

人体乳腺癌矿化的同步辐射研究

孟繁露¹, 李源¹, 李艳¹, 王长秋¹, 鲁安怀¹, 梅放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: 同步辐射具有常规光源不可比拟的优良性能, 可用于微量生物矿化样品的物相、结构、形貌和成分研究。本文利用基于同步辐射光源的 X 射线粉末衍射 (SR-XRD)、傅立叶变换红外光谱 (SR-FTIR)、X 射线荧光分析 (SR-XRF) 和 X 射线三维成像, 对人体乳腺癌矿化进行了表征。研究表明, 乳腺癌矿化的主要矿物物相为碳羟磷灰石, 含有 Sr、Zn 等微量元素, 其中砂粒体矿化具有独特的分层结构。研究结果为乳腺癌的病理研究和诊断提供了矿物学参考信息。

关键词: 同步辐射; 荧光; 成像; 肿瘤; 钙化; 磷灰石

中图分类号: P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2015)06-0957-06

Characterization of human breast cancer calcification using synchrotron radiation

MENG Fan-lu¹, LI Yuan¹, LI Yan¹, WANG Chang-qiu¹, LU An-huai¹ and MEI Fang²

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

Abstract: Synchrotron radiation performs much better than conventional light source in that it is capable of examining the mineral phase, crystal structure, morphology and chemical composition of biomineralization samples in a tiny amount. Based on synchrotron radiation, the authors employed several test methods to study human breast cancer calcification, including X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray fluorescence and three-dimensional imaging. According to the results, breast cancer calcification is mainly composed of (carbonated) hydroxylapatite, with trace elements like Sr and Zn. The psammoma body holds special layered structure. These results provide mineralogical information for the pathological study and diagnosis of breast cancer.

Key words: synchrotron radiation; fluorescence; mapping; tumor; calcification; apatite

同步辐射是由以接近光速运动的电子在磁场中作曲线运动改变运动方向时所产生的电磁辐射。同步辐射光源具有常规光源不可比拟的优良性能, 如高准直性, 高极化性, 高相干性, 宽的频谱范围、高光谱耀度和高光子通量等。基于同步辐射技术的 X 射

线成像则具有高空间分辨率、高穿透性、无创、曝光时间短、成像速度快、可外加各种环境条件(磁场、温度场、电场、压力等)以及衬度机制丰富(吸收、相位、散射、荧光、吸收边等)等优点。

自同步辐射光源应用于物质结构和组分研究以

收稿日期: 2015-09-01; 修订日期: 2015-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41272048, 40872196)

作者简介: 孟繁露(1990-), 女, 博士研究生, 研究方向为环境矿物学; 通讯作者: 王长秋, E-mail: cqwang@pku.edu.cn; 鲁安怀, E-mail: ahlu@pku.edu.cn

来,一些学者已经利用同步辐射装置对人体重大恶性肿瘤乳腺癌的研究进行了尝试。Ando等(2005)利用同步辐射暗场像(DFI)实现了 $5\ \mu\text{m}$ 分辨率灰度成像。测试结果中,“纤维和脂肪组织”与“癌巢和钙化”的亮度有明显差异,从而可以有效地对两种组成进行区分。Imamura等(2008)将传统的乳房X射线照片和高分辨的同步辐射图像对比,发现同步辐射图像在分辨率和细节表征上具有相当的优势。在传统技术下,可以分辨出大于 $300\ \mu\text{m}$ 的颗粒,小于 $180\ \mu\text{m}$ 的无法看到,而 $180\sim 300\ \mu\text{m}$ 之间的可否观察到则取决于颗粒的密度或者厚度。同步辐射图像中,可以分辨出 $24\ \mu\text{m}$ 的颗粒,其中有 $12\ 141$ 个亮点都在传统乳房X射线照片中不可见。

研究表明,乳腺癌及其他乳腺病变的形成过程与矿(钙)化作用密切伴随,矿化形态、物相组成、密度、数目、分布及其与肿块的关系对乳腺病变良恶性的诊断具有重要价值(Monda, 2001; Morgan *et al.*, 2001; Peacock *et al.*, 2004; Tse *et al.*, 2008)。然而受到样品和测试技术的限制,乳腺癌矿化灶矿化特征及规律仍不明确。利用同步辐射装置对乳腺癌矿化进行成分、结构、分布等特征的研究,是对人体乳腺癌矿化研究的重要补充,有助于理解矿化的发生发展以及与病变的关系,对疾病病理过程的认识和诊疗具有理论意义和应用价值。

本文应用多种同步辐射成像技术对人体乳腺癌矿化进行研究,旨在揭示了人体乳腺癌矿化的精细矿物特征,为人体病理性矿化的进一步研究提供方法上的参考。

1 样品采集、处理及测试方法

从湖北钟祥人民医院和北京大学第三医院病历库中所存的2010年1月到2014年12月的所有与矿化相关的乳腺标本中筛选出乳腺癌病例共73例,患者平均年龄52岁。将获取的石蜡包埋样品,用Leica超薄切片机连续切片。每一例样品,取1张 $4\ \mu\text{m}$ 薄片制成普通玻片,进行HE染色。采用偏光显微镜(Nikon LV100 POL)对HE玻片中矿化的数量、大小、分布、形态以及与有机组织间的联系等进行观察,为后续实验进行样品选取和初步定位。

选取矿化物较多的样品,进行分离处理:首先将数片 $10\ \mu\text{m}$ 厚薄片放在离心管中,二甲苯室温脱蜡3次,每次间隔2 h,再用100%、95%、90%、85%、

70%、50%、30%乙醇梯度洗去二甲苯,每步间隔10 min,双蒸水洗涤2次,然后加入5%次氯酸钠溶液,37℃水浴震荡至彻底消化有机质后,用双蒸水洗涤2次;最后用30%、50%、70%、90%、95%、100%梯度乙醇脱水。为了防止其他离子混入,分离出的粉末样品浸泡在无乙醇中备用。

同步辐射光源X射线粉末衍射(SR-XRD)测试在中国科学院上海应用物理研究所BL15U硬X射线微聚焦及应用(微束)光束线站进行,测试波长 $0.6884\ \text{nm}$,光斑大小 $5\ \mu\text{m}\times 10\ \mu\text{m}$,标样为 CeO_2 。将粉末样品固定在两层3M胶带之间进行测试,每个样品的数据采集时间 $30\sim 100\ \text{s}$,获得的图像用Fit2D 12.077和Datalab 1.34软件处理。

傅立叶变换显微红外光谱(SR-FTIR)在中国科技大学国家同步辐射实验室的红外与远红外线站光束线上完成,应用Bruker IFS 66v红外光谱仪和Hyperion 3000红外显微镜进行测量。测试条件:显微镜光栏设置为 $20\ \mu\text{m}\times 20\ \mu\text{m}$ 到 $30\ \mu\text{m}\times 30\ \mu\text{m}$ 之间,傅立叶变换光谱扫描范围 $4\ 000\sim 600\ \text{cm}^{-1}$,光谱分辨率 $4\ \text{cm}^{-1}$,扫描次数256次。红外成像通过二维精密样品台对选择的样品区域进行成像,每测定3个样品点采集1次空白背景(空白背景为不含样品的 BaF_2 位置)扣除背底。采集的成分和成像数据采用OPUS程序进行积分和单谱分析。

同步辐射光源X射线荧光分析(SR-XRF)在中国科学院上海应用物理研究所BL15U硬X射线线站进行,与SR-XRD可共用样品。测试能量为18 keV,光斑大小 $4\ \mu\text{m}\times 4.5\ \mu\text{m}$ 。每个粉末样品的数据采集时间为100 s,数据采用PyMca 4.4.0软件进行标定和计算。同时,对薄片样品进行荧光模式的吸收谱成像(SR-XRF mapping)。薄片制作方法为:将 $10\ \mu\text{m}$ 厚薄片置于硅质薄片上,二甲苯室温脱蜡3次后用乙醇浸泡2次,每次间隔2 h,干燥后转移至两层3M胶带之间。成像过程中,每个点的数据采集时间为 $8\sim 20\ \text{s}$ 。线站控制系统下采用pviewer软件进行分析,得到所选区域各个元素的分布图,用origin 8.0进行图像处理。

同步辐射光源X射线三维成像在北京同步辐射装置4W1A-X射线成像实验站进行。使用AB胶将样品固定在针尖上,置于样品台上进行测试。采用大视场模式获取吸收衬度像,测试能量为8 keV,分辨率100 nm。数据采用XMController软件进行处理,三维重构后导出逐帧图像、3D动画和断层图像。

2 结果

2.1 乳腺癌矿化的同步辐射光源 X 射线粉末衍射 (SR-XRD)

利用 SR-XRD 可以对极微量的矿物样品粉末进行物相鉴定。对分离后的乳腺癌矿化样品进行 SR-XRD 分析, 获得二维衍射数据(图 1a)。大部分样品的衍射图样呈衍射环式, 表明分离出的矿化物结晶粒度较小; 部分图样中出现衍射斑点, 表明有部分矿化颗粒尺寸较大。对于衍射环清晰、无衍射斑点的图样, 通过 Fit2D 软件积分处理后, 可转化为 2θ 和强度的对应关系, 导入 Jade5.0 软件, 与 PDF2 2004 数据库中所有含 Ca、P、C、H、O 元素的物相进行峰值

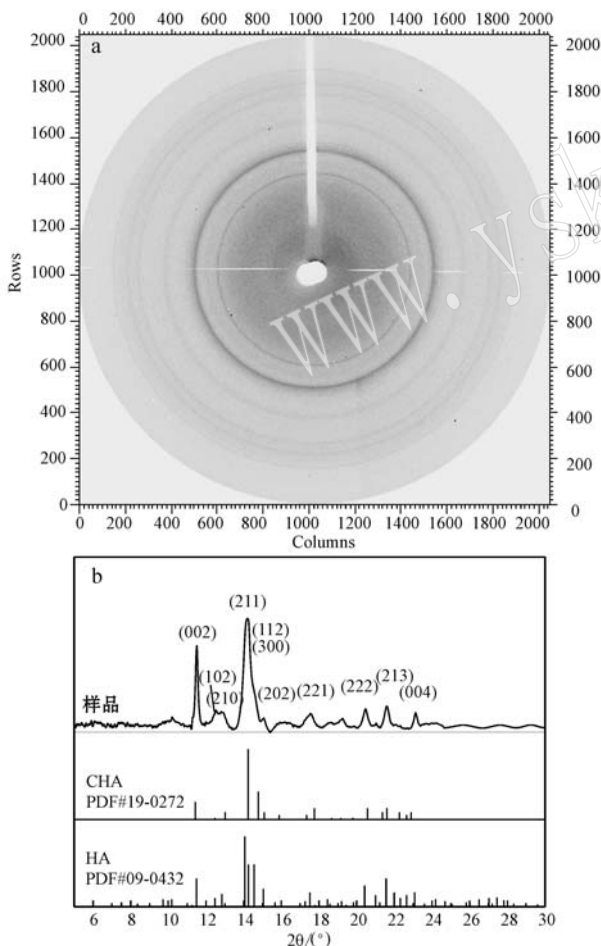


图 1 人体乳腺癌矿化的同步辐射光源 X 射线衍射

Fig. 1 SR-XRD result of breast cancer calcification

a—二维衍射图样; b—积分后的一维图谱

a—two-dimensional diffraction pattern; b—integrated one-dimensional diffraction pattern

比对(图 1b), 结果表明乳腺癌矿化的主要物相为羟磷灰石[HA, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, PDF # 09-0432]或碳羟磷灰石(CHA, $\text{Ca}_5[\text{PO}_4, \text{CO}_3]_3(\text{OH})$, PDF # 019-0272), 属 $\text{P6}_3/m$ 空间群, 六方晶系。(002)、(211)和(202)较标准数据略有偏移且峰宽化现象明显, 表明矿化物结晶度较差或/和矿物中存在杂质元素替代或/和有机物残留物干扰, 因此很难分辨矿化物主要物相到底是 HA 还是 CHA。

2.2 乳腺癌矿化的同步辐射傅立叶变换显微红外光谱(SR-FTIR)

利用 SR-FTIR 可对组织切片样品进行原位研究。在光学显微镜下选定如图 2a 中 12×5 红色十字叉丝所示的区域, 对显微红外光谱仪采集到的在 $1171 \sim 891 \text{ cm}^{-1}$ 区间的峰面积进行积分, 得到对应区域 PO_4^{3-} 的分布示意图, 如图 2b 所示, 该区域 PO_4^{3-} 的相对含量用不同颜色按比例表示。由于图片长和宽的比例尺不一致, 导致积分图有一定程度的变形。由 PO_4^{3-} 的分布示意图可以看出, PO_4^{3-} 的分布趋势和矿化的形状基本一致, 整个矿化中 PO_4^{3-} 的分布情况并不太均匀, 图中矿化的右半部分 PO_4^{3-} 的含量高于左半部分, 说明矿化灶不同部位的结晶程度和矿化密度有差异。

2.3 乳腺癌矿化的同步辐射光源 X 射线荧光分析 (SR-XRF)

利用 SR-XRF, 可实现高空间分辨、高灵敏的物质元素组成、含量和分布研究。对分离出的乳腺癌矿化样品(图 3a)、合成的 HA 样品(图 3b)和空白 3M 胶带(图 3c)进行了荧光全谱测试, 对比结果显示, 人体乳腺癌矿化中含 Fe、Cu、Zn、As、Sr 等微量元素。

2.4 乳腺癌矿化的同步辐射光源 X 射线荧光成像 (SR-XRF mapping)

利用 SR-XRF 成像可以进一步确定原位组织切片中各元素的分布情况。从 SR-XRF 成像结果来看(图 4), 乳腺癌矿化中 Ca、Sr 和 Zn 的分布大体一致, 而 Fe 主要分布在矿化物边缘, 说明 Sr 和 Zn 存在于矿化晶体之中, 而 Fe 主要存在于有机质中。

2.5 乳腺癌矿化的同步辐射光源 X 射线三维成像

利用同步辐射光源 X 射线三维成像, 可以进行乳腺癌矿化颗粒的高分辨纳米成像。一颗具有圈层构造的砂粒体矿化颗粒的平面吸收衬度像(图 5a)显示矿化颗粒中清晰的分层结构。将旋转测试获得的 721 张平面图进行三维重构, 获得矿化颗粒的三维高

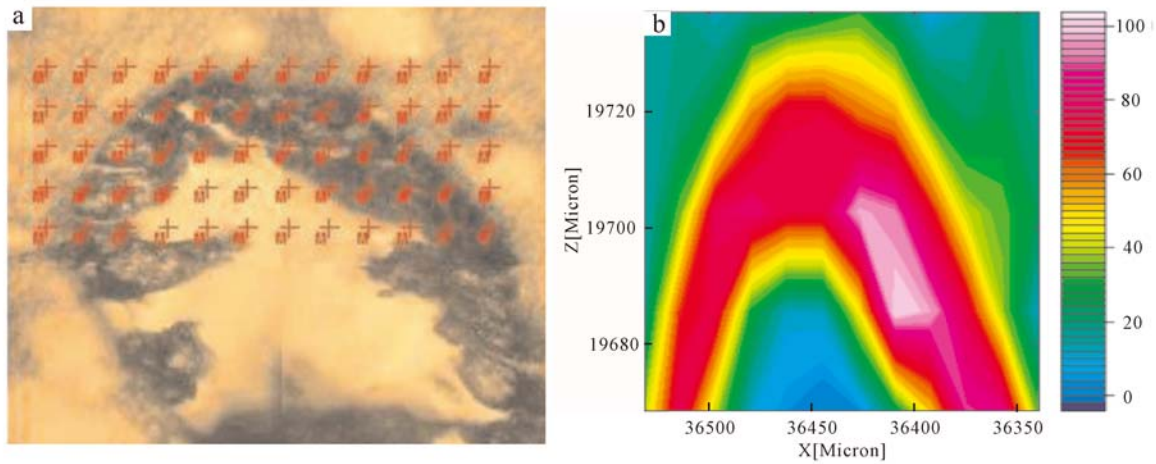


图 2 人体乳腺癌矿化的同步辐射显微红外分析

Fig. 2 SR-FTIR result of breast cancer calcification

a—测试位置示意图; b— PO_4^{3-} 分布图

a—optic view of the analyzed area; b—color-coded images of the spatial distribution of PO_4^{3-}

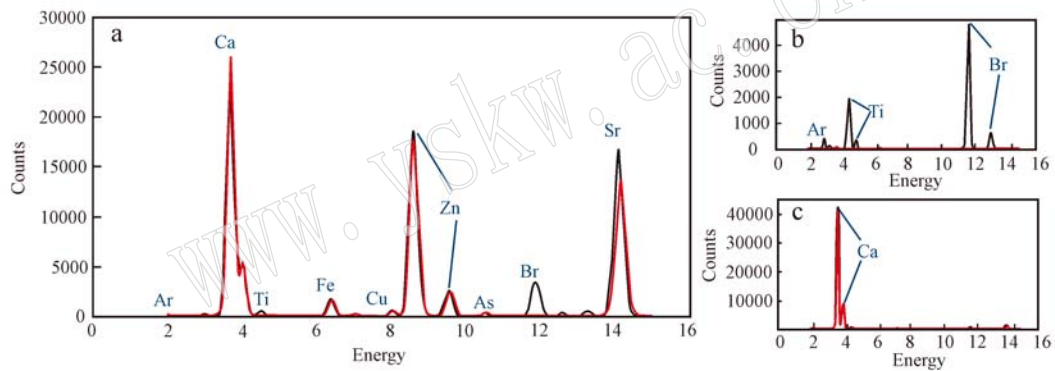


图 3 人体乳腺癌矿化的同步辐射光源荧光分析

Fig. 3 SR-XRF result of breast cancer calcification

a—人体乳腺癌矿化; b—3 M 胶带; c—合成 HA(黑线: 测试结果, 红线: 拟合曲线)

a—breast cancer calcification; b—3 M tape; c—synthesized HA (black line: test result, red: fit curve)

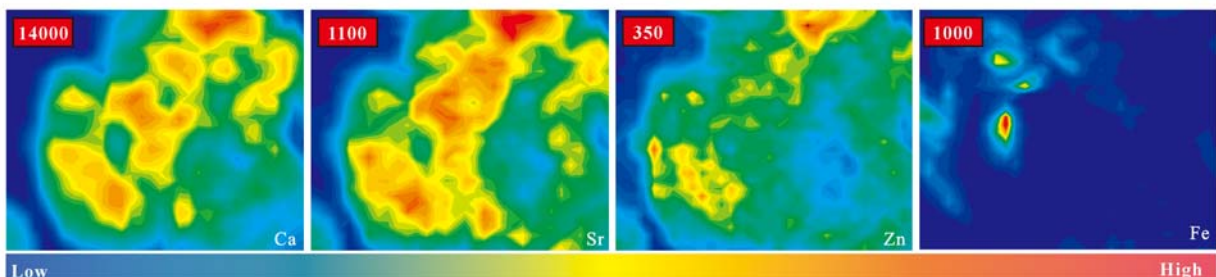


图 4 人体乳腺癌矿化的同步辐射光源 X 射线荧光成像结果

Fig. 4 SR-XRF mapping result of breast cancer calcification

分辨像(图 5b), 显示颗粒内部分层在三维空间中的连续性。进一步可获得平行入射光方向的断层图

(图 5c), 显示该颗粒内部有 2 个核心。

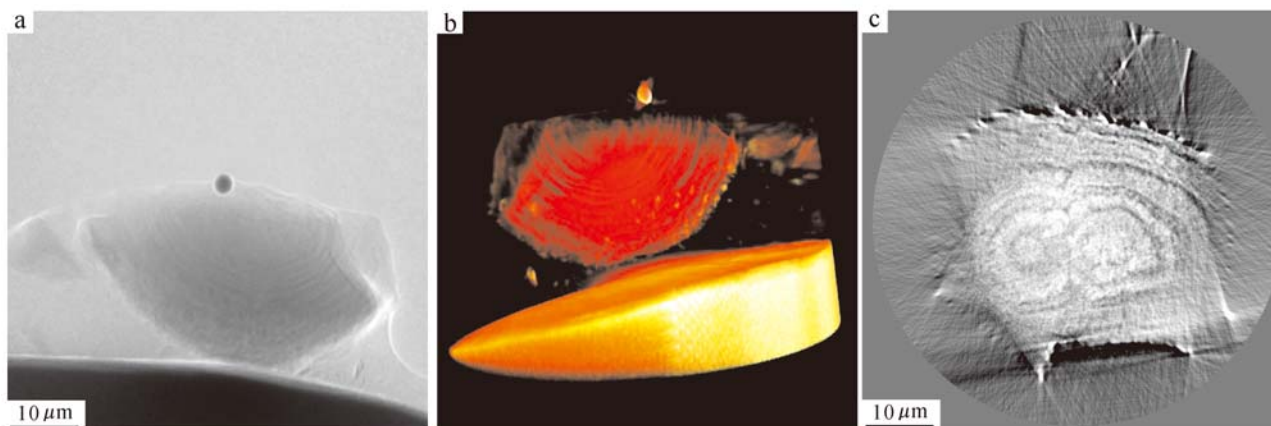


图 5 人体乳腺癌矿化的同步辐射光源 X 射线三维成像结果

Fig. 5 Three-dimensional imaging of breast cancer calcification

a—垂直入射光方向的平面图; b—三维重构图; c—平行入射光方向的断层图

a—the plane perpendicular to the incident ray; b—three-dimensional restructuring graph; c—section plane parallel to the incident ray

3 总结与讨论

人体乳腺癌矿化在临床医学和病理学上具有重要指示作用,然而受样品和测试技术限制,乳腺癌矿化灶矿化特征及规律仍不明确。采用同步辐射技术,可以更好地对乳腺癌矿化进行测试研究。

普通 XRD 的 X 射线采用 30~60 kV 的加速电子流,冲击金属(如纯 Cu 或 Mo)靶面产生。常用的 Mo K_{α} 射线波长 71.073 pm, Cu K_{α} 射线波长 154.18 pm。根据衍射条件,定义 Bragg 方程中的最小 d 值: $d_{\min} = \lambda/2\sin\theta_{\max}$, 则 Mo K_{α} 射线最大分辨率为 36 pm, Cu K_{α} 射线的分辨率更低。而同步辐射光源波长比 Mo K_{α} 射线更小,分辨率更高,测试时间更短。同时,SR-XRD 测试所需样品量极小,仅需肉眼可见即可进行测试。因而,SR-XRD 可以更好地对结晶度较差、样品量较小的生物矿化进行物相鉴定和结构分析。Stock 等(2004)和 Pachman 等(2006)分别利用同步辐射光源和 Cu K_{α} 射线对青少年型皮肤钙化进行 XRD 测试,均鉴定出其主要为 HA,但图谱效果前者较优。Schlieper 等(2010)使用 SR-XRD 和 SR-XRF 联用的方法,对尿毒症血管钙化进行研究,SR-XRF 下测出高 Ca 值的位置进行 SR-XRD 测试,鉴定其物相为 HA 和白磷钙石。Giri 等(2012)利用 SR-XRD 研究密质骨,发现大部分矿物晶体都排列在骨长轴附近 30° 范围内。本文利用 SR-XRD 鉴定出乳腺癌钙化的主要物相为 HA 或

CHA,但由于结晶度较差,峰宽化和位移明显,不适合进一步进行结构精修。乳腺癌钙化中的 HA 晶体在 SR-XRD 测试中未显示明显的定向排列。

普遍认为,乳腺病变钙化的矿物物相分为以(C)HA 为主的磷酸钙型和草酸钙型(Haka *et al.*, 2002)。本研究中 XRD 图谱仅显示(C)HA 为主要物相。然而由于 XRD 测试难以进行原位样品物相分布的表征,当 HA 为主要物相时难以确认局部物相分布,而 SR-FTIR 测试可以对样品进行某一波段成像,进而实现物相分布表征。与传统红外碳硅棒光源相比,SR-FTIR 可实现更强的信噪比、更高的空间分辨率和更快的采集时间。本文使用 SR-FTIR 对乳腺癌组织切片样品进行测试,证实钙化部位主要矿物物相为磷酸盐,矿化灶中矿物结晶程度和矿化密度不均匀。

利用 SR-XRF,可以进行微量元素(通常为 10-12 级)或次要元素(通常 1000×10^{-6} 级)的高分辨率成像研究(Adam *et al.*, 1998)。Geraki 等(2008)利用 SR-XRF 对乳腺癌组织进行过成像测试。本文通过 SR-XRF 全谱和成像分析揭示了乳腺癌钙化中 Fe、Cu、Zn、As、Sr 等微量元素的存在,尤其是 Sr 和 Zn 元素的分布与 Ca 的分布一致,说明其存在于 HA 晶格之中。由于 Sr 影响 HA 中 Ca 缺陷的形成,而 Zn 与肿瘤的发生发展密切相关,因此对这两种元素的进一步研究可能对乳腺癌钙化的发生发展提供新的线索。

乳房 X 射线照片是临床中常用的乳腺病变鉴定

依据,其中钙化是重要的、有时甚至是唯一的征象。利用同步辐射光源,可以提高成像效果,基于 BI-RADS 评价系统可以实现 81% 的诊断灵敏度(Buratini *et al.*, 1995),使用衍射增强技术(DED)时成像效果尤为清晰(Keyriläinen *et al.*, 2005)。本文使用同步辐射光源 X 射线三维成像技术,揭示了乳腺癌矿化灶中砂粒体矿化的分层结构。由于该砂粒体有两个核心,且外部壳层连续,可知砂粒体矿化由内向外生长。

总之,同步辐射技术对人体乳腺癌矿化的矿物学表征具有重要的作用。随着观察测试手段的发展,即使是经历了成百上千年研究的骨骼和牙齿,其化学组成和结构也仍然有新的认识(Glimcher, 2006; Boskey, 2007; Pasteris *et al.*, 2008; Rey *et al.*, 2009; Cölfen, 2010)。而对于人体乳腺癌矿化等病理性矿化的研究,更需要不断通过技术的进步来补充和发展。文中所述的测试手段也可应用于其他微量矿物样品上,可以进行微小、微量矿物的物相鉴定、结构分析、形貌表征和元素分析,实现微米级尺度上的矿物学特征研究。

致谢 衷心感谢中国科学院上海应用物理研究所 BL15U 硬 X 射线站、中国科技大学国家同步辐射实验室的红外与远红外线站和北京同步辐射装置 4W1A-X 射线成像实验站提供的机时和实验过程中给予的帮助。

References

- Adams F, Janssens K and Snigirev A. 1998. Microscopic X-ray fluorescence analysis and related methods with laboratory and synchrotron radiation sources[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13(5): 319~331.
- Ando M, Yamasaki K, Toyofuku F, *et al.* 2005. Attempt at visualizing breast cancer with X-ray dark field imaging[J]. *Japanese Journal of Applied Physics*, 44(4L): L528.
- Boskey A L. 2007. Mineralization of bones and teeth[J]. *Elements*, 3(6): 385~391.
- Buratini E, Cossu E, Di Maggio C, *et al.* 1995. Mammography with Synchrotron Radiation[J]. *Radiology*, 195(1): 239~244.
- Cölfen H. 2010. Biomineralization: a crystal-clear view[J]. *Nature Materials*, 9(12): 960~961.
- Geraki K, Farquharson M J, Bradley D A, *et al.* 2008. The localisation of biologically important metals in soft and calcified tissues using a synchrotron x-ray fluorescence technique[J]. *X-Ray Spectrometry*, 37(1): 12~20.
- Giri B, Almer J D, Dong X N, *et al.* 2012. In situ mechanical behavior of mineral crystals in human cortical bone under compressive load using synchrotron X-ray scattering techniques[J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 14: 101~112.
- Glimcher M J. 2006. Bone: nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation [J]. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64(1): 223~282.
- Haka AS, Shafer-Peltier K E, Fitzmaurice M, *et al.* 2002. Identifying Microcalcifications in Benign and Malignant Breast Lesions by Probing Differences in Their Chemical Composition Using Raman Spectroscopy[J]. *Cancer Research*, 62(18): 5375~5380.
- Imamura K, Ehara N, Inada Y, *et al.* 2008. Microcalcifications of breast tissue: appearance on synchrotron radiation imaging with 6 μm resolution[J]. *American Journal of Roentgenology*, 190(4): 234~236.
- Keyriläinen J, Fernández M, Fiedler S, *et al.* 2005. Visualisation of calcifications and thin collagen strands in human breast tumour specimens by the diffraction-enhanced imaging technique: a comparison with conventional mammography and histology[J]. *European Journal of Radiology*, 53(2): 226~237.
- Monda L A. 2001. Differentiation of breast calcifications[J]. *Radiologic Technology*, 72(6): 532~544.
- Morgan M P, Cook M M, Christopherson P A, *et al.* 2001. Calcium hydroxyapatite promotes mitogenesis and matrix metalloproteinase expression in human breast cancer cell lines[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 32(3): 111~117.
- Pachman L M, Veis A, Stock S, *et al.* 2006. Composition of calcifications in children with juvenile dermatomyositis: association with chronic cutaneous inflammation[J]. *Arthritis & Rheumatism*, 54(10): 3345~3350.
- Pasteris J D, Wopenka B and Valsami-Jones E. 2008. Bone and tooth mineralization: Why apatite? [J]. *Elements*, 4(2): 97~104.
- Peacock C, Given-Wilson R M and Duffy S W. 2004. Mammographic casting-type calcification associated with small screen-detected invasive breast cancers: Is this a reliable prognostic indicator? [J]. *Clinical Radiology*, 59(2): 165~170.
- Rey C, Combes C, Drouet C, *et al.* 2009. Bone mineral: update on chemical composition and structure[J]. *Osteoporosis International*, 20(6): 1013~1021.
- Schlieper G, Aretz A, Verberckmoes S C, *et al.* 2010. Ultrastructural analysis of vascular calcifications in uremia [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(4): 689~696.
- Stock S R, Ignatiev K, Lee P L, *et al.* 2004. Pathological calcification in juvenile dermatomyositis (JDM): microCT and synchrotron X-ray diffraction reveal hydroxyapatite with varied microstructures [J]. *Connective Tissue Research*, 45(4~5): 248~256.
- Tse G M, Tan P H, Cheung H S, *et al.* 2008. Intermediate to highly suspicious calcification in breast lesions: a radio-pathologic correlation[J]. *Breast Cancer Research Treatment*, 110(1): 1~7.