

KHẢO SÁT *IN SILICO*, XÂY DỰNG CƠ SỞ KHOA HỌC CHO VIỆC PHÁT HIỆN KẾT HỢP YẾU TỐ NHIỄM VÀ BẤT ỔN DI TRUYỀN TRONG UNG THƯ VÒM HỌNG

Ngày nhận bài: 17/06/2014
Ngày nhận lại: 05/07/2014
Ngày duyệt đăng: 09/09/2014

*Nguyễn Văn Trường, Nguyễn Thị Thúy Tài,
Nguyễn Thị Thanh Nhân, Nguyễn Thị Thu Ngân,
Lý Thị Tuyết Ngọc¹
Lao Đức Thuận²
Lê Huyền Ái Thúy³*

TÓM TẮT

Ung thư vòm họng là một dạng ung thư phổ biến ở Việt Nam với tỷ lệ tử vong khá cao lên đến 3,3% dân số vào năm 2012. Do vậy, việc chẩn đoán và phát hiện sớm ung thư vòm họng là một vấn đề cấp thiết nhằm nâng cao khả năng sống sót của bệnh nhân. Các nghiên cứu gần đây khẳng định rằng sự xâm nhiễm của Epstein-Barr virus (EBV) và sự methyl hóa bất thường trên gen DAPK là những nguyên nhân dẫn đến sự tăng sinh và phát triển khối u ở vòm họng. Với mục đích hướng tới việc phát triển một kỹ thuật chẩn đoán dựa trên việc kiểm tra sự hiện diện của gen EBNA-1 – một gen cần thiết cho sự xâm nhiễm và nhân lên của EBV – và sự methyl hóa bất thường trên gen DAPK như các dấu chứng sinh học trong tiên lượng và chẩn đoán sớm ung thư vòm họng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu bước đầu gồm (1) Khai thác dữ liệu, thống kê tần số methyl hóa trung bình có trọng số gen DAPK dựa trên các nghiên cứu trên thế giới; (2) Xác định phương thức thực nghiệm nhằm tiên lượng và chẩn đoán sớm bệnh ung thư vòm họng và khảo sát các bước *in silico* cần thiết.

Từ khóa: ung thư vòm họng, EBV, EBNA-1, DAPK, methyl hóa.

ABSTRACT

Nasopharyngeal carcinoma is the common cancer in Vietnam counting for 3,3% in 2012. Therefore, there are necessary to prognosis and early diagnosis nasopharyngeal carcinoma in order to improve the survival of patients. Current studies affirmed that the infection of EBV (Epstein-Barr virus) and the aberrant methylation in DAPK gene were the reasons leading to the carcinogenesis of nasopharynx. For the aims to establish the method based on the present of EBNA-1 which was necessary to the infection and replication of EBV and the hypermethylation in DAPK as the biomarker for prognosis and early diagnosis nasopharyngeal carcinoma, in this study, we carried out (1) Data mining and statistically calculated the mean of methylation frequencies of DAPK based on the studies worldwide; (2) Determination of the mode of experiment for prognosis and early diagnosis the nasopharyngeal carcinoma.

Keywords: nasopharyngeal carcinoma, EBV, EBNA-1, DAPK, methylation.

¹ Trường Đại học Mở TP.HCM.

² ThS, Trường Đại học Mở TP.HCM.

³ PGS.TS, Trường Đại học Mở TP.HCM. Email: lhathuy@gmail.com

1. Giới thiệu

Ung thư vòm họng là loại ung thư phổ biến, đứng đầu trong các bệnh ung thư cổ ở Việt Nam. Số liệu của năm 2012 cho thấy tỷ lệ mắc bệnh ung thư vòm họng và tử vong lần lượt lên đến 3,9% và 3,3% dân số^[17]. Cũng như các ung thư khác, việc chẩn đoán sớm bệnh ung thư vòm họng sẽ hứa hẹn cho sự phục hồi và nâng cao khả năng sống sót của bệnh nhân^[13]. Các phương pháp thông thường như sinh thiết khối u có giá trị cao trong chẩn đoán nhưng mang tính nhược điểm xâm lấn gây tổn thương cơ thể bệnh nhân và chỉ được áp dụng cho các giai đoạn không còn sớm của bệnh (khối u đã hình thành)^[13]. Song song đó, các nhà nghiên cứu trên thế giới đang hết sức nỗ lực để tìm kiếm một biomarker nhằm tiên lượng và chẩn đoán sớm bệnh.

Các công bố gần đây đều khẳng định nguyên nhân dẫn đến ung thư vòm họng là hệ quả của sự rối loạn về mặt di truyền và một trong những kiểu rối loạn di truyền đã được chứng minh xảy ra rất sớm trong tiến trình dẫn đến ung thư là sự methyl hóa vượt mức xảy ra ở các gen ức chế khối u hay các gen tham gia vào quá trình điều hòa chu trình tế bào bằng sự gắn nhóm methyl (-CH₃) vào C₅' của Cytosine thông qua liên kết cộng hóa trị^{[1][5][9][20]}. Sự methyl hóa xảy ra tại các đảo CpG của các gen ức chế khối u, các gen điều hòa chu trình tế bào dẫn đến sự mất chức năng của các gen này, thúc đẩy sự tăng trưởng và phát sinh khối u^[9]. Gen *DAPK* (Death Associated Protein Kinase) thuộc nhóm gen điều hòa chu trình tế bào, nằm ở vị trí 9q21.33, mã hóa cho protein *DAPK* có chức năng trong việc điều khiển tế bào chết theo chương trình^[15]. Sự methyl hóa trên gen *DAPK* đã được khẳng định là có liên quan đến một số loại ung thư với các tần số methyl hóa khác nhau lần lượt như: ung thư phổi với 34%^[12], ung thư gan với 52%^[18] u tuyến yên với 34%^[2], ung thư vú với 17%^[2]... Đối với ung thư vòm họng, tần số methyl hóa gen này là rất cao; cụ thể trong công bố của Kong *et al* (2006), tần số này chiếm 76,1%^[15]. Một nghiên cứu khác của Zhang *et al* (2002) cũng cho thấy sự methyl hóa vượt mức ở gen *DAPK* trên ung thư vòm họng chiếm tỷ lệ rất cao, từ 70-80%^[20]. Bên cạnh đó, nghiên cứu

của Wong *et al* (2002) đã cho thấy sự methyl hóa vượt mức trên promoter của gen *DAPK* ở ung thư vòm họng là một sự kiện diễn ra sớm trong quá trình sinh u ở vòm họng với sự methyl hóa trên gen *DAPK* ở khối u sơ cấp chiếm 75% và trên các dòng tế bào ung thư vòm họng chiếm 80%^[16].

Ngoài ra, một nguyên nhân khác nữa đã được xem là căn nguyên dẫn đến bệnh (ung thư vòm họng), đó là sự xâm nhiễm của virus Epstein Barr (EBV)^{[3][10]}. EBV là một loại virus thuộc họ Herpesvirus. Cấu trúc bộ gen của EBV là chuỗi DNA sợi đôi, kích thước 184kb, mã hóa cho trên 85 gen^[10]. Khi EBV xâm nhập vào cơ thể người, sự phát triển của EBV diễn tiến theo ba hướng (1) Xâm nhập vào tế bào biểu mô và nhân lên; (2) Gây sơ nhiễm và xâm nhập vào tế bào lympho B và nhân lên; (3) Tiềm tàng và tiến triển thành ung thư khi có điều kiện^{[10][19]}. Để duy trì khả năng tiềm tàng, EBV đòi hỏi phải có sự trợ giúp của protein EBNA-1 được mã hóa trực tiếp từ gen *EBNA-1*^{[14][19]}. Chi tiết hơn, EBNA-1 thể hiện vai trò bằng việc duy trì EBV ở dạng vòng (episome EBV) trong tế bào chủ và thực hiện chức năng trong phiên mã thông qua việc EBNA-1 bám vào oriP khởi phát sự nhân lên của DNA hệ gen EBV^{[7][14]}. Gen *EBNA-1* và các sản phẩm của nó được tìm thấy trong hầu hết các khối u liên quan đến EBV; sự có mặt của EBV được xác định lên tới 98% khối u^[20]. Chính vì vậy, có thể khẳng định rằng: yếu tố nhiễm EBV là nguyên phát của bệnh ung thư vòm họng.

Nhằm xây dựng cơ sở khoa học cho thực nghiệm phát hiện sớm và tiên lượng bệnh ung thư vòm họng, trong nghiên cứu bước đầu này, chúng tôi tiến hành (1) Khai thác dữ liệu đã được công bố trên thế giới liên quan đến sự hiện diện của *EBNA-1* và sự methyl hóa vượt mức *DAPK* liên quan đến ung thư vòm họng; (2) Xác định phương pháp chẩn đoán sớm bệnh dựa trên hai gen đích: gen *EBNA-1* (yếu tố nhiễm) và *DAPK* (yếu tố thể chủ).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Khai thác dữ liệu, thu nhận trình tự gen *EBNA-1* và *DAPK*

Tần số và các phương pháp đánh giá mức độ methyl hóa trên gen *DAPK* được khai thác trên cơ sở dữ liệu Pubmed và Pubmed central, từ đó, tần số trung bình có trọng số được tính toán. Các trình tự gen *EBNA-1* được thu nhận từ Genbank trên cơ sở dữ liệu NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) bằng các mã số truy cập KC207814, KC207813, NC_009334, DQ279927, KF373730, JQ009376, KC617875. Đồng thời trình tự gen *DAPK* cũng được thu nhận bằng mã số truy cập NC_000009.12.

Thiết kế môi cho phản ứng PCR khuếch đại EBNA-1 và cho phản ứng MSP đánh giá mức độ methyl trên gen *DAPK*

Việc thiết kế môi được thực hiện bằng các công cụ tin sinh học bao gồm chương trình trực

tuyến BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), IDT analyzer (www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/), Annhyb, CLUSTALX, BatchPrimer 3 (<http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>).

3. Kết quả và thảo luận

Khai thác dữ liệu

Chúng tôi bắt đầu bằng việc tập trung trên tính chất methyl hóa bất thường có liên quan đến ung thư vòm họng. Qua quá trình khai thác dữ liệu từ các nghiên cứu trên thế giới liên quan đến đánh giá mức độ methyl hóa, chúng tôi nhận thấy rằng gen *DAPK* có tỷ lệ methyl hóa cao vượt bậc. Bảng sau là tổng hợp từ các công bố điển hình về tỷ lệ methyl hóa, phương pháp thực hiện với các nguồn mẫu sử dụng trên gen này.

Bảng 1. Tỷ lệ methyl hóa, phương pháp, nguồn mẫu khác nhau giữa các nghiên cứu

Nghiên cứu	Phương pháp	Loại mẫu	Sôi mẫu ung thư/bình thường	Tỷ lệ methyl hóa trên mẫu ung thư (%)
[3]	MSP	Mô sinh thiết	49/-	67,3/-
		Dịch phết	49/20	55,1/0
[5]	MSP	Mô đúc paraffin	41/-	76,0/-
[6]	MSP	Mô sinh thiết	30/-	76,7/-
		Dịch phết	30/-	63,4/-
[7]	MSP, Real-Time PCR	Mô đúc paraffin, Mô sinh thiết	46/-	76,1/-
[13]	MSP	Mô đúc paraffin	53/-	79,2/-
[14]	MSP	Mô sinh thiết	32/-	75,0/-

Ghi chú: - trong nghiên cứu không thử nghiệm trên nguồn mẫu bình thường

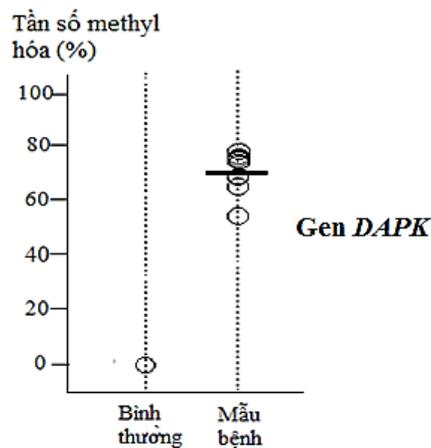
Dựa trên kết quả thể hiện ở Bảng 1 cho thấy phần lớn các công bố đều sử dụng mẫu sinh thiết và mô đúc paraffin, chỉ duy nhất hai nghiên cứu sử dụng dịch phết để khảo sát. Kết quả thống kê ghi nhận tỷ lệ methyl hóa trên gen *DAPK* đều rất cao và có sự dao động từ 55,1% đến 79,2% giữa các công bố. Trong khi

đó, các công bố không ghi nhận được tỉ lệ methyl hóa trên mẫu mô bình thường. Điều đáng chú ý là các công bố trên thế giới đều sử dụng kỹ thuật MSP để phát hiện tính chất methyl hóa trên gen *DAPK*, dù đã có nhiều kỹ thuật khác được phát triển. Bên cạnh đó, công bố của tác giả Zhang và cộng sự vào năm

2012, các tác giả vẫn lựa chọn MSP^[3]. Chúng tôi cũng thống nhất với lựa chọn này bởi MSP nhạy, dễ phát triển và nhất là đơn giản nhưng phân biệt được allele methyl (dù hiện diện ít) trong hỗn hợp tế bào ung thư và tế bào bình thường của mẫu bệnh phẩm. Nhằm loại bỏ sự

khác biệt giữa các phương pháp nghiên cứu và các loại mẫu, chúng tôi tính tần số trung bình có trọng số áp dụng cho các số liệu đã thống kê được. Kết quả cho thấy tần số methyl có trọng số là 72,02% và được thể hiện thông qua Hình 1.

Hình 1. Tần số methyl hóa có trọng số của gen *DAPK* trên tế bào ung thư vòm họng và tế bào bình thường



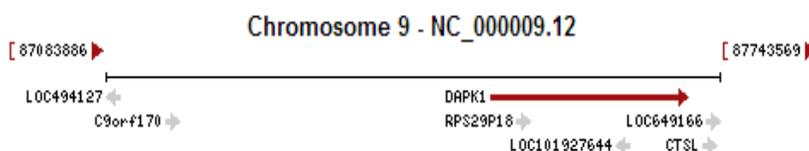
Ghi chú: Tâm của các vòng tròn thể hiện tần số methyl hóa đã được báo cáo trong các công trình liên quan. Đường thẳng nằm ngang hiển thị tần số methyl hóa trung bình có trọng số dựa trên các nghiên cứu mà chúng tôi phân tích.

Điều đáng đặc biệt lưu ý là trong tất cả các công bố về tính chất methyl hóa bất thường của gen *DAPK*, các tác giả đã không đề cập đến yếu tố nguyên phát, tức là nhiễm EBV của mẫu bệnh phẩm.

Thu nhận trình tự gen *DAPK* và thiết kế môi MSP đánh giá mức độ methyl hóa trên gen *DAPK*

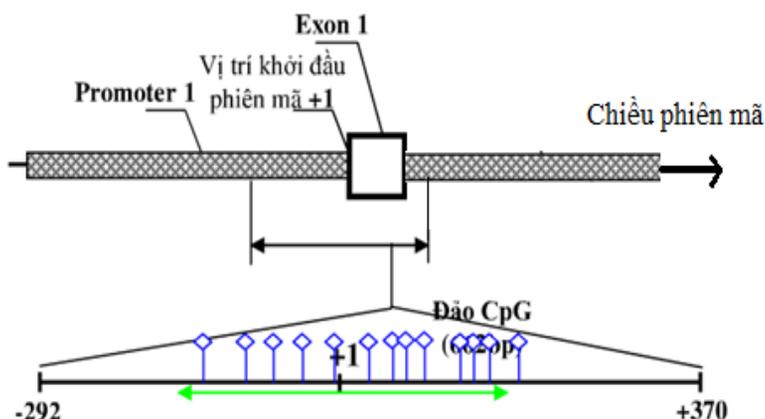
Trình tự gen *DAPK* được thu nhận từ ngân hàng gen với mã số truy cập NC_000009.12 (Hình 2). Đồng thời, các vùng promoter, exon 1 và 5'UTR được xác định bằng các công cụ hỗ trợ trực tuyến *Sequence view* trên NCBI (Dữ liệu không trình bày).

Hình 2. Vị trí gen *DAPK* nằm trên nhiễm sắc thể số 9



Các đảo CpG thuộc vùng promoter của gen được xác định bằng phần mềm Methprimer, đảo CpG có chiều dài 662 bp

(-292 đến +370) kéo dài từ vùng cuối promoter 1 đến cuối exon 1 (Hình 3).

Hình 3. Sơ đồ cấu trúc gen *DAPK*

Bên cạnh đó, kiểm tra bằng phần mềm TF search, nhiều vị trí phiên mã quan trọng Sp1, MZF, CP2, ANML1a, p300, C/EBP, GATA,... được nhận diện nằm bên trong đảo CpG của gen *DAPK* (Hình 4.). Các nhân tố phiên mã này hiện diện trong vùng promoter, vì vậy việc "đóng" hay "mở" của chúng sẽ quyết định đến hoạt động phiên mã và biểu hiện của gen, do đó, chúng tôi sẽ chọn vùng này để đánh giá mức độ methyl hóa tại các vị trí CpG có thể gây ức chế quá trình phiên mã dẫn đến sự im lặng của các gen thông qua phương pháp MSP. Từ đó, các môi được thiết

kế đánh giá tình trạng methyl hóa tại vị trí các đảo CpG sẽ đi qua các nhân tố phiên mã quan trọng. Đối với phản ứng MSP, hệ thống môi bao gồm mỗi methyl và mỗi unmethyl để phân biệt được tình trạng methyl hóa hay không methyl hóa của các vị trí CpG trong vùng khảo sát. Điểm khác biệt duy nhất giữa hai môi methyl và unmethyl là nucleotide Cytosine trong trình tự mỗi methyl sẽ được thay thế bằng các Thymine trong trình tự mỗi unmethyl. Trình tự các cặp môi được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Trình tự mỗi methyl (I) và unmethyl (II) dùng để khuếch đại gen *DAPK*

Cặp môi	Trình tự mỗi (5' – 3')
(I) DAPK-MF	GGATAGT <u>CGGATCGAGTTAACGTC</u>
DAPK-MR	CATAA <u>ACGCCAACGCCGAAAA</u>
(II) DAPK-UF	GGAGGATAGT <u>TGGATTGAGTTAATGTT</u>
DAPK-UR	CCATAA <u>ACCCAACACCAAAAA</u>

Ghi chú: Các vị trí CpG được in đậm và gạch dưới; Các cặp môi dùng trong phương pháp MSP được kí hiệu là F–mỗi xuôi. R–mỗi ngược; M–methyl; U–unmethyl

Cặp môi methyl và unmethyl được tiến hành đánh giá các thông số vật lý bao gồm chiều dài, phần trăm GC, năng lượng tự do hình thành cấu trúc thứ cấp,... bằng công cụ trực

tuyến IDT analyzer và đánh giá độ đặc hiệu thông qua chương trình trực tuyến BLAST hay METHBLAST trên NCBI (Bảng 3).

Bảng 3. Đánh giá thông số vật lý môi methyl và unmethyl gen *DAPK*

Tên môi	T_m (°C)	L	%GC	(1)	(2)	(3)	Sản phẩm (bp)
DAPK-MF	56,5	24	50,0	- 0,41	- 7,53	- 8,26	172
DAPK-MR	56,9	21	47,6	- 0,51	- 3,61		
DAPK-UF	54,8	27	37,0	0,15	- 4,85	- 8,31	176
DAPK-UR	52,1	22	36,4	-0,51	-1,47		

Ghi chú: Năng lượng tự do ΔG (Kcal.mole⁻¹) hình thành (1) hairpin loop; (2) homodimer và (3) heterodimer; T_m : nhiệt độ nóng chảy, L: chiều dài (bp), %GC: phần trăm GC.

Dựa trên kết quả phân tích các thông số vật lý của môi (Bảng 3.), phần lớn các thông số vật lý đều phù hợp với các yêu cầu lý thuyết đặt ra^[11]. Chỉ duy nhất %GC của cặp môi unmethyl thấp hơn so với quy định là 50-60%, do đó, trong thực nghiệm sau này sẽ lưu ý trong việc tối ưu hóa các thông số của phản ứng MSP. Ngoài ra, khi kiểm tra tính đặc hiệu bằng chương trình BLAST và METHBLAST đều thể hiện tính đặc hiệu cao (Dữ liệu không trình bày). Mặt khác, về số lượng các CpG

trong môi, môi xuôi và môi ngược được thiết kế bao phủ ít nhất ba vị trí CpG, cụ thể đối với môi xuôi methyl và unmethyl chứa 4 vị trí CpG và môi ngược chứa 3 vị trí CpG. Cùng với tính chất hệ thống môi này được thiết kế chứa các vị trí CpG trùng với vị trí của các nhân tố phiên mã quan trọng như CP2, MZF1 làm tăng độ đặc hiệu cũng như khả năng đánh giá tình trạng methyl hóa ở tế bào ung thư vòm họng (Hình 4).

Hình 4. Vị trí bắt cặp môi methyl và unmethyl, các nhân tố phiên mã quan trọng trên gen *DAPK*

Ghi chú: Các nucleotide được đóng khung trong hộp hình chữ nhật là các vị trí của các yếu tố phiên mã, trình tự nucleotide màu đen là toàn bộ trình tự đảo CpG thu thập được. Trong đó, hai đoạn trình tự được tô đậm là vị trí bắt cặp của hai đoạn môi methyl (DAPK-MF và DAPK-MR), đoạn trình tự được gạch chân bên dưới là vị trí bắt cặp của hai đoạn môi unmethyl (DAPK-UF và DAPK-UR).

Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc thiết kế cặp mồi methyl và unmethyl để đánh giá tình trạng methyl hóa trên gen *DAPK* của ung thư vòm họng để sử dụng trong các nghiên cứu thực nghiệm sau này.

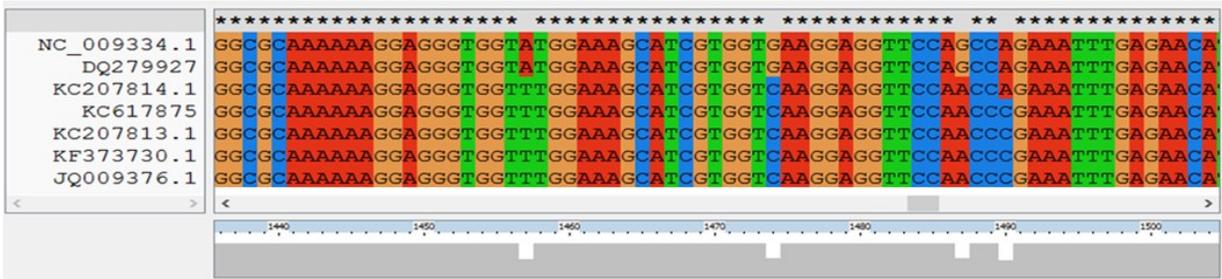
Xác định phương thức thực nghiệm nhằm tiên lượng và chẩn đoán sớm bệnh ung thư vòm họng

Như đã đề cập ở trên, sự có mặt của EBV đã được chứng minh về tính tương quan rất cao (trên 98%) ở các khối u vòm họng^[20]. Mặt khác, để duy trì hình thức xâm nhiễm tiềm tàng với DNA dạng vòng, gen *EBNA-1* cần thể

hiện chức năng. Vì vậy, bước khảo sát *in silico* kế tiếp, chúng tôi tập trung trên gen *EBNA-1*, nhằm xác định xem gen này có thể làm trình tự đích cho sự xác nhận tính nhiễm và hình thức xâm nhiễm tiềm tàng của EBV.

Trình tự gen *EBNA-1* được tiến hành thu nhận từ các mã số truy cập khác nhau (như đã liệt kê trong phần Vật liệu & Phương pháp) dựa trên nguồn gốc công bố có tính phân biệt về chủng hay type nhiễm. Các trình tự này được tiến hành sắp giống cột bằng chương trình CLUSTALX (Hình 5).

Hình 5. Kết quả sắp giống cột các trình tự gen *EBNA-1*



Kết quả sắp giống cột các trình tự *EBNA-1* (Hình 5) cho thấy tỷ lệ bảo tồn của gen này khá cao (thể hiện thông qua dấu * trong hình). Ngoài ra, các trình tự bảo tồn của gen này đều rất đặc trưng cho EBV khi khảo sát bằng BLAST (dữ liệu không trình bày). Do

đó, có thể kết luận rằng, vùng bảo tồn thuộc gen *EBNA-1* này có đủ cơ sở để làm trình tự đích nhằm phát hiện EBV. Việc thiết kế mồi cho các phản ứng RT-PCR được tiến hành và kết quả được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Trình tự mồi cho phản ứng PCR khuếch đại một phần gen *EBNA-1*

Cặp mồi	Trình tự mồi (5' – 3')
EBNA1_F	GCCGGTGTGTTCGTATATGG
EBNA1_R	AGGGGAGACGACTCAATGGT

Ghi chú: F mồi xuôi; R mồi ngược

Các thông số vật lý của cặp mồi EBNA1_F và EBNA1_R được kiểm tra bằng chương trình IDT analyzer và thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thông số vật lý của cặp mồi EBNA1_F và EBNA1_R

Trình tự mồi (5'-3')	L	%GC	T _m (°C)	(1)	(2)	(3)	Sản phẩm (bp)
EBNA1_F6	20	55,0	55,8	1,18	-9,75		109
EBNA1_R6	20	55,0	57,9	-1,65	-3,61	-6,53	

Ghi chú: Năng lượng tự do ΔG (Kcal.mole⁻¹) hình thành (1) hairpin loop; (2) homodimer và (3) heterodimer; T_m: nhiệt độ nóng chảy, L: chiều dài (bp), %GC: phần trăm GC.

Dựa trên kết quả phân tích, các thông số vật lý đều phù hợp với yêu cầu của thiết kế môi, ngoại trừ năng lượng tự do hình thành cấu trúc homodimer là $-9,75 < -9 \text{ Kcal.mole}^{-1}$. Tuy nhiên, khi tiến hành kiểm tra bằng phần mềm trực tuyến IDT, cấu trúc tự bắt cặp xảy ra ở đầu 5' và giá trị năng lượng tự do này không chênh lệch quá nhiều so với yêu cầu ($-9 \text{ Kcal.mole}^{-1}$). Do đó, cặp môi này vẫn được sử dụng để kiểm tra tính đặc hiệu. Khi tiến hành kiểm tra tính đặc hiệu bằng chương trình trực tuyến BLAST, kết quả cho thấy mỗi khuếch đại được gen *EBNA-1* của virus human herpes (Mã số truy cập JN986951, JN986949...) có độ tương đồng cao, đạt 100% và giá trị E-value gần bằng 0 (Ident=100%, E-value=0,089). Như vậy, về mặt lý thuyết, chúng tôi đã thiết kế thành công cặp môi khuếch đại gen *EBNA-1* thỏa mãn với các yêu cầu về thông số, tính đặc hiệu của môi. Qua đó, chúng tôi cũng đồng thời xác định phương thức thực nghiệm nhằm tiên lượng và chẩn đoán sớm ung thư

vòm họng sẽ dựa trên hai gen đích: gen *EBNA-1* (yếu tố nhiễm) và *DAPK* (yếu tố thể chủ) bằng các phản ứng kết hợp RT-PCR và MSP.

4. Kết luận

Từ những kết quả nghiên cứu bước đầu, chúng tôi ghi nhận tần số methyl hóa trung bình có trọng số của gen *DAPK* là cao, đạt 72,02%. Cùng với tính chất methyl hóa cao này, sự biểu hiện của gen *EBNA-1* được ghi nhận là đảm bảo tính nhiễm ở dạng tiềm tàng, DNA dạng vòng của EBV trong cơ thể chủ. Kết hợp cả hai yếu tố này, chúng tôi xác định phương thức thực nghiệm nhằm tiên lượng và chẩn đoán sớm ung thư vòm họng sẽ dựa trên hai gen đích: gen *EBNA-1* (yếu tố nhiễm) và *DAPK* (yếu tố thể chủ) bằng các phản ứng kết hợp RT-PCR và MSP với các bộ môi đặc trưng đã được thiết kế và đánh giá tốt trên lý thuyết. Kết quả khảo sát *in silico* này cũng là cơ sở khoa học để chúng tôi tiến hành thực nghiệm trong thời gian sớm nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chang HW., Chan A., Kwong DL., Wei WI., Sham JS., Yuen AP. (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". *Int J Cancer* 105, p.851– 855.
2. Chim CS., Liang R., Fung TK., Choi CL., Kwong YL. (2007). "Epigenetic dysregulation of the death-associated protein kinase/p14/HDM2/p53/Apaf-1 apoptosis pathway in multiple myeloma". *J Clin Pathol*, 60 p.664-669.
3. Eugene AC., Julie MW., David ET., Stacey LI. (2008). "Nasopharyngeal Carcinoma: The Role of the Epstein-Barr Virus". *Medscape J Med.*, 10(7), p.165.
4. Kong WJ., Zhang S., Guo CK., Wang YJ., Chen X., Zhang SL., Zhang D., Liu Z., Kong W. (2006). "Effect of methylation-associated silencing of the death-associated protein kinase gene on nasopharyngeal carcinoma". *Anticancer Drugs* 17(3), p.251-259.
5. Kwong J., Lo KW., To KF., Teo PM., Johnson PJ., Huang DP. (2002). "Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in Nasopharyngeal Carcinoma". *Clin Cancer Res*, 8, p.131-137.
6. Leah CP., Marcie JG., Leah AD., Daniel EJ., Kieu D., Carmen ST., Steven AB. (2009). "Dual promoter regulation of death-associated protein kinase gene leads to differentially silenced transcripts by methylation in cancer". *Carcinogenesis*, 30(12), p. 2023–2030.
7. Leight ER., Sugden B. (2000). "EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus". *Rev Med Virol*, 10, p.83-100.

8. Liu JB., Qiang FL., Dong J., Cai J., Zhou SH., Shi MX. (2011) ‘Plasma DNA methylation of Wnt antagonists predicts recurrence of esophageal squamous cell carcinoma’. *World J Gastroenterol.*, 17(44), p.4917-4921.
9. Manel E. (2005). “DNA methylation, epigenetics and metastasis”. *Springer*, ISBN-10 1-4020-3641-8.
10. Matthew PT., Razelle K. (2004). “Epstein-Barr Virus and Cancer”. *Clin Cancer Res*, 10, p.803-821.
11. Misener S., Krawetz SA. (1999). “Methods in Molecular Biology”. © *Humana Press*, 132, p.365-386.
12. Niklinska W., Naumnik W., Sulewska A., Kozlowski M., Pankiewicz., Milewski R. (2009). “Prognostic significance of DAPK and RASSF1A promoter hypermethylation in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)”. *Folia histochem cytobiol.*, 47, p.275-280.
13. Saeid G., Ali MA. (2012). “Non-Invasive Detection of Esophageal Cancer using Genetic Changes in Circulating Cell-Free DNA”. *Avicenna J Med Biotechnol.*, 4(1), p.3-13.
14. Sivachandran N., Wang X., Frappier L. (2012). “Functions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein in viral reactivation and lytic infection”. *J Virol.*, 86(11), p.6146-6158.
15. Susanna HH., Sagung RI., Luh PLI., Ahma H., Sylvia D., Sofia MH., Renske DMS., Astrid EG., Jaap MM. (2011). “Epigenetic markers for early detection of nasopharyngeal carcinoma in a high risk population”. *Molecular Cancer*, 10, p.48.
16. Wong TS, Chang HW, Tang KC, Wei WI, Kwong DL, Sham JS, Yuen AP, Kwong YL. (2002). “High frequency of promoter hypermethylation of the death-associated protein-kinase gene in nasopharyngeal carcinoma and its detection in the peripheral blood of patients”. *Clin Cancer Res.*, 8(2), p.433-437.
17. World Health Organization (2012). “Estimated cancer incidence, Mortality and prevalence worldwide in 2012”. *International agency for research on cancer*.
18. Wu LM., Zhang F., Zhou L., Yang Z., Xie HY., Zheng SS. (2010). “Predictive value of CpG island methylator phenotype for tumor recurrence in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma following liver transplantation”. *BMC Cancer*, 10, p.1471-2407.
19. Young LS., Dawson CW., Clark D., Rupani H., Busson P., Tursz T., Johnson A., Rickinson AB. (1988). “Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma”. *J Gen Virol.*, 69(5), p.1051-1065.
20. Zhang Z., Sun D., Hutajulu SH., Nawaz I., Nguyen Van D., Huang G., Haryana SM., Middeldorp JM., Ernberg I., Hu LF. (2012). “Development of a Non-Invasive Method, Multiplex Methylation Specific PCR (MMSP), for Early Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma”. *PLoS ONE*, 7(11), p.1-6.