbe B, Mordhorst LB, et al. Findings of multiple HPV genotypes in cervical carcinoma are associated with poor cancer-specific survival in a Swedish cohort of cervical cancer primarily treated with radiotherapy. *Oncotarget* 2018;9:18786-96.
- Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, et al. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs (Vol 6). Lyon: IARC; 2014.
- Soderlund-Strand A, Carlson J, Dillner J. Modified general primer PCR system for sensitive detection of multiple types of oncogenic human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 2009;47: 541-6.
- Guitarte C, Alagkiozidis I, Mize B, et al. Glassy cell carcinoma of the cervix: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2014;133:186-91.
- Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:303-15.
- Pirog EC, Lloveras B, Molijn A, et al. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. *Mod Pathol* 2014;27:1559-67.
- Ludyga N, Grunwald B, Azimzadeh O, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch* 2012;460:131-40.
- Walboomers JM, Meijer CJ. Do HPV-negative cervical carcinomas exist. *J Pathol* 1997;181:253-4.
- Irie T, Kigawa J, Minagawa Y, et al. Prognosis and clinicopathological characteristics of Ib-IIb adenocarcinoma of the uterine cervix in patients who

- have had radical hysterectomy. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:464–7.
18. Shimada M, Kigawa J, Nishimura R, et al. Ovarian metastasis in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2006; 101:234–7.
19. Eifel PJ, Burke TW, Morris M, et al. Adenocarcinoma as an independent risk factor for disease recurrence in patients with stage IB cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995;59:38–44.
20. Rose PG, Java JJ, Whitney CW, et al. Locally advanced adenocarcinoma and adenosquamous carcinomas of the cervix compared to squamous cell carcinomas of the cervix in gynecologic oncology group trials of cisplatin-based chemoradiation. *Gynecol Oncol* 2014;13
21. Morrison C, Catania F, Wakely P Jr, et al. Highly differentiated keratinizing squamous cell cancer of the cervix: a rare, locally aggressive tumor not associated with human papillomavirus or squamous intraepithelial lesions. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1310–15.
22. Casey S, Harley I, Jamison J, et al. A rare case of HPV-negative cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2015; 34:208–12.
23. Molijn A, Jenkins D, Chen W, et al. The complex relationship between human papillomavirus and cervical adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2016;138:409–16.
24. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol* 2013;32:76–115.
25. Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Poppinghaus A, et al. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. *Virchows Arch* 2001;439:55–61.
26. Yemelyanova A, Ji H, Shih Ie M, et al. Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: immunohistochemical analysis of 201 cases. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1504–14.
27. Pirog EC. Cervical adenocarcinoma: diagnosis of human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141:1653–67.
28. Okuma K, Yamashita H, Yokoyama T, et al. Undetected human papillomavirus DNA and uterine cervical carcinoma: association with cancer recurrence. *Strahlenther Onkol* 2016; 192:55–62.
29. Omori M, Hashi A, Kondo T, et al. Dysregulation of CDK inhibitors and p53 in HPV-negative endocervical adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2015;34:196–203.
30. Lindel K, Burri P, Studer HU, et al. Human papillomavirus status in advanced cervical cancer: predictive and prognostic significance for curative radiation treatment. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:278–84.
31. Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, et al. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res* 2013;73:4791–800.
32. Larsson GL, Helenius G, Andersson S, et al. Prognostic impact of human papilloma virus (HPV) genotyping and HPV-16 subtyping in vaginal carcinoma. *Gynecol Oncol* 2013;129: 406–11.
33. Banister CE, Liu C, Pirisi L, et al. Identification and characterization of HPV-independent cervical cancers. *Onco-target* 2017;8:13375–86.
34. Petry KU, Cox JT, Johnson K, et al. Evaluating HPV-negative CIN2+ in the ATHENA trial. *Int J Cancer* 2016;138:2932–9.
35. Zappa M, Visioli CB, Ciatto S, et al. Lower protection of cytological screening for adenocarcinomas and shorter protection for younger women: the results of a case-control study in Florence. *Br J Cancer* 2004;90:1784–6.

(刘冰冰 翻译 刘易欣 审校)