

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.17.015

数字聚合酶链反应技术对甲状腺结节术前良恶性的鉴别诊断价值^{*}胡静雯,魏丽荣,滕小艳,杜玉珍[△]

上海交通大学医学院附属第六人民医院检验科,上海 201306

摘要:目的 探讨数字聚合酶链反应(dPCR)技术在甲状腺结节术前良恶性鉴别诊断中的价值。方法 收集 2019 年 6 月至 2022 年 9 月在该院进行超声引导下细针穿刺细胞学检查(FNAC)且接受手术治疗的甲状腺结节患者穿刺液标本 141 份,采用 dPCR 和扩增阻滞突变系统(ARMS)-PCR 检测 BRAF V600E 基因突变,dPCR 同时检测 NRAS Q61R 基因突变、TERT 基因启动子 C228T 和 C250T 突变。以患者术后病理检测结果为金标准,比较几种方法的准确率,评价 dPCR 技术在甲状腺结节术前良恶性鉴别诊断中的价值。结果 141 份穿刺液标本中,dPCR 对 BRAF V600E 的检出率为 69.50%(98/141),ARMS-PCR 对 BRAF V600E 的检出率为 64.54%(91/141),差异有统计学意义($P<0.05$);dPCR 检测 NRAS Q61R、TERT C228T、TERT C250T 在甲状腺乳头状癌(PTC)中的突变检出率分别为 15.32%(17/111)、12.61%(14/111)和 1.80%(2/111)。单独使用 dPCR 检测 BRAF V600E 鉴别诊断甲状腺结节良恶性的准确率为 89.36%,明显高于 ARMS-PCR (84.40%)和 FNAC(77.30%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。dPCR(BRAF V600E)+FNAC 的诊断准确率为 97.16%,dPCR 多基因[BRAF V600E+NRAS Q61R+TERT(C228T+C250T)]+FNAC 的诊断准确率为 97.87%,均高于单独 dPCR(BRAF V600E)、dPCR(多基因)的诊断准确率,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 dPCR 可检测出 ARMS-PCR 漏检的基因突变位点,也可以弥补 FNAC 的不足,该技术联合 FNAC 可提高甲状腺结节术前良恶性鉴别诊断的效能。

关键词:数字聚合酶链反应; 甲状腺结节; 术前诊断; BRAF V600E; 甲状腺乳头状癌**中图法分类号:**R446.9**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2024)17-2537-05Value of digital polymerase chain reaction technology in preoperative diagnosis of benign and malignant thyroid nodules^{*}HU Jingwen, WEI Lirong, TENG Xiaoyan, DU Yuzhen[△]

Department of Laboratory Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201306, China

Abstract: **Objective** To investigate the value of digital polymerase chain reaction (dPCR) technique in the preoperative diagnosis of benign and malignant thyroid nodules. **Methods** A total of 141 samples of fine-needle aspiration from patients with thyroid nodules who underwent ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology (FNAC) and underwent surgery in Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine from June 2019 to September 2022 were collected. dPCR and amplification blocking mutation system (ARMS)-PCR were used to detect BRAF V600E gene mutations. dPCR simultaneously detected NRAS Q61R gene mutation, and TERT gene promoter C228T, C250T mutations. The value of dPCR technology in the preoperative benign and malignant diagnosis of thyroid nodules was evaluated by using the patient's postoperative pathology results as the gold standard and comparing the accuracy of the several methods. **Results** Among the 141 puncture fluid samples, the positive detection rate of BRAF V600E by dPCR was 69.50% (98/141), and that of BRAF V600E by ARMS-PCR was 64.54% (91/141), with a statistically significant difference ($P<0.05$). The mutation detection rates of dPCR detection of NRAS Q61R gene mutation, TERT gene promoter C228T and C250T mutations in papillary thyroid carcinoma (PTC) were 15.32% (17/111), 12.61% (14/111) and 1.80% (2/111) respectively. dPCR alone for BRAF V600E detection for di-

^{*} 基金项目:上海市浦东新区科技发展基金事业单位民生科研专项(医疗卫生)项目(PKJ2019-Y05);上海交通大学医学院附属第六人民医院医疗服务能级提升工程临床医疗技术骨干培育项目(20220207);上海市科技委员会 2020 年度“科技创新行动计划”医学创新研究专项项目(20Y11903300)。

作者简介:胡静雯,女,技师,主要从事分子诊断方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail:duyuzhen2005@163.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20240815.0958.006.html\(2024-08-16\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20240815.0958.006.html(2024-08-16))

agnosis of benign and malignant thyroid nodules had an accuracy of 89.36% for benign and malignant thyroid nodules, which was significantly greater than ARMS-PCR (84.40%) and FNAC (77.30%), the differences were statistically significant ($P<0.05$). The diagnostic accuracy of dPCR (BRAF V600E) combined with FNAC was 97.16%, and the diagnostic accuracy of dPCR multigene testing [BRAF V600E+NRAS Q61R+TERT (C228T+C250T)] combined with FNAC was 97.87%, which were superior to the diagnostic value of dPCR alone for BRAF V600E detection and multigene testing, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The dPCR technique can detect gene mutation sites missed by ARMS-PCR and can also compensate for the missed detection by FNAC, this technique combined with FNAC can improve the efficacy of preoperative benign and malignant diagnosis of thyroid nodules.

Key words: digital polymerase chain reaction; thyroid nodule; preoperative diagnosis; BRAF V600E; papillary thyroid carcinoma

甲状腺结节是内分泌系统的常见病和多发病^[1],且发病率逐年上升^[2]。甲状腺乳头状癌(PTC)占甲状腺癌的 85%~90%^[3-4]。甲状腺结节术前良恶性的鉴别与临床干预措施直接相关,因此,提高甲状腺结节良恶性鉴别的准确性具有重要意义。超声引导下的细针穿刺细胞学检查(FNAC)是目前区分甲状腺结节良恶性的主要手段,具有较高的灵敏度和特异度,但仍有 25%~30% 的结节(分类为 Bethesda III~V 级)无法通过 FNAC 确定其性质^[5]。美国国立综合癌症网络(NCCN)临床实践指南指出,无法通过 FNAC 明确的疑似肿瘤,分子诊断可辅助其良恶性鉴别^[6]。甲状腺恶性肿瘤常见的突变基因包括 BRAF、NRAS、TERT 等^[7]。BRAF V600E 突变是诊断 PTC 的重要分子标志物^[8]。有文献指出,BRAF V600E、RAS 和 TERT 基因共同出现突变时,PTC 患者一般预后不良^[9]。因此,术前多基因突变检测联合 FNAC 更有助于提高甲状腺恶性肿瘤的诊断准确性及预测侵袭性。目前,BRAF V600E 突变的检测主要采用免疫组化法、扩增阻滞突变系统(ARMS)法和测序法。然而,这些方法在突变细胞较少的穿刺标本中可能不够灵敏。因此,对于肿瘤细胞含量较低的标本,需要一种更加灵敏和准确的检测方法。数字聚合酶链反应(dPCR)具有灵敏度高、特异度高、标本用量少、对抑制剂耐受性强等特征,突变检测率可达 0.1%,在特定条件下甚至可以低至 0.01%^[10-12]。本研究拟采用 dPCR 对 141 例甲状腺结节患者穿刺液标本进行 BRAF V600E、NRAS Q61R、TERT C228T 和 C250T 基因突变检测,评价 dPCR 技术在甲状腺结节术前良恶性鉴别诊断中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 6 月至 2022 年 9 月在本院接受超声引导下 FNAC 及手术治疗的甲状腺结节患者 141 例为研究对象,其中男 46 例,女 95 例,年龄 28~87 岁。纳入标准:(1)术前进行 FNAC, FNAC Bethesda 分级 II~VI 级;(2)接受手术治疗且临床资料完整。排除标准:(1)妊娠或哺乳期女性;(2)合并糖尿病、自身免疫性疾病及恶性肿瘤;(3)

FNAC Bethesda 分级 I 级。所有研究对象均对本研究知情同意,本研究经本院医学伦理委员会批准(批号:2022-111)。

1.2 方法

1.2.1 FNAC FNAC 根据《超声引导下甲状腺结节细针穿刺活检专家共识及操作指南(2018 版)》^[13]进行操作。根据《甲状腺癌诊疗指南(2022 年版)》^[14],采用甲状腺细胞病理学 Bethesda 报告系统,将诊断分为 6 级:I 级,不能诊断/不满意;II 级,良性;III 级,意义不明的非典型细胞/意义不明的滤泡性病变;IV 级,滤泡性肿瘤/可疑滤泡性肿瘤;V 级,可疑恶性;VI 级,恶性。

1.2.2 ARMS-聚合酶链反应(PCR)及 dPCR (1)DNA 提取。FNAC 细胞保存于新鲜组织储存液中,采用组织/胸腔积液 DNA 核酸提取试剂盒(厦门艾德生物医药科技股份有限公司)提取 DNA。使用 SMA 4000 紫外分光光度计(厦门艾德生物医药科技股份有限公司)检测所提取的 DNA 水平,并监测 DNA 质量,要求吸光度(A)₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0, DNA 水平在 1.5~10.0 ng/μL,于 -20℃ 冰箱中保存备用。(2)ARMS-PCR 检测 BRAF V600E 突变。使用人类 BRAF V600E 突变检测试剂盒(厦门艾德生物医药科技股份有限公司,试剂盒检测基因突变的灵敏度为 1%),在 LC 480 II PCR 仪(德国罗氏公司)上进行 BRAF V600E 突变检测。反应体系(50 μL):45 μL 反应混合液,5 μL DNA 模板。扩增程序:95℃ 5 min;95℃ 25 s,64℃ 20 s,72℃ 20 s,15 个循环;93℃ 25 s,60℃ 35 s,72℃ 20 s,31 个循环;60℃ 采集荧光信号。结果判读:内参通道 Ct 值在 13~21 为扩增有效;标本 FAM 信号扩增曲线呈 S 形曲线且 Ct 值<30,则为突变阳性;Ct 值≥30 则为突变阴性。(3)dPCR 技术检测 NRAS Q61R、BRAF V600E、TERT C228T、TERT C250T 突变。试剂与仪器由江苏圣极基因科技有限公司提供。采用人类 NRAS/BRAF 基因突变联合检测试剂盒(试剂盒检测基因突变的灵敏度为 0.1%)进行 BRAF V600E 和 NRAS Q61R 基因突变检测,反应体系(30 μL):6.0 μL 5×

NB Snp Buffer, 0.5 μ L Snupp Taq 酶, 13.5 μ L NB 联检检测体系, 10.0 μ L DNA 模板。采用人类 TERT 基因突变检测试剂盒进行 TERT C228T 和 C250T 突变检测, 反应体系 (30 μ L): 15.0 μ L 2 $\times$ TERT GC Reaction Buffer, 0.5 μ L Snupp Taq 酶, 4.5 μ L TERT 检测体系, 10.0 μ L DNA 模板。根据制造商说明书, 在 Bio Digital 青-dPCR 液滴制备仪上进行芯片液滴制备, 在 Bio Digital 青-dPCR 芯片扩增仪上进行扩增。NRAS/BRAF、TERT 扩增程序: 50 $^{\circ}$ C 5 min; 90 $^{\circ}$ C 5 min; 96 $^{\circ}$ C 10 s; 60 $^{\circ}$ C 35 s, 50 个循环; 25 $^{\circ}$ C 采集荧光信号。在 Bio Digital 青-生物芯片阅读仪上读取芯片, 并用配套的数据分析系统进行结果分析。结果判读: 标本内参通道阳性点数 $\geq$ 200 个为扩增有效; 荧光通道阳性点数 $\geq$ 3 个判断为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS27.0 统计软件进行数据处理及统计分析。多基因检测[BRAF V600E+NRAS Q61R+TERT(C228T+C250T)]及联合检测采用并联的方法判断结果。计数资料以例数或百分率表示, 以术后病理结果为金标准, 计算各方法的灵敏度、特异度、准确率, 各方法的灵敏度、特异度、准确率比较采用配对 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 术前采用不同检测方法与术后病理检测的鉴别诊断价值比较 141 例穿刺液标本中, FNAC 结果 Bethesda 分级为 II 级 34 例, III~V 级 24 例, VI 级 83 例。术后病理检测诊断良性病变 30 例; 恶性肿瘤 111 例, 且均为 PTC。以术后病理检测结果为金标准, 比较术前 FNAC、ARMS-PCR、dPCR(BRAF V600E) 3 种方法单独使用对甲状腺结节术前良恶性的鉴别诊断价值, 结果显示, 使用 dPCR(BRAF V600E) 鉴别诊断甲状腺结节术前良恶性的灵敏度和准确率优于 FNAC 及 ARMS-PCR, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。进一步比较 dPCR(BRAF V600E)+FNAC 和 dPCR(多基因)+FNAC 鉴别诊断甲状腺结节良恶性的价值, 结果显示, dPCR(BRAF V600E)+FNAC 的准确率为 97.16%, dPCR(多基因)+FNAC 的准确率为 97.87%, 与 dPCR(BRAF V600E)、dPCR(多基因) 比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1、2。

表 1 141 份穿刺液标本术前采用不同方法检测与术后病理检测的鉴别诊断结果(<i>n</i>)		
方法	术后病理	
	恶性	良性
FNAC(Bethesda 分级)		
II	7	27
III~V	23	1
VI	81	2
ARMS-PCR(BRAF V600E)		

续表 1 141 份穿刺液标本术前采用不同方法检测与术后病理检测的鉴别诊断结果(<i>n</i>)		
方法	术后病理	
	恶性	良性
阳性	90	1
	21	29
dPCR		
BRAF V600E		
阳性	97	1
阴性	14	29
NRAS Q61R		
阳性	17	0
阴性	94	30
TERT(C228T+C250T)		
阳性	14	0
阴性	97	30
多基因		
	99	1
阴性	12	29
dPCR(BRAF V600E)+FNAC		
恶性	108	1
良性	3	29
dPCR(多基因)+FNAC		
恶性	109	1
良性	2	29

注: 多基因为 BRAF V600E+NRAS Q61R+TERT(C228T+C250T)。

表 2 术前采用不同检测方法与术后病理检测的鉴别诊断价值比较(%)			
方法	灵敏度	特异度	准确率
FNAC	72.97	93.33 [*]	77.30 [*]
ARMS-PCR	81.08	96.67 [*]	84.40 [*]
dPCR(BRAF V600E)	87.39	96.67	89.36
dPCR(多基因)	89.19	96.67	90.78
dPCR(BRAF V600E)+FNAC	97.30 ^{#△}	96.67	97.16
dPCR(多基因)+FNAC	98.20 ^{#△}	96.67	97.87

注: 多基因为 BRAF V600E+NRAS Q61R+TERT(C228T+C250T); 与 dPCR(BRAF V600E+NRAS) 比较, ^{*} $P<0.05$; 与 dPCR(BRAF V600E+NRAS) 比较, [#] $P<0.05$; 与 dPCR(多基因) 比较, [△] $P<0.05$ 。

2.2 dPCR 与 ARMS-PCR 检测甲状腺结节患者穿刺液 BRAF V600E 突变的结果比较 141 份穿刺液标本中, dPCR 对 BRAF V600E 突变的检出率为 69.50% (98/141), ARMS-PCR 对 BRAF V600E 突变的检出率为 64.54% (91/141), 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.14, P=0.016$)。单独使用 dPCR 检测 BRAF V600E 鉴别诊断甲状腺结节良恶性的准确率为 89.36%, 明显高于 ARMS-PCR (84.40%) 和 FNAC (77.30%), 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见

表 2、3。

其中,ARMS-PCR 法漏检 7 份标本,而被 dPCR 法检测出 BRAF V600E 阳性突变。对上述 7 份 ARMS-PCR 漏检的标本进一步分析发现, FNAC Bethesda 分级为Ⅱ级 1 例、Ⅴ级 3 例、Ⅵ级 3 例;术后病理检测的诊断结果均为恶性肿瘤。其中 4 份标本因 BRAF V600E 突变率在 0%~1%,小于 ARMS-PCR 的检出下限(<1%),ARMS-PCR 未能检出。另外,3 份标本虽然突变率高于 1%,但 ARMS-PCR 仍未检出。见表 4。141 份穿刺液标本来源患者中,30 例患者术后病理检测的诊断结果为良性病变, dPCR 和 ARMS-PCR 均未检测到 BRAF V600E 阳性突变。

2.3 dPCR 对 NRAS 基因和 TERT 基因启动子的突

变检出情况 dPCR 检测 NRAS Q61R 基因突变、TERT 基因启动子 C228T 和 C250T 突变,在 111 例 PTC 中突变检出率分别为 15.32% (17/111)、12.61% (14/111)和 1.80% (2/111)。见表 5。

表 3 dPCR 与 ARMS-PCR 检测 BRAF V600E 突变的比较(n)

dPCR	ARMS-PCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	91	7	98
阴性	0	43	43
合计	91	50	141

表 4 ARMS-PCR 漏检的 7 份标本基本信息

标本编号	Bethesda 分级	术后病理	dPCR	ARMS-PCR	DNA 水平 (ng/ μ L)	dPCR 检出突变率(%)
200529803	Ⅴ级	恶性	阳性	阴性	3.05	1.004
200717806	Ⅴ级	恶性	阳性	阴性	4.75	8.601
210514805	Ⅵ级	恶性	阳性	阴性	5.75	0.691
210604802	Ⅵ级	恶性	阳性	阴性	6.00	2.097
210625807	Ⅴ级	恶性	阳性	阴性	4.20	0.781
211029804	Ⅵ级	恶性	阳性	阴性	6.35	0.630
211105804	Ⅱ级	恶性	阳性	阴性	8.35	0.533

表 5 dPCR 对 NRAS 基因和 TERT 基因启动子的突变检出情况

项目	PTC(n)	阳性(n)	检出率(%)
NRAS Q61R	111	17	15.32
TERT C228T	111	14	12.61
TERT C250T	111	2	1.80

3 讨 论

甲状腺细针穿刺细胞的分子检测可以在 FNAC 的基础上提高甲状腺结节术前诊断的准确性,能更准确地划分结节的恶性风险,特别是能优化 FNAC Bethesda Ⅲ~Ⅴ级结节的恶性风险分层,避免不必要的手术^[15-16]。本研究结果显示,dPCR 联合 FNAC 可提高甲状腺结节术前良恶性诊断的效能,弥补 FNAC 的不足。

BRAF V600E 基因突变在 PTC 中最为常见,突变发生率为 65%~80%^[17-18]。在本研究中, dPCR 检测 PTC 的 BRAF V600E 突变率为 88.29% (111 例 PTC 中检出 98 例),高于文献报道,可能与 dPCR 的高灵敏度有关。本研究结果显示,141 份穿刺液标本中,dPCR 检测 BRAF V600E 的检出率 (69.50%) 高于 ARMS-PCR (64.54%),差异有统计学意义($P<0.05$)。

以术后病理检查结果作为金标准,单独使用

dPCR 检测 BRAF V600E 鉴别诊断甲状腺结节良恶性的准确率为 89.36%,明显高于 ARMS-PCR(84.40%)和 FNAC(77.30%),差异有统计学意义($P<0.05$); dPCR(BRAF V600E)+FNAC 的鉴别诊断准确率为 97.16%,优于单独使用 dPCR(BRAF V600E)的鉴别诊断准确率,差异有统计学意义($P<0.001$)。NRAS 在 PTC 中的发生频率为 10%~20%^[19],TERT 启动子突变频率在 PTC 中为 10%~15%,C228T 突变频率高于 C250T^[19-20]。在本研究中,dPCR 检测 NRAS Q61R 基因突变率 (15.32%)、TERT 启动子 C228T 和 C250T 的突变率 (12.61% 和 1.80%) 与上述文献报道接近^[19-20]。dPCR(多基因)检测到阳性突变 99 例,多于 dPCR 单独检测的 BRAF V600E 突变,由此表明,术前多基因检测比单基因检测能更有效地检测到基因突变。dPCR(多基因)+FNAC 鉴别诊断甲状腺结节良恶性的准确率 (97.87%) 明显高于 dPCR (BRAF V600E)、dPCR(多基因),差异均有统计学意义($P<0.05$)。由此证明,dPCR 联合 FNAC 提高了甲状腺结节良恶性鉴别诊断的效能,在一定程度上也能弥补 FNAC 的漏检。

此外,本研究还发现有 7 例恶性患者的穿刺液标本被 ARMS-PCR 漏检,而采用 dPCR 可检出 BRAF V600E 突变。其中有 4 份标本 dPCR 可以检测到突变率<1%的基因突变,低于 ARMS-PCR 所能检测的

最低限度。因此, ARMS-PCR 对低突变含量标本存在漏检现象, 而 dPCR 能够很好地弥补这个缺陷, 更准确地诊断。并且, 这 7 份标本来源患者中, 有 1 例 FNAC Bethesda 分级为 II 级(良性), 3 例 V 级(可疑恶性), 此 4 例患者术后病理检查均为恶性, 这表明在 FNAC 结果为良性及无法确定良恶性的甲状腺结节中, dPCR 比 ARMS-PCR 可以更有效地检测到基因突变, 提示甲状腺肿瘤。

综上所述, dPCR 可检测出 ARMS-PCR 漏检的基因突变位点, 具有高灵敏度、高准确度的优点, 可同时检测多个基因的多种变异类型。但 dPCR 也有一定的局限性, 在操作方面, 其自动化程度有待提高; 检测成本方面, dPCR 使用的耗材使检测成本相对较高。本研究纳入的标本量有限, PTC 在甲状腺癌中占比极高, 且超声检查结果提示高风险的人群才会进行 FNAC 和手术治疗。本研究纳入的恶性肿瘤经术后病理检查诊断均为 PTC, 因此, 在分析基因突变与甲状腺结节临床病理特征的相关性中可能存在偏倚。结果表明, dPCR 联合 FNAC 可提高甲状腺结节术前良恶性诊断的效能, 弥补 FNAC 的不足, 在临床应用方面具有明显优势。dPCR 多基因检测有利于提高分子诊断在甲状腺肿瘤分类中的作用, 对甲状腺肿瘤的精准诊断和临床确定个性化治疗方案有指导意义。

参考文献

[1] 刘博,寇子祥,陈宝贵. 陈宝贵教授治疗甲状腺结节经验浅析[J]. 天津中医药, 2021, 39(1): 8-10.

[2] SUBRAMANIAN K. Molecular markers in the diagnosis of thyroid cancer in indeterminate thyroid nodules[J]. Indian J Surg Oncol, 2022, 13(1): 11-16.

[3] DIPRAJAN L, NARIS N, MYRIEM B. New therapies for advanced thyroid cancer [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 82.

[4] SCHEFFEL R S, DORA J M, MAIA A L. BRAF mutations in thyroid cancer[J]. Curr Opin Oncol, 2022, 34(1): 9-18.

[5] 夏苇. 分子诊断在甲状腺结节诊断中的应用和进展[J]. 检验医学与临床, 2020, 18(8): 1163-1167.

[6] HADDAD R I, BISCHOFF L, BALL D, et al. Thyroid carcinoma, Version 2. 2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20(8): 925-951.

[7] ALEXANDER E K, CIBAS E S. Diagnosis of thyroid

nodules[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2022, 10(7): 533-539.

[8] 叶蕾,李浩榕. 良恶性甲状腺结节的分子鉴别诊断进展[J]. 诊断学理论与实践, 2020, 19(4): 334-338.

[9] ROSVALL B R, KOSTIUK M, WILLIAMS J, et al. Utility of droplet digital polymerase chain reaction for TERT and BRAF mutational profiling of thyroid nodules[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1142.

[10] 周小匀,周琰,郭玮. 数字 PCR 技术及其在临床检验中的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(18): 2738-2743.

[11] 黄瑾,梁涛波,许恒毅. 数字 PCR 在生物学检测中应用的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(2): 255-264.

[12] 时运,王卓. ddPCR 技术和 Sanger 测序法检测甲状腺乳头状癌患者 BRAF V600E 基因突变的比较分析[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2021, 13(3): 287-290.

[13] 中国医师协会外科医师分会甲状腺外科医师委员会, 中国研究型医院学会甲状腺疾病专业委员会, 中国医学装备协会外科装备分会甲状腺外科装备委员会. 超声引导下甲状腺结节细针穿刺活检专家共识及操作指南(2018 版)[J]. 中国实用外科杂志, 2018, 38(3): 241-244.

[14] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 甲状腺癌诊疗指南(2022 年版)[J]. 中国实用外科杂志, 2022, 42(12): 1343-1357.

[15] 刘志艳,刘书佚,王馨培,等. 第 5 版 WHO 甲状腺滤泡源性肿瘤分类解读[J]. 中华病理学杂志, 2023, 52(1): 7-12.

[16] 国家癌症中心, 国家肿瘤质控中心甲状腺癌质控专家委员会. 中国甲状腺癌规范诊疗质量控制指标(2022 版)[J]. 中华肿瘤杂志, 2022, 44(9): 902-907.

[17] JINIH M, FOLEY N, OSHO O, et al. BRAFV600E mutation as a predictor of thyroid malignancy in indeterminate nodules: a systematic review and meta-analysis[J]. Eur J Surg Oncol, 2017, 43(7): 1219-1227.

[18] LIU L, CHANG J W, JUNG S N, et al. Clinical implications of the extent of BRAFV600E alleles in patients with papillary thyroid carcinoma[J]. Oral Oncol, 2016, 62: 72-77.

[19] FUKUSHIMA T, TAKENOSHITA S. Roles of RAS and BRAF mutations in thyroid carcinogenesis[J]. Fukushima J Med Sci, 2005, 51(2): 67-75.

[20] YANG J, GONG Y, YAN S, et al. Association between TERT promoter mutations and clinical behaviors in differentiated thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. Endocrine, 2020, 67(1): 44-57.

(收稿日期: 2023-10-03 修回日期: 2024-02-16)

(上接第 2536 页)

[17] VARRICCHI G, PECORARO A, MARONE G, et al. Thymic stromal lymphopoietin isoforms, inflammatory disorders, and cancer[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1595.

[18] YAO F, YUAN Q, SONG X, et al. Yupingfeng granule improves th2-biased immune state in microenvironment of hepatocellular carcinoma through TSLP-DC-OX40L

pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 1263053.

[19] 郭倩,李金红,张岩岩,等. IL-25、TSLP 在细菌感染性肺炎患儿血清中表达水平及其与免疫炎症的相关性[J]. 热带医学杂志, 2021, 21(8): 1030-1034.

(收稿日期: 2023-12-15 修回日期: 2024-05-08)