

Khảo sát tần số methyl hóa của gene *ADAMTS9* trên bệnh Ung thư Vòm họng ở Việt Nam

Investigation of methylation frequency of the *ADAMTS9* gene in Nasopharyngeal Carcinoma in Vietnam

Thiều Hồng Huệ^{1,2}, Trần Mạch Hoàng Đàm², Vũ Quốc Hùng²,
Nguyễn Trung Hiếu², Lê Huyền Ái Thúy^{1,2}, Lao Đức Thuận^{1,2*}

¹Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Sự sống, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

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

THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.20.2.3754.2025

Ngày nhận: 24/09/2024

Ngày nhận lại: 09/10/2024

Duyệt đăng: 07/11/2024

TÓM TẮT

Theo thống kê của Cơ quan Nghiên cứu Ung thư toàn cầu (GCO), Ung thư Vòm Họng (UTVH) thuộc nhóm là một trong 15 bệnh ung phổ biến ở Việt Nam. *ADAMTS9* đóng vai trò quan trọng trong quá trình apoptosis, sự hình thành mạch máu và ức chế sự tăng sinh tế bào ở UTVH. Sự biến đổi của gene *ADAMTS9* sẽ có ảnh hưởng đến quá trình hình thành ung thư, vì vậy, khảo sát tính chất methyl hóa của gene *ADAMTS9* trên bệnh nhân UTVH ở Việt Nam được thực hiện. Trong nghiên cứu, 30 mẫu dịch phết UTVH và 30 mẫu dịch phết lành được sử dụng để khảo sát tính chất methyl hóa gene *ADAMTS9* bằng phương pháp Nested-MSP. Kết quả ghi nhận tần số methyl hóa của gene *ADAMTS9* ở mẫu UTVH và mẫu lành lần lượt là 50.00% và 3.33%. Đồng thời, ghi nhận chỉ số OR là 29.00, độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 50.00% và 96.67%. Nghiên cứu bước đầu thành công xây dựng quy trình khảo sát tính chất methyl hóa của gene *ADAMTS9* trên bệnh UTVH ở Việt Nam nhằm hướng tới xây dựng một dấu chứng sinh học tiềm năng phát hiện sớm UTVH cho người Việt Nam nói riêng và bệnh UTVH nói chung.

ABSTRACT

Từ khóa:

epigenetics;
gene *ADAMTS9*;
Nested-MSP; sự methyl hóa;
UTVH

Keywords:

epigenetics;
ADAMTS9 gene;
Nested-MSP; methylation;
NPC

According to statistics from the Global Cancer Observatory (GCO), Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) is among the 15 most common cancers in Vietnam. *ADAMTS9* plays an important role in apoptosis, blood vessel formation, and the inhibition of cell proliferation in NPC. Changes in the *ADAMTS9* gene will affect the process of cancer formation; therefore, a survey of the methylation properties of the *ADAMTS9* gene in Vietnamese NPC patients was conducted. In the study, 30 NPC swab samples and 30 healthy swab samples were used to investigate the methylation status of the *ADAMTS9* gene using the Nested-MSP method. The results recorded the methylation frequency of the *ADAMTS9* gene in NPC samples and healthy samples at 50.00% and 3.33%, respectively. Moreover, the OR index was recorded at 29.00, sensitivity and specificity at 50.00% and 96.67%, respectively. The study has initially succeeded in establishing a process to investigate the methylation properties of

the *ADAMTS9* gene in NPC disease in Vietnam, aiming to develop a potential biomarker for early detection of NPC for Vietnamese people in particular and NPC disease in general.

1. Giới thiệu

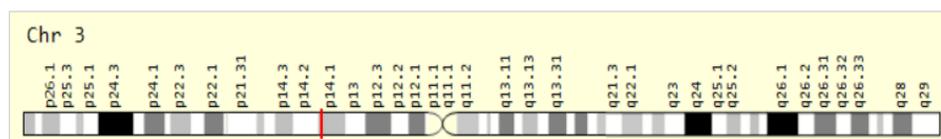
Ung thư vòm họng (Nasopharyngeal Carcinoma: NPC) là khối u ác tính hình thành tại các tế bào biểu mô vòm mũi họng (Cho, 2007; da Costa & ctg., 2015). Theo thống kê của Cơ quan Nghiên cứu Ung thư toàn cầu GCO (Global Cancer Observatory: <https://gco.iarc.fr/>) thuộc Tổ chức Y tế Thế Giới WHO, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong bởi UTVH trong năm 2022 cho thấy: trên thế giới, tỷ lệ mắc bệnh UTVH là 12,981 ca và tỷ lệ tử vong là 8,291 ca; ở Việt Nam, UTVH có tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong lần lượt là 5,613 và 3,453 ca xếp thứ 11 và thứ 10 trong các bệnh ung thư phổ biến. UTVH gây ra bởi ba nguyên nhân chính là: yếu tố môi trường, di truyền và sự xâm nhiễm của EBV (Epstein-Barr Virus) (Frappier, 2012). Những nghiên cứu gần đây đã chứng minh tính chất epigenetics đặc biệt là methyl hóa vượt mức các gene ức chế khối u là nguyên nhân gây nên ung thư (Chen & ctg., 2022; Dai & ctg., 2016; Geissler & ctg., 2024). Sự methyl hóa DNA là hiện tượng gắn nhóm $-CH_3$ từ AdoMet (S-adenosyl-L- methionine) vào vị trí 5' của nucleotide Cytosine bằng liên kết cộng hóa trị nhờ xúc tác của enzyme thuộc họ DNA methyltransferase (DNMTs) bao gồm: DNMT1, DNMT3A và DNMT3B (Chen & ctg., 2022; Davalos & Esteller, 2023). Kết quả của sự methyl hóa DNA là dẫn đến thay đổi biểu hiện gene và đồng thời liên quan đến sự phát triển khối u (Davalos & Esteller, 2023).

ADAMTS9 (A Disintegrin-like and Metalloprotease (reprolysin type) with Thrombospondin type 1 motif 9) là gene ức chế khối u định vị tại vị trí 3p14.2 (Hình 1), một thành viên thuộc họ ADAMTS bao gồm 19 proteases có cấu trúc xác định. Các enzyme này chứa một domain prometalloproteinase và một domain có đặc tính phụ thuộc bao gồm một hoặc nhiều motif thrombospondin type I (Lo & ctg., 2010). Ba protease ADAMTS1, ADMATS8 và ADAMTS9 có khả năng hoạt hóa kháng sinh. *ADAMTS9* có khả năng tham gia vào sự hình thành các tế bào màng trong mạch máu nhỏ ở chuột à có khả năng hoạt động như một chất ức chế sự hình thành mạch tự sinh (Lo & ctg., 2010), đồng thời, có liên quan đến sự tái tạo chất nền ngoài bào, và sự trưởng thành của các protein tiền thân (Lung & ctg., 2012). *ADAMTS9* còn có chức năng trong quá trình apoptosis, sự hình thành mạch máu và ức chế sự tăng sinh tế bào ở UTVH, dạ dày, đại trực tràng, tuyến tụy và cổ tử cung (Shao & ctg., 2017). Ngoài ra, sự methyl hóa vượt mức promoter sẽ điều chỉnh hoặc làm mất sự biểu hiện của *ADAMTS9* trong tất cả các ung thư đó. Hơn nữa, sự biểu hiện của *ADAMTS9* antisense RNA-2 (*ADAMTS9*-AS2) càng nhiều thì sự biểu hiện của DNMT1 càng giảm (Shao & ctg., 2017).

Cho đến nay, các công trình nghiên cứu về tần số methyl hóa của gene *ADAMTS9* trên thế giới còn rất hạn chế chỉ tìm thấy 02 công trình nghiên cứu của Lung và cộng sự (2008); Lao và Le (2024). Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa tìm thấy công trình công bố nào liên quan đến tần số methyl hóa của gene *ADAMTS9* trên UTVH. Vì vậy, Nghiên cứu “Khảo sát tính chất methyl hóa của gene *ADAMTS9* trên bệnh Ung thư vòm họng ở Việt Nam” được thực hiện hướng tới xây dựng một dấu chứng sinh học chẩn đoán sớm bệnh UTVH cho người Việt Nam.

Hình 1

Vị Trí Định Vị của Gene *ADAMTS9* Trên NST (Nhiễm Sắc Thể) Số 3



Ghi chú: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

30 mẫu dịch phết người mắc bệnh UTVH và 30 mẫu dịch phết người lành được thu nhận tại khoa Tai mũi họng Bệnh viện Chợ Rẫy, TP. Hồ Chí Minh. Việc lấy mẫu dịch phết UTVH và mẫu dịch phết lành được thông qua và cho phép của Hội Đồng Y Đức của bệnh viện Chợ Rẫy TP.HCM: 516/BVCR-HDDD. Mẫu sau khi thu nhận sẽ được bảo quản trong dung dịch PBS (Phosphate-Buffered Saline) và được giữ ở -21°C tại phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA, biến đổi bisulfite

Mẫu sẽ được ủ trong 700 μl dung dịch lysis buffer (Tris-HCl 1M; EDTA 0.5M; SDS 10%; NaCl 5M) và bổ sung 10 μl proteinase K. Ủ ở 56°C qua đêm. DNA sẽ được tiến hành tách chiết bằng phương pháp Phenol/Chloroform (pH = 8) và được rửa bằng Isopropanol. DNA sau khi được thu nhận sẽ tiến hành đánh giá độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang (OD: Optical Density) thông qua bước sóng A260 và A280.

DNA tiếp tục được tiến hành biến đổi bisulfite bằng bộ kit EpiJET Bisulfite Conversion Kit (#K1461). Cuối cùng, thu nhận được 20 μl DNA đã được biến đổi và bảo quản ở -20°C .

2.2.2. Khảo sát tính chất methyl hóa của gene ADAMTS9

Quá trình khảo sát tính chất methyl hóa của gene ADAMTS9 sẽ được thực hiện bằng máy luân nhiệt PCR Benchmark (Model: TC 9639) thông qua phương pháp Nested-MSP sử dụng 03 cặp mồi ở Bảng 1.

Bảng 1

Trình Tự Mồi Sử Dụng trong Nghiên Cứu

Bước	Mồi	Trình tự (5' - 3')	TLTK	Ta (X $^{\circ}\text{C}$)	t (Y giây)
1	ADAM-S1_F	GTATTTGAGAGGTTGTGGATT	Lo và ctg., 2007	50	20
	ADAM-S1_R	CCTCCTACCCCTCCTAACTA			
2	ADAM-MF	TTGGGTATTATGCGGTTAAGTAGTC		55	10
	ADAM-MR	CCAACCTTTAACTTTAAAAATCGCT			
	ADAM-UF	TGGGTATTATGTGGTTAAGTAGTTGA			
	ADAM-UR	CCAACCTTTAACTTTAAAAATCACT			

Ghi chú: S1: Mồi ngoài; M: Mồi methyl hóa; U: Mồi unmethyl hóa; F: Mồi xuôi; R: Mồi ngược; Ta: Nhiệt độ bắt cặp của mồi; t: Thời gian bắt cặp của mồi; X, Y: Nhiệt độ; Vị trí bôi đen thể hiện các vị trí CG của mồi. Dữ liệu từ "Identification of a tumor suppressive critical region mapping to 3p14. 2 in esophageal squamous cell carcinoma and studies of a candidate tumor suppressor gene, ADAMTS9" bởi P. H. Y. Lo, A. C. C. Leung, C. Y. C. Kwok, W. S. Y. Cheung, J. M. Y. Ko, L. C. Yang, S. Law, L. D. Wang, J. Li, E. J. Stanbridge, J. C. O. Tang, S. W. Tsao, và M. L. Lung, 2007, *Oncogene*, 26(1), pp. 148-157

Phương pháp MSP sẽ được thực hiện với tổng thể tích là 15 μl bao gồm các thành phần: 7.5 μl MyTaq TM Mix (Bioline Reagents Ltd., London, UK), 1 μl mồi xuôi và mồi ngược, 1 μl DNA đã được biến đổi và 5.5 μl nước cất.

Phản ứng MSP sẽ được thực hiện với quy trình luân nhiệt: 95°C - 05 phút; 95°C - 30 giây, X°C - 30 giây, 72°C - Y giây trong 30 chu kỳ; 72°C - 05 phút, 04°C - ∞ (X và Y được thể hiện ở Bảng 1).

Sau khi phản ứng MSP kết thúc, kết quả sẽ được tiến hành điện di trên gel agrose 1.5% và sử dụng thuốc nhuộm gelred 6X và ghi nhận kết quả bằng Geldoc.

Đồng thời, DNA khuếch đại thành công gene mục tiêu sẽ được gửi giải trình tự bằng phương pháp Sanger tại Công ty Nam Khoa Biotech Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2.3. Phân tích kết quả

Tần số gene *ADAMTS9* được tính toán và sử dụng Chi-square test để so sánh tần số methyl hóa giữa nhóm bệnh và nhóm lành. Ngoài ra, phân tích dữ liệu còn được xác định độ nhạy (sensitive), độ đặc hiệu (specificity), chỉ số κ (kappa). Sự khác biệt giữa 02 nhóm được xem là có ý nghĩa với $p < 0.05$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Lâm sàng

Đặc điểm lâm sàng của bộ mẫu được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2

Thông Tin Lâm Sàng của Bộ Mẫu Nghiên Cứu

Đặc điểm lâm sàng	Phân loại	Số lượng (%)
Giới tính	Nam	23 (76.67)
	Nữ	7 (23.33)
Tuổi	≤ 20	1 (3.33)
	20 đến ≤ 40	6 (20.00)
	40 đến ≤ 60	12 (40.00)
	60 đến ≤ 80	11 (36.67)
Giai đoạn bệnh	I	0 (0.00)
	II	10 (33.33)
	III	5 (16.67)
	IV	15 (50.00)

Ghi chú: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Theo kết quả thống kê của bộ mẫu: tỷ lệ mắc bệnh ung thư vòm họng ở nam và nữ lần lượt là 76.67% và 23.33%. Tỷ lệ nam:tỷ lệ nữ là 2.7:1. Điều này phù hợp với các công trình nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh tỷ lệ mắc ung thư vòm họng ở nam giới cao gấp 02 đến 03 lần so với nữ giới Salehiniya và cộng sự (2018); Tian và cộng sự (2013). Điều này có thể giải thích qua nghiên cứu của Ji và cộng sự (2011); Xu và cộng sự (2012), là do các thói quen sinh hoạt hằng ngày của nam giới như hút thuốc lá hay uống rượu bia cũng là một phần nguyên nhân gây ra tỷ lệ mắc bệnh cao hơn so với phụ nữ (Ji & ctg., 2011; Xu & ctg., 2012).

Về độ tuổi tỷ lệ mắc bệnh cao nhất ở nhóm trung niên từ 40 đến 60 tuổi (40.00%) và thấp nhất là dưới 20 tuổi (3.33%). Kết quả này cũng tương đồng với công bố trước đó của Wang và cộng sự (2009).

Tỷ lệ mắc bệnh UTVH được phát hiện cao nhất ở giai đoạn IV (50.00%) trong khi không phát hiện được ca nào ở giai đoạn I. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu trước đây của Tian và cộng sự (2013). Điều này có thể giải thích là do các triệu chứng của UTVH không rõ ràng như: đau cổ, sốt, khó thở, ...

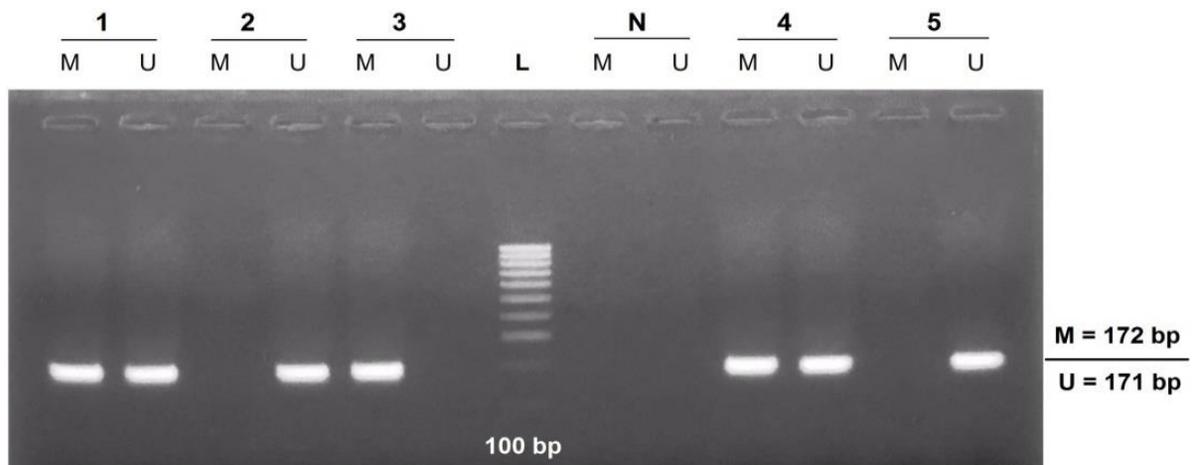
3.2. Kết quả khảo sát tính chất methyl hóa của gene *ADAMTS9*

Sau khi tách chiết và kiểm tra chất lượng của DNA kết quả đo OD ghi nhận mẫu tinh sạch có tỷ lệ $1.8 < A260/A280 < 2.0$.

Tiếp tục sử dụng mẫu DNA cho quá trình biến đổi bisulfite và sau đó khuếch đại gene mục tiêu. Sau đó tiến hành đọc kết quả bằng phương pháp điện di trên gel agarose. Kết quả ghi nhận các băng sản phẩm khuếch đại được sáng, rõ ràng với kích thước sản phẩm của mỗi methyl và unmethyl lần lượt là 172bp và 171bp (Hình 2). Ở mẫu 1 dịch phết UTVH và mẫu 4 dịch phết lành kết quả ghi nhận xuất hiện cả 02 băng ở mỗi methyl và unmethyl vì vậy, mẫu này là mẫu có trạng thái methyl hóa không hoàn toàn. Ở mẫu 2 dịch phết UTVH và mẫu 5 dịch phết lành xuất hiện băng có kích thước sản phẩm là 171bp, mẫu này được ghi nhận là mẫu unmethyl. Ở mẫu số 3 xuất hiện băng có kích thước sản phẩm là 172bp, ghi nhận mẫu methyl hóa hoàn toàn.

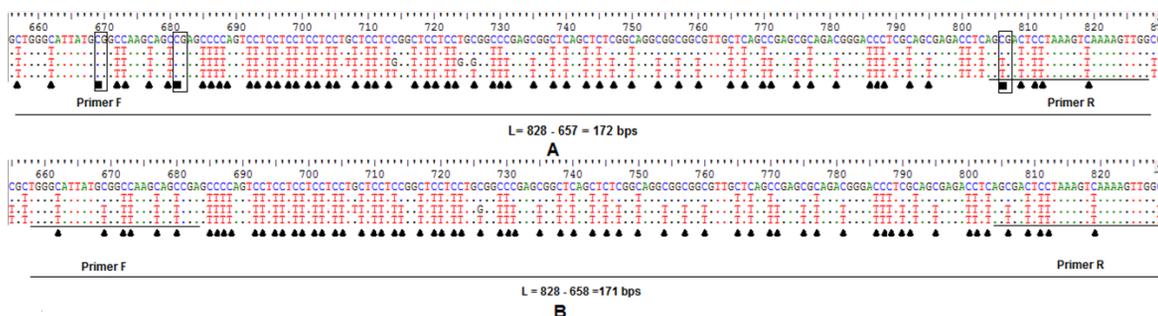
Hình 2

Kết Quả Điện Di



Ghi chú: M: Methyl; U: Unmethyl; L: thang; N: chứng âm; 1, 2, 3: mẫu dịch phết UTVH; 4, 5: mẫu dịch phết lành. Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Để khẳng định băng sản phẩm khuếch đại thành công gene mục tiêu *ADAMTS9*, băng sản phẩm sẽ được gửi giải trình tự. Sau khi tiến hành đọc và phân tích kết quả bằng phần mềm Bioedit, kết quả được thể hiện ở Hình 3. Kết quả ghi nhận kích thước sản phẩm khuếch đại được của mỗi methyl và unmethyl lần lượt là 172bp và 171bp tương ứng với gene *ADAMTS9*. Từ kết quả này, khẳng định lại quá trình biến đổi bisulfite đã thực hiện thành công thông qua những nucleotide C không bị methyl hóa sẽ chuyển thành nucleotide T và nucleotide C bị methyl hóa sẽ giữ nguyên nucleotide C được thể hiện qua ■: là vị trí methyl; ▲: là vị trí unmethyl (Hình 3).

Hình 3**Kết Quả Giải Trình Tự**

Ghi chú: A: kết quả methyl; B: kết quả unmethyl; ■: nucleotide C không bị biến đổi bisulfite, ▲: nucleotide C biến đổi bisulfite. Trình tự 1: trình tự gốc chưa biến đổi; trình tự 2: trình tự đã được biến đổi bằng phần mềm Methprimer; trình tự 3: kết quả giải trình tự mạch xuôi (F); trình tự 4: kết quả giải trình tự mạch ngược (R). Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

3.3. Kết quả thống kê

Sau khi khảo sát tính chất methyl hóa của gene *ADAMTS9* kết quả ghi nhận được tần số methyl hóa ở mẫu dịch phết bệnh UTVH cao hơn so với ở mẫu dịch phết lành lần lượt là 50.00% (15/30) và 3.33% (01/30). Kết quả này cho thấy mối tương quan chặt chẽ giữa sự methyl hóa của gene *ADAMTS9* với UTVH ($p < 0.05$). So với công trình nghiên cứu ở thế giới, chỉ tìm thấy một công trình duy nhất thực hiện khảo sát tính chất methyl hóa gene *ADAMTS9* trên UTVH của Lung và cộng sự (2008), kết quả của nghiên cứu cũng tương đồng khi ghi nhận tỷ lệ methyl hóa của *ADAMTS9* ở mẫu bệnh cao hơn ở mẫu lành. Tỷ lệ mắc bệnh UTVH ở nhóm có sự methyl hóa gene *ADAMTS9* cao gấp 29 lần so với nhóm không có sự methyl hóa gene *ADAMTS9* được thể hiện qua thông số $OR = 29.00$ ($p < 0.05$). Độ phù hợp κ ghi nhận là 0.467 cho thấy mức ý nghĩa trung bình giữa phương pháp xác định với UTVH. Ngoài ra, kết quả độ nhạy và độ đặc hiệu của gene *ADAMTS9* cũng được ghi nhận lần lượt là 50.00 và 96.67. Từ kết quả phân tích thống kê khẳng định tính chất methyl hóa của gene *ADAMTS9* là một đặc điểm phân tử ở bệnh UTVH.

Bảng 3**Kết Quả Tần Số Methyl Hóa của Gene *ADAMTS9***

Mẫu	<i>ADAMTS9</i>	
	M (%)	U (%)
Bệnh (n = 30)	15 (50.00)	15 (50.00)
Lành (n = 30)	1 (3.33)	29 (96.67)
<i>p</i>	0.0001	
OR	29.00	
95% CI	3.49 - 241.14	
<i>p</i>	= 0.0018	
κ	0.467	
Se	50.00	
Sp	96.67	

Ghi chú: *p*: *p* value; OR: tỷ suất chênh; κ : độ phù hợp; Se: Độ nhạy; Sp: Độ đặc hiệu; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%. Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Đồng thời, nhóm tiến hành phân tích kết quả methyl hóa của gene *ADAMTS9* với các đặc điểm lâm sàng: giới tính, độ tuổi và giai đoạn bệnh. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4, ghi nhận sự methyl hóa của gene *ADAMTS9* không có mối tương quan có ý nghĩa với các đặc điểm lâm sàng của bệnh UTVH ($p > 0.05$)

Bảng 4

Kết Quả Methyl Hóa Gene ADAMTS9 trên Đặc Điểm Lâm Sàng

Đặc điểm lâm sàng	Phân loại	<i>ADAMTS9</i>	
		P (%)	N (%)
Giới tính	Nam	11 (36.67)	12 (40.00)
	Nữ	4 (13.33)	3 (10.00)
	<i>p</i>	1.00	
Tuổi	≤ 20	1 (3.33)	0 (0,00)
	20 đến ≤ 40	2 (6.67)	4 (13.33)
	40 đến ≤ 60	8 (26.67)	4 (13.33)
	60 đến ≤ 80	4 (13.33)	7 (23.33)
	<i>p</i>	0.28	
Giai đoạn bệnh	I	0 (0.00)	0 (0.00)
	II	5 (16.67)	5 (16.67)
	III	3 (10.00)	2 (6.67)
	IV	7 (23.33)	8 (26.67)
	<i>p</i>	0.88	

Ghi chú: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

4. Kết luận

Kết quả khảo sát tính chất methyl hóa của gene *ADAMTS9* ở bệnh nhân UTVH ở Việt Nam ghi nhận tần số methyl hóa ở mẫu dịch phết bệnh cao hơn ở mẫu dịch phết lành lần lượt là 50.00% và 3.33%. Đồng thời, kết quả nghiên cứu ghi nhận có mối tương quan chặt chẽ giữa tần số methyl hóa gene *ADAMTS9* với UTVH và không ghi nhận mối tương quan giữa tần số methyl hóa gene *ADAMTS9* với các đặc điểm lâm sàng của bộ mẫu.

Kết quả này khẳng định việc xây dựng thành công quy trình khảo sát tính chất methyl hóa gene *ADAMTS9* trên bệnh UTVH, góp phần cho những nghiên cứu sâu hơn và hướng tới xây dựng một dấu chứng sinh học tiềm năng cho việc phát hiện sớm UTVH ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

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

TUYÊN BỐ KHÔNG CÓ XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả cam kết, tuyên bố không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến việc công bố bài báo này.

Tài liệu tham khảo

- Chen, C., Wang, Z., Ding, Y., Wang, L., Wang, S., Wang, H., & Qin, Y. (2022). DNA methylation: From cancer biology to clinical perspectives. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 27(12), Article 326. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2712326>
- Cho, W.C. S. (2007). Nasopharyngeal carcinoma: Molecular biomarker discovery and progress. *Molecular Cancer*, 6(1), 1-9.
- da Costa, V.G., Marques-Silva, A. C., & Moreli, M. L. (2015). The Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein-1 (*LMP1*) 30-bp deletion and XhoI-polymorphism in nasopharyngeal carcinoma: A meta-analysis of observational studies. *Systematic Reviews*, 4(46), 1-11.
- Dai, W., Zheng, H., Cheung, A. K., & Lung, M. L. (2016). Genetic and epigenetic landscape of nasopharyngeal carcinoma. *Chinese Clinical Oncology*, 5(2), Article 16.
- Davalos, V., & Esteller, M. (2023). Cancer epigenetics in clinical practice. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(4), 376-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21765>
- Frappier, L. (2012). Role of EBNA1 in NPC tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 22(2), 154-161.
- Geissler, F., Nestic, K., Kondrashova, O., Dobrovic, A., Swisher, E. M., Scott, C. L., & Wakefield, M. (2024). The role of aberrant DNA methylation in cancer initiation and clinical impacts. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 16, 1-23. <https://doi.org/10.1177/17588359231220511>
- Ji, X., Zhang, W., Xie, C., Wang, B., Zhang, G., & Zhou, R. (2011). Nasopharyngeal carcinoma risk by histologic type in central China: Impact of smoking, alcohol and family history. *International Journal of Cancer*, 129(3), 724-732.
- Lao, T. D., & Le, T. H. A. (2024). Hypermethylation of genes on chromosome 3p as a biomarker for nasopharyngeal carcinoma diagnosis: A Vietnamese case-control study. *The International Journal of Biological Markers*, 39(3), 201-208. <https://doi.org/10.1177/03936155241268431>
- Lo, P. H. Y., Leung, A. C. C., Kwok, C. Y. C., Cheung, W. S. Y., Ko, J. M. Y., Yang, L. C., Law, S., Wang, L. D., Li, J., Stanbridge, E. J., Tang, J. C. O., Tsao, S. W., & Lung, M. L. (2007). Identification of a tumor suppressive critical region mapping to 3p14. 2 in esophageal squamous cell carcinoma and studies of a candidate tumor suppressor gene, *ADAMTS9*. *Oncogene*, 26(1), 148-157.
- Lo, P., H., Y., Lung, H., L., Cheung, K., L., Apte, S. S., Chan, K. W., Kwong, F. M., Ko, J. M. Y., Cheng, Y., Law, S., Srivastava, G., Zabarovsky, E. R., Tsao, S. W., Tang, J. C. O. T., Stanbridge, E. J., & Lung, M. L. (2010). Extracellular protease *ADAMTS9* suppresses esophageal and nasopharyngeal carcinoma tumor formation by inhibiting angiogenesis. *Cancer Research*, 70(13), 5567-5576.
- Lung, H. L., Cheung, A. K. L., Ko, J. M. Y., Cheng, Y., & Lung, M. L. (2012). Identification of tumor suppressor genes via cell fusion and chromosomal transfer. In *Tumor suppressor genes* (pp. 53-78). InTech.

- Lung, H., L., Lo, H., Y., Xie, D., Apte S. S., Cheung, A. K. L., Cheng, Y., Law, E. W. L., Chua, D., Zeng, Y. X., Tsao, S. W., Stanbridge, E. J., & Lung, M. L. (2008). Characterization of a novel epigenetically-silenced, growth-suppressive gene, *ADAMTS9*, and its association with lymph node metastases in nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Cancer*, 123(2), 401-408. <https://doi.org/10.1002/ijc.23528>
- Salehiniya, H., Mohammadian, M., Mohammadian-Hafshejani, A., & Mahdavifar, N. (2018). Nasopharyngeal cancer in the world: Epidemiology, incidence, mortality and risk factors. *World Cancer Research Journal*, 5(1), Article e1046.
- Shao, B., Feng, Y., Zhang, H., Yu, F., Li, Q., Tan, C., Xu, H., Ying, J., Li, L., Yang, D., Peng, W., Tang, J., Li, S., Ren, G., Tao, Q., & Xiang, T. (2017). The 3p14.2 tumour suppressor *ADAMTS9* is inactivated by promoter CpG methylation and inhibits tumour cell growth in breast cancer. *Journal of Cell and Molecular Medicine*, 22(2), 1257-1271.
- 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.
- Wang, T., Liu, H., Chen, Y., Liu, W., Yu, J., & Wu, G. (2009). Methylation associated inactivation of *RASSF1A* and its synergistic effect with activated K-Ras in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28(160), 1-11.
- Xu, F. H., Xiong, D., Xu, Y. F., Cao, S. M., Xue, W. Q., Qin, H. D., Liu, W. S., Cao, J. Y., Zhang, Y., Feng, Q. S., Chen, L. Z., Li, M. Z., Liu, Z. W., Liu, Q., Hong, M. H., Shugart, Y. Y., Zeng, Y. X., Zeng, M. S., & Jia, W. H. (2012). An epidemiological and molecular study of the relationship between mmoking, risk of nasopharyngeal carcinoma, and Epstein-Barr Virus activation. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(18), 1396-1410.

