

液体活检及其联合影像学在良恶性肺结节诊断的研究进展

阚 杰, 牟 康, 李小松*

重庆医科大学附属第一医院临床分子医学检测中心, 重庆

收稿日期: 2024年12月26日; 录用日期: 2025年1月18日; 发布日期: 2025年1月30日

摘 要

肺结节是早期肺癌的一种表现, 检出率逐年增高, 早期诊断依赖于多种影像学, 由于假阳性率高而无法精准评估, 存在过度诊断。液体活检通过非侵入式方法对外周血中循环肿瘤细胞、DNA甲基化及非编码RNA进行检测, 具有较高灵敏度和特异性, 逐渐成为肿瘤精准医疗领域强有力的诊断依据。本文就液体活检及其联合临床影像学在良恶性肺结节诊断中的研究进展进行综述。

关键词

肺结节, 液体活检, 影像学, 诊断

Liquid Biopsy and Its Combination with Imaging in the Diagnostic Progress of Benign and Malignant Pulmonary Nodules

Jie Kan, Kang Mu, Xiaosong Li*

The Clinical Molecular Medical Testing Center of The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Dec. 26th, 2024; accepted: Jan. 18th, 2025; published: Jan. 30th, 2025

Abstract

Pulmonary nodules are a manifestation of early-stage lung cancer, with detection rates increasing year by year. Early diagnosis relies on various imaging techniques, but the high rate of false

*通讯作者。

文章引用: 阚杰, 牟康, 李小松. 液体活检及其联合影像学在良恶性肺结节诊断的研究进展[J]. 临床医学进展, 2025, 15(1): 1925-1931. DOI: 10.12677/acm.2025.151257

positives makes it difficult to assess accurately, leading to overdiagnosis. Liquid biopsy, a non-invasive method, detects circulating tumor cells, DNA methylation, and non-coding RNA in peripheral blood with high sensitivity and specificity, gradually becoming a powerful diagnostic basis in the field of precision oncology. This article reviews the research progress of liquid biopsy and its combination with clinical imaging in the diagnosis of benign and malignant pulmonary nodules.

Keywords

Pulmonary Nodules, Liquid Biopsy, Imaging, Diagnosis

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺癌是世界癌症相关死亡的主要原因[1],肺癌死亡率高的原因之一是早期缺乏特异性临床特征,早期精准诊断和治疗对提高患者生存率至关重要。随着低剂量螺旋计算机断层扫描(low dose computed tomography, LDCT)用于肺癌早期筛查灵敏度高,但鉴别恶性结节时存在假阳性和过度诊断问题。将液体活检与影像学相结合,可以显著提高肺良恶性结节鉴别的准确性。液体活检是指通过检测血液、尿液、唾液、胸水、腹水等体液中的肿瘤相关生物标志物,获取肿瘤的遗传信息,从而实现对癌症的早期诊断和监测。液体活检的原理基于肿瘤细胞在生长和转移过程中会释放 DNA、RNA、蛋白质等分子到体液中,这些分子可以作为肿瘤的生物标志物进行检测。在 CT 图像上分析肺结节的影像学特征同样可以预测肺癌,但鉴于肺癌发生过程中肿瘤异质性和克隆选择,单独使用液体活检影像学特征无法为肺癌诊断提供足够的证据,联合液体活检生物标志物与临床影像学特征的肺癌诊断模型往往表现出较高灵敏度[2]。已有大量研究联合生物标志物与临床影像学特征诊断恶性肺结节,在现有的诊断方式中,基于生物标志物联合临床影像学特征的恶性肺结节诊断模型往往表现出更好的准确性和稳定性,可能有助于肺结节的早期精准诊断,提高肺癌的治愈率,降低病死率,对临床诊疗具有巨大的意义[3]。在这篇综述中,将讨论液体活检及其联合临床影像学在良恶性肺结节诊断中的研究进展。

2. 液体活检诊断肺结节

2.1. 循环肿瘤细胞(CTCs)

循环肿瘤细胞(CTCs)是从原发肿瘤或转移瘤中分离出来进入外周血的肿瘤细胞,因此对肿瘤的早期诊断有重要意义。在良恶性肺结节的鉴别诊断中,CTC 计数和分析可以提供重要信息。此外,CTC 计数与多种肿瘤的临床病理特征显著相关,如肿瘤大小、分期、转移等,基线 CTC 数量升高提示较差的肿瘤临床病理特征[4]。研究发现,CTC 的数量和特征与肺结节的恶性程度密切相关[5]。CTC 的检测和分析可以提供肿瘤的分子特征,有助于区分良恶性肺结节。研究表明,恶性肺结节的 CTCs 数量显著高于良性肺结节患者。在一项研究中,恶性肺结节患者的 CTCs 水平显著高于良性肺结节患者($p < 0.05$)。CTCs 的检测灵敏度为 78.7%,尤其是 I 期肺癌的灵敏度达到 76.9% [6]。在一项针对孤立性肺结节患者的研究中,CTCs 的检测与肺癌的病理浸润显著相关,其敏感性达到了 75%,并且通过与肿瘤相关标志物如 CA125 或 NSE 的联合使用,CTC 的敏感性可以提高到 83% [7]。研究表明,外周血中的循环肿瘤细胞(CTCs)可用于肺孤立性肺结节的诊断,具有较高的敏感性和特异性。CTCs 的检测结果在恶性肺结节组、良性肺结

节组和对照组之间存在显著差异,提示 CTCs 可以作为肺癌特异性的生物标志物,在肺结节患者的早期筛查中发挥作用[8]。CTCs 的检测技术也在不断发展,例如叶酸受体 α (FR α)靶向聚合酶链反应(PCR)检测 CTC 为我国首创,该方法利用 FR α 在肺癌细胞表面的高表达特性,提供了一种新的 CTC 检测手段[9]。

CTCs 应用于癌症早期检测的最大挑战是极少数 CTC 细胞的富集,这些细胞通常以单个肿瘤细胞的形式存在于数百万血细胞中[10]。病灶的体积越小,血液中 CTCs 的数量就越少,从而导致 CTCs 对早期肺癌诊断的敏感度偏低。研究表明,肺腺癌患者的 CTCs 数目可能与原发肿瘤体积有关[11]。根据 CTCs 的物理和生物学特性,目前已有多种技术用于 CTCs 的富集,如免疫磁珠阴性富集、微流体装置富集、基于形态学富集的膜过滤等[12],仍需继续开发易于推广的、可以有效提高 CTCs 检测敏感度的技术及设备。未来的研究将进一步探索 CTCs 在肺结节诊断中的应用,包括提高检测的灵敏度和特异性,以及开发新的生物标志物,以实现更早期、更准确的肺癌诊断。

2.2. 循环肿瘤 DNA (ctDNA)

研究表明,ctDNA 可以作为一种非侵入性的方法,用于早期诊断肺癌并监测治疗反应[13]。通过高通量测序技术,ctDNA 能够检测到与肿瘤相关的基因突变,这些突变在组织活检中可能无法获得[14]。例如,一项研究利用 ctDNA 分析发现,恶性结节患者的 ctDNA 突变频率显著高于良性结节患者,这为临床提供了重要的诊断依据[15]。此外,ctDNA 的检测还可以帮助识别肿瘤的异质性和耐药机制,这对于个体化治疗具有重要意义[16]。在一些研究中,ctDNA 的检测与传统的影像学检查结合使用,能够提高对肺部结节的诊断准确性[17]。例如,结合循环肿瘤细胞(CTCs)和血清肿瘤标志物的检测,能够显著提高对恶性结节的筛查效率[18]。尽管 ctDNA 在肺部结节的诊断中展现出良好的前景,但仍面临一些挑战,如检测灵敏度和特异性的提高、标准化检测流程的建立等[19]。未来的研究需要进一步探索 ctDNA 在不同类型肺部结节中的应用,以期能为临床提供更为有效的诊断工具[20]。

ctDNA 在外周血中含量少,且容易与血浆蛋白结合,常规的提取效率不高。目前缺乏 ctDNA 样本采集和提取的标准流程。近年来与 ctDNA 有关的研究主要集中在晚期癌症,有研究显示:ctDNA 可以用来评估手术等治疗后的预后[21],监测肿瘤早期复发,针对不同的基因突变制定个体化治疗方案[22]。然而癌症早期组织中 ctDNA 浓度偏低,缺乏相关的研究经验[23],ctDNA 昂贵的经济成本也是其走向临床的阻碍。

2.3. 循环 RNA (Circulating RNA)

循环 RNA (circRNA)作为新兴生物标志物,已显示出在良恶性肺结节诊断中的巨大潜力。它们是一类特殊的非编码 RNA,通过其稳定性和组织特异性表达,在疾病诊断中具有独特的优势。通过对循环 RNA 的分析,研究人员能够识别出与肺癌相关的特定 RNA 分子,这些分子在恶性结节中的表达水平通常显著高于良性结节[24]。例如,某些微小 RNA (miRNA)在肺癌患者的血液中表现出特定的表达模式,这为肺结节的早期诊断提供了新的思路[25]。此外,循环 RNA 的检测方法也在不断进步。近年来,液体活检技术的进步使得从血液中提取和分析循环 RNA 变得更加高效和准确[26]。这种方法不仅可以减少患者的痛苦,还能在不进行侵入性操作的情况下,提供关于结节性质的重要信息[27]。在临床应用方面,循环 RNA 的检测已经显示出良好的敏感性和特异性。例如,某些研究表明,特定的循环 miRNA 组合能够在区分良性和恶性肺结节时达到高达 90%的准确率[28]。这为临床医生在决策过程中提供了有力的支持,帮助他们更好地评估患者的风险并制定相应的治疗方案。

基于 miRNA 的非侵入性生物标志物的发现具有重要前景,但开发用于肺癌早期诊断的 miRNA 仍然面临许多挑战。首先,缺乏肺癌特异性 miRNA,一种 miRNA 可能在多种癌症的血清中高表达。其次,

miRNA 的提取及检测过程需要规范化,包括样品获取和处理方法、检测平台及数据分析。用于肺癌早期诊断的 miRNA 相关临床研究多为单中心研究,且样本量偏少,导致研究结果的可重复性差,目前尚需大量临床研究数据对 miRNA 早期诊断肺癌的特异性进行论证。

2.4. 甲基化

在肺癌的早期诊断中,甲基化作为一种表观遗传学标记,已显示出在良恶性肺结节鉴别诊断中的巨大潜力。通过高通量测序技术,研究人员能够分析血浆样本中的甲基化特征,从而为肺结节的良恶性提供更为准确的诊断依据[29]。在一项研究中,针对 389 名肺结节患者的血浆样本进行了靶向 DNA 甲基化测序,结果显示该模型在独立验证样本中达到了 0.843 的接收者操作特征曲线(ROC-AUC),显示出良好的诊断性能[29]。此外,该研究还表明,甲基化测试在不同类型的肺结节中均表现出较高的敏感性和阴性预测值,尤其是在早期恶性肿瘤的识别上具有显著优势[29]。结合甲基化检测与其他生物标志物和影像学特征的综合模型,能够进一步提高对小型肺结节(如 5~10 毫米)良恶性的区分能力[30]。这种多模态的诊断方法不仅提高了诊断的准确性,还可能减少不必要的侵入性检查,从而改善患者的临床管理[30]。

DNA 甲基化检测技术随着表观遗传学及分子生物学技术的发展得到了快速发展。高通量的检测方法可以同时检测更多位点的甲基化,DNA 甲基化研究能够提高早期肺癌的检出率。制定规范的甲基化检测技术标准有利于该技术进一步的临床应用。

2.5. 细胞外囊泡和颗粒(EVP, Extracellular Vesicle and Particle)

EV 是由细胞分泌的含有蛋白质、脂质和核酸的小囊泡,能够反映肿瘤的生物特性。EV 在肺结节诊断中的应用也逐渐受到关注。有研究利用肿瘤组织 DNA 和细胞外囊泡(EV) DNA 验证 21 基因组,发现带有 EV DNA 的 21 基因面板可以在短时间内识别恶性肺结节,同时保持患者可负担性。该研究还开发了一个诊断列线图模型,用于评估侵袭性腺癌(IAC)的风险,为医疗决策提供有价值的见解[31]。另一研究开发了一种名为 DECODE 的单分子分辨率数字 sEV 计数检测芯片,该芯片能够分析与肺癌相关的 sEV 生物标志物的表达,从而区分恶性和良性肺结节[32]。在 33 人的队列研究中,DECODE 技术揭示了 sEV 的特异性分子谱,能够以较高的准确率(AUC=0.85)区分恶性和良性肺结节,显示出在肺癌筛查中对肺结节进行非侵入性表征的潜力[32]。这些研究表明,EVs 作为一种液体活检的生物标志物,在良恶性肺结节的诊断中具有重要的应用前景。

3. 液体活检联合影像学诊断良恶性肺结节

3.1. 液体活检联合临床特征、CT 特征

低剂量螺旋 CT (LDCT)是当前早期肺癌的主要筛查手段,但存在一定的局限性。CTCs 检测技术通过捕捉血液中的肿瘤细胞,分析其数量和分子特征,辅助诊断肺结节的良恶性。例如,一项多中心研究中,研究者探讨了临床影像学特征联合 CTCs 建立的预测模型对肺实性结节良恶性诊断的价值。结果表明,CTCs 的数量、胸膜凹陷征、分叶征、毛刺征是肺实性结节的独立危险因素,Nomogram 预测模型的 AUC 为 0.888,结果优于影像学特征预测模型(AUC: 0.853),CTCs 单独模型(AUC: 0.699) [9]。CTCs 与 LDCT 的联合使用在预测恶性孤立性肺结节的病理浸润方面,显示出比单独使用 LDCT 更高的准确性。CTCs 的检测结果与肺腺癌的 LDCT 肿瘤最大径、病理分期、淋巴结转移呈正相关[33]。联合使用 ctRNA 和其他生物标志物,如肿瘤标志物,可以提高肺癌筛查和诊断的阳性率和准确率。复旦大学附属中山医院白春学教授牵头开发的基于中国肺癌诊断生物标志物谱(LCBP)预测模型,采用肿瘤标志物的联合指标,结合患者年龄、性别、吸烟史,以及肺结节直径及边缘毛刺征等变量因素,对肺结节进行危险分层,其敏感

度为 94.6%，特异度为 94.2% [6]。

3.2. 液体活检联合影像组学

液体活检和影像组学在肺结节的良恶性诊断中展现出了巨大的潜力和互补优势。通过结合这两种技术，可以提高对肺结节性质的判断准确性。在一项研究中，戴纪刚教授团队开展了肺结节患者外周血多组学数据的联合分析，通过构建基于液体活检的多组学联合模型，进一步提高了早期肺癌的诊断准确率。该研究显示，通过结合游离 DNA 的甲基化和基因突变组学数据，连同传统的肿瘤标志物数据和临床特征，可以有效地降低肺结节 CT 筛查的假阳性率[34]。此外，对肺结节患者 8~10 mL 外周静脉血样本进行靶向 DNA 甲基化测序，通过将深度学习以及传统机器学习算法相结合，成功开发出一个具有 100 个甲基化标志物的肺结节良恶性诊断模型 PulmoSeek，并对其进行了全国多中心验证：该模型的 AUC 为 0.84、准确率为 80.0%。在此基础上，创造性地将肺结节患者的临床、CT 影像学数据与甲基化标志物模型 PulmoSeek 进行有机结合，开发出全球首个肺结节“甲基化液体活检 + CT 影像学 AI”联合诊断系统 PulmoSeek Plus，该系统一方面可对肺结节良恶性进行精准诊断，模型在 258 个验证样本集的 AUC 为 0.91 (95% CI: 0.87~0.95)、准确率为 90.3% (95% CI: 0.87~0.94)，较单纯甲基化液体活检模型或影像 AI 模型均有明显优势；另一方面可对高风险肺结节的浸润程度(原位癌、微浸润癌、浸润癌)进行精准预分期，其整体准确率为 85.8% [30]。一项前瞻性多中心研究开发了基于 ctDNA 甲基化的非侵入性模型“LUNG-TRAC”，用于肺结节的风险分层。该模型在验证集中的 AUC 为 0.810，敏感性为 74.4%，特异性为 73.7% [34]。基于液体活检的综合肺癌筛查和管理系统——PKU-LCSMS，整合了基于血液多组学检测的肺癌筛查模型和 AI 辅助肺结节诊断模型，提高了肺结节良恶性鉴别的准确性[35]。

4. 展望

虽然液体活检技术在肺良恶性结节诊断中展现了巨大的潜力，但仍面临一些挑战。首先，液体活检的灵敏度和特异性在不同的研究中存在差异，这可能与样本处理、检测方法和数据分析等因素有关。其次，液体活检的标准化和规范化仍需进一步完善，以确保其在临床应用中的可靠性和可重复性。液体活检技术也带来了许多机遇。随着技术的不断进步，液体活检的检测灵敏度和特异性将进一步提高。液体活检与影像学相结合，提供更全面的诊断信息，提高肺结节良恶性鉴别的准确性。液体活检技术在肺结节诊断中的应用前景广阔。首先，液体活检可以用于肺结节的早期筛查和诊断，帮助医生及时发现和治疗肺癌。其次，液体活检可以用于评估治疗效果和监测疾病进展，帮助医生制定个体化的治疗方案。此外，液体活检还可以用于预测疾病的预后，帮助医生评估患者的生存率和复发风险。液体活检的临床应用研究将进一步深入。例如，液体活检在肺结节诊断中的应用研究将进一步扩大样本量，验证其在不同人群中的适用性和有效性。液体活检生物标志物及其联合影像学在良恶性肺结节诊断中的应用前景广阔。

参考文献

- [1] Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., et al. (2024) Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **74**, 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- [2] Lin, Y., Leng, Q., Jiang, Z., Guarnera, M.A., Zhou, Y., Chen, X., et al. (2017) A Classifier Integrating Plasma Biomarkers and Radiological Characteristics for Distinguishing Malignant from Benign Pulmonary Nodules. *International Journal of Cancer*, **141**, 1240-1248. <https://doi.org/10.1002/ijc.30822>
- [3] 孙硕, 王锋, 何立, 杨文文, 韩彪, 赵蒙蒙, 陈昶, 马敏杰. 液体活检生物标志物及其联合影像学在肺癌早期诊断中应用的研究进展[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2023, 30(2): 313-319.
- [4] 中华医学会检验医学分会分子诊断学组. 循环肿瘤细胞临床应用与实验室检测专家共识[J]. 中华检验医学杂志,

- 2021, 44(11): 1008-1020.
- [5] 李凯迪, 梁乃新, 刘洪生, 李力, 黄诚, 秦应之, 韩志军, 邢钟兴, 刘磊, 徐源, 徐慧慧, 杨延莲, 彭佳茜, 霍力, 李方, 胡志远, 李单青. 基于多肽的循环肿瘤细胞纳米磁珠检测对肺部结节的鉴别诊断价值[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2018, 25(7): 560-566.
- [6] Liu, B., Huang, L., Cao, Y., Tan, Q.L., Wang, Y.L. and Guo, Q.N. (2020) Application of Folate Receptor-Positive Circulating Tumor Cells in Auxiliary Diagnosis of Malignant Pulmonary Nodules. *Journal of Third Military Medical University*, **43**, 2330-2335.
- [7] Zhong, M., Zhang, Y., Pan, Z., Wang, W., Zhang, Y., Weng, Y., *et al.* (2021) Clinical Utility of Circulating Tumor Cells in the Early Detection of Lung Cancer in Patients with a Solitary Pulmonary Nodule. *Technology in Cancer Research & Treatment*, **20**. <https://doi.org/10.1177/15330338211041465>
- [8] Duan, X., Liu, Z. and Xu, S. (2017) Research Progresses of Circulating Tumor Cells in Diagnosis and Treatment of Early Lung Cancer. *Chinese Journal of Lung Cancer*, **20**, 703-709. (In Chinese)
- [9] 尤培林, 丁运, 郭天兴, 等. 循环肿瘤细胞联合低剂量螺旋 CT 对恶性孤立性肺结节病理浸润的预测价值[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(2): 360-363.
- [10] Duan, G., Zhang, X., Wang, H., Wang, Z., Zhang, H., Yu, L., *et al.* (2020) Circulating Tumor Cells as a Screening and Diagnostic Marker for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *OncoTargets and Therapy*, **13**, 1931-1939. <https://doi.org/10.2147/ott.s241956>
- [11] Kang, B.J., Ra, S.W., Lee, K., Lim, S., Son, S.H., Ahn, J., *et al.* (2020) Circulating Tumor Cell Number Is Associated with Primary Tumor Volume in Patients with Lung Adenocarcinoma. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, **83**, 61-70. <https://doi.org/10.4046/trd.2019.0048>
- [12] Yao, H., Wang, Z., Yang, J., Xu, X. and Song, Y. (2021) Simultaneous in Situ Detection of Protein Expression of Multiple Tumor Markers of Circulating Tumor Cells and Heteroploid of Chromosome 8 in Primary Lung Cancer. *Annals of Translational Medicine*, **9**, 1772-1772. <https://doi.org/10.21037/atm-21-6346>
- [13] Ulivi, P. and Silvestrini, R. (2013) Role of Quantitative and Qualitative Characteristics of Free Circulating DNA in the Management of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Cellular Oncology*, **36**, 439-448. <https://doi.org/10.1007/s13402-013-0155-3>
- [14] Khatami, F. and Tavangar, S.M. (2018) Circulating Tumor DNA (ctDNA) in the Era of Personalized Cancer Therapy. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, **17**, 19-30. <https://doi.org/10.1007/s40200-018-0334-x>
- [15] Zhang, L., Liang, Y., Li, S., Zeng, F., Meng, Y., Chen, Z., *et al.* (2019) The Interplay of Circulating Tumor DNA and Chromatin Modification, Therapeutic Resistance, and Metastasis. *Molecular Cancer*, **18**, Article No. 36. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0989-z>
- [16] Iwahashi, N., Sakai, K., Noguchi, T., Yahata, T., Toujima, S., Nishio, K. and Ino, K. (2018) A Comprehensive Gene Mutation Analysis of Liquid Biopsy Samples from Patients with Metastatic Colorectal Cancer to the Ovary: A Case Report. *Oncology Letters*, **16**, 6431-6436.
- [17] Hofman, P. (2020) Liquid Biopsy for Lung Cancer Screening: Usefulness of Circulating Tumor Cells and Other Circulating Blood Biomarkers. *Cancer Cytopathology*, **129**, 341-346. <https://doi.org/10.1002/cncy.22367>
- [18] Gassa, A., Fassunke, J., Schueten, S., Kuhlmann, L., Scherer, M., Qien, J., *et al.* (2021) Detection of Circulating Tumor DNA by Digital Droplet PCR in Resectable Lung Cancer as a Predictive Tool for Recurrence. *Lung Cancer*, **151**, 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.10.019>
- [19] Soria-Comes, T., Palomar-Abril, V., Ureste, M.M., Guerola, M.T. and Maiques, I.C.M. (2019) Real-World Data of the Correlation between EGFR Determination by Liquid Biopsy in Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) and the EGFR Profile in Tumor Biopsy. *Pathology & Oncology Research*, **26**, 845-851. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00628-x>
- [20] Campos-Carrillo, A., Weitzel, J.N., Sahoo, P., Rockne, R., Mokhnatkin, J.V., Murtaza, M., *et al.* (2020) Circulating Tumor DNA as an Early Cancer Detection Tool. *Pharmacology & Therapeutics*, **207**, Article ID: 107458. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107458>
- [21] Yu, H., Wang, Y., Yu, Q., Zhang, H., Ma, W., Shang, S. and Wang, D. (2015) Significance of Plasma Hepatocyte Growth Factor in Diagnosis of Benign and Malignant Solitary Pulmonary Nodules. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **8**, 2063-2067.
- [22] Liu, D., Mao, Y. and Ma, H. (2021) Value of Circulating Tumor Cells in the Diagnosis and Treatment of Solitary Pulmonary Nodules. *Annals of Translational Medicine*, **9**, 501-501. <https://doi.org/10.21037/atm-21-889>
- [23] Xu, S., Luo, J., Tang, W., Bao, H., Wang, J., Chang, S., *et al.* (2024) Detecting Pulmonary Malignancy against Benign Nodules Using Noninvasive Cell-Free DNA Fragmentomics Assay. *ESMO Open*, **9**, Article ID: 103595. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2024.103595>

- [24] Jiang, W., Phillips, S.A., Newbury, R.O., Naheedy, J.H. and Newfield, R.S. (2021) Diagnostic Utility of Fine Needle Aspiration Cytology in Pediatric Thyroid Nodules Based on Bethesda Classification. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, **34**, 449-455. <https://doi.org/10.1515/jpem-2020-0645>
- [25] Jee, Y.H., Celi, F.S., Sampson, M., Sacks, D.B., Remaley, A.T., Kebebew, E., *et al.* (2015) Midkine Concentrations in Fine-Needle Aspiration of Benign and Malignant Thyroid Nodules. *Clinical Endocrinology*, **83**, 977-984. <https://doi.org/10.1111/cen.12676>
- [26] Li, J., Xia, T., Yang, X., Dong, X., Liang, J., Zhong, N., *et al.* (2018) Malignant Solitary Pulmonary Nodules: Assessment of Mass Growth Rate and Doubling Time at Follow-Up CT. *Journal of Thoracic Disease*, **10**, S797-S806. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.04.25>
- [27] Zhang, M. and Lin, O. (2016) Molecular Testing of Thyroid Nodules: A Review of Current Available Tests for Fine-Needle Aspiration Specimens. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **140**, 1338-1344. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0100-ra>
- [28] Zhou, Y., Gong, G., Wang, H., Habibabady, Z.A., Lang, P., Hales, R., *et al.* (2019) Transthoracic Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Solid, Subsolid, and Partially Calcified Lung Nodules: A Retrospective Study from a Single Academic Center. *CytoJournal*, **16**, 16. https://doi.org/10.4103/cytojournal.cytojournal_43_18
- [29] Liang, W., Chen, Z., Li, C., Liu, J., Tao, J., Liu, X., *et al.* (2021) Accurate Diagnosis of Pulmonary Nodules Using a Noninvasive DNA Methylation Test. *Journal of Clinical Investigation*, **131**, e145973. <https://doi.org/10.1172/jci145973>
- [30] Yang, M., Yu, H., Feng, H., Duan, J., Wang, K., Tong, B., *et al.* (2024) Enhancing the Differential Diagnosis of Small Pulmonary Nodules: A Comprehensive Model Integrating Plasma Methylation, Protein Biomarkers, and LDCT Imaging Features. *Journal of Translational Medicine*, **22**, Article No. 984. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05723-5>
- [31] Song, C., Sun, Y., Chen, Y., Shen, Y., Lei, H., Mao, W., *et al.* (2024) Differential Diagnosis of Pulmonary Nodules and Prediction of Invasive Adenocarcinoma Using Extracellular Vesicle DNA. *Clinical and Translational Medicine*, **14**, e1582. <https://doi.org/10.1002/ctm2.1582>
- [32] Li, J., Sina, A.A.I., Antaw, F., Fielding, D., Möller, A., Lobb, R., *et al.* (2022) Digital Decoding of Single Extracellular Vesicle Phenotype Differentiates Early Malignant and Benign Lung Lesions. *Advanced Science*, **10**, e2204207. <https://doi.org/10.1002/advs.202204207>
- [33] 中华医学会呼吸病学分会, 中国肺癌防治联盟专家组. 肺结节诊治中国专家共识(2024 年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2024, 47(8): 716-729.
- [34] He, J., Wang, B., Tao, J., Liu, Q., Peng, M., Xiong, S., *et al.* (2023) Accurate Classification of Pulmonary Nodules by a Combined Model of Clinical, Imaging, and Cell-Free DNA Methylation Biomarkers: A Model Development and External Validation Study. *The Lancet Digital Health*, **5**, e647-e656. [https://doi.org/10.1016/s2589-7500\(23\)00125-5](https://doi.org/10.1016/s2589-7500(23)00125-5)
- [35] Song, Z. and Liu, Y. (2018) Progress of Liquid Biopsy in Early Diagnosis of Lung Cancer. *Chinese Journal of Lung Cancer*, **21**, 620-627. (In Chinese)