

同期多灶性肺部磨玻璃结节患者基因突变的相关性研究

韩亚青,高茂钢,王世泽,刘广杰,刘庆熠,解少男
(河北医科大学第四医院,河北 石家庄 050000)

摘要: [目的] 研究同期多灶性肺磨玻璃结节 (synchronous multiple ground glass nodules, SMGGNs) 患者的肺癌相关驱动基因的表达及其与临床特征的关系,并从分子生物学角度探索肺部多原发磨玻璃结节的起源。[方法] 回顾性分析 2018 年 1 月至 2020 年 10 月河北医科大学第四医院胸外科收治并行手术治疗,术后病理诊断为肺腺癌或癌前病变的 43 例 SMGGNs 患者的临床病理资料。应用第二代基因测序 (next generation sequencing, NGS) 技术对手术切除的全部标本进行 16 个肺癌驱动基因位点的检测,分析基因的突变状态与临床特征的关系。[结果] 入组 43 例患者,共手术切除 111 枚肺部结节。病理学分型:18 枚非典型腺瘤样增生 (atypical adenomatous hyperplasia, AAH), 28 枚原位腺癌 (adenocarcinoma in situ, AIS), 25 枚微浸润性腺癌 (microinvasive adenocarcinoma, MIA) 和 40 枚浸润性腺癌 (invasive adenocarcinoma, IAC)。79.1% (34/43) 的患者中的 66 枚结节具有肺癌相关驱动基因突变。其中 42 枚为 *EGFR* 突变 (15 枚 *Ex19Del* 缺失, 22 枚 *21-L858R* 突变, 3 枚 20 号外显子框内插入突变和 2 枚 *E18G719X* 突变), 2 枚 *EML4-ALK* 融合, 2 枚 *NRAS* 突变, 2 枚 *PIK3CA* 融合, 4 枚 *MET14* 号外显子可剪切突变, 3 枚 *RET17* 错义突变, 7 枚 *KRAS* 突变, 2 枚 *ROS1* 融合, 1 枚 *BRAF* 突变, 1 枚 *ESR1* 突变。未发现同一组织中存在多种基因突变。[结论] SMGGNs 的驱动基因突变状态差异较大,各结节可能来自不同的起源,为多个原发病灶,而非某一病灶的多发转移。手术切除是 SMGGNs 疗效比较好的治疗方法。

关键词: 非小细胞肺癌;同期多灶性肺磨玻璃结节;第二代基因测序;驱动基因突变;肿瘤异质性
中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2021)12-0942-05
doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2021.12.A010

Gene Mutations in Synchronous Multiple Lung Ground Glass Nodules

HAN Ya-qing, GAO Mao-gang, WANG Shi-ze, LIU Guang-jie, LIU Qing-yi, XIE Shao-nan
(The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the mutations of driving genes related in synchronous multiple ground-glass nodules (SMGGNs) of the lung and its relationship with clinical characteristics. [Methods] The clinical data of 43 patients with SMGGNs admitted to the Department of Thoracic Surgery of the Fourth Hospital of Hebei Medical University from January 2018 to October 2020 were retrospectively analyzed. The surgically resected specimens were examined with next generation sequencing (NGS) technique, and 16 lung cancer-driving gene loci were detected. The relationship between gene mutations and clinical characteristics was analyzed. [Results] A total of 111 pulmonary nodules were surgically resected from 43 patients. Among 111 nodules, atypical adenomatous hyperplasia (AAH) was pathologically confirmed in 18 nodules, adenocarcinomas *in situ* (AIS) in 28, microinvasive adenocarcinoma (MIA) in 25, and invasive adenocarcinoma (IAC) in 40. Sixty-six nodules in 34 patients (79.1%) had lung cancer-related driver gene mutations. Among them, *EGFR* mutations (15 with *Ex19Del* deletions, 22 with *21-L858R* mutations, 3 with 20 exon-frame insertions, and 2 with *E18G719X* mutations) were detected in 42 nodules, *EML4-ALK* fusion in 2, *NRAS* mutation in 2, *PIK3CA* fusion in 2, applicable *MET14* exon mutations in 4, *RET17* missense mutations in 3, *KRAS* mutations in 7, *ROS1* fusion in 2, *BRAF* mutation in 1, and *ESR1* mutation in 1. Multiple gene mutations were not found in the same tissue specimens. [Conclusion] The mutation status of the driver genes in SMGGNs varies greatly, and the nodules may come from different origins and be multiple primary lesions rather than multiple metastases of one lesion. Surgical excision is an effective treatment for SMGGNs patients.

Key words: non-small cell lung cancer; synchronous multiple ground glass nodules; next generation sequencing; driver gene mutation; tumor heterogeneity

收稿日期:2021-09-26;修回日期:2021-11-01

基金项目:2019 年政府资助临床医学优秀人才培养项目计划[冀财社(2019)139 号];河北省卫生健康委员会医学科学研究课题(20201076)

通信作者:解少男, E-mail: 5791586@qq.com

同步多原发性肺癌(synchronous multiple primary lung cancer, SMPLC), 是指在同一时期发现的多个原发性肺癌^[1-2], 属于罕见病, 发生率仅为 0.5%^[3]。虽然 SMPLC 和转移性肺癌很难区分, 但是分子标志物的应用对区分两者还是有意义的^[4-5]。

随着影像学诊断的不断进步以及对大量高危人群进行胸部低剂量计算机断层扫描 (low dose computed tomography, LDCT) 筛查, 越来越多的纯磨玻璃结节(pure ground glass nodules, pGGN)或混合磨玻璃结节(mix ground glass nodules, mGGN)被检测出来^[6-7], 同时越来越多的同期多灶性肺磨玻璃结节(synchronous multiple ground glass nodules, SMGGNs)被发现。研究表明, SMGGNs 患者具有特殊的临床特征及预后^[8-10]。肺结节的多灶性可能是由于单个原发性肿瘤的扩散(肺内扩散)或多灶性独立病变同时发展所致^[11-12]。更重要的是, 研究发现多种类型的实体瘤中存在肿瘤间异质性^[12-19], 这可能有助于将 SM-PLC 与转移性肺癌区分开, 因为病变的异质性很可能来自不同的肿瘤克隆复制所致^[4]。

为了解 SMGGNs 的基因异质性, 我们对切除的 111 个肺结节(来自 43 例患者的 SMGGNs 病变)进行了第二代基因测序 (next generation sequencing, NGS) 分析, 以分析 *EGFR*、*KRAS*、*ERBB2*、*HER2*、*BRAF*、*ALK*、*ROS1*、*MET*、*RET*、*PIK3CA*、*KIT*、*ESR1*、*PDGFRA*、*DDR2*、*HRAS*、*NRAS* 基因突变状态, 从而研究 SMGGNs 患者的基因突变状况, 推断多个病变的起源。

1 资料与方法

1.1 资料

选取 2018 年 1 月至 2020 年 10 月在河北医科大学第四医院胸外科接受手术治疗的 SMGGNs 患者的术后石蜡标本 (formalin fixation and paraffin embedding, FFPE), 通过 NGS 技术对所有肿瘤标本进行基因测序分析, 分析 *EGFR*、*KRAS*、*ERBB2*、*HER2*、*BRAF*、*ALK*、*ROS1*、*MET*、*RET*、*PIK3CA*、*KIT*、*ESR1*、*PDGFRA*、*DDR2*、*HRAS*、*NRAS* 基因突变状态, 研究 SMGGNs 患者的基因突变状况, 并从分子生物学角度推断多个病变的起源情况。本研究得到河北医科大学第四医院伦理委员会的批准 (伦理编号: 2021ky103)。

入组标准: (1) 入组患者均为 SMGGNs 患者, 经

外科手术治疗至少切除 2 枚及以上结节; (2) 入组患者在术前均未接受新辅助化疗或其他任何抗肿瘤治疗; (3) 相关病例及影像资料完整; (4) 取得患者知情同意并签署知情同意书。

1.2 分子生物学分析

所有患者均按照国际抗癌联盟 (UICC) 推出的《肺癌 TNM 分期(第 8 版)》进行术后 TNM 分期^[20]。根据世界卫生组织 (WHO) 2015 年出版的《肺肿瘤的组织学分类》^[21]对本标本进行组织学分型, 所有标本均由 2 名病理学专家进行检查并进行分类。

基因组分析在河北医科大学第四医院病理科实验室进行。根据制造商的方案, 使用 DNA 提取试剂盒 (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit; Qiagen, Hilden, Germany) 从每个 FFPE 肿瘤样本中提取至少 30 ng DNA。使用 Qubit dsDNA 测定法测量 DNA 浓度。使用 Covaris M220 进行 DNA 剪切, 然后进行末端修复、磷酸化和接头连接。通过磁珠 (Agencourt AM-Pure XP Kit, Beckman Coulter, California, USA) 选择大小为 200~400 bp 的片段, 然后用捕获探针诱饵进行杂交, 用磁珠进行杂交选择和 PCR 扩增。运用高灵敏度生物分析仪对 DNA 片段的质量和大小进行测定, 并对样本进行测序。在 MiSeq DX 测序仪 (Illumina, Inc., California, USA) 上进行双端读取。使用肺癌 16 基因面板对捕获的组织样本遗传图谱进行靶向深度测序评估, 覆盖 76 kb 的人类基因组区域 (试剂盒 Burning Rock Dx, Lung cure 16-gene panel), 16 基因面板可以检测 *EGFR*、*KRAS*、*ERBB2*、*HER2*、*BRAF*、*ALK*、*ROS1*、*MET*、*RET*、*PIK3CA*、*KIT*、*ESR1*、*PDGFRA*、*DDR2*、*HRAS* 和 *NRAS* 的致癌驱动突变。FFPE 样本的测序深度为 1 000×。

1.3 统计学处理

使用 R 3.6 软件进行统计分析。计数资料用 n(%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 计量资料符合正态分布采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 不符合正态分布采用 M(P25, P75) 描述, 组间比较采用秩和检验。所有统计检验均在双侧 $\alpha=0.05$ 显著性水平上进行。

2 结果

2.1 临床资料

共入组 43 例 SMGGNs 患者, 中位发病年龄为 58 岁 (范围 48~73 岁)。女性、不吸烟者和腺癌患者的比例分别为 72.7%、70.4% 和 100.0%。35 例患者接

受了单侧手术治疗,其中结节位于同一肺叶者 14 例,位于不同肺叶者 21 例;另 8 例患者接受了双侧肺结节切除(5 例同期切除,3 例分期切除)。共切除结节 111 枚,其中 27 例患者切除了 2 枚结节,9 例患者切除了 3 枚结节,5 例患者切除了 4 枚结节,2 例患者切除了 5 枚结节。111 枚结节的组织学分型为:18 枚非典型腺瘤样增生(atypical adenomatous hyperplasia,AAH),28 枚原位腺癌(adenocarcinoma in situ,AIS),25 枚微浸润性腺癌(microinvasive adenocarcinoma,MIA),40 枚浸润性腺癌(invasive adenocarcinoma,IAC)。

2.2 驱动基因突变状态

在整组病例中,79.1%(34/43)的患者存在基因突变状态。111 枚肺结节中有 66 枚结节存在基因突变,其中 63.6%(42/66)为 *EGFR* 基因突变,包括 19 号外显子缺失 15 枚,21 号外显子 *L858R* 突变 22 枚,20 号外显子框内插入突变 3 枚(均为“YVMA”插入突变)和 2 枚 *E18G719X* 突变。2 枚结节为 *EML4-ALK* 融合,2 枚结节为 *NRAS* 突变,2 枚结节为 *PIK3CA* 融合,4 枚结节 *MET14* 号外显子可剪切突变,3 枚结节 *RET17* 错义突变,7 枚结节 *KRAS* 突变,2 枚结节 *ROS1* 融合,1 枚结节 *BRAF* 突变,1 枚结节 *ESR1* 突变。未发现其他基因突变分型。在具有已知突变的肿瘤中,大多数是互斥的,即同一组织中无多种基因突变(Figure 1)。

2.3 肺腺癌亚组驱动基因突变分析

共切除肺腺癌结节 93 枚,AIS 亚组中突变驱动因子的发生率为 53.6%(15/28),与 MIA 亚组的 68.0%(17/25)和 IAC 亚组的 70.0%(18/40)无明显统计学差异($P>0.05$)。而 *EGFR* 突变在不同腺癌亚组中的发生率存在明显统计学差异(AIS 14.3% vs MIA 40.0% vs IAC 62.5%, $P<0.05$)(Table 1)。

2.4 放射学亚组驱动基因突变分析

影像学检查显示,111 个 GGN 中有 63 枚为 pGGN,48 枚为 mGGN。pGGN 亚组中驱动基因突变的发生率为 47.6%(30/63),低于 mGGN 亚组的 70.8%(34/48),但两组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。而 *EGFR* 突变在不同放射学亚组中的突变率

差异有统计学意义(pGGN 25.4% vs mGGN 54.2%, $P<0.05$)(Table 2)。

3 讨论

全文分析了来自 43 例 GGN 患者的 111 个肺部结节的基因突变状态,包括 *EGFR*、*KRAS*、*ERBB2*、*HER2*、*BRAF*、*ALK*、*ROS1*、*MET*、*RET*、*PIK3CA*、*KIT*、*ESR1*、*PDGFRA*、*DDR2*、*HRAS*、*NRAS* 基因突变,以探索 SMGGNs 患者多发病灶的驱动基因突变的差异。国内外尚鲜有对 SMGGNs 患者进行肺癌相关驱

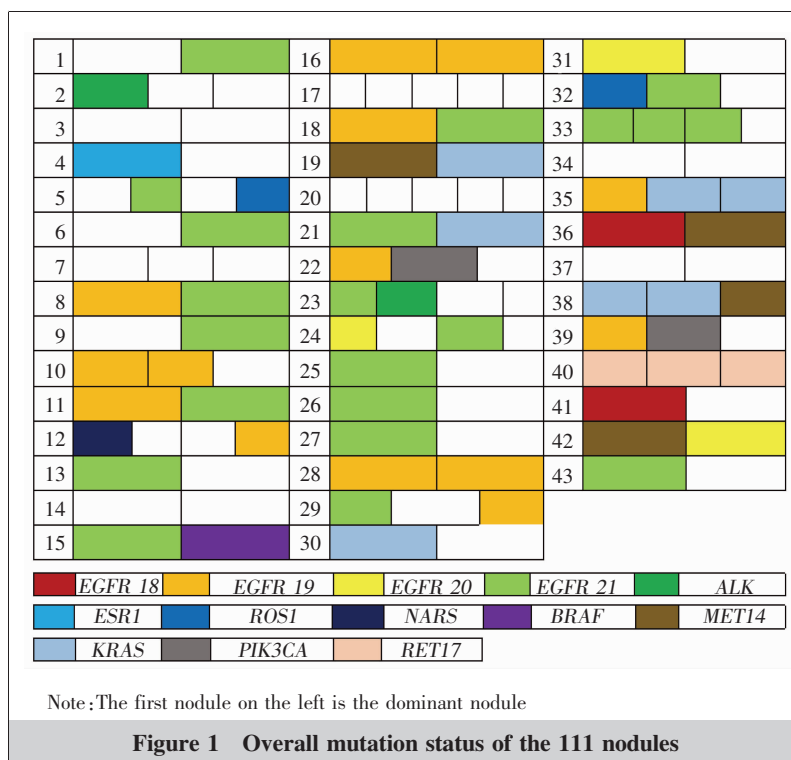


Figure 1 Overall mutation status of the 111 nodules

Table 1 Comparison of mutation status of lung adenocarcinoma subgroups

Gene mutation	AIS(n=28)	MIA(n=25)	IAC(n=40)	P
<i>EGFR</i>	4	10	25	0.030
<i>ALK</i>	1	1	0	0.473
<i>NRAS</i>	2	0	0	0.109
<i>PIK3CA</i>	0	0	1	0.520
<i>MET14</i>	2	0	0	0.109
<i>RET17</i>	1	2	0	0.230
<i>KRAS</i>	4	2	1	0.246
<i>ROS1</i>	1	1	0	0.473
<i>BRAF</i>	0	1	0	0.266
<i>ESR1</i>	0	0	1	0.520
No mutation	13	8	12	0.615

Table 2 Comparison of mutation status in imaging subgroups

Gene mutation	pGGN(n=63)	mGGN(n=48)	P
<i>EGFR</i>	14	26	0.018
<i>ALK</i>	2	0	0.220
<i>NRAS</i>	1	1	0.847
<i>PIK3CA</i>	2	0	0.220
<i>MET14</i>	4	0	0.085
<i>RET17</i>	1	2	0.420
<i>KRAS</i>	3	4	0.473
<i>ROS1</i>	2	0	0.220
<i>BRAF</i>	1	0	0.384
<i>ESR1</i>	0	1	0.255
No mutation	33	14	0.113

动基因检测分析,从分子生物学角度辨别磨玻璃结节(GGN)异质性的报道。

肿瘤异质性是指同一患者体内的肿瘤在生长过程中,经过多次分裂、增殖,其子细胞呈现出分子生物学或基因方面的改变,从而使肿瘤的生长速度、侵袭能力、对药物的敏感性、预后等各方面产生差异,这对个体化癌症治疗提出了重大挑战^[22-24]。据报道,在6.3%~30%的肺癌患者体内,激活的*EGFR*突变显示出肿瘤内异质性和空间不一致性^[18-19]。与肺外转移相比,SMGGNs在*EGFR*突变中异质性的概率明显更高^[18]。我们的研究聚焦于SMGGNs患者,发现43例患者中至少有一项基因突变的驱动基因突变差异高达79%。Chung等^[11]在24例肺多发磨玻璃样变(ground-glass opacity,GGO)的非小细胞肺癌患者中检测到*EGFR*突变,发现不一致率高达70.8%,与我们的结果相一致,并支持这样的假设:非小细胞肺癌患者中的许多多发性GGN似乎来自不同的原发性肿瘤^[22,24],因此需要制定不同于转移性多发性肺病患者的诊疗策略。

尽管随着放射学的进展,多个GGN的检测已变得越来越普遍^[25-26],然而,对于具有多个肺结节患者的最佳治疗仍未达成共识。Chang等^[9]研究了肺部多发纯GGO的自然史,并建议对无恶性病史的受试者进行长期随访,期间,筛查检测到的纯GGO结节中约有90%没有进展。但是,对于mGGN病变患者,Asamura等^[27]建议,即使是多发病变,也应进行手术切除治疗。我们的研究发现,mGGN组的基因突变概率与pGGN组相比存在差异,且mGGN组中*EGFR*突变概率更大。因此对于多部位肺结节患者

而言,如果有机会行手术治疗,应优先手术切除。GGN病变可被视为原发性肿瘤,手术切除是该亚组的合适选择。

在这项研究中,我们还根据新分类比较了腺癌不同亚组的驱动基因突变。众所周知,在肺腺癌和鳞癌的癌前病变中分别检测出了*KRAS*和*p53*突变。另外,在AAH病变患者中发现了*EGFR*突变,并且*EGFR*突变在支气管肺泡癌和腺癌中发生率相似,这支持了*EGFR*基因突变发生在肺腺癌发展的早期阶段这一观点^[28-29]。我们在诊断为AIS的早期病变中发现了*EGFR*和*KRAS*突变,与上述结果一致。在本次试验中也发现在不同肺腺癌亚组中,*EGFR*突变的发生率存在明显统计学差异。值得注意的是,我们还在AIS病变中检测到*EML4-ALK*融合蛋白,这表明*EML4-ALK*融合蛋白也可能像癌基因或*EGFR*一样,在肿瘤的发生、发展中起着重要作用^[30-31]。

本研究也存在一些局限性。首先,驱动基因整体突变率并未在肺腺癌亚组和放射学亚组中存在统计学差异,而*EGFR*突变状态却存在统计学差异,这可能是由于样本量相对较小,加上非*EGFR*突变发生率较低,未达到统计学差异,同时样本量较小,研究的回顾性可能会导致选择偏倚。其次,由于本研究没有使用全基因组或外显子组测序,使用16个致癌驱动基因获得的信息可能只代表整个基因序列的一部分,不能完全说明基因突变的互斥性。最后,由于在某些情况下由于逐步积累的遗传改变,转移性肿瘤在遗传水平上也可能与原发肿瘤不同^[24]。因此,需要更大的前瞻性研究来验证我们的发现。

总之,我们发现在多发性GGN患者的驱动基因中,突变存在高度的瘤间差异。这种高度的差异表明,这些肿瘤中的许多结节可能已经发展成为独立的原发性疾病,而不是转移性疾病。并且研究表明,这类患者经手术切除后预后良好^[27],所以应将非小细胞肺癌中的多发GGN优先视为原发肿瘤,手术切除对于多发GGN患者来说是一个合适的治疗方法。

参考文献:

- [1] Kozower BD, Larnar JM, Detterbeck FC, et al. Special treatment issues in non-small cell lung cancer; diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed; American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guide-

- lines[J]. *Chest*, 2013, 143(5 Suppl):e369S–e399S.
- [2] 陈芝强, 李泽云, 黄睿澜. 晚期非小细胞肺癌患者 PD-1 使用的系统评价再评价[J]. *中国肿瘤*, 2021, 30(6):465–480.
Chen ZQ, Li ZY, Huang RL. Re-evaluation of systematic reviews and Meta analyses of PD-1/PD-L1 related therapy for advanced non-small cell lung cancer[J]. *China Cancer*, 2021, 30(6):465–480.
- [3] Ferguson MK. Synchronous primary lung cancers [J]. *Chest*, 1993, 103(4 Suppl):398S–400S.
- [4] Murphy SJ, Aubry MC, Harris FR, et al. Identification of independent primary tumors and intrapulmonary metastases using DNA rearrangements in non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(36):4050–4058.
- [5] Zhang YL, Hu HC, Wang R, et al. Synchronous non-small cell lung cancers: diagnostic yield can be improved by histologic and genetic methods[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(13):4369–4374.
- [6] Detterbeck FC, Homer RJ. Approach to the ground-glass nodule[J]. *Clin Chest Med*, 2011, 32(4):799–810.
- [7] 吴茂芳, 蔡静静, 莫欣. 多发肺结节的鉴别策略研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2021, 27(3):170–174.
Wu MF, Cai JJ, Mo X. Research progress on differential strategies of multiple lung nodules[J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2021, 27(3):170–174.
- [8] Kim TJ, Goo JM, Lee KW, et al. Clinical, pathological and thin-section CT features of persistent multiple ground-glass opacity nodules: comparison with solitary ground-glass opacity nodule[J]. *Lung Cancer*, 2009, 64(2):171–178.
- [9] Chang BS, Hwang JH, Choi YH, et al. Natural history of pure ground-glass opacity lung nodules detected by low-dose CT scan[J]. *Chest*, 2013, 143(1):172–178.
- [10] Sim HJ, Choi SH, Chae EJ, et al. Surgical management of pulmonary adenocarcinoma presenting as a pure ground-glass nodule[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014, 46(4):632–636.
- [11] Chung JH, Choe GY, Jheon SH, et al. Epidermal growth factor receptor mutation and pathologic-radiologic correlation between multiple lung nodules with ground-glass opacity differentiates multicentric origin from intrapulmonary spread[J]. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(12):1490–1495.
- [12] Arai J, Tsuchiya T, Oikawa M, et al. Clinical and molecular analysis of synchronous double lung cancers [J]. *Lung Cancer*, 2012, 77(2):281–287.
- [13] Matsumoto S, Takahashi K, Iwakawa R, et al. Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(6):1491–1494.
- [14] Bai H, Wang ZJ, Wang YY, et al. Detection and clinical significance of intratumoral EGFR mutational heterogeneity in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e54170.
- [15] Park S, Holmes-Tisch AJ, Cho EY, et al. Discordance of molecular biomarkers associated with epidermal growth factor receptor pathway between primary tumors and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(7):809–815.
- [16] Munfus-McCray D, Harada S, Adams C, et al. EGFR and KRAS mutations in metastatic lung adenocarcinomas [J]. *Hum Pathol*, 2011, 42(10):1447–1453.
- [17] Chen ZY, Zhong WZ, Zhang XC, et al. EGFR mutation heterogeneity and the mixed response to EGFR tyrosine kinase inhibitors of lung adenocarcinomas [J]. *Oncologist*, 2012, 17(7):978–985.
- [18] Schmid K, Oehl N, Wrba F, et al. EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregionallymph node metastases [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(14):4554–4560.
- [19] Girard N, Deshpande C, Azzoli CG, et al. Use of epidermal growth factor receptor/Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog mutation testing to define clonal relationships among multiple lung adenocarcinomas: comparison with clinical guidelines[J]. *Chest*, 2010, 137(1):46–52.
- [20] Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, et al. The eighth edition lung cancer stage classification [J]. *Chest*, 2017, 151(1):193–203.
- [21] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(2):244–285.
- [22] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(10):883–892.
- [23] Yap TA, Gerlinger M, Futreal PA, et al. Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(127):127ps10.
- [24] Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, et al. Tumour heterogeneity in the clinic[J]. *Nature*, 2013, 501(7467):355–364.
- [25] Kim HK, Choi YS, Kim J, et al. Management of multiple pure ground-glass opacity lesions in patients with bronchioloalveolar carcinoma[J]. *J Thorac Oncol*, 2009, 5(2):206–210.
- [26] Yang Y, Wang HF, Jiang GN, et al. Surgical algorithm for heterogeneous bilateral quadruple pulmonary nodules[J]. *Interactive Cardiovasc Thorac Surg*, 2013, 17(5):892–894.
- [27] Asamura H, Suzuki K, Watanabe S, et al. A clinicopathological study of resected subcentimeter lung cancers: a favorable prognosis for ground glass opacity lesions [J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 76(4):1016–1022.
- [28] Yoo SB, Chung JH, Lee HJ, et al. Epidermal growth factor receptor mutation and p53 overexpression during the multistage progression of small adenocarcinoma of the lung[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(7):964–969.
- [29] Ikeda K, Nomori H, Ohba Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in multicentric lung adenocarcinomas and atypical adenomatous hyperplasias[J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(5):467–471.
- [30] Sartori G, Cavazza A, Bertolini F, et al. A subset of lung adenocarcinomas and atypical adenomatous hyperplasia-associated foci are genotypically related: an EGFR, HER2, and K-ras mutational analysis[J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(2):202–210.
- [31] Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer[J]. *Nature*, 2007, 448(7153):561–566.