

## Phân tích tổng hợp: Mối tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* (Glutathione S-Transferase P1) với bệnh ung thư vú

### Meta-analysis: Association between promoter hypermethylation of Glutathione S-Transferase P1 (*GSTP1*) and breast cancer

Trương Kim Phượng<sup>1\*</sup>, Phạm Hoàng Năng<sup>1</sup>, Lao Đức Thuận<sup>1</sup>, Lê Huyền Ái Thúy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ, Email: [phuong.tk@ou.edu.vn](mailto:phuong.tk@ou.edu.vn)

#### THÔNG TIN

#### TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.13.1.799.2018

Ngày nhận: 19/01/2018

Ngày nhận lại: 12/02/2018

Duyệt đăng: 14/03/2018

*Từ khóa:*

*GSTP1*, methyl hóa, phân tích tổng hợp, ung thư vú

Mối tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* đối với bệnh ung thư vú đã được công bố trong nhiều công trình nghiên cứu khác nhau tại nhiều quốc gia trên thế giới. Dù vậy, tính tương quan giữa tính chất epigenetic này của gen với bệnh ung thư vú không thống nhất qua từng công bố. Do đó chúng tôi thực hiện phân tích tổng hợp này nhằm xác nhận có hay không mối tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* đối với bệnh ung thư vú. Phân tích 19 nghiên cứu (ca-chứng) về tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter của gen *GSTP1* đối với bệnh ung thư vú (1910 ca bệnh ung thư, 671 người lành) cho thấy tính chất methyl hóa vùng promoter gen *GSTP1* làm tăng nguy cơ ung thư vú (OR = 10,497; 95%CI = 4,42 - 24,94; P < 0,0001; Mô hình phân tích ảnh hưởng ngẫu nhiên). Mối tương quan tính trên chỉ số nguy cơ OR tăng khi chọn lọc lại 13 nghiên cứu (1247 ca bệnh ung thư, 369 người lành), OR = 13,642 (95%CI = 8,23 - 22,60; P < 0,001; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến). Khi tách các phân hạng, chỉ số tương quan tăng: tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* xuất hiện ở cả mẫu mô và mẫu máu, tính chất methyl hóa vượt mức này nên được xác định bằng phương pháp Methylation Specific PCR và các phương pháp khác như Pyrosequencing, MS-MLPA, MethyLight và QMSP, so với Bisulfite methylation specific PCR. Methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* xuất hiện cao ở các chủng tộc châu Âu, Phi so với châu Á. Ngoài ra, tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* cũng là tính đặc trưng của bệnh nhân ung thư vú có phân độ mô học cao, giai đoạn bệnh muộn, kích thước khối u lớn, có sự xuất hiện hạch bạch huyết và Her2. Sự methyl

hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* cũng chính là nguyên nhân làm giảm hàm lượng và chức năng protein GSTP1.

### ABSTRACT

The association between promoter hypermethylation of Glutathione S-transferase P1 (*GSTP1*) and breast cancer has been investigated by much previous research worldwide. However, the results of the correlation between the epigenetic features of human genes with breast cancer varied from study to study. The purpose of this study, therefore, is to use a meta-analysis to identify how the *GSTP1* gene's promoter hypermethylation and breast cancer correlate to each other. Accordingly, 19 case-control studies were conducted to evaluate the association between GSTP gene' promoter methylation status and breast cancer, including 1910 cancer cases and 671 control cases. The findings showed that the status of gene promoter methylation increased the candidate's breast cancer risk by calculating the OR value (OR = 10,497; 95% CI = 4.42 - 24.94;  $P < 0.0001$ ; Random-effect meta-analysis). In addition, the re-collection of 13 case-control studies, including 1247 cancer cases and 369 control case, also showed an increase in the OR value (OR = 13,642; 95% CI = 8.23 - 22.60;  $P < 0,001$ , Fixed-effect meta-analysis model). The association value also increased. Then, the hypermethylation characteristic of the GSTP1 gene's promoter was observed in both tissue and blood samples, and at this level, it should be detected by many methods such as Methylation Specific PCR, MS-MLPA, MethyLight and QMSP compared to Bisulfite methylation-specific PCR. The hypermethylated GSTP1 promoter was higher in Europeans and Africans than in Asians. Moreover, the hypermethylated *GSTP1* gene's promoter is also found in breast cancer patients with high histopathology, large tumor size, lymph node and HER2 and at the terminal stage of the disease. The hypermethylated *GSTP1* gene's promoter also results in the reduced expression and activity of GSTP1 protein.

*Keywords:*

*GSTP1*, breast cancer, meta analysis, methylation

## 1. Tổng quan

Ung thư vú, một trong những bệnh ung thư có tỷ suất mắc cao ở giới nữ, xấp xỉ 25% trong tổng số trường hợp mắc các ung thư khác nhau, và là nguyên nhân gây tử vong cao nhất ở giới nữ (Ferlay et al., 2015; Globocan, 2012). Nhiều công trình nghiên cứu đã cho thấy hiện tượng epigenetics, đặc biệt là methyl hóa DNA vượt mức tại các đảo CpG trên vùng promoter của các gen đè nén u (Tumor Suppressor Genes - TSG) dẫn đến sự bất hoạt của các gen này; từ đó kích hoạt cơ chế sinh u, trong đó có ung thư vú (Jones & Baylin, 2002; Terry, McDonald,

Wu, Eng, & Santella, 2016). Tuy nhiên, vẫn tồn tại sự khác nhau trong các công bố về tính tương quan giữa methyl hóa vượt mức với các đặc điểm khác liên quan đến bệnh như nguồn mẫu sử dụng cho phân tích, phương pháp phân tích, chủng tộc được nghiên cứu, ... (Jung et al., 2013; Müller et al., 2003; Park et al., 2010; Phuong, Thao, Thuan, & Thuy, 2016; Sturgeon et al., 2012; Wu et al., 2016).

Trong những năm gần đây, một số TSG (Tumor Suppressor Gene - Gen đè nén u) đã được xác định là gen tiềm năng nhạy cảm với ung thư vú và một trong số đó là gen *Glutathione S-transferase P1 (GSTP1)* (Tang et al., 2015). *GSTP1 (Glutathione S-transferase pi 1)* là thành viên của họ enzyme Glutathione S-transferases (GSTs), định vị trên nhiễm sắc thể số 11 (11q13) (Genbank), có kích thước 3.059bp, gồm 7 exon (GeneCards, NCBI). Gen *GSTP1* mã hóa protein GSTP1 với một số chức năng chính như giải độc và kiểm soát sự chết theo chu trình (Isgor & Isgor, 2011; Wang, Arifoglu, Ronai, & Tew, 2001).

Chúng tôi thực hiện phân tích tổng hợp (Meta-analysis) này trên một khối dữ liệu tương đối lớn được tổng hợp từ số liệu của nhiều công bố khoa học trên thế giới (cập nhật đến tháng 1/2018), nhằm phân ánh một cách chính xác hơn về mối tương quan giữa methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* với các đặc điểm đặc trưng của bệnh ung thư vú.

## **2. Vật liệu - Phương pháp nghiên cứu**

### **2.1. Thu thập các công bố khoa học**

Nguồn dữ liệu được thu thập là các công bố khoa học thuộc dạng dữ liệu gốc trên nguồn cơ sở dữ liệu trực tuyến: PubMed, EMBASE và Web of Science bằng một số từ khóa: “*GSTP1*”, “breast cancer”, “DNA hypermethylation”; số liệu cập nhật đến tháng 1 năm 2018.

### **2.2. Tiêu chuẩn chọn lọc các công bố khoa học**

Các công bố khoa học được chọn vào phân tích tổng hợp theo một số tiêu chuẩn như sau: (1) Nghiên cứu ca-chứng (case-control study); Nghiên cứu đoàn hệ (cohort study) trong khảo sát tính tương quan giữa methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* với các đặc điểm lâm sàng: phân độ mô học, giai đoạn bệnh,...; (2) Dữ liệu đo lường mức độ tương quan giữa yếu tố nguy cơ (tính chất methyl hóa vượt mức trên gen *GSTP1*) và nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, thông qua chỉ số nguy cơ tỷ suất chênh (Odds Ratio - OR) với khoảng tin cậy 95% (Confidence intervals- CIs)\*; (3) các công bố khoa học được viết bằng tiếng Anh; (4) các công bố tiến hành trên mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân nữ giới. Không thỏa các yêu cầu trên, ví dụ như nghiên cứu tiến hành trên mô động vật; dòng tế bào nuôi cấy; bệnh ung thư khác; hoặc đối tượng mục tiêu (gen mục tiêu) khác và các báo cáo tổng quan (review) đều bị loại bỏ.

\*Dữ liệu OR này được các công bố xuất bản hoặc chúng tôi tính bằng phần mềm Medcalc® (phiên bản 16.4.3) dựa trên các kết quả mà các nghiên cứu đã xuất bản.

### **2.3. Trích xuất dữ liệu**

Sau bước chọn lọc các công bố, dữ liệu được trích xuất bao gồm: tác giả, năm xuất bản, thông tin về bệnh nhân: chủng tộc, kiểu nghiên cứu ca-chứng, nghiên cứu đoàn hệ, phương pháp phân tích tính chất methyl hóa, tần số methyl hóa gen *GSTP1*, trên mẫu bệnh và mẫu

chúng, các đặc điểm lâm sàng như giai đoạn bệnh, phân độ mô học, kích thước khối u, sự xuất hiện hạch bạch huyết, sự biểu hiện của thụ thể Her2.

#### **2.4. Phân tích thống kê**

Phân tích thống kê được tiến hành theo mô hình phân tích tổng hợp ảnh hưởng bất biến (Fixed-effects meta-analysis) hoặc mô hình phân tích tổng hợp ảnh hưởng ngẫu nhiên (Random effects meta-analysis) cho một tiêu chí nhị phân (a dichotomous outcome) với khoảng tin cậy 95% (CI) nhằm đánh giá tính tương quan giữa yếu tố nguy cơ (tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* và/hoặc tính chất đa hình đơn nucleotide) và nguy cơ mắc bệnh ung thư vú. Ước tính chỉ số bất đồng nhất (Index of Heterogeneity  $I^2$ ) giữa các nghiên cứu được tiến hành dựa vào thuật Chi bình phương. Giá trị  $I^2$  được xác định theo thang từ 0 đến 100% theo công bố của Higgins, Thompson, Deeks, và Altman (2003) cũng như hướng dẫn của Ryan (2014) và hệ thống Cochrane, bao gồm tính bất đồng nhất thấp ( $0% < I^2 < 40%$ ), tính bất đồng nhất vừa ( $30% < I^2 < 60%$ ), tính bất đồng nhất cao ( $50% < I^2 < 90%$ ) và tính bất đồng nhất đáng kể ( $I^2 > 75%$ ). Khi ước tính chỉ số đồng nhất (Index of homogeneity - Q) có giá trị  $P \geq 0,1$  và giá trị  $I^2 < 50%$ , điều này cho thấy không có tính bất đồng nhất giữa các công trình nghiên cứu, mô hình phân tích tổng hợp ảnh hưởng bất biến theo phương pháp của Mantel-Haenszel (Cochrane, 2014) sẽ được áp dụng nhằm phân tích chỉ số tỷ suất chênh (Odds Ratio - OR) với giá trị trọng số dựa trên nguồn dữ liệu đã được nhận vào phân tích tổng hợp. Ngược lại, khi chỉ số đồng nhất có giá trị  $P < 0,1$  và giá trị  $I^2 > 50%$ , điều này cho thấy có tính bất đồng nhất giữa các công trình nghiên cứu, mô hình phân tích tổng hợp ảnh hưởng bất biến theo phương pháp của DerSimonian (Cochrane, 2014) sẽ được áp dụng. Thêm vào đó, sự phân tích sẽ được tiếp tục tiến hành nhằm xác định tính bất đồng nhất trên các yếu tố, bao gồm chủng tộc: 00C1, Phi, và Da trắng (bao gồm châu Âu, Úc và Mỹ) (Ford & Kelly, 2005; Senior & Bhopal, 1994); loại mẫu bệnh phẩm: mẫu máu hay mô; phương pháp xác định methyl hóa DNA: MSP (Methylation specific PCR, là phương pháp chiếm đa số) so với các phương pháp khác (QMSP - Quantitative MSP, Bisulfite specific PCR - BSP, ...). Tất cả phân tích thống kê được thực hiện trên phần mềm Medcalc® (phiên bản 16.4.3).

### **3. Kết quả và thảo luận**

#### **3.1. Khai thác dữ liệu**

Dựa vào hướng dẫn của hệ thống PRISMA (Moher, Liberati, Tetzlaff, Altman, & Prisma Group, 2009) và Cochrane cùng với một số công bố khoa học của Haidich (2010), Russo (2007), Hughes (1996), quy trình lựa chọn, đánh giá công trình nghiên cứu, loại bỏ và trích xuất số liệu để đưa vào phân tích tổng hợp được tóm tắt ở Hình 1.

#### **3.2. Đặc điểm của bộ dữ liệu được trích xuất**

Chi tiết các bước sàng lọc và trích xuất dữ liệu và kết quả thống kê được mô tả ở Hình 1, tổng số từ 113 công bố được chọn từ các cơ sở dữ liệu; sau bước loại bỏ bởi không đáp ứng được các tiêu chí (như đã trình bày ở phần phương pháp), 19 nghiên cứu ca-chứng và 8 nghiên cứu đoàn hệ công bố trong khoảng thời gian từ 2003 đến 2017 được chọn lọc (Bảng 1, 2).

### **3.3. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, trên bộ dữ liệu từ 19 nghiên cứu ca chứng**

Bộ dữ liệu thích hợp cho phân tích tổng hợp từ 19 nghiên cứu ca-chứng công bố về tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* bao gồm 1910 mẫu ung thư vú (472 mẫu máu, 1438 mẫu mô) và 671 mẫu chứng (305 mẫu máu, 366 mẫu mô) (Bảng 1).

Kết quả phân tích (Hình 2) cho thấy tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* làm tăng nguy cơ ung thư vú với chỉ số OR là 10,50 (95% CI = 4,42 - 24,94; Mô hình phân tích ảnh hưởng ngẫu nhiên). Mặc dù vậy, tính bất đồng nhất giữa các công trình nghiên cứu là lớn ( $P_H < 0,0001$ ;  $I^2=77,02\%$ , Hình 2). Tính thiên vị của bộ dữ liệu vì vậy được phân tích và minh họa trên Hình 3. Đồ thị “Funnel plot” (Hình 3) ghi nhận tính thiên vị của bộ dữ liệu từ 19 nghiên cứu ca-chứng này.

### **3.4. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, trên bộ dữ liệu từ 13 nghiên cứu ca chứng**

Từ kết quả phân tích như đã được trình bày ở Hình 2, một số nghiên cứu cho thấy có mối tương quan thấp làm ảnh hưởng đến độ nhạy của kết quả phân tích. Khi những nghiên cứu này được loại bỏ, chỉ số bất đồng nhất giữa các nghiên cứu trong bộ dữ liệu còn lại, gồm 13 nghiên cứu ca-chứng (1247 mẫu bệnh và 369 mẫu chứng), giảm xuống  $I^2=17,39\%$  ( $P=0,27$ ) (Hình 4), và mối tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* và nguy cơ mắc ung thư vú tăng (OR = 13,64; 95% CI = 8,23 - 22,60;  $P<0,001$ ) (Hình 4). Thêm vào đó, đồ thị “Funnel plot” (Hình 5) ghi nhận tính thiên vị của bộ dữ liệu từ 13 nghiên cứu ca-chứng này được phân tích.

Các phân hạng được phân tích tiếp theo bao gồm loại mẫu bệnh phẩm được sử dụng cho nghiên cứu, phương pháp phân tích tính chất methyl hóa, chủng tộc, các đặc điểm lâm sàng liên quan đến bệnh ung thư vú như phân độ mô học (histological grade), giai đoạn bệnh (stage), kích thước khối u, sự xuất hiện hạch bạch huyết, sự biểu hiện của thụ thể Her2 và hoạt tính của protein *GSTP1*.

### **3.5. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, xét yếu tố loại mẫu bệnh phẩm**

Kết quả phân tích (Bảng 3) cho thấy chỉ số OR của tính chất methyl hóa bất thường vùng promoter gen *GSTP1*, sử dụng mẫu mô trong nghiên cứu, giữa nhóm bệnh nhân ung thư vú so với mô lấy từ người lành hay mô lành nằm kề mô ung thư ở người bệnh là 13,208; tương quan rất chặt chẽ (95% CI = 7,90-22,07;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến). Chỉ số tương quan này cũng xấp xỉ chỉ số tương quan khi phân tích chung về tính chất methyl hóa bất thường vùng promoter gen *GSTP1* và nguy cơ mắc ung thư vú ở trên (Hình 5). Trong khi đó, chỉ số OR của tính chất methyl hóa bất thường vùng promoter gen *GSTP1*, sử dụng mẫu máu trong nghiên cứu, giữa nhóm bệnh nhân ung thư vú so với nhóm người lành tăng rất cao, đạt giá trị 27,11 (95% CI = 1,55-474,99;  $P = 0,024$ ) (Bảng 3). Như vậy, bên cạnh việc sử dụng mẫu mô, khả năng sử dụng mẫu máu để phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* là rất thuận tiện, từ đó, khả năng áp dụng trong thực tế lâm sàng sẽ cao, đặc biệt khi

mà sự phát triển của kỹ thuật để từ đó việc sử dụng các loại sinh thiết lỏng (liquid biopsy) ứng dụng trong chẩn đoán, sàng lọc nguy cơ ung thư được dễ dàng hóa.

### **3.6. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, xét yếu tố phương pháp**

Kết quả phân tích (Bảng 3) cho thấy chỉ số OR của tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1*, giữa nhóm bệnh nhân ung thư vú so với nhóm người lành hay mô lành nằm kề mô ung thư ở người bệnh, bằng phương pháp MSP đạt giá trị 16,80 (95% CI = 8,06-34,99;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến). Trong khi đó, chỉ số OR của tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1*, giữa nhóm bệnh nhân ung thư vú so với nhóm người lành hay mô lành nằm kề mô ung thư ở người bệnh, bằng phương pháp BSP là 6,73 (95% CI = 2,61-17,33;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến), và các phương pháp khác MSP và BSP là 15,72 (95% CI = 5,51-44,91;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến). Sự tách các phân hạng phương pháp này cũng đã làm tăng chỉ số tương quan OR lên cao hơn so với phân tích chung, và xác định kỹ thuật BSP cũng chính là yếu tố làm giảm chỉ số OR trong các công bố được sử dụng cho phân tích tổng hợp này. Cho đến nay, phương pháp MSP cũng vẫn là phương pháp thông dụng nhất cho phân tích methylation và chỉ số tương quan trong kết quả phân tích cho thấy cao nhất so với việc sử dụng các phương pháp phân tích khác (Bảng 3), và đây cũng chính là phương pháp mà chúng tôi đã sử dụng trong thực nghiệm bước đầu của mình (Phuong et al., 2016). Chúng tôi sẽ tiếp tục sử dụng phương pháp MSP trong các thực nghiệm tiếp theo, sử dụng loại mẫu không xâm lấn, đặc biệt là sinh thiết lỏng - một khuynh hướng rất được chú ý phát triển hiện nay trong chẩn đoán ung thư trong các nghiên cứu mang tính thực nghiệm của mình.

### **3.7. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, xét yếu tố chủng tộc**

Kết quả phân tích (Bảng 3) cho thấy chỉ số OR của tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* của người châu Á giữa nhóm bệnh nhân ung thư vú so với nhóm người lành là 11,06 (95% CI = 6,36-19,25;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến), của người châu Âu là 37,98 (95% CI = 8,76-164,56;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến), của người châu Phi là 27,11 (95% CI = 1,55-474,99;  $P = 0,024$ ). Qua đó, có thể khẳng định rằng tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* là một đặc trưng của bệnh ung thư vú, với các chủng tộc châu Âu và châu Phi, chỉ số tương quan này rất cao và cao hơn so với các chủng tộc châu Á. Khẳng định này là tương đối chính xác với các đại diện công bố được thực hiện từ các chủng tộc châu Á và Âu, tuy nhiên đại diện châu Phi chỉ mới có một nghiên cứu, số liệu vì vậy cần được tiếp tục thu thập và cập nhật thêm trong thời gian tới.

### **3.8. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, xét yếu tố phân độ mô học**

7 nghiên cứu có số liệu về phân độ mô học được sử dụng cho phân tích này. Với kết quả phân tích ghi nhận chỉ số  $I^2 = 59,37\%$  ( $P = 0,02$ ), do đó chúng tôi áp dụng mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến để phân tích chỉ số OR của tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trong mối tương quan với phân độ mô học (cao hay thấp). Kết quả (Hình 6) cho thấy chỉ số OR = 1,753 (95% CI = 1,00 - 3,06;  $P = 0,009$ ), hay nói cách khác, tính chất methyl

hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* là một đặc trưng của bệnh ung thư vú, phân độ mô học cao. Chỉ số tương quan OR tăng lên 3,631 (95%CI = 1,95 - 6,74;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến) khi 3 nghiên cứu được loại bỏ (Hình 7).

### ***3.9. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen GSTP1 với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, xét yếu tố giai đoạn bệnh***

7 nghiên cứu có số liệu về giai đoạn bệnh sớm (I-II) hay muộn (III-IV) được sử dụng cho phân tích này. Kết quả (Hình 8) cho thấy chỉ số OR = 2,02 (95%CI = 1,50 - 2,73;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến), hay nói cách khác, tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* là một đặc trưng của bệnh ung thư vú, giai đoạn muộn của bệnh.

### ***3.10. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen GSTP1 với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, xét yếu tố kích thước khối u***

8 nghiên cứu có số liệu về kích thước khối u lớn hay nhỏ được sử dụng cho phân tích này. Kết quả (Hình 9) cho thấy chỉ số OR = 2,09 (95%CI = 1,04 - 4,22;  $P = 0,005$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng ngẫu nhiên). Chỉ số tương quan này tăng lên khi 2 nghiên cứu được loại bỏ (Hình 10), OR = 3,01 (95%CI = 1,87 - 4,85;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến), hay nói cách khác, tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* là một đặc trưng của bệnh ung thư vú, kích thước khối u lớn.

### ***3.11. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen GSTP1 với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, xét yếu tố có hay không sự xuất hiện của hạch bạch huyết***

11 nghiên cứu có số liệu về sự xuất hiện của hạch bạch huyết ở bệnh nhân được sử dụng cho phân tích này. Kết quả (Hình 11) cho thấy chỉ số OR = 2,29 (95%CI = 1,70 - 3,07;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến), hay nói cách khác, tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* là một đặc trưng của bệnh ung thư vú, bệnh nhân có sự xuất hiện của hạch bạch huyết.

### ***3.12. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen GSTP1 với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, xét yếu tố có hay không sự biểu hiện của Her2***

10 nghiên cứu có số liệu về sự biểu hiện của Her2 ở bệnh nhân được sử dụng cho phân tích này. Kết quả (Hình 12) cho thấy chỉ số OR = 2,50 (95%CI = 1,77 - 3,52;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến), hay nói cách khác, tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* là một đặc trưng của bệnh ung thư vú, bệnh nhân có sự biểu hiện của Her2.

### ***3.13. Phân tích tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen GSTP1 với nguy cơ mắc bệnh ung thư vú, xét yếu tố chức năng của protein GSTP1***

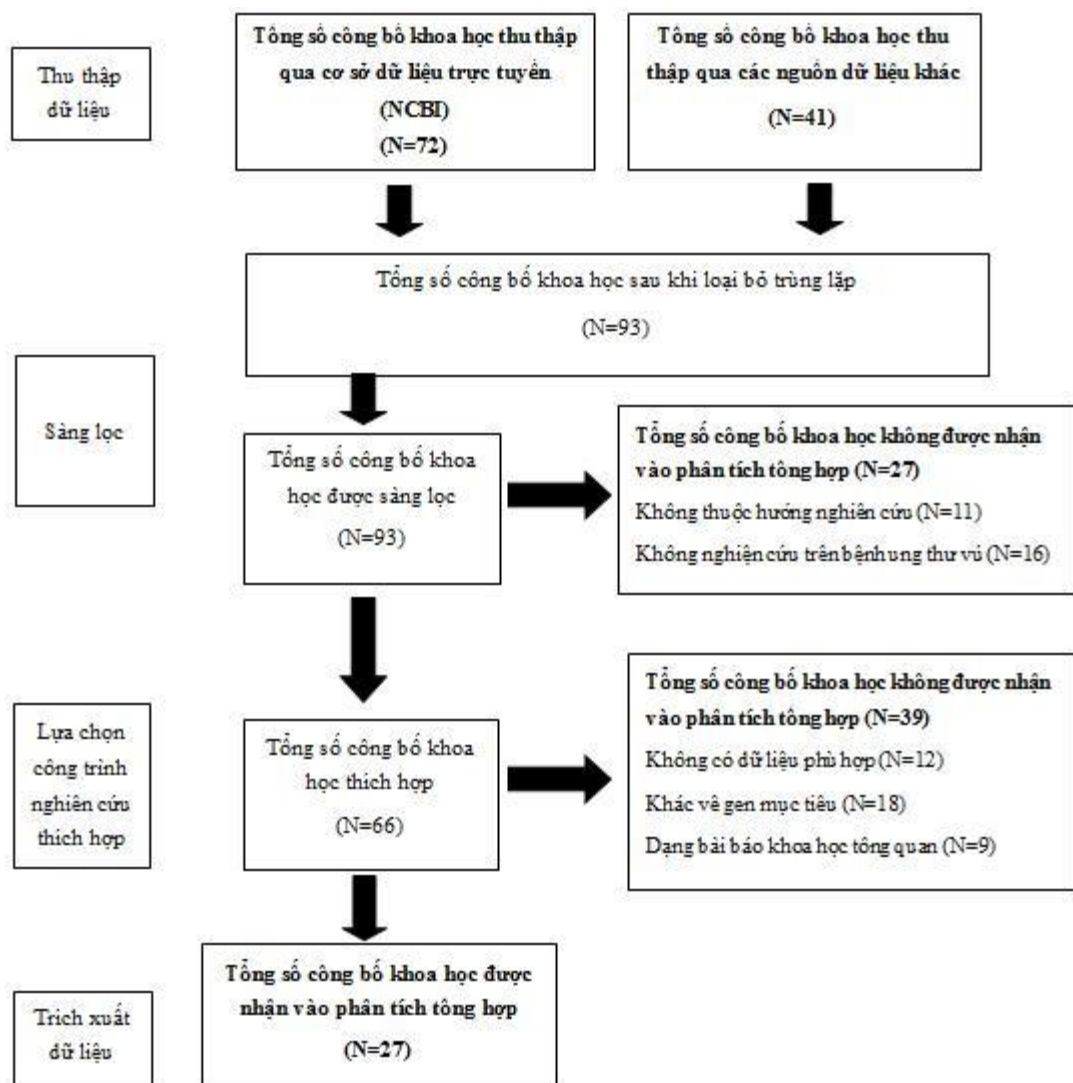
5 nghiên cứu có số liệu về hoạt động chức năng của protein *GSTP1* ở bệnh nhân được sử dụng cho phân tích này. Kết quả (Hình 13) cho thấy chỉ số OR = 18,30 (95%CI = 4,09 - 81,91;  $P < 0,001$ ; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến), hay nói cách khác, tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* là một đặc trưng của bệnh ung thư vú, ở những bệnh nhân này, chức năng của protein *GSTP1* giảm rõ rệt.

Methyl hóa trên gen là một cơ chế epigenetic có tính thuận nghịch; nghĩa là methyl hóa có thể sinh ra và mất đi trong quá trình sống. Gen *GSTP1* lại là gen có chức năng khử độc cho tế bào. Việc gen có thể bị methyl hóa, làm ảnh hưởng đến hoạt động chức năng, gen không được hoặc giảm phiên mã/dịch mã, từ đó, chức năng khử độc cho tế bào có thể giảm. Như vậy, việc áp dụng thử nghiệm phương thức điều trị bằng các thuốc epi-drugs, nhằm khử methyl hóa gen; có thể chọn gen *GSTP1* như một gen tiềm năng để thử nghiệm. Điều này được củng cố thêm qua kết quả phân tích tổng hợp này, nhất là đối với bệnh nhân ở thể nặng. Các bệnh nhân này (có kích thước u lớn, giai đoạn bệnh muộn, phân độ mô học cao, có sự xuất hiện hạch bạch huyết và Her2) là những lựa chọn phù hợp cho thử nghiệm epi-drugs khi *GSTP1* bị methyl hóa vượt mức ở các đảo CpG thuộc vùng promoter của gen.

#### 4. Kết luận

Kết quả phân tích tổng hợp của chúng tôi vừa trình bày trên đây ghi nhận tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* đã làm tăng nguy cơ mắc bệnh ung thư vú lên hơn 10 lần (OR = 10,497; 95%CI = 4,42 - 24,94; P < 0,0001; Mô hình phân tích ảnh hưởng ngẫu nhiên). Mỗi tương quan này tăng khi áp dụng mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến với bộ dữ liệu được chọn lọc, chỉ số nguy cơ lúc này là tăng 13,642 lần (95%CI = 8,23 - 22,60; P < 0,001; Mô hình phân tích ảnh hưởng bất biến). Khi tách các phân hạng, chỉ số tương quan này đều tăng; khẳng định tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* xuất hiện ở cả mẫu mô lẫn mẫu máu, tính chất methyl hóa vượt mức này nên được xác định bằng phương pháp Methylation Specific PCR và các phương pháp khác như Pyrosequencing, MS-MLPA, Methylight và QMSP, so với Bisulfite methylation specific PCR. Methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* xuất hiện cao ở các chủng tộc châu Âu so với châu Á. Xét sự tương quan giữa tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* với các phân hạng phản ánh đặc điểm lâm sàng của bệnh ung thư vú, kết quả phân tích tổng hợp của chúng tôi khẳng định tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* là một đặc trưng của bệnh nhân ung thư vú có phân độ mô học cao, giai đoạn bệnh muộn, kích thước khối u lớn bên cạnh việc có sự xuất hiện hạch bạch huyết và biểu hiện của thụ thể Her2 ở bệnh nhân. Sự methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* cũng chính là nguyên nhân làm giảm hàm lượng và chức năng protein *GSTP1*. Các đặc trưng này gợi ý việc có thể thử nghiệm phương thức điều trị cho các bệnh nhân ung thư vú giai đoạn muộn của bệnh bằng các epi-drugs nhằm giải methyl hóa cho các bệnh nhân này, tăng cơ hội lui bệnh cho các bệnh nhân.





**Hình 1.** Sơ đồ mô tả quy trình chọn lọc công trình nghiên cứu vào bộ dữ liệu phân tích tổng hợp

**Bảng 1**Đặc điểm của bộ dữ liệu 19 nghiên cứu ca-chứng về sự methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1*

Công trình nghiên cứu	Quốc gia	Chủng tộc	Phương pháp	Loại mẫu	Mẫu bệnh ung thư vú			Mẫu chứng			Đặc điểm mẫu chứng
					Mẫu methyl hóa	Mẫu không bị methyl hóa	Tổng mẫu	Mẫu methyl hóa	Mẫu không bị methyl hóa	Tổng mẫu	
Bhat và cộng sự (2017)	Ấn Độ	Châu Á	MSP	Mô	19	32	51	6	45	51	Mô lân cận
Wu và cộng sự (2016)	Trung Quốc	Châu Á	MSP	Mô	22	48	70	0	20	20	Mẫu của người lành
Shakeri, Gharesouran, Fakhrjou, Esfahani, và Ardebili (2016)	Iran	Châu Á	MS-MLPA	Mô	27	48	75	0	10	10	Mẫu của người lành
Thao (2015)	Việt Nam	Châu Á	MSP	Mô	41	54	95	0	20	20	Mẫu của người lành
Hafez và cộng sự (2015)	Ả Rập Saudi	Châu Á	MSP	Mô	89	91	180	0	20	20	Mẫu của người lành
Jung và cộng sự (2013)	Hàn quốc	Châu Á	MS-MLPA	Mô	10	50	60	2	58	60	Mô lân cận
Klajic và cộng sự (2013)	Na uy	Châu Âu	Pyrosequencing	Mô	142	77	219	0	6	6	Mẫu mô của người lành
Sturgeon và cộng sự (2012)	Mỹ	Châu Mỹ	Pyrosequencing	Máu	233	71	304	186	48	234	Mẫu của người lành
Yamamoto và cộng sự (2012)	Nhật bản	Châu Á	MSP	Mô	45	49	94	1	52	53	Mẫu của người lành

Công trình nghiên cứu	Quốc gia	Chủng tộc	Phương pháp	Loại mẫu	Mẫu bệnh ung thư vú			Mẫu chứng			Đặc điểm mẫu chứng
					Mẫu methyl hóa	Mẫu không bị methyl hóa	Tổng mẫu	Mẫu methyl hóa	Mẫu không bị methyl hóa	Tổng mẫu	
Shargh, Hosseini, và Sakizli (2011)	Ả Rập Saudi	Châu Á	BSP	Mô	19	27	46	6	41	47	Mô lân cận
Park và cộng sự (2010)	Hàn quốc	Châu Á	Methylight	Mô	26	79	115	0	30	30	Mẫu của người lành
Matuschek và cộng sự (2010)	Đức	Châu Âu	Methylight	Máu	15	70	85	1	22	23	Mẫu của người lành
Dejeux và cộng sự (2010)	Thụy Điển	Châu Âu	Pyrosequencing	Mô	135	28	163	0	6	6	Mẫu của người lành
Rønneberg và cộng sự (2008)	Ý	Châu Âu	BSP	Mô	57	24	80	0	6	6	Mẫu của người lành
Lee (2007)	Hàn quốc	Châu Á	Nested MSP	Mô	36	73	109	0	15	15	Mẫu của người lành
Hoque và cộng sự (2006)	Senegal	Châu Phi	QMSP	plasma	12	35	47	0	38	38	Mẫu của người lành
Parrella và cộng sự (2003)	Ý	Châu Âu	MSP	Mô	7	47	54	0	10	10	Mẫu của người lành
Jerónimo và cộng sự (2003)	Bồ đào nha	Châu Âu	MSP	Mô	18	9	27	0	12	12	Mẫu của người lành
Müller và cộng sự (2003)	Úc	Châu Úc	Methylight	Serum	9	27	36	1	9	10	Mẫu của người lành

Chú thích: tổng mẫu bệnh: 1910 mẫu (472 mẫu máu và 1438 mẫu mô); tổng mẫu chứng: 671 mẫu (305 mẫu máu và 366 mẫu mô)

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

**Bảng 2**

Đặc điểm của bộ dữ liệu 8 nghiên cứu đoàn hệ về sự methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1*

Công trình nghiên cứu	Quốc gia	Chủng tộc	Phương pháp	Loại mẫu	Mẫu bệnh ung thư vú			Đặc điểm mẫu chứng
					Mẫu methyl hóa	Mẫu không bị methyl hóa	Tổng mẫu	
Saxena và cộng sự (2012)	Ấn Độ	Châu Á	MSP	Tissue	74	141	215	Mô lân cận
Pongtheerat, Pakdeethai, Purisa, Chariyalertsak, và Petmitr (2011)	Thái Lan	Châu Á	MSP	Tissue	11	30	41	Mẫu của người lành
Sharma và cộng sự (2009)	Ấn Độ	Châu Á	MSP	tissue	25	86	101	Mẫu của người lành
Lasabova và cộng sự (2009)	Slovakia	Châu Âu	nested-MSP	tissue	11	34	45	Mẫu của người lành
Sunami và cộng sự (2008)	Mỹ	Châu Mỹ	MSP	Tissue	23	107	130	Mô lân cận
Hoque và cộng sự (2006)	Senegal	Châu Phi	QMSP	Tissue	11	68	79	Mẫu của người lành
Arai và cộng sự (2006)	Nhật bản	Châu Á	MSP	tissue	24	150	174	Mẫu của người lành
Shinozaki và cộng sự (2005)	Mỹ	Châu Mỹ	MSP	Tissue	32	119	151	Mô lân cận

Chú thích: Hoque và cộng sự (2006) thuộc dạng nghiên cứu cắt ngang.

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

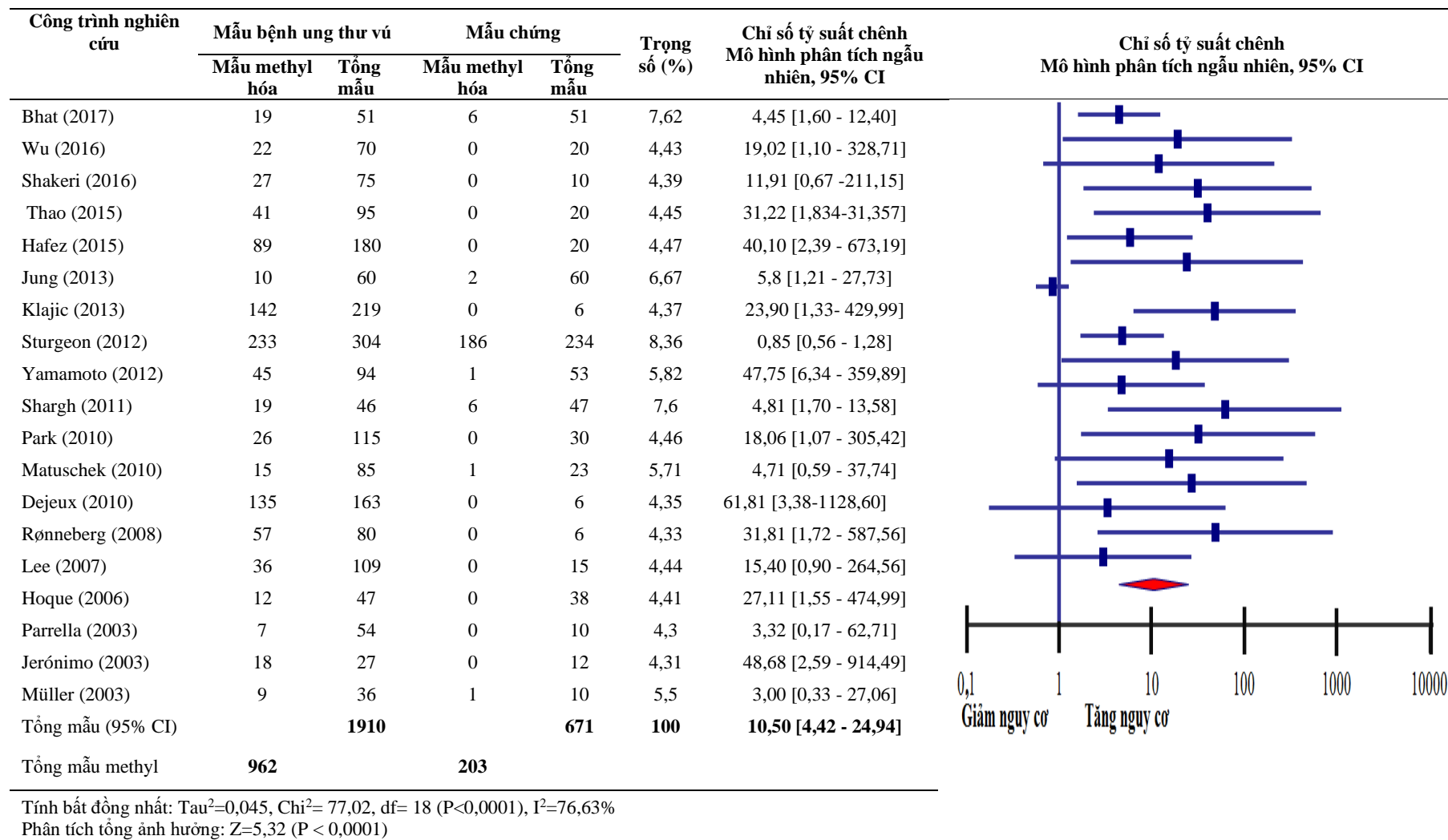
**Bảng 3**

Tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trên bộ dữ liệu 13 nghiên cứu ca-chứng về bệnh ung thư vú

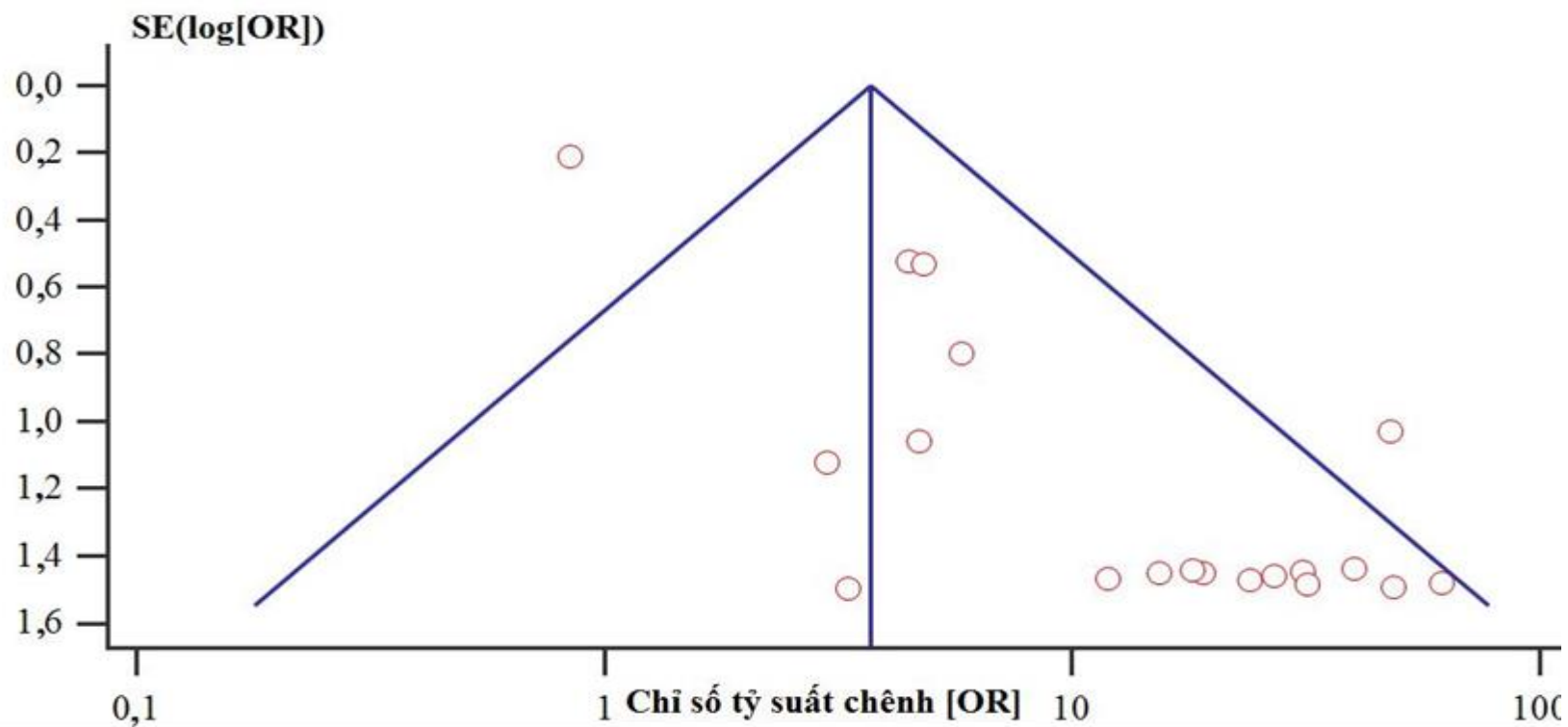
Chỉ số	N	Phân tích ảnh hưởng			Phân tích tính bất đồng nhất		
		OR (95% CI)	Z	P-value	Model	Ph	I <sup>2</sup> (%)
<b>Tổng số</b>	13	<b>13,642 [8,23-22,60]</b>	10,14	< 0,001	F	0,27	17,39
<b>Loại mẫu</b>							
Mẫu mô	12	13,208 [7,90-22,07]	9,86	<0,001	F	0,23	21,45
Mẫu máu	1	27,11 [1,55-474,99]	2,25	0,024	NA	NA	NA
<b>Phương pháp</b>							
MSP	6	16,80 [8,06-34,99]	7,53	<0,001	F	0,12	41,54
BSP	2	6,73 [2,61-17,33]	3,95	<0,001	F	0,22	32,99
Khác*	5	15,72 [5,51-44,91]	5,15	<0,001	F	0,62	0,00
<b>Ethnicity</b>							
Châu Á	8	11,06 [6,36-19,25]	8,50	<0,001	F	0,20	28,19
Châu Âu	4	37,98 [8,76-164,56]	4,86	<0,001	F	0,96	0,00
Châu Phi	1	27,11 [1,55-474,99]	2,25	0,024	NA	NA	NA

Khác\*: Pyrosequencing, MS-MLPA, MethyLight và QMSP.

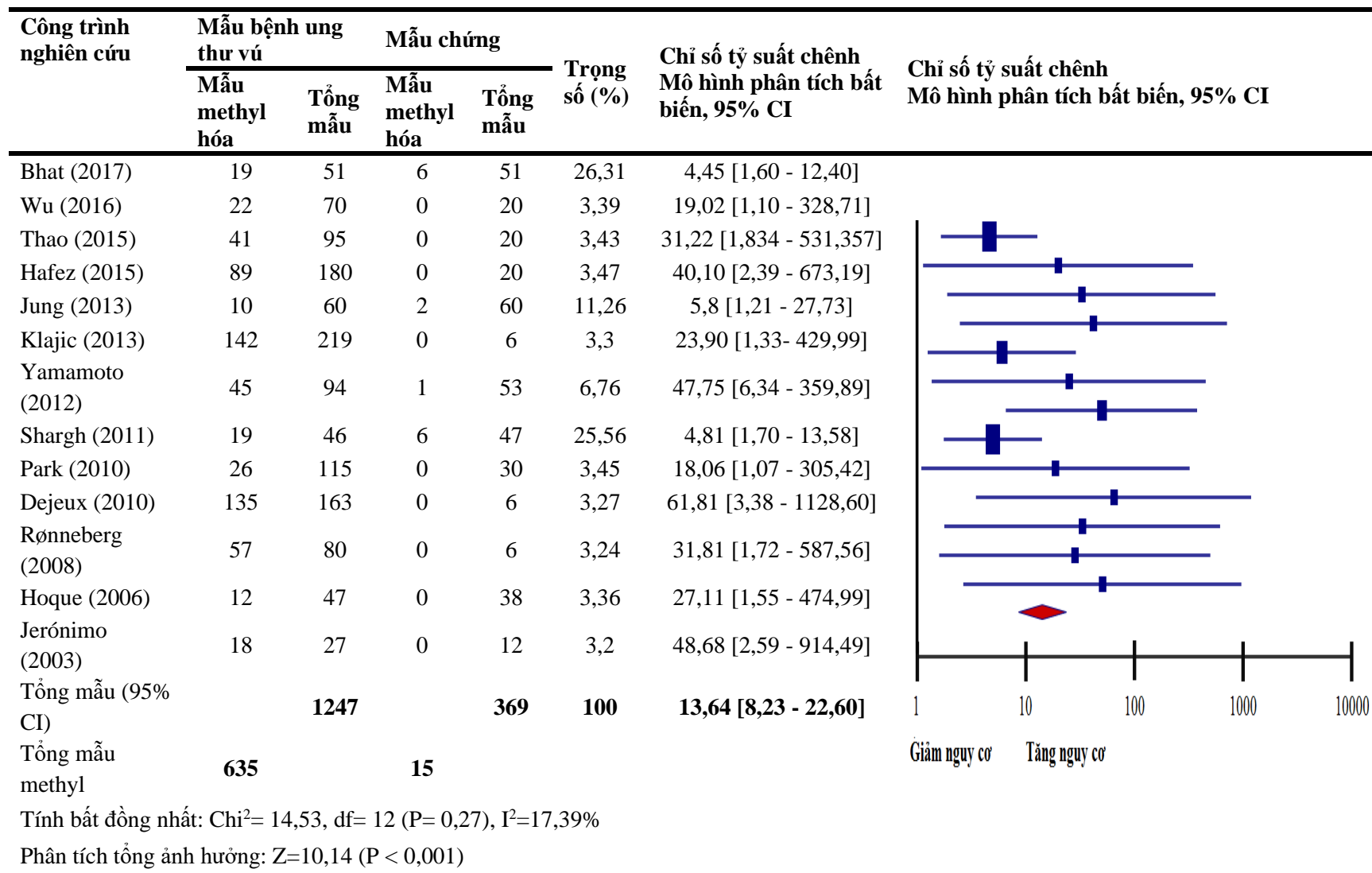
Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu



**Hình 2.** Kết quả phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen GSTP1 trên bộ dữ liệu 19 nghiên cứu ca-chứng về bệnh ung thư vú

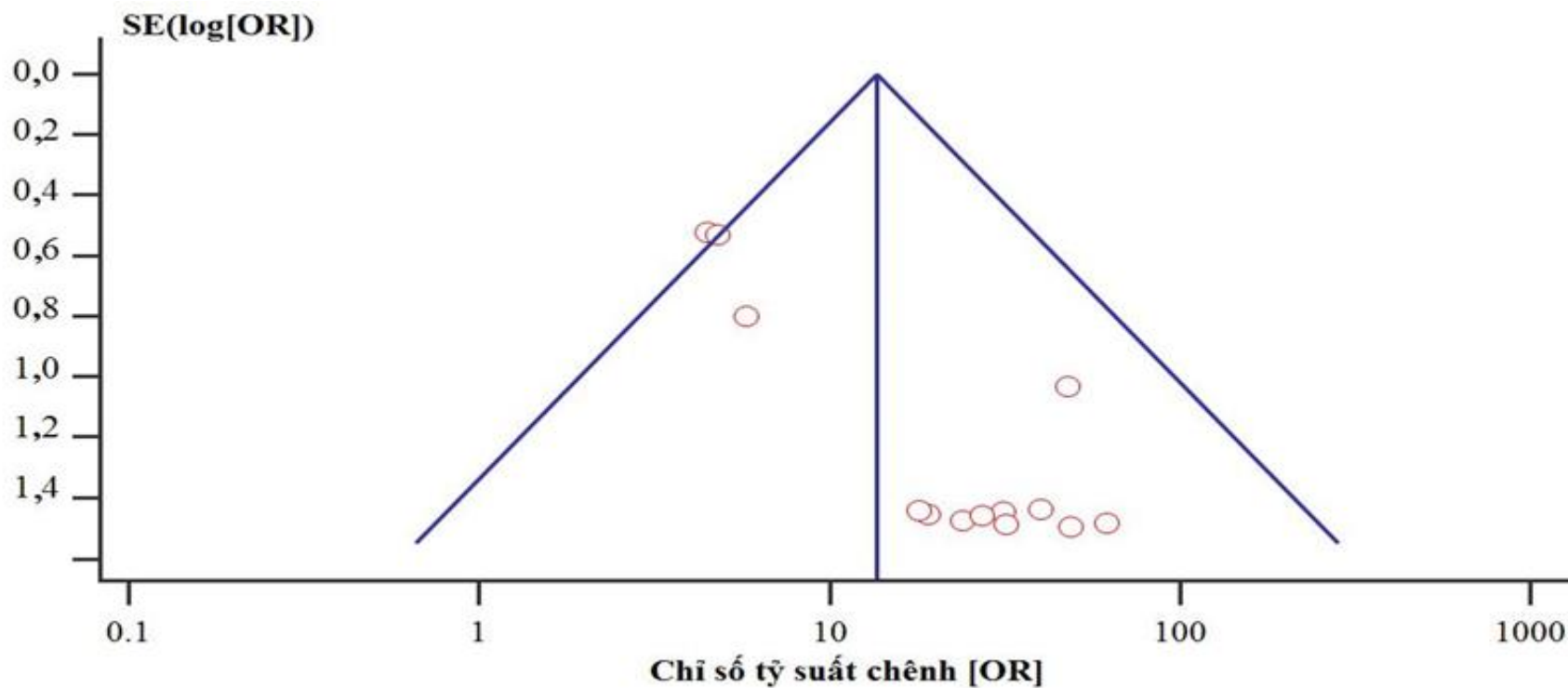


**Hình 3.** Đồ thị “Funnel plot” đánh giá tính thiên vị trên bộ dữ liệu 19 công trình nghiên cứu ca-chứng về bệnh ung thư vú

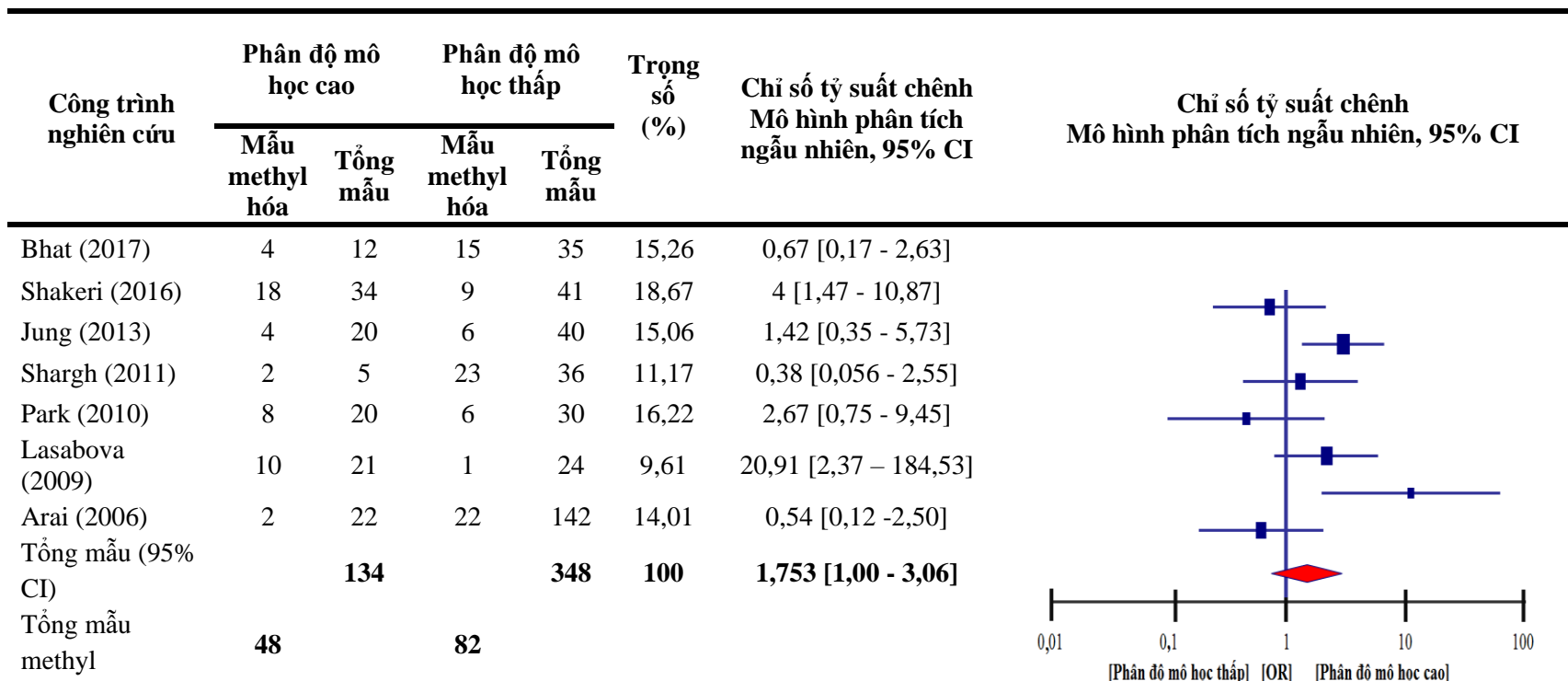


**Hình 4.** Kết quả phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trên bộ dữ liệu 13 nghiên cứu ca-chứng về bệnh ung thư vú





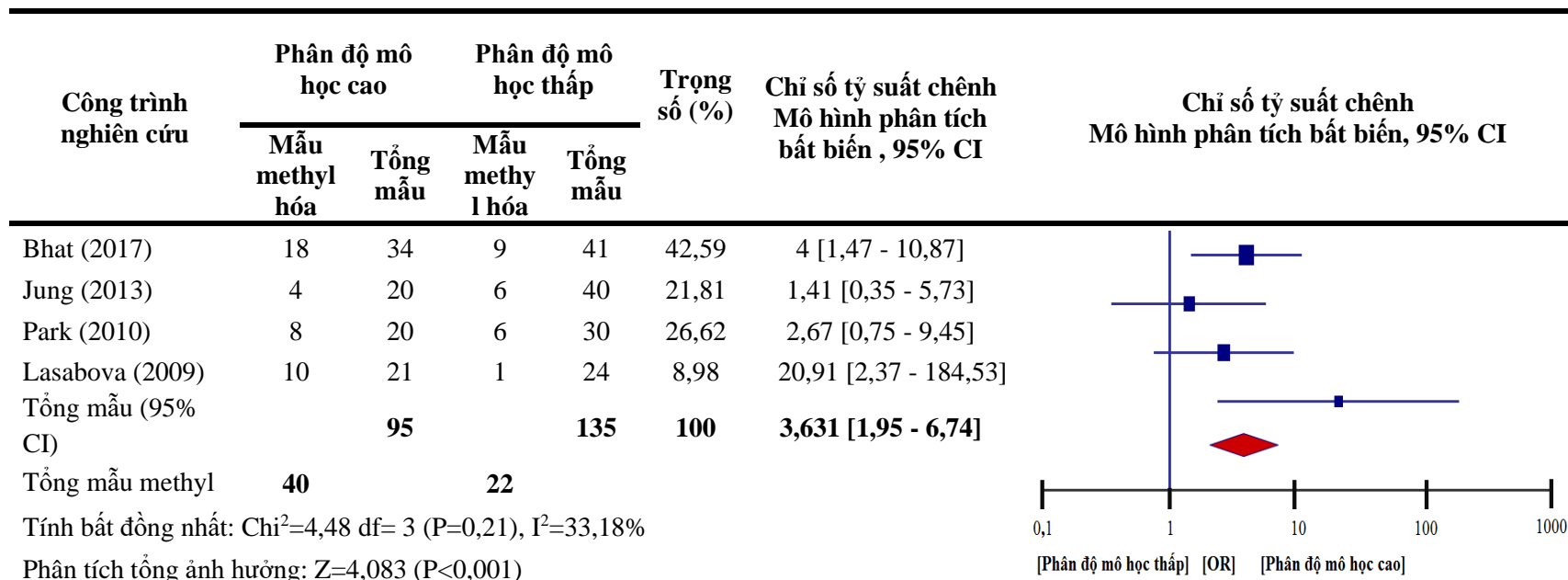
**Hình 5.** Đồ thị “Funnel plot” đánh giá tính thiên vị trên bộ dữ liệu 19 công trình nghiên cứu ca-chứng về bệnh ung thư vú



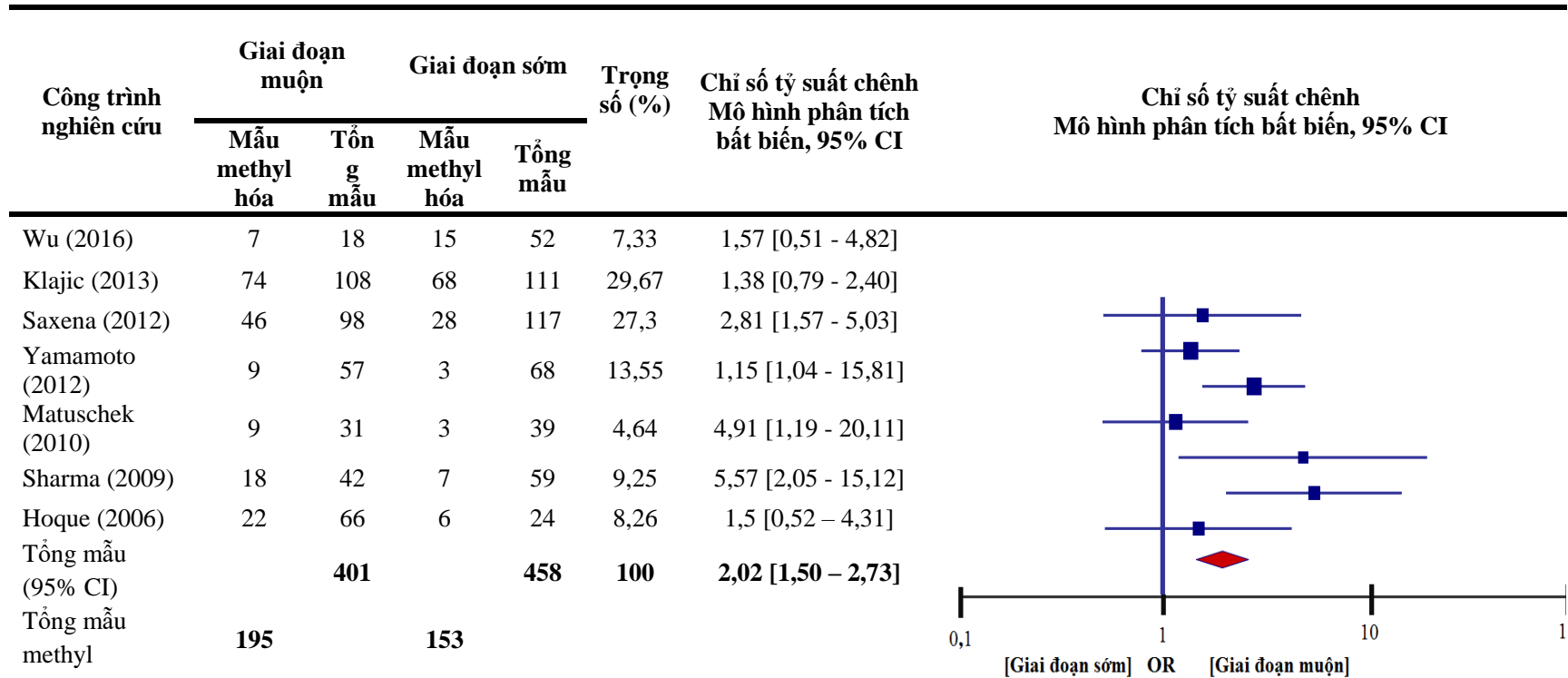
Tính bất đồng nhất:  $Tau^2 = 0,02$   $Chi^2 = 14,50$   $df = 6$  ( $P = 0,02$ ),  $I^2 = 59,37\%$

Phân tích tổng ảnh hưởng:  $Z = 2,60$  ( $P = 0,009$ )

**Hình 6.** Kết quả phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trên bộ dữ liệu 7 nghiên cứu về bệnh ung thư vú, xét yếu tố phân độ mô học (cao và thấp)



**Hình 7.** Kết quả phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trên bộ dữ liệu 4 nghiên cứu về bệnh ung thư vú, xét yếu tố phân độ mô học (cao và thấp)



Tính bất đồng nhất:  $\text{Chi}^2=10,83$  df= 6 (P=0,09),  $I^2=44,59\%$

Phân tích tổng ảnh hưởng:  $Z=4,62$  (P<0,001)

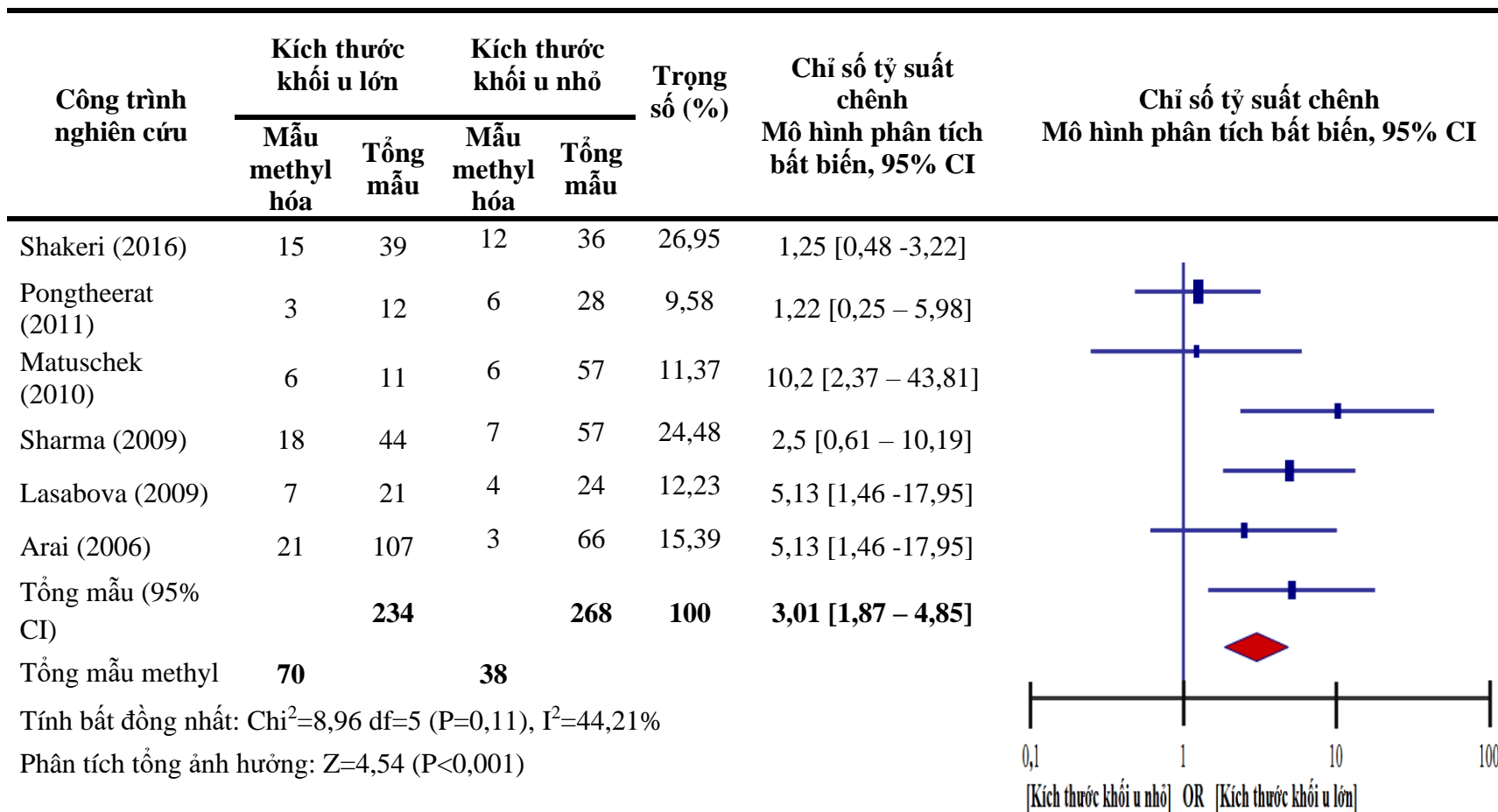
**Hình 8.** Kết quả phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trên bộ dữ liệu 7 nghiên cứu về bệnh ung thư vú, xét yếu tố giai đoạn bệnh (sớm hay muộn)

Công trình nghiên cứu	Kích thước khối u lớn		Kích thước khối u nhỏ		Trọng số (%)	Chỉ số tỷ suất chênh Mô hình phân tích ngẫu nhiên, 95% CI	Chỉ số tỷ suất chênh Mô hình phân tích ngẫu nhiên, 95% CI
	Mẫu methyl hóa	Tổng mẫu	Mẫu methyl hóa	Tổng mẫu			
Wu (2016)	16	52	6	18	12,63	0,89 [0,83 - 2,79]	
Shakeri (2016)	15	39	12	36	14,12	1,25 [0,48 - 3,22]	
Hafez (2015)	40	88	49	92	16,78	0,73 [0,40 - 1,31]	
Pongtheerat (2011)	3	12	6	28	9,63	1,22 [0,25 - 5,98]	
Matuschek (2010)	6	11	6	57	10,44	10,2 [2,37 - 43,81]	
Sharma (2009)	18	44	7	57	13,77	2,5 [0,61 - 10,19]	
Lasabova (2009)	7	21	4	24	10,78	5,13 [1,46 - 17,95]	
Arai (2006)	21	107	3	66	11,84	5,13 [1,46 - 17,95]	
Tổng mẫu (95% CI)		<b>374</b>		<b>378</b>	<b>100</b>	<b>2,09 [1,04 - 4,22]</b>	
Tổng mẫu methyl	<b>126</b>		<b>93</b>				

Tính bất đồng nhất:  $\tau^2 = -0,006$   $\chi^2 = 23,16$   $df = 7$  ( $P = 0,0016$ ),  $I^2 = 69,74\%$

Phân tích tổng ảnh hưởng:  $Z = 2,81$   
( $P = 0,005$ )

**Hình 9.** Kết quả phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trên bộ dữ liệu 8 nghiên cứu về bệnh ung thư vú, xét yếu tố kích thước khối u (lớn hay nhỏ)



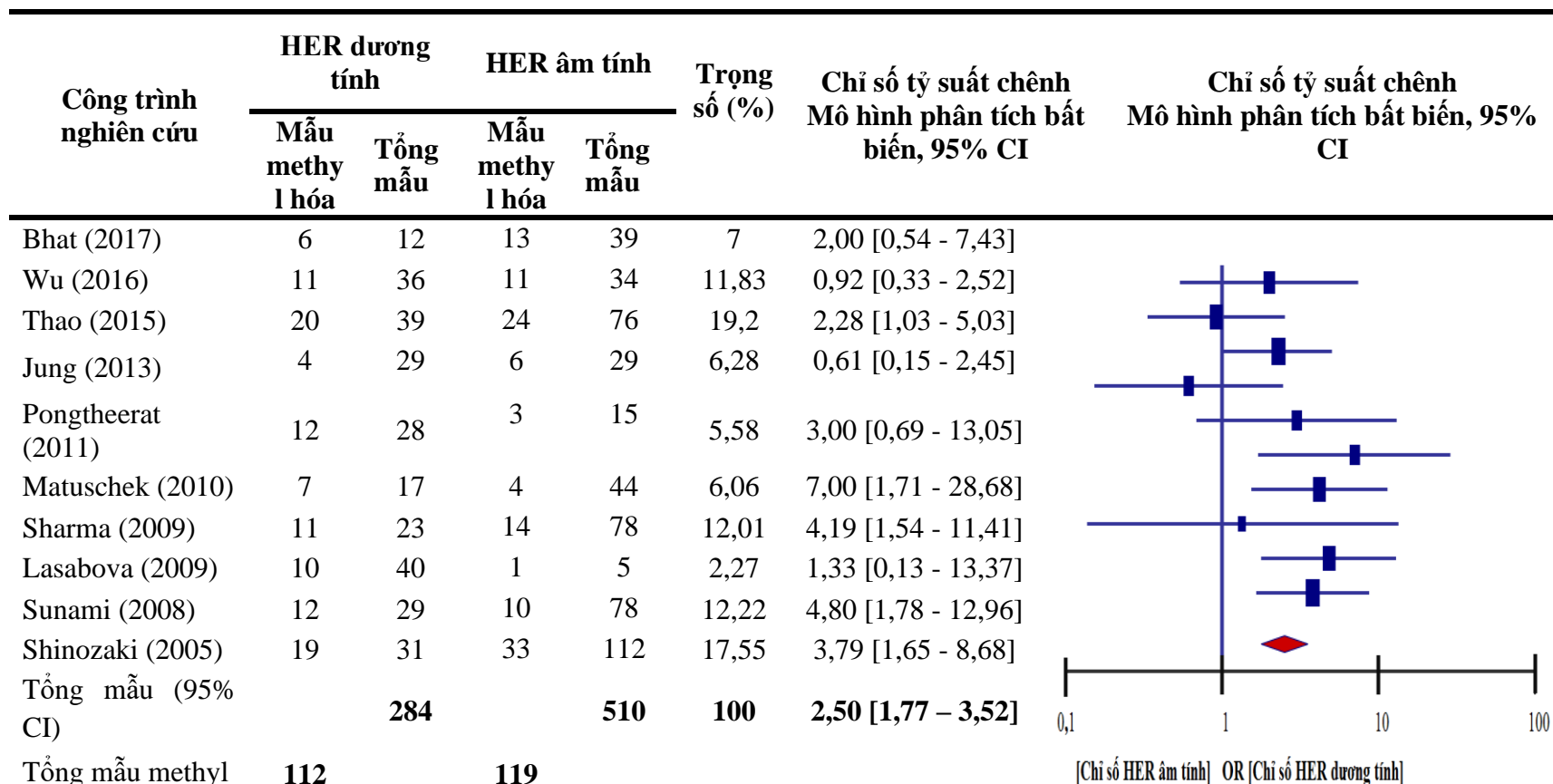
**Hình 10.** Kết quả phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trên bộ dữ liệu 6 nghiên cứu về bệnh ung thư vú, xét yếu tố kích thước khối u (lớn hay nhỏ)

Công trình nghiên cứu	Hạch bạch huyết (+)		Hạch bạch huyết (-)		Trọng số (%)	Chỉ số tỷ suất chênh Mô hình phân tích bất biến, 95% CI	Chỉ số tỷ suất chênh Mô hình phân tích bất biến, 95% CI
	Mẫu methyl hóa	Tổng mẫu	Mẫu methyl hóa	Tổng mẫu			
Wu (2016)	13	37	9	33	8,61	1,44 [0,52 - 4,01]	
Shakeri (2016)	20	43	7	32	8,45	3,10 [1,11 - 8,70]	
Hafez (2015)	41	77	48	103	25,61	1,30 [0,72 - 2,36]	
Jung (2013)	7	29	3	31	4,19	2,97 [0,69 - 12,83]	
Pongtheerat (2011)	7	17	2	21	2,94	6,65 [1,16 - 38,19]	
Matuschek (2010)	10	37	3	32	4,63	3,58 [0,89 - 14,41]	
Sharma (2009)	20	69	5	32	7,6	2,20 [0,74 - 6,53]	
Lasabova (2009)	9	21	2	23	3,15	7,87 [1,45 - 42,61]	
Sunami (2008)	15	54	8	76	10,07	3,27 [1,27 - 8,40]	
Arai (2006)	13	60	11	112	11,73	2,54 [1,06 - 6,09]	
Shinozaki (2005)	22	81	10	70	13,04	2,24 [0,98 - 5,13]	
Tổng mẫu (95% CI)		<b>525</b>		<b>565</b>	<b>100</b>	<b>2,29 [1,70 - 3,07]</b>	
Tổng mẫu methyl	<b>177</b>		<b>108</b>				

Tính bất đồng nhất:  $\text{Chi}^2=9,19$   $\text{df}=10$  ( $P=0,51$ ),  $I^2=0,00\%$

Phân tích tổng ảnh hưởng:  $Z=5,51$  ( $P<0,001$ )

**Hình 11.** Kết quả phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trên bộ dữ liệu 11 nghiên cứu về bệnh ung thư vú, xét yếu tố xuất hiện hạch bạch huyết (có hoặc không)



Tính bất đồng nhất:  $\chi^2=13,91$  df=9 (P=0,12),  $I^2=35,31\%$   
 Phân tích tổng ảnh hưởng:  $Z=5,26$  (P<0,001)

**Hình 12.** Kết quả phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trên bộ dữ liệu 10 nghiên cứu về bệnh ung thư vú, xét yếu tố biểu hiện HER2 (có hoặc không)



Công trình nghiên cứu	GSTP1 giảm		GSTP1 bình thường		Trọng số (%)	Chỉ số tỷ suất chênh Mô hình phân tích bất biến, 95% CI	Chỉ số tỷ suất chênh Mô hình phân tích bất biến, 95% CI
	Mẫu methyl hóa	Tổng mẫu	Mẫu methyl hóa	Tổng mẫu			
Bhat (2017)	12	18	7	33	24,33	7,43 [2,05 - 26,91]	
Wu (2016)	18	23	4	9	14,87	4,5 [0,87 - 23,35]	
Saxena (2012)	67	67	7	148	4,87	2547 [143,35 - 45255,49]	
Lee (2007)	28	39	8	63	38,89	17,5 [6,32 - 48,44]	
Arai, (2006)	15	54	2	44	17,03	8,77 [1,73 - 37,62]	
Tổng mẫu (95% CI)		<b>201</b>		<b>297</b>	<b>100</b>	<b>18,30 [4,09 - 81,91]</b>	
Tổng mẫu methyl	<b>140</b>		<b>28</b>				

Tính bất đồng nhất:  $\tau^2=0,11$   $\chi^2=19,47$   $df=4$  ( $P=0,0006$ ),  $I^2=79,46\%$

Phân tích tổng ảnh hưởng:  $Z=3,80$   
( $P<0,001$ )

**Hình 13.** Kết quả phân tích tính chất methyl hóa vượt mức vùng promoter gen *GSTP1* trên bộ dữ liệu 5 nghiên cứu về bệnh ung thư vú, xét yếu tố tăng hoặc giảm chức năng protein GSTP1

### Tài liệu tham khảo

- Arai, T., Miyoshi, Y., Kim, S. J., Taguchi, T., Tamaki, Y., & Noguchi, S. (2006). Association of GSTP1 CpG islands hypermethylation with poor prognosis in human breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 100(2), 169-176.
- Bhat, A., Masood, A., Wani, K. A., Bhat, Y. A., Nissar, B., Khan, N. S., & Ganai, B. A. (2017). Promoter methylation and gene polymorphism are two independent events in regulation of GSTP1 gene expression. *Tumor Biology*, 39(4), 1-11. doi:10.1177/1010428317697563.
- Dejeux, E., Rønneberg, J. A., Solvang, H., Bukholm, I., Geisler, S., Aas, T., & Tost, J. (2010). DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response. *Molecular Cancer*, 9(1), Article 68.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386.
- Ford, M. E., & Kelly, P. A. (2005). Conceptualizing and categorizing race and ethnicity in health services research. *Health Services Research*, 40(5p2), 1658-1675.
- Globocan. (2012). *Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed*. Retrieved October 10, 2017, from International Agency for Research on Cancer website: [https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/pr223\\_E.pdf](https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/pr223_E.pdf)
- Hafez, M. M., Al-Shabanah, O. A., Al-Rejaie, S. S., Al-Harbi, N. O., Hassan, Z. K., Alsheikh, A., ... Sayed-Ahmed, M. M. (2015). Increased hypermethylation of glutathione S-transferase P1, DNA-binding protein inhibitor, death associated protein kinase and paired box protein-5 genes in triple-negative breast cancer Saudi females. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(2), 541-549.
- Haidich, A. B. (2010). Meta-analysis in medical research. *Hippokratia*, 14(Suppl 1), 29-37.
- Higgins, J. P., Thompson, S. G., Deeks, J. J., & Altman, D. G. (2003). Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ: British Medical Journal*, 327(7414), 557-560.
- Hoque, M. O., Feng, Q., Toure, P., Dem, A., Critchlow, C. W., Hawes, S. E., ... & Yu, M. (2006). Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(26), 4262-4269.
- Hughes, E. G. (1996). Systematic literature review and meta-analysis. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 14(2), 161-169.
- Isgor, Y. G., & Isgor, B. S. (2011). Kinases and glutathione transferases: Selective and sensitive targeting. *Frontiers in Biology*, 6(2), 156-169.

- Jerónimo, C., Costa, I., Martins, M. C., Monteiro, P., Lisboa, S., Palmeira, C., ... Lopes, C. (2003). Detection of gene promoter hypermethylation in fine needle washings from breast lesions. *Clinical Cancer Research*, 9(9), 3413-3417.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 415-428.
- Jung, E. J., Kim, I. S., Lee, E. Y., Kang, J. E., Lee, S. M., Kim, D. C., ... Park, S. T. (2013). Comparison of methylation profiling in cancerous and their corresponding normal tissues from Korean patients with breast cancer. *Annals of Laboratory Medicine*, 33(6), 431-440.
- Klajic, J., Fleischer, T., Dejeux, E., Edvardsen, H., Warnberg, F., Bukholm, I., ... Kristensen, V. N. (2013). Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors. *BMC Cancer*, 13(1), Article 456.
- Lasabova, Z., Tilandyova, P., Kajo, K., Zubor, P., Burjanivova, T., Danko, J., & Plank, L. (2010). Hypermethylation of the GSTP1 promoter region in breast cancer is associated with prognostic clinicopathological parameters. *Neoplasma*, 57(1), 35-40.
- Lee, J. S. (2007). GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. *Virchows Archiv*, 450(6), 637-642.
- Matuschek, C., Bölke, E., Lammering, G., Gerber, P. A., Peiper, M., Budach, W., ... Bojar, H. (2010). Methylated APC and GSTP1 genes in serum DNA correlate with the presence of circulating blood tumor cells and are associated with a more aggressive and advanced breast cancer disease. *European Journal of Medical Research*, 15(7), 277-286.
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., & Prisma Group. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Medicine*, 6(7), Article e1000097.
- Müller, H. M., Widschwendter, A., Fiegl, H., Ivarsson, L., Goebel, G., Perkmann, E., ... Widschwendter, M. (2003). DNA methylation in serum of breast cancer patients. *Cancer Research*, 63(22), 7641-7645.
- Park, S. Y., Kwon, H. J., Lee, H. E., Ryu, H. S., Kim, S. W., Kim, J. H., ... Kang, G. H. (2011). Promoter CpG island hypermethylation during breast cancer progression. *Virchows Archiv*, 458(1), 73-84.
- Parrella, P., Poeta, M. L., Gallo, A. P., Prencipe, M., Scintu, M., Apicella, A., ... Rabitti, C. (2004). Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. *Clinical Cancer Research*, 10(16), 5349-5354.
- Phuong, T. K., Thao, D. T. P., Thuan, L. D., & Thuy, L. H. A. (2016). Sự methyl hóa vượt mức tại đảo CpG thuộc vùng promoter của gen GSTP1 là một đặc tính đặc trưng của bệnh ung thư vú người Việt Nam [The excessive methylation at CpG island in the promoter region of the GSTP1 gene is a characteristic feature of Vietnamese breast cancer]. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 18(3T), 99-104.

- Pongtheerat, T., Pakdeethai, S., Purisa, W., Chariyalertsak, S., & Petmitr, S. (2011). Promoter methylation and genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 gene (GSTP1) in Thai breast-cancer patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12(10), 2731-2734.
- Rønneberg, J. A., Tost, J., Solvang, H. K., Alnaes, G. I., Johansen, F. E., Brendeford, E. M., ... Gabrielsen, O. S. (2008). GSTP1 promoter haplotypes affect DNA methylation levels and promoter activity in breast carcinomas. *Cancer Research*, 68(14), 5562-5571.
- Russo, M. W. (2007). How to review a meta-analysis. *Gastroenterology & Hepatology*, 3(8), 637-642.
- Ryan, R. (2014). *Heterogeneity and subgroup analyses in Cochrane Consumers and Communication Group reviews: Planning the analysis at protocol stage*. Retrieved November 15, 2017, from Cochrane Consumers and Communication Review Group website: <http://cccr.org>
- Saxena, A., Dhillon, V. S., Shahid, M., Khalil, H. S., Rani, M., Das, T. P., ... Shukla, N. K. (2012). GSTP1 methylation and polymorphism increase the risk of breast cancer and the effects of diet and lifestyle in breast cancer patients. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(6), 1097-1103.
- Senior, P. A., & Bhopal, R. (1994). Ethnicity as a variable in epidemiological research. *BMJ: British Medical Journal*, 309(6950), 327-330.
- Shakeri, H., Gharesouran, J., Fakhrijou, A., Esfahani, A., & Ardebili, S. M. M. (2016). DNA methylation assessment as a prognostic factor in invasive breast cancer using methylation-specific multiplex ligation dependent probe amplification. *EXCLI Journal*, 15, 11-20.
- Shargh, S. A., Hosseini, Z. M., & Sakizli, M. (2011). Evaluation of methylation status in glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene promoter in human breast cancer and its relation to tumor grade and stage. *Scientific Research and Essays*, 6(27), 5741-5749.
- Sharma, G., Mirza, S., Yang, Y. H., Parshad, R., Hazrah, P., Gupta, S. D., & Ralhan, R. (2009). Prognostic relevance of promoter hypermethylation of multiple genes in breast cancer patients. *Analytical Cellular Pathology*, 31(6), 487-500.
- Shinozaki, M., Hoon, D. S., Giuliano, A. E., Hansen, N. M., Wang, H. J., Turner, R., & Taback, B. (2005). Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clinical Cancer Research*, 11(6), 2156-2162.
- Sturgeon, S. R., Balasubramanian, R., Schairer, C., Muss, H. B., Ziegler, R. G., & Arcaro, K. F. (2012). Detection of promoter methylation of tumor suppressor genes in serum DNA of breast cancer cases and benign breast disease controls. *Epigenetics*, 7(11), 1258-1267.
- Sunami, E., Shinozaki, M., Sim, M. S., Nguyen, S. L., Vu, A. T., Giuliano, A. E., & Hoon, D. S. (2008). Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. *Breast Cancer Research*, 10(3), Article R46.

- Tang, J., Zhou, Q., Zhao, F., Wei, F., Bai, J., Xie, Y., & Huang, Y. (2015). Association of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 polymorphisms in the breast cancer risk: a meta-analysis in Asian population. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(8), Article 12430.
- Terry, M. B., McDonald, J. A., Wu, H. C., Eng, S., & Santella, R. M. (2016). Epigenetic biomarkers of breast cancer risk: Across the breast cancer prevention continuum. *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer*, 882, 33-68.
- The Nordic Cochrane Centre (Cochrane). (2014). *Review manager*. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre.
- Wang, T., Arifoglu, P., Ronai, Z. E., & Tew, K. D. (2001). Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 20999-21003.
- Wu, L., Shen, Y., Peng, X., Zhang, S., Wang, M., Xu, G., ... Lu, C. (2016). Aberrant promoter methylation of cancer-related genes in human breast cancer. *Oncology Letters*, 12(6), 5145-5155.
- Yamamoto, N., Nakayama, T., Kajita, M., Miyake, T., Iwamoto, T., Kim, S. J., ... Noguchi, S. (2012). Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RAR $\beta$ 2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. *Breast Cancer Research and Treatment*, 132(1), 165-173.