

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.23.021

口腔白斑抑癌基因 DAPK 和 TIG1 高甲基化表达研究 *

柳 杨¹ 周曾同² 龚中坚¹ 吴祥冰¹ 於 俊^{1Δ}

(1 南京医科大学附属无锡人民医院口腔科 江苏 无锡 214023;

2 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔黏膜病科 上海 200011)

摘要 目的:探讨抑癌基因 DAPK、TIG1 高甲基化在口腔白斑中表达状态及其对口腔癌发生发展中的作用。**方法:**取 77 例口腔白斑、32 例口腔鳞癌、32 份正常口腔黏膜组织,用实时定量甲基化特异性 PCR 技术检测组织中 DAPK、TIG1 高甲基化表达并进行统计学分析。**结果:**DAPK 在口腔鳞癌组织中高甲基化表达率为 46.9%,表达量为(0.0728±0.1617),明显高于其在口腔白斑组织(19.5%,0.0070±0.0172)和口腔正常组织(18.8%,0.0021±0.0050)中的表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。DAPK 高甲基化表达与口腔白斑组织上皮异常增生程度相关,上皮增生高风险组相对于低风险组 DAPK 高甲基化表达风险增加(OR,1.013;95% CI,1.004-1.023; $P=0.004$)。TIG1 高甲基化在正常组织中未表达,在口腔鳞癌组织和口腔白斑组织表达为(28.1%,0.0174±0.0440)和(27.3%,0.0035±0.0076),与正常组织相比具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**抑癌基因 DAPK、TIG1 高甲基化有望成为口腔黏膜癌变早期标志物。

关键词:口腔白斑;口腔癌前病变;高甲基化;DAPK;TIG1

中图分类号:R781.5;R739.85 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)23-4506-05

Hypermethylation of DAPK and TIG1 in Oral Leukoplakia*

LIU Yang¹, ZHOU Zeng-tong², GONG Zhong-jian¹, WU Xiang-bing¹, YU Jun^{1Δ}

(1 Department of Stomatology, The Affiliated Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu, 214023, China;

2 Department of Oral Mucosal Diseases, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200011, China)

ABSTRACT Objective: To detect promoter hypermethylation status of tumor suppressor genes of DAPK and TIG1 in oral leukoplakia (OLK) and explore its potential roles in oral carcinogenesis. **Methods:** DAPK and TIG1 hypermethylation were evaluated in 77 OLK, 32 oral squamous cell carcinomas (OSCC) and 40 normal tissues by quantitative methylation-specific PCR (QMSP). **Results:** It was found that DAPK were hypermethylated in OSCC. The frequency (46.9%) and the quantity (0.0728±0.1617) of DAPK hypermethylation in OSCC was significant higher than those in OLK and normal tissues (OLK: 19.5%, 0.0070±0.0172; normal tissues: 18.8%, 0.0021±0.0050, $P<0.05$). Furthermore, DAPK hypermethylation was significantly correlated with epithelial dysplasia. Compared with the low malignant potential group of OLK patients(LMP), the high malignant potential group (HMP) was more likely to express increased gene hypermethylation of DAPK (OR, 1.013; 95% CI: 1.004-1.023; $P=0.004$). No hypermethylation of TIG1 was found in normal tissues. The frequency (OSCC: 28.1%; OLK: 27.3%) and the quantity (OSCC: 0.0174±0.0440; OLK: 0.0035±0.0076) of TIG1 hypermethylation were both higher than those in normal tissues ($P<0.05$). **Conclusions:** Our data suggested that DAPK and TIG1 hypermethyations were associated with oral precancer and may be useful as early detection markers for oral cancer.

Key words: Oral leukoplakia; Oral precancer; Hypermethylation; DAPK; TIG1

Chinese Library Classification(CLC): R781.5; R739.85 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)23-4506-05

前言

口腔白斑病(Oral leukoplakia, OLK)是一种常见的口腔黏膜潜在恶性疾病,约有 4-13% OLK 患者转变为口腔鳞状细胞癌(Oral squamous cell carcinomas, OSCC)^[1,2]。早期治疗可以有

效减少 OSCC 的发生。抑癌基因启动子高甲基化造成抑癌基因表达降低或失活,对肿瘤的早期诊断具有重要的临床意义。在口腔鳞癌中检测到多种抑癌基因的高甲基化表达^[3,4]。死亡相关蛋白激酶(Death associated protein kinase, DAPK)、他扎罗汀诱导基因 1(Tazarotene-induced gene-1, TIG1)甲基化与多种肿瘤

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81502347)

作者简介:柳杨(1982-),女,博士研究生,副主任医师,主要研究方向:口腔黏膜癌前病变,
电话:0510-85351243, E-mail: liuyang1261982@163.com

Δ 通讯作者:於俊(1974-),男,本科,副主任医师,主要研究方向:口腔临床医学, E-mail: 19yujun74@163.com

(收稿日期:2022-04-28 接受日期:2022-05-24)

的发生相关^[56]。本研究应用实时定量甲基化 PCR 技术分析正常口腔黏膜、口腔白斑、口腔鳞状细胞癌组织中 DAPK、TIG1 启动子高甲基化的表达,同时评估其作为口腔白斑癌变早期诊断标记物的潜在可能性,为口腔癌早期诊断寻找新的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

384 孔定量 PCR 仪为美国 Roche 公司生产,离心机 Alle-

gra™ X-12R,微量离心机 Microfuge® 16 购自美国 BECKMAN 公司。1 M Tris HCL 购自 Sigma 公司;1 M MgCl₂,0.5 M EDTA,10 % SDS,10 mg/mL ssDNA 购自 Fluka 公司;Glycogen 购自 Roche 公司;5 U/μL Plat Taq 聚合酶购自 invitrogen 公司;Wizard clean-up 试剂盒购自 Promega 公司;待测基因 DAPK, TIG1,内参基因 ACTB,探针及引物序列由 Invitrogen 公司合成(表 1)。

表 1 实时定量甲基化特异性 PCR 探针及引物序列

Table 1 Time quantitative methylation specific PCR probe and primer sequence

Gene	Primer sequence	Probe sequence
ACTB	5'-3'TGGTGATGGAGGAGTTTAGTAAGT	ACCACCACCCAACACACAATAA-CAAA-
	3'-5'AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA	CACA
DAPK	5'-3'GGATAGTCGGATCGAGTT AACGTC	TTCGGTAATTCGTAGCGGTAGG-GTTTGG
	3'-5'CCCTCCCAAACGCCGA	
TIG1	5'-3'TTTTCGTCG CGGTTTGG	TCGGTTTTGCGTTGCGGAGGC
	3'-5'CGCTACCCGAACCTAATACTAAAATACG	

1.2 组织标本

选取 2006 年至 2018 年就诊于南京医科大学附属无锡人民医院口腔科和上海交通大学附属第九人民医院口腔黏膜科的口腔白斑患者 77 例,口腔鳞癌患者 32 例,正常对照 32 例。

临床资料见表 2。收取手术中病损组织样本。正常黏膜组织取材于正颌外科手术和阻生牙拔除患者。所有病例均经病理诊断证实,术前未进行放疗、化疗及激素治疗,且无自身系统性疾病和癌症史。研究对象均签署知情同意书。

表 2 受检患者临床资料特征

Table 2 Baseline characteristics of the patients in tissue samples analysis

Groups	Amount (n)	Age($\bar{x} \pm s$)	Sex		Smoke		epithelial dysplasia		T stage	
			M	F	Yes	No	LMP	HMP	T1/T2	T3/T4
OLK Group	77	56.1± 11.3	42	35	38	39	44	33	-	
OSCC Group	32	55.0± 13.5	19	13	15	17	-		22	10
N Group	32	31.63± 9.92	16	16	10	22	-		-	

Note: N Group (normal tissue group); LMP (OLK with none and mild epithelial dysplastic); HMP (OLK with moderate and severe epithelial dysplastic).

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取和纯化 收取组织经病理确认后,苯酚-氯仿法提取组织 DNA, 紫外线分光光度仪测定提取 DNA 的浓度和纯度。按浓度取 1-2 μg 组织 DNA (约 20 μL),3 M NaOH 2 μL,10 mg/mL ssDNA 1 μL;ddH₂O 补足 25 μL 反应体系,充分混合,heat block 50 °C,20 分钟。向反应后的 DNA 样本中加入 500 μL 对苯二酚/重硫酸盐溶液,在 70 °C 下避光孵育 3 h 进行重亚硫酸盐处理。按照 Wizard clean-up 试剂盒使用说明进行重亚硫酸盐处理后的 DNA 纯化。

1.3.2 实时定量甲基化特异性 PCR 检测 配置 7 μL 反应溶液:1.0 μL lab 10× Buffer;0.2 μL 25 mM dNTP 混合液;0.06 μL 100 μM F primer;0.06 μL 100 uM R primer;0.06 μL (5 U/μL) PlatTaq 聚合酶;0.02 μL 100 μM Probe;5.6 μL 双蒸水。实时定量甲基化 PCR 反应体系单孔 10 μL 由 3 μL 检测 DNA 和 7 μL 反应溶液组成。加样 384 孔 PCR 板,5000 rpm 离心,置入 384 孔定量 PCR 仪检测。实时定量甲基化 PCR 反应条件为 95 °C

10 min;95 °C 10 s ,60 °C 20 s 45 个循环;40 °C 1 s。结果判定:各组织样本的检测基因和内参基因分别进行实时定量甲基化 PCR 反应。每个样本做 3 个拷贝,计算浓度时取平均值。根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线,各样本目的基因和内参基因 ACTB 的浓度结果直接由机器生产。每个待测样本的待测基因除以内参基因的浓度,即为此样本本基因的校正后的甲基化相对含量。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 23.0 统计软件,采用非参数 Mann-Whitney U 比较三组组织 DNA 基因高甲基化表达量的不同;采用卡方检验评定三组高甲基化表达率的情况及高甲基化表达与临床资料的相关性。受试者工作特性曲线 (Receive operator characteristic curves,ROC) 用来评判基因高甲基化预测癌变的效能。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。散点图及 ROC 曲线由 GraphPad Prism 9 绘制。

2 结果

2.1 口腔组织中 DAPK、TIG1 高甲基化表达情况

在口腔正常组织、口腔白斑和口腔鳞癌组织中均检测到 DAPK 高甲基化的表达。其中, DAPK 在口腔鳞癌组织中高甲基化表达率为 46.9%, 明显高于其在口腔白斑组织(19.5%)和口腔正常组织(18.8%)中的表达, 差异有统计学意义(P_{OSCC}

vs OLK=0.004; P_{OSCC} vs N=0.017)。DAPK 在口腔鳞癌组织中的高甲基化表达量同样明显高于其在口腔白斑组织和正常组织中的表达, 差异具有统计学意义 ($OSCC$ vs OLK: 0.0728 ± 0.1617 vs 0.0070 ± 0.0172 , $P=0.001$; $OSCC$ vs N: 0.0728 ± 0.1617 vs 0.0021 ± 0.0050 , $P=0.017$)。口腔白斑组和正常组织相比, DAPK 高甲基化表达差异没有统计学意义。见图 1 A, 表 3。

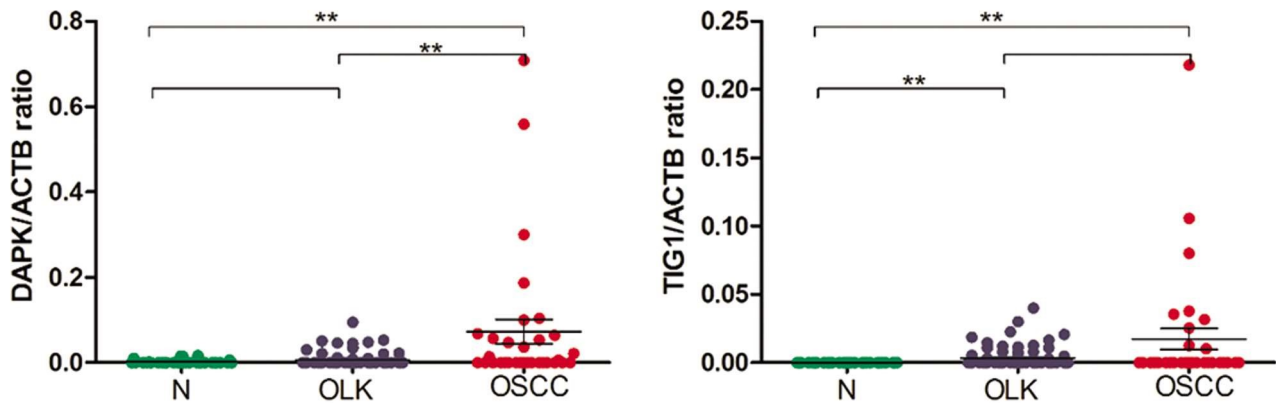


图 1 各组组织中 DAPK 和 TIG1 高甲基化表达散点图分析

Fig.1 Scatter plot analysis of DAPK and TIG1 hypermethylation in the three groups

Note: Data are expressed as DAPK/ACBT ratio and TIG1/ACBT ratio, ** $P<0.001$.

与 DAPK 高甲基化表达不同, 在正常组织中并未发现 TIG1 高甲基化表达。口腔鳞癌组织和口腔白斑组织中, TIG1 高甲基化表达率为 28.1%, 27.3%, 无显著差异性。两组中 TIG1 高甲基化表达量分别为 $OSCC: 0.0174 \pm 0.0440$; $OLK: 0.0035 \pm$

0.0076 , 虽然口腔癌组中表达值相对较高, 但无显著差异。与正常组相比, 口腔鳞癌和口腔白斑组中 TIG1 高甲基化表达均有显著差异($P<0.001$)。见图 1 B, 表 3。

表 3 口腔白斑、口腔鳞癌和正常组织中 DAPK 和 TIG1 高甲基化表达比较
Table 3 Frequency (F) and quantity (Q) of gene hypermethylation in the three groups

		OLK (n=77)	OSCC (n=32)	N(n=32)	$P_{(OLK \text{ vs } OSCC)}$	$P_{(OLK \text{ vs } N)}$
DAPK	F	15 (19.5)	15 (46.9)	6 (18.8)	0.004	0.065
	Q	0.0070± 0.0172	0.0728± 0.1617	0.0021± 0.0050	0.001	0.088
TIG1	F	21 (27.3)	9 (28.1)	0 (0)	0.928	0.001
	Q	0.0035± 0.0076	0.0174± 0.0440	0.0000± 0.0000	0.499	0.001

Note: Statistically significant ($P<0.05$) results in boldface type.

DAPK、TIG1 在口腔鳞癌组织中的高甲基化表达量明显增高, 我们采用 ROC 分析高甲基化表达量检测早期癌症效能, 阳性判断值(Cutoff)。以病理表现为口腔鳞癌为金标准, ROC 曲线分析结果显示, DAPK 高甲基化 Cutoff 为 0.0362, 敏感性为 37.5%, 特异性为 94.5%, ROC 曲线下面积为 0.67, $P=0.004$ 。见图 2。

2.2 DAPK、TIG1 高甲基化表达与临床资料相关分析

我们分析临床资料对 DAPK 高甲基化表达的影响因素发现, 在口腔白斑组中, DAPK 高甲基化表达阳性样本中, 上皮增生高风险组 DAPK 甲基化表达率为 25.8%, 低风险组 DAPK 高甲基化表达率为 15.2%, Logistic 回归模型分析, 上皮增生高风险组相对于低风险组 DAPK 高甲基化表达风险增加(OR, 1.013; 95% CI, 1.004-1.023; $P=0.004$)。年龄、性别及吸烟与 DAPK 高甲基化表达无明显相关性。各临床参数与 TIG1 高甲

基化表达无明显相关性。

3 讨论

口腔鳞癌一般起源于口腔黏膜上皮, 容易发生颈部淋巴结转移, 五年生存率为 51%-69%^[7]。早期诊断和早期治疗是提高口腔癌治疗成功率的关键。肿瘤的发生是多步骤、多中心、多因素参与的复杂过程。在正常细胞到癌细胞之间的癌前病变阶段具有重要的意义。因此癌前病变的研究成为探索肿瘤发生机制的一个主要方向。口腔白斑是一种重要的口腔潜在恶性疾病^[8]。与健康个体相比, 口腔潜在恶性疾病有更高癌变的风险^[9]。对口腔白斑的早期防治可以有效减少口腔癌的发生。目前, 临床上依据组织病理学检查分析口腔白斑癌变风险, 尚缺乏可靠的生物标记物。

表观遗传的变化, 包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 miRNA

表达变化已被研究作为各种癌症的潜在标记物。启动子区域的 DNA 甲基化是癌变中最常见的遗传表现变化。因此 DNA 甲基化作为癌变风险评估的标记物受到关注^[10]。异常甲基化已被观察作为口腔癌发生的早期分子事件^[11-13],DNA 高甲基化模式具有口腔癌前进展的诊断生物标志物的潜在作用^[14,15]。

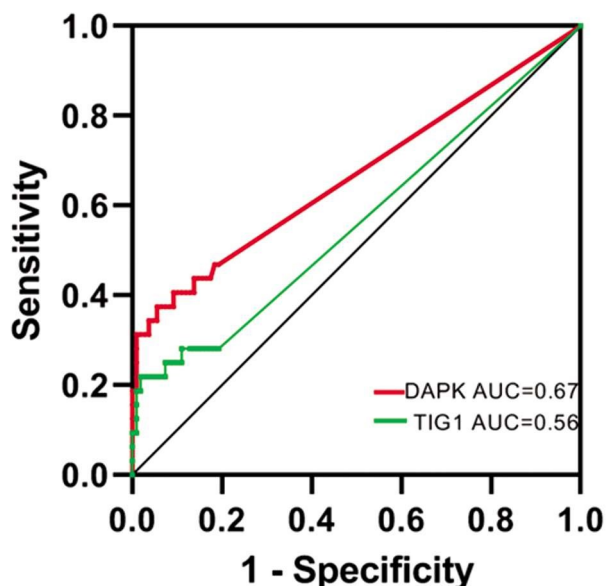


图2 DAPK 和 TIG1 甲基化表达量区分口腔癌变效能的 ROC 曲线图

Fig.2 ROC curve analysis for oral carcinogenesis base on the quantity of gene methylation

抑癌基因 DAPK 具有参与细胞凋亡、细胞迁徙等生物学功能,在正常组织中均有表达^[16]。TIG1 又称为维 A 酸受体反应子 1,负责编码具有糖基化信号传导和透明质酸结合动力的跨膜蛋白。近年来的研究发现,DAPK、TIG1 启动子甲基化表达可使其表达沉默,从而抑制细胞凋亡,参与肿瘤的发生发展^[17,18]。但口腔癌及口腔癌前病变中抑癌基因 DAPK、TIG1 启动子高甲基化的表达研究较少。

本研究对口腔白斑以及口腔鳞癌组织中 DAPK、TIG1 甲基化表达进行检测,结果显示 DAPK 高甲基化在口腔鳞癌组中表达明显高于其在口腔白斑组和正常组中的表达。一项 Meta 分析表明,亚洲地区 DAPK 启动子甲基化与头颈部癌之间存在着显著关联($OR=4.43, 95\% CI=2.29-8.58$)^[19]。我们在研究中发现 DAPK 启动子高甲基化在口腔鳞癌中的表达率和表达量都明显高于白斑组和正常组。TIG1 高甲基化在口腔白斑组和口腔鳞癌组中有明显表达,而在正常组织中,TIG1 高甲基化表达为 0。Mizui^[20]等报道了食管鳞状细胞癌中,TIG1 甲基化表达阳性率为 17.9%。本研究对口腔白斑和口腔鳞状细胞癌中甲基化表达的阳性情况,基本与这些报道是相符合的。我们的研究表明 DAPK、TIG1 启动子高甲基化可能在口腔癌的发生发展中起重要的作用。

本研究通过比较不同组中 DAPK、TIG1 高甲基化表达情况发现,DAPK 高甲基化在口腔鳞癌组中表达明显高于其在口腔白斑组和正常组中的表达,而口腔白斑组和正常组差异不明显,这可能提示 DAPK 高甲基化促进口腔癌的发生。TIG1 高甲基化表达情况不同,口腔白斑组和口腔鳞癌组中 TIG1 高甲基

化与正常组相比,均有显著差别,而口腔白斑组和癌症组之间无明显差异,这可能暗示 TIG1 高甲基化在癌前病变期参与了上皮细胞的改变,但在口腔癌症发生期趋于稳定状态。启动子高甲基化使抑癌基因失活可能发生在癌症的某个时间或是在癌症发生的整个过程都重要作用,可以作为癌症早期诊断及预后的生物标记物^[21,22]。我们的研究结果证实了抑癌基因甲基化在癌症发生中作用的不同步,DAPK、TIG1 启动子高甲基化都参与了口腔癌的发生,并且发生在口腔癌的不同阶段。这提示了 DAPK、TIG1 高甲基化作为口腔早期癌变的筛查标记物的可能性。目前,我们研究仅限于不同疾病队伍中启动子高甲基化表达状态的横断面研究,DAPK、TIG1 高甲基化预测癌症的发展仍需要相同患者队列进行前瞻性的研究,评估其预测癌变的能力。

临床上,口腔白斑组织学上皮异常增生程度作为其癌化危险性评价的重要指标^[23]。在分析甲基化表达与临床资料的相关性中,我们发现组织 DAPK 高甲基化与口腔白斑上皮异常增生相关。这一结果同样证实了 DAPK 高甲基化对口腔癌发生发展的促进作用。通过 ROC 曲线来评判 DAPK 高甲基化预测口腔癌发生的能力,我们发现组织 DAPK 高甲基化可以较好的区分癌前病变和口腔癌组织。Mori 等通过 6 种抑癌基因甲基化的组合区分口腔癌和临床诊断的口腔潜在恶性疾病,能准确诊断口腔癌。提示甲基化基因组可以作为口腔癌的新生物标记物^[24]。通过 QMSP 检测口腔组织中 DAPK 高甲基化的表达情况,可以做为辅助病理,指导治疗的一个可行性的检测指标。DAPK、TIG1 高甲基化预测癌变的效能不高,可以通过额外的生物标记物来提高筛查性能,有望成为预测口腔癌的基因组成员。

另外,我们注意到文献中关于甲基化表达的研究,对照组的选择是不同的。由于健康者健康组织的获取受到伦理的限制,在本实验中,正常组组织是从整颌外科,阻生牙患者手术时获取的,患者年龄偏小。有文献报道位点特异性 DNA 甲基化模式与年龄相关^[25],因此,我们分析组内年龄对甲基化表达的影响。结果显示 DAPK、TIG1 高甲基化表达与年龄未见相关性,因此在本实验中年龄并不影响甲基化表达情况提示给我们的一些信息。但仍需匹配年龄样本进一步分析。

可疑癌变组织的抑癌基因启动子高甲基化是一种有广泛应用前景的检测手段。开发能够以高灵敏度和选择性快速量化 DNA 高甲基化的诊断系统至关重要。Chen^[26]等开发了一种用于快速检测血液中 DNA 甲基化的超灵敏和高选择性电化学生物传感器,实现 35 分钟响应时间和微创诊断卵巢癌提供了一种有前途的方法。口腔含漱液中的甲基化也可以作为口咽部癌症潜在的生物标记物^[27],为口腔癌早期诊断提供一种无创检测方式。如何利用抑癌基因启动子并提高其检测口腔癌变的灵敏性和特异性是我们今后需要研究的方向。

DNA 高甲基化是一个可逆的过程,甲基化修复是抑制肿瘤发生发展的重要机制之一。应用 DNA 甲基化抑制剂可以使一些重要抑癌基因发生去甲基化,恢复基因的正常抑癌功能^[28]。研究发现沉默 DNA 甲基转移酶 1 可以抑制 RASSF1A 和 DAPK 的甲基化,从而抑制食管癌的增殖,转移和侵袭^[29]。有报道指出普鲁卡因可以抑制 DNA 甲基转移酶活性,重新激活抑癌基因,触发抗肿瘤机制,为口腔癌的提供新的治疗策略^[30]。伴

有轻度或中度上皮异常增生的口腔白斑被认为是处在可被逆转的时期,采取适当的治疗可以阻断其癌化进程。对抑癌基因启动子去甲基化药物的开发用于口腔癌前病变及口腔癌的早期干预仍需要广泛深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Lyu MY, Guo YSi, Li S, et al. Hospital-based epidemiological and clinical characterisation of the malignant transformation of oral leukoplakia in a Chinese population [J]. *Int Dent J*, 2017, 67(4): 252-259
- [2] Jayasooriya PR, Dayaratne K, Dissanayake UB, et al. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study [J]. *Clin Oral Investig*, 2020, 24(12): 4563-4569
- [3] Flausino CS, Daniel FI, Modolo F. DNA methylation in oral squamous cell carcinoma: from its role in carcinogenesis to potential inhibitor drugs[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021, 164: 103399
- [4] Liu L, Wu Y, Li QL, et al. METTL3 Promotes Tumorigenesis and Metastasis through BMI1 m6A Methylation in Oral Squamous Cell Carcinoma[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(10): 2177-2190
- [5] Lin LH, Chen X, Yin D. Aberrant DNA Methylation in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Biological and Clinical Implications[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 549850
- [6] Chen XH, Wu WG, Ding J. Aberrant TIG1 methylation associated with its decreased expression and clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(2): 967-971
- [7] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33
- [8] Warnakulasuriya, S. Oral potentially malignant disorders: A comprehensive review on clinical aspects and management [J]. *Oral Oncol*, 2020, 102: 104550
- [9] H Alsarraf A, Kujan O, Farah CS. The utility of oral brush cytology in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: A systematic review [J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47(2): 104-116
- [10] Dumitrescu RG. Early Epigenetic Markers for Precision Medicine[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1856: 3-17
- [11] Ghosh A, Ghosh S, Maiti GP, et al. Frequent alterations of the candidate genes hMLH1, ITGA9 and RBSP3 in early dysplastic lesions of head and neck: clinical and prognostic significance [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(6): 1511-1520
- [12] Yang F, Shi J, Zhang L, et al. Role of fibulin-1 gene promoter methylation in the carcinogenesis and development of tongue squamous cell carcinoma[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio*, 2021, 133(4): 432-440
- [13] Hsieh YP, Chen KC, Chen MY, et al. Epigenetic Deregulation of Protein Tyrosine Kinase 6 Promotes Carcinogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4495
- [14] Shridhar K, Walia GK, Aggarwal A, et al. DNA methylation markers for oral pre-cancer progression: A critical review [J]. *Oral Oncol*, 2016, 53: 1-9
- [15] Crawford M, Johnson EH, Liu KYP, et al. On the Cutting Edge of Oral Cancer Prevention: Finding Risk-Predictive Markers in Precancerous Lesions by Longitudinal Studies[J]. *Cells*, 2022, 11(6): 1033
- [16] Farag AK, Roh EJ. Death-associated protein kinase (DAPK) family modulators: Current and future therapeutic outcomes [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(1): 349-385
- [17] El Aliani A, El-Abid H, El Mallali Y, et al. Association between Gene Promoter Methylation and Cervical Cancer Development: Global Distribution and A Meta-analysis [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2021, 30(3): 450-459
- [18] Zhang JM, Liu LM, Pfeifer GP. Methylation of the retinoid response gene TIG1 in prostate cancer correlates with methylation of the retinoic acid receptor beta gene [J]. *Oncogene*, 2004, 23(12): 2241-2249
- [19] Cai FC, Xiao XY, Niu X, et al. Association between promoter methylation of DAPK gene and HNSCC: A meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173194
- [20] Mizuiri H, Yoshida K, Toge T, et al. DNA methylation of genes linked to retinoid signaling in squamous cell carcinoma of the esophagus: DNA methylation of CRBP1 and TIG1 is associated with tumor stage[J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(9): 571-577
- [21] Ma WP, Bao ZS, Qian ZH, et al. LRRFIP1, an epigenetically regulated gene, is a prognostic biomarker and predicts malignant phenotypes of glioma[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(6): 873-883
- [22] Ishikawa R, Imai A, Mima M, et al. Novel prognostic value and potential utility of opioid receptor gene methylation in liquid biopsy for oral cavity cancer[J]. *Curr Prob Cancer*, 2022, 46(2): 100834
- [23] Mehanna HM, Rattay T, Smith J, et al. Treatment and follow-up of oral dysplasia-a systematic review and meta-analysis [J]. *Head Neck*, 2009, 31(12): 1600-1609
- [24] Mori K, Hamada T, Beppu M, et al. Detecting Early-Stage Oral Cancer from Clinically Diagnosed Oral Potentially Malignant Disorders by DNA Methylation Profile[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(11): 2646
- [25] Pagiatakis C, Musolino E, Gornati R, et al. Epigenetics of aging and disease: a brief overview [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2021, 33(4): 737-745
- [26] Chen DF, Wu YF, Tilley RD, et al. Rapid and ultrasensitive electrochemical detection of DNA methylation for ovarian cancer diagnosis [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 206: 114126
- [27] Dicke BL, Nedjai B, Preece MD, et al. Methylation of HPV16 and EPB41L3 in oral gargles and the detection of early and late oropharyngeal cancer[J]. *Cancer Med*, 2022 [Epub ahead of print]
- [28] Hassan HE, Keita JA, Narayan L, et al. The combination of dimethoxycurcumin with DNA methylation inhibitor enhances gene re-expression of promoter-methylated genes and antagonizes their cytotoxic effect[J]. *Epigenetics*, 2016, 11(10): 740-749
- [29] Bai Jian, Zhang Xue, Hu Kai, et al. Silencing DNA methyltransferase 1 (DNMT1) inhibits proliferation, metastasis and invasion in ESCC by suppressing methylation of RASSF1A and DAPK [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44129-44141
- [30] Bhol CS, Mishra SR, Patil S, et al. PAX9 reactivation by inhibiting DNA methyltransferase triggers antitumor effect in oral squamous cell carcinoma[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2022 [Epub ahead of print]