

Detection of Serum Free DNA Hypermethylation in Surgically Resected Adenocarcinoma of the Lung

Purpose: Aberrant DNA methylation patterns have been commonly associated with human cancers. We have investigated the frequency of DNA hypermethylation in promoter regions from adenocarcinomas of the lung and then attempted to detect the same epigenetic changes from patient serum samples. **Materials and Methods:** We collected tissues from 72 cases of lung adenocarcinomas. The cancer and normal lung tissues were tested for DNA hypermethylation using methylation-specific PCR (MSP). The genes investigated were *DAPK*, *RAR β P2* and *p16*. We selected 12 patients where promoter hypermethylation was present for all three genes and four patients where hypermethylation was not seen for any of the three genes. Serum-free DNA was extracted and was tested for promoter hypermethylation. The status of serum-free DNA methylation was analyzed; the hypermethylation status was compared to clinical variables and cancer outcomes. **Results:** DNA hypermethylation was observed in 32% of samples for *DAPK*, 63% of samples for *RAR β P2* and 83% of samples for *p16* from the cancer tissues. Among the 12 matched serum samples where the primary tumor showed hypermethylation in all three gene promoter regions, we were able to detect five incidences of serum DNA hypermethylation in four patients. The four patients had TNM stage II or higher disease. None of the patients with stage I disease showed serum-free DNA hypermethylation. **Conclusion:** Aberrant promoter hypermethylation was frequently observed in surgically resected adenocarcinoma of the lung. Concurrent serum-free DNA hypermethylation was detected in 34% of patients where the primary tumor showed hypermethylation in all three gene promoter regions. The findings suggest that the serum-free DNA methylation status might be used as a potential target for the diagnosis of lung cancer. However, the low sensitivity should be improved for use in a clinical application. (J Lung Cancer 2008;7(2):65 – 70)

Key Words: Lung cancer, Adenocarcinoma, Hypermethylation, Epigenetics, Serum DNA

Sun Jung Park, M.S.^{1,2}
Young Tae Kim, M.D., Ph.D.^{1,2,3}
Ju-Yeon Park, M.S.^{1,2}
Hyun Cho Wi, M.S.^{1,2}
Chang Hyun Kang, M.D., Ph.D.³
Sook-Whan Sung, M.D., Ph.D.³
and Joo Hyun Kim, M.D., Ph.D.³

¹Cancer Research Institute, ²Transplantation Research Institute, Seoul National University College of Medicine, ³Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Received: December 1, 2008

Accepted: December 4, 2008

Address for correspondence

Young Tae Kim, M.D., Ph.D.
Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, 101 Daehang-ro, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Tel: 82-2-2072-3161
Fax: 82-2-765-7117
E-mail: ytkim@snu.ac.kr

This paper was partially supported by a grant No. 04-2003-011-0 from the Seoul National University Hospital Research Fund and by the National R&D Program Grant of the Ministry of Science and Technology (R13-2002-025-03002-0).

서 론

폐암은 전세계적으로 가장 사망률이 높은 암으로써 우리나라에서도 암사망률 1위인 치명적인 암이다(1). 폐암의 치료로는 수술이 가장 효과적인 방법이지만 근치적 수술이 가능하였던 환자 중 병기가 상대적으로 높은 환자의 경우에는 상당수에서 폐암이 재발하고 결국 사망에 이르게 된다. 따라서 조기 진단을 하여 초기에 폐암을 수술하고자 하는 노력이 경주되고 있고 많은 연구자들이 폐암을 조기에 진단하거나 폐암의 예후를 예측하는 분자생물학적인 인자

를 찾고자 연구를 하고 있다. 특히 최근에는 많은 중앙 환자의 혈액에서 중앙세포에서 혈중으로 배출된 DNA를 검출할 수 있다는 보고들이 나오고 있어 주목받고 있다(2). 이러한 중앙기원 DNA를 검출할 수 있으면 폐암의 조기진단은 물론 예후 예측, 치료방침 결정 등 폐암 치료에 획기적인 전기를 마련할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구팀에서는 비소세포 폐암의 조직에서 *p16^{INK4a}*, retinoic acid receptor β -promoter (*RAR β P2*), death-associated protein kinase (*DAPK*), glutathione-S-transferase P1 (*GSTP1*), O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (*MGMT*)

등의 암억제 유전자의 프로모터의 메틸화로 유전자가 비활성되어 있는 경우가 흔하고 이러한 메틸화가 폐암의 예후에 일부 관여함을 규명한 바 있다(3,4). 이 연구에서는 폐암 환자의 혈액에서 폐암 조직에 존재하는 암억제 유전자의 프로모터 메틸화가 검출되는지 여부를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 환자 혈액 채취 및 DNA 추출

2000년 12월부터 2004년 4월까지 서울대학교병원 흉부외과에서 수술을 시행받은 653명의 비소세포폐암 환자 중 폐선암 조직형이면서 신선 동결 폐암 조직이 잘 보관되어 있으면서 유전자 검사에 동의하였고 신선 동결 암조직이 있는 72명의 환자를 대상으로 하였다. 연구 계획은 서울대학교 의과대학/서울대학교병원 의학연구윤리심의위원회에서 승인되었다(IRB No. C-0505-149-014). 암조직과 정상 조직에서 p16, RAR β P2, DAPK 프로모터 메틸화 여부를 검사한 후 세가지 유전자 모두 메틸화가 있던 환자와 세 유전자 모두 메틸화가 없었던 환자의 혈청 유전자 연구를 시행하였다.

혈액은 채혈 후 팔콘 튜브(falcon tube)에 보관하여 4°C에서 응혈이 일어나도록 한 후 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액인 혈청을 분리하여 -80°C에서 보관하였다.

2) DNA 메틸화 검사

신선동결한 폐암 및 정상 조직 DNA를 QIAmp Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였다. 조직 DNA 1 μ g을 제한효소(*HindIII*; Intron Biotechnology, Sungnam, Korea)로 처리 후, CpGenome DNA modification Kit (Intergen, Purchase, NY, USA)을 이용하여 bisulfite modification을 시행하였다. Methylation-specific PCR (MSP)은 Table 1과 같은 프라이머를 사용하여 Qiagen HotStart Master Mix

Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 hot start법으로 35회 시행하였다.

혈청 1 ml를 이용하여 QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 판매자의 사용방법에 따라 혈청 유리 DNA를 추출하고 30 μ l로 elution하였다. 혈청 유리 DNA 15 μ l를 MethylEasy™ DNA Bisulphite Modification kit (Human Genetic Signatures, NSW, Australia)를 이용하여 bisulfite modification 하고 35 μ l로 elution하였다. MSP는 2단계를 걸친 nested PCR 방법을 통하여 시행하였다. Nested PCR의 첫단계 PCR은 5 μ l의 modified DNA를 이용하여 35회, 두번째 PCR은 20회 중첩반응시켰다. 1X PCR buffer (Qiagen), dNTPs (1.25 mM), primers (final concentration, 0.6 μ M each per reaction), 1 unit의 HotStarTaq (Qiagen), 그리고 bisulfite-modified DNA를 포함하는 PCR 혼합물의 최종 부피가 25 μ l가 되도록 하여 PCR을 시행한 후 각 PCR 산물을 2% agarose gel에서 전기 영동하였고, ethidium bromide 염색법으로 UV 광 아래에서 관찰하였다 (Fig. 1).

3) 임상양상과 혈청 유전자 메틸화 비교

환자의 연령, 성별, 흡연력, 폐암병기 등 임상상과 혈청 유전자 메틸화 여부를 조사하였고 재발 및 생존 등 예후와의 관련성을 조사 분석하였다. 통계분석은 SPSS version 12.0을 이용하였다.

결 과

1) 암조직 DNA 메틸화

29명이 남자환자였고 43명이 여자 환자였으며 평균 연령은 59세(38~85)였다. 10명의 환자는 수술 3개월 전까지 흡연을 하였고, 20명의 환자는 과거 흡연력이 있었으며, 나머지 42명은 흡연력이 없었다. 수술 전 항암화학치료는 7명에서 시행하였으며, 65명에서 폐엽절제수술, 6명에서 전폐절

Table 1. Summary of Primer Sequences, Annealing Temperatures and PCR Product Sizes Used for MSP

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
p16	M: TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC U: TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	M: GACCCCGAACC CGACCGTAA U: CAACCCCAAACCACACCATAA	62 60	150 151
RAR β P2	M: TCGAGAACGCGAGCGATTTCG U: TTGAGAATGTGAGTGATTTGA	M: GACCAATCCAACCGAAACGA U: AACCAATCCAACCAAAACAA	59 55	146 146
DAPK	M: GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC U: GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	M: CCCTCCCAAACGCCGA U: CAAATCCCTCCCAAACACCAA	57 55	98 106

bp: base pair, DAPK: death-associated protein kinase, RAR β P2: retinoic acid receptor β -promoter

제수술, 그리고 1명에서 폐쇄기절제수술을 시행하였다. 모든 환자에서 종격동 림프절제술을 시행하였으며 15명의 환자는 수술 후 보조 항암화학치료, 17명은 수술 후 보조 방사선치료, 그리고 1명은 수술 후 항암화학 및 방사선치료를 시행 받았다.

폐암 조직의 DNA 메틸화는 p16 유전자에서 83% (60/72), RAR β P2는 63% (45/72), DAPK 32% (23/72)에서 발견 되었다.

이 중 p16, RAR β P2, DAPK의 세 개 유전자가 모두 메틸화되어 있는 21명과 세 유전자 모두 메틸화가 없었던 8명 중 혈청이 보관되어 있는 12명, 4명의 환자에서 혈청 유리 DNA 메틸화를 검사하였다.

2) 혈청 유리 DNA 메틸화

폐암조직에서 세가지 유전자 모두에서 DNA 메틸화가 없었던 4명의 환자의 혈청에서는 3가지 유전자에 대한 프로모터 DNA 메틸화가 관찰되지 않았다. 폐암조직에서 세가지 유전자 메틸화가 모두 존재하던 환자 12명 중 4명에서 (36.4%) 혈청 유리 DNA 메틸화를 검출할 수 있었다. 세가지 유전자 중 RAR β P2의 프로모터 메틸화가 3명에서 측정되어 (25%) 가장 높은 검출률을 보였다. DAPK와 p16 프로모터 메틸화는 각각 1예씩 발견되었는데 (8.3%), 이들 중 한 환자에서는 DAPK와 RAR β P2 프로모터 메틸화가 함께 검출되었다 (Fig. 1, 2).

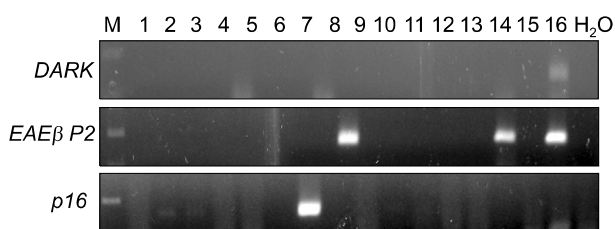


Fig. 1. Result of MSP analyses of serum-free DNA for three genes: DAPK, RAR β P2 and p16.

3) DNA 메틸화와 임상상

72명의 환자의 병리학적 병기는 1기 및 2기가 43명, 3기 이상이 29명이었다. 각 유전자의 프로모터 DNA 메틸화는 병리학적 병기와 관계가 없었다 (Table 2). 폐암조직에서 3개의 유전자 프로모터 메틸화가 있어서 혈청 유리 DNA 메틸화 검사를 시행한 12명의 환자 중 1기 환자는 4명이었는데 이들 모두에서 혈청 유리 DNA 메틸화는 검출되지 않았다. 2기 환자는 2명이었고 이 중 한 환자에서 p16 프로모터 DNA 메틸화가 검출 되었다. 3기 이상 환자는 6명에서 검사하였고 이들 중 3명에서 4개의 DNA 메틸화를 검출할 수 있어 병기가 높아짐에 따라 혈청 유리 DNA 메틸화 검출률이 높아짐을 알 수 있었다 (Table 3).

혈청 유리 DNA 메틸화가 검출된 4명 중 1명에서 수술 후 1년째 재발하여 항암화학치료를 시행 받았고 나머지 3명은 각각 6년 6개월, 6년, 4년째 무병생존 중이다.

No.	DAPK		RAR β P2		p16	
	TUMOR	SERUM	TUMOR	SERUM	TUMOR	SERUM
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						

Fig. 2. Summary of the methylation status for DAPK, RAR β P2 and p16 in primary tumor and serum samples. The black-colored boxes represent methylated samples.

Table 2. Methylation Frequency of the Cancer Tissues According to the TNM Stage

Gene	Early stage			Advanced stage			p value*
	Stage Ia (13)	Stage Ib (19)	Stage IIb (11)	Stage IIIa (22)	Stage IIIb (6)	Stage IV (1)	
p16	11 (84.6%)	17 (89.5%)	8 (72.7%)	18 (81.8%)	5 (83.3%)	1 (100.0%)	0.914
RAR β P2	10 (76.9%)	12 (63.2%)	6 (54.5%)	12 (54.5%)	4 (66.7%)	1 (100.0%)	0.577
DAPK	3 (23.1%)	7 (36.8%)	4 (36.4%)	8 (36.4%)	2 (33.3%)	0 (0.0%)	0.865

*p values were calculated by using the chi-squared test for proportion difference between the early and the advanced stages

Table 3. Serum Free DNA Hypermethylation Status According to the TNM Stage

	Number of patients	Patient No. (Hypermethylated gene)
Stage I	4	None
Stage II	2	#7 (p16)
Stage III	6	#8, #14 (RAR β P2) #16 (RAR β P2, DAPK)

고안 및 결론

암환자의 혈액 내에 혈구 밖에 유리 형태의 DNA의 농도가 증가한다는 사실이 보고된 이후 다양한 암에서 혈청 유리 DNA가 증가함이 알려져왔다. 이러한 혈청 유리 DNA가 증가하는 기전에 대하여서는 정확히 알려져 있지는 않으나 아마도 암세포가 자멸(apoptosis) 또는 괴사하면서 DNA가 유리되는 것으로 추측되고 있다(5). 폐암 환자의 혈청 유리 DNA양이 얼마나 증가해 있는지에 대하여서는 여러 연구자들이 보고하였는데, 실험 대상군의 조직형, 병기, 혈액 샘플 및 처리방법, 보관방법, 측정방법 등의 차이로 인하여 보고마다 양이 많이 차이가 나기는 하지만 대부분 암환자에서는 정상 대조군에 비하여 증가해 있는 것으로 보고되고 있다(6-12). 특히 수술이 가능한 조기 폐암의 경우 혈청의 DNA양이 폐암의 크기, 병기, 조직형, 재발여부와 생존율과 상관관계가 없고 완전 절제수술 후에 급격히 떨어지는 것으로 보고되었으나 재발시 증가하는 경우는 드문 것으로 알려져 있다(6,7). 한편 대부분의 항암화학치료를 받는 진행성 폐암의 경우에는 혈청 DNA의 양이 증가가 암의 확산과 관련이 있다고 하여(11), 조기폐암에서와는 다르게 보고되고 있어 혈청 DNA의 농도 증가가 폐암에서 예후를 예측하는 인자인지에 대해서는 아직은 확실히 알려져있지 않은 형편이다. 우리 연구에서는 MSP 측정시 DNA양을 결정하기 위하여 방법으로 혈청 1 ml로부터 추출한 DNA양을 측정하였고 샘플에 따라 차이는 있었으나 약 10~100 ng 정도로 측정되었다. 이 연구에서는 정상 대조군의 DNA 양과의 비교는 시행하지 않았다.

암환자에서 증가된 혈청 유리 DNA가 원발암에서 기인하는 것으로 생각되는 이유는 원발암에서 관찰되는 DNA 변이가 혈청 유리 DNA에서 관찰되는 경우가 있기 때문이다. 이러한 현상은 약 40~90%의 환자에서 관찰되는 것으로 알려져 있는데, 예들 들어 폐암에서 원발암의 DNA에서 관찰되는 microsatellite instability와 loss of heterozygosity가 혈청 유리 DNA의 48~94%에서 발견되는 것으로 알려져 있고

(7,9,13-16) K-ras와 p53 등의 유전자 변이도 각각 12.5%, 27%에서 혈청에서 검출되는 것으로 알려져 있다(8,15,17-19).

폐암억제 유전자의 프로모터 메틸화도 혈청 유리 DNA에서 검출된다고 보고되어 있는데, p16의 경우 60%(8,20,21), APC는 47%(22), TMS1과 RASSF1A는 34%(17), DAPK는 33%에서(17,21) 검출된다고 보고되었다. 또한 fluorescent MSP assay나(8) seminested MSP를 하는 경우(20) 더욱 민감하게 검출할 수 있다고 알려져 있다. 우리 연구에서는 폐암 조직에서 세가지 유전자 프로모터가 다 메틸화 되어있는 환자만을 대상으로 검사하였음에도 불구하고 전체 12명 중 3명에서 1가지 유전자 그리고 1명에서 2가지 혈청 유리 유전자 메틸화를 검출할 수 있어 1가지 이상의 혈청 유리 DNA는 검출률 33.3%에 지나지 않았다. MSP는 bisulfite modification 과정에서 DNA가 분해되어 다른 PCR 검사에 비하여 상대적으로 많은 양의 DNA가 필요하기 때문에 임상적으로 바로 이용하는데 어려움이 있다고 알려져 있다(23). Esteller 등(21)은 p16, DPAK, GSTP1, MGMT 유전자에 대하여 MSP를 시행하여 어느 하나의 혈청 유리 DNA 메틸화가 발견된 경우는 50%로 비교적 낮은 검출률을 발표하였으나, 원발 폐암에서 메틸화가 있었던 환자의 73%에서 네가지 유전자 중 적어도 한가지 이상의 혈청 유리 DNA 메틸화를 발견할 수 있었다고 보고하였다. 이러한 보고들에 비교하면 우리 연구에서의 검출률은 매우 낮은 것을 알 수 있었다.

MSP 법은 유전자 메틸화를 비교적 손쉽게 검출할 수 있는 방법이지만 몇가지 문제점이 있는 방법이기도 하다. 그 중 가장 큰 문제점은 bisulfite modification 단계로 이 과정에서 메틸화되지 않은 wild 타입 유전자는 염기가 바뀌게 되고 메틸화 된 유전자는 염기가 바뀌지 않게 되어 두 유전자가 구분되도록 하는 중요한 단계이다. 만일 메틸화 되지 않은 wild type 유전자의 bisulfite modification이 충분히 일어나지 않아 modification 되지 않은 DNA가 남아 있는 경우에는 PCR 과정에서 위양성의 결과를 초래할 수 있는 위험이 있다. 실제로 우리 연구팀은 통상의 bisulfite modification 방법이나 조직용 bisulfite modification kit를 혈청 분석에 사용하는 경우 많은 위양성의 밴드가 관찰됨을 경험하였고 그러한 위양성의 원인은 불충분한 bisulfite modification으로 추정되었다(data not published). 통상 bisulfite modification은 1 μ g의 DNA를 가지고 시작하는데 우리 경험으로는 혈청 1 ml에서 추출한 혈청 유리 DNA의 양은 10~100 ng이었음을 확인하였고, 이는 1 μ g에 훨씬 미치지 못하는 미량으로 아마도 위양성의 원인이 미량의 DNA가 bisulfite modification이 충분히 되지 않았기 때문으로 생각하고 미량의 DNA를

위하여 특별히 제조된 MethylEasy™ DNA Bisulphite Modification kit (Human Genetic Signatures, NSW, Australia)을 사용하여 bisulfite modification을 시행하였다. 그 이후에는 위 양성 밴드는 찾아 볼 수 없었다. 그러나 다른 연구자들이 발표한 정도의 높은 혈청 유리 DNA 검출률은 우리 연구에서는 재현할 수 없었다. 이러한 현상은 여러가지 원인에서 기인할 수 있을 것으로 생각된다. 우선 우리가 사용한 MethylEasy™ DNA Bisulphite Modification kit에서의 DNA 회수율이 낮을 가능성이 있다. 그렇지만 unmethylated primer를 사용하여 검증하였을 때 밴드는 확실히 나타나서 회수된 DNA의 양은 충분하다고 생각되었으며 키트의 DNA 회수율이 문제는 아닐 것으로 추측되었다. 다른 원인으로는 wild 타입 DNA의 양이 종양세포에서 기인한 메틸화된 DNA에 비하여 너무 과량이라서 추출한 소량의 혈청 유리 DNA에는 극소량의 메틸화된 DNA만 포함되어 있게 되고 bisulfite modification을 거치면서 대부분 소실되었을 가능성도 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 최근에는 methyl collector를 이용하여 미리 메틸화된 DNA를 enrichment 시킨 후 검사하는 방법이 개발되었고 우리 연구팀에서도 일부 사용하고 있다.

또 다른 원인으로 생각할 수 있는 것은 대상환자가 수술이 가능하였던 비교적 조기 폐암의 환자인 점을 들 수 있다. 물론 몇몇 연구에서는 수술환자를 대상으로 하였음에도 불구하고 우리 결과에서 보다 높은 혈청 유리 DNA 메틸화를 보고하고는 있으나, 병기가 낮은 경우 혈청 유리 DNA의 양이 낮고, 따라서 메틸화의 검출율이 낮아지는 경향을 보일 수 있을 것으로 추측된다. 실제로 우리 연구에서 원발 종양 조직의 DNA에서의 메틸화는 암 병기와 관련이 없었으나 혈청 유리 DNA 메틸화는 2기 또는 3기 이상의 병기에서만 검출되어 이러한 추정을 뒷받침하였다.

혈청 유리 DNA에서 암기원 유전자 변이가 관찰 되는 경우 재발의 위험이 높을 것으로 기대하였으나, 이 연구에서는 혈청 유리 DNA 메틸화가 검출된 4명 중 1명만이 재발하여 아마도 수술 시 혈청 유리 DNA 메틸화 여부가 재발을 예측하지는 못할 것으로 추측되었다. 그러나 이 연구에서의 혈청 유리 DNA 메틸화 검출률이 낮아 통계적 분석은 어렵고, 실제 재발을 한 시점에서의 혈청 유리 DNA 메틸화를 검출한 것은 아니었기 때문에 재발하는 경우 혈청 유리 DNA 메틸화 검출이 가능한지 여부에 대한 연구는 추후 시행되어야 할 중요한 과제로 생각되었다.

결론적으로 수술적 절제가 가능하였던 폐선암 환자에서 종양조직의 암억제 유전자 프로모터 메틸화는 흔히 발생하였고, 약 34% 환자에서는 혈청 유리 DNA에서도 메틸화를

검출할 수 있음을 확인하였다. 그러나 혈청 유리 DNA에 대한 MSP 법은 아직 비교적 조기 폐암 환자의 임상에서 사용하기는 민감도가 낮아 보다 향상된 메틸화 검출법의 개발이 필요하다고 판단된다.

REFERENCES

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999;49:8-31.
2. Bunn PJ Jr. Early detection of lung cancer using serum RNA or DNA markers: ready for "prime time" or for validation? *J Clin Oncol* 2003;21:3891-3893.
3. Kim YT, Lee SH, Sung SW, Kim JH. Can aberrant promoter hypermethylation of CpG islands predict the clinical outcome of non-small cell lung cancer after curative resection? *Ann Thorac Surg* 2005;79:1180-1188.
4. Kim YT, Park SJ, Lee SH, et al. Prognostic implication of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:1378.
5. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659-1665.
6. Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3902-3908.
7. Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:4675-4678.
8. Bearzatto A, Conte D, Frattini M, et al. p16(INK4A) Hypermethylation detected by fluorescent methylation-specific PCR in plasmas from non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3782-3787.
9. Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, et al. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients. *Int J Cancer* 2003;105:361-370.
10. Gormally E, Hainaut P, Caboux E, et al. Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study. *Int J Cancer* 2004;111:746-749.
11. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22:4157-4164.
12. Herrera LJ, Raja S, Gooding WE, et al. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. *Clin Chem* 2005;51:113-118.
13. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996;2:1033-1035.
14. Sozzi G, Musso K, Ratcliffe C, Goldstraw P, Pierotti MA, Pastorino U. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for

- early diagnosis. *Clin Cancer Res* 1999;5:2689-2692.
15. Andriani F, Conte D, Mastrangelo T, et al. Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *Int J Cancer* 2004;108:91-96.
16. Cuda G, Gallelli A, Nistico A, et al. Detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity in serum DNA of small and non-small cell lung cancer patients: a tool for early diagnosis? *Lung Cancer* 2000;30:211-214.
17. Ramirez JL, Sarries C, de Castro PL, et al. Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Lett* 2003; 193:207-216.
18. Kimura T, Holland WS, Kawaguchi T, et al. Mutant DNA in plasma of lung cancer patients: potential for monitoring response to therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:55-60.
19. Silva JM, Gonzalez R, Dominguez G, Garcia JM, Espana P, Bonilla F. TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:160-161.
20. An Q, Liu Y, Gao Y, et al. Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Lett* 2002;188:109-114.
21. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999;59: 67-70.
22. Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, et al. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer. *Cancer Res* 2002;62:371-375.
23. Xue X, Zhu YM, Woll PJ. Circulating DNA and lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:154-164.