

人体卵巢癌中砂粒体矿化的矿物学研究

王长秋¹, 杨若晨¹, 鲁安怀¹, 柳剑英², 张波²

(1. 造山带与地壳演化教育部重点实验室, 北京大学地球与空间科学学院, 北京 100871;
2. 北京大学医学部基础医学院病理学系, 北京 100083)

摘要: 以卵巢浆液性癌中砂粒体矿化为研究对象, 采用偏光显微镜、扫描电镜及其能谱、X 射线粉晶衍射、傅立叶变换红外光谱和高分辨透射电子显微镜, 对原位和分离处理样品的表面形貌、结构和矿物成分进行了观察测试。结果表明, 卵巢浆液性癌中砂粒体具同心层状结构, 矿化物质由纳米尺寸水草酸钙石和碳羟磷灰石两种物相组成, 前者沉积在砂粒体内部, 结晶度相对较高, 后者沉积在砂粒体外层, 结晶度差。

关键词: 卵巢癌, 砂粒体, 碳羟磷灰石, 水草酸钙石

中图分类号: P579; R737.31

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2009)06-0617-06

Mineralogy of psammoma bodies in human ovarian cancer

WANG Chang-qiu¹, YANG Ruo-chen¹, LU An-huai¹, LIU Jian-ying² and ZHANG Bo²

(1. The Key Laboratory of Orogenic Belts and Crustal Evolution, School of Earth and Space Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; 2. Pathology Department in School of Basic Medical Science, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

Abstract: Ovarian cancer is one of the common malignant tumors in female reproductive organs. Psammoma bodies occurring in cell population is considered to be a phenomenon of ovarian serous cancer. In this paper, psammoma bodies from ovarian serous carcinomas were investigated by using SEM, EDAX, XRD, FTIR and HRTEM. The results show that the mineralized matter of the psammoma bodies with the concentric lamellated structure is composed of nano-size whewellite and carbonate hydroxylapatite. The former is deposited in the inner part of the psammoma body in a relatively high crystallinity, whereas the latter in the outer part in a low crystallinity.

Key words: ovarian cancer; psammoma body; carbonate hydroxylapatite; whewellite

卵巢癌是发生于卵巢组织的恶性肿瘤, 是女性生殖器官常见的肿瘤之一, 而浆液性囊腺癌最为常见, 约占所有卵巢恶性肿瘤的 50%。由于卵巢位于腹腔深部, 早期病变不易发现, 就诊时多已属晚期, 因此其死亡率很高, 超过宫颈癌与子宫体癌的总和, 占妇科肿瘤首位(沈铿, 2003)。同时由于卵巢癌临床早期症状不明显, 鉴别其组织类型及良、恶性相当困难, 且卵巢癌行剖腹探查术中发现肿瘤局限于卵巢的仅占 30%, 大多数已扩散到子宫、双侧附件、大网膜及盆腔各器官, 所以卵巢癌在诊断和治疗上一直是一个难题。

卵巢癌的发病原因仍不清楚, 但环境和内分泌影响在卵巢癌致病因素中最受重视。影像学观察表明, 19% 的卵巢癌伴有矿化(钙化)灶(刘明娟等, 2007)。但对卵巢癌矿化灶的矿物组成以及矿化的成因, 包括与癌变的关系都没有深入研究。本文以卵巢浆液性癌中砂粒体矿化为研究对象, 采用偏光显微镜、扫描电镜、X 射线衍射仪、傅立叶变换红外拉曼光谱仪以及高分辨透射电镜, 对矿化物质的形貌、结构和成分进行研究, 并探讨了卵巢癌矿化的形成机理。

收稿日期: 2009-09-08; 修订日期: 2009-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40872196)

作者简介: 王长秋(1965-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 环境矿物学, E-mail: cqwang@pku.edu.cn; 通讯作者: 鲁安怀, E-mail: ahlu@pku.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

从北京大学医学部病理学系病历库中查询出 15 例卵巢浆液性癌病历,并在病理学光片库中寻找对应的存档光学薄片,用偏光显微镜进行观察。从中选出具有明显砂粒体矿化的 6 例,并在蜡块库中找出石蜡包埋的样品块。

偏光显微镜和扫描电镜原位观察使用普通玻片和硅质玻片,而 X 射线和红外光谱物相分析和透射电镜观察需要将矿化砂粒体与周围有机组织分离。玻片制作和砂粒体分离处理方法和步骤详见杨若晨等(2008)。

1.2 观察与测试方法

用光学显微镜观察样品 HE 染色玻片的组织特征,同时将进一步做环境扫描电镜(ESEM)观察的矿化砂粒体定位。

将制备好的硅质薄片直接用导电胶粘在样品台上,并在硅片周围涂抹银胶,使硅片与样品台之间建立良好的电子通道,以增加导电性提高分辨率。在北京大学物理学院场发射环境扫描电镜(Quanta 200FEG)下观察砂粒体的形貌特征,并使用配有的 EDAX 能谱仪分析其各元素含量。供高分辨扫描电镜(HRSEM)研究的样品,将喷镀碳膜并用导电胶带粘在硅片上放置于样品台上进行观察。

经过分离处理的砂粒体,在无水乙醇中超声分散 10 min

左右,取不同液层的悬浊液滴在处理干净的硅片上,待酒精挥发后,把硅片用导电胶粘在 ESEM 的样品台上,硅片周围涂银胶,放入样品室进行观察与测试。

X 射线衍射和红外光谱物相分析分别在北京大学化学与分子工程学院的 RIGAKU-RA 型 X 射线粉晶衍射仪和 Raman950/Magna-IR750 型傅立叶变换拉曼红外光谱仪上进行。前者测试条件:CuK α 波长 0.154 06 nm,加速电压 40 kV,电流 100 mA,扫描范围 2°~75°,扫描速度 5°/min,步宽 0.02°。后者扫描范围为 650~4 000 cm⁻¹,分辨率为 4 cm⁻¹。将测得的红外光谱图与 Sadtler 红外光谱数据库中的标准矿物红外光谱图做峰-峰对比,探究样品的物相组成。

高分辨透射电子显微镜观察需将分离出的粉末状样品分散在无水乙醇中,将悬浮液滴在有炭膜的 TEM 专用铜网上,干燥后使用。透射电镜观察在北京大学物理学院的 H29000NAR 型高分辨透射电子显微镜上进行。

2 测试结果与分析

2.1 光学显微镜观察

图 1 中箭头所指的呈蓝染的圆形颗粒就是砂粒体。卵巢癌中砂粒体数量不多,个体小,HE 蓝染较深,一般较致密,很少见到中心有空隙,常出现在癌细胞旁基质中。

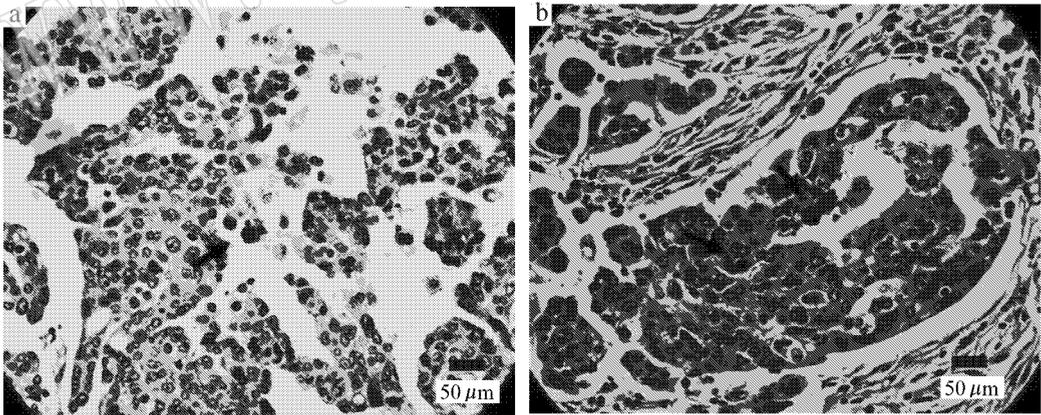


图 1 卵巢浆液性癌中砂粒体光镜照片

Fig. 1 Light microscope photos of psammoma bodies in ovarian cancers

2.2 扫描电镜观察与分析

ESEM 测试的样品是硅片载体薄片。图 2a 为卵巢癌中一个砂粒体的横断面 ESEM 图像。可以看到砂粒体具同心层构造,且与周围基质的附着不紧密。切片过程中,由于层间的性质差异,中心部分沿层被切掉,造成了凹陷。图 2b 为该砂粒体的高倍放大图像,左上角为外层,粒度不明显,右边为内层,可以看到明显的矿化颗粒,约十几纳米,说明中心部分

结晶较好,脆性较大,因而易被切掉。

利用扫描电镜附配的 EDAX 对砂粒体元素组成进行分析。为了防止砂粒体外部的有机组织对能谱接收的信号造成影响,笔者选择砂粒体的中心部分测试成分,结果显示 Ca/P(原子分数,下同)比值较高,为 1.800,大大超出磷灰石系列矿物的理论值(杨若晨等,2007),表明有非磷灰石系列的钙盐物相存在。

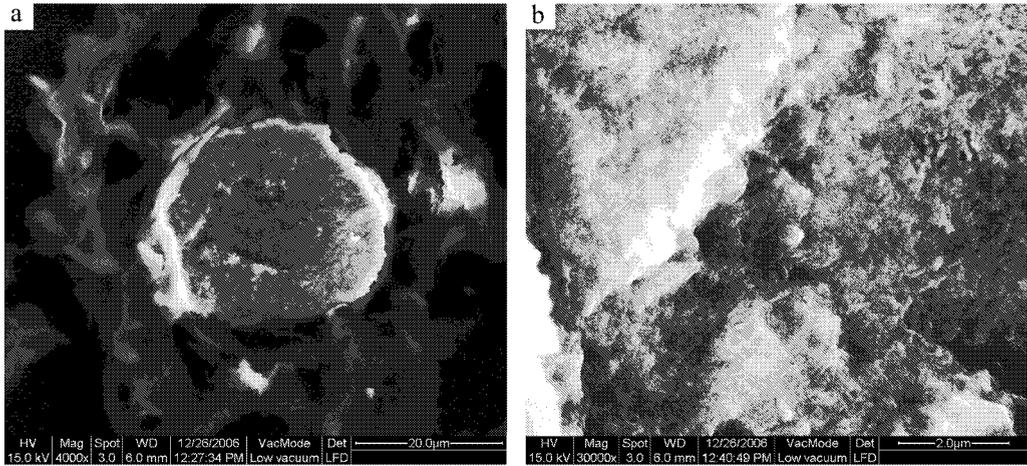


图 2 卵巢癌中砂粒体的 ESEM 照片(a)和高倍 ESEM 照片(b)

Fig. 2 ESEM morphology of the psammoma body in ovarian cancer

图 3a 为卵巢癌中一个中心有明显分层砂粒体颗粒的 HRSEM 图像,图 3b 为其高倍放大图(104 532 倍),从中可以看到明显的分层界线,左侧为明显的矿化颗粒,约十几纳米,

右侧粒度不易分辨。右侧能谱测试 Ca/P 比值为 1.729,比碳羟磷灰石的理论值稍高;左侧 Ca/P 比值高达 2.361,同样表明有非磷灰石系列的钙盐物相存在。

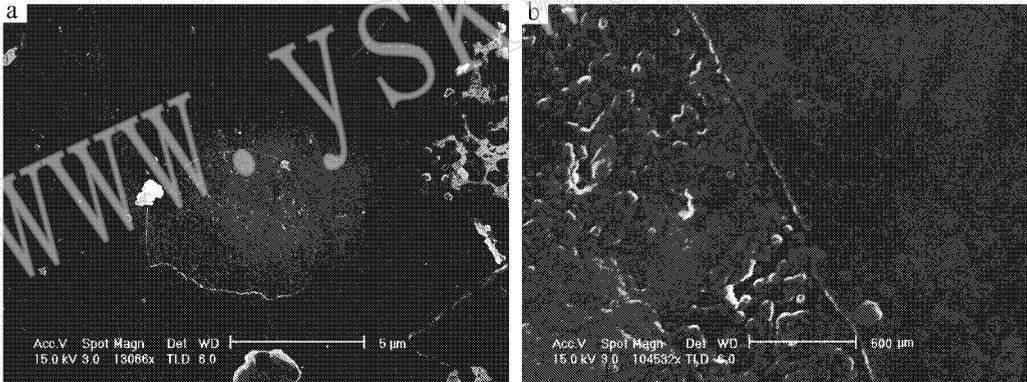


图 3 卵巢癌中砂粒体的 HRSEM 照片(a)和高倍放大 HRSEM 照片(b)

Fig. 3 HRSEM morphology of the psammoma body in ovarian cancer

2.3 XRD 物相分析

取适量经分离处理的砂粒体,用玛瑙研钵研碎成大约 10 μm 的粉末进行 XRD 分析,结果见图 4。将衍射数据与国际衍射数据中心(The International Centre for Diffraction Data, ICDD)的 75-1313、15-0100 卡片数据对比,结果基本吻合,表明该卵巢癌中砂粒体的物相为碳羟磷灰石 $(Ca, Mg, Na, H_3)_2(P, C)_2O_{12}(OH, Cl, F)$ 和水草酸钙石 $CaC_2O_4(H_2O)_2$ 。虽然只有一例样品足够进行 XRD 测试,但测试结果与扫描电镜的观察和测试结果相符。目前尚未检索到关于卵巢癌砂粒体中含水草酸钙石的研究报道。

2.4 FT-IR 物相分析

取 1 mg 经分离处理并用玛瑙研钵研碎的砂粒体与 100

mg 溴化钾(光谱纯)混合,研磨,过 0.127 mm 筛,移入压模机内压片,迅速进行红外光谱测试。测试结果见图 5。图中位于 3 489~3 060 cm^{-1} 间的 4 个吸收宽峰是水草酸钙石的配位水对称和非对称伸缩振动峰的典型表现,1 618 cm^{-1} 表现出的强吸收峰和 1 319 cm^{-1} 附近的中强吸收峰,是水草酸钙石的特征峰,与草酸钙配位的水分子在 1 618 cm^{-1} 处产生弯曲振动峰,而 1 319 cm^{-1} 处的吸收峰为金属-羧基的伸缩振动峰。在指纹区,780 cm^{-1} 处一个很尖的特征吸收峰和 663 cm^{-1} 的吸收带可以证明水草酸钙石的存在。这些谱带充分说明砂粒体中存在水草酸钙石晶体。

1 038 cm^{-1} 处的强吸收峰为 PO_4^{3-} 典型的 P—O 键对称伸缩振动吸收峰,957 cm^{-1} 处的小吸收峰也是 PO_4^{3-} 的伸缩振

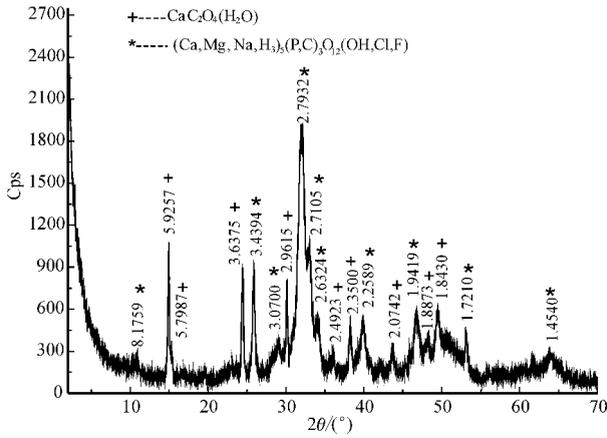


图 4 卵巢癌砂粒体的 X 射线衍射谱

Fig. 4 XRD spectra of psammoma bodies in ovarian cancer

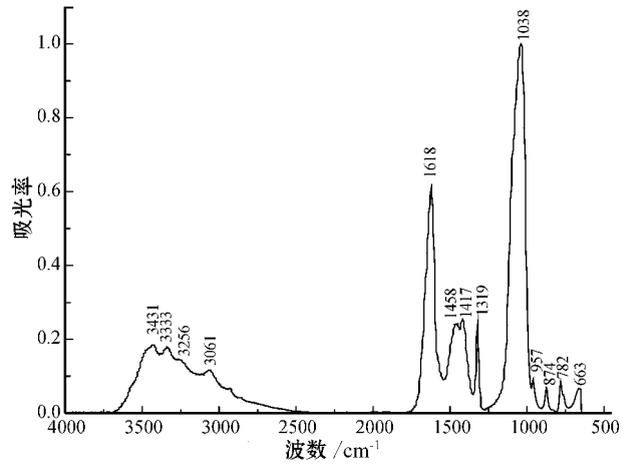


图 5 卵巢癌砂粒体的红外光谱图

Fig. 5 Infrared spectra of psammoma bodies in ovarian cancer

动吸收峰。在 1417 cm^{-1} 附近为碳酸根的 C—O 键不对称伸缩振动特征吸收峰。 875 cm^{-1} 的尖峰是 O—C—O 面外弯曲振动谱带。 OH^- 在 $3300\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ 之间有大的水峰, 与水草酸钙石的配位水产生的振动峰发生重叠。由此可以说明砂粒体中还存在碳羟磷灰石晶体。

2.5 HRTEM 分析

取少量经分离处理的砂粒体放入丙酮中, 超声分散 10 min 左右, 将悬浮液滴在有炭膜的 TEM 专用铜网上, 用滤纸从铜网背面吸去丙酮, 干燥后使用 H-9000NAR 型高分辨透射电子显微镜进行观察分析, 操作电压为 300 kV。为了不破坏砂粒体的结构, 样品没有经过研磨, 而且矿化颗粒很小, 粒度在 $5\sim 20\text{ nm}$ 范围, 分散困难, 所以很难找到衬度很好的单独晶体颗粒。

前述研究表明, 卵巢癌砂粒体有分层现象, 内部结晶程度高, 且 Ca/P 比值大, 而外部相反。图 6a 显示的是结晶程度高、粒径相对较大的颗粒图片, 可见几个纳米晶明显的晶格条纹不连续。其选区衍射图(图 6b)为多晶衍射环, 说明晶粒细小。中心环带处的衍射环清晰, 而且还可以看到一些衍射斑点, 说明该区域存在一些晶粒较大并且结晶好的晶体。外层衍射环有些弥散, 说明结晶程度差。用透射电镜附带的能谱测得该区域的 Ca/P 比值高达 3.297。图 7a 显示的是结晶程度不高的区域, 其中也有个别结晶度较好、粒径相对较大的颗粒。该区域的选区衍射图(图 7b)为多晶衍射环。最内层的衍射环清晰, 外层衍射环出现很明显的弥散, 说明结晶程度低。该区域的能谱测试结果 Ca/P 比值为 1.952。根据 XRD 测试的结果可知砂粒体中含有水草酸钙石, 所以 Ca/P 比值

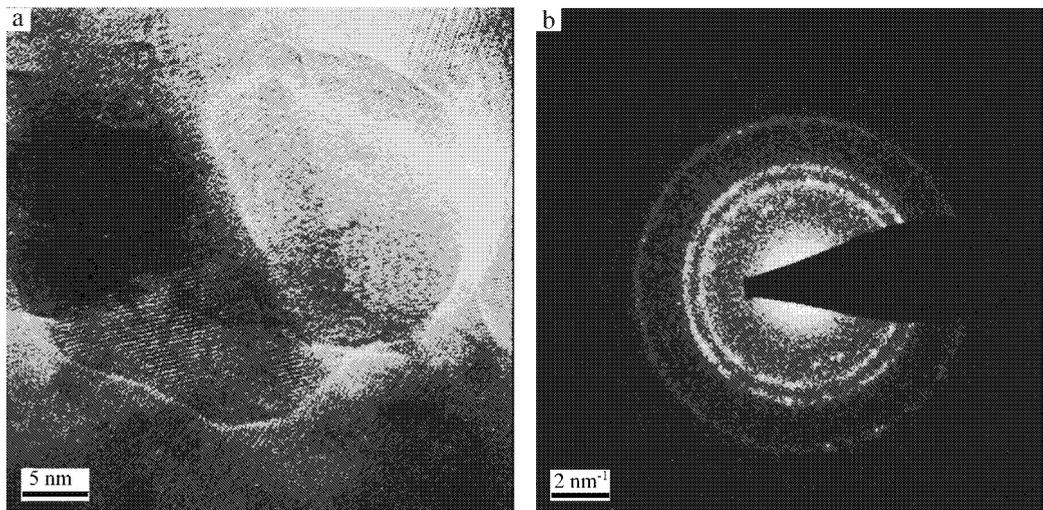


图 6 卵巢癌砂粒体结晶较好区域的 HRTEM 高分辨照片(a)和选区衍射图(b)

Fig. 6 HRTEM micrograph(a) and HRTEM diffraction pattern(b) of better mineralized particles in psammoma bodies in ovarian cancer

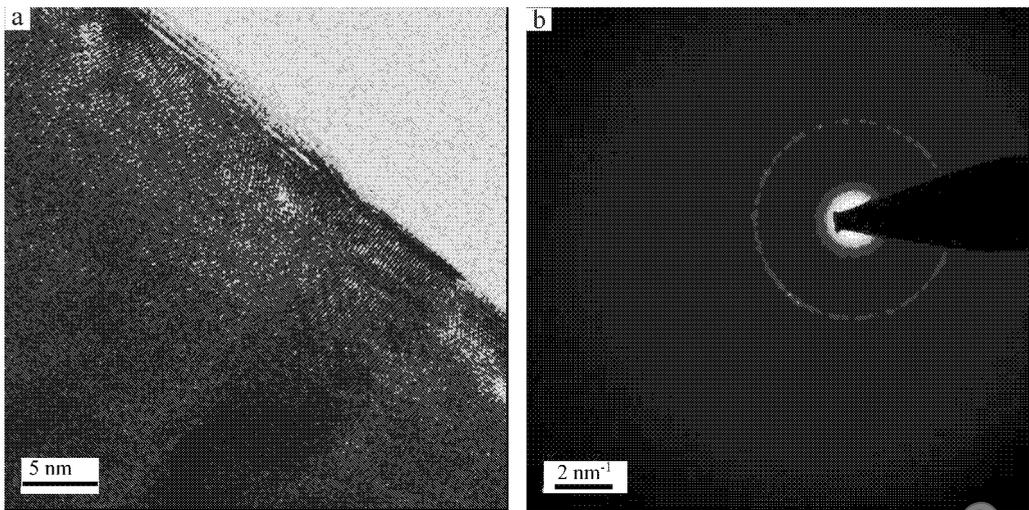


图 7 卵巢癌砂粒体结晶较差区域的 HRTEM 高分辨照片 (a) 和选区衍射图 (b)

Fig. 7 HRTEM micrograph (a) and HRTEM diffraction pattern (b) of less mineralized particles in psammoma bodies in ovarian cancer

较高的区域应该存在较多水草酸钙石。结合扫描电镜和透射电镜的结果,说明水草酸钙石的结晶度较高,粒度较大,碳酸羟基磷灰石的结晶程度不高。

3 讨论与结论

很多研究发现细胞群伴有砂粒体时为卵巢腺癌的表现 (Sorbe and Frankendal, 1982; Kiyozuka *et al.*, 2001)。对卵巢浆液性腺癌样品的砂粒体矿化物质的研究表明,卵巢癌砂粒体中含水草酸钙石 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})$ 和碳羟基磷灰石 $(\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Na}, \text{H}_3)(\text{P}, \text{C})_3\text{O}_9(\text{OH}, \text{Cl}, \text{F})$ 两种物相。

通过高分辨扫描电镜和透射电镜观察到了两种物相的界线,水草酸钙石沉积在砂粒体内部,结晶度高,晶粒较大,碳羟基磷灰石沉积在砂粒体外层,结晶度稍差,晶粒细小。

结晶好、粒度大的水草酸钙石晶体位于砂粒体的内层,而晶粒细小的碳羟基磷灰石沉积在砂粒体外层的现象说明砂粒体的生长是由内向外进行的。通过原位微形貌观察发现,卵巢癌中的砂粒体与周围的有机组织没有紧密的附着,也没有发现其成核点。而且砂粒体个体较小,经常出现在癌细胞巢中,可能是细胞内成核,通过细胞壁的内吞作用 (endocytosis) 和外排作用 (exocytosis) 完成聚集阴、阳离子在胞内成核,然后排出细胞外的过程 (Anderson, 1983)。成核的矿物物可以不断聚集体液中的阴、阳离子逐渐在外层沉淀为砂粒体状矿化。

草酸是植物的一种防御性毒素。人类日常食用的蔬果中都有草酸。正常情况下,人体摄入草酸后会启动保护机制,使草酸与钙结合产生不被人体吸收的草酸钙,然后通过肠道和泌尿系统排出体外。如果具有细胞毒性的草酸根 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 没有形成不溶性盐,便会被人体吸收,造成不同程度的损害。

人体出现代谢异常也会产生过量的 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 在卵巢中聚集,会对卵巢细胞造成损伤,机体的保护性机制会促使细胞吸收 Ca^{2+} 形成水草酸钙沉淀来降低毒性,细胞再通过外排作用将水草酸钙沉淀排出。同时,损伤的细胞膜极性丧失,可以吸附晶体,使水草酸钙沉淀被聚集,产生结晶中心 (Mandel, 1994; Verkoelen *et al.*, 1995; Bigelow *et al.*, 1996)。损伤和坏死的细胞会聚集 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} , 从而在水草酸钙之外形成碳羟基磷灰石沉淀。

References

- Anderson H. 1983. Calcific disease: a concept [J]. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 107: 341~347.
- Bigelow M W, Wiessner J H, Kleinman J G, *et al.* 1996. Calcium oxalate-crystal membrane interactions: Dependence on membrane lipid composition [J]. *Journal of Urology*, 155(3): 1094~1098.
- Kiyozuka Y, Nakagawa H, Senzaki H, *et al.* 2001. Bone morphogenetic protein-2 and type IV collagen expression in psammoma body forming ovarian cancer [J]. *Anticancer Research*, 21(3B): 1723~1730.
- Liu Mingjuan, Guo Yan, Zhang Ling, *et al.* 2007. CT manifestation of the carcinoma of ovary: diagnosis and differential diagnosis [J]. *Journal of Diagnostic Imaging & Interventional Radiology*, 16(2): 67~71 (in Chinese with English abstract).
- Mandel N. 1994. Crystal-membrane in kidney stone disease [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 5(5): S37~S45.
- Shen Keng. 2003. Advance in diagnosis and treatment of ovarian malignant tumor [J]. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 38(8): 489~492 (in Chinese).
- Sorbe B and Frankendal B. 1982. Prognostic importance of psammoma bodies in adenocarcinoma of the ovary [J]. *Gynecologic Oncology*, 4

(1):6~14.

- Veroelen C F, Romijn J C, Debruijn W C, *et al.* 1995. Association of calcium oxalate monohydrate crystals with MDCK cells[J]. *Kidney International*, 48(1): 129~138.
- Yang Ruochen, Wang Changqiu, Liu Jianying, *et al.* 2007. Mineral composition of a tremendous mineralization beside meningioma[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 26(6): 597~601(in Chinese with English abstract).
- Yang Ruochen, Wang Changqiu, Lu Anhuai, *et al.* 2008. A study of the psammoma body mineralization in meningioma[J]. *Earth Science Frontiers*, 15(6): 44~53(in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

- 刘明娟, 郭燕, 张翎, 等. 2007. 卵巢癌的 CT 诊断与诊断鉴别[J]. *影像诊断与介入放射学*, 16(2): 67~71.
- 沈铿. 2003. 卵巢恶性肿瘤的诊断与治疗进展[J]. *中华妇产科杂志*, 38(8): 489~492.
- 杨若晨, 王长秋, 柳剑英, 等. 2007. 脑膜瘤旁巨型矿化灶矿物成分分析[J]. *岩石矿物学杂志*, 26(6): 597~601.
- 杨若晨, 王长秋, 鲁安怀, 等. 2008. 脑膜瘤中砂粒体矿化研究[J]. *地学前缘*, 15(6): 44~53.

www.yskw.ac.cn