

DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2016.02.006

医学影像物理

光纤和显微拉曼光谱结合化学计量学鉴别胃癌组织

易伟松¹, 钱辉跃¹, 江厚敏²

1. 华中农业大学理学院, 湖北 武汉 430070; 2. 武汉市黄陂区人民医院, 湖北 武汉 430300

【摘要】目的:胃癌具有高发生率、高死亡率的典型特征,是严重影响人类健康的重大疾病。拉曼光谱因其无损、快速、高灵敏性、高特异性,且易与各种探针有机结合可以实现原位、活体和实时检测等特征,极具医学临床应用潜力。研究光纤和显微拉曼光谱结合化学计量学方法鉴别胃癌组织的可行性及科学性。**方法:**分别利用光纤拉曼和显微拉曼光谱仪获取胃癌组织及正常组织的拉曼光谱,经过平滑、基线扣除及归一化等预处理后,结合化学计量学方法,以指纹范围(800~1700 cm⁻¹)的全波段拉曼光谱作为输入变量,进行主成分分析和聚类分析,同时以病理学诊断结果作为依据,从正确率、灵敏度和特异性等指标评价前述鉴别效果。**结果:**正常组织和癌变组织的拉曼光谱存在显著差异,拉曼光谱结合化学计量学方法鉴别诊断效果良好,显微拉曼光谱聚类分析的正确率、灵敏度和特异性分别为 90.0%、91.9% 和 88.9%;光纤拉曼光谱聚类分析的正确率、灵敏度和特异性分别为 87.8%、86.7% 和 88.9%。**结论:**拉曼光谱结合化学计量学能够鉴别胃癌组织,具有从原理到临床应用的一致性。

【关键词】光纤拉曼光谱;显微拉曼光谱;化学计量学;鉴别;胃癌

【中图分类号】R44;R735.2

【文献标识码】A

【文章编号】1005-202X(2016)02-0134-07

Fiber-optic and microscopic Raman spectroscopy combined with chemometrics for discrimination of gastric cancer tissue

YI Wei-Song¹, QIAN Hui-yue¹, JIANG Hou-min²

1. School of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. People's Hospital of Huangpi District, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective Gastric cancer is a major disease that seriously affects human health, with typical characteristics of high incidence and mortality. Raman spectroscopy has great potential for clinical application because it is non-destructive, rapid, with high sensitivity and specificity, and it can achieve the detection and diagnosis *in vivo*, *in situ* and real-time by easily integrating with various medical probes. To analyze the feasibility and scientificity of fiber-optic and microscopic Raman spectroscopy combined with chemometrics for the diagnosis of gastric cancer tissue. **Methods** The Raman spectrums of gastric cancer tissue and normal tissue were respectively obtained by fiber-optic and microscopic Raman spectroscopy. After the preprocess of smoothing, baseline elimination and normalization, combined with chemometrics, the Raman spectrums at the fingerprint range from 800 to 1700 cm⁻¹ were taken as input variables for the principal component analysis and cluster analysis. Based on the pathological diagnostic result, the diagnostic result of Raman spectroscopy combined with chemometrics was evaluated by analyzing the accuracy, sensitivity, specificity and so on. **Results** Significant differences were found between the Raman spectrum of gastric cancer tissue and that of normal tissue. The discrimination results of the Raman spectroscopy combined with chemometrics were satisfactory. The accuracy, sensitivity, specificity of microscopic Raman spectroscopy were respectively 90.0%, 91.9% and 88.9%, while those of fiber-optic Raman spectroscopy were respectively 87.8%, 86.7% and 88.9%. **Conclusion** Raman spectroscopy combined with chemometrics has a satisfactory result in the diagnosis of gastric cancer tissue, achieving the consistency of principle and clinical application.

Key words: fiber-optic Raman spectroscopy; microscopic Raman spectroscopy; chemometrics; discrimination; gastric cancer

【收稿日期】2015-09-20

【基金项目】湖北省自然科学基金(2014CFB476);中央高校基本科研业务费专项资金(2662015PY157;529020900206178);出国留学基金(201406765056)

【作者简介】易伟松(1977-),男,副教授.研究方向:生物医学光谱学. E-mail: weisong_yi@mail.hzau.edu.cn.

前言

拉曼光谱用于胃癌鉴别与诊断的研究10年有余^[1-2],从机理探讨到临床应用可谓包罗万象,其中,研究对象包括离体胃癌组织^[3-6]、胃癌细胞^[7-8]和胃癌活体^[9-15];研究手段包括傅立叶变换拉曼光谱^[1-2]、显微拉曼光谱^[7-8,16]和光纤拉曼光谱^[9-15]等。尽管上述研究结果都在一定程度上证实了拉曼光谱能够鉴别胃癌,但没有文献报道同时采用光纤拉曼和显微拉曼光谱研究胃癌组织。

从病理学研究角度讲,生物组分的拉曼光谱解析十分重要,但拉曼光谱应用于临床诊断研究,其数据的化学计量学处理与诊断模型的建立显得更为重要。为了将胃癌组织与正常组织区分开来,仅仅凭借经验方法(如单个或几个谱峰、峰面积、强度和形状)作为判断依据,有失偏颇。胃癌组织生物成分复杂、结构多样,应该采用拉曼光谱指纹波段的全光谱信息进行鉴别。已有文献报道采用多元统计分析拉曼光谱,其诊断效果优于经验分析方法^[11-15,17-20]。

本文采用近红外光纤拉曼光谱和显微拉曼光谱对离体胃癌组织和正常组织进行鉴别诊断研究。前者从宏观层次偏重临床应用,后者从微观层次偏重谱图解析和病理学机理探讨。对于获取的拉曼光谱,结合化学计量学方法,将整个指纹波段的全谱信息作为变量,对正常和肿瘤组织光谱进行分类,并比较两种拉曼光谱系统实验结果的异同,分析拉曼光谱诊断胃癌从原理到临床应用的一致性。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

在湖北省肿瘤医院和武汉市黄浦区人民医院征集到15例胃癌病人,他们均经受胃癌部分切除手术。这些病人概况如下:8男7女,平均年龄56岁,最大78岁,最小29岁。切除组织经生理盐水冲洗后,分别取大约1 cm²的胃癌组织及正常组织(肿瘤组织及正常组织由外科医生操作,并提供病理学诊断结果作为参考依据),其中正常组织作为对照组,共计30个样品。本项研究得到了医院伦理道德委员会批准,病人签署了知情同意书。

1.2 拉曼光谱仪及光谱获取

胃癌组织及正常组织的拉曼光谱获取顺序按照如下进行:首先采用便携拉曼光谱仪获取组织黏膜层拉曼光谱,标记后进行超薄切片,然后采用显微拉

曼仪获取组织切片黏膜层拉曼光谱,最后送病理学实验室检验^[17]。所有拉曼检测实验均采用金片作为衬底材料^[7]。

1.2.1 光纤拉曼光谱 光纤拉曼光谱仪,型号为Mini Raman (HORIBA Jobin Yvon, France),系统主要包括:近红外半导体激光器(785 nm),电子耦合器、分光系统及拉曼光纤探头。光纤探头外直径约为3.0 mm,光斑直径约为2.0 mm,取样面积约为3.0 mm²。高性能拉曼光纤探头能够远距离非破坏性获取生物医学样品的拉曼光谱信息,非常适合原位活体研究。

胃癌组织及正常组织样品黏膜层向上置于金片表面,光纤探头用夹具固定,其末端与组织黏膜紧密接触,模拟临床原位检测。激发波长处于近红外区域为785 nm,激发功率约为300 mW,通过光栅和滤光片后,实际照射到样品上的功率约为10 mW,信号采集时间为60 s,每个光谱来自5次扫描的累加值,扫描范围为800~1700 cm⁻¹,光谱分辨率为2 cm⁻¹,约有450个变量。30个样品,每个样品重复3次测量,共有90个光谱用于数据分析。光谱横坐标为拉曼位移,单位为波数;纵坐标为归一化拉曼强度。系统控制、光谱获取及光谱预处理(平滑和基线校准)均由系统自带的LabSpec软件完成。光谱数据以TXT格式输出,使用Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA)处理光谱数据。

1.2.2 显微拉曼光谱 显微拉曼光谱仪型号为HR800型(HORIBA Jobin Yvon, France)。激发波长选用785 nm,功率21 mW,通过光栅和滤光片后,实际照射到组织切片黏膜上的功率约为1 mW,光斑直径约2 μm,面积约为3 μm²。拉曼散射信号由50倍长焦镜头收集,共焦针孔为100 μm,光栅为600线,扫描光谱范围800~1700 cm⁻¹,光谱分辨率为2 cm⁻¹,约有450个变量。信号采集时间为30 s,累计扫描3次。在显微镜下先找到组织黏膜区域,每个样品重复3次测量,30个样品,共有90个光谱用于后期分析。系统控制、光谱获取及光谱预处理(平滑和基线校准)均由系统自带的LabSpec软件完成。光谱数据以TXT格式输出,使用Origin 8.0管理光谱数据。

1.3 光谱预处理和数据分析

利用系统自带软件LabSpec对原始光谱进行预处理,主要包括平滑、基线扣除等,以TXT格式输出,在Origin 8.0中进行归一化处理,光谱作图和光谱比较。

在Matlab R2010a(Math Work Inc, South Natick, MA, USA)中自编程序,对预处理后的光谱数据执行

主成分分析和聚类分析。以组织病理学诊断结果作为金标准,计算灵敏度、特异性和正确率,对拉曼光谱结合化学计量学鉴别胃癌组织的效果进行评价。

2 结果与讨论

2.1 平均光谱和归属

2.1.1 光纤拉曼光谱的平均光谱及其归属 图1表示光纤拉曼光谱获取同一病例的胃癌组织和正常组织的平均光谱,虚线和实线分别表示胃癌组织和正常组织光谱。从图中可以看出,在整个光谱范围内,除了1079 cm⁻¹以外,胃癌组织的拉曼光谱强度在整个拉曼位移范围内都比正常组织光谱强。胃黏膜组织由多种细胞组成,主要包括胃黏膜上皮细胞、壁细胞、酶原细胞及其它类型的细胞和胞间质,结构的复杂性为拉曼峰的具体归属带来困难。但总的来说,不论是癌变组织还是正常黏膜组织,其主要谱带都来自蛋白质和脂类^[5-7]。主要拉曼光谱峰位于875、930、1079、1176、1272、1300、1456、1520和1672 cm⁻¹,归属结果如表1所示^[3,7,11,17,21]。其中,不论正常组织还是胃癌组织在1078 cm⁻¹处都有最强拉曼峰,主要是光纤的拉曼本底信号,也有组织的拉曼信号(从显微拉曼光谱中可以观察到)。利用拉曼光纤探头直接获取金片拉曼光谱(图2),唯一较强拉曼信号位于1078 cm⁻¹附近,表明它是光纤本底信息,而金片本身没有拉曼散射信号^[7]。

图1中位于1520 cm⁻¹附近的拉曼峰应归属为类胡萝卜素C=C振动。Shen^[7,21]曾以514.5 nm 波长激

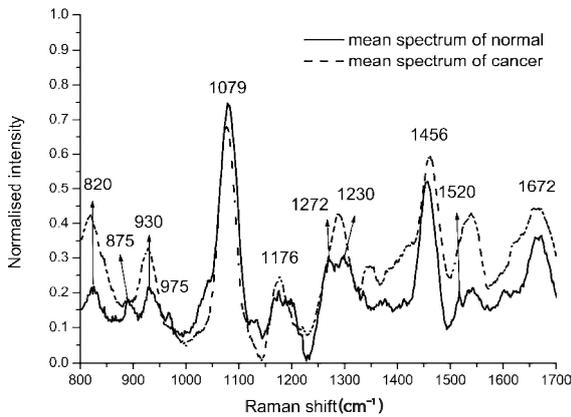


图1 胃癌组织(虚线)和正常组织(实线)的平均光谱(光纤拉曼光谱)

Fig.1 Mean spectrums of gastric cancer tissue and normal tissue by using fiber-optical Raman spectroscopy

Note: The dotted line and dash line were respectively the mean spectrum of gastric cancer tissue and normal tissue.

表1 拉曼光谱位移及归属

Tab.1 Raman shift and assignment

Raman shift (cm ⁻¹)	Assignment
875	(-C-C-) stretching of hydroxyproline
930	(-C-C-) stretching of proteins
1010	(-C-C-) vibrating of ring breathing or phenylalanine
1079	(-C-C-) vibrating of lipids or background of fiber
1160	(-C-C-) stretching of carotenoid
1176	vibrating of hemoglobin
1272	Amide III
1300	Amide III
1456	d CH2 (CH3)
1520/1525	(-C=C-) stretching of carotenoid
1672	Amide I

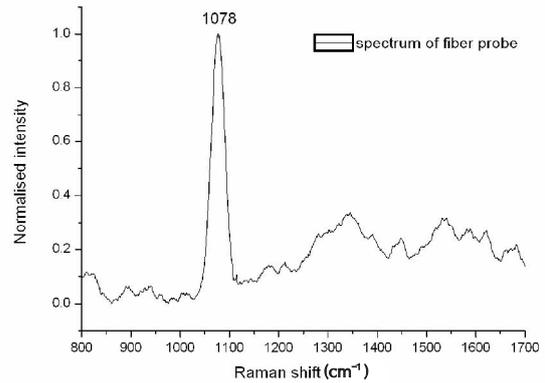
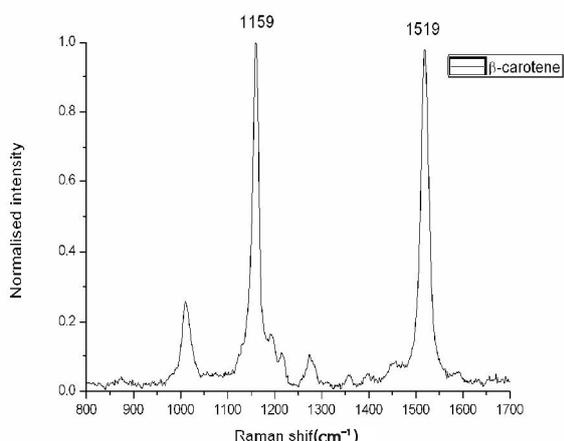


图2 光纤拉曼光谱本底信号

Fig.2 Spectrum of fiber probe

光激发胃癌组织及正常组织切片,产生共振拉曼效应,观察到较强类胡萝卜素的拉曼信号,并讨论了组织癌变前后类胡萝卜素在胃黏膜组织中的含量即类胡萝卜素体内代谢等问题,并且认为胃癌组织中类胡萝卜素含量(特别是β-胡萝卜素)比正常组织中含量要高。这里用光纤拉曼获取纯β-胡萝卜素的拉曼光谱,特征拉曼峰位于1159和1519 cm⁻¹附近(图3)。以785 nm 波长激光激发拉曼效应,在胃癌组织和正常组织拉曼光谱中也观察到类胡萝卜素的特征拉曼信号。但是,Duraipandian 等人^[11]以785 nm 波长激光激发胃癌组织及正常组织的拉曼效应,却没有观察到明显的类胡萝卜素的特征拉曼信号。可能原因是活体获取组织拉曼光谱受生理环境干扰所致。

图3 β -胡萝卜素的光纤拉曼光谱Fig.3 Fiber-optic Raman spectrum of β -carotene

2.1.2 显微拉曼光谱的平均光谱及其归属 图4为显微拉曼光谱获取的同一病例胃癌组织和正常组织的平均光谱,虚线和实线分别表示胃癌组织和正常组织光谱。主要拉曼光谱峰位于 877、1080、1160、1272、1308、1446、1525 和 1662 cm^{-1} ,光谱归属结果(表1)。

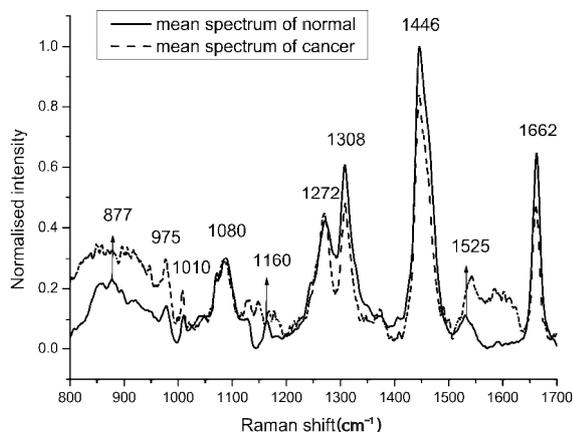


图4 胃癌组织(虚线)和正常组织(实线)的平均光谱(显微拉曼光谱)

Fig.4 Mean spectrum of gastric cancer tissue and normal tissue by using microscopic Raman spectroscopy

Note: The dotted line and dash line were respectively the mean spectrum of gastric cancer tissue and normal tissue.

从图中可以看出,位于 1308、1446 和 1662 cm^{-1} 处胃癌组织的平均光谱强度较正常组织的强,其它的都较弱。这在一定程度上表明胃癌组织相对正常组织而言,蛋白质含量更高,而脂肪含量更低^[5]。在 1080 cm^{-1} 处也观察到拉曼峰,显微拉曼光谱中没有使用光纤传导光,应该归属为脂肪 C-C 振动^[7]。在 1160、1525 cm^{-1} 处的拉曼峰归属为 β -胡萝卜素的拉

曼光谱(图3)。比较 1525 cm^{-1} 处拉曼峰强度,发现胃癌组织的拉曼光谱信号比正常组织强,证实了胃癌组织与正常组织中类胡萝卜素(特别是 β -胡萝卜素)含量存在差异。为了支持这一推论,采用高效液相色谱定量分析胃癌组织和正常组织类胡萝卜素(特别是 β -胡萝卜素)含量,结果得到印证。

2.2 主成分分析

胃癌组织及正常组织结构复杂、物质种类繁多,拉曼光谱变量多,数据量大,信息丰富,如果仅仅依据某个拉曼峰的位置、形状和强度进行正常及异常判别有失偏颇,应该采用全光谱信息进行评判。随着化学计量学及计算机技术的发展,主成分分析和聚类分析等非监督分类方法在拉曼光谱分析中广泛使用^[22-23]。

2.3 显微拉曼光谱主成分分析

主成分散点图常常用于揭示一组数据中的模式或类型。以特征指纹 800~1700 cm^{-1} 区域作为输入,对所有胃癌组织及正常组织的显微拉曼光谱,进行主成分分析,前2个主成分的累积方差贡献率高于80%,能够完全反映原始数据的信息,得到第一主成分对第二主成分散点图(图5)。可以观察到光谱数据被聚类为两个截然不同的类型,这表明胃癌组织与正常组织的成分及结构差异可以利用拉曼光谱来区分。也可以注意到胃癌组织的拉曼光谱更加分散,表明不同肿瘤组织差异性较大,可能原因是肿瘤

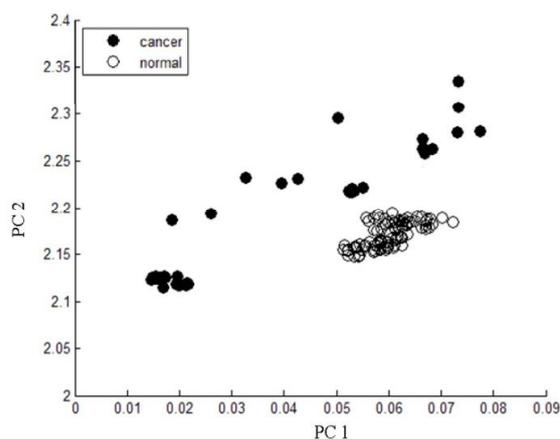
图5 显微拉曼光谱PC1对PC2的散点图(所有光谱采用平滑+基线+归一化处理,波长范围800~1700 cm^{-1})

Fig.5 Scatter diagram of PC1 and PC2 of microscopic Raman spectra

Note: All the spectra were processed by smoothing, baseline elimination and normalization. The wavelength ranged from 800 to 1700 cm^{-1} .

处于不同发展状态;正常组织的光谱更加集中,表明所有正常组织具有更加一致的化学成分。

2.4 光纤拉曼光谱主成分分析

图6表示光纤拉曼光谱的第一主成分对第二主成分散点图,其中前2个主成分的累积方差贡献率高于80%,能够完全反映原始数据的信息。从中可以观察到光谱数据也能够被聚类为两个界限清晰的类型,这表明肿瘤组织与正常组织的成分及结构差别可以利用拉曼光谱来表征。光谱分散程度与图5情况一致。表明从不同层次和尺度获取的胃癌组织及正常黏膜组织的拉曼光谱具有高度一致性。

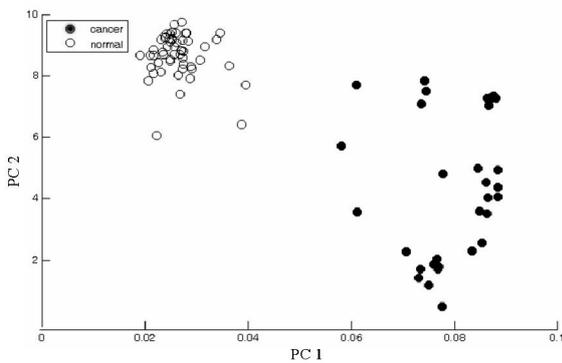


图6 光纤拉曼光谱PC1对PC2的散点图(所有光谱采用平滑+基线+归一化处理,波长范围800~1700 cm⁻¹)

Fig.6 Scatter diagram of PC1 and PC2 of fiber-optic Raman spectrums

Note: All the spectrums were processed by smoothing, baseline elimination and normalization. The wavelength ranged from 800 to 1700 cm⁻¹.

系统聚类中,依据相似性或差异性将光谱分为群或类,并以系统树图呈现聚类结果。以组织病理学诊断结果作为评价依据,从正确率、灵敏度和特异性三个方面分类效果进行评价。

3.1 显微拉曼光谱聚类分析

以特征指纹800~1700 cm⁻¹区域作为输入,对所有胃癌组织及正常组织的显微拉曼光谱进行系统聚类分析,以系统树图呈现聚类结果(图7),可以明显观察到所有光谱分为两大类。

为了评价显微拉曼光谱鉴别胃癌组织及正常组织的效果,将组织病理学检查结果作为诊断金标准,灵敏度、特异性和正确率作为具体指标。利用系统聚类方法分析所有显微拉曼光谱的正确率、灵敏度和特异性分别为90.0%、91.9%和88.9%,聚类效果很好。结果表明显微拉曼光谱结合化学计量学手段可以用于胃癌组织鉴别。

3.2 光纤拉曼光谱聚类分析

仍然以特征指纹800~1700 cm⁻¹区域作为聚类分析的输入,对所有胃癌组织及正常组织的光纤拉曼光谱进行系统聚类分析,以系统树图呈现聚类结果(图8),也可以观察到所有光谱分为两大类(图中最右边的两个光谱可能是实验误差原因造成的结果)。利用系统聚类方法分析所有光纤拉曼光谱的正确率、灵敏度和特异性分别为87.8%、86.7%和88.9%(没有考虑两个实验误差光谱)。光纤拉曼光谱聚类分析效果比显微拉曼光谱聚类分析效果相差无几,结果表明光纤拉曼光谱结合化学计量学也可以用于胃癌组织鉴别,临床应用潜力巨大。

显微拉曼光谱和光纤拉曼光谱从不同尺度都得到了胃癌组织和正常组织拉曼信号。对两种光谱系

3 聚类分析

聚类分析方法众多,本实验采用系统聚类。在

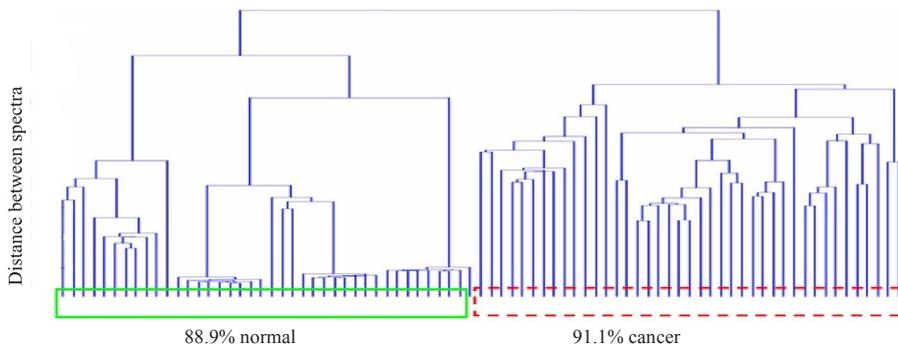


图7 显微拉曼光谱系统聚类分析系统树(所有光谱采用平滑+基线+归一化处理,波长范围800~1700 cm⁻¹)

Fig.7 Dendrogram of hierarchical cluster analysis for microscopic Raman spectral data

Note: All the spectrums were processed by smoothing, baseline elimination and normalization. The wavelength ranged from 800 to 1700 cm⁻¹.

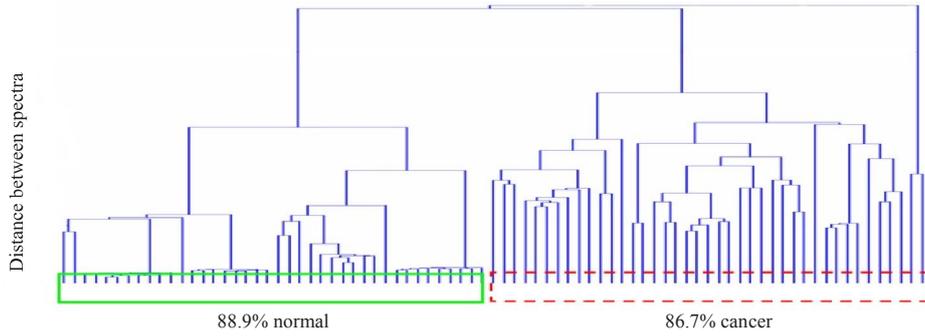


图8 光纤拉曼光谱系统聚类分析系统树(所有光谱采用平滑+基线+归一化处理,波长范围800~1700 cm^{-1})

Fig.8 Dendrogram of hierarchical cluster analysis for fiber-optical Raman spectral data

Note: All the spectrums were processed by smoothing, baseline elimination and normalization. The wavelength ranged from 800 to 1700 cm^{-1} .

统获取的胃癌组织和正常组织拉曼信息进行指纹光谱范围的全光谱信息分析,采用主成分分析和聚类分析都可以将两种组织区分开来,识别效果较好。显微拉曼光谱从微观层次研究胃癌组织和正常组织切片的拉曼光谱差异及产生的原因,空间分辨率和光谱分辨率更高,能够观察到光纤拉曼无法观测到组织拉曼信息(如1080 cm^{-1} 处拉曼峰,归属为脂肪C-C伸缩振动)。光纤拉曼光谱因为使用了光纤作为激发光和散射光的传播通道,可以原位获取组织信息,更加接近临床应用环境和条件。同时应该注意到光纤有无法消除的本底拉曼信号,容易掩盖样品信息,相信随着弹性光学理论及光纤技术的发展,拉曼光谱结合光纤可能实现活体诊断^[7, 24-25],使得拉曼光谱具有临床检测和诊断疾病的潜力。

4 总结

本文利用光纤和显微拉曼光谱从不同尺度范围对胃癌组织和正常组织进行鉴别诊断研究。两种拉曼光谱仪均能获取胃癌组织及正常组织的拉曼光谱,并对特征拉曼峰进行了归属。比较胃癌组织和正常组织的平均光谱,发现两类组织的拉曼光谱存在显著差异。所有正常及异常光谱数据经过平滑、基线扣除和强度归一化处理后,以指纹波长范围800~1700 cm^{-1} 的全波段拉曼光谱作为输入,进行主成分分析,光纤拉曼光谱及显微拉曼光谱都能够分为两个截然不同的类型。聚类分析效果较好,显微拉曼光谱聚类的正确率、灵敏度和特异性分别为90.0%、91.9%和88.9%,光纤拉曼光谱聚类的正确率、灵敏度和特异性分别为87.8%、86.7%和88.9%。

结果表明拉曼光谱结合化学计量学方法能够鉴别胃癌组织,具有从原理到临床应用的一致性。

【参考文献】

- [1] 凌晓锋,李维红,宋苑苑,等. 胃癌组织的拉曼光谱初探[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(5): 692-693.
LING X F, LI W H, SONG Y Y, et al. FT-Raman spectroscopic investigation on stomach cancer [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2000, 20(5): 692-693.
- [2] LING X F, XU Y Z, WENG S F, et al. Investigation of normal and malignant tissue samples from the human stomach using Fourier transform Raman spectroscopy [J]. Appl Spectrosc, 2002, 56(5): 570-573.
- [3] TEH S K, ZHWENG W, HO K Y, et al. Diagnostic potential of near-infrared raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue [J]. Br J Cancer, 2008, 98(2): 457-465.
- [4] XU M, MA J, QU Y, et al. Recognition of gastric cancer by Raman spectroscopy[C]// Photonics and Optoelectronics Meetings 2009. International Society for Optics and Photonics, 2009: 75191H-75191H-8.
- [5] KUMAR K K, ANAND A, CHOWDARY M V, et al. Discrimination of normal and malignant stomach mucosal tissues by Raman spectroscopy: A pilot study [J]. Vib Spectrosc, 2007, 44(2): 382-387.
- [6] KAWABATA T, MIZUNO T. Optical diagnosis of gastric cancer using near-infrared multichannel Raman spectroscopy with a 1064-nm excitation wavelength [J]. J Gastroenterol, 2008, 43(4): 283-290.
- [7] SHEN A G, YE Y, ZHANG J W, et al. Screening of gastric carcinoma cells in the human malignant gastric mucosa by confocal Raman microspectroscopy [J]. Vib Spectrosc, 2005, 37(2): 225-231.
- [8] 黄鹰,陶家友,蔺蓉,等. 用激光拉曼光谱区分胃癌变细胞与正常细胞[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(11): 2262-2265.
HUANG Y, TAO J Y, LIN R, et al. Differentiating gastric cancer cell from normal cell by laser raman spectrum [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2007, 27(11): 2262-2265.

- [9] SHIM M G, SONG L W, MARCON N E, et al. *In vivo* near-infrared raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy [J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 72(1): 146-150.
- [10] HATTORI Y, KOMACHI Y, ASAKURA T, et al. *In vivo* raman study of the living rat esophagus and stomach using a micro-raman probe under an endoscope [J]. *Appl Spectrosc*, 2007, 61(6): 579-584.
- [11] DURAIPIANDIAN S, BERGHOLT M S, ZHENG W, et al. Real-time raman spectroscopy for *in vivo*, online gastric cancer diagnosis during clinical endoscopic examination [J]. *J Biomed Optics*, 2012, 17(8): 081411-081418.
- [12] HUANG Z, TEH S K, ZHENG W, et al. Integrated raman spectroscopy and trimodal wide-field imaging techniques for real-time *in vivo* tissue Raman measurements at endoscopy [J]. *Optics Letters*, 2009, 34(6): 758-760.
- [13] HUANG Z, TEH S K, ZHENG W, et al. *In vivo* detection of epithelial neoplasia in the stomach using image-guided Raman endoscopy [J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(2): 383-389.
- [14] BERGHOLT M S, ZHENG W, LIN K, et al. *In vivo* diagnosis of gastric cancer using raman endoscopy and ant colony optimization techniques [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(11): 2673-2680.
- [15] BERGHOLT M S, ZHENG W, LIN K, et al. *In vivo* raman spectroscopy integrated with multimodal endoscopic imaging for early diagnosis of gastric dysplasia [C]. *Proc SPIE*, 2010, 7560: 7560031-7560036.
- [16] 张京伟, 沈爱国, 魏芸, 等. 胃癌和胃正常黏膜拉曼光谱检测 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2004, 21(6): 910-912.
ZHANG J W, SHEN A G, WEI Y, et al. Study of normal mucosa and gastric carcinoma by confocal raman microspectroscopy [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2004, 21(6): 910-912.
- [17] TEH S K, ZHENG W, HO K Y, et al. Near-infrared raman spectroscopy for early diagnosis and typing of adenocarcinoma in the stomach [J]. *Br J Surg*, 2010, 97(4): 550-557.
- [18] HUANG Z, BERGHOLT M, ZHENG W, et al. *In vivo* early diagnosis of gastric dysplasia using narrow-band image-guided Raman endoscopy [J]. *J Biomed Optics*, 2010, 15(3): 037017.
- [19] TEH S K, ZHENG W, HO K Y, et al. Diagnosis of gastric cancer using near-infrared Raman spectroscopy and classification and regression tree techniques [J]. *J Biomed Optics*, 2008, 13(3): 5-7.
- [20] TEH SK, ZHENG W, HO K Y, et al. Near-infrared Raman spectroscopy for gastric precancer diagnosis [J]. *J Raman Spectrosc*, 2009, 40(8): 908-914.
- [21] 沈爱国. 显微拉曼光谱在生物医学领域中的应用 [D]. 武汉: 武汉大学博士论文, 2006.
SHEN A G. Application of raman spectroscopy to biomedical field [D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Wuhan University, 2006.
- [22] ROGGO Y, CHALUS P, MAURER L, et al. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies [J]. *J Pharm Biomedical Anal*, 2007, 44: 683-700.
- [23] KRAFFT C, STEINER G, BELEITES C, et al. Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy [J]. *J Biophotonics*, 2009, 2(1/2): 13-28.
- [24] HANLON E B, MANOHARAN R, KOO T W, et al. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy [J]. *Phys Med Biol*, 2000, 45(2): 1-59.
- [25] MOTZ J T, GANDHI S J, SCEPANOVIC O R, et al. Real time raman system for *in vivo* disease diagnosis [J]. *J Biomed Optics*, 2005, 10(3): 0311131-0311137.