

拉曼光谱分析癌变胃黏膜组织中蛋白质改变的研究*

陈瑶,代剑华,周学谦,刘云杰,袁月,彭贵勇[△]

(第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

摘要:目的 研究正常和癌变胃黏膜组织中蛋白质的拉曼特征峰的差异及其意义。方法 提取 12 例正常和癌变胃黏膜组织的蛋白质相关特征峰进行对比分析,结合统计学方法,观察癌变胃黏膜组织中蛋白质构型构象、氨基酸组成等改变。结果 和正常胃黏膜组织比较,癌变胃黏膜组织中蛋白质相关拉曼特征峰 758 cm^{-1} 、 879 cm^{-1} 、 938 cm^{-1} 、 1271 cm^{-1} 、 1660 cm^{-1} 等发生了不同程度的移位,蛋白质的氨基酸组成及空间构象等出现了改变;结合蛋白质特征峰的相对峰强进行 Fisher 判别分析,建立判别函数获得了 91.7% 准确判别率。结论 拉曼光谱是研究癌变胃黏膜组织中蛋白质分子的生化改变的新型有效手段,有助于胃癌的基础机制及临床诊疗研究。

关键词:拉曼光谱;胃肿瘤;蛋白质类

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)29-3875-04

A preliminary study of protein alterations accompanied with malignant transformation of gastric mucosa using Raman spectroscopy*

Chen Yao, Dai Jianhua, Zhou Xueqian, Liu Yunjie, Yuan Yue, Peng Guiyong[△]

(Institute of Digestive Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the difference of Raman characteristic peaks of protein in cancer and normal gastric tissues and its significance. **Methods** Raman peaks of protein from 12 cancer and normal tissues were analyzed. Combined with statistical analysis, the alteration of configuration, structure, amino acids composition of protein from malignant gastric tissues was further explored. **Results** Compared with the normal gastric tissues, Raman characteristic peaks like 758 cm^{-1} , 879 cm^{-1} , 938 cm^{-1} , 1271 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} shifted to higher or lower wave numbers in various degrees, which indicated that the composition of amino acids, conformation of protein had changed. Meanwhile, relative peak intensity of amino acids was applied in Fisher discriminate analysis and an accuracy of 91.7% was acquired from the established discrimination function. **Conclusion** Raman spectroscopy provides an effective approach in studying molecular biochemical alterations accompanied with malignant transformation of gastric mucosa, which makes a contribution to fundamental mechanism research, clinical diagnosis as well as treatment of gastric cancer.

Key words: raman spectroscopy; stomach neoplasms; proteins

胃癌是我国第 3 位最常见的恶性肿瘤,严重威胁着人类的生命健康。2008 年全球新发胃癌约 100 万,我国占 47%^[1]。胃癌的发生伴随着组织内部蛋白质、脂质、核酸等大分子物质的生化改变,而胃黏膜组织癌变相关的蛋白质差异是目前研究的热点。目前蛋白质的研究方法主要有 X 线晶体衍射、多维核磁共振衍射技术、二维电泳、质谱法、蛋白质组学等。但这些研究方法都是在细胞破坏后提取蛋白进行研究,无法在完整组织细胞中进行蛋白质原位、天然状态下的研究。X 线晶体衍射只能研究结晶蛋白质,多维核磁共振衍射技术只能研究水溶液状态下的分子质量小于 35×10^3 的蛋白质,二维电泳难以分析疏水性、低丰度蛋白质。拉曼光谱是一种基于非弹性散射的光谱,起源于分子内部化学键、官能团的振动。人体组织的拉曼光谱可以反映癌变组织内部分子化学键、官能团的改变,测定便捷、无损,不需要破坏组织细胞,可以在大分子物质原位、活性状态下进行研究。

研究表明,胃癌、肾癌、皮肤癌等人体癌组织的拉曼光谱不同于正常组织,目前通过正常和癌变组织的差异光谱鉴别诊断

癌变的研究较多,而通过拉曼特征峰分析癌变组织内部的蛋白质的研究极少。Zhuang 等^[2]发现正常肾脏组织中蛋白质络氨酸残基是隐蔽的,以保持蛋白质结构的稳定,而在肾脏肿瘤中,络氨酸残基变为暴露。Chen 等^[3]通过 1005 cm^{-1} 、 1640 cm^{-1} 、 1662 cm^{-1} 、 785 cm^{-1} 等拉曼特征峰分析发现子痫前期孕妇胎盘中蛋白质 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角是叠加的,推测蛋白质的结构变得紊乱。酪氨酸和色氨酸的吡咯环的振动较正常组织增强,提示蛋白质分子有序的氨基酸主链减少了,氨基酸侧链出现明显损伤。Taniguchi 等^[4]研究发现,和非吸烟妇女相比,绝经前吸烟妇女的唾液中黏蛋白减少了,并通过交联二硫键的拉曼峰强峰位分析,发现吸烟者的唾液含有更多的氧化形式的蛋白质,推测可能是由于氧自由基改变了黏蛋白的糖及蛋白质部分。

因此,作者对正常和癌变胃黏膜组织中的蛋白质特征峰进行研究,通过拉曼光谱分析癌变胃黏膜组织中蛋白质的改变,以为胃癌发生、进展过程中蛋白质的构象特征、功能发挥研究及胃癌的蛋白分子靶点研究、药物治疗、检测诊断等提供新

* 基金项目:国家自然科学基金项目资助(81272580)。 作者简介:陈瑶(1987-),住院医师,硕士,主要从事消化道肿瘤的拉曼光谱研究。

[△] 通讯作者, E-mail: pgy63@163.com。

的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 测定的 24 例胃组织样本均来自 2013 年 6 月至 2014 年 6 月于西南医院消化内镜中心行胃镜检查的患者。男 14 例,女 10 例,平均年龄(52.00±15.01)岁,样本采集前患者签署相关知情同意书,本研究已通过伦理委员会的审查。12 例正常胃黏膜组织分别来自全胃各部分,包括贲门、胃底、胃体、胃窦、幽门等。12 例癌变胃黏膜组织均来自已确诊的进展期腺癌患者。标本采集后立即置入 1.8 mL 冻存管封装后置入冰块保存,随即带至实验室进行拉曼光谱测定(测定时标本离体时间约 1 h)。

1.2 设备 英国 Renishaw 显微共焦拉曼光谱仪;二极管激光器,激发光波长 785 nm,波谱 200 cm⁻¹~4000 cm⁻¹,分辨率 1 cm⁻¹~2 cm⁻¹,最大激光功率 300 mw,光栅 1200/1800/2400。并配置有高性能的莱卡显微镜,三维样品台等。拉曼光谱光路图见图 1。

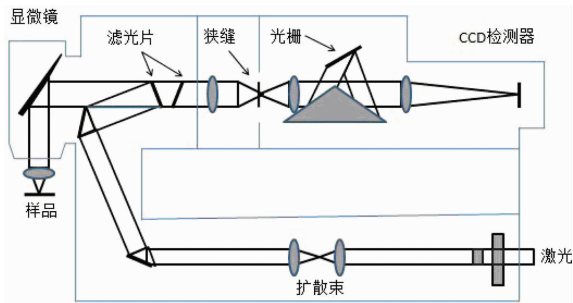


图 1 拉曼光谱光路图

1.3 拉曼光谱测定 检测前将标本取出置于玻片上室温自然解冻后行拉曼光谱采集。设定积分时间 30 s,累积次数 5 次,激发光功率 10%,光栅 1200,采集范围 200 cm⁻¹~2000 cm⁻¹。测定前用标准晶体硅片校准仪器,仪器校准后依次用 5、10、20、50、100 倍的显微镜进行观察并聚焦,聚焦完成后开启激光进行激发及拉曼散射采集。对每个样品任意选取 1 个点进行采集,共获得 24 个拉曼光谱图。

1.4 病理检查确诊 样本进行拉曼光谱测定后立即置入 10%甲醛溶液中固定。之后常规脱水、石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色、固定。并由经验丰富的病理医师阅片,再次确诊正常及癌变组织。

1.5 数据处理 所有原始数据均采用 NGS-Labspec 软件进行标准化及归一化处理,并查找特征峰(Loren 函数)。数据采用 Excel 软件进行汇总,计算平均光谱、平均强度、相对峰强等。采用 Graph Prism 进行绘图分析。参罗拉曼光谱谱峰归属,总结光谱中的蛋白质相关拉曼特征峰,进行表征意义分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。应用两独立样本的 *t* 检验比较正常和癌变胃黏膜组织中蛋白质特征峰相对峰强,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。并将主要的蛋白质拉曼特征峰相对强度进行 Fisher 判别分析检验,建立由此判别正常和癌变的判别函数,计算判别分析的准确率。

2 结果

2.1 正常和癌变胃黏膜组织的蛋白质拉曼特征峰比较 正常和癌变胃黏膜组织的拉曼特征峰丰富,参考相关文献,总结本次测定所获表征蛋白质的拉曼特征峰见表 1。蛋白质相关拉

曼特征峰 1004 cm⁻¹、853 cm⁻¹ 位置固定,表明仪器校正准确,拉曼位移有效。而 758 cm⁻¹、880 cm⁻¹、938 cm⁻¹、1252 cm⁻¹、1271 cm⁻¹、1606 cm⁻¹、1660 cm⁻¹ 发生了 1 cm⁻¹~8 cm⁻¹ 不同程度的移位。正常和癌变胃黏膜组织的平均拉曼光谱图见图 2,蛋白质特征峰的分布散点图见图 3。

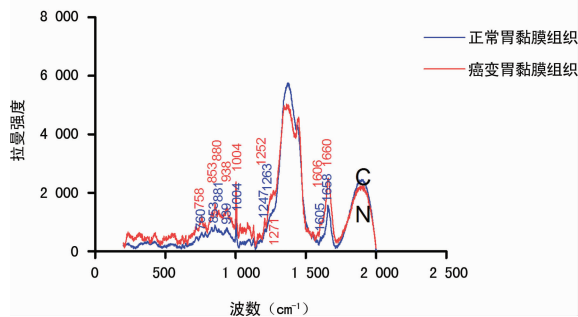


图 2 正常和癌变胃黏膜组织的平均拉曼光谱图

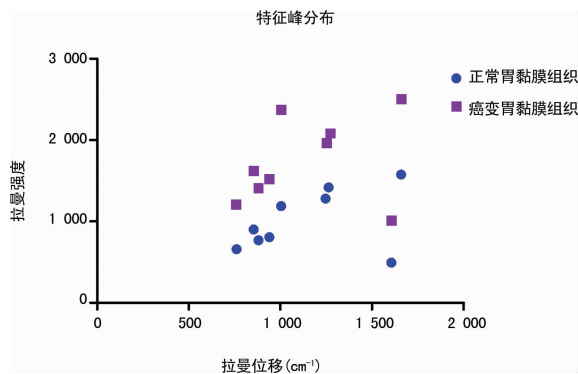


图 3 正常和癌变胃黏膜组织中相关蛋白质拉曼特征峰分布散点图

表 1 正常和癌变胃黏膜组织中蛋白质相关拉曼特征峰分布及其归属

癌变胃黏膜组织 (cm ⁻¹)	正常胃黏膜组织 (cm ⁻¹)	特征峰归属 ^[5-11]	生物分子来源
760	758	vs (咀嚼环呼吸)	色氨酸
853	853	v C-C 脯氨酸	蛋白质(胶原)
881	880	v C-C 羟脯氨酸	蛋白质(胶原)
939	938	v C-C 脯氨酸和缬氨酸(α 螺旋)	蛋白质(胶原)
1004	1004	v 环呼吸	苯丙氨酸、蛋白质
1247	1252	氨基化合物III(无规卷曲、转角)	—
1263	1271	氨基化合物III(α 螺旋)	—
1605	1606	v C=C 芳香族化合物	苯丙氨酸、酪氨酸
1658	1660	氨基化合物I, α 螺旋	蛋白质

v: 伸缩振动; vs: 对称性伸缩振动。—: 此项无数据。

2.2 蛋白质相关拉曼特征峰相对峰强及相对峰强比的两独立样本 *t* 检验情况 见表 2。

2.3 采用主要蛋白质氨基酸拉曼特征峰相对峰强的判别分析 将主要表征特定氨基酸的拉曼特征峰相对强度 $I_{758 \text{ cm}^{-1}}$ (色氨酸)、 $I_{853 \text{ cm}^{-1}}$ (脯氨酸)、 $I_{880 \text{ cm}^{-1}}$ (羟脯氨酸)、 $I_{1004 \text{ cm}^{-1}}$ (苯丙氨酸) 纳入 Fisher 判别分析, 设定 X_1 代表 $I_{758 \text{ cm}^{-1}}$, X_2 代表

$I_{853\text{ cm}^{-1}}$, X_3 代表 $I_{880\text{ cm}^{-1}}$, X_4 代表 $I_{1004\text{ cm}^{-1}}$ 。建立 Fisher 判别函数: $Y = -4.508 + 2.105X_1 - 2.634X_2 - 2.274X_3 + 5.13X_4$ ($\lambda = 0.304, P = 0.00$), 判别规则: $Y < 0$ 判归为胃癌, $Y > 0$ 判归为正常, 正确判别率为 91.7%。24 个光谱的 Fisher 判别分类结果见图 4。

表 2 相对峰强及相对峰强比的两独立样本 t 检验 ($\bar{x} \pm s$)

特征峰相对峰强比	相对峰强比(癌变/正常)	t	P
$I_{1252\text{ cm}^{-1}}/I_{1004\text{ cm}^{-1}}$	$(1.14 \pm 0.18)/(0.82 \pm 0.11)$	5.080	0.000
$I_{1271\text{ cm}^{-1}}/I_{1004\text{ cm}^{-1}}$	$(1.28 \pm 0.22)/(0.91 \pm 0.19)$	4.417	0.000
$I_{758\text{ cm}^{-1}}$	$(0.62 \pm 0.22)/(1.01 \pm 0.32)$	-3.602	0.002
$I_{853\text{ cm}^{-1}}$	$(0.85 \pm 0.23)/(1.37 \pm 0.54)$	-3.050	0.008
$I_{880\text{ cm}^{-1}}$	$(0.72 \pm 0.21)/(1.19 \pm 0.42)$	-3.504	0.003
$I_{1004\text{ cm}^{-1}}$	$(1.10 \pm 0.29)/(1.97 \pm 0.46)$	-5.521	0.000

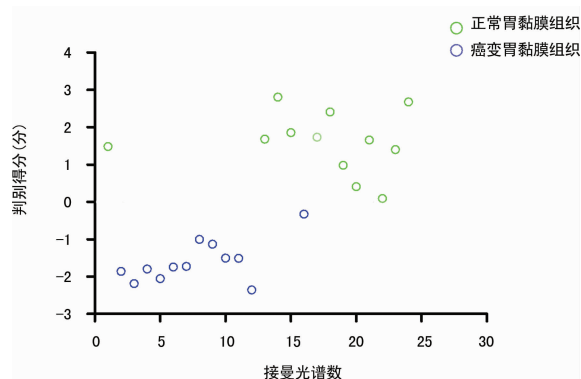


图 4 Fisher 判别结果散点图

2.4 病理再次确诊 所有经上述数判为癌变胃黏膜组织标本再次经病理确诊均为胃腺癌, 包括低、高、中分化; 正常胃黏膜组织病理未见明显异常。

3 讨论

蛋白质约占细胞干质量的 50% 以上, 且种类繁多, 不仅构成细胞的基本结构, 并担负着重要的生理代谢功能, 并且是反映基因信息的最佳分子物质。肿瘤的发生始于原癌基因的活化, 伴随着一系列复杂的蛋白质表达的改变, 如肿瘤细胞表面层黏连蛋白受体增加, 细胞间钙黏连蛋白减少, 而微管蛋白则与肿瘤的侵袭转移有关等^[12-13]。研究正常和癌变胃黏膜组织中的蛋白质差异, 有助于了解细胞分裂、增殖、分化、凋亡过程中蛋白质的动态变化。拉曼光谱不受水的干扰, 可以在细胞原位、活性状态下进行检测, 且能反映癌组织整体蛋白质的改变。蛋白质的拉曼光谱主要来自于氨基酸侧链的振动, 苯丙氨酸的苯环、色氨酸的吡咯烷环等可以产生强的谱带^[14]。蛋白质氨基酸组成、侧链振动的改变可以引起其拉曼光谱出现特征性改变。

3.1 癌变胃黏膜组织中蛋白质拉曼特征峰改变的分析研究

本实验结果提示蛋白质拉曼特征峰 758 cm^{-1} 、 880 cm^{-1} 、 938 cm^{-1} 发生了移位, 而拉曼特征峰的移动可分为“蓝移”与“红移”, 蓝移是指波数增加, 振动的能量增加, 提示振动更加稳定, 可能是引入了新的基因或周边基因的活化使其更加稳定; 红移则反之, 可能是基团的扭曲、暴露、活化等有关。氨基酸排列构成蛋白质的一级结构, 且其三维构象的形成也是由氨基酸排列

决定的。胃癌组织中拉曼振动的改变提示蛋白质的种类、结构等出现了改变。

特征峰 1004 cm^{-1} 来自于苯环的环呼吸振动, 1606 cm^{-1} 来自苯环的 C=C 振动, 都表征苯丙氨酸或酪氨酸。已知苯丙氨酸是组织中含量最丰富的氨基酸之一, 具有较大的疏水残基, 大多位于水溶性蛋白质的内部。胃癌组织中, 1606 cm^{-1} 移位到了 1605 cm^{-1} , 提示振动的能量降低, 可能是由于局部微环境改变, 如更多的苯丙氨酸被掩盖在蛋白质内部等。

特征峰 880 cm^{-1} 、 938 cm^{-1} 表征的是羟脯氨酸、脯氨酸, 而这两种氨基酸主要存在于胶原蛋白, 重复出现的甘氨酸-脯氨酸-X 模体是胶原三股螺旋特定空间构象所依赖的基础。胃癌组织中这两个特征峰均向高波数发生了移位, 提示振动更加稳定, 能量增加。已知胃癌组织的胶原主要为基底膜的 IV 型胶原, 癌细胞分泌金属蛋白酶降解胶原破坏基底膜以利转移。提示可能癌组织中胶原被降解以致更多的脯氨酸暴露和活化。

特征峰 758 cm^{-1} 表征色氨酸吡啉环的呼吸振动。已知色氨酸是疏水、非极性氨基酸, 胶原蛋白中色氨酸缺如, 因此 755 cm^{-1} 表征非胶原蛋白。癌组织中此特征峰移位到了 760 cm^{-1} , 振动一致性增加, 更加稳定, 提示胃癌组织的蛋白质中色氨酸与周边基团的作用、所处的电子环境更加稳定。

此外, 采用表征色氨酸 (758 cm^{-1})、脯氨酸 (853 cm^{-1})、羟脯氨酸 (880 cm^{-1})、苯丙氨酸 (1004 cm^{-1}) 的拉曼特征峰相对峰强进行 Fisher 判别分析, 建立了较好的判别函数, 并获得了较高的正确判别率, 表明正常和癌变胃黏膜组织中蛋白质氨基酸相对峰强存在明显差别, 通过氨基酸拉曼特征峰可以准确区分正常和癌变。进一步说明拉曼光谱可以用于胃黏膜组织癌变的监测、鉴别。

3.2 癌变胃黏膜组织中蛋白质二级结构拉曼特征峰改变的分析研究 蛋白质的二级结构主要包括 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角及无规则卷曲^[15], α 螺旋是多肽链最常见和最稳定的构象, 大多存在于球蛋白分子中。特征峰 1660 cm^{-1} 、 1271 cm^{-1} 、 1252 cm^{-1} 分别表征蛋白质的 α 螺旋、 β 转角, 在癌组织中分别移位到了 1558 cm^{-1} 、 1263 cm^{-1} 、 1247 cm^{-1} , 提示振动能量降低, 表明癌组织中多肽链中更多的 α 螺旋及 β 转角倾向于不稳定。此外, 相对峰强比 $I_{1271\text{ cm}^{-1}}/I_{1004\text{ cm}^{-1}}$ 和 $I_{1252\text{ cm}^{-1}}/I_{1004\text{ cm}^{-1}}$ 在癌变胃黏膜组织中明显大于正常胃黏膜组织 ($P < 0.05$), 已知在其他条件不变的情况下, 拉曼峰强度正比于官能团数目, 表明相对于苯丙氨酸的含量, 可能癌组织肽链中有更多的 α 螺旋及 β 转角形成或含此二级结构的肽链的数量增加。已知苯丙氨酸因为侧链结构极大, 形成较大的空间位阻而不利于局部二级结构的形成, 因此在 α 螺旋及 β 转角中相对少见。本研究进一步说明胃黏膜组织中各类蛋白质的种类、构象及相对含量较正常组织更加丰富和复杂。

本研究通过对 12 例正常和癌变胃黏膜组织中的蛋白质相关拉曼特征峰进行比较分析, 发现: (1) 和正常胃黏膜组织比较, 这些特征峰发生了不同程度的移位及强度增减, 提示胃癌组织中更多的苯丙氨酸被掩盖; 色氨酸所处环境更加稳定; 更多的脯氨酸暴露和活化; 胃癌组织的蛋白质有更多的 α 螺旋、 β 转角形成, 且二者的构象倾向于不稳定。(2) 采用表征氨基酸的特征峰相对强度 $I_{758\text{ cm}^{-1}}$ 、 $I_{853\text{ cm}^{-1}}$ 、 $I_{880\text{ cm}^{-1}}$ 、 $I_{1004\text{ cm}^{-1}}$ 可以建立较好的 Fisher 判别函数, 并获得了 91.3% 正确判别率, 说明通过拉曼光谱鉴别癌变是可行的。本研究证实了拉曼光谱在

蛋白质研究、肿瘤诊断中应用价值良好,拉曼光谱有助于胃癌发生发展机制研究,并为胃癌的分子诊断、药物靶向治疗、肿瘤标志物寻找等提供了新的依据。

参考文献:

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [2] Zhuang Z, Li N, Guo Z, et al. Study of molecule variations in renal tumor based on confocal micro-Raman spectroscopy[J]. *J Biomed Opt*, 2013, 18(3):31103.
- [3] Chen SJ, Zhang Y, Ye XP, et al. Study of the molecular variation in pre-eclampsia placenta based on micro-Raman spectroscopy[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2014, 290(5):943-946.
- [4] Taniguchi M, Iizuka J, Murata Y, et al. Multimolecular salivary mucin complex is altered in saliva of cigarette smokers; detection of disulfide bridges by Raman spectroscopy[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:168765.
- [5] Li SX, Chen QY, Zhang YJ, et al. Detection of nasopharyngeal cancer using confocal Raman spectroscopy and genetic algorithm technique[J]. *J Biomed Opt*, 2012, 17(12):125003.
- [6] Nemecek D, Stepanek J, Thomas GJ Jr. Raman spectroscopy of proteins and nucleoproteins[J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2013, Chapter 17:Unit17. 8.
- [7] Silveira L Jr, Leite KR, Silveira FL, et al. Discrimination of prostate carcinoma from benign prostate tissue fragments in vitro by estimating the gross biochemical alterations through Raman spectroscopy[J]. *Lasers Med Sci*, 2014, 29(4):1469-1477.
- [8] De Gelder J, De Gussem K, Vandenabeele P, et al. Reference database of Raman spectra of biological molecules [J]. *J Raman Spectrosc*, 2007, 38(9):1133-1147.
- [9] Sjöberg B, Foley S, Cardey B, et al. An experimental and theoretical study of the amino acid side chain Raman bands in proteins[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2014, 128:300-311.
- [10] Kurouski D, Postiglione T, Deckert-Gaudig TA, et al. Amide I vibrational mode suppression in surface (SERS) and tip (TERS) enhanced Raman spectra of protein specimens[J]. *Analyst*, 2013, 138(6):1665-1673.
- [11] Weymuth T, Reiher M. Characteristic raman optical activity signatures of protein beta-Sheets[J]. *J Phys Chem B*, 2013, 117(40):11943-11953.
- [12] Giarnieri E, De Francesco GP, Carico E, et al. Alpha- and beta-tubulin expression in rectal cancer development[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(5):3237-3241.
- [13] Niu Y, Wang Y, Yu Y, et al. Expression of alpha-tubulin and gamma-tubulin in premalignant lesion and carcinoma of breast and the significance there of[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2006, 86(1):56-60.
- [14] 张正行. 有机光谱分析[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009:74-79.
- [15] Henchey LK, Jochim AL, Arora PS. Contemporary strategies for the stabilization of peptides in the alpha-helical conformation[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12(6):692-697.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-09-22)

(上接第 3874 页)

参考文献:

- [1] 陈妙研,蔡建庭. EUS 在上消化道疾病诊治中的应用[J]. *国际消化病杂志*, 2007, 27(1):60-63.
- [2] Sakamoto H, Kitano M, Kudo M. Diagnosis of subepithelial tumors in the upper gastrointestinal tract by endoscopic ultrasonography[J]. *World J Radiol*, 2010, 2(3):289-297.
- [3] Kang JH, Lim JS, Kim JH, et al. Role of EUS and MDCT in the diagnosis of gastric submucosal tumors according to the revised pathologic concept of gastrointestinal stromal tumors[J]. *Eur Radiol*, 2009, 19(4):924-934.
- [4] Hata S, Arai M, Suzuki T, et al. Clinical significance of endoscopic ultrasound for gastric submucosal tumors[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2013, 37(2):207-212.
- [5] Sgouros SN, Bergele C, Avgerinos A, et al. Endoscopic ultrasonography in the diagnosis and management of portal hypertension. Where are we next? [J]. *Dig Liver Dis*, 2006, 38:289-295.
- [6] Kimmey MB, Martin RW, Haggitt RC, et al. Histologic correlates of gastrointestinal ultrasound images[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(4):433-441.
- [7] Caletti G, Fusaroli P, Bocus P. Endoscopic ultrasonography in large gastric folds[J]. *Endoscopy*, 1998(30):A72-75.
- [8] 曹艳,樊丽琳,孙文静,等. 不同注水方式在 160 例超声小探头对胃和食道检查中的应用[J]. *重庆医学*, 2013, 42(4):413-414.
- [9] Meister T, Domagk D, Heinzow HS, et al. Miniprobe endoscopic ultrasound accurately stages esophageal cancer and guides therapeutic decisions in the era of neoadjuvant therapy: results of a multicenter cohort analysis[J]. *Surg Endosc*, 2013, 27(8):2813-2819.
- [10] Mocellin S, Marchet A, Nitti D. EUS for the staging of gastric cancer: a meta-analysis[J]. *Gastrointest Endosc*, 2011, 73(6):1122-1134.

(收稿日期:2014-08-03 修回日期:2014-08-26)