

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.012

## CD99在尤因肉瘤中的作用及其靶向治疗

### The functional roles and targeted-therapy strategies of CD99 in Ewing sarcoma

胡晓东 综述;周俊,胡嘉 审阅(武汉科技大学 生命科学与健康学院,武汉 430065)

**[摘要]** CD99是一种主要定位在细胞膜上的I型跨膜糖蛋白,参与调控正常组织细胞的分化、黏附、迁移和蛋白运输等功能。CD99蛋白在大多数正常组织中表达较低,但在一些恶性肿瘤,尤其是尤因肉瘤(EWS)中高表达,可作为EWS的辅助诊断和预后标志物。高表达的CD99蛋白可通过多种机制促进EWS的发生发展,例如与配体结合、影响外泌体相关的miRNA分泌和调控下游信号通路等。作为在EWS细胞中高特异性表达并发挥促癌作用的膜蛋白,CD99是理想的肿瘤治疗靶点,已有研究尝试开发通过靶向CD99治疗EWS的方法,包括CD99中和抗体、小分子抑制剂和肿瘤疫苗等。尽管目前靶向CD99治疗EWS还处于临床前研究阶段,但已展现出很好的治疗前景。因此,针对CD99的靶点干预可能为EWS治疗提供新策略。

**[关键词]** CD99;尤因肉瘤;抗体;免疫治疗

**[中图分类号]** R738.1;R730.5;Q71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)08-0726-07

尤因肉瘤(Ewing sarcoma, EWS)是一种多发于儿童和青少年的恶性肿瘤,包括骨EWS、骨骼外EWS、阿斯金肿瘤和基于软组织的原始神经外胚层肿瘤等<sup>[1]</sup>。尽管EWS发病率相对其他常见恶性肿瘤低(约6/100万人)<sup>[2]</sup>,但是该病恶性程度高、病程短、转移快、目前缺乏有效的治疗手段。CD99蛋白高表达是EWS重要的分子特征<sup>[3]</sup>,研究表明CD99在EWS中发挥促癌作用,与肿瘤细胞的增殖、分化和转移等恶性特征密切相关。CD99促癌的分子机制涉及与配体结合、影响肿瘤细胞外泌体中miRNA的分泌水平和调控下游信号通路等。鉴于CD99蛋白是EWS发生发展的重要驱动分子,其在EWS细胞膜上具有特征性高表达,因此CD99是一个极具前景的治疗EWS的靶点。目前已经开展了多个靶向CD99治疗EWS的临床前研究,取得了令人振奋的抑瘤效果。本文将对CD99在EWS发生发展中的作用、分子机制以及CD99相关的靶向治疗进行综述。

#### 1 CD99分子结构与生物学功能

1979年科学家在人类胸腺白血病细胞中发现一种高度糖基化的I型跨膜蛋白,命名为CD99蛋白。CD99蛋白由CD99基因(又称MIC2基因)编码,在高尔基体组装形成二聚体后在细胞膜上表达<sup>[4]</sup>。根据CD99蛋白胞内区域可变剪切的不同可分为2种亚型:第一种是包含185个氨基酸的全长CD99蛋白(CD99wt或CD99 I型),另一种是包含161个氨基酸的CD99蛋白亚型(CD99sh或CD99 II型)<sup>[5]</sup>,CD99wt是CD99蛋白的主要表达形式。值得注意的是,CD99蛋白的2种亚型有不同的生物学功能,CD99sh可发挥拮抗CD99wt功能的作用<sup>[6-7]</sup>。

CD99蛋白在大多数正常组织中表达较低,但在一些特定的组织细胞中高表达,例如胸腺细胞、卵巢颗粒细胞、睾丸支持细胞、表皮细胞以及未成熟的淋巴细胞等<sup>[8-10]</sup>。CD99蛋白在正常组织细胞中发挥调控细胞分化、影响细胞黏附与迁移,参与胞内膜蛋白运输等功能<sup>[11-13]</sup>。CD99蛋白在不同类型肿瘤中的表达有差异,作用也不相同,其发挥抑癌或者促癌作用与肿瘤类型相关。例如,CD99蛋白在急性髓系白血病<sup>[14-15]</sup>和胶质瘤细胞<sup>[16]</sup>中高表达并发挥促癌作用,而在霍奇金淋巴瘤<sup>[17]</sup>、骨肉瘤<sup>[18]</sup>、乳腺癌<sup>[11]</sup>、胃癌<sup>[19]</sup>中高表达则抑制肿瘤进展。

#### 2 CD99在EWS中的表达及调控

CD99蛋白高表达是EWS的重要分子特征,临床上已经将CD99蛋白作为EWS的辅助诊断指标。研究认为EWS中高表达的CD99主要受EWS-FLI1融合基因调控。

##### 2.1 CD99在EWS中的表达

CD99蛋白高表达是EWS的一个重要分子特征。有研究<sup>[20]</sup>采用免疫组织化学染色法检测244个EWS样本中CD99蛋白的表达情况,结果显示全部样本均为CD99蛋白表达阳性,其中221个样本(91%)CD99蛋白表达强阳性,且主要定位在细胞膜。CD99蛋白在临床上已经用于EWS的辅助诊断,利用CD99蛋白表达差异可以区别EWS和其他形态类似的小圆细胞肿瘤,如中枢原始神经外胚层肿瘤等<sup>[21]</sup>。循环肿瘤

**[基金项目]** 湖北省自然科学基金创新发展联合基金(No. 2022CFD109)

**[作者简介]** 胡晓东(2000—),男,硕士生,主要从事CAR-T细胞治疗靶点的筛选及研究,E-mail: 15737717295@163.com

**[通信作者]** 胡嘉,E-mail: hujia123@wust.edu.cn

细胞(circulating tumor cell, CTC)是癌症患者转移的重要危险因素。有研究<sup>[22]</sup>通过 CD99<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> 抗原组合在化疗前和化疗期间检测 EWS 患者血液中的循环肿瘤细胞,并据此预测患者预后,这种方法快速、微创且成本较低。CD99 蛋白与 NGFR 联合使用也可作为 EWS 来源的小细胞外囊泡(small extracellular vesicle, sEV)的检测标志物,用于 EWS 的微创预后诊断<sup>[23-24]</sup>。CD99 基因多态性与 EWS 的发生及预后相关,有研究<sup>[25]</sup>表明,CD99 等位基因 rs311059-T 与 14 岁之前罹患 EWS 的风险呈正相关,携带 CD99 等位基因 rs312257-T 的 EWS 患者肿瘤复发率较低,无事件生存率延长。

## 2.2 CD99 在 EWS 中的调控机制

虽然 CD99 蛋白在 EWS 中特征性高表达,但对 CD99 在 EWS 中的确切调控机制目前仍然了解甚少。EWS 和 FLI1 基因融合及 EWS-FLI1 融合蛋白表达是 EWS 最显著的分子生物学特征,EWS-FLI1 融合蛋白作为一种异常的转录因子,可以通过调控下游基因表达影响肿瘤细胞的生长、凋亡和分化等过程<sup>[26-27]</sup>。关于 EWS-FLI1 融合基因是否调控 CD99 的表达目前仍然有不同见解。研究发现<sup>[28-29]</sup>,EWS-FLI1 融合基因对 CD99 表达具有促进作用,EWS-FLI1 融合基因的过表达可以诱导人间充质祖细胞、横纹肌肉瘤和神经母细胞瘤中 CD99 的表达。进一步研究发现,EWS-FLI1 融合基因转录因子可以结合 miR-30a-5p 的启动子抑制 miRNA-30a-5p 转录,CD99 基因是 miRNA-30a-5p 的下游靶基因,因此 EWS-FLI1 融合基因可以通过 miR-30a-5p 调控 CD99 基因表达<sup>[30-31]</sup>。ROCCHI 等<sup>[32]</sup>通过染色质免疫沉淀实验发现,EWS-FLI1 融合蛋白能够与 CD99 基因的启动子结合,提示其可能直接影响 CD99 基因转录。但 EWSR1-FLI1 基因敲降后 CD99 转录组水平没有明显变化,与生物信息学预测的结果相符<sup>[33]</sup>。因此,EWS-FLI1 融合基因对 CD99 的调控机制还需要进一步深入研究。

## 3 CD99 在 EWS 中的促癌作用机制

CD99 能够促进 EWS 细胞的生长、转移和恶性分化。其促进 EWS 恶性转化的分子机制可能是通过配/受体结合、调控外泌体中相关 miRNA 的分泌水平,以及调控下游信号通路等来实现的。

### 3.1 CD99 蛋白与配体 GDF6 蛋白相互作用

生长与分化因子 6(growth differentiation factor 6, GDF6)是一种属于骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)家族的细胞因子,与骨骼和眼睛发育有关<sup>[34]</sup>。GDF6 蛋白的 N 端为前体结构域,在 C 端有一个 BMP 结构域,高尔基体中的蛋白水

解可以将两个结构域分开。CD99 蛋白作为膜受体,可以与 GDF6 蛋白的前体结构域结合,然后募集 Src 激酶(CSK)磷酸化 Src 蛋白 C 末端的第 530 位酪氨酸,使其丧失活性,维持肿瘤细胞的生长<sup>[35]</sup>。有意思的是,GDF6 基因也是 EWS-FLI1 融合蛋白的直接转录激活靶点<sup>[36]</sup>,关于 CD99 蛋白、GDF6 蛋白和 EWS-FLI1 分子三者之间是否形成一个环路促进 EWS 的恶性转化仍然需要进一步深入研究。

### 3.2 CD99 调控外泌体中 miRNA 的分泌水平

CD99 能够通过调控外泌体中 miRNA 的分泌水平,影响 EWS 细胞的生长、分化和凋亡过程。外泌体是一种特殊的细胞外囊泡,可以在细胞间发挥通讯作用<sup>[37]</sup>。EWS 细胞可以释放表达 CD99 蛋白的外泌体,而 CD99 基因沉默的 EWS 细胞则传递具有抑癌功能的外泌体,这些 CD99 表达缺陷的外泌体可以调节受体肿瘤细胞的基因表达,减少增殖和迁移能力并诱导其向更分化的低恶性表型转变。有研究<sup>[38]</sup>分析了敲除 CD99 基因对 EWS 细胞释放外泌体中 miRNA 分泌水平的影响,共鉴定出 56 种 miRNA 发生改变,其中 miR-199a-3p 是逆转 EWS 恶性表型的关键驱动因素。CD99 基因敲除的 EWS 细胞释放的外泌体中 miR-199a-3p 含量明显提高,它能够减少受体细胞中 AP-1 蛋白活性及靶基因表达,抑制肿瘤细胞迁移并诱导肿瘤细胞向神经类型细胞分化<sup>[39]</sup>。“CD99-miR-34a-Notch-NF- $\kappa$ B”通路在 EWS 细胞分化中发挥重要作用。敲减 CD99 基因能够提高 miR-34a 的表达,抑制 Notch 信号通路,进而影响 NF- $\kappa$ B 转录因子的活性,促进 EWS 细胞向神经类型细胞分化;还可以释放含有高水平 miR-34a 的外泌体,这些外泌体与周围 EWS 细胞结合后,能使受体肿瘤细胞向神经类型细胞分化。因此,即使给部分肿瘤细胞敲除 CD99 基因也可以对整个 EWS 细胞群产生影响,这为 EWS 的治疗提供了新的思路<sup>[40]</sup>。

### 3.3 CD99 其他促癌机制

CD99 还可以通过其他分子机制促进 EWS 的进展。研究<sup>[41]</sup>发现,敲减 CD99 基因或者使用 CD99 中和抗体处理可以诱导 EWS 细胞发生 Caspase 非依赖的细胞死亡,这种细胞死亡方式与肌动蛋白/细胞骨架信号通路相关。同时有研究<sup>[42]</sup>表明 zyxin 蛋白在其中发挥重要作用,CD99 基因可以调控 zyxin 基因表达并诱导其核转位;研究提示可以通过 CD99 介导的非凋亡途径杀伤 EWS。此外,CD99 蛋白在 EWS 细胞中与钾通道调节蛋白 KCMF1 表达呈负相关,CD99 与 KCMF1 之间相互作用可能抑制 EWS 细胞迁移,但具体分子机制还需要进一步研究<sup>[43]</sup>。CD99 蛋白还能够抑制 MAPK-ERK1/2 通路,阻止 EWS 细胞向神经

类型细胞分化,促进EWS的进展<sup>[32]</sup>。还有研究<sup>[44]</sup>发现,CD99基因还可通过抑制miR-214-3p的表达促进EWS细胞的生长和迁移。

综上,CD99在EWS中是一个原癌基因,对于维持EWS恶性程度是必需的。抑制EWS细胞中CD99的表达可使EWS细胞生长、迁移能力明显降低,并倾向于向神经类型细胞分化。

#### 4 靶向CD99治疗EWS

由于CD99是EWS进展的重要驱动分子,结合它在EWS细胞膜上的特异性表达,可作为EWS潜在的治疗靶点,目前已经开展了多个针对CD99靶点治疗EWS的临床前研究(表1)。

表1 靶向CD99治疗EWS的方法

药物类型	药物名称	作用机制
单克隆抗体	0662mAb	诱导zyxin蛋白积累,抑制GLI1基因转录,抑制EWS生长 <sup>[42]</sup> ;诱导肿瘤细胞巨泡式死亡 <sup>[45]</sup>
	scFvC7	利用噬菌体展示技术筛选得到高亲和力的靶向EWS CD99蛋白的抗体 <sup>[46]</sup>
	<sup>64</sup> Cu-DN16	与CD99结合,对小鼠EWS原发灶及转移灶检测具有高敏感性 <sup>[47]</sup>
双特异性抗体	dAbd C7	诱导zyxin蛋白核聚积,抑制GLI1基因转录,抑制肿瘤细胞生长 <sup>[42]</sup> ;激活p53信号通路,诱导EWS细胞凋亡,与多柔比星组成抗体偶联药物 <sup>[48]</sup>
小分子药物	氯法拉滨、克拉屈滨	抑制CD99蛋白二聚化,抑制ROCK2的表达和肿瘤细胞迁移 <sup>[49]</sup> 、诱导肿瘤细胞凋亡 <sup>[50]</sup>
	氯法拉滨和克拉屈滨嘌呤核苷类似物BK5016、BK60106	直接与CD99分子结合,诱导肿瘤细胞死亡 <sup>[51]</sup>
CD99靶向的纳米颗粒	聚合物脂质杂化纳米颗粒	携带伊立替康药物,靶向CD99 <sup>+</sup> EWS细胞进行特异性杀伤 <sup>[52]</sup>
	SPC/Chol脂质体	利用CD99抗体特异性与CD99 <sup>+</sup> EWS细胞结合,将siRNA或金属离子递送至肿瘤细胞 <sup>[53]</sup>
	CD99靶向聚合免疫纳米颗粒	携带siRNA,抑制EWS皮下植入模型中相关基因的表达 <sup>[54]</sup>
其他CD99相关的靶向治疗策略	CD99 CAR-T细胞	与AML细胞中的CD99特异性结合,杀伤肿瘤细胞,后续可能用于EWS治疗 <sup>[55]</sup>
	TRXtr-mCD99	免疫EWS小鼠后会产生高水平CD99抗体,该抗体可以靶向肿瘤的血管系统,抑制肿瘤生长 <sup>[56]</sup>

##### 4.1 靶向CD99蛋白的单克隆抗体

目前研究最多的是利用靶向CD99蛋白的抗体治疗EWS。用CD99的单克隆抗0662 mAb处理EWS细胞可诱导细胞发生非Caspase依赖的细胞巨泡式死亡。巨泡式死亡的细胞会出现大量单层膜结构的空泡,但是缺乏典型的细胞凋亡特征(如细胞收缩、染色质凝集、DNA碎片等)。其作用机制可能是由于CD99蛋白和抗体结合后诱导IGF-1R/RAS/Rac1复合体形成,CD99蛋白与IGF-1R/RAS/Rac1复合体内化后发生解离,IGF-1R循环到细胞膜,而CD99蛋白和RAS/Rac1被送至未成熟的溶酶体相关膜蛋白1(lysosome-associated membrane protein 1, LAMP-1)阳性的液泡中,这种液泡过度积累引发细胞巨泡式死亡。而上述现象在表达CD99蛋白的正常间充质细胞中不会发生,提示0662 mAb可用于EWS的治

疗<sup>[45]</sup>。此外,有研究<sup>[46]</sup>还通过噬菌体文库筛选得到一种CD99单链抗体(scFvC7),该抗体对EWS细胞有良好的亲和力,而在其他肿瘤和正常细胞中没有观察到该抗体结合或者仅有微弱结合。除了用于EWS治疗外,CD99抗体还可以用于EWS的肿瘤成像检测,用<sup>64</sup>Cu标记的抗CD99抗体(<sup>64</sup>Cu-DN16)对小鼠EWS原发灶及转移灶的成像检测具有很高的敏感性,在临床前研究中优于18-氟脱氧葡萄糖正电子发射计算机断层显像(FDG-PET)。这种靶向放射性示踪剂可能对EWS的诊断、监测和治疗具有重要意义<sup>[47]</sup>。

##### 4.2 双特异性抗体

有研究<sup>[48]</sup>设计了一种针对CD99蛋白两个不同表位的双特异性抗体dAbd C7。与单链抗体相比,双特异性抗体具有更高的亲和力与稳定性<sup>[57]</sup>。dAbd C7



与CD99蛋白结合后促进MDM2蛋白泛素化降解,激活p53信号通路,诱导EWS细胞凋亡。进一步研究发现,EWS特征性表达的EWS-FLI1融合蛋白介导了dAbd C7诱导的细胞凋亡,因此dAbd C7对正常造血干细胞和间充质干细胞没有影响,且其具有良好的特异性和安全性。多柔比星是治疗EWS患者的一线化疗药物<sup>[58]</sup>,将dAbd C7与多柔比星偶联可以显著增强多柔比星的细胞毒性作用<sup>[48]</sup>,提示CD99靶向联合化疗可能可以应用于EWS的治疗。

#### 4.3 小分子药物

研究人员<sup>[49]</sup>对FDA批准的小分子药物库进行筛选后发现,氯法拉滨(clofarabine)和克拉屈滨(cladribine)可以靶向CD99蛋白抑制EWS的生长。氯法拉滨是一种嘌呤类似物,临床用于治疗复发或难治性急性淋巴细胞白血病<sup>[59]</sup>。克拉屈滨用于经干扰素治疗失败后的毛细胞白血病的治疗<sup>[60]</sup>。这两种药物可以直接与CD99蛋白结合抑制EWS的生长,并且抑瘤效率与肿瘤细胞CD99蛋白表达量呈正相关。氯法拉滨和克拉屈滨能够抑制CD99蛋白二聚化,阻断CD99与亲环素A(CyPA)和PKA-RII $\alpha$ 的相互作用,从而抑制下游信号通路。氯法拉滨和克拉屈滨还可以抑制ROCK2蛋白的表达,影响EWS细胞的细胞迁移能力,这个过程也是由CD99介导<sup>[49]</sup>。此外,氯法拉滨与CD99蛋白结合后可以激活ERK1/2通路,促进丝裂原和应激激活蛋白激酶1/2(MSK1/2)和cAMP反应元件结合蛋白(CREB)磷酸化,诱导EWS细胞死亡<sup>[50]</sup>。有研究<sup>[51]</sup>对氯法拉滨和克拉屈滨嘌呤核苷类似物脱氧核糖5'末端位点的初级醇部分进行修饰,得到了两种化合物BK50164和BK60106,由于C末端被修饰,它们主要通过抑制CD99蛋白功能而不是通过抑制DNA合成来诱导EWS细胞死亡。这些研究为未来开发选择性CD99抑制剂靶向治疗EWS提供了方向。

#### 4.4 CD99蛋白靶向的纳米颗粒

基于CD99蛋白在EWS中特异性高表达,有研究<sup>[52]</sup>将CD99蛋白靶向与纳米药物联用杀伤肿瘤细胞。将CD99抗体与伊立替康制成聚合物脂质杂化纳米颗粒(PLN)能够有效靶向EWS小鼠模型中的肿瘤细胞,抑制肿瘤生长。此外,将CD99抗体与常规磷脂/胆固醇(SPC/Chol)脂质体偶联可以特异性地将siRNA或金属离子递送至EWS细胞中,该方案可用于肿瘤治疗或者示踪<sup>[53]</sup>。聚氰基丙烯酸异丁酯(PIBCA)/壳聚糖核/冠状纳米颗粒制成的聚合物载体可以在体内传递siRNA。RAMON等<sup>[54]</sup>设计具有生物素化配体的CD99蛋白靶向聚合免疫纳米颗粒,经静脉注射后,纳米颗粒携带的siRNA能够有效抑

制EWS皮下植入模型中相关基因的表达。

#### 4.5 其他CD99相关的靶向治疗策略

CAR-T是经基因修饰表达嵌合受体的T淋巴细胞,它是将抗体的可变区与T细胞受体的恒定区结合,在共刺激分子的协同作用下,使T细胞同时具有特异性识别和细胞杀伤功能,可以特异性识别和消除肿瘤<sup>[61-62]</sup>。有研究<sup>[55]</sup>发现,CD99 CAR-T细胞对CD99<sup>+</sup>T-ALL细胞系和原代肿瘤细胞表现出强大的肿瘤细胞杀伤能力,并显著延长肿瘤负荷小鼠的生存期。由于CD99蛋白在EWS细胞膜表面高特异性表达,为CD99 CAR-T细胞治疗EWS提供了可行性,本实验室已经针对CD99 CAR-T细胞治疗EWS开展了研究。

此外,还有研究<sup>[56]</sup>利用CD99蛋白抗原制备肿瘤疫苗,将小鼠CD99蛋白的细胞外结构域(mCD99<sub>ex</sub>)与部分截取的细菌硫氧还原蛋白58aa融合制备抗原(TRXtr-mCD99),对免疫肉瘤小鼠制模后会在血清中产生高水平的CD99抗体,该抗体可以靶向肿瘤的血管系统,抑制肿瘤生长,而正常小鼠免疫后体重和健康状况良好。

## 5 小结

CD99蛋白高表达是EWS的标志性特征,临床上已用于EWS的辅助诊断<sup>[63]</sup>。CD99在EWS的发生发展过程中发挥重要作用,深入研究CD99在EWS中的表达调控和促癌机制,可为EWS的治疗提供新的策略和潜在靶点。作为一个在EWS细胞高特异性表达并发挥促癌作用的膜蛋白,CD99是一个理想的肿瘤治疗靶点,然而目前还有许多问题有待研究推进。首先,CD99的临床应用仍然匮乏,目前全球尚未开展针对利用CD99治疗EWS的临床试验,只作为EWS的辅助诊断指标,该靶点的临床安全性和有效性仍需要进一步验证。其次,靶向CD99治疗EWS的临床前研究仍需要进一步扩展,目前开展的研究主要局限于CD99抗体,CD99靶向的小分子药物及其他免疫疗法有待开展。此外,CD99在EWS中的调控机制尚未完全明了,EWS-FLI1融合基因对CD99的调控存在争议,是否有其他的调控机制仍然需要进一步探索。

## [参考文献]

- [1] DURER S, SHAIKH H. Ewing Sarcoma [M/OL]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023[2023-03-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559183/>.
- [2] SPECTOR L G, HUBBARD A K, DIESSNER B J, *et al.* Comparative international incidence of Ewing sarcoma 1988 to 2012[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(5): 1054-1066. DOI: 10.1002/ijc.33674.

- [3] CIDRE-ARANAZ F, WATSON S, AMATRUDA J F, *et al.* Small round cell sarcomas[J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8(1): 66 [2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36202860/>. DOI: 10.1038/s41572-022-00393-3.
- [4] CHOI G, LEE S W, JUNG K C, *et al.* Detection of homodimer formation of CD99 through extracellular domain using bimolecular fluorescence complementation analysis[J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(6): 746-755. DOI: 10.1038/emmm.2007.81.
- [5] TAKHEAW N, SITTITHUMCHAREE G, KARIYA R, *et al.* Anti-human CD99 antibody exerts potent antitumor effects in mantle cell lymphoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(6): 1557-1567. DOI: 10.1007/s00262-020-02789-0.
- [6] SCOTLANDI K, ZUNTINI M, MANARA M C, *et al.* CD99 isoforms dictate opposite functions in tumour malignancy and metastases by activating or repressing c-Src kinase activity[J]. *Oncogene*, 2007, 26(46):6604-18. DOI: 10.1038/sj.onc.1210481.
- [7] MAHIDDINE K, MALLAVIALLE A, BZIOUECH H, *et al.* CD99 isoforms regulate CD1a expression in human monocyte-derived DCs through ATF-2/CREB-1 phosphorylation[J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(6): 1460-1471. DOI: 10.1002/eji.201546143.
- [8] MATTISSON J, DANIELSSON M, HAMMOND M, *et al.* Leukocytes with chromosome Y loss have reduced abundance of the cell surface immunoprotein CD99[J/OL]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 15160[2023-03-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8313698/>. DOI: 10.1038/s41598-021-94588-5.
- [9] CHOI G, ROH J, PARK C S. CD99 is strongly expressed in basal cells of the normal adult epidermis and some subpopulations of appendages: comparison with developing fetal skin[J]. *Pathol Transl Med*, 2016, 50(5):361-368. DOI: 10.4132/jptm.2016.06.19.
- [10] PASELLO M, MANARA M C, SCOTLANDI K. CD99 at the crossroads of physiology and pathology[J]. *J Cell Commun Signal*, 2018, 12(1): 55-68. DOI: 10.1007/s12079-017-0445-z.
- [11] MANNION A J, ODELL A F, TAYLOR A, *et al.* Tumour cell CD99 regulates transendothelial migration *via* CDC42 and actin remodelling [J/OL]. *J Cell Sci*, 2021, 134(15): jcs240135[2023-03-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8403985/>. DOI: 10.1242/jcs.240135.
- [12] WONG Y L, OKUBO T, UNO E, *et al.* Role of CD99 in regulating homeostasis and differentiation in normal human epidermal keratinocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 606: 108-113. DOI:10.1016/j.bbrc.2022.03.087.
- [13] RUTLEDGE N S, OGUNGBE F T, WATSON R L, *et al.* Human CD99L2 regulates a unique step in leukocyte transmigration[J]. *J Immunol*, 2022, 209(5):1001-1012. DOI: 10.4049/jimmunol.2101091.
- [14] ALI A, VAIKARI V P, ALACHKAR H. CD99 in malignant hematopoiesis[J]. *Exp Hematol*, 2022, 106: 40-46. DOI: 10.1016/j.exphem.2021.12.363.
- [15] LI K, DU Y, CAI Y, *et al.* Single-cell analysis reveals the chemotherapy-induced cellular reprogramming and novel therapeutic targets in relapsed/refractory acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2023, 37(2): 308-325. DOI: 10.1038/s41375-022-01789-6.
- [16] PANG B, QUAN F, PING Y Y, *et al.* Dissecting the invasion-associated long non-coding RNAs using single-cell RNA-seq data of glioblastoma[J/OL]. *Front Genet*, 2021, 11: 633455[2023-03-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7831882/>. DOI: 10.3389/fgene.2020.633455.
- [17] 林香伶, 孙清灿, 陆茵, 等. 过表达 CD99 后霍奇金淋巴瘤细胞株 L428 细胞蛋白表达变化的蛋白质组学分析及验证[J]. *中华血液学杂志*, 2019, 40(6): 490-496. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.06.008.
- [18] XU N, WANG X, WANG L, *et al.* Comprehensive analysis of potential cellular communication networks in advanced osteosarcoma using single-cell RNA sequencing data[J/OL]. *Front Genet*, 2022, 13:1013737 [2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36303551/>. DOI: 10.3389/fgene.2022.1013737.
- [19] YU F, LIU G D, ZHANG H L, *et al.* Cell adhesion molecule CD99 in cancer immunotherapy[J/OL]. *Curr Mol Med*, 2022[2023-03-25]. <https://www.eurekaselect.com/article/126860>. DOI: 10.2174/1566524023666221007143513.
- [20] PERLMAN E J, DICKMAN P S, ASKIN F B, *et al.* Ewing's sarcoma-routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: a Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study[J]. *Hum Pathol*, 1994, 25(3): 304-307. DOI: 10.1016/0046-8177(94)90203-8.
- [21] VURAL C, ULUOĞLU O, AKYÜREK N, *et al.* The evaluation of CD99 immunoreactivity and EWS/FLI1 translocation by fluorescence *in situ* hybridization in central PNETs and Ewing's sarcoma family of tumors[J]. *Pathol Oncol Res*, 2011, 17: 619-625. DOI 10.1007/s12253-010-9358-3.
- [22] ZAKZOK O, ELSHANSHORY M, ZEKRI W, *et al.* Prognostic value of detection of CD99<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> cells in peripheral blood by flow cytometry in children with Ewing sarcoma[J/OL]. *Pediatr Blood Cancer*, 2022, 69(1): e29298[2023-03-25]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pbc.29298>. DOI:10.1002/pbc.29298.
- [23] SAMUEL G, CROW J, KLEIN J B, *et al.* Ewing sarcoma family of tumors-derived small extracellular vesicle proteomics identify potential clinical biomarkers[J]. *Oncotarget*, 2020, 11(31): 2995-3012. DOI: 10.18632/oncotarget.27678.
- [24] TURAGA S M, SARDIU M E, VISHWAKARMA V, *et al.* Identification of small extracellular vesicle protein biomarkers for pediatric Ewing Sarcoma[J/OL]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10:1138594 [2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37122563/>. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1138594.
- [25] MARTINELLI M, PARRA A, SCAPOLI L, *et al.* CD99 polymorphisms significantly influence the probability to develop Ewing sarcoma in earlier age and patient disease progression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47): 77958-77967. DOI: 10.18632/oncotarget.12862.
- [26] APFELBAUM A A, WRENN E D, LAWLOR E R. The importance of fusion protein activity in Ewing sarcoma and the cell intrinsic and extrinsic factors that regulate it: A review [J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1044707 [2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36505823/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.1044707.
- [27] YU L, DAVIS I J, LIU P. Regulation of EWSR1-FLI1 function by post-transcriptional and post-translational modifications[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(2):382[2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36672331/>. DOI: 10.3390/cancers15020382.
- [28] MIYAGAWA Y, OKITA H, NAKAIJIMA H, *et al.* Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(7):2125-2137. DOI: 10.1128/MCB.00740-07.

- [29] RAMACHANDRAN B, RAJKUMAR T, GOPISSETTY G. Challenges in modeling EWS-FLI1-driven transgenic mouse model for Ewing sarcoma[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(11):12181-12194.
- [30] FRANZETTI G A, LAUD-DUVAL K, BELLANGER D, *et al.* MiR-30a-5p connects EWS-FLI1 and CD99, two major therapeutic targets in Ewing tumor[J]. *Oncogene*, 2013, 32(33): 3915-3921. DOI: 10.1038/onc.2012.403.
- [31] BARRETT C, BUDHIRAJA A, PARASHAR V, *et al.* The landscape of regulatory noncoding RNAs in Ewing's sarcoma[J/OL]. *Biomedicines*, 2021, 9(8): 933[2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34440137/>. DOI: 10.3390/biomedicines9080933.
- [32] ROCCHI A, MANARA M C, SCIANDRA M, *et al.* CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(3): 668-680. DOI: 10.1172/JCI36667.
- [33] WANG J, JIANG W, YAN Y, *et al.* Knockdown of EWSR1/FLI1 expression alters the transcriptome of Ewing sarcoma cells *in vitro*[J]. *J Bone Oncol*, 2016, 5(4): 153-158. DOI: 10.1016/j.jbo.2016.05.006.
- [34] YU T, LI G, WANG C, *et al.* Defective joint development and maintenance in GDF6-related multiple synostoses syndrome[J]. *J Bone Miner Res*, 2023, 38(4): 568-577. DOI: 10.1002/jbmr.4785.
- [35] ZHOU F, ELZI D J, JAYABAL P, *et al.* GDF6-CD99 Signaling regulates Src and Ewing sarcoma growth[J/OL]. *Cell Rep*, 2020, 33(5): 108332[2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33147457/>. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108332.
- [36] RIGGI N, KNOECHEL B, GILLESPIE S M, *et al.* EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 668-681. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.10.004.
- [37] GURUNATHAN S, KANG M H, KIM J H. A comprehensive review on factors influences biogenesis, functions, therapeutic and clinical implications of exosomes[J]. *Int J Nanomed*, 2021, 16:1281-1312. DOI: 10.2147/IJN.S291956.
- [38] DE FEO A, SCIANDRA M, FELICETTI F, *et al.* Abstract 3549: Exosome-mediated transfer of sh-CD99 is sufficient to modulate cell differentiation in Ewing sarcoma[J/OL]. *Cancer Res*, 2018, 78(13\_Supplement): 3549[2023-03-25]. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2018-3549>. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2018-3549.
- [39] DE FEO A, SCIANDRA M, FERRACIN M, *et al.* Exosomes from CD99-deprived Ewing sarcoma cells reverse tumor malignancy by inhibiting cell migration and promoting neural differentiation[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 471[2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31209202/>. DOI: 10.1038/s41419-019-1675-1.
- [40] VENTURA S, ARYEE D N, FELICETTI F, *et al.* CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-Notch-mediated control of NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Oncogene*, 2016, 35(30): 3944-3954. DOI: 10.1038/onc.2015.463.
- [41] CERISANO V, AALTO Y, PERDICHIZZI S, *et al.* Molecular mechanisms of CD99-induced caspase-independent cell death and cell-cell adhesion in Ewing's sarcoma cells: actin and zyxin as key intracellular mediators[J]. *Oncogene*, 2004, 23(33): 5664-5674. DOI: 10.1038/sj.onc.1207741.
- [42] BALESTRA T, MANARA M C, LAGINESTRA M A, *et al.* Targeting CD99 compromises the oncogenic effects of the chimera EWS-FLI1 by inducing reexpression of zyxin and inhibition of GLI1 activity[J]. *Mol Cancer Ther*, 2022, 21(1): 58-69. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-21-0189.
- [43] KREPPPEL M, ARYEE D N, SCHAEFER K L, *et al.* Suppression of KCMF1 by constitutive high CD99 expression is involved in the migratory ability of Ewing's sarcoma cells[J]. *Oncogene*, 2006, 25(19): 2795-2800. DOI: 10.1038/sj.onc.1209300.
- [44] DE FEO A, PAZZAGLIA L, CIUFFARIN L, *et al.* miR-214-3p is commonly downregulated by EWS-FLI1 and by CD99 and its restoration limits Ewing sarcoma aggressiveness[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(7): 1762 [2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35406534/>. DOI: 10.3390/cancers14071762.
- [45] MANARA M C, TERRACCIANO M, MANCARELLA C, *et al.* CD99 triggering induces methuosis of Ewing sarcoma cells through IGF-1R/RAS/Rac1 signaling[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 79925-79942. DOI: 10.18632/oncotarget.13160.
- [46] GELLINI M, ASCIONE A, FLEGO M, *et al.* Generation of human single-chain antibody to the CD99 cell surface determinant specifically recognizing Ewing's sarcoma tumor cells[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2013, 14(4): 449-463. DOI: 10.2174/1389201011314040011.
- [47] O'NEILL A F, DEARLING J L, WANG Y, *et al.* Targeted imaging of Ewing sarcoma in preclinical models using a  $^{64}\text{Cu}$ -labeled anti-CD99 antibody[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(3): 678-687. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1660.
- [48] GUERZONI C, FIORI V, TERRACCIANO M, *et al.* CD99 triggering in Ewing sarcoma delivers a lethal signal through p53 pathway reactivation and cooperates with doxorubicin[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(1): 146-156. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0492.
- [49] ÇELİK H, SCIANDRA M, FLASHNER B, *et al.* Clofarabine inhibits Ewing sarcoma growth through a novel molecular mechanism involving direct binding to CD99[J]. *Oncogene*, 2018, 37(16): 2181-2196. DOI: 10.1038/s41388-017-0080-4.
- [50] SEVİM H, ÇELİK H, DÜŞÜNCELİ L, *et al.* Clofarabine induces ERK/MSK/CREB activation through inhibiting CD99 on Ewing sarcoma cells[J/OL]. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0253170[2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34133426/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0253170.
- [51] BALARAMAN K, DENİZ E, NELSON E, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of nucleosidic CD99 inhibitors that selectively reduce Ewing sarcoma viability[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2023, 251: 115244[2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36917882/>. DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115244.
- [52] KANG H G, NAGY J, MITRA S, *et al.* Abstract 2875: Targeted therapy of Ewing's sarcoma by human anti CD99 targeted hybrid polymerized liposomal nanoparticles (HPLNs) encapsulating anticancer agents [J/OL]. *Cancer Res*, 2019, 79(13\_Supplement): 2875. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-2875>. DOI: 10.1158/1538-7445.am2019-2875.
- [53] GEYER A, PÜTZ G, REICHARDT W, *et al.* Imaged-guided therapy of Ewing sarcoma using magnetic nanoparticles coupled with anti-CD99-antibody and siRNA against EWS/FLI1[J/OL]. *Klinische Pädiatrie*, 2013, 225(3): A23[2023-03-25]. <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0033-1343640#top>. DOI: 10.1055/s-0033-1343640.
- [54] RAMON A L, BERTRAND J R, DE MARTIMPREY H, *et al.* siRNA associated with immunonanoparticles directed against CD99

- antigen improves gene expression inhibition *in vivo* in Ewing's sarcoma[J]. *J Mol Recognit*, 2013, 26(7): 318-329. DOI: 10.1002/jmr.2276.
- [55] SHI J, ZHANG Z, CEN H, *et al*. CAR T cells targeting CD99 as an approach to eradicate T-cell acute lymphoblastic leukemia without normal blood cells toxicity[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 162[2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34627328/>. DOI: 10.1186/s13045-021-01178-z.
- [56] HUIJBERS E J M, VAN DER WERF I M, FABER L D, *et al*. Targeting tumor vascular CD99 inhibits tumor growth[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 651[2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31001265/>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00651.
- [57] BRINKMANN U, KONTERMANN R E. Bispecific antibodies[J]. *Science*, 2021, 372(6545): 916-917. DOI: 10.1126/science.abg1209.
- [58] YAKUSHOV S, MENYAILO M, DENISOV E, *et al*. Identification of factors driving doxorubicin-resistant Ewing tumor cells to survival[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(22): 5498[2023-03-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36428591/>. DOI: 10.3390/cancers14225498.
- [59] RAMIZ S, ELHAJ O, SIDDIQUI K, *et al*. Clofarabine in pediatric acute relapsed or refractory leukemia: where do we stand on the bridge to hematopoietic stem cell transplantation? [J]. *J Hematol*, 2023, 12(1):16-26. DOI: 10.14740/jh1065.
- [60] FALINI B, DE CAROLIS L, TIACCI E. How I treat refractory/relapsed hairy cell leukemia with BRAF inhibitors[J]. *Blood*, 2022, 139(15): 2294-2305. DOI: 10.1182/blood.2021013502.
- [61] ABBASI S, TOTMAJ M A, ABBASI M, *et al*. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells: novel cell therapy for hematological malignancies[J]. *Cancer Med*, 2022, 12(7):7844-7858. DOI: 10.1002/cam4.5551.
- [62] LARSON R C, MAUS M V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(3): 145-161. DOI: 10.1038/s41568-020-00323-z.
- [63] MURTHY S S, GUNDIMEDA S D, CHALLA S, *et al*. FISH for EWSR1 in Ewing's sarcoma family of tumors: experience from a tertiary care cancer center[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2021, 64(1):96-101. DOI: 10.4103/IJPM.IJPM\_267\_20.

[收稿日期] 2023-04-27

[修回日期] 2023-07-15

[本文编辑] 阮芳铭