

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00355

## 肾透明细胞癌转移相关的 CD99 选择性剪接异构体的筛选

林丽萍<sup>1</sup>, 武 旗<sup>2</sup>, 常文军<sup>1</sup>, 侯建国<sup>2</sup>, 张宏伟<sup>1</sup>, 谭晓洁<sup>1</sup>, 曹广文<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的:**寻找人肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)中 CD99 转移相关选择性剪接异构体,探讨 CD99 选择性剪接异构体表达与 ccRCC 转移的关系。**方法:**通过选择性剪接数据库(alternative splicing database, ASD)对 CD99 基因可能存在的选择性剪接异构体进行预测。运用自行设计的 5 对特异性引物,采用 RT-PCR 技术,在转移组织、发生及未发生转移的癌组织、癌旁组织的各混合样本中检测 6 种预测异构体的表达,再对电泳所获条带进行克隆、测序。在各个组织样本中检测 CD99 I、CD99 II 和新型 CD99 选择性剪接异构体(CD99-III)的表达。**结果:**从 6 种预测异构体中筛选出一种新型异构体(CD99-III)。该异构体在转移组织中表达率(8/9)高于未发生转移的原发癌组织(10/21,  $P < 0.05$ )。CD99 I 型在样本中均表达,CD99 II 型在发生转移的原位癌组织中表达率(6/9)远高于未转移的原发癌组织(3/21,  $P = 0.008$ )。**结论:**CD99-III 为一种新型选择性剪接异构体,且 CD99 II 型、CD99-III 的表达可能与 ccRCC 的转移进展有关。

**[关键词]** CD99; 肿瘤; 剪接异构体

**[中图分类号]** R 730.45 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)04-0355-05

### Identification of metastasis-associated alternatively spliced variants of CD99 in clear cell renal cell carcinoma tissues

LIN Li-ping<sup>1</sup>, WU Qi<sup>2</sup>, CHANG Wen-jun<sup>1</sup>, HOU Jian-guo<sup>2</sup>, ZHANG Hong-wei<sup>1</sup>, TAN Xiao-jie<sup>1</sup>, CAO Guang-wen<sup>1\*</sup>

1. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To identify the metastasis-associated splice variants of CD99 and investigate the mRNA expression of the splice variants in clear cell renal cell carcinoma(ccRCC) tissues, so as to investigate its relationship with the initiation and progression of ccRCC. **Methods:** Alternative Splicing Database was used to predict the splice variants of CD99. The six predicted splice variants of CD99 were identified in the metastatic tissues, primary ccRCCs and normal tissues adjacent to cancer by using self-designed primer sets, and were cloned into vectors and sequenced. The mRNA expression of CD99 type I, CD99 type II, and CD99-III were detected in 9 metastatic tissues and their corresponding cancer tissues, 21 primary ccRCCs and normal tissues adjacent to cancer by RT-PCR. **Results:** A new isoform of CD99 (CD99-III) was identified, which was detected in 8 of the 9 metastatic tissues, a ratio significantly higher than that in the primary ccRCCs without metastasis (10 out of 21,  $P < 0.05$ ). The results revealed that the transcripts of CD99 type I was present in all of the ccRCC specimens tested; CD99 type II was detected in 6 of 9 metastatic corresponding primary cancer tissues, a ratio significantly higher than that in cancer tissues without metastasis (3 out of 21,  $P = 0.008$ ). **Conclusion:** CD99 type II and CD99-III, a novel splice variant of CD99, may be associated with the initiation and progression of ccRCC.

**[KEY WORDS]** CD99; neoplasms; alternative splicing

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(4): 355-359]

肾细胞癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率占我国泌尿系肿瘤的第 2 位,占全身恶性肿瘤的 3%,而肾透明细胞癌(clear cell renal cell

carcinoma, ccRCC)占肾细胞癌的 60%~85%。本实验室前期采用 ccRCC 患者原发癌和转移癌原代培养细胞进行 cDNA Microarray 分析,结果提示

**[收稿日期]** 2008-09-25 **[接受日期]** 2009-02-09

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30872562),上海市教育委员会科研创新项目(08ZZ39). Supported by National Natural Science Foundation of China(30872562) and Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission(08ZZ39).

**[作者简介]** 林丽萍,硕士生. E-mail: message\_me@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

CD99 可能与癌症发生和转移有关<sup>[1]</sup>。

CD99 蛋白是由位于 X 和 Y 染色体短臂假染色体区(PAR)的 MIC2 基因编码的广泛存在于各种细胞内的跨膜蛋白,是一种与肿瘤相关的细胞黏附分子<sup>[2]</sup>。以往的研究<sup>[3-5]</sup>表明 CD99 参与一系列细胞功能,如细胞间黏附、细胞形态的维持、细胞死亡等,许多不同类型肿瘤如 Ewing 肉瘤/PNET、霍奇金淋巴瘤、乳腺癌、胃癌、前列腺癌和宫颈癌等均存在其异常表达或缺失。文献<sup>[6]</sup>提出 CD99 通过选择性剪接可产生 I 型、II 型 2 种蛋白,且有报道<sup>[7]</sup>显示 CD99 I 型显著抑制细胞的生长、迁移和转移,而II型则恰恰相反。且 Kim 等<sup>[8]</sup>发现高转移性乳腺癌细胞株 MDA-MB-435 同时表达 2 种 CD99 异构体,而非侵袭性乳腺癌细胞株 MCF-7 仅表达 CD99 I 型。以上均提示 CD99 II 型的表达与肿瘤的转移倾向有关。

CD99 在 ccRCC 中究竟存在几种异构体,且其在 ccRCC 发生发展中作用的研究目前尚没有报道。本研究通过生物信息学预测可能存在的选择性剪接异构体,采用 RT-PCR 在 ccRCC 组织中筛选新型选择性剪接异构体,旨在探讨 CD99 选择性剪接异构体表达与 ccRCC 发生和转移的关系。

1 材料和方法

1.1 CD99 选择性剪接异构体的生物信息学分析 采用 alternative splicing database (ASD)对 CD99

基因可能存在的选择性剪接异构体进行预测,预测出 8 种(图 1),ASD 网址为 <http://www.ebi.ac.uk/asd/index.html>。应用 Primer Premier 5.0 软件设计各个剪接异构体的 RT-PCR 引物,引物序列见表 1。

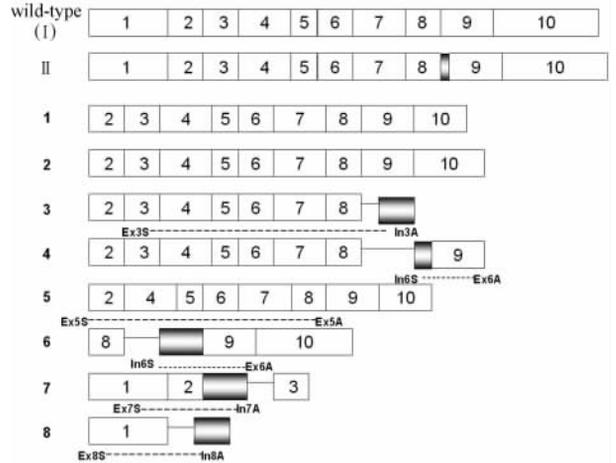


图 1 CD99 I 型、II 型、ASD 预测的 8 种异构体及其相应引物

Fig 1 Structural map of wild-type CD99, CD99 type II and eight CD99 splice variants deduced by ASD

Gray boxes represent introns which are reserved to produce effects as exons; white boxes represent exons and numbers corresponding to different exons. In the scheme, the primers used for the amplification of different special fragments are indicated

表 1 引物序列和 PCR 条件  
Tab 1 Primer's sequence and condition of PCR

Primer	Sequence(5'-3')	Expected PCR product(bp)	Annealing temperature θ/°C
CD99 type I (wild-type)	Sense GTG CGG CTA GCA CCA TGG CCC GCG GGG CTG	583	58
	Antisense TAG TCT CGA GCT ATT TCT CTA AAA GAG TAC G		
CD99 type II	Sense GTG CGG CTA GCA CCA TGG CCC GCG GGG CTG	515	58
	Antisense GCT CTA GAC CCT AGG TCT TCA GCC AT		
Ex3S/In3A	Sense GGG ATG ACT TTG ACT TAG GAG	498	55.4
	Antisense CCG CCA TGT GAT TGA GAA		
In6S/Ex6A <sup>a</sup>	Sense GAG CTT CCA TGT GCG TGT T	291	45
	Antisense AGC TGG CTC TGC GTT GG		
Ex5S/Ex5A	Sense TTA TCC GAT GCC CTT CCT	446	56.7
	Antisense TTT CTG CCG ACA ATC TTC TA		
In6S/Ex6A	Sense GAG CTT CCA TGT GCG TGT T	372	45
	Antisense AGC TGG CTC TGC GTT GG		
Ex7S/In7A	Sense CCG GAT GGT GGT TTC GAT TT	311	57.6
	Antisense ACG TGC CCC ACT TCC TGT CT		
Ex8S/In8A	Sense TGC TGG GTG TTC TGG TCG	438	57.6
	Antisense CCG TTT CAA AGG GAG GGA		

The primers for CD99 type I and type II were from references<sup>[9]</sup>. The other primers were designed for amplification of 6 variants predicted by ASD. Ex: nucleotides were located on exon; In: nucleotides were located on intron. <sup>a</sup>The primers In6S/Ex6A can also be used to amplify the 4th variant, whose product is shorter than that of the 6th variant

1.2 标本来源 ccRCC 转移和原发肿瘤标本来源 于 2004 年 1 月至 2007 年 9 月长海医院泌尿外科和

长征医院泌尿外科肾癌根治术<sup>[10]</sup>的患者以及长征医院骨科转移癌切除标本。根据患者术前检查及术后病理,将组织样本确定为9例已发生转移的ccRCC原位组织和及其相应转移组织,转移包括骨转移2例,淋巴结转移2例及癌栓5例;21例未发生转移的ccRCC原位组织和及其相应癌旁组织。

1.3 主要试剂 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; RNA 逆转录试剂盒 (A3500) 购自 Promega 公司; pMD18-T 载体 (D101A) 及 rTaq DNA 聚合酶 (R10T1) 均购自 TaKaRa 公司, DH5 $\alpha$  感受态细胞 (CB101) 及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (DP209-02) 购自北京天根生化技术有限公司。

1.4 总 RNA 提取及逆转录 细胞及组织总 RNA 提取按 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂说明书操作完成,将30例原发肿瘤(包括已发生转移的原位癌组织及未发生转移的癌组织)、21例癌旁组织及9例转移组织抽取总 RNA,并在紫外分光光度仪 UV7504 上对所提取 RNA 进行纯度鉴定和定量,每例样本总 RNA 各取 3  $\mu$ g 分别混合。取 1  $\mu$ g 总 RNA 作为模板,按 Reverse Transcription System 说明进行逆转录。

1.5 RT-PCR 及序列测定 分别以混合转移组织、混合癌组织及混合癌旁的逆转录产物 1  $\mu$ l 作为模板,1 U rTaq DNA 聚合酶,5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR Reaction buffer, 20 pmol 引物、25 nmol dNTP, 总体积 50  $\mu$ l。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 退火 45 s, 退火温度见表 1, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 25~30 个循环。最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min。溴化乙啶染色, UV 灯下观察。PCR 产物纯化后的产物与 pMD18-T 载体连接后转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌,经氨苄青霉素  $\alpha$  筛选,挑选单个克隆并培养,取 500  $\mu$ l 克隆菌液送北京天根生化科技有限公司测序。

1.6 CD99 剪接异构体在组织中的存在情况 采用 RT-PCR,检测 CD99 剪接异构体分别在 9 例转移组织及其相应原位癌组织、21 例未转移的原发癌及相应癌旁组织中的发生率,PCR 体系及反应程序同上。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,组间比较采用 Fisher 确切概率法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 ASD 分析结果及引物的设计 针对 ASD 对 CD99 预测的 8 种异构体,我们首先排除预测异构体 1、2(均包含外显子 2-9 以及部分外显子 10),因为其可能是 EST、mRNA 及基因匹配过程中产生的转录产物的一部分,且若要将其扩增出来并与其他异构体区别较困难;异构体 4、6 为外显子 8、9 间插入一段内含子导致,且 4 插入的内含子是 6 中插入内含子的一部分,故针对 4 与 6 共有的序列设计 1 对引物,若存在 4 则 PCR 产物大小为 291 bp,若存在 6 则 PCR 产物大小为 372 bp;异构体 5 为外显子 3 缺失,设计引物对 Ex5S/Ex5A,若存在 5 则片段大小为 446 bp,若不存在则可能从 DNA 中扩增出片段大小为 494 bp;3 为外显子 8、9 之间插入一段内含子,7 为外显子 2、3 间插入内含子,8 为外显子 1、2 间插入内含子,对这 3 种预测异构体,我们将引物的下游分别设计在其插入内含子中,从而保证扩增产物为该异构体。

2.2 混合样本中各异构体的存在情况 将转移、所有原位癌及癌旁组织总 RNA 分别混合后,检测 CD99 I 型、II 型及 ASD 预测的 6 种选择性剪接异构体表达,发现 I 型、II 型在转移、原位癌及癌旁的混合样本中均有表达,且 ASD 预测的异构体中 Ex3S/In3A、In6S/Ex6A、Ex7S/In7A 扩增的 PCR 产物片段与预测基本一致(图 2)。

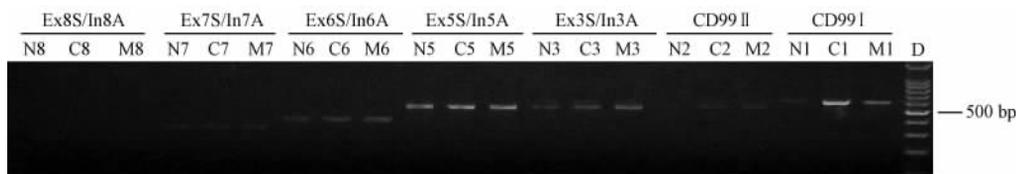


图 2 混合转移组织、原发肾细胞癌组织及癌旁组织中异构体的检测

Fig 2 Expression of CD99 splice variants deduced by ASD in mixed metastatic tissues, mixed primary ccRCCs, and mixed non-malignant tissues

M: Mixed metastatic ccRCC; C: Mixed primary ccRCC samples; N: Mixed non-malignant renal tissues; D: 100 bp DNA ladder

2.3 克隆片段的序列分析 C1、C2 的扩增结果经分析分别与文献<sup>[11]</sup>中 CD99 I 型、II 型的序列相同

(图 3), C3 的扩增片段序列则与 ASD 中提供的序列相同,如图 3C 显示 CD99 外显子 8、9 之间插入一

段 100 bp 左右的碱基,即内含子 8 中间的一部分充当外显子发挥作用,且该异构体不能由 DNA 污染产生。将该异构体命名为 CD99-III,它与 CD99 II 型均属选择性剪接模式中的内含子保留。C6、C7 测序结果经 BLAST 比对无同源序列,确定为非特异扩增。

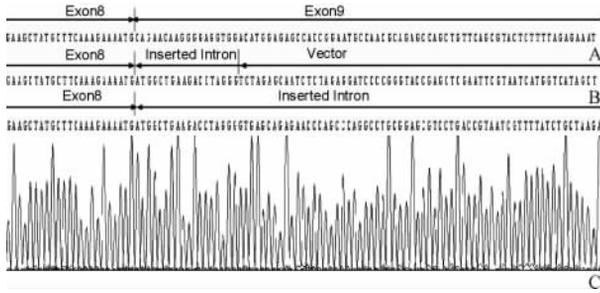


图 3 CD99 I 型、II 型及 CD99-III 测序结果  
Fig 3 Sequencing results of CD99 type I, type II, and CD99-III

A: CD99 type I contains normal splice site between exon 8 and 9; B: CD99 type II contains 18 bp intron between exon 8 and 9; C: CD99-III contains intron longer than 18 bp between exon 8 and 9

2.4 CD99 剪接异构体在 ccRCC 组织中的表达检测 CD99 I 型在所有检测的 ccRCC 组织中均有表达(60/60);CD99 II 型在转移组织相应的原位癌组织中的发生率远高于未发现转移的原发癌组织(6/9 vs 3/21,  $P=0.008$ ),且该异构体在转移组织中发生率较高(6/9),与未发生转移的原发癌组织(3/21)间也存在统计学差异( $P=0.008$ );CD99-III 在转移组织与未发生转移的原发癌组织间差别有统计学意义(8/9 vs 10/21,  $P=0.049$ ),转移与癌旁组织及原发癌组织与癌旁组织间差别无统计学意义。

### 3 讨论

CD99 基因全长为 52 kb,由 10 个外显子组成,经过转录、翻译、切掉信号肽、修饰加工,形成成熟的 CD99 蛋白质,其相对分子质量为 32 000。除野生型外目前国际上公认的 CD99 选择性剪接异构体仅 1 种即 CD99 II 型,其外显子 8、9 之间插入一段 18 bp 的内含子<sup>[11]</sup>。

有研究<sup>[9]</sup>显示 CD99 的这两种剪接异构体在细胞黏附过程中发挥相反的作用:CD99 I 型可促进 B 细胞间的同型黏附,而 II 型则抑制黏附的发生。Alberti 等<sup>[12]</sup>报道在 CD99 缺失的 Jurkat T 细胞中 CD99 I 型促进细胞黏附,而 2 种异构体的共表达诱导细胞的凋亡。由于 CD99 在细胞黏附过程中起调节作用,且在许多类型癌症侵袭进展过程中常可观

察到细胞黏附的改变,故 CD99 可能参与调节与肿瘤细胞侵袭相关的细胞内活动,这与我们前期 cDNA 基因表达谱芯片分析 CD99 基因可能与 ccRCC 的发生和转移相关的结果一致<sup>[1]</sup>。

本研究采用 ASD 针对 CD99 进行生物信息学分析,该数据库系统地收集了关于选择性剪接外显子、内含子和剪接异构体方面的数据并给予注释,且许多资源是从文献中收集获得,数据经实验室验证,具有很高的可信度。而实验结果显示 Ex3S/In3A、Ex5S/Ex5A、In6S/Ex6A、Ex7S/In7A 扩增产物电泳有单一条带,其中 Ex5S/Ex5A 扩增产物片段大小为 500 bp 左右,与预期不符,其余 3 个条带经克隆测序,只有 Ex3S/In3A 扩增产物与 ASD 预测序列一致,In6S/Ex6A、Ex7S/In7A 扩增产物经 BLAST 未找到同源序列,确定为非特异扩增。本研究中预测的 8 种异构体中仅有 1 种得到证实,可能是由于 ASD 收集了不同组织来源或其他类型肾癌组织克隆文库的 EST,预测结果并非针对 ccRCC。而 Wang 等<sup>[13]</sup>通过生物信息学分析,筛选出 845 个与人类肿瘤相关的选择性剪接异构体,且通过实验验证了某些选择性剪接异构体确实具有肿瘤类型特异性及组织特异性。当然也不排除引物设计本身的问题。

在一些恶性肿瘤中,如乳腺癌、胃腺癌、宫颈癌<sup>[8,14-15]</sup>中 CD99 I 型、II 型在细胞聚集、黏附等生物学功能方面存在差异甚至相反,且与肿瘤的发生、发展关系密切。到目前为止,还没有 CD99 异构体在 ccRCC 中表达情况的相关报道。本研究中经克隆测序 CD99 I 型、II 型与文献<sup>[9]</sup>提供序列一致,且目前为止未有 CD99-III 的相关报道。本研究中 CD99 I 型在所有检测的 ccRCC 样本中均有表达,与 Jung 等<sup>[14]</sup>报道的在所有检测的胃癌组织中均有 CD99 I 型检出结果一致,同时 CD99 II 型在癌组织及癌旁组织中均有表达,而并未检测该异构体在发生转移的原位癌组织及未发生转移的原发癌组织中表达的差异。本研究中 CD99 II 型在转移相应的原位癌组织中表达远高于未转移的原发癌组织,提示其可能与 ccRCC 的转移相关,有望用于临床筛选具有转移倾向的患者,但仍需进一步扩大样本量进行验证。实验结果验证,CD99-III 为一种新的不同于 CD99 I 型、II 型的异构体,且其在 ccRCC 转移、癌组织及癌旁组织中的表达情况表明:相比癌组织,CD99-III 在转移组织中的发生率较高,该异构体的表达在癌组织与癌旁组织间差别有统计学意义。以上结果提示 CD99 II 型与 CD99-III 的表达可能与肾透明细胞癌

的转移倾向有关。

本研究中将转移组织、原发肾细胞癌组织(包括发生转移及未发生转移的原发癌组织)及癌旁组织分别混合后抽提总 RNA 用作 RT-PCR 的模板,是由于我们旨在发现新的异构体,采用混合组织样本,可增大对异构体检测的灵敏度,以免由于样本间差异导致的异构体检测假阴性。

针对 CD99 II 型的特异性引物扩增范围为外显子 1 到外显子 8,9 间插入的 18 bp,而针对 CD99-III 的引物扩增外显子 3 到外显子 8,9 间插入的内含子范围,即这两种异构体的扩增范围部分重叠。但组织样本中 CD99-III 的发生率要高于 CD99 II 型,其原因可能是 CD99-III 无法由 CD99 II 型的引物扩增出来,也就是说 CD99-III 的 5'端与 II 型不同,该异构体的全长仍需进一步研究获得。

有研究<sup>[16]</sup>显示肿瘤组织中的选择性剪接亚型的数量显著高于正常组织,且许多情况下选择性剪接产生的亚型,其蛋白功能会发生明显改变,甚至产生拮抗作用<sup>[17-18]</sup>,均提示异常的选择性剪接与肿瘤发生相关。因此,选择性剪接作为一种增加蛋白多样性的方式的同时也为肿瘤的发生提供了机会。CD99 II 型及新剪接异构体表达的改变在肾透明细胞癌的发展进程中可能发挥着作用。进一步研究需要增加检测的样本量,并明确 CD99-III 全长序列和功能,以深入阐明 CD99-III 与肾透明细胞癌发生发展的关系。

## [参考文献]

- [1] Tan X, Zhai Y, Chang W, Hou J, He S, Lin L, et al. Global analysis of metastasis-associated gene expression in primary cultures from clinical specimens of clear-cell renal-cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123:1080-1088.
- [2] Lee J H, Kim S H, Wang L H, Choi Y L, Kim Y C, Kim J H, et al. Clinical significance of CD99 down-regulation in gastric adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13:2584-2591.
- [3] Bernard G, Zoccola D, Deckert M, Breittmayer J P, Aussen C, Bernard A. The E2 molecule (CD99) specifically triggers homotypic aggregation of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes[J]. *J Immunol*, 1995, 154:26-32.
- [4] Kim S H, Choi E Y, Shin Y K, Kim T J, Chung D H, Chang S I, et al. Generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype through downregulation of CD99 (Mic2)[J]. *Blood*, 1998, 92:4287-4295.
- [5] Bernard G, Breittmayer J P, de Matteis M, Trampont P, Hofman P, Senik A, et al. Apoptosis of immature thymocytes mediated by E2/ CD99[J]. *J Immunol*, 1997, 158:2543-2550.
- [6] Scotlandi K, Zuntini M, Manara M C, Sciandra M, Rocchi A,

- Benini S, et al. CD99 isoforms dictate opposite functions in tumour malignancy and metastases by activating or repressing c-Src kinase activity[J]. *Oncogene*, 2007, 26:6604-6618.
- [7] Ellis N A, Ye T Z, Patton S, German J, Goodfellow P N, Weller P. Cloning of PBDX, an MIC2-related gene that spans the pseudoautosomal boundary on chromosome Xp[J]. *Nat Genet*, 1994, 6:394-400.
- [8] Kim E, Lee H J, Hahn J H, Park S H, Lee H. Expression of a spliced variant of CD99 membrane protein increases motility, matrix degradation, and invasiveness of human breast carcinoma cells[J]. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 2000, 41:231-232.
- [9] Byun H J, Hong I K, Kim E, Jin Y J, Jeoung D I, Hahn J H, et al. A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281:34833-34847.
- [10] Mickisch G, Carballido J, Hellsten S, Schulze H, Mensink H, European Association of Urology. Guidelines on renal cell cancer[J]. *Eur Urol*, 2001, 40:252-255.
- [11] Hahn J H, Kim M K, Choi E Y, Kim S H, Sohn H W, Ham D I, et al. CD99 (MIC2) regulates the LFA-1/ICAM-7-mediated adhesion of lymphocytes, and its gene encodes both positive and negative regulators of cellular adhesion [J]. *J Immunol*, 1997, 159:2250-2258.
- [12] Alberti I, Bernard G, Rouquette-Jazdanian A K, Pelassy C, Pourteim M, Aussen C, et al. CD99 isoforms expression dictates T cell functional outcomes[J]. *FASEB J*, 2002, 16:1946-1948.
- [13] Wang Z, Lo H S, Yang H, Gere S, Hu Y, Buetow K H, et al. Computational analysis and experimental validation of tumor-associated alternative splicing in human cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63:655-657.
- [14] Jung K C, Park W S, Bae Y M, Hahn J H, Hahn K, Lee H, et al. Immunoreactivity of CD99 in stomach cancer[J]. *J Korean Med Sci*, 2002, 17:483-489.
- [15] Zhou J H, Ye F, Chen H Z, Zhou C Y, Lu W G, Xie X. Altered expression of cellular membrane molecules of HLA-DR, HLA-G and CD99 in cervical intraepithelial neoplasias and invasive squamous cell carcinoma[J]. *Life Sci*, 2006, 78:2643-2649.
- [16] Xu Q, Lee C. Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences[J]. *Nucleic Acid Res*, 2003, 31:5635-5643.
- [17] Matsushita K, Tomonaga T, Shimada H, Shioya A, Higashi M, Matsubara H, et al. An essential role of alternative splicing of c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor in carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 1409-1417.
- [18] Garneau D, Revil T, Fiset J F, Chabot B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280:22641-22650.

[本文编辑] 尹 茶