



ARTIGO ORIGINAL

Identification of key genes involved in nasopharyngeal carcinoma[☆]



Xue Jiang, Lichun Feng, Baoqiang Dai, Liping Li e Weiwei Lu*

Cangzhou Central Hospital, Department of Otorhinolaryngology, Cangzhou, Hebei, China

Recebido em 18 de maio de 2016; aceito em 11 de setembro de 2016

Disponível na Internet em 19 de julho de 2017

KEYWORDS

Nasopharyngeal carcinoma;
Differentially expressed genes;
Enrichment analysis;
Regulatory network

Abstract

Introduction: Nasopharyngeal carcinoma is the most common cancer originating from the nasopharynx.

Objective: To study the mechanisms of nasopharyngeal carcinoma, we analyzed GSE12452 microarray data.

Methods: GSE12452 was downloaded from the Gene Expression Omnibus database and included 31 nasopharyngeal carcinoma samples and 10 normal nasopharyngeal tissue samples. The differentially expressed genes were screened by ANOVA in the PGS package. Using the BiNGO plugin in Cytoscape and pathway enrichment analysis in the PGS package, functional and pathway enrichment analyses were performed separately to predict potential functions of the differentially expressed genes. Furthermore, Transcription factor-differentially expressed gene pairs were searched, and then the transcription factor-differentially expressed gene regulatory network was visualized using Cytoscape software.

Results: A total of 487 genes were screened as differentially expressed genes between the nasopharyngeal carcinoma samples and the normal nasopharyngeal tissue samples. Enrichment analysis indicated that PTGS2 was involved in the regulation of biological process and small cell lung cancer. ZIC2 and OVOL1 may function in nasopharyngeal carcinoma through targeting significantly up-regulated genes (such as PTGS2, FN1, CXCL9 and CXCL10) in the Transcription factor-differentially expressed gene regulatory network (e.g., ZIC2→PTGS2 and OVOL1→CXCL10).

Conclusion: PTGS2, FN1, CXCL9, CXCL10, ZIC2 and OVOL1 might play roles in nasopharyngeal carcinoma.

© 2016 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.09.003>

[☆] Como citar este artigo: Jiang X, Feng L, Dai B, Li L, Lu W. Identification of key genes involved in nasopharyngeal carcinoma. Braz J Otorhinolaryngol. 2017;83:670–6.

* Autor para correspondência.

E-mail: 13933985866@163.com (W. Lu).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

PALAVRAS-CHAVE

Carcinoma nasofaríngeo;
Genes diferencialmente expressos;
Análise de enriquecimento;
Rede reguladora

Identificação dos principais genes envolvidos no carcinoma nasofaríngeo**Resumo**

Introdução: O carcinoma nasofaríngeo é o câncer mais comum originário da nasofaringe.

Objetivo: Estudar os mecanismos do câncer de nasofaringe; dados do microarray GSE12452 foram analisados.

Método: GSE12452 foi obtido da base de dados Gene Expression Omnibus e inclui 31 amostras de carcinoma nasofaríngeo e 10 amostras de tecido nasofaríngeo normal. Os genes diferencialmente expressos foram analisados por ANOVA no kit PGS. Usando o plugin BiNGO no Cytoscape e análise de enriquecimento da via no kit PGS, análises de enriquecimento funcional e da via foram realizadas separadamente para prever as potenciais funções dos genes diferencialmente expressos. Além disso, os pares Fator de Transcrição - genes diferencialmente expressos foram pesquisados e em seguida a sua rede reguladora foi visualizada usando o programa Cytoscape.

Resultados: Um total de 487 genes foram analisados como genes diferencialmente expressos entre as amostras de carcinoma nasofaríngeo e amostras de tecido nasofaríngeo normal. A análise de enriquecimento indicou que PTGS2 estava envolvido na regulação do processo biológico e câncer pulmonar de pequenas células. ZIC2 e OVOL1 podem funcionar no carcinoma nasofaríngeo almejando-se de maneira significativa os genes suprarregulados (como o PTGS2, FN1, CXCL9 e CXCL10) na rede reguladora de fator de transcrição - genes diferencialmente expressos (p.ex., ZIC2→PTGS2 e OVOL1→CXCL10).

Conclusão: PTGS2, FN1, CXCL9, CXCL10, ZIC2 e OVOL1 podem desempenhar alguns papéis no carcinoma de nasofaringe.

© 2016 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

O câncer de nasofaringe mais comum, o carcinoma nasofaríngeo (CNF), causou 86.700 novos casos e 50.800 mortes no mundo em 2012.¹ O CNF é extremamente comum no sudeste da Ásia e no sul da China, com mais de 50.000 novos casos por ano,^{2,3} e pode ser induzido por vários fatores, como hereditariedade, fatores virais e influências ambientais.⁴ A maioria dos casos de CNF está correlacionada à infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), um herpesvírus B-linfotrópico que tem propriedades de transformação de crescimento.⁵ Assim, o estudo dos mecanismos do CNF é de grande importância.

Muitos estudos que investigam os mecanismos de CNF foram publicados. Existem vários genes (como C-myc, AKT1, p53, MDM2, LMP1 e PTEN) implicados na patogênese do CNF, porque eles são muitas vezes amplificados ou alterados em pacientes com essa doença.⁶⁻⁸ O Disabled 2 (DAB2) é frequentemente infrarregulado por hipermetilação do promotor e pode ser um supressor tumoral potencial no CNF.⁹ Estudos anteriores mostram que o potencial gene supressor tumoral de uma desintegrina e metaloprotease com motivos trombospondina 9 tipo 1 (ADAMTS9) está estreitamente relacionado com metástases para linfonodos e pode inibir o crescimento do tumor por meio da supressão da angiogênese no CNF.^{10,11} O complexo 1 da proteína relacionada com o adaptador (AP-1) do fator de transcrição (TF) ativado pelo antígeno nuclear 1 codificado pelo EBV (EBNA 1) pode ter como alvo o fator-1 α induzido por hipóxia, interleucina 8 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que promove a formação de microtúbulos em células do CNF.¹² O TF *forkhead* Box M1 (FOXM1) está envolvido no desenvolvimento do tumor e o vetor do adenovírus AdFOXM1shRNA, que expressa *short hairpin* RNA específico de FOXM1, pode

ser usado como intervenção terapêutica para o tratamento de pacientes com CNF.¹³ Por infrarregulação da expressão da proteína secretada, ácida e rica em cisteína (SPARC), a região de determinação do sexo do TF Y-box 5 (SOX-5) atua na progressão do CNF e pode ser usado como um preditor para o prognóstico sombrio de CNF.^{14,15} Embora esses estudos tenham sido feitos para investigar CNF, seus mecanismos ainda permanecem obscuros.

Em 2006, Sengupta et al. analisaram a expressão de todos os genes de EBV latentes entre amostras de CNF e amostras de epitélio da nasofaringe normais e obtiveram um painel de genes diferencialmente expressos (GDE).³ Com os mesmos dados empregados por Sengupta et al.,³ não só foram selecionados os GDE, mas também foi feita uma análise bioinformática abrangente para identificar os principais genes associados ao CNF. As funções potenciais dos GDE foram previstas por análises funcionais e da via de enriquecimento. Além disso, uma rede reguladora TF-GDE foi construída para investigar as relações de regulação entre TF e GDE.

Método**Dados de microarray**

Os dados do perfil de expressão de GSE12452 depositados por Sengupta et al.³ foram obtidos do banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), que se baseou na plataforma do GPL570 [HG-U133.Plus.2] *Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array*. Os espécimes incluíram 31 amostras de CNF e 10 amostras de tecido de nasofaringe normais coletadas

de pacientes de Taiwan, com consentimento informado. As amostras foram ressecadas, rapidamente congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido.

Triagem para GDE

Para o conjunto de dados GSE12452, o método *Robust MultiArray Averaging* (RMA) no kit Partek® Genomics Suite™ (PGS) (<http://www.partek.com/>)¹⁶ foi usado para pré-processamento, inclusive o ajuste de fundo, a normalização de quantil e a transformação log₂. Após a correção do lote, foi obtida a matriz de expressão processada. O método Anova (análise de variância) no kit PGS¹⁶ foi usado para comparar os GDE entre as amostras de CNF e as de tecidos normais da nasofaringe. Os valores de *p* obtidos foram ajustados para testes múltiplos com o método de Benjamini & Hochberg.¹⁷ Genes com *fold-change* (FC) > 2 e valor *p* ajustado < 0,05 foram selecionados como GDE.

Análise funcional e de via de enriquecimento

Os termos de ontologia do gene (OG) podem ser usados para descrever os três tipos de produtos de genes, inclusive o processo biológico no qual eles estão implicados, sua função molecular e localização subcelular.¹⁸ A *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) é um banco de dados composto por genes e suas informações funcionais.¹⁹ Com o *plug-in* BiNGO²⁰, em Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>), e análise de enriquecimento da via no kit PGS,¹⁶ análises de enriquecimento da via GO e KEGG foram feitas separadamente para GDE entre as amostras de CNF e amostras de tecidos normais da nasofaringe. O valor *p* ajustado < 0,05 foi usado como o critério de corte.

Construção da rede reguladora TF-GDE

O pacote de *software* Genomatix Suite (<https://www.genomatix.de/>)²¹ foi usado para prever fatores de transcrição (TF). Em resumo, a ferramenta *Gene2Promoter* (<http://www.genomatix.de/>)²² foi usada para extrair seqüências promotoras de GDE correspondentes a partir da base de dados Genomatix. Em seguida, os TF foram analisados com a ferramenta *MatInspector*.²¹ TF com um valor de *p* < 0,05 e FC > 2 foram selecionados como TF expressos diferencialmente, e, em seguida, os seus correspondentes pares de TF-GDE foram analisados. Finalmente, a rede reguladora TF-GDE foi visualizada com o *software* Cytoscape.²³

Resultados

Análise de GDE

Após o GSE12452 ser baixado, os dados de perfil de expressão foram pré-processados e, em seguida, os GDE foram identificados por Anova com o kit PGS. O gráfico volcano para GDE, separadamente, é mostrado na [figura 1](#). Foram selecionados 487 genes como GDE entre as amostras de CNF e as amostras de tecidos nasofaríngeos normais, inclusive 122 genes suprarregulados e 365 infrarregulados. O número de genes infrarregulados foi maior do que o número de

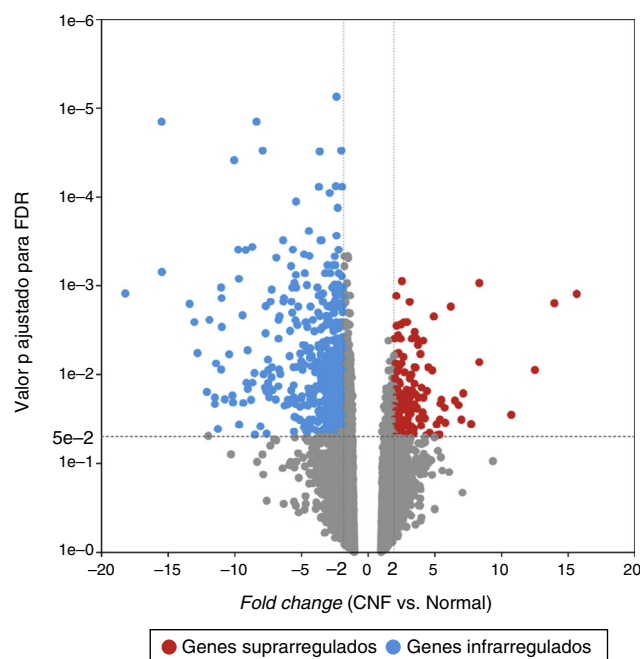


Figura 1 Gráfico volcano para genes diferencialmente expressos (GDE) (FC > 2 e valor *p* ajustado < 0,05). O eixo horizontal representa o *fold change* e o eixo vertical representa o valor *p* ajustado. Os círculos vermelhos e azuis indicam genes suprarregulados e infrarregulados, respectivamente.

genes suprarregulados. No *heat map* da análise hierárquica de agrupamento para os GDE, as amostras do CNF e as amostras de tecidos normais da nasofaringe eram claramente divididas em dois grupos ([fig. 2](#)).

Análise de enriquecimento funcional e de via

As dez principais funções de GO para os genes suprarregulados incluíram a organização de fibrilas de colágeno (*p* = 1,44E-06), a organização de matriz extracelular (*p* = 6,73E-08) e regulação do processo biológico (*p* = 3,35E-06, que envolveu prostaglandina-endoperóxido sintase 2,

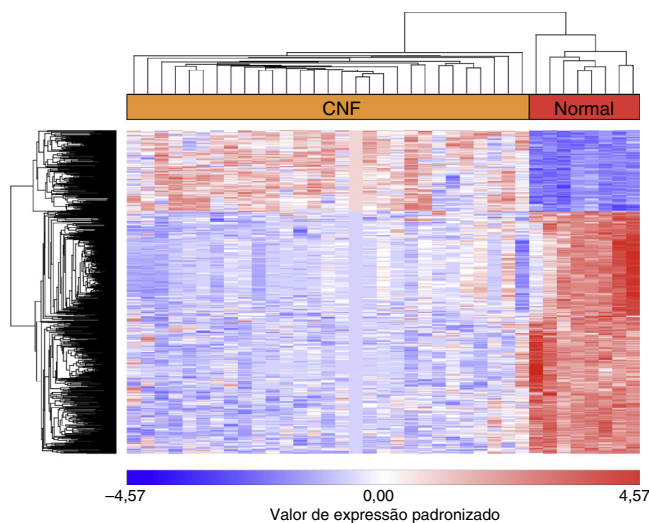


Figura 2 *Heat map* da análise do agrupamento hierárquico para genes diferencialmente expressos (GDE).

Tabela 1 Função enriquecida de GO e as vias de KEGG para os genes suprarregulados e infrarregulados. (A) As dez principais funções do GO enriquecidas para os genes suprarregulados. (B) As dez principais funções do GO enriquecidas para os genes infrarregulados. (C) As dez principais vias de KEGG enriquecidas para os genes suprarregulados. (D) As dez principais vias de KEGG enriquecidas para os genes infrarregulados

Termo	Descrição	Número do gene	Símbolo do gene	Valor p
A				
30198	Organização da matriz extracelular	9	COL18A1, COL4A2.....	6,73E-08
30199	Organização colágeno fibrila	5	COL3A1, COL1A2.....	1,44E-06
43062	Organização da estrutura extracelular	9	COL3A1, COL1A2.....	2,85E-06
50789	Regulação do processo biológico	72	PTGS2, EZH2.....	3,35E-06
32964	Processo biossintético de colágeno	3	COL1A1, COL5A1, COL5A1	3,91E-06
43588	Desenvolvimento da pele	5	COL5A2, COL5A1.....	4,77E-06
65007	Regulação biológica	74	SLC9A7, PTGS2.....	6,95E-06
6950	Resposta ao estresse	30	C3AR1, PTGS2.....	8,65E-06
9611	Resposta à formação de feridas	15	BMP2, TNFSF4.....	1,03E-05
6954	Resposta inflamatória	11	CXCL9, PLA2G7.....	2,15E-05
B				
10880	Regulação da liberação de íon de cálcio sequestrado em citosol pelo retículo sarcoplasmático	4	CALM3, FKBP1B.....	2,32E-07
30855	Diferenciação de células epiteliais	13	EREG, ELF3.....	1,30E-06
60316	Regulação positiva da atividade do canal de liberação de cálcio sensível a rianodina	3	CALM2, CALM1, CALM1	3,21E-06
60314	Regulação atividade do canal de liberação de cálcio sensível a rianodina	4	FKBP1B, CALM2.....	9,20E-06
60315	Regulação negativa de atividade do canal de liberação de cálcio sensível a rianodina	3	CALM3, CALM2, CALM1	1,27E-05
7017	Processo baseado no microtúbulo	14	TPPP3, DNAH9.....	1,92E-05
8544	Desenvolvimento da epiderme	12	CST6, EREG.....	2,15E-05
1539	Motilidade ciliar ou flagelar	4	TEKT2, DNAH2.....	3,02E-05
7018	Movimento baseado no microtúbulo	9	DNAH2, DNAH7.....	3,72E-05
30216	Diferenciação de ceratinócito	7	PPL, CNFN.....	3,90E-05
C				
	Interação ECM-receptor	11	COL1A1, COL1A2.....	9,01E-10
	Digestão e absorção da proteína	10	COL1A2, COL3A1.....	9,05E-09
	Amebíase	10	CD14, COL1A2.....	1,25E-07
	Câncer de pulmão de pequenas células	8	PTGS2, FN1.....	3,10E-06
	Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	5	C3AR1, FCGR2A.....	2,66E-04
	Diferenciação de osteoclastos	6	SOCS1, TYK2.....	2,23E-03
	Via de sinalização do receptor Toll-like	5	CXCL9, NFKBIA.....	4,54E-03
	Reprodução do DNA	3	PCNA, MCM2.....	6,36E-03
	Leishmaniose	4	FCGR2A, PTGS2.....	6,94E-03
	Ciclo celular	5	CCNE2, SMC1A.....	9,53E-03
D				
	Metabolismo do fármaco-citocromo P450	9	ADH1C, ADH7.....	3,02E-07
	Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450	8	ADH7, ALDH1A3.....	8,48E-06
	Metabolismo da tirosina	5	ALDH3A1, ALDH3B2.....	1,69E-04
	Glicólise/gliconeogênese	6	ADH7, ALDH1A3.....	2,51E-04
	Metabolismo da histidina	4	ALDH3A1, ALDH3A2.....	5,74E-04
	Metabolismo de beta-alanina	4	ALDH3A2, ALDH3B2.....	6,59E-04
	Metabolismo de fenilalanina	3	ALDH1A3, ALDH3A1, ALDH3B2	1,88E-03
	Junção de oclusão	7	CGN, CLDN7.....	2,40E-03
	Fototransdução	3	CALM1, CALM2, CALM3	7,52E-03
	Metabolismo do retinol	4	DHRS9, SDR16C5.....	1,03E-02

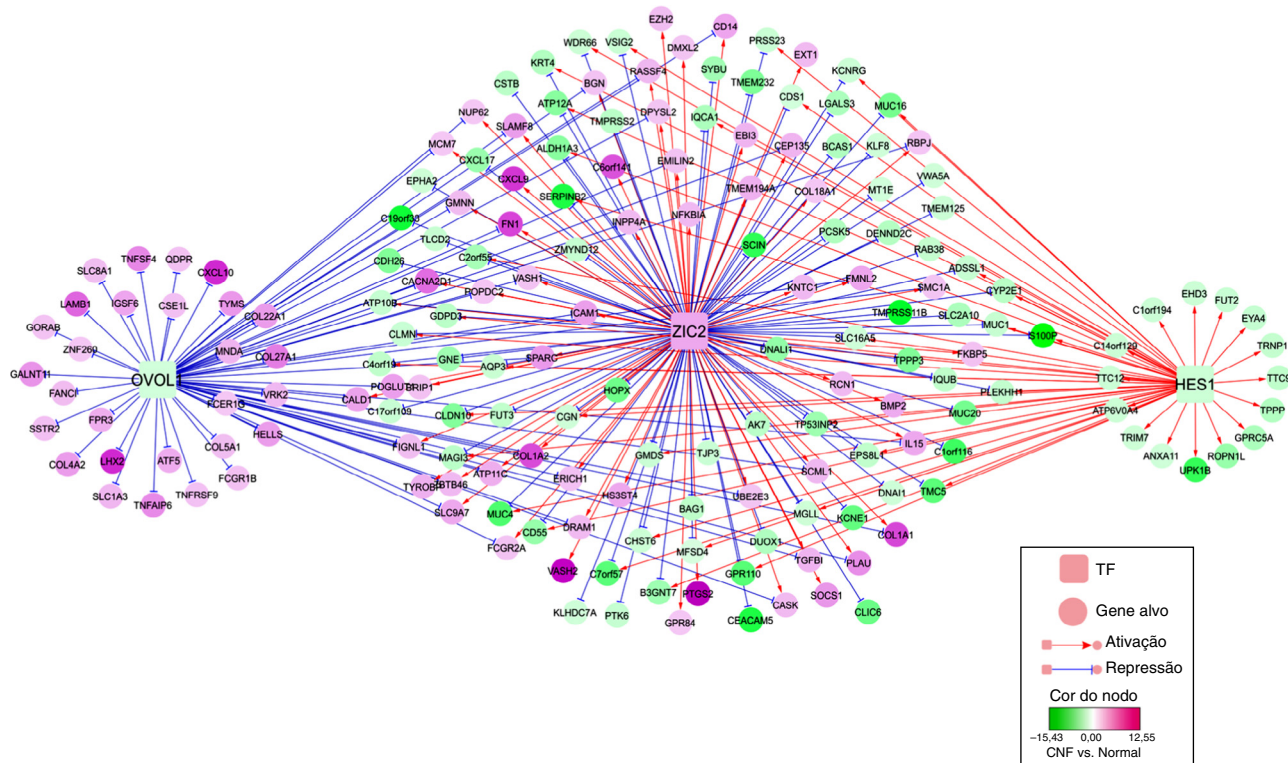


Figura 3 Rede reguladora de fatores de transcrição (TF, como ZIC2, OVOL e HES1) e seus genes diferencialmente expressos almeçados (GDE).

PTGS2) (tabela 1A). As vias KEGG enriquecidas para genes suprarregulados estão listadas na tabela 1 C e incluíram amebiose ($p = 1,25E-07$), interação ECM-receptor ($p = 9,01E-10$) e câncer de pulmão de pequenas células ($p = 3,10E-06$, que envolveu PTGS2).

Da mesma maneira, análises de enriquecimento funcionais e de via foram feitas para os genes infrarregulados. Como pode ser visto na tabela 1B, as funções que incluem a regulação da liberação do íon de cálcio sequestrado para o citosol por retículo sarcoplasmático ($p = 2,32E-07$), diferenciação de células epiteliais ($p = 1,30E-06$) e regulação positiva de atividade do canal de liberação de cálcio sensível a rianodina ($p = 3,21E-06$) foram enriquecidas. As vias enriquecidas incluíram citocromo P450 do metabolismo do fármaco ($p = 3,02E-07$), metabolismo de xenobióticos por citocromo P450 ($p = 8,48E-06$) e metabolismo da tirosina ($p = 1,69E-04$) (tabela 1D).

Análise da rede reguladora TF-GDE

Com o pacote *Genomatix Software Suite*, os TF foram previstos para 122 genes suprarregulados e 365 genes infrarregulados. Havia TF suprarregulados que almejavam genes suprarregulados ou infrarregulados, bem como TF infrarregulados que almejavam genes suprarregulados e infrarregulados. No entanto, apenas TF que tiveram como alvo tanto genes suprarregulados como infrarregulados foram selecionados. A rede reguladora de TF-GDE dos TF (membro da família Zic 2, ZIC2; tipo ovo 1, OVOL1; e o *hairly/enhancer of split 1*, HES1) e seus GDE alvo são mostrados na figura 3. Em particular, PTGS2 significativamente suprarregulado, fibronectina (FN1) e quimiocinas (CXC motif) que ligam 9 (CXCL9)

foram almeçados e ativados por ZIC2. No entanto, quimiocina significativamente suprarregulada (C-X-C motif) que liga 10 (CXCL10) foi almeçada e suprimida por OVOL1.

Discussão

Neste estudo, foram selecionados 487 genes como amostras GDE entre amostras de CNF e amostras de tecidos nasofaríngeos normais, inclusive 122 genes suprarregulados e 365 infrarregulados. Havia muitas funções enriquecidas para os GDE, como a organização de matriz extracelular e organização da estrutura extracelular. PTGS2, FN1, CXCL9 e CXCL10 eram genes significativamente suprarregulados, envolvidos na rede reguladora TF-DEG, e podem funcionar no CNF através de ZIC2 ou OVOL1 (p.ex., ZIC2 → PTGS2 e OVOL1 → CXCL10).

A análise de enriquecimento indicou que PTGS2 estava envolvido na regulação do processo biológico e câncer de pulmão de pequenas células. Como um gene a jusante envolvido na via de NF- κ B, PTGS2 também é chamado de ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Sabe-se que COX2 pode regular células cancerosas do tipo estaminais das células de CNF e promover as suas características. Além disso, o partenólideo pode funcionar na quimioterapia dirigida por meio da via do NF- κ B/COX2.²⁴ Com base em PCR e análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, o polimorfismo -765 G> do promotor funcional C do COX2 pode ser relacionado a risco e progressão neoplásica de CNF.²⁵ Os resultados de imunohistoquímica e avaliação semiquantitativa mostram que a expressão de COX-2 aumenta à medida que o epitélio da nasofaringe evolui de normal a displásico e,

em seguida, para CNF, indica que COX-2 promove o desenvolvimento de CNF.^{26,27} Isso sugere que PTGS2 pode estar associado ao CNF.

Sabe-se que FN1 contribui para a tumorigênese por meio da promoção do crescimento e migração de células tumorais, bem como do aumento da resistência à terapia.^{28,29} O FN1 suprarregulado correlaciona-se com a transição epitelial para mesenquimatosa (TEM) e contribui para a metástase de células tumorais; pode, portanto, ser usado como um potencial marcador de diagnóstico e alvo terapêutico de CNF.³⁰ Com base no sistema de arranjo de suspensão múltipla, um estudo anterior descobriu que a expressão de CXCL9 é significativamente suprarregulada em pacientes com CNF e carcinoma espinocelular da cavidade oral.^{31,32} A PCR quantitativa em tempo real e a imuno-histoquímica sugeriram que CXCL9 suprarregulado está relacionado com agressividade do CNF e um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima indicou que seu nível sérico pode ser um indicador de prognóstico valioso.³³ Os genes ZIC, que consistem em cinco domínios de dedo de zinco Cys2His2, codificam fatores de transcrição de dedos de zinco.³⁴ Entre os membros da família, ZIC2 medeia a expressão específica de tecido do receptor da dopamina D1 acoplado à proteína G.³⁵ A expressão de ZIC2 é suprarregulada em diversos tumores malignos, inclusive sarcoma sinovial, meduloblastoma pediátrica e cânceres do endométrio.^{36–38} Portanto, os níveis de FN1, CXCL9 e ZIC2 podem estar correlacionados com o CNF. Na rede reguladora TF-DEG, descobrimos que ZIC2 almejou e ativou FN1, CXCL9 e PTGS2, indica que ZIC2 pode também funcionar em CNF e regular FN1, CXCL9 e PTGS2.

Relata-se que os TF OVOL1 e OVOL2 desempenham papéis cruciais na indução da transição de mesenquimatosa para epitelial (TME) em vários tipos de cânceres humanos.³⁹ Como um membro da família quimioquina CXC, CXCL10 liga-se ao seu receptor CXCR3 para exercer funções biológicas em doenças infecciosas, disfunção imune, inflamação crônica, desenvolvimento de tumores e metástases.⁴⁰ A quimiocina CXC negativa para ELR CXCL10 pode atenuar a angiogênese e suprimir tumores.⁴¹ A sobre-expressão de CXCL10 e CXCR3 desempenha papéis essenciais em cânceres avançados, tais como carcinoma de células basais,⁴² linfoma de células B,⁴³ mieloma múltiplo⁴⁴ e carcinoma do ovário.⁴⁵ As citocinas inflamatórias que incluem CXCL10, proteína inibidora de macrófago 1 (MIP1) e interleucina 1 alfa são sobre-expressadas em células malignas de CNF, que podem promover o infiltrado de leucócitos.⁴⁶ Esses resultados sugerem que OVOL1 e CXCL10 podem estar correlacionados com CNF. Na rede reguladora TF-DEG, também descobrimos que OVOL1 tinha como alvo e reprimia CXCL10, sugere que OVOL1 pode também desempenhar um papel na mediação do CNF por CXCL10.

Conclusão

Foram usados os dados do perfil de expressão de GSE12452 baixados da GEO para estudar os mecanismos de CNF. Foram selecionados 487 genes como GDE entre as amostras de CNF e as de tecidos normais da nasofaringe. Vários genes (PTGS2, FN1, CXCL9, CXCL10, ZIC2 e OVOL1) podem desempenhar papéis no CNF e também podem ser usados para a terapia

alvo de CNF na prática clínica. Entretanto, uma validação experimental adicional ainda é necessária para desvendar seus mecanismos de ação no CNF.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:87–108.
2. Chang ET, Adami H-O. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2006;15:1765–77.
3. Sengupta S, Den Boon JA, Chen I-H, Newton MA, Dahl DB, Chen M, et al. Genome-wide expression profiling reveals EBV-associated inhibition of MHC class I expression in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2006;66:7999–8006.
4. Tsao SW, Yip YL, Tsang CM, Pang PS, Lau VMY, Zhang G, et al. Etiological factors of nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol.* 2014;50:330–8.
5. Tay JK, Chan SH, Lim CM, Siow CH, Goh HL, Loh KS. The role of Epstein-Barr virus DNA load and serology as screening tools for nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2016;155:274–80.
6. Dawson CW, Port RJ, Young LS. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). In: *Seminars in cancer biology.* Elsevier; 2012.
7. Jiang Q, Zhang Y, Zhao M, Li Q, Chen R, Long X, et al. miR-16 induction after CDK4 knockdown is mediated by c-Myc suppression and inhibits cell growth as well as sensitizes nasopharyngeal carcinoma cells to chemotherapy. *Tumor Biol.* 2016;37:2425–33.
8. Zhang X, Chen X, Zhai Y, Cui Y, Cao P, Zhang H, et al. Combined effects of genetic variants of the PTEN, AKT1, MDM 2 and p53 genes on the risk of nasopharyngeal carcinoma. *PLoS ONE.* 2014;9:e92135.
9. Tong JH, Ng DC, Chau SL, So KK, Leung PP, Lee TL, et al. Putative tumour-suppressor gene DAB2 is frequently down regulated by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer.* 2010;10:253.
10. Lung HL, Lo PHY, Xie D, Apte SS, Cheung AKL, Cheng Y, et al. Characterization of a novel epigenetically-silenced, growth-suppressive gene, ADAMTS9, and its association with lymph node metastases in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 2008;123:401–8.
11. Lo PHY, Lung HL, Cheung AKL, Apte SS, Chan KW, Kwong FM, et al. Extracellular protease ADAMTS9 suppresses esophageal and nasopharyngeal carcinoma tumor formation by inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 2010;70:5567–76.
12. O'Neil JD, Owen TJ, Wood VH, Date KL, Valentine R, Chukwuma MB, et al. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 modulates the AP-1 transcription factor pathway in nasopharyngeal carcinoma cells and enhances angiogenesis in vitro. *J Gen Virol.* 2008;89:2833–42.
13. Chen H, Yang C, Yu L, Xie L, Hu J, Zeng L, et al. Adenovirus-mediated RNA interference targeting FOXM1 transcription factor suppresses cell proliferation and tumor growth of nasopharyngeal carcinoma. *J Gene Med.* 2012;14:231–40.
14. Huang DY, Lin YT, Jan PS, Hwang YC, Liang ST, Peng Y, et al. Transcription factor SOX-5 enhances nasopharyngeal carcinoma progression by down-regulating SPARC gene expression. *J Pathol.* 2008;214:445–55.

15. Wang HY, Li YY, Shao Q, Hou JH, Wang F, Cai MB, et al. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with nasopharyngeal carcinoma metastasis and poor prognosis. *J Transl Med.* 2012;10:10–7.
16. Maiti S. Comprehensive assessment of CNV calling algorithms: a family based study involving monozygotic twins discordant for schizophrenia; 2012.
17. Haynes W. Benjamini–Hochberg method. In: *Encyclopedia of systems biology.* Springer; 2013. p. 78.
18. Consortium GO. Gene ontology consortium: going forward. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D1049–56.
19. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 2015, gkv1070.
20. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics.* 2005;21:3448–9.
21. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* 2005;21:2933–42.
22. Scherf M, Klingenhoff A, Werner T. Highly specific localization of promoter regions in large genomic sequences by PromoterInspector: a novel context analysis approach. *J Mol Biol.* 2000;297:599–606.
23. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics.* 2011;27:431–2.
24. Liao K, Xia B, Zhuang Q-Y, Hou M-J, Zhang Y-J, Luo B, et al. Parthenolide inhibits cancer stem-like side population of nasopharyngeal carcinoma cells via suppression of the NF- κ B/COX-2 pathway. *Theranostics.* 2015;5:302.
25. Ben Nasr H, Chahed K, Bouaouina N, Chouchane L. PTGS2 (COX-2)—765 G>C functional promoter polymorphism and its association with risk and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2009;36:193–200.
26. Tan KB, Putti TC. Cyclooxygenase 2 expression in nasopharyngeal carcinoma: immunohistochemical findings and potential implications. *J Clin Pathol.* 2005;58:535–8.
27. Shi D, Xiao X, Tian Y, Qin L, Xie F, Sun R, et al. Activating enhancer-binding protein-2 α induces cyclooxygenase-2 expression and promotes nasopharyngeal carcinoma growth. *Oncotarget.* 2015;6:5005.
28. Jia D, Entersz I, Butler C, Foty RA. Fibronectin matrix-mediated cohesion suppresses invasion of prostate cancer cells. *BMC Cancer.* 2012;12:1.
29. Bae YK, Kim A, Kim MK, Choi JE, Kang SH, Lee SJ. Fibronectin expression in carcinoma cells correlates with tumor aggressiveness and poor clinical outcome in patients with invasive breast cancer. *Hum Pathol.* 2013;44:2028–37.
30. Ma LJ, Lee SW, Lin LC, Chen TJ, Chang IW, Hsu HP, et al. Fibronectin overexpression is associated with latent membrane protein 1 expression and has independent prognostic value for nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biol.* 2014;35:1703–12.
31. Chang KP, Chang YT, Liao CT, Yen TC, Chen IH, Chang YL, et al. Prognostic cytokine markers in peripheral blood for oral cavity squamous cell carcinoma identified by multiplexed immunobead-based profiling. *Clin Chim Acta.* 2011;412:980–7.
32. Chang KP, Wu CC, Chen HC, Chen SJ, Peng PH, Tsang NM, et al. Identification of candidate nasopharyngeal carcinoma serum biomarkers by cancer cell secretome and tissue transcriptome analysis: potential usage of cystatin A for predicting nodal stage and poor prognosis. *Proteomics.* 2010;10:2644–60.
33. Hsin LJ, Kao HK, Chen IH, Tsang NM, Hsu CL, Liu SC, et al. Serum CXCL9 levels are associated with tumor progression and treatment outcome in patients with nasopharyngeal carcinoma. *PLoS ONE.* 2013;8:e80052.
34. Grinberg I, Millen K. The ZIC gene family in development and disease. *Clin Genet.* 2005;67:290–6.
35. Yang Y, Hwang CK, Junn E, Lee G, Mouradian MM. ZIC2 and Sp3 repress Sp1-induced activation of the human D1A dopamine receptor gene. *J Biol Chem.* 2000;275:38863–9.
36. Bidus MA, Risinger JI, Chandramouli GV, Dainty LA, Litzi TJ, Berchuck A, et al. Prediction of lymph node metastasis in patients with endometrioid endometrial cancer using expression microarray. *Clin Cancer Res.* 2006;12:83–8.
37. Pfister S, Schlaeger C, Mendrzyk F, Wittmann A, Benner A, Kulozik A, et al. Array-based profiling of reference-independent methylation status (aPRIMES) identifies frequent promoter methylation and consecutive downregulation of ZIC2 in pediatric medulloblastoma. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:e51.
38. Fernebro J, Francis P, Edén P, Borg Å, Panagopoulos I, Mertens F, et al. Gene expression profiles relate to SS18/SSX fusion type in synovial sarcoma. *Int J Cancer.* 2006;118:1165–72.
39. Roca H, Hernandez J, Weidner S, McEachin RC, Fuller D, Sud S, et al. Transcription factors OVOL1 and OVOL2 induce the mesenchymal to epithelial transition in human cancer. *PLoS ONE.* 2013;8:e76773.
40. Liu M, Guo S, Stiles JK. The emerging role of CXCL10 in cancer. *Oncol Lett.* 2011;2:583–9 [review].
41. Persano L, Crescenzi M, Indraccolo S. Anti-angiogenic gene therapy of cancer: current status and future prospects. *Mol Aspects Med.* 2007;28:87–114.
42. Lo BKK, Yu M, Zloty D, Cowan B, Shapiro J, McElwee KJ. CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. *Am J Pathol.* 2010;176:2435–46.
43. Ansell SM, Maurer MJ, Ziesmer SC, Slager SL, Habermann TM, Link BK, et al. Elevated pretreatment serum levels of interferon-inducible protein-10 (CXCL10) predict disease relapse and prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Am J Hematol.* 2012;87:865–9.
44. Pellegrino A, Antonaci F, Russo F, Merchionne F, Ribatti D, Vacca A, et al. CXCR3-binding chemokines in multiple myeloma. *Cancer Lett.* 2004;207:221–7.
45. Furuya M, Suyama T, Usui H, Kasuya Y, Nishiyama M, Tanaka N, et al. Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. *Hum Pathol.* 2007;38:1676–87.
46. Teichmann M, Meyer B, Beck A, Niedobitek G. Expression of the interferon-inducible chemokine IP-10 (CXCL10), a chemokine with proposed anti-neoplastic functions, in Hodgkin lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol.* 2005;206:68–75.