

网络出版时间:2024-04-30 10:08:17 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240429.1130.003

表观遗传药物联合诱导口腔癌 FMR1NB 表达的研究

张煜萱¹, 谢欢¹, 王燕靖¹, 李枫¹, 王国鉴¹, 农蔚霞^{1,2}, 刘畅^{1,3}, 罗彬^{1,2}, 谢小薰^{1,2}, 沈宁⁴, 张庆梅^{1,2}

摘要 目的 研究 DNA 去甲基化药物联合组蛋白去乙酰化酶抑制剂对人口腔癌细胞脆性 X 智障基因 1 邻近蛋白 (FMR1NB) 表达及其启动子甲基化的影响, 探寻改善 FMR1NB 表达异质性的方法和策略。方法 DNA 甲基化转移酶抑制剂地西他滨 (DAC) 联合组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A (TSA) 和丙戊酸 (VPA) 干预人舌鳞癌细胞株 Cal27 和 SCC-9 后, 采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)、实时定量 RT-PCR (qRT-PCR) 和蛋白印迹法 (Western blot) 检测干预前后 FMR1NB 的表达变化; 焦磷酸测序法检测干预前后 FMR1NB 启动子甲基化的变化。结果 与空白对照组相比, DAC 及其与 TSA 和 VPA 联合组均能显著诱导 Cal27 和 SCC-9 中 FMR1NB mRNA 和蛋白的表达。与 DAC 单独组比较, Cal27 中各联合用药组的 FMR1NB mRNA 表达水平均显著升高, 但 FMR1NB 蛋白表达无明显变化; 而 SCC-9 中除 DAC 与 TSA 联合组不能明显提升 FMR1NB mRNA 表达水平之外, 其余各组均能引起 FMR1NB mRNA 和蛋白水平的显著升高。此外, 两株细胞中 FMR1NB mRNA 和蛋白表达在三药联合组和各两药联合组之间差异均无统计学意义。进一步甲基化测定显示: 除 SCC-9 的三药联合组之外, 其余各给药组在两株细胞中 FMR1NB 启动子区的整体甲基化水平和所测各 CpG 位点的甲基化水平均有不同程度地降低。结论 DAC 及其 TSA 和 VPA 联合组普遍可介导 FMR1NB 启动子去甲基化而增强 FMR1NB 表达, 其中两药联合组的增强表达作用更强。

关键词 口腔癌; FMR1NB; 表观遗传学药物; 表达; 甲基化

中图分类号 R 739.85

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)05-0761-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.003

口腔癌是头颈部常见的恶性肿瘤, 患者预后差, 5 年生存率约 64%^[1], 需研发新的辅助治疗方法。基于肿瘤抗原的免疫治疗是一种全新的肿瘤治疗方法。癌-睾丸抗原 (cancer testis antigen, CTA) 是一类被视为肿瘤免疫治疗理想靶点的肿瘤抗原^[2], 但许多 CTA 抗原在肿瘤中的表达存在异质性^[3-4], 这将影响肿瘤免疫治疗的效果。脆性 X 智障基因 1 邻近蛋白 (fragile X mental retardation 1 neighbor protein, FMR1NB) 属于 CTA 家族成员, 研究^[5-6]显示 FMR1NB 在多种肿瘤中有表达, 且其启动子的高甲基化可导致 FMR1NB 的转录沉默^[6]。鉴于前期研究结果 FMR1NB 在肿瘤组织的表达存在异质性^[5], 故该研究拟运用表观遗传学药物 DNA 甲基化转移酶抑制剂地西他滨 (decitabine, DAC) 联合组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 和丙戊酸 (valproic acid, VPA) 对口腔癌细胞进行诱导, 然后检测药物诱导前后 FMR1NB 的表达及启动子甲基化的变化。该研究将有助于探讨 FMR1NB 的表达调控机制, 为探寻改善 CTA 异质性表达, 提高口腔癌免疫治疗效果的策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 DMEM/F12、RPMI-1640 培养基及胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; DAC (货号 A3656)、TSA (货号: V900931) 及 VPA (货号: PHR1061) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 引物由上海生物工程公司合成; RNA 提取试剂盒 (货号: RC101)、HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (货号: R323)、qRT-PCR 试剂盒 (货号: Q711) 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 蛋白抽提试剂盒 (货号: BC3710) 购自北京索莱宝科技有限公司; FMR1NB 多克隆抗体 (货号: ab121339) (稀释度 1:100) 购自英国 Abcam 公司; 基因组 DNA 抽提试剂盒 (货号: DP304) 购自北京天根生化科技有限公司;

2023-12-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82260608、81960453、82260554); 广西自然科学基金资助项目 (编号: 2022GXNSFAA-035639、2018GXNSFAA050058); 广西医科大学大学生创新创业训练计划项目 (编号: 201910598054)

作者单位: ¹广西医科大学组织学与胚胎学教研室, 南宁 530021

²广西高校区域性疾病基础研究重点实验室, 南宁 530021

³广西医科大学第一附属医院神经外科, 南宁 530021

⁴广西区人民医院口腔颌面外科, 南宁 530021

作者简介: 张煜萱, 女, 硕士研究生;

沈宁, 男, 硕士, 主任医师, 责任作者, E-mail: 472457983@qq.com;

张庆梅, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: 940478522@qq.com

EZ DNA Methylation Kits 试剂盒(货号:D5002)购自美国 Zymo Research 公司;荧光定量 PCR 仪(型号:ABI7500)购自美国 Applied Biosystems 公司;凝胶成像系统(型号:XRS + 1708265)购自美国 Biorad 公司。

1.2 细胞培养 人口腔鳞癌细胞株 Cal27 和 SCC-9 来自广西医科大学口腔医学院的馈赠。Cal27 采用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 RPMI-1640 培养基进行培养;SCC-9 则培养于含 10% FBS 的 DMEM/F12 的培养基中。将细胞置于含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中培养。

1.3 细胞给与与分组 取对数生长期的细胞,消化后将细胞分为 5 份,以相同密度和体积接种于 6 孔板中,24 h 后将药物加入培养基中,每 24 h 换药 1 次,给药期间注意用锡箔纸包裹孔板避光培养。

分组:①空白对照组(Control 组):完全培养基连续培养 5 d;②DAC 组:含 1 μmol/L DAC 的完全培养基连续培养 5 d;③DAC + TSA 组:含 1 μmol/L DAC 的培养基连续培养 5 d,其中第 5 天培养基中同时加入 1 μmol/L TSA;④DAC + VPA 组:含 1 μmol/L DAC 和 1 mmol/L VPA 的培养基连续培养 5 d;⑤DAC + VPA + TSA 组:含 1 μmol/L DAC 和 1 mmol/L VPA 的完全培养基连续培养 5 d,其中第 5 天培养基中同时加入 1 μmol/L TSA。

1.4 逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 按 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,将所得 RNA 进行浓度和纯度测定及完整性鉴定后,取 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA,具体操作按照 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(诺唯赞)说明书进行。扩增内参 GAPDH 以检测 cDNA 质量,将合格的 cDNA 用于扩增目的基因 FMR1NB。引物序列见表 1。反应体系: Master Mix 12.5 μl, ddH₂O 9.5 μl, 引物各 1.0 μl, cDNA 1.0 μl。反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。最后取扩增产物 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.5 实时定量 RT-PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 细胞总 RNA 的提取和逆转录同上。采用 SYBR Green I 染料法,通过荧光定量 PCR 仪进行扩增。反应体系: Green Mix 10 μl, ddH₂O 7.2 μl, 引物各 0.4 μl, cDNA 2 μl。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火和延伸 30 s, 共 40 个循环。引物序列见表 1。每个样本

表 1 引物列表

用途	基因	引物序列(5'-3')
RT-PCR	FMR1NB	F:CTTGGTGCGATCAGCCTTAT R:TTGATGCATGAAAACAGAACTC
	GAPDH	F:CAAGTCATCCATGACAACCTTTG R:GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG
qRT-PCR	FMR1NB	F:CTTGGTGCGATCAGCCTTAT R:TTGATGCATGAAAACAGAAC
	GAPDH	F:GCACCGTCAAGGCTGAGAAC R:TGGTGAAGACGCCAGTGA
Pyrosequencing	FMR1NB	F:GGTATAAGGGTTTGGGTTTGTGGA R:AACTTCTCCTATTCTCCCTCTC 测序:GTTTGTGGAATGAACTAGA

设置 3 个复孔并重复 3 次实验。以 GAPDH 为内参,2^{-ΔΔC_T}法计算目的基因的表达量。

1.6 蛋白印迹法(Western blot) 采用蛋白抽提试剂盒提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,将蛋白变性后进行 SDS-PAGE 电泳分离,然后转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉对膜封闭 2 h,加入 FMR1NB 多克隆抗体(稀释度 1:100)4 °C 孵育过夜;洗膜后加入二抗室温孵育 1 h,最后加入 ECL 发光液显色,利用凝胶成像系统进行曝光拍照,结果以目的条带与内参 GAPDH 条带的灰度值衡量 FMR1NB 蛋白的相对表达量。

1.7 焦磷酸测序实验(Pyrosequencing) 使用基因组 DNA 抽提试剂盒进行 DNA 提取,然后采用 EZ DNA Methylation Kits 试剂盒对 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰后,进行 PCR 扩增和测序。FMR1NB 启动子区扩增引物序列和测序引物见表 1。反应条件:5 × buffer 10 μl, ddH₂O 34.8 μl, dNTP 1.0 μl, 引物各 1.0 μl, Taq 酶 0.2 μl; DNA 2.0 μl。反应条件: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 m, 共 40 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。最后进行 Pyrosequencing 测序,由中科普瑞生物技术有限公司完成。根据测序结果,计算启动子各 CpG 位点甲基化和总体甲基化水平。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析。计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$, 两组均数分析采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 表观遗传学药物联用对 FMR1NB mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示: DAC 组、DAC + TSA 组、DAC + VPA 组及 DAC + VPA + TSA 组均能显著诱导 Cal27 和 SCC-9 细胞中 FMR1NB mRNA 的表达,见图 1。进一步 qRT-PCR 证实:与 Control 组相

比, Cal27 和 SCC-9 中 DAC 组 ($t = 12.880, P < 0.001; t = 8.184, P < 0.01$)、DAC + TSA 组 ($t = 20.520, P < 0.001; t = 5.638, P < 0.01$)、DAC + VPA 组 ($t = 28.100, P < 0.001; t = 10.130, P < 0.001$) 及 DAC + VPA + TSA 组 ($t = 6.444, P < 0.01; t = 8.868, P < 0.001$) 的 FMR1NB mRNA 表达水平显著升高。与 DAC 组相比, Cal27 中 DAC + TSA 组 ($t = 9.823, P < 0.001$)、DAC + VPA 组 ($t = 11.510, P < 0.001$) 及 DAC + TSA + VPA 组 ($t = 3.398, P < 0.05$) 的 FMR1NB mRNA 表达水平显著升高; SCC-9 细胞中除 DAC + TSA 组之外, DAC + VPA 组 ($t = 7.176, P < 0.01$) 和 DAC + TSA + VPA 组 ($t = 6.945, P < 0.01$) 的 FMR1NB mRNA 表达水平也显著高于 DAC 组。分别与 DAC + TSA 组和 DAC + VPA 组比较, DAC + TSA + VPA 组的 FMR1NB mRNA 表达水平在所测两株细胞中均未见明显差异, 见图 2。

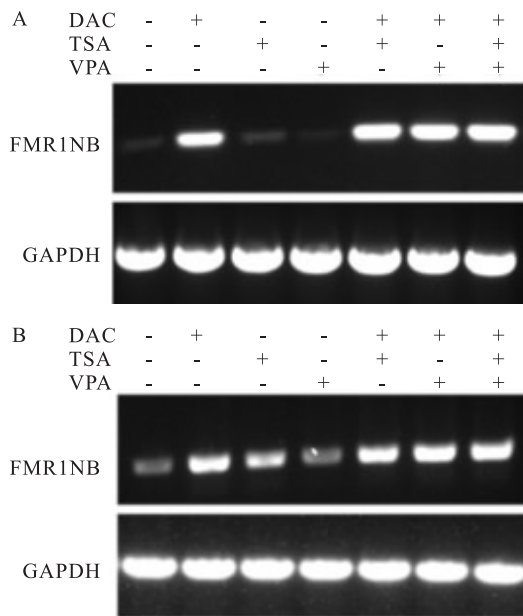


图1 RT-PCR 法检测 DAC 与 TSA、VPA 联用干预口腔癌细胞前后 FMR1NB mRNA 的表达变化
A: Cal27 细胞; B: SCC-9 细胞

2.2 表观遗传学药物联用对 FMR1NB 蛋白表达的影响 mRNA 表达水平不一定与蛋白表达水平一致, 因此进一步采用 Western blot 法检测了口腔癌细胞给药前后 FMR1NB 蛋白的表达情况, 结果如图 3 所示: 与 Control 组相比, Cal27 和 SCC-9 中 DAC 组 ($t = 175.00, P < 0.001; t = 152.80, P < 0.001$)、DAC + TSA 组 ($t = 71.31, P < 0.001; t = 202.80, P < 0.001$)、DAC + VPA 组 ($t = 120.00, P < 0.001; t =$

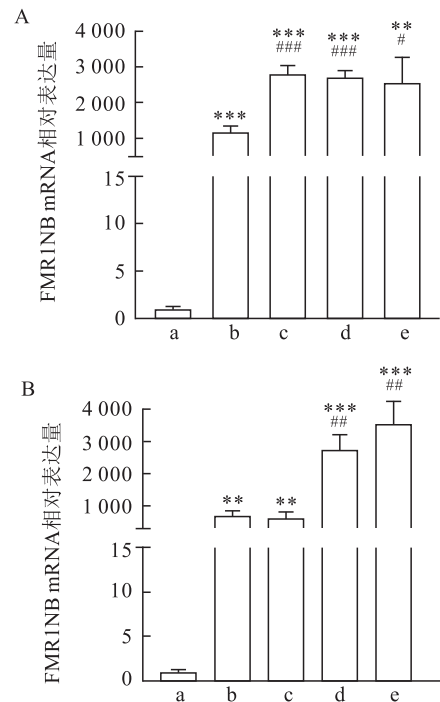


图2 qRT-PCR 法检测 DAC 与 TSA、VPA 联用干预口腔癌细胞前后 FMR1NB mRNA 表达水平的变化

A: Cal27 细胞 FMR1NB mRNA 的表达; B: SCC-9 细胞 FMR1NB mRNA 的表达; a: Control 组; b: DAC 组; c: DAC + TSA 组; d: DAC + VPA 组; e: DAC + TSA + VPA 组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 DAC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

198.20, $P < 0.001$) 及 DAC + VPA + TSA 组 ($t = 158.80, P < 0.001; t = 169.10, P < 0.001$) 的 FMR1NB 蛋白表达显著升高; 与 DAC 组相比, 仅 SCC-9 细胞中 DAC + TSA 组 ($t = 92.43, P < 0.001$)、DAC + VPA 组 ($t = 49.88, P < 0.001$) 及 DAC + TSA + VPA 组 ($t = 64.77, P < 0.001$) 的 FMR1NB 蛋白表达显著升高; 而 DAC + TSA + VPA 组的 FMR1NB 蛋白表达在所测两株细胞中均与 DAC + TSA 组和 DAC + VPA 组无显著差异。

2.3 表观遗传学药物联用对 FMR1NB 启动子甲基化的影响 为了解表观遗传学药物增强 FMR1NB 表达的机制, 进一步通过焦磷酸测序法分析 FMR1NB 启动子的甲基化情况。所检测的启动子区域和 CpG 位点见图 4。结果显示, 与 Control 组相比, 除 SCC-9 细胞中 DAC + TSA + VPA 组之外, Cal27 的 DAC 组 ($t = 39.86, P < 0.001$)、DAC + TSA 组 ($t = 36.65, P < 0.001$)、DAC + VPA 组 ($t = 44.29, P < 0.001$) 和 DAC + VPA + TSA 组 ($t = 34.16, P < 0.001$) 与 SCC-9 的 DAC 组 ($t = 10.86, P < 0.001$)、DAC + TSA 组 ($t = 12.03, P < 0.001$) 和 DAC + VPA

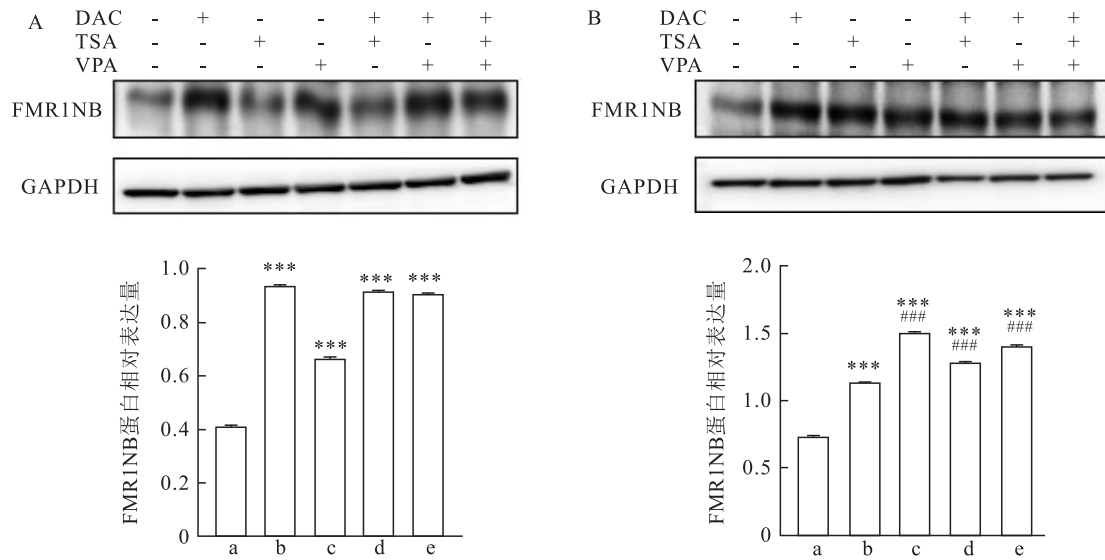


图3 Western blot 法检测 DAC 与 TSA 和 VPA 联用干预口腔癌细胞前后 FMR1NB 蛋白表达变化

A: Cal27 细胞 FMR1NB 蛋白相对表达量; B: SCC-9 细胞 FMR1NB 蛋白相对表达量; a: Control 组; b: DAC 组; c: DAC + TSA 组; d: DAC + VPA 组; e: DAC + TSA + VPA 组; 与 Control 组比较: *** $P < 0.001$; 与 DAC 组比较: ### $P < 0.001$

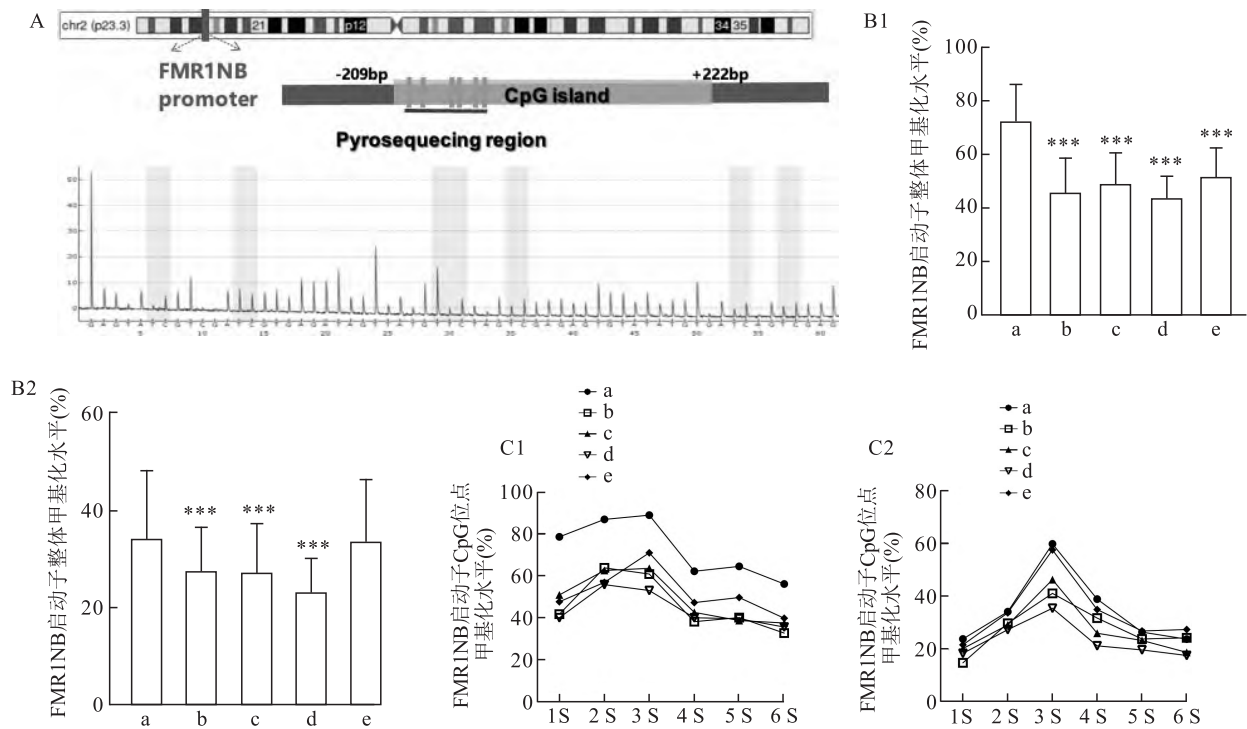


图4 Pyrosequencing 法检测 DAC 与 TSA 和 VPA 联用干预口腔癌细胞前后 FMR1NB 启动子区甲基化水平变化

A: FMR1NB 启动子区 CpG 岛及所测甲基化位点模式图; B: FMR1NB 启动子区的整体甲基化水平变化; C: FMR1NB 启动子区各 CpG 位点的甲基化水平变化; 1: Cal27 细胞; 2: SCC-9 细胞; a: Control 组; b: DAC 组; c: DAC + TSA 组; d: DAC + VPA 组; e: DAC + TSA + VPA 组; 与 Control 组比较: *** $P < 0.001$

组 ($t = 16.12, P < 0.001$) 的 FMR1NB 启动子区整体甲基化水平均显著下降, 但 DAC 组、DAC + TSA 组、DAC + VPA 组和 DAC + VPA + TSA 组之间的 FMR1NB 启动子区整体甲基化水平差异均无统计学

意义, 见图 4B。进一步分析所检测的 FMR1NB 启动子区的 6 个 CpG 位点, 发现大部分 CpG 位点在各组中的变化趋势与上述整体甲基化水平的变化基本一致, 见图 4C。

3 讨论

CTA 抗原的表达特性使其成为肿瘤免疫治疗的理想靶点,目前一些 CTA 已进入临床试验并取得一定的疗效^[7]。然而,许多 CTA 表达的异质性使其在肿瘤免疫治疗中的应用面临挑战,因为 CTA 表达阳性的肿瘤组织中所混杂的阴性或低表达瘤细胞,将会产生免疫逃逸,影响治疗效果。因此,诱导这些阴性/低表达的瘤细胞重新表达/高表达 CTA 可能是克服肿瘤免疫逃逸的一种策略,而采用表观遗传学药物可能是改善 CTA 表达异质性,提高肿瘤免疫治疗效果的一种有效策略^[3-4]。

表观遗传学在基因表达调控中发挥重要作用。DNA 甲基化和组蛋白乙酰化是两种主要表观遗传修饰形式。研究^[8]表明 DNA 甲基化通过干扰转录因子与基因启动子结合而致基因沉默;组蛋白乙酰化则通过染色质重塑而增强转录。也有文献^[9-10]报道甲基化 DNA 可通过甲基化 CpG 结合蛋白(MBPs)募集组蛋白去乙酰化酶(HDACs),提示 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化具有协同作用。

目前已发现许多 CTA 表达与表观遗传学调控有关^[11-12]。如 STK31 受甲基化调控,促进胰腺癌的发展^[11];表观遗传学药物可上调肝癌 ACRBP 的表达,增强肝癌免疫效果^[13]。FMR1NB 属于 CTA,具有用于肿瘤免疫治疗的潜质。但该课题组前期发现其在肿瘤存在异质性表达,加之 FMR1NB 启动子区存在 CpG 岛,且其高甲基化可致 FMR1NB 转录沉默^[6]。故推测 FMR1NB 表达与甲基化调控有关。

已知 DAC 是一种常见的去甲基化药物,对肿瘤相关基因的诱导作用明显,但对正常细胞基因通常无影响^[14];目前 DAC 用于肿瘤临床治疗,已显示出一定的临床疗效^[13],故该研究选择 DAC 来诱导口腔癌细胞。而鉴于 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化具有协同效应,故将 DAC 与 TSA、VPA 联用。TSA 和 VPA 是组蛋白去乙酰化酶抑制剂,同样在临床也有一定应用,将这些“老药新用”,具有更好的安全性和可靠性。

该研究结果显示所有给药组都能不同程度地诱导所检测的口腔癌细胞 FMR1NB 表达,且联合用药组的诱导作用普遍优于 DAC 单独组,提示药物联用更能改善 FMR1NB 表达异质性。而为何三药联用与两药联用对 FMR1NB 的诱导无差异,可能与 TSA 和 VPA 的作用相似,其靶向的组蛋白乙酰化位点相同有关。该研究表明某些分组的 FMR1NB mRNA

和蛋白水平表达显著不一致,如 Cal27 中 DAC 与 TSA 或/和 VPA 联用能在 mRNA 水平表现出优于 DAC 单独组的诱导效应,但在蛋白水平无明显效应,这可能与转录后水平的调控有关。此外,结果显示 DAC 及其与 TSA、VPA 联用组多能不同程度地降低 FMR1NB 启动子区的甲基化水平,说明这些联用组对 FMR1NB 的表达增强作用与 DNA 甲基化相关;其可能的机制为 DAC 诱导 FMR1NB 启动子去甲基化后,一些转录因子结合促进了 FMR1NB 的转录;也有可能为 FMR1NB 启动子的低甲基化,阻碍了 MBPs 的结合,不能募集 HDACs,加之 TSA 和 VPA 的共同作用,促使组蛋白乙酰化,从而促进 FMR1NB 的转录表达。

综上所述,该研究说明表观遗传学药物联用在一定程度上能改善口腔癌 FMR1NB 的表达异质性。但也存在一些不足:① 所检测的 FMR1NB 启动子 CpG 位点较少;② 没有检测用药后组蛋白乙酰化水平的变化;③ 没有进行 FMR1NB 表达异质性改善后,肿瘤免疫治疗效果的检测等。今后将针对以上不足深入探讨,为将来将 FMR1NB 应用于口腔癌免疫治疗提供参考资料。

参考文献

- [1] Zanon D K, Montero P H, Migliacci J C, et al. Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985–2015) [J]. *Oral Oncol*, 2019, 90: 115–21.
- [2] Zhao J, Xu Z, Liu Y, et al. The expression of cancer-testis antigen in ovarian cancer and the development of immunotherapy [J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(2): 681–94.
- [3] Losic B, Craig A J, Villacorta-Martin C, et al. Intratumoral heterogeneity and clonal evolution in liver cancer [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 291.
- [4] Li X F, Ren P, Shen W Z, et al. The expression, modulation and use of cancer-testis antigens as potential biomarkers for cancer immunotherapy [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(11): 7002–19.
- [5] Bi S Q, Peng Y, Wei Z D, et al. FMR1NB involved in glioma tumorigenesis is a promising target for prognosis and therapy [J]. *Curr Med Sci*, 2022, 42(4): 803–16.
- [6] Park J H, Song M H, Lee C H, et al. Expression of the human cancer/testis antigen NY-SAR-35 is activated by CpG island hypomethylation [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(6): 1085–91.
- [7] Okumura S, Ishihara M, Kiyota N, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy targeting a MAGE A4 peptide and HLA-A*02:01 complex for unresectable advanced or recurrent solid cancer: Protocol for a multi-institutional phase 1 clinical trial [J]. *Bmj Open*, 2022, 12(11): e065109.
- [8] Zhang B L, Gu X H, Han X, et al. Crosstalk between DNA methylation and histone acetylation triggers GDNF high transcription in

- glioblastoma cells [J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 47.
- [9] Dasko M, De Pascual-Teresa B, Ortín I, et al. HDAC Inhibitors: Innovative strategies for their design and applications [J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 715.
- [10] Peng Z, Zhou W J, Zhang C, et al. Curcumin controls choriocarcinoma stem-like cells self-renewal *via* repression of DNA methyltransferase (DNMT)- and histone deacetylase (HDAC)-mediated epigenetic regulation [J]. *Med Sci Monitor*, 2018, 24: 461–72.
- [11] Gao H, Cai B B, Lu Z P, et al. Cancer-testis gene is regulated by methylation and promotes the development of pancreatic cancer [J]. *Cancer Med-Us*, 2023, 12(6): 7273–82.
- [12] Ge Y Y, Zhang Q M, Liu C, et al. Combined treatment with epigenetic agents enhances anti-tumor activity of T cells by upregulating the ACRBP expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(7): 7591–609.
- [13] Zhou S, Tremblay D, Hoffman R, et al. Clinical benefit derived from decitabine therapy for advanced phases of myeloproliferative neoplasms [J]. *Acta Haematol-Basel*, 2021, 144(1): 48–56.
- [14] Zhong G C, Zhao W Q, Li Y S, et al. MAGEA1 and hTERT Peptide treatment improves the potency of the dendritic cell- cytotoxic T lymphocytes (DC-CTL) immunotherapy in DAC treated acute myeloid leukemia [J]. *J Cancer*, 2022, 13(4): 1252–60.

Epigenetic drug combination induced the expression of FMR1NB in oral carcinoma

Zhang Yuxuan¹, Xie Huan¹, Wang Yanjing¹, Li Feng¹, Wang Guojian¹, Nong Weixia^{1,2},
Liu Chang^{1,3}, Luo Bin^{1,2}, Xie Xiaoxun^{1,2}, Shen Ning⁴, Zhang Qingmei^{1,2}

¹*Dept of Histology and Embryology, Guangxi Medical University, Nanning 530021;*

²*Key Laboratory of Regional Basic Research on Diseases in Guangxi Universities, Nanning 530021;*

³*Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021;*

⁴*Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, Guangxi District People's Hospital, Nanning 530021)*

Abstract Objective To investigate the effects of DNA demethylation drugs combined with histone deacetylase inhibitors on fragile X mental retardation 1 neighbor protein (FMR1NB) expression and its promoter methylation in human oral cancer cells and try to find a strategy of weakening the heterogeneity of FMR1NB expression. **Methods**

Human oral cancer cell lines Cal27 and SCC-9 were treated with decitabine (DAC), an inhibitor of DNA methyltransferase, combined with trichostatin A (TSA) and valproic acid (VPA), inhibitors of histone deacetylase. Then reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the expression of FMR1NB and pyrosequencing was used to detect the methylation of FMR1NB promoter. **Results** Compared with the blank control group, DAC and its combination with TSA and VPA significantly induced the expression of FMR1NB mRNA and protein in Cal27 and SCC-9 cells. Compared with DAC alone group, FMR1NB mRNA expression of each DAC-combined drug groups significantly increased, but FMR1NB protein did not significantly change in Cal27 cells; for SCC-9 cells, except for DAC + TSA group, the mRNA and protein levels of FMR1NB significantly increased in all other groups. In addition, there was no significant difference in the expression of FMR1NB mRNA and protein between the three-combined drugs group and two-combined drugs groups. Further methylation assay showed that the methylation level of the overall FMR1NB promoter and its each CpG site measured were reduced to varying degrees in all treatment groups except for three-combination drug group of SCC-9. **Conclusion** DAC and its combination with TSA and VPA can enhance the expression of FMR1NB by mediating the demethylation of FMR1NB promoter, wherein the enhanced expression effect of the combination of the two drugs is stronger, suggesting that they have the potential to weaken the heterogeneity of FMR1NB expression and improve the immunotherapy effect of oral cancer.

Key words oral cancer; FMR1NB; epigenetic drugs; expression; methylation