

Phân tích tổng hợp gene $p16^{INK4a}$ (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) - Một trong những yếu tố dẫn đến bệnh ung thư vòm họng

Meta-analysis: $p16^{INK4a}$ (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) is one of the major causes of nasopharyngeal cancer

Lao Đức Thuận^{1*}, Nguyễn Thị Ngọc Thảo^{1,2}, Thiều Hồng Huệ¹, Nguyễn Trung Hiếu^{1,2}, Phạm Thị Thúy Ngọc^{1,2}, Trần Bích Thu^{3,4}, Lê Huyền Ái Thúy¹

¹Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: thuan.ld@ou.edu.vn

THÔNG TIN

TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.19.2.3040.2024

Ngày nhận: 26/10/2023

Ngày nhận lại: 06/12/2023

Duyệt đăng: 08/12/2023

Từ khóa:

phân tích tổng hợp; $p16^{INK4a}$ (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A); ung thư vòm họng; Việt Nam

Keywords:

meta-analysis; $p16^{INK4a}$ (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A); nasopharyngeal carcinoma; Vietnam

Ung Thư Vòm Họng (UTVH) là một loại khối u hiếm xuất phát từ khu vực phía sau khoang mũi và phía trên của hầu. Các nguyên nhân chính của UTVH bao gồm: nhiễm Virus Epstein-Barr, sự biến đổi gen và do yếu tố môi trường, lối sống. Nghiên cứu trên toàn cầu và tại Việt Nam đã chỉ ra sự tăng cường methyl hóa trên vùng promoter của các đảo CpG, góp phần vào sự hình thành của nhiều loại ung thư, trong đó có UTVH (Chan, Teo, & Johnson, 2002). Gene $p16^{INK4a}$ còn được gọi là cyclin-dependent kinase inhibitor, là một gene ức chế khối u, có vai trò ức chế Cyclin-Dependent Kinase (CDK), dẫn đến việc CDK không tương tác với cyclin, từ đó ức chế quá trình phosphoryl trên pRb, làm ngưng chu trình tế bào. Gene $p16^{INK4a}$ nằm trên phần ngắn của nhiễm sắc thể số 9 vị trí 9p21.3 bao gồm ba exon mã hóa 156 axit amin (Coppé & ctg., 2011). Theo một nghiên cứu tổng hợp từ 11 bài báo về quá trình methyl hóa trên gene $p16^{INK4a}$, tiến hành bởi Xiao, Jiang, Hu, và Li vào năm 2016 đã cho thấy sự tồn tại của quá trình methyl hóa vượt mức trong mẫu khối u vòm họng cao hơn đáng kể so với mẫu không có khối u (Xiao & ctg., 2016). Ngoài ra, sự methyl hóa trên gene $p16^{INK4a}$ trong mẫu máu của bệnh nhân UTVH cũng cao hơn đáng kể so với mẫu máu bình thường. Vì thế, bài báo này nhằm cung cấp thêm dữ liệu có tính khoa học về tình trạng tăng cường methyl hóa trong vùng promoter trên đảo CpG của bệnh nhân mắc UTVH dựa trên việc phân tích gene $p16^{INK4a}$ bằng phương pháp tổng hợp thống kê.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tần suất biểu hiện của gene $p16^{INK4a}$ không đồng đều giữa hai nhóm bệnh và nhóm chứng. Trong nhóm bệnh, chúng tôi quan sát thấy giá trị $Q = 104.5223$ với bậc tự do $DF = 13$ và giá trị $p < 0.0001$, cùng với chỉ số I^2 là 87.56%, với khoảng tin cậy 95% cho chỉ số I^2 từ 80.84 đến 91.9. Trong khi đó, trong nhóm chứng, giá trị Q là 56.1888 ($p < 0.001$), và chỉ số I^2 đạt 76.86%, với khoảng tin cậy 95% cho chỉ số I^2 từ

61.38 đến 86.14. Tần số có trọng số của nhóm bệnh và nhóm chứng tương ứng là 63.478% và 7.966%, cho thấy có sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng, với giá trị Q cao và giá trị p rất nhỏ. Các yếu tố khác có thể ảnh hưởng đến quá trình methyl hóa, như dân tộc và nguồn mẫu, cũng được đưa vào phân tích. Kết quả cho thấy rằng quá trình methyl hóa trong hai nhóm này có mối tương quan đáng kể với sự phát triển của UTVH. Cụ thể, chỉ số OR tương đối cho Trung Quốc và Châu Phi lần lượt là 7.002 và 6.47. Chúng ta cũng quan sát được rằng chỉ số OR cho nhóm nguồn mẫu từ mô và dịch cơ thể lần lượt là 6.802 và 5.516. Phân tích kết quả đã xác nhận rằng sự biểu hiện của gene $p16^{INK4a}$ có mối liên quan mạnh đến quá trình hình thành khối u vòm họng. Vì vậy, dữ liệu này tạo nền tảng cho các nghiên cứu thực nghiệm trên mẫu UTVH thu thập từ người Việt Nam.

ABSTRACT

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a rare type of tumor originating from the region behind the nasal cavity and above the throat. The primary causes of NPC include Epstein-Barr virus infection, genetic mutations, and environmental factors, such as lifestyle. Global and Vietnamese studies have indicated enhanced methylation in the promoter region of CpG islands, contributing to the development of various cancers, including NPC (Chan, Teo, & Johnson, 2002). The $p16^{INK4a}$ gene, also known as cyclin-dependent kinase inhibitor, is a tumor suppressor gene that inhibits Cyclin-Dependent Kinase (CDK), leading to the inhibition of CDK interaction with cyclin, thereby inhibiting the phosphorylation process on pRb, halting the cell cycle. The $p16^{INK4a}$ gene is located on the short arm of chromosome 9 at position 9p21.3, consisting of three exons encoding 156 amino acids (Coppé et al., 2011). According to a meta-analysis of 11 papers on methylation processes on the $p16^{INK4a}$ gene conducted by Xiao et al. in 2016, significantly higher levels of methylation were found in NPC tissue samples compared to non-tumor samples (Xiao et al., 2016). Additionally, methylation on the $p16^{INK4a}$ gene in blood samples from NPC patients was also significantly higher compared to normal blood samples. Therefore, this article aims to provide further scientific evidence on the enhanced methylation status in the promoter region of CpG islands of NPC patients based on the analysis of the $p16^{INK4a}$ gene using statistical synthesis methods.

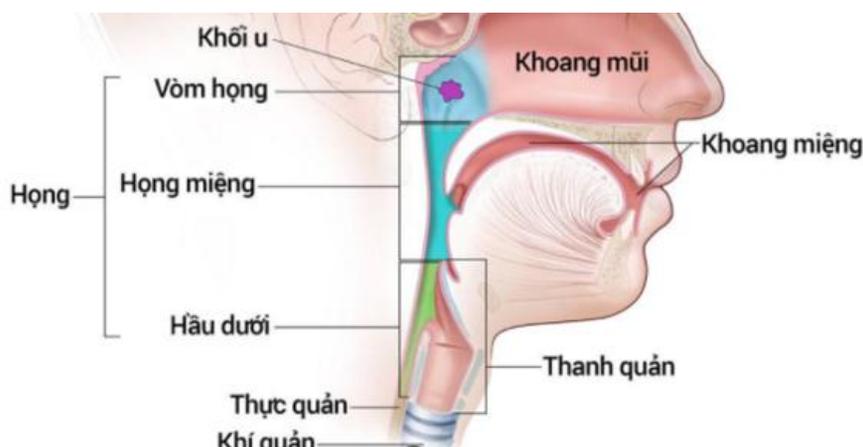
The research results demonstrated an uneven expression frequency of the $p16^{INK4a}$ gene between the two patient groups and the control group. In the patient group, we observed a Q value of 104.5223 with degrees of freedom (DF) = 13 and a p-value < 0.0001, along with an I^2 index of 87.56%, with a 95% confidence interval for I^2 from 80.84 to 91.9. Meanwhile, in the control group, the Q value was 56.1888 (p < 0.001), and the I^2 index reached

76.86%, with a 95% confidence interval for I^2 from 61.38 to 86.14. The weighted frequency of the patient and control groups was 63.478% and 7.966%, respectively, indicating a significant difference between the patient and control groups, with a high Q value and a very low p-value. Other factors that may influence the methylation process, such as ethnicity and sample source, were also included in the analysis.

The results showed a significant correlation between the methylation process in these two groups and the development of NPC. Specifically, the Odds Ratios (OR) for China and Africa were 7.002 and 6.47, respectively. We also observed that the OR for samples from the mucosa and body fluids were 6.802 and 5.516, respectively. The analysis confirmed that the expression of the $p16^{INK4a}$ gene is strongly related to the formation of throat cancer. Therefore, this data provides a foundation for experimental studies on NPC samples collected from the Vietnamese population.

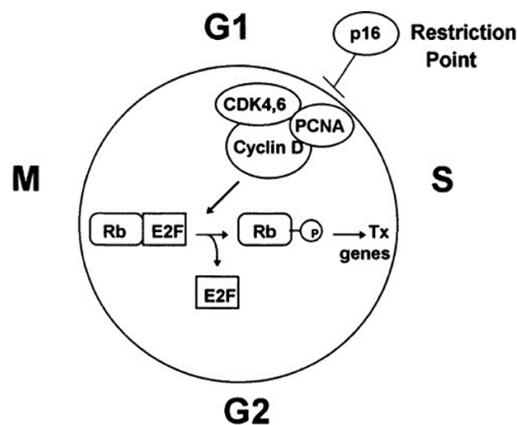
1. Giới thiệu

Vòm họng, nằm ở phía trên hầu họng và phía sau mũi, bên trong xương chẩm, và tạo thành một không gian ở phía trên vòm miệng mềm, nối mũi với miệng (National cancer institute, n.d.) UTVH là một loại khối u ác tính thường bắt nguồn từ biểu mô niêm mạc của vòm họng và tuyến nước bọt. Có ba loại UTVH ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư biểu mô không sừng hóa và cuối cùng là ung thư biểu mô không biệt hóa (National cancer institute, n.d.). Tỷ lệ nhiễm bệnh cao nhất ghi nhận ở các khu vực như Đông Nam Trung Quốc, Đông Nam Á, Bắc Phi, Trung Đông và Bắc Cực, tuy nhiên, hiếm gặp ở các nơi khác trên thế giới. Thường thì khi được chẩn đoán mắc UTVH, bệnh nhân thuộc nhóm tuổi trung bình là 50 tuổi, trẻ hơn so với nhiều loại ung thư khác, thường được xác định ở độ tuổi từ 65 trở lên (Dai, Zheng, Cheung, & Lung, 2016). Theo thống kê từ tổ chức nghiên cứu về bệnh ung thư toàn cầu, vào năm 2020, trên toàn thế giới ghi nhận tổng cộng 182,563 trường hợp ung thư, trong đó UTVH chiếm tỷ lệ 0.69% (Global Cancer Observatory, 2020). Khu vực các nước Châu Á có số lượng ca mắc mới cao hơn so với các khu vực khác trên thế giới. Năm 2020, Việt Nam ghi nhận 6,040 trường hợp mắc UTVH và tỷ lệ tử vong liên quan đến bệnh này là 3%. Việt Nam đứng đầu trong khu vực về tình trạng mắc bệnh và tử vong do UTVH (Global Cancer Observatory, 2020).



Hình 1. Vòm họng theo giải phẫu

Hiện nay, xét nghiệm sinh thiết tế bào là tiêu chuẩn vàng trong xác định bệnh lý ung thư. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành ở nhiều quốc gia trên thế giới và tại Việt Nam ghi nhận sự methyl hóa vượt mức xảy ra trên vùng promoter của đảo CpG, tham gia vào quá trình tiến triển của nhiều dạng ung thư, trong đó bao gồm cả UTVH. Những thay đổi trong biểu mô, bao gồm cả quá trình methyl hóa của vùng promoter, được xem được coi là có tầm quan trọng lớn liên quan đến bệnh UTVH (Dai & ctg., 2016). Gene $p16^{INK4a}$ còn được gọi là cyclin-dependent kinase inhibitor, là một gene ức chế khối u, có vai trò ức chế Cyclin-Dependent Kinase (CDK), dẫn đến việc CDK không tương tác với cyclin, từ đó ức chế quá trình phosphoryl trên pRb, làm ngưng chu trình tế bào. Gene $p16^{INK4a}$ nằm trên phần ngắn của nhiễm sắc thể số 9 vị trí 9p21.3 bao gồm ba exon mã hóa 156 axit amin (Coppé & ctg., 2011). Theo một nghiên cứu tổng hợp từ 11 bài báo về quá trình methyl hóa trên gene $p16^{INK4a}$, tiến hành bởi Xiao và cộng sự vào năm 2016 đã cho thấy sự tồn tại của quá trình methyl hóa vượt mức trong mẫu khối u vòm họng cao hơn đáng kể so với mẫu không có khối u (Xiao & ctg., 2016). Ngoài ra, sự methyl hóa trên gene $p16^{INK4a}$ trong mẫu máu của bệnh nhân UTVH cũng cao hơn đáng kể so với mẫu máu bình thường. Điều này đặt nền móng khoa học quan trọng cho việc phát triển các phương pháp chẩn đoán sớm dựa trên các nền mẫu khác nhau. Vì thế, trong bài phân tích này chúng tôi tìm hiểu mối liên quan giữa methyl hóa DNA của gene $p16^{INK4a}$ và bệnh UTVH (Lun, Cheung, Chow, Chung, & Lo, 2013).



Hình 2. Con đường tín hiệu của gene $p16^{INK4a}$

Nguồn: Foulkes, Flanders, Pollock, và Hayward (1997)

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Thu thập dữ liệu

Thu thập thông tin dữ liệu gene từ các cơ sở dữ liệu uy tín như:

- NCBI (n.d.): phần mềm dùng cho việc thu thập tìm kiếm dữ liệu thông tin.
- Pubmed (n.d.): khai thác tất cả các công trình nghiên cứu khoa học đã công bố về Y - Sinh trong MedLine.
- Genebank: Tìm kiếm thông tin như trình tự nucleotide và protein, taxonomy, genome, mapping, cấu trúc protein, thông tin vùng domain và bài báo đã công bố trên Pubmed.

Các từ khóa sử dụng trong quá trình tìm kiếm bao gồm “nasopharyngeal carcinoma”, “methylation”, “ $p16^{INK4a}$ ”, “diagnosis”, “prognosis”, “epigenetic”, “hypermethylation”. Các nghiên cứu tiếng Anh được xem xét, với các tiêu chí:

- Có thiết kế nghiên cứu bệnh chứng có dữ liệu về tần suất của quá trình methyl hóa các gene mục tiêu, cần có một cỡ mẫu đủ lớn để hỗ trợ phân tích.

- Các yếu tố cần loại trừ bao gồm: các bài viết sử dụng ngôn ngữ khác, các tóm tắt, báo cáo trường hợp, thư gửi cho biên tập viên hoặc các bài báo chưa được xuất bản. Nghiên cứu không liên quan đến các khối u vòm họng sẽ không được xem xét, và nghiên cứu thiếu thông tin quan trọng để phân tích cũng sẽ không được xem xét.

2.2. Phân tích tổng hợp

Sau khi thu thập các bài báo, chúng sẽ được đưa vào phần mềm MedCal để thực hiện tổng hợp thống kê, phân tích để đánh giá mối tương quan giữa tính chất methyl với các yếu tố liên quan. Các thước đo như tỷ lệ mắc bệnh (Proportion), chỉ số nguy cơ tương đối (Relative Risk - RR) và tỷ suất chênh (Odds Ratio - OR), phép thử Cochran's Q và chỉ số I^2 được sử dụng để đánh giá.

- Phép thử Cochran's Q: được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các phân nhóm.
- Chỉ số I^2 : chỉ số ước tính sự đồng nhất và bất đồng nhất.
- Khoảng tin cậy được sử dụng trong bài báo là 95%.

Bảng 1

Hệ thống điểm của giá trị OR và RR trong y học

Giá trị OR		Giá trị RR	
Điểm	Ý nghĩa	Điểm	Ý nghĩa
> 1	Khả năng mắc bệnh cao hơn khả năng không mắc bệnh	> 1	Yếu tố phơi nhiễm làm tăng khả năng mắc bệnh
= 1	Khả năng mắc bệnh bằng khả năng không mắc bệnh	= 1	Không có mối liên hệ nào giữa yếu tố phơi nhiễm và khả năng mắc bệnh
< 1	Khả năng mắc bệnh thấp hơn khả năng không mắc bệnh	< 1	Yếu tố phơi nhiễm làm giảm khả năng mắc bệnh

3. Kết quả và biện luận

Sau khi loại bỏ các nghiên cứu không đáp ứng tiêu chí thu nhận, chúng tôi thu thập được 14 nghiên cứu về gene $p16^{INK4a}$. Các bài báo sau khi tổng hợp các thông số như chỉ số nguy cơ (OR), khoảng tin cậy 95%, phép thử Cochran's Q và chỉ số I^2 đã được đưa vào quá trình phân tích.

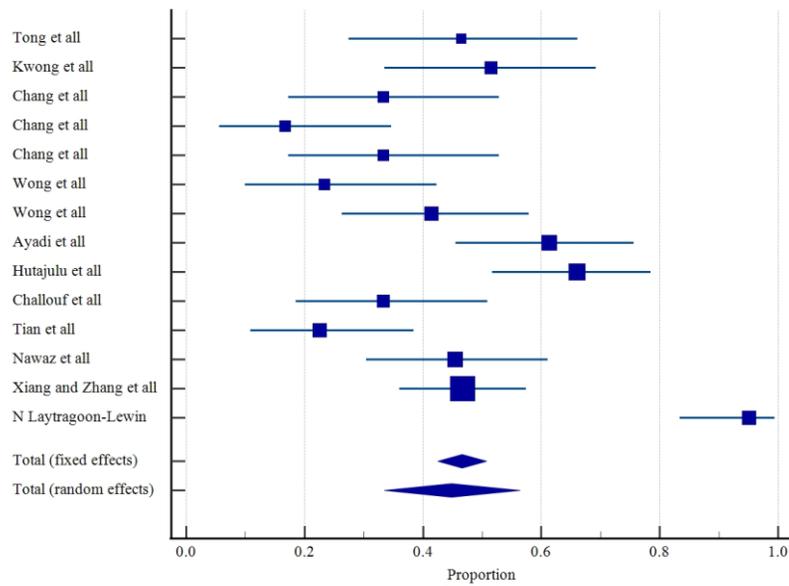
Bảng 2

Các đặc điểm của các nghiên cứu về việc methyl hóa quá mức trong vùng promoter của gene $p16^{INK4a}$

Nghiên cứu	Năm	Quốc gia	Phương pháp	Loại mẫu	Mẫu bệnh UTVH		Mẫu chứng	
					Mẫu methyl hóa	Mẫu không bị methyl	Mẫu methyl hóa	Mẫu không bị methyl
Xiao và cộng sự (2016)	2002	Trung Quốc	MSP	dịch	13	15	0	12
Kwong và cộng sự (2002)	2002	Trung Quốc	MSP	mô	17	16	0	06
Chang và cộng sự (2003)	2003	Trung Quốc	MSP	máu	30	0	0	43

Nghiên cứu	Năm	Quốc gia	Phương pháp	Loại mẫu	Mẫu bệnh UTVH		Mẫu chứng	
					Mẫu methyl hóa	Mẫu không bị methyl	Mẫu methyl hóa	Mẫu không bị methyl
Chang và cộng sự (2003)	2003	Trung Quốc	MSP	dịch	05	25	0	43
Chang và cộng sự (2003)	2003	Trung Quốc	MSP	mô	10	20	0	06
Wong và cộng sự (2003)	2003	Trung Quốc	MSP	mô	07	23	0	05
Wong và cộng sự (2003)	2003	Trung Quốc	MSP	máu	17	24	10	33
Ayadi và cộng sự (2008)	2008	Châu Phi	MSP	mô	27	17	0	03
Hutajulu và cộng sự (2011)	2011	Châu Phi	MSP	dịch	35	18	06	41
Challouf và cộng sự (2012)	2012	Châu Phi	MSP	mô	12	24	04	15
Tian và cộng sự (2013)	2013	Trung Quốc	MSP	máu	09	31	10	21
Nawaz và cộng sự (2015)	2015	Châu Phi	MSP	mô	20	24	0	18
Xiang và Zhang (2005)	2005	Trung Quốc	MSP	mô	42	48	0	30
Laytragoon-Lewin và cộng sự (2010)	2010	Châu Phi	MSP	mô	39	02	06	13

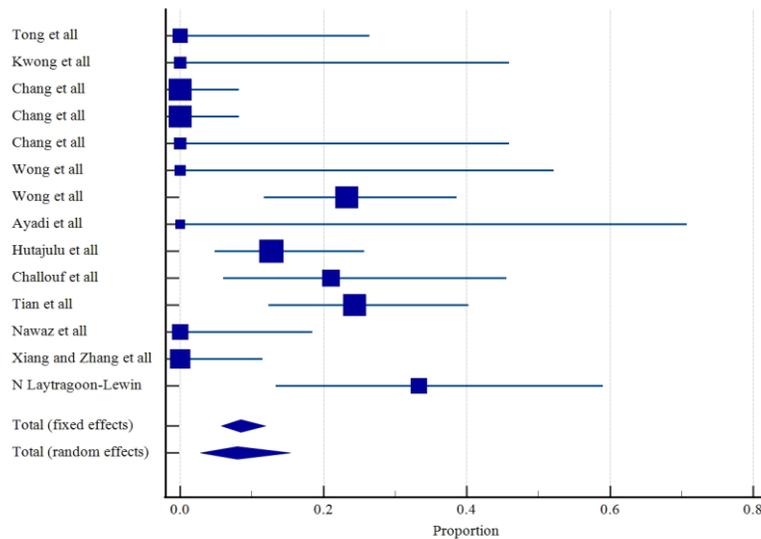
Tổng cộng, chúng tôi thu thập được 14 nghiên cứu (trong đó 01 công trình của Wong và cộng sự (2003) thực hiện trên 02 nguồn mẫu khác nhau, và 01 công trình của Chang và cộng sự (2003) thực hiện trên 03 nguồn mẫu khác nhau) đáp ứng tiêu chuẩn cho việc đưa vào nghiên cứu. Tập hợp này bao gồm tổng cộng 904 mẫu, trong đó có 570 mẫu lấy từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư vòm họng và 334 mẫu từ các mẫu không gây ra ung thư. Các nghiên cứu này bao gồm khoảng thời gian từ 2002 đến 2015. Về nguồn gốc dân tộc của bệnh nhân trong 14 nghiên cứu này, hầu hết (09 trên 14, chiếm 64.28%) tập trung vào cá nhân từ các nước châu Á. Năm nghiên cứu còn lại (35.72%) bao gồm bệnh nhân từ các nước châu Phi. Phân bố này phản ánh sự tập trung nghiên cứu ở các khu vực cụ thể và đa dạng về nguồn gốc dân tộc trong các nghiên cứu. Trong số 14 nghiên cứu, 08 đã sử dụng phương pháp MSP để phân tích mẫu sinh thiết, chủ yếu là để phân tích methyl hóa của gene $p16^{INK4a}$. Hơn nữa, 06 nghiên cứu đã sử dụng mẫu máu và dịch cơ thể để đánh giá mối tương quan giữa quá trình methyl hóa gene $p16^{INK4a}$ và ung thư vòm họng. Phương pháp này đưa ra một cách tiếp cận không gây xâm lấn để đánh giá trạng thái methyl hóa của gene $p16^{INK4a}$ và tiềm năng trong việc chẩn đoán hoặc tiên lượng của ung thư vòm họng. Sau khi thống kê các nghiên cứu khoa học, sẽ thực hiện phân tích các thước đo tỷ lệ phát hiện (Proportion), nguy cơ tương đối (Relative risk) và tỷ số số chênh (Odds ratio).



Hình 3. Biểu đồ rừng tần suất methyl hóa gene $p16^{INK4a}$ trên ca bệnh

Total (random effects): 570

$Q = 104.5223$, $DF = 13$, $p < 0.0001$, $I^2 = 87.56\%$, CI 95% cho $I^2 = 80.84 - 91.9$

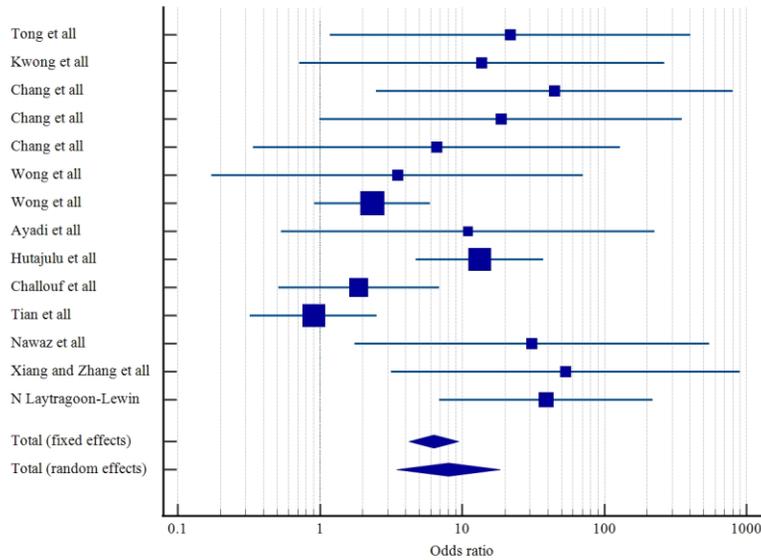


Hình 4. Biểu đồ rừng tần suất methyl hóa gene $p16^{INK4a}$ trên ca chứng

Total (random effects): 334

$Q = 56.1888$, $DF = 13$, $p < 0.0001$, $I^2 = 76.86\%$, CI 95% cho $I^2 = 61.38 - 86.14$

Tần suất methyl hóa của hai tập nhóm nghiên cứu đã được xem xét trong Hình 3 và Hình 4, và kết quả này cho thấy rằng, tần suất trong gene $p16^{INK4a}$ cũng có sự phân hóa không đồng nhất giữa hai nhóm này. Trong nhóm bệnh, chúng tôi quan sát một giá trị $Q = 104.5223$ với bậc tự do $DF = 13$ và giá trị $p < 0.0001$, đồng thời chỉ số I^2 là 87.56%, với khoảng tin cậy 95% cho chỉ số I^2 từ 80.84 đến 91.9. Trong khi đó, trong nhóm chứng, giá trị Q là 56.1888 ($p < 0.001$), và chỉ số I^2 đạt 76.86%, với khoảng tin cậy 95% cho chỉ số I^2 từ 61.38 đến 86.14. Tần số có trọng số của nhóm bệnh và nhóm chứng tương ứng là 63.478% và 7.966%, cho thấy có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm bệnh và nhóm chứng, với Q -score cao và giá trị p rất nhỏ. Vì vậy, để tính toán tần suất methyl hóa của gene $p16^{INK4a}$, chúng tôi đã thực hiện một phân tích ngẫu nhiên.



Hình 5. Sơ đồ rừng tỷ số nguy cơ tương đối methyl hóa của các nghiên cứu trên gene *p16^{INK4α}*

Total (random effects): 8.022

Q = 34.5986, DF = 13, p = 0.001, I² = 62.43%, CI 95% cho I² = 33.02 - 78.92

Bảng 3

Phân tích nhóm mối liên quan giữa quá trình methyl hóa trên gene *p16^{INK4α}* và UTVH theo dân tộc và nguồn mẫu

Nghiên cứu	Tỷ lệ ca bệnh	Tỷ lệ ca chứng	Odds ratio	95% CI	z	P	Weight (%)
							Random
Trung Quốc	224/529	30/316	7.002	4.629 - 10.590	12.109	< 0.001	55.97
Châu Phi	184/348	26/176	6.473	4.060 - 10.321	12.102	< 0.001	44.03
Mẫu Mô	250/542	36/322	6.802	4.971 - 9.234	12.479	< 0.001	55.36
Mẫu khác	162/395	30/268	5.516	4.963 - 9.218	12.459	< 0.001	44.64

Các yếu tố khác có thể ảnh hưởng đến quá trình methyl hóa như dân tộc và nguồn mẫu cũng đã được đưa vào phân tích phân nhóm, và kết quả cho thấy quá trình methyl hóa của 02 nhóm này có mối tương quan đáng kể với sự phát triển của UTVH. Cụ thể, chỉ số OR tương đối của Trung Quốc và Châu Phi lần lượt là 7.002 và 6.47. Chúng ta cũng quan sát OR của nhóm nguồn mẫu Mô và dịch cơ thể lần lượt là 6.802 và 5.516.

4. Kết luận

Tóm lại, kết quả phân tích cho thấy có sự biến đổi đáng kể trong tần suất methyl hóa của gene *p16^{INK4α}* giữa nhóm bệnh và nhóm chứng, và cũng chỉ ra mối tương quan giữa quá trình methyl hóa này với sự phát triển của UTVH và các yếu tố khác như dân tộc và nguồn mẫu.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến Bộ Giáo dục và Đào tạo đã tài trợ kinh phí cho đề tài với mã số B2023-MBS-01.

Tài liệu tham khảo

- Ayadi, W., Karray-Hakim, H., Khabir, A., Feki, L., Charfi, S., Boudawara, T., ... Hammami, A. (2008). Aberrant methylation of *p16*, *DLEC1*, *BLU* and *E-cadherin* gene promoters in nasopharyngeal carcinoma biopsies from Tunisian patients. *Anticancer Research*, 28(4B), 2161-2167.
- Challouf, S., Ziadi, S., Zaghdoudi, R., Ksiasa, F., Gacem, R. B., & Trimeche, M. (2012). Patterns of aberrant DNA hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma in Tunisian patients. *Clinica Chimica Acta*, 413(7/8), 795-802.
- Chan, A. T. C., Teo, P. M. L., & Johnson, P. J. (2002). Nasopharyngeal carcinoma. *Annals of Oncology*, 13(7), 1007-1015.
- Chang, H. W., Chan, A., Kwong, D. L. W., Wei, W. I., Sham, J. S. T., & Yuen, A. P. W. (2003). Evaluation of hypermethylated tumor suppressor genes as tumor markers in mouth and throat rinsing fluid, nasopharyngeal swab and peripheral blood of nasopharyngeal carcinoma patient. *International Journal of Cancer*, 105(6), 851-855.
- Coppé, J. P., Rodier, F., Patil, C. K., Freund, A., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2011). Tumor suppressor and aging biomarker *p16INK4a* induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36396-36403.
- Dai, W., Zheng, H., Cheung, A. K. L., & Lung, M. L. (2016). Genetic and epigenetic landscape of nasopharyngeal carcinoma. *Chinese Clinical Oncology*, 5(2), Article 16.
- Foulkes, W. D., Flanders, T. Y., Pollock, P. M., & Hayward, N. K. (1997). The CDKN2A (*p16*) gene and human cancer. *Molecular Medicine*, 3(1), 5-20.
- Global Cancer Observatory. (2020). Truy cập ngày 20/09/2023 tại <https://gco.iarc.fr/today/en>
- Hutajulu, S. H., Indrasari, S. R., Indrawati, L. P., Harijadi, A., Duin, S., Haryana, S. M., ... Middeldorp, J. M. (2011). Epigenetic markers for early detection of nasopharyngeal carcinoma in a high risk population. *Molecular Cancer*, 10(1), 1-9.
- Kwong, J., Lo, K. W., To, K. F., Teo, P. M., Johnson, P. J., & Huang, D. P. (2002). Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 8(1), 131-137.
- Laytragoon-Lewin, N., Chen, F., Castro, J., Elmberger, G., Rutqvist, L. E., Lewin, F., ... Lundgren, J. (2010). DNA content and methylation of *p16*, *DAPK* and *RASSF1A* gene in tumour and distant, normal mucosal tissue of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Research*, 30(11), 4643-4648.
- Lun, S. W. M., Cheung, C. C. M., Chow, C., Chung, G. T. Y., & Lo, K. W. (2013). *Molecular genetics of nasopharyngeal carcinoma*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- National cancer institute. (n.d.). Truy cập ngày 20/09/2023 tại <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/hp/adult/nasopharyngeal-treatment-pdq>
- Nawaz, I., Moumad, K., Martorelli, D., Ennaji, M. M., Zhou, X., Zhang, Z., ... Hu, L. F. (2015). Detection of nasopharyngeal carcinoma in Morocco (North Africa) using a multiplex methylation-specific PCR biomarker assay. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 1-12.
- NCBI. (n.d.). Truy cập ngày 20/09/2023 tại <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

PubMed. (n.d.). Truy cập ngày 20/09/2023 tại <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

Tian, F., Yip, S. P., Kwong, D. L. W., Lin, Z., Yang, Z., & Wu, V. W. C. (2013). Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum as potential biomarker for the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiology*, 37(5), 708-713.

Wong, T. S., Tang, K. C., Kwong, D. L. W., Sham, J. S. T., Wei, W. I., Kwong, Y. L., & Yuen, A. P. W. (2003). Differential gene methylation in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Oncology*, 22(4), 869-874.

Xiang, Y. N., & Zhang, W. Y. (2005). The clinical significance of p16 protein non-expression and p16 gene inactivation by deletions and hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *Zhonghua Bing li xue za zhi= Chinese Journal of Pathology*, 34(6), 358-361.

Xiao, L., Jiang, L., Hu, Q., & Li, Y. (2016). Promoter methylation of p16 and DAPK genes in brushing, blood, and tissue samples from patients with nasopharyngeal carcinoma: A systematic meta-analysis. *Translational Cancer Research*, 5(6), 827-837.

