

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學科

作品名稱：台灣兒科病人罹患神經母細胞瘤者可檢測到微小
病毒 B19 的存在

得獎獎項：醫學與健康科學科佳作

學 校：臺中縣私立明道高級中學

作 者：蕭志強

作者簡介



我出生於民風純樸的彰化市，目前就讀於明道中學。在一次偶然的機會裡，我有幸能到周寬基博士的實驗室裡見習，讓我學習到了許多分子生物學的研究方法，也給予我參與這一個專題研究的機會，使我對於科學研究方法和自己喜愛的生物有更深一層的認識。我要感謝周博士所給予我的諄諄教誨，明道中學季光三老師的指導和彭建彰同學的協助。

摘要

罹患神經母細胞瘤的兒科病人，尤其是罹患 stage IVs 神經母細胞瘤者，他們有些伴隨著非常嚴重的貧血，但卻檢測不出神經母細胞瘤已經侵犯骨髓；有時病情來勢洶洶，尤其是腫瘤細胞中已可偵測到 *N-myc* 基因增幅者，診斷時腫瘤細胞可能已在腹腔四處擴散並已侵犯大部分的肝臟。但是，某些這種病患，特別是腫瘤細胞中 *N-myc* 基因沒增幅者，即使在沒有治療的狀況下卻可能有自然恢復的現象，也就是腫瘤細胞會自動消退，但原因仍待進一步的證實與探討。可是，這些病人在其病情最嚴重的時候，骨髓內紅血球母細胞形態上的改變顯示可能與病毒感染有關。但是關於病毒來源的研究，現有的資訊仍然十分有限，其中最重要的是，病毒感染與引發其後天之免疫作用是否有關，更需要深層的研究。因此，為更進一步了解罹患神經母細胞瘤之兒科病人的病毒感染及病毒蛋白表現的作用，我們這次研究的目的是檢驗罹患神經母細胞瘤及貧血之兒科病人與微小病毒 B19 (PVB19)、Epstein-Barr Virus (EBV)、腸病毒 71 型(EV 71)和巨細胞病毒(CMV)的關係，以及病毒蛋白表現對這些病人的作用與臨床意義。

Abstract

In pediatric patients with neuroblastoma, in particular, those with stage IVs neuroblastoma, sometimes the disease was combined with severe anemia. However, no tumor involvement was detected in the bone marrow. Although some of these patients may have *N-myc* gene amplification, and the disease could have invaded many abdominal organs, especially liver, interestingly, the disease might regress spontaneously in some of these patients. The medical reason of the spontaneous regression, nonetheless, remains to be determined. It is worth noting that morphological changes of erythroid progenitor cells in the bone marrow have suggested virus infection in these pediatric patients. However, the available information of viral origin is limited. Furthermore, it is possible that the virus infection in these patients could be associated with the revocation of immune responses related to the spontaneous regression of the tumor. In this study we will investigate the relationship of parvovirus B19 (PVB19), Epstein-Barr virus (EBV), enterovirus 71 (EV71) and cytomegalovirus (CMV) with neuroblastoma by PCR in Taiwanese pediatric patients. Moreover, we will study the effect and the clinical significance of viral gene expression as well as *N-myc* gene amplification in these patients.

壹、前言

一、研究動機與研究目的

神經母細胞瘤是一個常發生在小孩子的癌症，它是小孩子因癌症致死的一個重要因素(大約有 15%的癌症病童是死於此種腫瘤)。依據病理學的看法，神經母細胞瘤是由神經外胚層細胞所發展出來的一種胎兒腫瘤，這種細胞起源於神經冠和腎上腺髓質及交感神經節。一般診斷到死亡的中位數是 22 個月，而且大部分的病例(超過 95%)是在病患 10 歲之前所發現的。不幸地是，如果神經母細胞瘤是在病人 1 歲之後才被診斷出來，大約 75%的病人顯示出有散播性的轉移(第 III、IV 期)，此時腫瘤具有侵犯性、化學抗藥性，而且不容易治癒。

另一方面，罹患神經母細胞瘤的嬰兒較常出現前期的病徵(第 I、II 及 IVs 期)。在臨床上，這些腫瘤對於化學治療較為敏感，且具有較高的治癒率。令人感興趣的是，有一些病人他們罹患較前期的腫瘤，即使他們出現廣泛性轉移的第 IVs 期病徵卻能自發性地復原，重回健康的狀態。但是這種自發性復原的機制現在仍然不清楚。臨床上的進程指出這種復原可能與免疫有關。

經由分析遺傳差異，博爾多氏等學者(Brodeur *et al*)發現神經母細胞瘤的抗藥性是經常和染色體的異常有關聯的。再細一點地說，就是和同質染色區(homogenously staining region, HSR)及雙小體(double minute chromosome, DMC)有關。這兩種現象是細胞學上的證據，證明和染色體異常有關。後來，史瓦墨氏等學者(Schwab *et al*)發現這些發生遺傳變異的 DNA 序列和致癌基因 *c-myc* 是同源的。令人感興趣的是，這個基因可以被放大到正常的 100 倍。而且，這個被放大的基因常位於額外染色體 DMC 或在其他染色體的 HSR 上，替代了包含只有一個 *N-myc* 之 2p23-24 區域。雖然基因放大是常和疾病的發展及不良的預後有關，引起 *N-myc* 基因放大的因素，仍待更深一層的研究。

事實上，*N-myc* 的基因放大常和 *Myc* 的過度表現有關。*Myc* 是一個核磷酸蛋白。*Myc* 的過度表現不但可以引起正常細胞的惡性轉形，*N-myc* 大量在老鼠的神經外胚層細胞表現時，也容易將這種細胞轉形成神經母細胞瘤。雖然「*Myc* 蛋白質是如何對惡性的改變產生影響」的詳細機制還需確認，但有一可能發生的事是，*Myc* 蛋白質可能和轉錄抑制者 Max 結合，而且在不適當時期的活化促進了細胞的異常生長。令人感興趣的是，致癌基因 *c-myc* 也是常在與 Epstein-Barr 病毒(EBV)有關之 Burkitt' s 淋巴瘤中被發現它有放大的現象。此種 Burkitt' s 淋巴瘤最大的特徵是，有 *c-myc* 基因的放大，即 *c-myc* 的基因轉位。轉位時最常跟第 8 對染色體上面的免疫球蛋白重鏈或輕鏈的位置結合在一起。除此之外，與腺病毒有關的病毒 DNA，它也經常嵌插在 MYC 染色體上的位置。這種現象表示某些病毒在感染細胞後，除了轉激活作用反應之外，或許也能跟宿主的基因群產生重組作用。但是，在神經母細胞瘤中從來沒有病毒感染的報告。

之後我們使用了整組的引子以聚合 鏈反應來測試以下的病毒在這些病人身上是否有感染：巨細胞病毒(cytomegalovirus, CMV)、非洲淋巴細胞瘤病毒(Epstein-Barr virus)、人類疱疹病毒 8 (human herpesvirus 8, HHV8)、human T lymphotropic virus I (HTLV-I)及微小病毒 B19 (parvovirus B19)。另外我們使用原位雜交，肝臟生檢體的神經母細胞瘤細胞研究它們的基因

表現，得到了病毒和神經母細胞瘤的直接關聯。除此之外，我們研究了另外 10 個有相似病徵的小兒科病人，以及患有嗅覺器官的神經母細胞瘤之成年病人。我們也回頭找尋先前的病例，確認神經母細胞瘤和 PVB19 感染的相互關係。下面我們簡單敘述神經母細胞瘤到目前為止研究的結果。

二、研究背景

第一章、流行病學

第一節、發生率

在美國，男性(百萬分之 9.8)比女性有稍高的發生率(百萬分之 9.2)；但男嬰的發生率(百萬分之 69.3)與女嬰的發生率(百萬分之 59.6)則有相當明顯的不同。人種方面，黑人幼童與白人幼童的發生率也不同，但在年齡較大的白人幼童和黑人幼童其發生率則沒有什麼不同[6]。關於流行病學研究的範圍，僅限於一些和母親有關的危險群，如藥物治療、荷爾蒙，懷孕期間抽煙飲酒，出生時的特徵(如體重的增加)及雙親的職業等。

第二節、危險因子

在較幼年時期最常出現神經母細胞瘤，這顯示在胚胎或懷孕期間之前，暴露於危險環境會增加罹患神經母細胞瘤的機會；流行病學調查顯示胎兒暴露於利尿劑、鎮定劑、荷爾蒙、殺蟲劑(phenytoin)、酒精和菸草之下都會增加罹患神經母細胞瘤的危險[7-10]。

第二章、分子病理的發生

第一節、DNA 含量

流式細胞儀分析神經母細胞瘤的 DNA 含量，顯示在疾病較前期的嬰兒較有可能具高倍體 DNA 含量(DI > 1)，其對化療有較好的反應，並能全面改善治療的效果[11-14]。細胞遺傳學上，發現嬰兒的高倍體腫瘤常有整個染色體增加及少數構造重排的現象；比較之下，具雙倍體 DNA 含量(DI = 1)的病人及年齡較大帶有多倍體的孩童，他們的腫瘤細胞染色體經常有構造上的重排，如易位、缺失或基因的增幅。因此，Children's Cancer Group (CCG)和 Pediatric Oncology Group (POG)最近開始使用這種分級來治療 International Neuroblastoma Staging System 第 3、4 和 4s 期疾病的嬰兒。

在不同的胎兒神經母細胞瘤中，檢驗出不同 DNA 含量的基因異常是極具價值的，且不同的 DNA 含量可以區分出雙倍體和高倍體的腫瘤細胞 [15]。高倍體腫瘤指數範圍介於 1.07

和 1.42 之間，有趣的是，DNA 含量和腫瘤階段(期別)的關聯是有意義的；雙倍體有很高的頻率是處於較後期的腫瘤，而 DNA 含量顯示和治療的反應有關：有 17 個高倍體腫瘤病人他們的腫瘤消去、病癒或部分腫瘤消去；另一方面，有 6 個雙倍體腫瘤病人，沒有任何 1 個對治療有反應。而數個隨後的流式細胞儀研究[16-21]更證實這些發現：年幼病人體內的高倍體 DNA 含量腫瘤細胞，具有疾病前期的特徵及對臨床上的治療是有利的。然而，體內具有正常的雙倍體細胞 DNA 含量的病人，常同時帶有不利的臨床特徵以及十分低的存活率。

進一步將這個研究擴增至 298 個病人[22]，腫瘤 DNA 含量為雙倍體的(diploid)佔 34%，高倍體的(hyperploid)佔 65%，低倍體的(hypoploid)佔 1%。經檢測 *N-myc* 基因增幅總共約 25%；雙倍體腫瘤比高倍體腫瘤被檢測到的比率較高。在疾病的後期，高倍體與嬰兒或幼兒(超過 2 歲帶有第四期腫瘤患者的倍體數是沒有意義的，因為它本身的存活率已非常地低)長期疾病的無疾病存活率(disease-free survival)緊密相關。用流式細胞儀分析和經由典型細胞遺傳學直接染色體計數，都同樣能提供於神經母細胞瘤其倍體改變所扮演的角色這方面的資料。在兩個研究[23,24]中總計包含 81 個核型顯示出非常一致的結果。這兩個研究以 3 個倍體層次區分；接近雙倍體(near diploidy)、接近三倍體(near triploidy)以及接近四倍體(near tetraploidy)，用這種方法發現第 1 對染色體短臂異常、雙小體(double minute chromosomes, DMC)、以及另一染色體構造畸變同質染色區(homogenously staining regions, HSRs)更普遍出現於雙倍體和四倍體腫瘤。而 *N-myc* 基因的增幅經南方點漬法偵測大部分僅限於在雙倍體群腫瘤出現。

倍體(ploid)數與年齡、期別(stage)及存活率有很強的關聯性，接近三倍體的患者具有更有利的結果，經由結合流式細胞儀及細胞遺傳學兩者的研究結果顯示出一致性，即接近三倍體腫瘤的病人與雙倍體或四倍體有很明顯的不同，顯示倍體是一個具有意義的預後因子。高倍體對嬰兒來說是一個很有利的預後因子，反之，第 1 對染色體短臂缺失、第 17 對染色體長臂遺傳物質的增加及 *N-myc* 基因組的增幅與不利的預後有關。

在許多醫學中心，使用流式細胞儀來檢測是常見的，也可以使用於石蠟包埋材料來檢測，但是這種方法需要大量的腫瘤。如果腫瘤材料較少時，可以使用針頭活體切片法(biopsy)，以細針頭抽取並輕壓於玻片上，這種方式稱為靜態 DNA 細胞儀(static DNA cytometry)。此外，於其他的惡性腫瘤實驗所顯示[25]，間期螢光原位雜交(interphase FISH)結合著中心粒偵測試劑(centromeric probes)能夠獲得接近倍體層次的近似值。

第二節、N-*myc* 的增幅

一般而言，N-*myc* 為神經母細胞瘤基因組的一種固定且穩定的特徵，但是 N-*myc* 基因增幅與否，不會影響腫瘤的生長速率[26]。N-*myc* 的增幅，強烈的意味著神經母細胞瘤的惡性侵犯，同時亦可被用來當做判斷神經母細胞瘤臨床試驗治療層級的一種根據。但 Bordow 等人發現[27]高 N-*myc* 基因表現只能對年齡較大病童的預測有較大的幫助，並不適用於嬰兒。N-*myc* 基因的增幅有時和基因產物-核磷酸蛋白(Myc)的高濃度有關。N-*myc* 過度表現腫瘤基因的特性，在體外藉由一 N-*myc* 表現載體轉殖到正常細胞後，將細胞轉形為惡性[28]，以及藉由神經母細胞瘤能穩定的於轉殖基因老鼠中生長，和位於神經外胚層細胞中 N-*myc* 持續性過度的表現[29]。然而，最根本的機制是 Myc 蛋白促成惡性腫瘤的發育。此種機制是十分清楚的，Myc 蛋白會結合轉錄壓抑子 Max，以及導致生長促進基因的不適當活化，也就是無法抑制其生長[30]。Myc 蛋白在腫瘤中的濃度通常很高，顯示出基因有增幅的作用，但同樣地可能在單一的 N-*myc* 疾病中增加基因表現。N-*myc* 的表現、臨床條件以及結果的關聯，在最近的一些文章仍有爭議[31]，使得 N-*myc* 基因增幅的問題尚待理解。

第三節、染色體的增加或缺失

由 Fong 等人[32]一個簡要明確的研究，清楚的顯示出有 62% 的腫瘤是因第 1 對染色體短臂失去了異卵性的調控(LOH)而產生 N-*myc* 的增幅，而僅約 3%第 1 對染色體短臂完整的腫瘤出現 N-*myc* 的增幅。最後，數個細胞遺傳學的研究[33-36]顯示，第 1 對染色體短臂缺失(delete)具有預告走向不利後果的意義。但是，第 1 對染色體短臂缺失(delete)和其它相關的變異其預後能力的精確，特別是 N-*myc*，仍具爭議性。雖然，第 1 對染色體短臂失去了異卵性的調控(LOH)於多項存活率分析(multivariate survival analyses)中[37, 38]，已被當作是預測走向不利後果的最有效因子。但是這些研究的結果並不一致，其主要原因可能是不同的研究使用不同的標準，而獲得不同的結果，有些研究習慣使用無疾病存活率(event-free survival, EFS)，反之，有些研究習慣使用整體存活率(overall survival, OS)[39]。Maris 等人以 238 個病人做為研究組群，在兩種標準之下分析，全部病人中有 35% 顯示，具有第 1 對染色體短臂失去了異卵性的調控(LOH)。於多項分析(multivariate analysis)時，第一對染色體短臂第 3 區第 6 染色條帶的缺失對於 EFS 預測的減少是具有意義的，但對 OS 而言是不具意義的。這些研究幫助我們對第 1 對

染色體短臂角色的了解，並且有利於治療其它低危險群復發的病人。研究顯示，第 1 對染色體短臂的缺失，對高危險群病人並無預後作用(特別是 *N-myc* 增幅的腫瘤)。

細胞遺傳因子異常，是普遍發現於神經母細胞瘤中被發現；這些異常包含整個染色體增加、第 1 對染色體短臂缺失、第 17 對染色體長臂遺傳物質的增加以及 *N-myc* 基因組的增幅，皆已被發現有同質染色區與雙小體的出現[40,41]。第 1 對染色體短臂的缺失是神經母細胞瘤的細胞遺傳學上之特徵，它發生於 30~50%的原發性腫瘤。常見的缺失區域與 LOH 位於第 1 對染色體末端 1p36 位置[42]。這個 LOH 區域顯示可能有腫瘤抑制基因的存在。

之前的研究[43]有相當多的證據顯示，在神經母細胞瘤中，第 1 對染色體短臂、第 11 對染色體長臂、第 14 對染色體長臂有 LOH。此外，也有相當多的證據顯示，有 3 個染色體出現 LOH(>30%)，分別是第 2 對染色體長臂(30%)、第 9 對染色體短臂(36%)及第 18 對染色體長臂(31%)；此外，第 9 對染色體短臂 LOH 的腫瘤，顯示與後期疾病及不利的預後有關。特別是位於第 9 對染色體短臂上的基因可能與神經母細胞瘤的侵犯有關。另外於 Kamb 等人[44]的研究中也曾經提到在神經母細胞瘤的第 1 對染色體短臂、第 11 對染色體長臂及第 14 對染色體長臂之外，第 2 對染色體長臂、第 9 對染色體短臂及第 18 對染色體長臂也常出現 LOH。於 Fong 及 White 等人[45]的報告中顯示第 1 對染色體短臂和第 14 對染色體長臂發生 LOH 的病人，帶有疾病後期的特徵。第 14 對染色體的缺失和第 11 對染色體上的 LOH 有很強烈的關聯；但和 *N-myc* 的增幅呈現反比關係。此外，Srivatsan 及相關的研究報告顯示第 11 對染色體長臂的 LOH，也可能在神經母細胞瘤的轉移中扮演重要的角色。Takita 等人[46]則就臨床病理的發現及神經母細胞瘤等位基因(allelotype)之間的關係，發現第 9 對染色體短臂 LOH 與疾病的後期及不利的預後亦有關。

N-myc 未增幅的病人，其第 11 對染色體上的 LOH 明顯會減少全面存活率(OS)，因此，第 11 對染色體上的 LOH 可以幫助我們鑑定帶有不利因素的病人為何其 *N-myc* 沒有增幅的這個問題。最近的研究[47]指出第 1 對染色體的 LOH 可單獨用作 EFS 的預測但不適用於 OS。而位於第 2 對染色體第 2 區第 5 染色條帶區(2p25)的鳥胺酸去碳基酶(ornithine decarboxylase, *ODCI*) 基因，偶而和 *N-myc* 有共同增幅的現象，此種 *N-myc* 和 *ODCI* 的協同作用，顯示於神經母細胞瘤中 *N-myc* 能調控 *ODCI* 的表現[48]。在 Plantaz 等人[49]的研究當中，第 17 對染色體遺傳物質的異常增加即佔了 72%，其中 34%包含整個染色體的增加，有 38%只單獨出現長臂的增加(17q21-qtr)。

第四節、異常染色體

就抗藥性而言，數個使用人類細胞株的體外研究，結果顯示 DMC 和 HSRs 可當作基因增幅的細胞學證據[50]；Schwab 等人的研究更指出，神經母細胞瘤細胞株和原發性腫瘤的增幅基因中，在神經母細胞瘤中表現的 *n-myc* 與人類細胞的腫瘤基因 *c-myc* 有相似的(homology)序列。由南方點漬法的結果來看，基因可增幅 130 倍；原位雜交更進一步顯示神經母細胞瘤中的 HSRs，即為所增幅的 *myc* 相關序列位置，此增幅的基因因此稱作 N-*myc*。它的起源是第二對染色體的短臂[51-54]。N-*myc* 增幅的方式對起源於神經組織的腫瘤具相對特異性，N-*myc* 基因的增幅從不出現於基因本身第二對染色體短臂的第二區第 3-4 染色條帶殘基位置，但可在其它染色體或外染色體雙小體發現同質染色區，這個特性可作為一種快速的鑑別[52,55]。在神經母細胞瘤細胞株，螢光原位雜交研究顯示，在第二對染色體短臂的第二區第 3-4 染色條帶區，除了單一的 N-*myc* 基因外，還含有許多易位的 HSRs，這種異常複製的增幅模式會引起重組產生環狀 extrachromosomal 構造；而這種併入其它染色體和原位增幅的第二期過程，導致 HSR 的產生[56,57]。

HSRs 於原發性腫瘤細胞比 DMC 罕見，而且不是很清楚。直到最近，仍未有報告提到 N-*myc* HSRs 併入位(integration sites)的確定部位，然而，螢光原位雜交技術(FISH)目前可顯示這種構造(integration sites)經常位於第 17 對染色體長臂部份的兩邊，此顯示第 17 對染色體長臂可能為 N-*myc* 優先重組的位置[58]。在罕見例子的細胞株中，HSRs 的增幅區段顯示出包括 N-*myc* 和源自於其它位置序列的複雜構造，例如，LS 細胞株[59]的第 12 對染色體長臂 HSR 的 N-*myc* 還包含 MDM2，或在 IMR32 細胞株[60]的第 2 對染色體短臂第 1 區第 5 染色條帶區到第 1 對染色體短臂 HSR 的 N-*myc* 及包含 MEIS1 homeobox gene。

第五節、發病或轉移相關基因及蛋白質

神經元細胞生長因子(Neurotrophins)

神經母細胞瘤源自於神經冠的腎上腺交感神經；neurotrophins 和它的受體是神經系統發

育的一個關鍵，它們對於神經母細胞瘤發病亦是一重要角色。Neurotrophins 家族的成員包括神經生長因子(NGF)、brain-derived neurotrophic factor(BDNF)、neurotrophin 3(NT-3)及 neurotrophin 4(NT-4)。

trk 原型致癌基因(proto-oncogen)是一種神經生長因子(nerve growth factor, NGF)的受體；於乳突狀癌(papillary carcinoma)，經常與 *ret* 及 *trk* 兩種不同基因編碼的轉膜神經促性酪胺酸激酶受體(transmembrane neurotrophic tyrosine kinase receptors)的重排(rearrangement)有關。此受體突變或不正常表現時，會轉換成致癌基因。

TrKA 的高程度表現和前期疾病相關，但和 *N-myc* 的增幅呈反比[61-64]。相反地，TrKB 的表現和 *N-myc* 的增幅呈正相關[65]。TrKB 可促使細胞增生或存活[66]。TrKC 若在神經母細胞瘤中表現，則與 TrKA 一樣可以使腫瘤走向有利的關係[67,68]。TrKA 和 TrKC 的高程度表現，可在 neurotrophin 缺乏時，造成細胞凋亡(apoptosis)或在 neurotrophin 出現時，造成分化(differentiate)。TrK 的表現可解釋神經母細胞瘤自發性復原或分化走向神經節良性腫瘤(ganglioneuromas)的臨床觀察。

Telomerase 端粒酶

端粒酶是一核糖核蛋白酵素，可維持真核細胞染色體末端的完整。與大多數正常的體細胞相較，人類的腫瘤大多表現端粒酶，端粒酶造成末端長度的穩定及細胞繼續的增生[69]。端粒酶在大多數神經母細胞腫瘤內表現，帶有高端粒酶活性與後期疾病有很大的關聯[70-72]。由於端粒酶普遍表現於神經母細胞腫瘤內，Hahn 等人[73]發現經由抑制端粒酶的活性可抑制人類癌細胞的生長。端粒酶可以當作新的抗癌治療標的。

CD 44

CD 44 是一細胞表面醣蛋白，它包含細胞間(cell-cell)及細胞和基質(cell-matrix)的交互作用。它們異常(aberrant)的表現和各種腫瘤的轉移及惡化有關。CD 44 的表現缺失和後期肝外的膽管(bile duct)和膽囊(ampullary)、子宮癌的復發和惡化及膀胱癌有關。除了後期階段疾病及 *N-myc* 增幅者外，大多數神經母細胞腫瘤表現高程度的 CD 44[74-76]。CD 44 的表現缺失，強烈的與 *N-myc* 增幅有關，在多項分析時，它可單獨作為全面存活率(OS)的預測因子。

nm23

nm23-H1 和 *nm23-H2* 基因編碼的蛋白質具有核苷酸雙磷酸激 (nucleotide diphosphate kinase)的性質，並能抑制癌症的轉移。某些腫瘤例如乳癌和黑色素細胞瘤(melanoma)，*nm 23* 的表現減少和癌症轉移有關[77,78]，相較而言，在急性骨髓性白血病(AML)[79]及非杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin' s lymphoma) [80]，*nm 23-H1* 的表現增加與不利的預後有關；於神經母細胞腫瘤，*nm 23-H1* 的表現增加和更後期階段的疾病相關，而且它可以可單獨做為一個預後指標。*nm 23-H1* 的基因組增幅但 *nm23-H2* 不見增幅的情形，是經由 Leone 等人[81]發現的，其頻率是 18 個後期腫瘤可發現 6 個是這樣，同時他們還確認出 *nm23-H1* 和 *nm23-H2* 皆有突變[81,82]。但是，*nm23* 蛋白於神經母細胞腫瘤侵襲的確切角色仍有待進一步的證明。

第六節、其它相關因子

其他可能和神經母細胞瘤轉移有關的因子有基質金屬蛋白酵素(matrix metalloproteinase, MMP)、intergrins(這個蛋白的存在是爲了維持細胞的完整性)及血管內皮生長因子(VEGF)。MMP2 (凝膠蛋白 A, gelatinase A)和 MMP9 (gelatinase B)於原發性神經母細胞瘤中表現增加則和較後期階段疾病有關[83]，另外，經由 Ara 等人[84]的研究顯示 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2)的表現減少則和不利的預後結果有關。intergrin $\alpha V \beta 3$ 和黑色素瘤及乳癌的轉移有關[85,86]。intergrin $\alpha V \beta 3$ 強勢地表現於未分化的神經母細胞瘤[87]，帶有抗血管生成的 intergrin $\alpha V \beta 3$ antagonist 經由 anti-GD2 抗體的協同作用能抑制神經母細胞瘤的生長[88]。Angiogenic factor VEGF 被發現存在於神經母細胞瘤細胞株及原發性腫瘤內[89,90]，帶有 anti-VEGF 抗體於一裸鼠研究模式中(nude mice model)[91]，發現可抑制神經母細胞腫瘤。另外，於卡死 5(caspase 5)編碼區內的單核苷酸重複引起的閱讀框位移(frameshift)突變，已在與腫瘤有相關的遺傳性不會產生息肉的大腸癌(nonpolyposis colorectal cancer syndrome)內被發現[92]，caspase 8 基因的缺失與不活化的點突變，亦有報告指出容易出現於人類頭頸部癌症[93]。在一神經母細胞瘤研究中特別提到，caspase 1 如先在腫瘤中表現，則具較有利的結果，但其在後期神經母細胞瘤(stage 3 and 4)則經常不會出現[94]。同樣地，caspase 3 的表現增加也被報告與神經母細胞瘤有關，帶有高程度的 TrKA 表現、單一的 *N-myc*、疾病發生的較幼年階段、臨床病理前期(stage 1, 2 and 4S)等，具較有利的預後特徵[95]。caspase 9 的不活化可排除神經母細胞瘤腫瘤的發生，

caspase 的不表現可以調控潛在的腫瘤抑制，例如，於帶有 *N-myc* 過度表現的神經母細胞瘤中，DNA 的甲基化使 caspase 8 無法活化[96]。

第三章、原型腫瘤基因 *c-myc*, *N-myc* 與細胞凋亡(apoptosis)之關係

p53 的兩個不同的重要功能是誘導細胞凋亡及阻止生長停留在 G1 期腫瘤抑制基因。bcl 2 可以對抗經由 p53 誘導的細胞凋亡，但無法推使生長越過 G1 期；然而，bcl 2 和原型腫瘤基因 *c-myc* 的共同表現(coexpression)，可有效的對抗 p53 於 G1 期的生長停滯及細胞凋亡，顯示此兩個原型腫瘤基因有協同(cooperation)的作用。另外，*c-myc* 也中止了(disrupt)在細胞週期的 early G1 phase 包含 D1 週期素(cyclin D1)表現的基因控制。

兩種不同等級的 caspase，引燃者(initiators) (CASP8, CASP9, CASP10)及 effectors (CASP3)。其中一種是經由死亡受器傳導以及經 caspase 8 及 caspase 10 控制(外在路徑)，另一種的發生是經由粒線體細胞色素 C 的釋放以及 caspase 9 的活化(內在路徑)。

Caspase-8 牽涉的細胞色素 C-介導的細胞死亡，可能是幫助放大死亡訊號以及確保 apoptosis 能迅速發生；我們發現在神經母細胞瘤中，編碼 caspase-8 的基因經常因甲基化而缺失或不表現。Caspase 8 的完全不活化，幾乎發生在 stage IV 的神經母細胞瘤中，反之，只有一部份甲基化(hemimethylation)和神經母細胞瘤 stage I - III 及 *N-myc* 未增幅有關。沒有 caspase 8(caspase 8-null)的神經母細胞能夠抵抗經由死亡受器介導的細胞凋亡(apoptosis)。Caspase 8 扮演一個腫瘤抑制基因的角色，它沒有被活化，原因完全是被染色體外的因素所抑制，而這將提供一個神經母細胞瘤存活的優勢以及增幅它們的 *N-myc*。Caspase 8 的沉默不表現，是經由基因的甲基化所致；更進一步發現，caspase 訊息路徑的另一調控者 Apaf-1 的沉默不表現，也是經由類似的甲基化方式出現於人類黑色素腫瘤(melanoma)病人當中。因此，經由協同基因(corresponding gene)甲基化造成調控細胞凋亡的沉默不表現，可作為腫瘤發展期間的一個可供使用的共同機制。

N-myc 增幅作用的影響可能顯示在 Fas 受器介導的細胞死亡(Fas receptor-mediated cell death)步驟，在此過程 Fas ligand 引起 Fas 受器的 oligomerization，導致 FADD (Fas receptor associated death domain containing protein)和 FLICE (caspase 8)的加入靠攏(recruitment)，FADD 藉由本身的 death domain 和 Fas 受器的細胞質 death domain 相互作用，此將吸引 FLICE 經由他本身的 death effector domain (DED)及 FADD 的 DED 而靠攏。此 FLICE/caspase 8 的 caspase 的活性

因此被活化，導致細胞凋亡。最近的發現顯示，*c-myc* 基因的過度表現，是經由 FasR 路徑引起細胞死亡。因此，我們假定 *N-myc* 過度表現引起細胞凋亡是用同樣的方式。FasR 路徑的任一組成改變 [如 FADD 或 FLICE] 將會抑制細胞死亡，並通常伴隨著 *N-myc* 的過度表現，及造成神經母細胞瘤的增生。因此，Fas 受器路徑的改變，可作為 *N-myc* 增幅發生時，神經母細胞瘤細胞存活的決定因素。

除此之外，是否其他新因子，如 metalloproteinases inhibitors, integrin antagonists 或抑制 VEGF pathway 能否應用到臨床上面，則仍留待更進一步的研究。

第四章、預後標記

第一節、血清標記

神經母細胞腫瘤於血清中產生很多可供測定的因子，如鐵質腸蛋白混合物(ferritin)、賂神經元特異性的烯醇酵素(neuron-specific enolase, NSE)、色素顆粒蛋白 A (chromagranin A)、乳糖脫氫酶(LDH)和 ganglioside GD2。血清 ferritin 的升高(超過 142 ng/ml)和神經母細胞瘤的預後有不利的結果，且當其結合腫瘤組織學檢查後，有很高的預後效果[97-99]。NSE 對神經母細胞瘤的檢測雖然不具有特異性，但具有後期疾病的病人仍象徵不利的結果[100]。同樣地，在血清中 chromagranin A 的含量和後期疾病與不利的預後結果有關[101]。血清乳糖脫氫酶(LDH)可單獨作為年齡和期別的預後結果預測因子[102]。然而，血清乳糖脫氫酶(LDH)可額外提供一個非從 DNA 倍體、*N-myc* 或組織病理學而來的危險群資訊[103]。ganglioside GD2 表現於大多數神經母細胞腫瘤的細胞表面上，且不僅可用來確認神經母細胞腫瘤細胞亦可用來反映疾病的活性及對治療的反應[104]。ganglioside GD2 的重要性並非利用它來當作一預後因子，而是利用它來當作抗體治療的標的。

第二節、尿液標記

大約 90~95% 的神經母細胞瘤產生兒茶酚胺(catcholamine)，可藉偵測其尿液代謝物來篩檢病人。其主要尿液代謝物為 HVA 和 VMA；除了可利用它來診斷神經母細胞瘤外，VMA/HVA 的比值亦為可用的預後標記，病人 VMA/HVA 的比值超過 1 時有較好的存活率[105,106]，特別

是在一個經由 Evans 等人的研究中，帶有第三期或第四期疾病的病人其 VMA/HVA 的比值超過 1 時，分別有 71% 和 17% 的存活率[106]。

第五章、腫瘤相關遺傳標記

很多的遺傳因子可被用來當作預後的解釋；這些包括嬰兒的 DNA 倍體(DNA ploidy)、*N-myc* 的增幅、第 17 對染色體物質的增加、第 1 對染色體短臂的 LOH、TrkA 的高程度表現及 CD44 等。結合這些因子可有助於確認神經母細胞瘤是傾向於復發或進行。然而，由於已知 DNA 倍體(藉由流式細胞儀)和 *N-myc* 的增幅(藉由螢光原位雜交法)是有力又容易偵測的預後因子，DNA 倍體和 *N-myc* 的增幅雖然僅是腫瘤標記，但也可用來將危險病人分群。第 17 對染色體長臂物質的增加、第 1 對染色體短臂的 LOH、TrkA 及 CD44 等的預後價值已經越來越清楚。

第六章、危險因子的多變異分析

在一多項分析(multivariate analysis)中，並沒有單一個研究可以包含所有的變異；年齡、疾病期別、*N-myc* 的增幅、腫瘤組織學檢查和嬰兒的 DNA 倍體數等，無一項在單獨作為預後因子時，有始終一致的結果；於現今，則利用結合這些因子來將危險病人分群。

第七章、診斷期別

神經母細胞瘤的症候和臨床症狀，要看原發腫瘤擴展的部位而定。皮膚的損傷幾乎是嬰兒特有的，帶藍點色彩(bluish hue)和出現“blueberry muffin”的損傷。腫瘤過度分泌兒茶酚胺(catcholamine)，導致造成焦慮不安、心悸及高血壓。過度分泌血管活化腸蛋白(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)會造成棘手的水樣化腹瀉、低鉀血症、脫水[107]，也會出現眼球胡亂活動的症狀(Opsomyclonus)。此症狀在某些病患身上可使用腎上腺皮質激素或類固醇來改善[108,110]。

第八章、診斷及評估

現今期別的診斷是依據 International Neuroblastoma Staging System (INSS)，爲了有助於臨床試驗和生物上的研究與比較，一個關於神經母細胞瘤診斷的國際一致標準分期系統於 1988 年發表[111]，並於 1993 年修訂。此系統名爲 INSS。另外對反應的標準也有一套準則--- International Neuroblastoma Response Criteria (INRC)。

Neuroblastoma Pathology Committee (INPC)[112,113]的分類是依據年齡、神經母細胞瘤分化程度的級數、細胞轉換指數(turnover index)、Schwannian stroma 發育的出現與否而定。

第九章、分期系統

INSS 的兩套分類系統分別由 Evans 等人[114]及 St. Jude 稍後修正的 POG 分期系統 [115](Pediatric Oncology Group Staging System)。

貳、研究方法與過程

一、材料與檢體

1. 孕產婦血漿、臍帶血、病患血清

檢體從中國醫藥學院附設醫院婦產科部收集以作為免疫酵素連接法(ELISA)偵測 Parvovirus B19 之抗體、PVB19 基因的表現及聚合 鏈鎖反應偵測 PVB 19 、EBV、EV 71 和 CMV 病毒用。

2. 腫瘤組織切片或骨髓抽取(BMA)

- A. 以作為免疫細胞化學染色偵測細胞表面標記、caspase 3 及 caspase 8 的表現及 EBV、EV 71 和 CMV 病毒蛋白抗原的檢測。
- B. 作為偵測 Parvovirus B19 感染的螢光原位雜交法試驗。
- C. 作為偵測 *N-myc* 基因的表現。

二、分析方法

1. 免疫酵素連接法(ELISA)

經純化的重組蛋白 NS1，VP1 備用，並執行以下 ELISA procedure：

- A. 將純化的抗原以 PBS (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl)泡製成 1 μ g/ml 的濃度，然後被覆於 96 well (for ELISA)的微量盤內，每一 well 內添加 50 μ l 的抗原液。
- B. 將微量盤置於 37°C 的 incubator 中過夜，以除去所有之液體成份。
- C. 在室溫以甲醇固定微量盤 10 分鐘，之後將甲醇除去(以手甩乾)，再將微量盤置於空氣中乾燥。
- D. 此被覆抗原的微量盤可開始執行免疫酵素連接法或置於-20°C 中貯存。
- E. 於開始執行免疫酵素連接法前，先以 PBS 泡製 5% 山羊血清，加於微量盤內 10 分鐘，以阻礙未結合位(block unbound sites)。
- F. 除去微量盤中之 5% 山羊血清，並以 PBS 泡製成 1% 的山羊血清作一系列的連續稀釋，之後置於 37°C 的 incubator 中 90 分鐘。

- G. 在加入鹼性磷酸酶接合山羊抗人類抗血清前 (1 : 3000 in PBS with 1% goat serum) , 先除去血清及以二次水清洗微量盤 10 次 , 隨後置於 37°C 的 incubator 中反應 90 分鐘。
- H. 在室溫 45 分鐘 , 觀看呈色劑的顏色變化(pNPP, 黃色)以確認陽性反應。再置於 ELISA reader 中讀取 OD₄₀₅ 的值。

2. 免疫細胞化學

使用標定有 streptavidin-biotin 的複合物(DAKO, LSAB2 System, Carpenteria, CA) , 免疫表現的研究將以一系列單株抗體 , 如 CD3, CD4, CD8, CD20, CD30, CD43, CD45RO, CD56, and CD68 (DAKO, Kyoto, Japan). 檢體則使用 BMA 或石蠟切片。呈色劑為 aminoethyl carbazole (AEC)。每個玻片將以蘇木紫(hematoxylin)或甲基綠(methyl green)逆染(counterstain)。在顯微鏡下觀察深紅色顆粒以確認陽性反應。免疫細胞化學也將使用檢測 caspase 3, caspase 8 和 active caspase 3 的表現(BD Biosciences, San Jose, CA)。病毒基因產物的檢測則使用對抗 LMP1 , EA-D , EBV BZLF-1 複製活化子(ZEBRA) , EBV 的 EBV-associated nuclear protein 2 (EBNA-2)或對微小病毒 B19 的 VP2 capsid protein , 及對 CMV 的晚期抗原(Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK)等的抗體。對抗 ZEBRA 和 EA-D 的抗體將使用來偵測 EBV 的感染是否為溶解(lytic) , 使用對抗 LMP1 和 EBNA-2 的抗體來偵測 EBV 的感染是否為潛伏(latent) , 及使用對抗 EV71 病毒蛋白之抗體(Bio-Life catalog number 3324)來檢測 EV71 之感染。

3. 訊息的增幅

聚合酶鏈鎖反應和反轉錄聚合酶鏈鎖反應的步驟, 簡單的說, 從血清及緩衝層(buffy-coat) 抽取DNA或RNA以進行聚合酶鏈鎖反應和反轉錄聚合酶鏈鎖反應。此反應利用標準程序經35次循環增幅: 於94°C, 1分鐘, 分開DNA雙股(denature), 於56°C, 40秒, 黏合(annealing), 於72°C, 1.2分鐘, 延伸雙股(elongation)。於微小病毒B19測定中, 四對引子被選用, 其個別的序列如下(此序列係依據GenBank/AF113323):

NS1: 5' -CAGAGGTTGTGCCATTTAAT-3' (nts 610-629);

NS2: 5' -TGTGCATTACACCATGTAAGCCACTGTTGTAC-3' (nts 1420-1389);

NS5: 5' -ACTAGTAGGTACTAAATTAGTTG-3' (nts 830-808)

NS6: 5' -TGCGTGGAAGTGTAGCTGTGCCTG-3' (nts 1207-1230)

S1: 5' -ATAAATCCATATACTCATTGGA-3' (nts2512-2533);

S2: 5' -CTAAAGTATCCTGACCTTG-3' (nts 3211-3193).

NS 表示編碼非構造蛋白的一個區域，及 S 表示編碼 VP2 蛋白的一個區域。214 鹼基配對(NS6-NS2)，219 鹼基配對(NS1-NS5)，700 鹼基配對(S1-S2)及 809 鹼基配對(NS1-NS2)的增幅產物，利用 2.0% agarose-ethidium bromide gel 來解析。微小病毒 B19 增幅的 700 及 809 鹼基配對的特定產物，更進一步以 DNA 定序儀(ABI Prism, Perkin-Elmer, Foster City, CA)確認之。於巨細胞病毒、EBV 和腸病毒 71 型的測定，引子序列如下：

於巨細胞病毒測定中，一對引子被選用，其個別的序列如下(此序列係依據 GenBank/X17403)：

M1:5'-CACCACGCAGCGGCCCTTGATGTTT-3'(nts 118878-118902)

M2:5'-CACCTGTCACCGCTGCTATATTTGC-3'(nts 119277-119253)

巨細胞病毒增幅的400鹼基配對的特定產物，進一步以2.5% agarose-ethidium bromide gel來解析。

於EBV測定中，一對引子被選用，其個別的序列如下(此序列係依據GenBank/M15973)：

AA5'-GCCAGAGGTAAGTGGACTTT-3'(nts 1400-1419)

AZ5'-TGGAGAGGTCAGGTTACTTA-3'(nts 1640-1621)

EBV增幅的241鹼基配對的特定產物，進一步以2.5% agarose-ethidium bromide gel來解析。而且以DNA定序儀(ABI Prism, Perkin-Elmer, Foster City, CA)確認之。

於EV71測定中，兩對引子被選用，其個別的序列如下(此序列係依據GenBank)：

5'-ACCTTTGTACGCCTGTT-3'

5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'

5'-AAGCACTTCTGTTTCCC-3'

5'-ATTCAGGGGCCGGAGGA-3'

EV71增幅的249鹼基配對的特定產物，進一步以2.5% agarose-ethidium bromide gel來解析。而且以DNA定序儀(ABI Prism, Perkin-Elmer, Foster City, CA)確認之。

4.原位雜交

簡單地說，從石蠟包埋組織切片取 4 μm ，以二甲苯去石蠟、脫水及以不含核酸酶之蛋白酶(Boehringer Mannheim, Germany)於室溫 15 分鐘預先消化。玻片接著以蒸餾水水洗、以 70% 乙醇浸潤並置於空氣中乾燥。加一滴接合有標定 fluorescein isothiocyanate 對微小病毒 B19 的反義探針 antisense probe (250 ng/ml in 50% formamide, 6 \times SSC, and 0.25% dry milk)於每一組織切片上。此反義探針是經由 DNAFax Inc.(Taipei, Taiwan)合成，如下述的序列：

α PVB19a: 5' FITC-TATCCCATTATGGGACTAATGG-3'

α PVB19b: 5' FITC-CTAAAGTATCCTGACCTTGCCCTAAC-3'

α PVB19c: 5' FITC-GCACCAGTGCTGGCTTCTGCAGAA-3'

α PVB19d: 5' FITC-TTTGCCACTTTCTTTACTCATAATCTAC-3'

α PVB19e: 5' FITC-GATTCTCCTGAACTGGTCCC-3'

α PVB19f: 5' FITC-AGGTAAACCCCTTACTCCGTCCCACACA-3'

雜交產物的顯現是藉由使用對 FITC 的 alkaline phosphatase-conjugated polyclonal antibody 及 NBT/BCIP 產色劑，陽性反應於顯微鏡下觀察雜交位置呈現 brownish blue 顆粒。

參、研究結果與討論

一、研究結果

微小病毒 B19 (PVB19)是一個單股的 DNA 病毒，傳統上它和水胎以及幼兒傳染性紅斑有關(第五病)。在免疫能力正常的個體身上，PVB19 的感染不會造成臨床病理上的症狀。然而，在免疫作用遭到抑制的個體身上，病毒的感染會導致暫時性的紅血球缺乏以及慢性紅血球細胞系分化不良[116-118]。在先前的研究，我們懷疑帶有先天性貧血的兒科病人是因母體攜帶微小病毒 B19，經由子宮-胎盤傳遞而使胎兒感染微小病毒 B19。因此，我們收集篩檢懷孕婦女分別經由免疫酵素連接法或聚合 鏈鎖反應測定病毒的存在及血清中對抗此病毒的抗體，來篩檢潛伏性微小病毒 B19 的感染。四名婦女於懷孕期間被確認出有短暫性病毒血症，之後我們非常密切地追蹤這些婦女(圖 1A-C)。神經母細胞瘤在其中一名婦女所生出的三個月大的女嬰中意外的被診斷出來。(圖 2A-D 和 3)。並進一步以原位雜交法證實，該名罹患神經母細胞瘤的三個月大女嬰，也有被微小病毒 B19 感染(圖 4)。

種種的證據顯示貧血與微小病毒 B19 感染緊密相關，帶有病毒訊息的非典型紅血球母細胞，進一步使紅血球的生成受到牽連。然而，隨著微小病毒 B19 感染後，細胞內所發生的事件並沒有很詳盡的說明。一個由 Yagashi 等人的研究中，清楚的顯示微小病毒 B19 感染可能是一個誘導紅血球細胞凋亡的主要因子[119]，此結果更進一步由 Sol 等人[120]於轉染之紅血球細胞中揭示，NS1 的表現可以導致 DNA 的碎裂(片斷化)這個結果而得到支持。因為活化的 caspase 3 和病毒訊號的出現(圖 5)，目前的研究更進一步啟發不完全的細胞分裂(cytokinesis)、細胞凋亡過程在微小病毒 B19 感染期間它如何影響紅血球細胞成熟的見解。在紅血球先驅細胞上，激烈的細胞毒殺作用僅歷時 2 星期(圖 5)。

另外，我們就懷孕期間被確認出有短暫性微小病毒 B19 病毒血症的四名婦女中，追蹤到其中一個罹患神經母細胞瘤的三個月大女嬰後，為探索兩者之間的關係，陸續檢查曾經被中國醫藥學院附設醫院診斷為神經母細胞瘤的 15 名病患，以原位雜交法偵測其微小病毒 B19 及 NS1 基因表現，發現有 11 名為陽性(75.33%，11/15)，而 4 名反應不為陽性者，年齡皆已超過 34 歲；另外，將 4 名 *N-myc* 放大的病人以原位雜交偵測他們的微小病毒 B19 及 NS1 基因表現全數為陽性(100%，4/4)(表 1)。之後，我們將罹患神經母細胞瘤的小兒科病人和他們的母親體內的 PVB19 隔離出來，確認這些 PVB19 的 NS1 區域突變(表 2)。

第一對染色體短臂對神經母細胞瘤的遺傳是重要的；經由細胞株[121]和原發性腫瘤的細胞遺傳學分析，第一對染色體一再發生缺失的高頻率已被確認，隨後的細胞遺傳學分析[122]高頻率的缺失和第一對染色體短臂的重排直到最近，這些特徵被認為是神經母細胞瘤腫瘤基因畸變中最常見的。因為單純的尾端缺失及不平衡重排，個體第一對染色體短臂的末端片斷被另一染色體替換。細胞遺傳學研究顯示位於第一對染色體短臂有一範圍非常大的斷裂點，此斷裂點從第一對染色體短臂第 2 區第 2 染色條帶(1p22)到第一對染色體短臂第 3 區第 6 染色條帶(1p36)。第 1 對染色體短臂第 3 區第 6 染色條帶小區域極小部分缺失(interstitial deletions)的病人，大多數年齡小於 1 歲，相對的，病人帶有第 1 對染色體短臂第 3 區第 2 染色條帶末端缺失者，大多超過 1 歲，且經常伴隨有 *N-myc* 的增幅。

鑑別第一對染色體短臂的重排及缺失是重要的，但並非特定針對神經母細胞瘤(非特異性)，但是人類惡性腫瘤有具範圍非常大的特徵，包含固態腫瘤和血液腫瘤兩者[123,124]。隨之而來於神經母細胞瘤中第一對染色體短臂的異常出現，確定與腫瘤未切除及轉移有關。反之，局部和臨床較有利(溫和)的腫瘤顯示它的第一對染色體是完整無缺(無斷裂或缺失)[125]。此外，第一對染色體短臂的缺失與不利的臨床有關，基因顯示如：*N-myc* 基因的增幅(圖 6A-D)。

N-myc 基因的增幅變成許多研究的焦點。*N-myc* 基因的增幅於體外被確認是神經母細胞瘤的慣常特徵。一般而言，*N-myc* 為神經母細胞瘤基因組的一種固定且穩定的特徵，但是 *N-myc* 基因增幅與否，不會改變腫瘤的發育。*N-myc* 基因的增幅，究竟如何與後期疾病相關聯，顯示於 Brodeur 等人[126]的研究上。*N-myc* 基因的增幅，在第三期和第四期 48 例腫瘤中偵測到 24 例有這樣的現象；但在第一期和第二期 15 例腫瘤中全數偵測不到 *N-myc* 基因的增幅。很多個研究[127, 128]隨後確認與此種進行性疾病的關聯，而且 *N-myc* 基因增幅倍數多的時候，其致命性愈高。在 Seeger 等人[129]的存活率分析，腫瘤病人有正常的 *N-myc* 者，腫瘤在 18 個月內復發者，有 70% 之無疾病存活率，與其他腫瘤病人之無疾病存活率為 30% 及 5% 者比較，顯示它們分別有 3-10 或大於 10 個的腫瘤基因複本。*N-myc* 的增幅與臨床期別有不利的關聯：增幅在前期疾病(II)與治療失敗有連鎖關係，反之，正常的 *N-myc* 在第三期及第四期腫瘤的腫瘤消去、病癒有關聯。*N-myc* 的增幅，可以強烈意味著神經母細胞瘤的惡性侵犯，並可以建立起一種對高危險群檢測的有力臨床標記。到目前為止，*N-myc* 是腫瘤基因唯一的特徵，可以被用來當做神經母細胞瘤臨床試驗治療層級的一個根據[130, 131]。兩種優勢的技術，可以視臨床的目的而應用於常規檢測 *N-myc*。腫瘤 DNA 的分子分析是藉由南方點漬法，這種技術已被廣泛的使用，而 genomic PCR 的優點是與南方點漬法需使用

5-10 μg 的 DNA 來比較，它所需的腫瘤 DNA 僅約 100 ng 即可[132,133]。上面提到的兩種技術都可以提供 *N-myc* 基因複本數的定量資訊。

分裂間期螢光原位雜交法使用cosmid或酵母菌人工染色體(YAC)探針[134]。此結果通常和分子分析一樣具有很高的一致性，但是螢光原位雜交法有數種優點：它只須非常微量的腫瘤材料，因為螢光原位雜交法可以迅速地將腫瘤輕壓於玻片上，以細針頭吸取[135]及石蠟包埋組織切片[136]，更重要的是螢光原位雜交法的結果是以單個細胞層次呈現，因此，比南方點漬法分析更加敏感。例如，高程度的基因增幅僅出現在少數細胞，或許因為非惡性細胞存在於腫瘤檢體內，經由分子分析時，低程度的增幅或無增幅可能導致誤判，但經由螢光原位雜交法則能既迅速又明確地得到我們所要的結果[137](圖6A-D)

以往的研究載明，在帶有 EB virus 及 Burkitt' s lymphoma 的病患身上，有比較高的機率能檢測到 *myc* 基因的增幅[138,139]。雖然，EB virus 和人類許多良性和惡性淋巴增生的發病有關。這些腫瘤的特徵是藉由 *c-myc* 腫瘤基因從正常的第八對染色體位置易位到免疫球蛋白(Ig)的重鏈和輕鏈的區位導致 *c-myc* 基因的增幅。在地區性的 Burkitt' s lymphoma 中，典型的易位區域含有參與免疫球蛋白基因的 V(D)J 區域(V(D)J joining)的重組訊息序列。在偶發性的 Burkitt' s lymphoma 中，*c-myc* 基因易位到免疫球蛋白重鏈開關區[S]，此涉及開關區的重組。而在體外，EBV 在 B 細胞內潛伏感染，它受到 V(D)J 的重組影響，並能刺激這些細胞(B cell)增生和表現出細胞活化特徵的標記。這種現象引出一個是否 EBV 感染可能活化開關(switch)重組活性的問題，它可能為 *c-myc* 基因於偶發性 Burkitt' s lymphoma 易位的原因。EBV 可以誘導開關(switch)重組活性，因為 EBV 基因組內竟含有一個與免疫球蛋白重鏈開關區類似的區段，此區段屬於 BamHI W repeats，是由一個 3kb 片段富含 G 具 9-11 個前後重複的序列所組成，且此片段很頻繁的涉及 EBV 基因組的重排[140,141]。除了基因的增幅和易位外，病毒蛋白能夠經由和 *bcl-2* 或 *p53* 的作用將細胞凋亡路徑(apoptosis pathway)當作目標 (targeting)。事實上，除 EBV 外，其它的病毒如人類疱疹病毒第 8 型(HHV8)，乳頭狀病毒(papillomaviruses)，SV40，B 型肝炎病毒(hepatitis B virus)，C 型肝炎病毒(hepatitis C virus)等，也有相似的作用。比較特殊令人感興趣的是小病毒，如 SV40，B 型肝炎病毒(hepatitis B virus)，C 型肝炎病毒(hepatitis C virus)等，以及有較大破壞性的病毒，如 EBV，人類疱疹病毒第 8 型(HHV8)及乳頭狀病毒(papillomaviruses)，也有著相同的作用。值得更進一步注意的是人類微小病毒 B19 之 NS1 基因中的一小段 DNA，與乳頭狀病毒(papillomaviruses)解旋 基因(nelicase)及細胞的 ATPase 具有相同序列。(表 3)

二、討論

到目前為止關於神經母細胞瘤的病因瞭解還不是很多，在臨床和生物學的特徵方面已經知道的有：發生於非常早期的年齡、自發性復原、*N-myc* 的放大、高多倍體(hyperploidy)及第 1 對染色體短臂上的 LOH 等。神經母細胞瘤的病因已引起了很大的關注[142]。

大約有 1-2% 罹患神經母細胞瘤的病人具有家族性病史[143]。罹患家族性神經母細胞瘤的病人經常於胎兒中就被診斷出來，並且具有多個原發性腫瘤，這顯示生殖細胞系(germline)中任何一個細胞突變出現於一腫瘤抑制基因中的一個等位基因(one allele) 上[144,145]。

幼童合併帶有神經母細胞瘤及 opsoclonus-myoclonus syndrome 比不帶有 opsoclonus-myoclonus syndrome 者，具有較不利的長期併發症[146]。臨床上以高劑量的靜脈注射人類免疫球蛋白及促腎上皮質刺激荷爾蒙激素 (ACTH)，已顯示可有效降低 opsoclonus-myoclonus syndrome 伴隨的神經母細胞瘤[147]。神經母細胞瘤臨床上所看到的轉移現象，被認為與細胞增生、分化及細胞凋亡之間的競爭性交互作用有關[148]。

微小病毒B19感染與疾病

微小病毒B19感染的疾病其表現形式已廣為人知，它們所顯示出病人的免疫學和血液學上的變化範圍相當大。微小病毒B19感染會產生短暫血球再生性不良[149]及懷孕期間急性病毒感染的傷害。然而，在已發表的文獻皆討論「它如何影響胎兒?」，如流產或水胎[150-152]，並無報告強調「母體」層次，尤其是母親懷孕後期的三個月。我們的初步發現明白的指出，在懷孕期間感染微小病毒B19的母親，也一樣會受到傷害[圖5]。現今的證據顯示，懷孕的婦女由於紅血球生成的作用活躍，可能更容易受到微小病毒B19感染的傷害[153]，經由對病人紅血球的傷害增加，並發展成 子癲前症(preeclampsia)、子癲症(eclampsia)、HELLP 症候群、微血管溶血性貧血microangiopathic hemolytic anemia (MAHA)，使她們的身體狀況更加惡化。在後期，病人常被建議以血漿交換來治療[154,155]。然而困難之處是在於如何從微小病毒B19相關的貧血中去區分出微血管溶血性貧血是非常重要的。臨床的表現和紅血球的特徵很難區分兩者疾病。雖然，於骨髓的網狀紅血球計數可以提供紅血球生成的資訊。選擇傳統照護或血漿的交換仍須接受主治醫師的決定。

先前的報告描述，微小病毒 B19 感染的型式是帶有非典型的紅血球母細胞(atypical erythroblasts)。在某些研究裡，病人帶有嚴重貧血甚至對抗微小病毒 B19 的抗體也升高[156]。但是，陽性的血清數據是先前暴露於微小病毒 B19 感染的結果，並不表示當時正感染病毒，值得注意的是這些病人病毒血持續期間相當短，少於 1 週，而且我們在自願測驗者身上研究的結果都是一致的。因此，單一的檢查並不足以能測定病毒的存在，需要以一連串檢查才能證明病毒的存在，特別是當病人帶有惡質化的貧血(cachsia)時。因為紅血球母細胞是微小病毒 B19 攻擊的目標，檢查骨髓抹片可以提供更多疾病表現的資訊，尤其包括病毒感染，這些並不是只用骨髓細胞的細胞學特徵就可以顯示出來的。

然而，紅血球生成異常所表現出來的並不止如此而已。就整體而言，它可反映在全身性臨床反應上，例如，疾病的發作(seizures)、腎功能的損害及血清中肝臟酵素濃度的升高。此外，紅血球母細胞(normoblast)的發育障礙，病毒的檢測及細胞凋亡的活化更進一步意味宿主因素與紅血球生成不良的過程可能糾纏紛雜。事實上，除了紅血球細胞外，病毒的存在也發現與血小板生成作用(megakaryocytopoiesis)[157]有關。此外，Cooling 等人更進一步於腎臟、肝臟和腸組織[158]檢測到微小病毒 B19 受體—圓球糖 (globosides, neutral glycosphingolipids)。據推測，微小病毒 B19 感染扮演了一個重要的角色，它與高血壓，引起腎功能障礙有關。如同上文所提到的，微小病毒 B19 基因組中病毒基因數目有限；目前，病毒基因表現的控制及宿主如何與病毒複製的交互作用仍不清楚，而依序檢測疾病的表現形式，及病毒訊息的出現表示病毒已經可以在這些器官中複製。

在病毒與人類癌症的關聯性研究當中，EBV 促成變異基因為 EBNA-5 及 LMP-1，它可能的機轉為與 p53 或 pRB 蛋白質結合使它們失去活性，或增加 bcl-2 以抑制細胞凋亡。而巨細胞病毒與罹患第 4 期神經母細胞瘤病患之復發有關[159]。巨細胞病毒感染會降低免疫細胞及自然殺手細胞的活性；換句話說，巨細胞病毒是擔任一個居間策導免疫的病原角色。除此之外，巨細胞病毒能夠調控神經母細胞的功能特性，並藉與內皮細胞的相互作用進而轉移，所以它也被認為是導致神經母細胞瘤發展進程的可能因子[160]。至於 EV 71 除了造成口足手症(HFMD)、腦炎及腦膜炎等疾病外，很少有報告提及它與癌症的關聯性。而微小病毒 B19 於體外(in vitro)只會在骨髓的紅血球先驅細胞(erythroid precursors)及胎兒的肝細胞中複製，它可以導致正常胎兒的紅斑性感染(erythema infectiosum)，又稱為 fifth disease(第五病)，它也會造成慢性溶血性疾病(chronic hemolytic anemia)及無血球增生的危機(aplastic crisis)。

對於免疫抑制的病人會產生持續性的紅血球化生不良(persistent pure RBC aplasia)，也就是不會製造紅血球；而在懷孕婦女子宮內微小病毒 B19 的感染容易造成自發性的流產(spontaneous abortion)。微小病毒 B19 感染除了對胎兒造成影響外，對母親一樣具有傷害，它會造成懷孕婦女出現短暫性血紅素減少(圖 1A-C)。目前的證據顯示，可能是因為在懷孕期間，懷孕的婦女由於紅血球生成的活性增加，可能更容易會受到微小病毒 B19 感染的傷害。我們的研究爲了追蹤這些帶有微小病毒 B19 病毒血的懷孕婦女它們所生胎兒的病毒感染情形，卻意外地在其中一名三個月大女嬰診斷出神經母細胞瘤。而我們是以超音波、斷層攝影、核磁共振正面攝影(Frontal MRI)(圖 2)來證實此女嬰確定罹患神經母細胞瘤，她們出現多發性(multifocal)。經由病理組織學診斷放大 200 倍後，我們發現典型的癌巢；以及經螢光原位雜交法偵測到 *N-myc* 的增幅(圖 6)。

肆、結論與應用

腫瘤的發生是由環境與遺傳因素共同決定的。環境中的致癌因子只有透過改變遺傳物質的結構或功能才能使正常細胞轉變成癌細胞。神經母細胞瘤中，小於 1 歲具有前期疾病的患者，常有自發性復原的現象，特別是第 IVs 期腫瘤病患最具有自發復原的優勢[161,162]，大致上是和遲緩型細胞凋亡(delayed apoptosis)有關[163]。另外，第 1 對染色體短臂缺失(delete)與 LOH、HSR 與 DMC 的出現和其它相關的變異具有精確預後能力，特別是 *N-myc* 的增幅現象，仍然有爭議性。

但是影響人體的外在因素，例如生活方式、飲食、環境和藥物等化學及物理致癌因子有些並不會直接攻擊 DNA，它們本身並不是強力的致變劑。而且通常突變沒有機會能傳到下一代的生物體中，只有屬於[生殖細胞系](germ line)的細胞，它們所產生的突變才會傳到後代。身體其他部位的體細胞發生的突變並不會傳到後代，而且顯然體細胞突變是引發癌症的關鍵因素。至於流行病學的研究是既缺乏統計學上強而有力的論據以證明上述這些是危險因子，隨後的研究也還未證實。

眾所皆知的是，細胞癌化往往需要多個原型腫瘤基因的協同作用，要經過階段式的演變及一系列突變的累積效應，這包括腫瘤抑制基因，也可能包括至少一個腫瘤基因。通常的情形是一個腫瘤基因啟動，加上腫瘤抑制基因失去了作用而產生癌症。所以啟動的腫瘤基因和腫瘤抑制基因失去作用加在一起，才會產生了癌症。而物理和化學致變劑攻擊細胞基因時是漫無目標的，全憑機會。而攻擊的重要目標基因(腫瘤基因、腫瘤抑制基因)，如原型腫瘤基因，只佔基因組的極小部分，要打到這些目標的機會很小。

神經母細胞瘤的兒科患者，據推測可能先發生 *N-myc* 單獨或協同其它原型腫瘤基因的增幅導致細胞轉形。另外，因為在形成受精卵時就可能已具有其中一種突變，受精卵分裂時，突變也就傳到子細胞中，於是胚胎裡所有細胞都帶有這個突變。之後在體細胞中再以同型重組的方法，造成 LOH，使關鍵腫瘤抑制基因失去，使得轉形細胞步向癌化的階段。

如上所述，流行病學中有關的化學、物理因子，因為某些因子並非是很強的致變劑，而少數為致變劑的因子，攻擊 DNA 而造成原型腫瘤基因突變的效率也不高；再加上流行病學的研究缺乏統計學上強而有力的論據來證明，所以排除掉此一因子後，讓我們聯想到是否和病毒促成的變異有關。

在這次的研究中，偵測罹患神經母細胞瘤病人的病毒感染，除了微小病毒 B19 (PVB19) 外，並無發現 EBV、CMV 及 EV71 的感染。其中 EBV 導致之鼻咽癌或 Burkitt's 淋巴瘤等疾病似乎具有地域性。特別是 Burkitt's 淋巴瘤於非洲地區由於居民長期飽受瘧疾及寄生蟲的侵襲，而導致他們的免疫系統疲乏，而使得 EB 病毒有機可乘。而關於巨細胞病毒，有研究指出[164]，它與罹患第 4 期神經母細胞瘤病患的復發有關。它可能是抑制免疫系統的因素之一；並能夠調控神經母細胞的功能特性，並藉與內皮細胞的相互作用進而轉移，所以它也被認為是導致神經母細胞瘤發展進程的可能因子[165]。至於微小病毒 B19 是不經意地在懷孕期間被確認出有短暫性病毒血症的婦女中，追蹤到神經母細胞瘤存在於其中一名婦女所生出的三個月大的女嬰體內(視結果，圖 1A-C)。並且進一步以原位雜交法證實，該名女嬰亦出現微小病毒 B19 的感染(圖 4)。另外，曾罹患神經母細胞瘤又經中國醫藥學院附設醫院追蹤的 15 名病患中(視表 1)，經由螢光原位雜交檢測 PVB19 病毒及偵測 NS1 基因表現，竟有高達 73.33%(11/15)的病人為陽性反應。如果排除編號 12 至 15 號病患(皆為 34 歲以上)，則陽性率達 100%，而且病人全部集中於 10 歲以下之孩童及三歲以下之幼兒，這個數據與罹患神經母細胞瘤孩童的年齡層是不謀而合的，所以孩童及胎兒微小病毒 B19 (PVB 19)的感染，尤其為懷孕後期三個月的感染[因懷孕早期感染往往造成水胎(hydrops)，造成胎兒的死亡]與罹患神經母細胞瘤有相當強的關聯性。究竟應該是神經母細胞瘤破壞免疫系統或降低免疫能力，才造成微小病毒 B19 的易感染性；或者是微小病毒 B19 本身就是誘發神經母細胞瘤形成的要角，此機轉目前並不清楚，在文獻上也沒有類似的報告。據推測微小病毒 B19 之致癌蛋白，可能會與人體內原有存在的 p53 及 Rb 抑癌蛋白結合，而中和其具有抑制細胞生長分化的功能；或者影響細胞內數種與調節細胞的生長與死亡有關之重要訊息傳導路徑。微小病毒 B19 與神經母細胞瘤的緊密關係，至少可以提供一個往後針對神經母細胞瘤與病毒感染關聯性的研究，以及提供一個有力的診斷標記。臨床上也可以藉此標記迅速診斷出初期的病人，適時給予最合適的治療，以防止因為病毒感染而造成腫瘤危害的加劇。

其實，對剛懷孕的孕婦是否建議施打疫苗或適婚婦女建議施打此種病毒之疫苗，以防止胎兒感染病毒，而造成先天性的貧血或引起神經母細胞瘤，是下一階段值得繼續研究的目標。

圖 1A. 帶有 preeclampsia/eclampsia 和貧血病患血紅素之波動數據表。

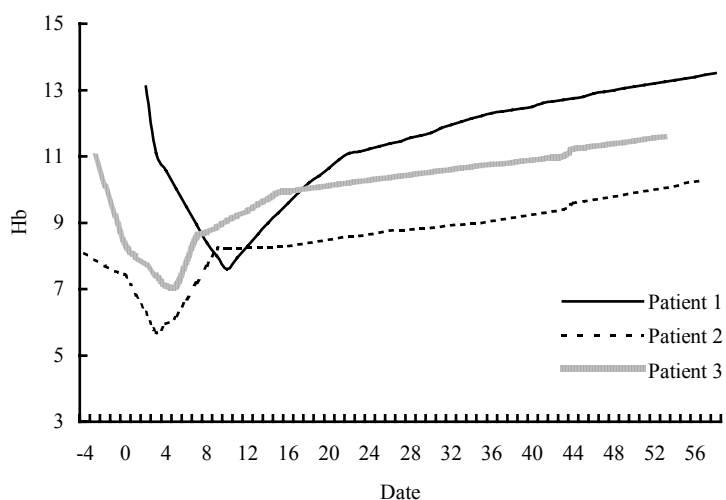


圖 1A.顯示三名病患分別於第 4、5、10 天呈現嚴重的短暫性血紅素減少症，其血紅素值分別為 5.5 gm/dl、7.0 gm/dl 及 7.5 gm/dl。比較不尋常的是其中 1 名病人，於胎兒出生後四天其血紅素值低到僅約 5.5 gm/dl。

圖 1B 和 C. 暫時性微小病毒 B19 病毒血症出現於帶有 preeclampsia/eclampsia 及貧血病人中。

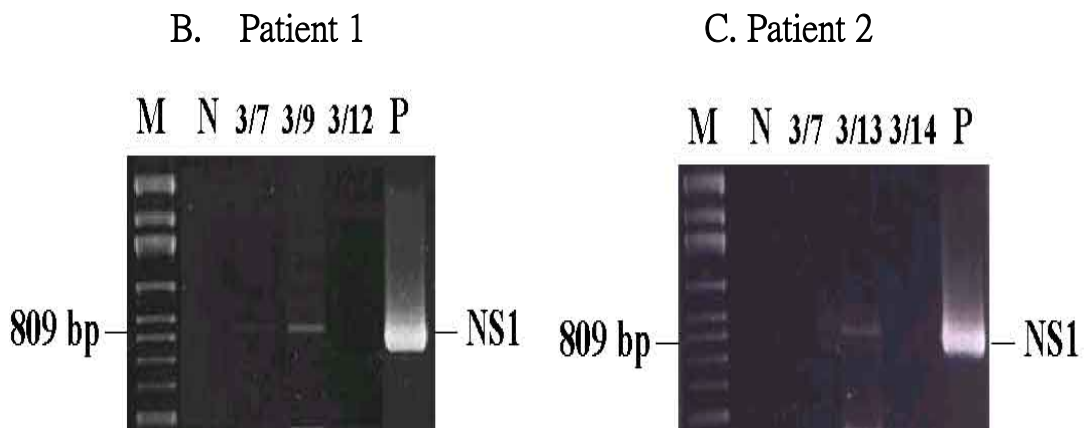
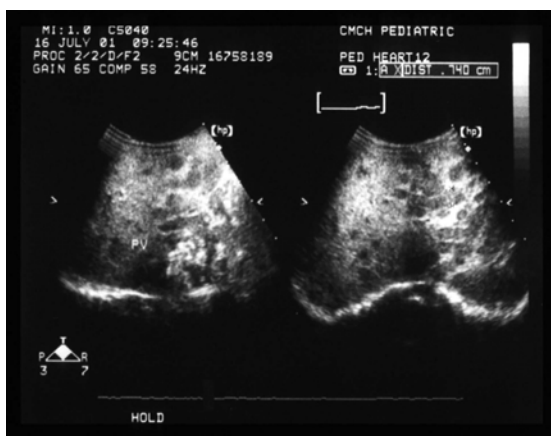


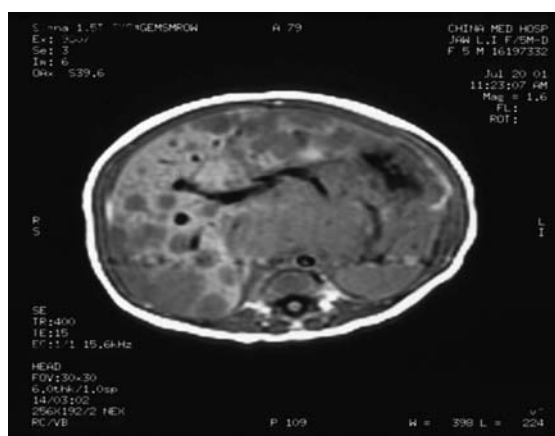
圖 1B 和 C. 顯示病患 1 及病患 2，利用 2.0% agarose-ethidium bromide gel 來解析，分別於 3 月 9 日及 3 月 13 日偵測到微小病毒 B19 增幅的 809 鹼基配對(primer NS1-NS2)的特定產物。M 為 marker，P 為 positive control，N 為 negative control。

圖 2. 超音波、斷層攝影及核磁共振顯示出神經母細胞瘤 multifocal 的存在。

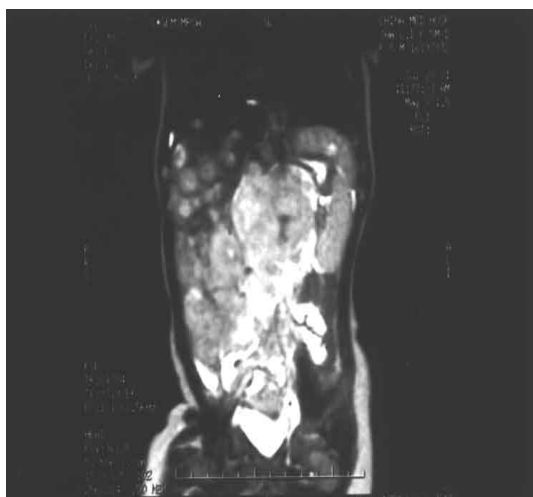
A. 超音波



B. 斷層攝影



C. Frontal MRI



D. C 的放大

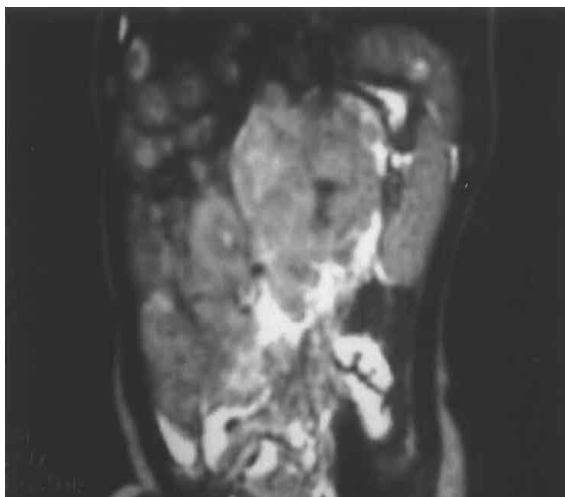


圖 2. 以超音波、斷層攝影及核磁共振顯示該名三個月大女嬰出現 multifocal 的存在。

圖3. 經由病理組織學診斷神經母細胞瘤的圖像 (x200)

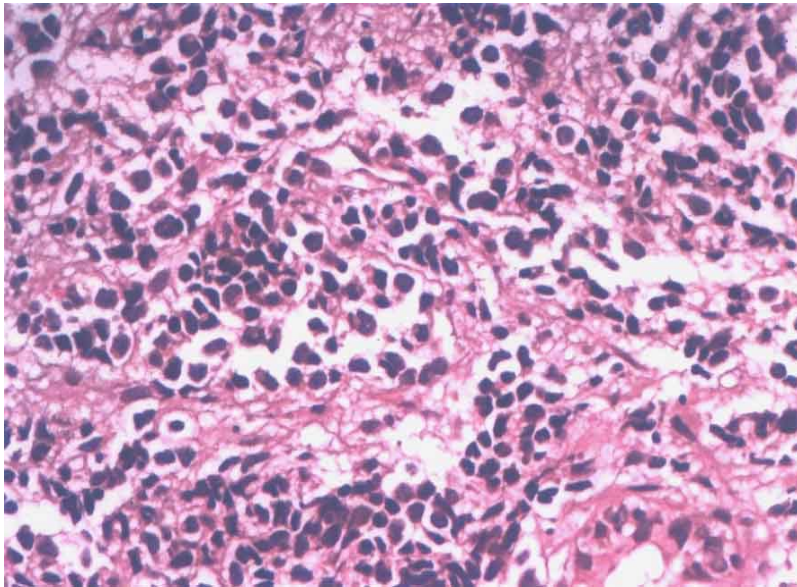
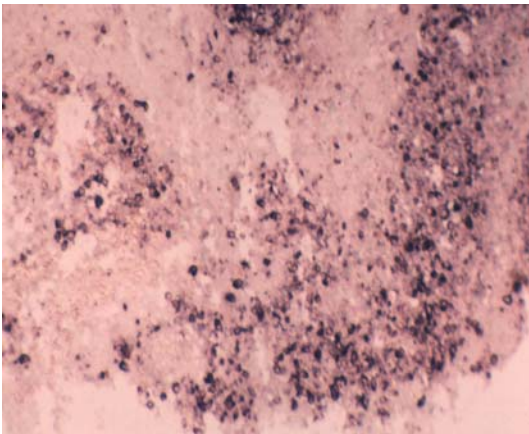


圖3. 經由病理組織學診斷，發現該名三個月大女嬰出現多個典型的癌巢。(上圖經放大 200 倍)

圖 4. 以原位雜交法呈現之微小病毒 B19 存在於神經母細胞瘤細胞中的圖像

A. (×200)



B. (×1000)

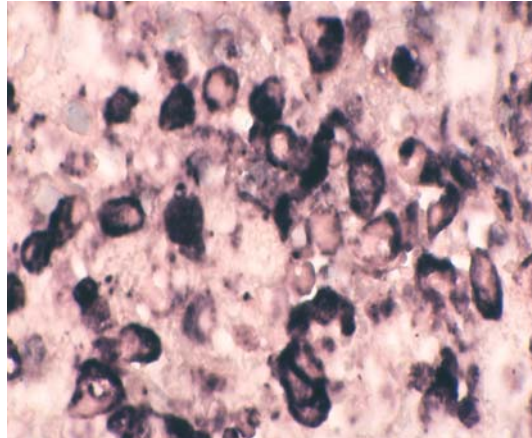


圖 4. 於圖中，以原位雜交法呈現之圖像，證實該名三個月大女嬰神經母細胞瘤的細胞中，出現微小病毒 B19 的感染。

圖 5. 在骨髓中，於後續不同的日期呈現微小病毒 B19 訊號的出現及活化的 caspase 3。
微小病毒 B19/原位雜交

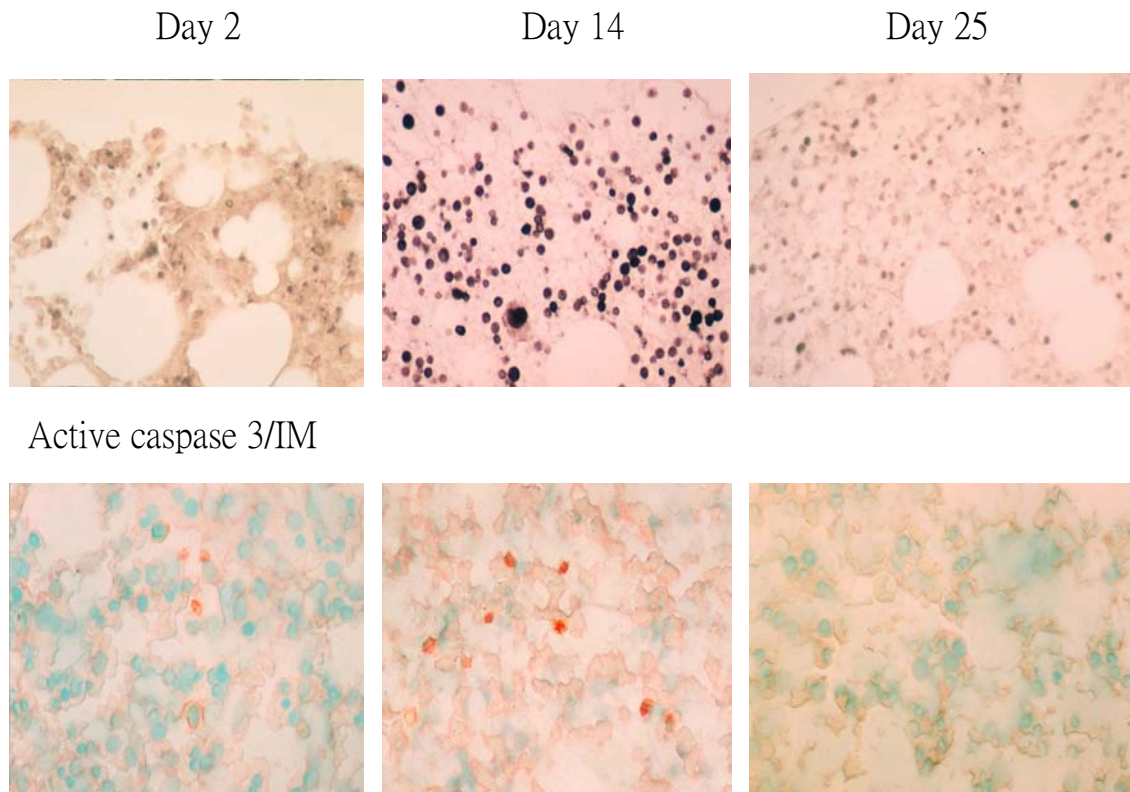
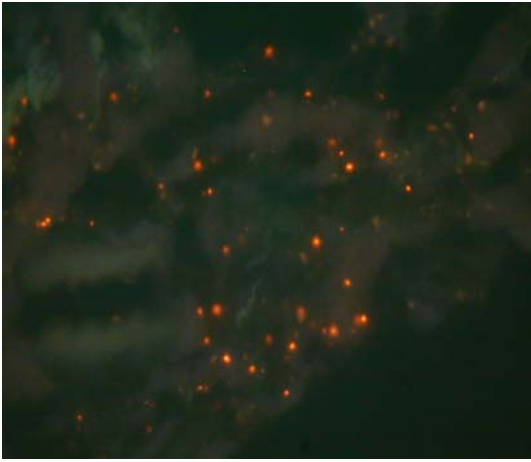


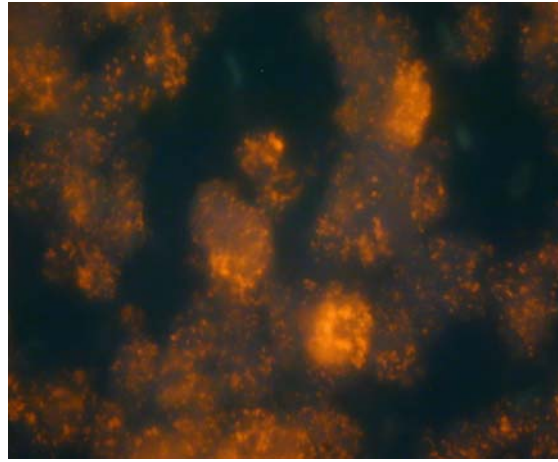
圖 5. 於後續不同的日期(第 2 天、第 14 天、第 25 天)，以原位雜交法呈現微小病毒 B19 訊號的出現及以免疫細胞化學法偵測到活化的 caspase 3 (深紅色顆粒為陽性)。

圖 6. 罹患神經母細胞瘤的病人經由螢光原位雜交法偵測 *N-myc* 的增幅。

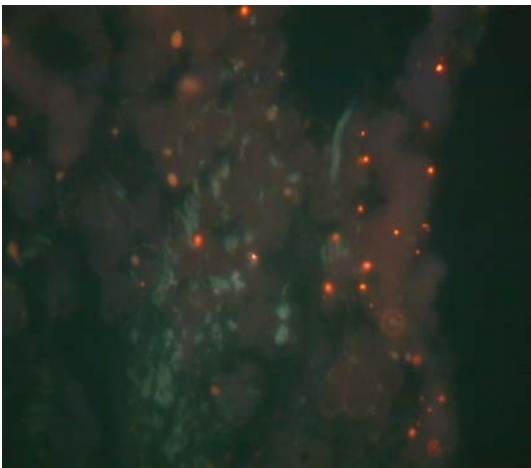
A. normal



B. *N-myc* amplification



C. normal



D. *N-myc* amplification

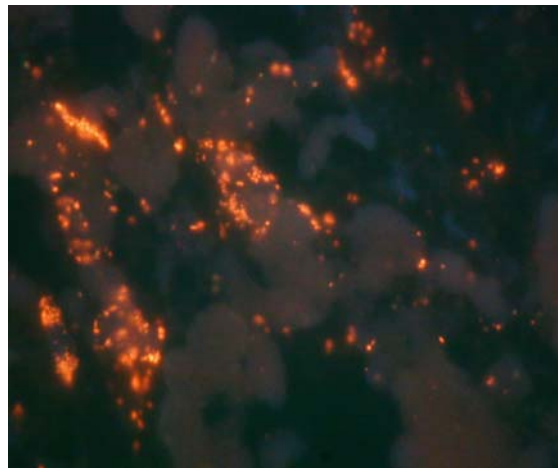


圖 6. 罹患神經母細胞瘤的病人，經以螢光原位雜交法偵測 *N-myc* 的增幅 (圖 6B 和 6D)。

No.	Age	Gender	Diagnosis	PVB19 virus		Gene expression				
				PCR	ISH	NS1	VP1/2	N-myc	IL-6 ^h	IL6R α ⁱ
1	3 m	F	NB ^b	+ ^d	+	+ ^f	-	NA ^g	+	-
2	10 m	F	NB	+ ^d	+	+ ^f	-	NA	+	-
3	66 m	M	NB	-	-	-	-	Amplified	-	-
4	36 m	F	NB	-	+	+	-	NA	+	-
5	48 m	F	NB	-	-	-	-	Amplified	-	+
6	10 yr ^a	F	NB	ND ^e	+	+	-	NA	+	-
7	45 m	F	NB	ND	+	+	-	NA	+	-
8	47 m	F	NB	ND	-	-	-	NA	-	+
9	32 m	M	NB	ND	+	+ ^f	-	Amplified	+	-
10	24 m	F	NB	-	-	-	-	NA	-	-
11	27 m	M	NB	+	+	+	-	Amplified	+	-
12	43 yr	M	ONB ^c	-	-	-	-	NA	-	-
13	46 yr	F	ONB	-	-	-	-	NA	-	-
14	34 yr	F	ONB	-	-	-	-	NA	-	-
15	44 yr	M	ONB	-	-	-	-	NA	-	-

^aPatient # 6 had spontaneous remission of neuroblastoma at age of two. B: Neuroblastoma; ^bNB:

Neuroblastoma; ^cONB: Olfactory neuroblastoma; ^d+: positive, and the presence of PVB19 was determined by PCR amplified fragments and DNA sequencing; -: negative; ^eND: not done;

^fRT-PCR amplified sequence had been submitted to NCBI. ^gNA: not amplified; ^hExpression of IL-6 mRNA was detected by ISH; ⁱIL-6R α was detected by IHC.

表 1：罹患神經母細胞瘤的小兒科病人他們的一些臨床特徵 PCR， ISH 和 IHC 的結果。

Codon	Type of mutation in the codon	Effect	Frequency
205	AAT → ATT	Asn → Ile	1/5
223	TTG → CTG	Leu → Leu (silent)	5/5
272	ACA → ACT	Thr → Thr (silent)	5/5
276	CTA → TTA	Leu → Leu (silent)	5/5
305	TTA → TTG	Leu → Leu (silent)	5/5
365	GGG → GGA	Gly → Gly (silent)	5/5
386	GCC → GCT	Ala → Ala (silent)	5/5
465	ACA → ACG	Thr → Thr (silent)	5/5
466	TGG (deletion)	Trp (deletion)	5/5

表 2：將罹患神經母細胞瘤的小兒科病人和他們的母親體內的 PVB19 隔離出來，確認這些 PVB19 的 NS1 區域突變。

表 3、NS1 序列和 Papillomavirus 及 ATPase 的比較

PSSMs producing significant alignments:	Score E (bits) value
gnl Pfam pfam01057 Parvo_NS1, Parvovirus non-structural protein NS1	324 8e-90
gnl Pfam pfam00519 E1, Papillomavirus helicase	43.5 4e-05
● gnl Pfam pfam00004 AAA, ATPase family associated with various cellular activities...	42.7 6e-05

[gnl|Pfam|pfam01057](#), Parvo_NS1, Parvovirus non-structural protein NS1.

Add sequences

most similar to the query

CD-Length = 273 residues, 99.6% aligned
Score = 324 bits (831), Expect = 8e-90

Query: 210 **TKASIKFQTMVNWLCENRVFTEDKWKLVDFNQYTLSSSHSGSFQIQSALKLAIYKATNL** 269
Sbjct: 2 **SKKSVSFSTLVDFWLDIRGVFTEDWISRSDSDAYASLSASPNGSKQIKRALAMARKKIAAT** 61

Query: 270 **VPTSTFLLHTDFEQVMCIKDNKIVKLLLCQNYDPLLVGQHVLRKWKIDKKCGKNTLWFYGP** 329
Sbjct: 62 **KTAFDFLLHKDAEFDISNTGNRRYQLLLTQGYNPTYAGAALDTWLGKQGGKRNTLWFYGP** 121

Query: 330 **PSTGKTNLAMAIAKSVVYGMVWNNENFPFNDVAGKSLVWVDEGLIKSTIVEAAKAILG** 389
Sbjct: 122 **AGTGKTNIAQAIAHAVPLVYGMVWNNENFPFNDVAGKSLVWVDEGLIKSTIVEAAKAILG** 181

Query: 390 **GQPTRVDQKMRGSAVAVPVPVITSNGDITFVVSNGNTTIVHAKALKERMVKNLFTVRC** 449
Sbjct: 182 **GQDIRVDQKCKGSVEISPTPVIITSNTDITFVVLGNSTTNEHARPLKDRMYNINLTKTLP** 241

Query: 450 **PDMGLLTEADVQQLTWCAQSWDHYENWAIN** 481
Sbjct: 242 **PDFGLITKDEIKQFLAWARNPNPNSVRVTHEFP** 273

[gnl|Pfam|pfam00519](#), E1, Papillomavirus helicase.

Add sequences

most similar to the query

CD-Length = 431 residues, only 29.9% aligned
Score = 43.5 bits (101), Expect = 4e-05

Query: 292 **IVKLLLCQNYD--PLLVGQHVLRKWKIDKKCGKNTLWFYGGPSTGKTNLAMAIAKSV--PV** 347
Sbjct: 233 **IVKFLRYQGIIEFIFLS---ALKLFLKGIKKNCVLYGPPNTGKSYFCMSLIKFLGGKV** 289

Query: 348 **YGMVWNNENFPFNDVAGKSLVWVDEG--IIKSTIVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSAV** 405
Sbjct: 290 **ISFVN-SKSHFWLQPLADAKVALLDATDACWTYIDTYLRNALDGNPVSIDRKHRLVQI** 348

Query: 406 **PGVPVITSNGDI** 418
Sbjct: 349 **KCPPLLITSNIDI** 361

● [gnl|Pfam|pfam00004](#), AAA, ATPase family associated with various cellular activities (AAA).

Add sequences

most similar to the query

CD-Length = 186 residues, only 30.6% aligned
Score = 42.7 bits (99), Expect = 6e-05

Query: 326 **FYGGPSTGKTNLAMAIAKSVVYGMVWNNENFPFNDVAGKSLVWVDEGLIKSTIVEAAK** 385
Sbjct: 4 **LYGPPGTGKTLAKALAKEL-----GVPFIEISGSELLSKYVGESEKLVRLFS** 52

Query: 386 **AILGGQPT** 393
Sbjct: 53 **LARKSAPC** 60

表 3、顯示微小病毒 B19 NS1 某些 DNA 序列和 Papillomavirus 之解旋 及 ATPase 有相同序列(紅色字部分)。

伍、參考文獻

1. Castleberry RP. Paediatric update: neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997;**33**:1430 – 7.
2. Cancer Medicine e.5, Section 39. Neoplasms in Children, 139D. Neuroblastoma, Diagnosis and Staging, Signs and Symptoms.
3. Cotterill SJ, Pearson ADJ, Pritchard J. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992, *et al.* *Eur J Cancer* 2000;**36**:901 – 8.
4. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, *et al.* Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 1999;**86**:349 – 63.
5. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, *et al.* The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 1999;**86**:364 – 72.
6. Goodman MT, Gurney JG, Smith MA, Olshan AF. Sympathetic nervous system tumors. In: Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER program 1975-1995. NIH Pub. No. 99-4649. Edited by LAG Ries, MA Smith, JG Gurney *et al.* Bethesda, MD: *National Cancer Institute*, 1999; 65-72.
7. S Kramer, E Ward, AT and Meadows, and KE Malone. Medical and drug risk factors associated with neuroblastoma: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 1987; 78: 797-804.
8. JA Schwartzbaum. Influence of the mother's prenatal drug consumption on risk of neuroblastoma in the child. *Am J Epidemiol.* 1992;**135**: 1358-1367.
9. Michalek AM, Buck GM, Nasca PC *et al.* Gravid health status, medication use, and risk of neuroblastoma. *Am J Epidemiol* 1996; **143**:996-1001.
10. H Kinney, R Faix, and J and Brazy. The fetal alcohol syndrome and

neuroblastoma: *a case-control study Pediatrics* 1980; **66**: 130-132.

11. AT Look, FA Hayes, and R Nitschke *et al.* Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 1984; **311**: 231-235.
12. T Gansler, J Chatten, and M Varello *et al.* Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma . Correlation with histology and clinical outcome. *Cancer* 1986; **58**: 2453-2458.
13. AT Look , FA Hayes , and JJ Shuster *et al.* Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-*myc* gene amplification in childhood neuroblastoma: Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991; **9**: 581-591.
14. LC Bowman , RP Castleberry , and A Cantor *et al.* Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a Pediatric Oncology Group study. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**: 373-380.
15. Look AT, Hayes FA, Nitschke R, *et al.* Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 1984;**311**:231 – 5.
16. Gansler T, Chatten J, Varello M, *et al.* Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma. Correlation with histology and clinical outcome. *Cancer* 1986;**58**:2453 – 8.
17. Brenner DW, Barranco SC, Winslow BH, *et al.* Flow cytometric analysis of DNA content in children with neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 1989;**24**:204 – 7.
18. Cohn SL, Rademaker AW, Salwen HR, *et al.* Analysis of DNA ploidy and proliferative activity in relation to histology and N-*myc* amplification in neuroblastoma. *Am J Pathol* 1990; **136**:1043 – 52.
19. Naito M, Iwafuchi M, Ohsawa Y, *et al.* Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma: prognostic significance of DNA ploidy in unfavorable group. *J Pediatr Surg* 1991;**26**: 834 – 7.
20. Huddart SN, Muir KR, Parkes SE, *et al.* Retrospective study of prognostic

value of DNA ploidy and proliferative activity in neuroblastoma. *J Clin Pathol* 1993;**46**:1101 – 4.

21. Muraji T, Okamoto E, Fujimoto J, *et al.* Combined determination of N-*myc* oncogene amplification and DNA ploidy in neuroblastoma. Complementary prognostic indicators. *Cancer* 1993; **72**:2763 – 8.
22. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, *et al.* Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-*myc* gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991; **9**:581 – 91.
23. Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, *et al.* Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. *Cancer Res* 1987; **47**:311 – 18.
24. Hayashi Y, Kanda N, Inaba T, *et al.* Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1. *Cancer* 1989; **63**:126 – 32.
25. Moorman AV, Clark R, Farrell DM. Probes for hidden hyperdiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; **16**:40 – 5.
26. Brodeur GM, Hayes FA, Green AA, *et al.* Consistent N-*myc* copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res* 1987; **47**:4248 – 53.
27. SB Bordow, MD Norris, and PS Haber *et al.* Prognostic significance of N-*myc* oncogene expression in childhood neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1998; **16**: 3286-3294.
28. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Human N-*myc* gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature* 1985; **316**:160 – 2.
29. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, *et al.* Targeted expression of MYCN

- causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J* 1997; **16**:2985 – 995.
30. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999; **17**:2264 – 79.
 31. Bordow SB, Norris MD, Haber PS, *et al.* Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1998; **16**:3286 – 94.
 32. Fong C, Dracopoli NC, White PS, *et al.* Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**:3753 – 7.
 33. Hayashi Y, Kanda N, Inaba T, *et al.* Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1. *Cancer* 1988; **63**:126 – 32.
 34. Christiansen H, Lampert F. Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br J Cancer* 1988; **7**:121 – 6.
 35. Christiansen H, Schestag J, Christiansen NM, *et al.* Clinical impact of chromosome 1 aberrations in neuroblastoma: a metaphase and interphase cytogenetic study. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; **5**:141 – 9.
 36. Gehring M, Berthold F, Edler L, *et al.* The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma. *Cancer Res* 1995; **55**:5366 – 9.
 37. Caron H, Van Sluis P, de Kraker J, *et al.* Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1996; **334**:225 – 30.
 38. Rubie H, Delattre O, Hartmann O, *et al.* Loss of chromosome 1p may have a prognostic value in localised neuroblastoma: results of the French NBL 90 Study. Neuroblastoma Study Group of the Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique (SFOP). *Eur J Cancer* 1997; **33**:1917 – 22.

39. Maris JM, Weiss MJ, Guo C, *et al.* Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000; **18**:1888 – 99.
40. GM Brodeur , JM Maris , and DJ Yamashiro *et al.* Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; **19**: 93-101.
41. JM Maris and KK Matthay. Molecular Biology of Neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 2264.
42. PS White, JM Maris, and C Beltinger *et al.* A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 5520-5524.
43. Fong CT, White PS, Peterson K, *et al.* Loss of heterozygosity for chromosome 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastoma. *Cancer Res.* 1992; **52**:1780-85.
44. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhous J, *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.* 1994; **264**: 436-38.
45. Fong CT, White PS, Peterson K, *et al.* Loss of heterozygosity for chromosome 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastoma. *Cancer Res.* 1992; **52**:1780-85.
46. Takita J, Hayashi Y, Kohno T, *et al.* Alleotype of neuroblastoma. *Oncogene.* 1995; **11**:1829-34.
47. JM Maris and KK Matthay. Molecular Biology of Neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 2264.
48. Tonin PN, Yeger H, Stallings RL, Srinivasan PR, Lewis WH. Amplification of N-*myc* and ornithine decarboxylase genes in human neuroblastoma and hydroxyurea-resistant hamster cell lines.

Oncogene. 1989; **4**:1117-21.

49. D Plantaz, G Mohapatra, and KK Matthay *et al*. Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1997; **150**: 81-89.
50. Biedler JL, Spengler BA. A novel chromosome abnormality in human neuroblastoma and antifolate-resistant Chinese hamster cell lines in culture. *J Natl Cancer Inst* 1976; **57**: 683 – 95.
51. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer K-H. Amplified DNA with limited homology to *myc* cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983; **305**:245 – 8.
52. Kanda N, Schreck R, Alt F, *et al*. Isolation of amplified DNA sequences from IMR-32 human neuroblastoma cells: facilitation by fluorescence-activated flow sorting of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**:4069 – 73.
53. Kohl, NE, Kanda N, Schreck RR, *et al*. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 1983; **35**:359 – 67.
54. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, *et al*. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to *c-myc*. *Nature* 1984; **308**:288 – 91.
55. Emanuel BS, Balaban G, Boyd JP, *et al*. N-*myc* amplification in multiple homogeneously staining regions in two human neuroblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**:3736 – 40.
56. Amler LC, Shibasaki Y, Savelyeva L, *et al*. Amplification of the N-*myc* gene in human neuroblastomas: tandemly repeated amplicons within homogeneously staining regions on different chromosomes with the retention of single copy gene at the resident site. *Mutat Res* 1992; **276**:291 – 7.
57. Corvi R, Amler LC, Savelyeva L, *et al*. MYCN is retained in single copy

at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**:5523 – 7.

58. O' Neill S, Ekstrom L, Łastowska M, *et al.* MYCN amplification and 17q in neuroblastoma: evidence for structural association. *Genes chromosomes Cancer* 2001; **30**:87 – 90.
59. Corvi R, Savelyeva L, Breit S, *et al.* Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. *Oncogene* 1995; **10**:1081 – 6.
60. Shiloh Y, Shipley J, Brodeur G, *et al.* Differential amplification, assembly, and relocation of multiple DNA sequences in human neuroblastomas and neuroblastoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**:3761 – 5.
61. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, *et al.* Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 1993; **328**:L847-854.
62. T Tanaka, E Hiyama, and T Sugimoto *et al.* A gene expression in neuroblastoma. The clinical significance of an immunohistochemical study. *Cancer* 1995; **76**: 1086-1095.
63. T Suzuki, E Bogenmann, and H Shimada *et al.* Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 377-384.
64. P Kogner, G Barbany, and C Dominici *et al.* Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* 1993; **53**: 2044-2050.
65. A Nakagawara, CG Azar, NJ Scavarda, and GM Brodeur. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 759-767.
66. GM Brodeur, A Nakagawara, and DJ Yamashiro *et al.* Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *J Neurooncol* 1997;

31: 49-55.

67. DJ Yamashiro, A Nakagawara, and N Ikegaki *et al.* Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas. *Oncogene* 1996;**12**: 37-41.
68. M Ryden, R Sehgal, and C Dominici *et al.* Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumour stage and good prognosis. *Br J Cancer* 1996;**74**: 773-779.
69. NW Kim, MA Piatyszek, and KR Prowse *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [see comments]. *Science* 1994;**266**: 2011-2015.
70. E Hiyama, K Hiyama, and K Ohtsu *et al.* Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 1997;**33**: 1932-1936.
71. CP Reynolds, JJ Zuo, and NW Kim *et al.* Telomerase expression in primary neuroblastomas. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 1929-1931.
72. C Poremba, H Willenbring, and B Hero *et al.* Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis. *Ann Oncol* 1999; **10**: 715-721.
73. WC Hahn, SA Stewart, and MW Brooks *et al.* Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells [see comments]. *Nat Med* 1999; **5**: 1164-1170.
74. V Combaret, N Gross, and C Lasset *et al.* Clinical relevance of TrKA expression on neuroblastoma: comparison with N-*myc* amplification and CD44 expression. *Br J Cancer* 1997;**75**:1151-1155.
75. V Combaret, N Gross, and C Lasset *et al.* Clinical relevance of CD44 cell-surface expression and N-*myc* gene amplification in a multicentric

- analysis of 121 pediatric neuroblastomas. *J Clin Oncol* 1996;**14**: 25-34.
76. MA Comito, VH Savell, and MB Cohen. CD44 expression in neuroblastoma and related tumors. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; **9**: 292-296.
77. L Xerri, JJ Grob, and Z Battyani *et al.* NM23 expression in metastasis of malignant melanoma is a predictive prognostic parameter correlated with survival. *Br J Cancer* 1994;**70**: 1224-1228.
78. C Hennessey, JA Henry, and FE May *et al.* Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1991; **83**: 281-285.
79. J Okabe-Kado, T Kasukabe, and Y Honma. Differentiation inhibitory factor Nm23 as a prognostic factor for acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; **32**: 19-28.
80. N Niitsu, J Okabe-Kado, and T Kasukabe *et al.* Prognostic implications of the differentiation inhibitory factor nm23- H1 protein in the plasma of aggressive non-Hodgkin' s lymphoma [in process citation]. *Blood* 1999; **94**: 3541-3550.
81. A Leone, RC Seeger, and CM Hong *et al.* Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene* 1993; **8**: 855-865.
82. CL Chang, XX Zhu, and DH Thoraval *et al.* Nm23-H1 mutation in neuroblastoma [letter] *Nature* 1994. **370**: 335-336.
83. Y Sugiura, H Shimada, and RC Seeger *et al.* Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res* 1998. **58**: 2209-2216.
84. T Ara, M Fukuzawa, and T Kusafuka *et al.* Immunohistochemical

- expression of MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 in neuroblastoma: association with tumor progression and clinical outcome *J Pediatr Surg* 1998. 33: 1272-1278.
85. E Petitclerc, S Stromblad, and TL von Schalscha *et al.* Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival *Cancer Res* 1999. 59: 2724-2730.
 86. G Gasparini, PC Brooks, and E Biganzoli *et al.* Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer *Clin Cancer Res* 1998. 4: 2625-2634.
 87. CL Gladson, S Hancock, and MM Arnold *et al.* Stage-specific expression of integrin alphaVbeta3 in neuroblastic tumors. *Am J Pathol* 1996; 148: 1423-1434.
 88. HN Lode, T Moehler, and R Xiang *et al.* Synergy between an antiangiogenic integrin alphav antagonist and an antibody-cytokine fusion protein eradicates spontaneous tumor metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 1591-1596.
 89. J Rossler, S Breit, W Havers, and L Schweigerer. Vascular endothelial growth factor expression in human neuroblastoma: up-regulation by hypoxia. *Int J Cancer* 1999; 81:113-117.
 90. B Meister, F Grunebach, and F Bautz *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1999; 35: 445-449.
 91. DH Rowe, J Huang, and C Manley *et al.* Suppression of primary tumor growth in a mouse model of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2000; 36: 1-6.
 92. Schwartz S, Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at

mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype II. *Cell*. 1999; **98**:47-58.

93. Mandruzzato S, Brasseur F, ANDry G, Boon T, vander Bruggen P. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med*. 1997; **186**:785-93.
94. Ikeda H, Nakamura Y, Hisawa T, *et al*. Interleukin-1 β converting enzyme (ICE) is preferentially expressed in neuroblastoma with favorable prognosis. *Eur J Cancer*. 1997; **33**: 2081-83.
95. Nakagawara A, Makamura Y, Ikeda H, *et al*. High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 β converting enzyme (ICE) and CPP32 in favorable human neuroblastomas. *Cancer Res*. 1997; **57**:4578-84.
96. Teitz, T, Wei T, Valentine MB, *et al*. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of N-*myc*. *Nature Med*. 2000; **6**: 529-35.
97. HW Hann, HM Levy, and AE Evans. Serum ferritin as a guide to therapy in neuroblastoma. *Cancer Res* 1980; **40**: 1411-1413.
98. HW Hann, AE Evans, IJ Cohen, and JE Leitmeyer. Biologic differences between neuroblastoma stages IV-S and IV. Measurement of serum ferritin and E-rosette inhibition in 30 children. *N Engl J Med* 1981; **305**: 425-429.
99. JH Silber, AE Evans, and M Fridman. Models to predict outcome from childhood neuroblastoma: the role of serum ferritin and tumor histology. *Cancer Res* 1991; **51**: 1426-1433.
100. PM Zeltzer, PJ Marangos, AE Evans, and SL Schneider. Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. Relationship to stage and disease course. *Cancer* 1986; **57**: 1230-1234.
101. RJ Hsiao, RC Seeger, AL Yu, and DT O' Connor. Chromogranin A in children with neuroblastoma. Serum concentration parallels disease stage

and predicts survival. *J Clin Invest* 1990; **85**: 1555-1559.

102. JJ Shuster, NB McWilliams, and R Castleberry *et al.* Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study. *Am J Clin Oncol* 1992; **15**: 295-303.
103. VV Joshi, AB Cantor, and GM Brodeur *et al.* Correlation between morphologic and other prognostic markers of neuroblastoma. A study of histologic grade, DNA index, N-*myc* gene copy number, and lactic dehydrogenase in patients in the Pediatric Oncology Group. *Cancer* 1993; **71**: 3173-3181.
104. S Ladisch and ZL Wu. Detection of a tumour-associated ganglioside in plasma of patients with neuroblastoma. *Lancet* 1985; **1**: 136-138.
105. WE Laug, SE Siegel, and KN Shaw *et al.* Initial urinary catecholamine metabolite concentrations and prognosis in neuroblastoma. *Pediatrics* 1978; **62**: 77-83.
106. AE Evans, GJ D'Angio, and K Probert *et al.* Prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer* 1987; **59**: 1853-1859.
107. SH Quak, K Prabhakaran, R Kwok, and APO' Reilly. Vasoactive intestinal peptide secreting tumours in children: a case report with literature review. *Aust Paediatr J* 1988; **24**: 55-58.
108. PS Koh, JG Raffensperger, and S Berry *et al.* Long-term outcome in children with opsoclonus-myoclonus and ataxia and coincident neuroblastoma [see comments]. *J Pediatr* 1994; **125**: 712-716.
109. Leder RM. The opsoclonus-myoclonus syndrome. A review of the literature. *Bull L A Neurol Soc* 1981; **46**: 41-50, 1981.
110. Mitchell WG, Snodgrass SR. Opsoclonus-ataxia due to childhood neural crest tumors: a chronic neurologic syndrome. *J Child Neurol* 1990; **5**: 153-158 [published erratum appears in *J Child Neurol*

1990; **5**:266].

111. GM Brodeur, RC Seeger, and A Barrett *et al.* International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma [see comments]. *J Clin Oncol* 1988; **6**: 1874-1881.
112. H Shimada, IM Ambros, and LP Dehner *et al.* The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer* 1999; **86**: 364-372.
113. H Shimada, IM Ambros, and LP Dehner *et al.* Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. *Cancer* 1999; **86**: 349-363.
114. AE Evans, GJ D'Angio, and J Randolph. A proposed staging for children with neuroblastoma. *Children's cancer study group A Cancer* 1971; **27**: 374-378.
115. FA Hayes, A Green, HO Hustu, and M Kumar. Surgicopathologic staging of neuroblastoma: prognostic significance of regional lymph node metastases. *J Pediatr* 1983; **102**: 59-62.
116. Peck TM, Arias F. Hematologic changes associated with pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1979; **22**:785-798.
117. Letsky EA. Erythropoiesis in pregnancy. *J Perinat Med* 1995; **23**:39-45.
118. Lurie S, Mamet Y. Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; **93**:185-192.
119. Yaegashi N, Niinuma T, Chisaka H, *et al.* Parvovirus B19 infection induces apoptosis of erythroid cells in vitro and in vivo. *J Infect* 1999; **39**:68-76.
120. Sol N, Le Junter J, Vassias I, *et al.* Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *J Virol* 1999; **73**:8762-8770.

121. Brodeur GM, Sekhon GS, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* 1977; **40**: 2256 – 63.
122. Gilbert F, Balaban G, Moorhead P, *et al.* Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; **7**:33 – 42.
123. Atkin NB. Chromosome 1 aberrations in cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; **21**:279 – 85.
124. Schwab M, Praml C, Amler LC. Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; **16**:211 – 29.
125. Franke F, Rudolph B, Christiansen H, *et al.* Tumour karyotype may be important in the prognosis of human neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1986; **111**:266 – 72.
126. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, *et al.* Amplification of N-*myc* in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; **224**:1121 – 4.
127. Brodeur GM, Seeger RC, Sather H, *et al.* Clinical implications of oncogene activation in human neuroblastomas. *Cancer* 1986; **58**:541 – 5.
128. Nakagawara A, Ikeda K, Tsuda T, *et al.* N-*myc* oncogene amplification and prognostic factors of neuroblastoma in children. *J Pediatr Surg* 1987; **22**:895 – 8.
129. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, *et al.* Association of multiple copies of the N-*myc* oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985; **313**:1111 – 16.
130. Matthay KK, Perez C, Seeger RC, *et al.* Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 1998; **16**:1256 – 64.
131. Schmidt ML, Lukens JN, Seeger RC, *et al.* Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: A prospective

Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000; **18**:1260 – 8.

132. Squire J, Thorner P, Marrano P, *et al.* Identification of MYCN Copy Number Heterogeneity by Direct FISH Analysis of Neuroblastoma Preparations. *Mol Diagn* 1996; **1**:281 – 9.
133. Gallego S, Reventos J, Sanchez de Toledo J, *et al.* Differential polymerase chain reaction with serial dilutions for quantification of MYCN gene amplification in neuroblastoma. *Anticancer Res* 1998; **18**:1211 – 15.
134. Shapiro DN, Valentine MB, Rowe ST, *et al.* Detection of N-*myc* gene amplification by fluorescence in situ hybridization. Diagnostic utility for neuroblastoma. *Am J Pathol* 1993; **142**:1339 – 46.
135. Frostad B, Martinsson T, Tani E, *et al.* The use of fine-needle aspiration cytology in the molecular characterization of neuroblastoma in children. *Cancer* 1999; **87**:60 – 8.
136. Leong PK, Thorner P, Yeger H, *et al.* Detection of MYCN gene amplification and deletions of chromosome 1p in neuroblastoma by in situ hybridization using routine histologic sections. *Lab Invest* 1993; **69**:43 – 50.
137. Lorenzana AN, Zielenska M, Thorner P, *et al.* Heterogeneity of MYCN amplification in a child with stroma-rich neuroblastoma (ganglioneuroblastoma). *Pediatr Pathol Lab Med* 1997; **17**:875 – 83.
138. Miller G. 1990. In *Virology*. Fields BN, Knipe, DM, eds. Raven Press, New York, p. 1921.
139. Purtilo DT, Strobach RS, Okano M, Davis JR. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Lab. Invest.* 1992; **67**:5.
140. Kolman JL, Kolman CJ, and G. Miller G. Marked variation in the size of genomic plasmids among members of a family of related Epstein-Barr viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; **89**:7772.
141. Rooney C, Taylor N, Countryman J, Jenson H, Kolman J, Miller G.

Genome rearrangements activate the Epstein-Barr virus gene whose product disrupts latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; **85**:9801.

142. RC Seeger, GM Brodeur, and H Sather *et al.* Association of multiple copies of the N-*myc* oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985; 313:1111-1116.
143. JM Maris, SM Kyemba, and TR Rebbeck *et al.* Molecular genetic analysis of familial neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 1923-1928.
144. Sugie H, Sugie Y, Akimoto H, Endo K, Shirai M, Ito M. High-dose immunoglobulin in a case with infantile opsoclonus polymyoclonia syndrome. *Acta Paediatr.* 1992; **81**:371-2.
145. BH Kushner, F Gilbert, and L Helson. Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations. *Cancer* 1986; **57**: 1887-1893.
146. Sugie H, Sugie Y, Akimoto H, Endo K, Shirai M, Ito M. High-dose immunoglobulin in a case with infantile opsoclonus polymyoclonia syndrome. *Acta Paediatr.* 1992; **81**:371-2.
147. Nickerson BG, Hutter JJ. Opsomyoclonus and neuroblastoma: Response to ACTH. *Clin Pediatr.* 1979; **81**:446-8.
148. D.R. Catchpole, R.B. Lock. The potential tumor suppressor role for caspase-9(CASP9) in the childhood malignancy, neuroblastoma. *European Journal of cancer.* 2001; **37**: 2217-21.
149. Lau SM, WL Yu, Chow KC, Wang JH. Parvovirus B19 infection in a human immunodeficiency virus-infected patient with anemia. *J Formos Med Assoc* 2000; **99**: 162-165.
150. Brown KE, Young NS, Liu JM. Molecular, cellular and clinical aspects of parvovirus B19 infection. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994; **16**:1-31.
151. Parker JE, Mufti GJ, Mijovic A, Devereux S, Pagliuca A. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary

to MDS. *Blood* 2000; **96**:3932-8.

152. Morey AL, Ferguson DJ, Fleming KA. Ultrastructural features of fetal erythroid precursors infected with parvovirus B19 in vitro: evidence of cell death by apoptosis. *J Pathol* 1993; **169**:213-220.
153. Rodis JF, Quinn DL, Gary GW, *et al.* Management and outcomes of pregnancies complicated by human B19 parvovirus infection: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1990; **163**:1168-1171.
154. Gratacos E, Torres P, Vidal J, *et al.* The incidence of human parvovirus B19 infection during pregnancy and its impact on perinatal outcome. *J Infect Dis* 1995; **171**:1360-1363.
155. Richter C, Huch A, Huch R. Erythropoiesis in the postpartum period. *J Perinat Med* 1995; **23**:51-59.
156. Foerster J. Red cell fragmentation syndromes. In Lee GR, Lukens J, Greer JP, Foerster J, Paraskevas F, Rodgers GM eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10th edition. Baltimore:Williams & Wilkins, 1999: 1318.
157. Frickhofen N, Chen ZJ, Young NS, Cohen BJ, Heimpel H, Abkowitz JL. Parvovirus B19 as a cause of acquired chronic pure red cell aplasia. *Br J Haematol* 1994; **87**:818-824.
158. Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, *et al.* Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis* 1985; **152**:257-265.
159. Nigro G, Schiavetti A, Booth JC, Clerico A, Dominici C, Krzysztofiak A, Castello M. Cytomegalovirus-associated stage 4S neuroblastoma relapsed stage 4. *Med Pediatr Oncol.* 1995;**24**(3):200-203.
160. Scholz M, Blaheta RA, Hundemer M, Doerr HW, Cinatl J Jr. Cytomegalovirus infection as a possible factor in the progression of neuroblastoma. *Klin Padiatr* 1999;**211**(4):310-313.
161. Pritchard J, Hickman JA. Why does stage 4s neuroblastoma regress

spontaneously ? *Lancet* .1994; **344**:869-70.

162. Evans AE, D' Angelo GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma, Children' s Cancer Study Group A. *Cancer*:
163. Pritchard J, Hickman JA. Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously ? *Lancet* .1994; **344**:869-70.
164. Nigro G, Schiavetti A, Booth JC, Clerico A, Dominici C, Krzysztofiak A, Castello M. Cytomegalocirus-associated stage 4S neuroblastoma relapsed stage 4. *Med Pediatr Oncol*. 1995; **24(3)**:200-203.
165. Scholz M, Blaheta RA, Hundemer M, Doerr HW, Cinatl J Jr. Cytomegalovirus infection as a possible factor in the progression of neuroblastoma. *Klin Padiatr* 1999; **211(4)**:310-313.

評語

本論文探討對兒科病人罹患神經母細胞瘤，研究其腫瘤細胞中 N-myc 基因，無增幅，但發現有 parvo virus B19 之存在。三位病患者，由 parvo virus B19 之 NS1 存在證實有該病毒之存在。及神經母細胞瘤有該病毒之存在及 Caspase3 之上升。並證實 NS1 有九個異變株，並發現其基因異變，引起胺基的改變。本論文有關神經母細胞之 apoptosis，並可再分子層次探討。