

脑膜瘤旁巨型矿化灶矿物成分分析

杨若晨¹, 王长秋¹, 柳剑英², 鲁安怀¹, 张波², 顾建文³, 马原³

(1. 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;
3. 成都军区总医院神经外科中心, 四川成都 610083)

摘要: 脑膜瘤旁复发性巨大矿化灶是罕见的病例, 对其中矿物成分的分析可能会对肿瘤复发病因的研究提供辅助信息。本文利用 X 射线物相分析、红外光谱分析、环境扫描电镜观察和高分辨透射电镜观察分析等方法, 对该矿化灶样品的矿物成分进行了分析。结果表明, 该矿化灶的矿物颗粒大小统计值约为 4.3 nm, 主要成分为碳酸磷灰石, 笔者推测可能还含有少量不定形的磷酸钙系列其他矿物。

关键词: 脑膜瘤, 矿化, 纳米矿物, 碳酸磷灰石

中图分类号: P57

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2007)06-0597-05

Mineral composition of a tremendous mineralization beside meningioma

YANG Ruo-chen¹, WANG Chang-qi¹, LIU Jian-ying², LU An-huai¹, ZHANG Bo²,
GU Jian-wen³ and MA Yuan³

(1. 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; 3. Department of Neurosurgery, General Hospital of Chengdu Command, PLA, Chengdu 610083, China)

Abstract: The relapsed tremendous mineralization beside meningioma is a rare case. An analysis of its mineral composition may provide some support information for finding the reason of relapse. Using X-ray phase analysis, infrared spectrometry, environmental scanning electron microscopy and high-resolution transmission electron microscopy, the authors observed and analyzed the mineral composition of the samples. The results show that the particle size of the mineral is about 4.3 nm (statistical value), and the main component is carbon hydroxyapatite. It is supposed that there may also be a small amount of amorphous calcium phosphate.

Key words: meningioma; mineralization; nano minerals; carbon-apatite

脑膜瘤是起源于脑膜及脑膜间隙的衍生物, 发病率占颅内肿瘤的 19.2%, 居第 2 位, 难根治, 复发率很高, 在脑膜瘤内部或瘤旁经常会有矿化生成。随着生物矿化研究的快速发展, 其重要分支——人体组织矿化也逐渐引起医学、矿物学、材料学、结晶学和生物化学等多学科学者的关注(杨若晨等, 2006)。一些高发疾病(如乳腺癌、脑膜瘤、心血管系统疾病等)中普遍存在鲜为人知的病理性矿化, 不同类型的矿化可能提示疾病的起源和发展过程, 有些特殊类型的矿化已经被作为恶性肿瘤的辅助诊断标志(Sorbe and Frankendal, 1982;

Frappart *et al.*, 1984; Lanyi, 1985; Adelaida *et al.*, 1988; Jose *et al.*, 1991)。脑膜瘤内部的矿化经常以一种同心层状的结构出现, 这是其典型特征(Kubota *et al.*, 1986; Kirschvink, 1992; Cerda, 1995; Han *et al.*, 1996; Yasuhiko *et al.*, 2001), 但尚未见对此类矿化矿物成分的系统研究报道。脑膜瘤矿化中的矿物是人体与周围环境共同作用的产物, 因此含有丰富的能反映人体环境及周围环境变化影响人体的信息, 成为记录环境演变信息的载体。这些信息具体蕴藏在矿物外部微形貌、内部微结构、化学组成、化学性质、物理性质、谱学特征和

收稿日期: 2007-09-10; 修订日期: 2007-09-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(2007CB815602)

作者简介: 杨若晨(1982-), 女, 博士研究生, 环境矿物学研究方向, E-mail: yangruochen325@163.com 通讯作者: 王长秋, E-mail: wqwang@pku.edu.cn.

成因产状等方面(鲁安怀, 2001 2002)。可见,分析病灶中的矿物有望对研究疾病的发生、发展提供辅助信息。本文用改良的方法先将样品的矿物成分分离出来,进行 X 射线能谱分析、X 射线物相分析、红外光谱分析和扫描电镜、透射电镜观察等方法,对伴随脑膜瘤的巨大矿化中矿物成分进行了研究,以期对脑膜瘤复发的原因提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

样品来自成都军区总医院神经外科中心一名 28 岁女患者头颅中切除的两个庞大肿瘤,肿瘤大小分别为:脑膜瘤 $10\text{ cm} \times 8\text{ cm} \times 6\text{ cm}$,瘤旁血肿矿化 $15\text{ cm} \times 10\text{ cm} \times 4\text{ cm}$,肿瘤之大实属罕见。该患者属复发病例,在 12 年前相同部位进行过矿化肿瘤切除手术。

用经过清洗、杀菌的器具在两个肿瘤上分别采集样品,对样品进行下列消化有机质处理。将样品依次用 100%、90%、80%、50% 的乙醇溶液浸泡 1 min,倒去溶液。用双蒸水清洗样品 3 次,用来除去福尔马林溶液。将样品浸泡在 1% 的氢氧化钾溶液中加热到 36°C 在恒温振荡器中保持 2 d,用来分离有机组织(Kirschvink, 1992; Simon *et al.*, 2002)。10 000 r/min 离心,倒去上清液。双蒸水清洗,离心沉淀 3 次,自然干燥。将沉淀放在盛有 2.5% 次氯酸钠溶液(商业上的漂白剂稀释两次)的离心筒内,声波降解 15 min,沉积颗粒立即用 90% 的乙醇溶液清洗两遍,然后放在 5 mL 的 100% 乙醇中浸泡(要确保样品不触及任何杂质离子)。

脑膜瘤经过消化有机质后没有分离出矿物颗粒沉淀,瘤旁的血肿矿化分离出层状矿化块。

1.2 矿化样品形貌观察

①通过肉眼观察消化有机质后的矿化样品形态、颜色等特征;②利用环境扫描电镜观察矿化样品微形貌,把矿化样品用导电胶带粘在硅片上放置于样品台上,在场发射环境扫描电镜(Quanta 200FEG)下进行观察。

1.3 矿化样品成分分析

①环境扫描电镜附属 EDAX 能谱仪分析元素成分:在场发射环境扫描电镜(Quanta 200FEG)下用 EDAX 能谱仪分析其各元素含量;②红外光谱分析原子团成分:称取 1 mg 研碎的矿化样品与 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,迅速放入 Raman 950/Magna-IR750 型傅立叶变换拉曼红外光谱仪中测试。设置光谱为 $4000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$,分辨率为 4 cm^{-1} 。将测得的红外光谱图与 Sadtler 红外谱图数据库中的标准矿物红外光谱图做“峰-峰”比对,从而鉴定矿化样品的成分。

1.4 矿化样品物相分析

①X 射线物相分析:将样品研成大约 $10\text{ }\mu\text{m}$ 的粉末,涂片。采用 RIGAKU-RA 型 X 射线物相衍射仪进行测试。测试条件 $\text{CuK}\alpha$ 加速电压 40 kV,电流 100 mA,波长 1.540 6 nm,扫描范围 $2^\circ \sim 75^\circ$,扫描速度 $5^\circ/\text{min}$,步宽 0.02° ;②高分辨透射电镜物相分析:将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 TECNAIF30 型场发射高分辨透射电子显微镜进行观察分析。

2 结果与讨论

2.1 矿化样品形貌观察及成分分析

2.1.1 肉眼观察

消化有机质后的矿化成层状,灰白色,多孔,不易被碾成粉末,有韧性。

2.1.2 环境扫描电镜观察样品表面微形貌及分析元素含量

应用装有 EDAX 附件的扫描电镜观察人体矿化样品,并对所得元素成分的比值进行分析。这是被一些专家认为是有效进行原位研究的方法(Sarah *et al.*, 1998)。扫描电镜观察结果表明,矿化为明显的层状结构(图 1a),进一步放大可以看到纤维状的晶体(推测其已结晶)沿着层面排列。能谱分析结果如表 1、图 2,主要元素钙和磷的原子分数比值(Ca/P)为 1.65。图 1b 显示的是从层状矿化中剥离出的薄片,可以看到

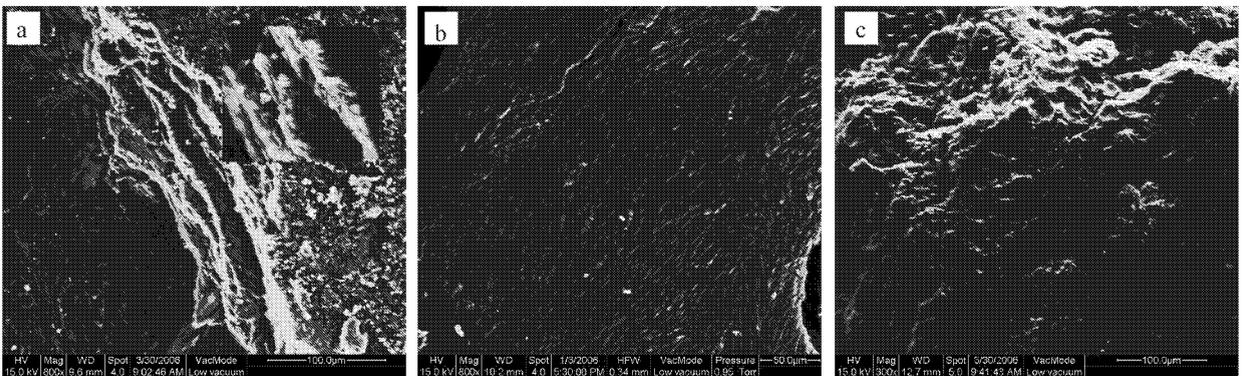


图 1 脑膜瘤矿化样品扫描电镜照片

Fig. 1 SEM images of the mineralization samples in meningioma
a—层状矿化图 b—剥离层图 c—自然断面图

a—image of the layer mineralization; b—image of the stripped layer; c—image of the natural cross section

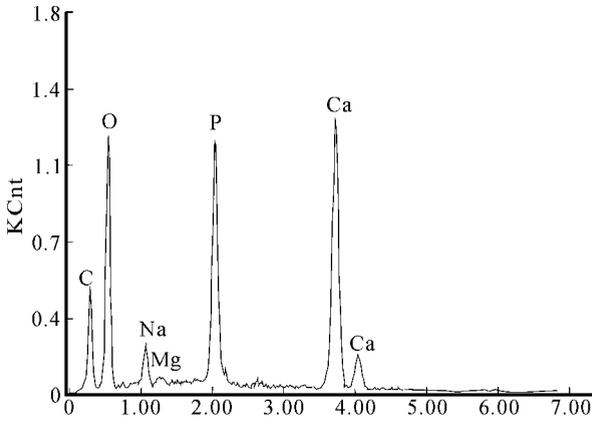


图 2 脑膜瘤矿化样品的 EDAX 能谱

Fig. 2 EDAX spectroscopy of the mineralization samples in meningioma

表 1 脑膜瘤矿化样品 EDAX 测量成分量化表

Table 1 EDAX quantification table of the mineralization samples in meningioma

元素	C	O	Na	Mg	P	Ca	Ca/P
$x_B/\%$	35.05	41.91	1.77	0.28	7.93	13.07	1.65
$w_B/\%$	22.06	35.14	2.14	0.35	12.87	27.45	

表 2 磷酸钙系列矿物化学式及 Ca、P 原子含量比值

Table 2 Molecular formula of the series of calcium phosphate minerals and Ca、P atom content ratio

矿物	化学式	$x(\text{Ca})/x(\text{P})$
磷酸氢钙	CaHPO_4	1
磷酸八钙	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
磷酸三钙	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5
羟基磷灰石	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$	1.667
碳酸磷灰石	$(\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Na}, \text{H}_3)(\text{P}, \text{C})_3\text{O}_{12}(\text{OH}, \text{Cl}, \text{F})$	>1.667

表面有纤维状的凹痕，推测为被溶解的胶原纤维留下的痕迹，能谱分析结果 Ca/P 为 1.56。矿化块自然断裂的表面可以看到许多纳米尺度的球形矿化颗粒(图 1c)，由于分辨率有限，矿化晶体的观察要依靠透射电镜实现。自然断面的能谱分析结果 Ca/P 为 1.63。形貌分析结果说明，样品中矿化颗粒为纳米级别，可观察到的形态有纤维状和球状，呈现层状的富集方式。能谱分析该矿化的主要成分为 C、O、Ca、P，其中 Ca/P 都在磷酸钙系列矿物范围之内(表 2)。测试所得 Ca/P 比碳酸磷灰石的理论值偏低，推测由两种以上的物相存在造成。

2.1.3 红外光谱分析原子团成分

矿化样品在傅立叶变换拉曼红外光谱仪中测试结果见图 3。从图 3 可以看出，在 1048cm^{-1} 处的强吸收峰为 PO_4^{3-} 典型的对称伸缩振动吸收峰， 950cm^{-1} 处的小吸收峰也是 PO_4^{3-} 的伸缩振动吸收峰。 1400cm^{-1} 附近存在 CO_3^{2-} 的宽

吸收峰， 873cm^{-1} 也是 CO_3^{2-} 的吸收峰。 OH^- 在 $3300\sim 3400\text{cm}^{-1}$ 之间有峰，且有大的水峰。在 1720cm^{-1} 处出现了羰基的特征吸收峰，这可能是与矿化紧密相连的酯类物质未溶解完全形成的吸收峰。

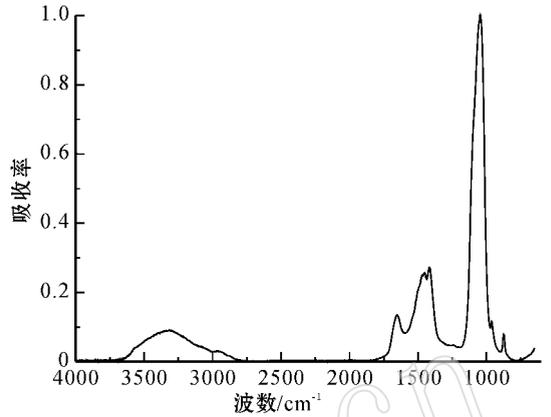


图 3 脑膜瘤矿化样品红外光谱图

Fig. 3 Infrared spectra of the mineralization samples in meningioma

2.2 矿化样品物相分析

2.2.1 X 射线物相分析

将矿化样品的 X 射线衍射谱线(图 4)与国际衍射数据中心(The International Centre for Diffraction Data, ICDD)中 12-0529 卡片中碳酸磷灰石的数据对比，结果基本吻合，由此可知，此矿化的主要成分是碳酸磷灰石($\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Na}, \text{H}_3$) $(\text{P}, \text{C})_3\text{O}_{12}(\text{OH}, \text{Cl}, \text{F})$ 。从图 4 中可以看到衍射背底稍高，说明存在少量不定形成分。图谱经过平滑和扣背底处理后，排除仪器引起的宽化，经过图形拟合得出 XRD 图谱中主要衍射峰的半高宽，然后根据谢乐 Scherrer 公式 $D = k\lambda/\beta\cos\theta$ 计算对应的晶粒尺寸。式中 D 为晶粒尺寸(nm)， k 为 Scherrer 常

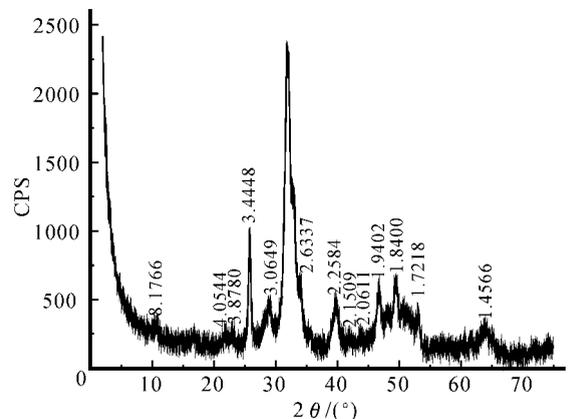


图 4 脑膜瘤矿化样品 X 射线衍射图谱

Fig. 4 X-ray diffraction spectra of the mineralization samples in meningioma

数(0.89), λ 为 X 射线波长(0.154 056), β 为积分半高宽度, θ 为衍射角。(0002)对应的半高宽 $\beta = 0.032 \text{ } \alpha \text{ (rad)}$, 算出垂直该方向的晶粒尺寸为 4.3 nm。

2.2.2 高分辨透射电镜物相分析

经过高分辨透射电镜观察样品, 发现有两种形态的矿化颗粒, 如图 5。

图 5a 为粒状的晶体, 粒径约为 4~7 nm, 这种形态的晶体在样品中多见。图 5a 右上角为样品的衍射花样, 样品的衍射花样为多晶环形式, 可见样品由纳米多晶组成。衍射环半径与对应 d 值存在以下关系: $d = L\lambda/R$, 式中 d 为晶面间距, R 为衍射环半径, λ 为电子波长, L 为有效相机长度。用标样测试得出电镜常数, 公式就可写为 $d = 570/R$ (R 的单位为 pixel)。对所得衍射环进行标定, 计算结果如表 3, 半径平

方比约为 3:4:7:9:12, 符合六方晶系规律, 并且 d 值与 ICDD 中 12-0529 号卡片碳酸磷灰石的数据对应。衍射环的形态表明晶体排列有沿(0002)的择优取向性。选取晶粒做高分辨像(例如如图 5a 右下角), 得出的晶面间距在卡片上也可以找到对应。此结果进一步证实了 X 射线衍射的分析结果。

图 5b 为纤维状的颗粒, 右上角的衍射花样不清晰, 说明有很多不定形成分, 右下角的高分辨晶格条纹也不清晰, 排除样品条件的影响, 也可以推测出样品的结晶度不好。对整个矿化样品来说, 这可能是晶体形成的初步阶段。而纤维状不是晶体的形态, 推测是胶原纤维的残余形态。胶原纤维已被认为与人体中矿化密切相关(Lumenthal *et al.*, 1991; Christiansen and Silver, 1993; Han *et al.*, 1996)。胶原纤维为矿化提供了成核点, 矿化由此发生发展。

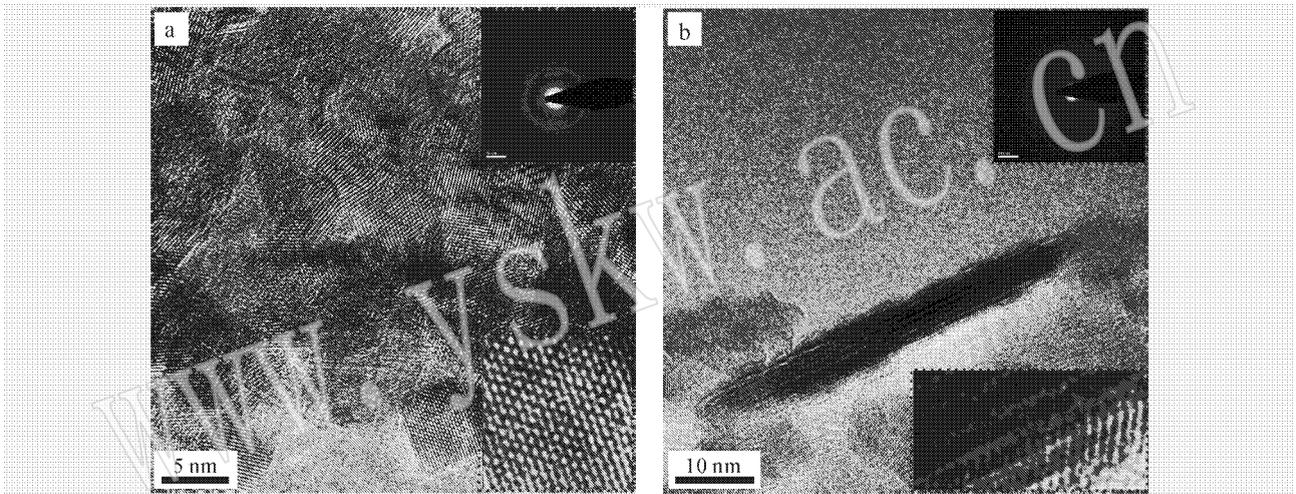


图 5 脑膜瘤矿化样品中粒状(a)纤维状(b)颗粒透射电镜图

Fig. 5 TEM images of granular (a) and fibrous (b) particles in the mineralization samples in meningioma

表 3 脑膜瘤矿化样品中粒状颗粒的衍射环标定结果

Table 3 Calibration results of electron diffraction rings of granular particles

1	R (pixel)	R_1^2/R_1^2	$3R_2^2/R_1^2$	$d_1/\text{Å}$	$d_{hkl}/\text{Å}$	hkl
1	163.295	1	3	3.490 6	3.451 0	002
2	189.315	1.38	4.14	3.050 9	3.092 0	210
3	258.175	2.43	7.29	2.207 8	2.271 0	310
4	291.645	3.16	9.48	1.954 4	1.949 0	222
5	324.875	3.96	11.88	1.754 5	1.757 0	303

3 结论

(1) 经过对样品的形貌观察、成分分析、物相分析, 认为矿化的主要矿物成分为纳米碳酸磷灰石, 晶体尺寸的统计值为 4.3 nm。沿(0002)方向择优取向排列, 成层状结构。据 X 射线衍射、透射电镜观测、EDAX 测试成分结果可以推测有少

量无定形的其他磷灰石系列矿物存在。

(2) 据扫描电镜、红外光谱和透射电镜的测试结果还可以推测, 与矿化过程息息相关的有机物质包括胶原纤维和一些酯类。层状排列和择优取向的矿物成分, 纤维状的无定形成分的成核、有序生长和聚集都与这些有机大分子存在密切关联。

(3) 有机大分子成分分析需要后续对样品的原位研究来证实。无机的矿物成分指示了人体环境中哪些相关信息, 这些信息与脑膜瘤的发生有何关系, 还需要继续深入的研究来寻求答案。

References

- Adelaida F M, Miguel P E and Josep M. 1988. Adolf T C. Breast tumors: Composition of microcalcifications [J]. *Radiology*, 169: 325~327.
- Aure J C, Hoeg K and Kolstad P. 1971. Psammoma bodies in serous

- carcinoma of the ovary-A prognostic study[J]. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 109:113~18.
- Cerda N M. 1995. Meningiomas: Morphologic and ultrastructural characteristics of psammoma bodies[J]. *Arch. Neurobiol. Madr.*, 55:256~261.
- Christiansen D L and Silver F H. 1993. Mineralization of an axially aligned collagenous matrix: a morphological study[J]. *Cells Mater.*, 3:177~188.
- Frappart L, Boudeulle M and Boumendil J. 1984. Structure and composition of microcalcifications in benign and malignant lesions of the breast: Study by light microscopy, transmission and scanning electron microscopy, microprobe analysis, and X ray diffractor[J]. *Human Pat. hol.*, 15:880~889.
- Han J, Daniel J C and Pappas G D. 1996. Expression of type IV collagen in psammoma bodies: Immunofluorescence studies on two fresh human meningiomas[J]. *Acta Cytol.* 40:177~181.
- Jose E, Gonzalez R G and Caldwell J V. 1991. Calcium oxalate crystals in the breast[J]. *Am. J. Surg. Pat. hol.*, 15(6):586~591.
- Kirschvink J L. 1992. Magnetite biomineralization in the human brain[J]. *Proc. Natl. Acad.*, 89:7683~7687.
- Kubota T, Yamashita T, Hasegawa M, et al. 1986. Formation of psammoma bodies in meningocytic whorls: Ultrastructural study and analysis of calcified material[J]. *Acta Neuropathol.* 70:262~268.
- Lanyi M. 1985. Microcalcifications in the breast: A blessing or a curse, A critical review[J]. *Diagn. Imag. Clin. Med.* 54:126~145.
- Lu Anhuai. 2001. Basic Properties of environmental mineral materials: natural self-purification of inorganic minerals[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 20(4):371~381(in Chinese with English abstract).
- Lu Anhuai. 2002. Environmental properties of minerals and natural self-purification of inorganic minerals[J]. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 21(3):192~197(in Chinese with English abstract).
- Lumenthal N C, Cosma V and Gomes E. 1991. Regulation of hydroxyapatite formation by gelation and type I collagen Gels[J]. *Calcif. Tissue. Int.* 48:440~442.
- Sarah H P, Catherine H, Skinner W, et al. 1998. Darryl Carter. Using scanning electron microscopy to study mineral deposits in breast tissues[J]. *American Mineralogist*, 83:122~126.
- Simon B, Sideny B L, Maria P, et al. 2002. Gullia. calcite microcrystals in the pineal gland of the human brain: First physical and chemical studies[J]. *Bioelectromagnetics*, 23:488~495.
- Sorbe B and Frankendal B. 1982. Prognostic importance of psammoma bodies in adenocarcinoma of the ovary[J]. *Gynecol. Oncol.* 4:6~14.
- Yang Ruochen, Lu Anhuai, Liu Jianying, et al. 2006. Advances of the study on Pathological minerals of popular diseases[J]. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 25(4):395~402(in Chinese with English abstract).
- Yasuhiko K, Hiroyuki N, Hideto S, et al. 2001. Bone morphogenetic protein and type IV collagen expression in psammoma body forming ovarian cancer[J]. *Anticancer Res.*, 21:1723~1730.

附中文参考文献

- 鲁安怀. 2001. 环境矿物材料基本性能——无机界矿物天然自净化功能[J]. *岩石矿物学杂志*, 20(4):371~381.
- 鲁安怀. 2002. 矿物环境属性与无机界天然自净化功能[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 21(3):192~197.
- 杨若晨, 鲁安怀, 柳剑英, 等. 2006. 人体高发疾病的病理性矿物研究进展[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 25(4):395~402.