

乳腺炎症及增生症病灶中钙化的矿物学研究

熊翠娥¹, 王长秋¹, 鲁安怀¹, 李 艳¹, 梅 放², 柳剑英²

(1. 北京大学 造山带与地壳演化教育部重点实验室, 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: 选取9例乳腺炎症、7例乳腺增生的钙化样品, 利用光学显微镜(OM)、环境扫描电镜(ESEM)、微区X射线衍射(μ -XRD)等矿物学分析方法对样品进行了原位形貌观察、分离后结构及成分的测试分析, 探讨了病灶中钙化的矿物学特征及其组成成分和形成机制。研究结果表明, 发生在炎症病灶中的钙化主要类型是脂肪坏死后的钙化, 其发生和死亡的脂肪细胞和周围病变后期修复性Ⅲ型胶原有直接关系。增生症中的钙化主要有发生在扩张的导管内和在束状深度交联胶原中的坏死型钙化, 扩张的导管边缘处Ⅳ型胶原和大片变性Ⅲ型胶原为钙化提供了成核位点, 继而参与无机矿物的形成过程, 最后形成较为致密的钙化。乳腺炎症和增生症中的钙化的主要成分均为碳羟磷灰石。

关键词: 乳腺炎症; 乳腺增生症; 钙化; 碳羟磷灰石; 矿物学

中图分类号: P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2011)06-1014-07

Mineralogical studies of calcification in inflammation and hyperplasia of breast

XIONG Cui-e¹, WANG Chang-qiu¹, LU An-huai¹, LI Yan¹, MEI Fang² and LIU Jian-ying²

(1. Key Laboratory of Orogenic Belts and Crustal Evolution, MOE, 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: Calcifications in the calcified focuses from inflammation and hyperplasia of breast patients were investigated in terms of their composition, structure and morphology by using light microscope (OM), environmental scanning electron microscope (ESEM) and micro area X-ray diffraction (BL15U), and the formation mechanism of the calcifications was discussed. The results show that the calcifications in inflammation focus mainly result from dead adipocytes and repairing collagen of type Ⅲ which occurs at the late stage of the disease. Dilating catheter calcifications in hyperplasia of breast come from collagen of type Ⅳ. At the early stage of thanatosis calcification of hyperplasia, many nano-sized calcified balls are precipitated on the collagen fibers of type Ⅳ due to the adsorption of inorganic ions such as calcium ions onto glucose amino glycan. These balls continue to grow and aggregate, and gradually act as the calcification of the collagen fibers during the development of the disease, which finally turns out to be a large area. The main component of calcifications of both inflammation and hyperplasia of breast is poorly-crystallized carbonate-rich hydroxylapatite.

Key words: inflammation of breast; hyperplasia of breast; calcification; carbonate-rich hydroxylapatite; mineralogy

收稿日期: 2011-09-08; 修订日期: 2011-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40872196); 国家重点基础研究发展计划 973 资助项目(2007CB815602)

作者简介: 熊翠娥(1988-), 女, 硕士研究生, 从事人体病理性矿物学研究, E-mail: xiongcuie@pku.edu.cn; 通讯作者: 王长秋, E-mail: cqwang@pku.edu.cn.

多种乳腺疾病中经常伴生矿(钙)化。矿(钙)化在影像学上的显著特征是识别乳腺病变的重要标志之一。钙化的形状和分布被认为是区分乳腺疾病良恶性的重要判别标准之一(Busing *et al.*, 1981; Muir *et al.*, 1983; Kopans, 1998; Morgan *et al.*, 2005; Imamura *et al.*, 2008)。乳腺疾病发展的初期阶段及早确诊有助于提高治愈率(田捷, 2003), 确定乳腺内钙化是早期发现乳腺癌及制定正确治疗方案的可靠保证之一(郇军亮, 2005)。

已有的研究表明,不同钙化的中心和周围组织的联系和分布方式存在差异,且在化学组成和结晶习性上也有所不同(Hassler, 1969; Ahmed, 1975; Barth *et al.*, 1977; Keppler & Nitsche, 1979; Winters *et al.*, 1986)。乳腺组织不同部位钙化的Ca/P比值有差异,并可能对应着不同的磷酸盐物相(Poggi *et al.*, 1998)。Fandos-Morera等(1988)研究了31个病人乳腺矿化病灶的形态和成分,发现任何病理性钙化都会产生磷灰石,而草酸盐则均出现在恶性肿瘤中;另有学者研究指出乳腺病灶中主要有两种成分类型的矿(钙)化,即草酸钙和磷酸钙,但其与疾病的良恶性无简单对应关系,草酸钙更多出现在良性病变中,但也见于小叶原位癌中(Frappart *et al.*, 1984, 1986; Radi, 1989; Haka *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2007)。

常伴发钙化的乳腺疾病主要有乳腺肿瘤、乳腺增生症、乳腺炎症病例(付丽等, 2008), 乳腺增生症的发病率在乳腺疾病中占首位(王长秋等, 2011)。乳腺炎症为细菌侵入乳腺组织所引起的病变,表现为边界不清的硬结,局部组织发生坏死、液化,经常伴发钙化,乳腺增生症指乳腺上皮和纤维组织增生,乳腺组织导管和乳腺小叶在结构上的退行性病变及进行性结缔组织的生长,乳腺增生导管腺腔中可以发生微钙化,常见为无定形颗粒物或者离散的嗜碱性沉积物(薛卫成等, 2008; 付丽等, 2008)。作为区分于肿瘤病变最常见的伴发钙化的乳腺病变,发生在炎症和增生症中钙化的研究具有重要意义,但目前非肿瘤病灶中钙化的矿物学研究鲜有涉及,对其中矿化产物的矿物学特征及其形成机制研究不够深入和系统,组织中的非正常矿物沉积及其对疾病发生发展的指示意义仍有待探索。本文选取了9例乳腺炎症、7例乳腺增生的钙化样品,利用OM、ESE-EM、 μ -XRD等矿物学分析方法对样品进行了原位形貌观察、分离后结构及成分的测试分析,探讨了乳腺

炎症和增生症中钙化的矿物学特征及其形成机制。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

在北京大学医学部病理学系病历库中查询出66例伴发钙化的乳腺疾病患者的病例记录,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,从中选出具有明显钙化的9例乳腺炎症、7例乳腺增生病例,并在蜡块库中找出石蜡包埋的样品块。根据不同的测试要求制备用于原位观察的普通苏木精-伊红(HE)染色玻璃片和硅质薄片样品,部分样品进行了钙化与有机组织的分离处理,具体处理方法见文献赵文雯等(2009)。

1.2 样品观察与测试

首先利用OM观察病灶的组织学特征,初步观察钙化的形貌及其和有机组织间的关系,同时做好进一步ESE-EM观察的矿化灶定位。在北京大学物理学院场发射环境扫描电镜(Quanta 200FEG)下进一步观察钙化的微形貌及其和有机组分之间的联系。将分离出的钙化粉末状样品在显微镜下堆积在3M胶带上,并让粉末尽量紧密而且均匀分布,采用上海光源微聚焦线站(BL15U)的微区X射线衍射模式进行观察测试,所使用的光束波长为0.6885 nm,聚焦离子束的光斑大小约为 $5 \times 10 \mu\text{m}^2$,使用CeO₂标样校对样品和Mar CCD探测器之间的距离等参数,每次测试采集样品信号的时间为10 s,使用Fit2D软件得到一维衍射图谱,并使用Datalab软件进行数据的基线校正。

2 结果与讨论

2.1 原位形貌观察

2.1.1 光学显微镜观察

在光学显微镜下观察16例病例的HE染色薄片,发生在炎症的钙化主要有脂肪坏死钙化(图1a、1b),发生在增生症中的主要有扩张导管内潴留物钙化(图1c)、胶原变性坏死型钙化(图1d)等类型。

如图1a、1b中箭头所指深染区域为发生在炎症病灶中脂肪坏死区域的钙化,大片钙化由很多大小不一的区域融合而成,外围是变性的束状胶原。脂肪细胞状的钙化融合在一起,形成了直径约100 μm 的大片不连续钙化。脂肪坏死早期脂肪细胞变性、

坏死、崩解,融合成大小不一的空腔,后期为纤维组织所取代,并伴发钙化。脂肪坏死的 X 射线影像学特征和在光学显微镜下观察到的一致,表现为刺状包块,含有斑点状或者大的不规则钙化。

图 1c 中箭头所指深染处为发生在增生症病灶中扩张导管内的钙化,乳腺组织内存在大量的导管,乳腺增生后扩张的导管内潴留了大量分泌物,后期继发钙化。因为分泌物无有序结构,扩张导管内潴

留物的钙化比较分散,大小为几个 μm 。

图 1d 中箭头所指深染大片区域为发生在炎症病灶中胶原变性坏死型钙化,钙化致密均匀,剖面平整,直径约 $100\ \mu\text{m}$ 。钙化外围为深度交联的变性胶原,和钙化的联系较为紧密。从形貌还可以看出钙化的走向和粗大胶原的分布方向相同,初步推断大片不规则钙化的形成和胶原密切相关,因此形貌上保留了胶原的束状结构。

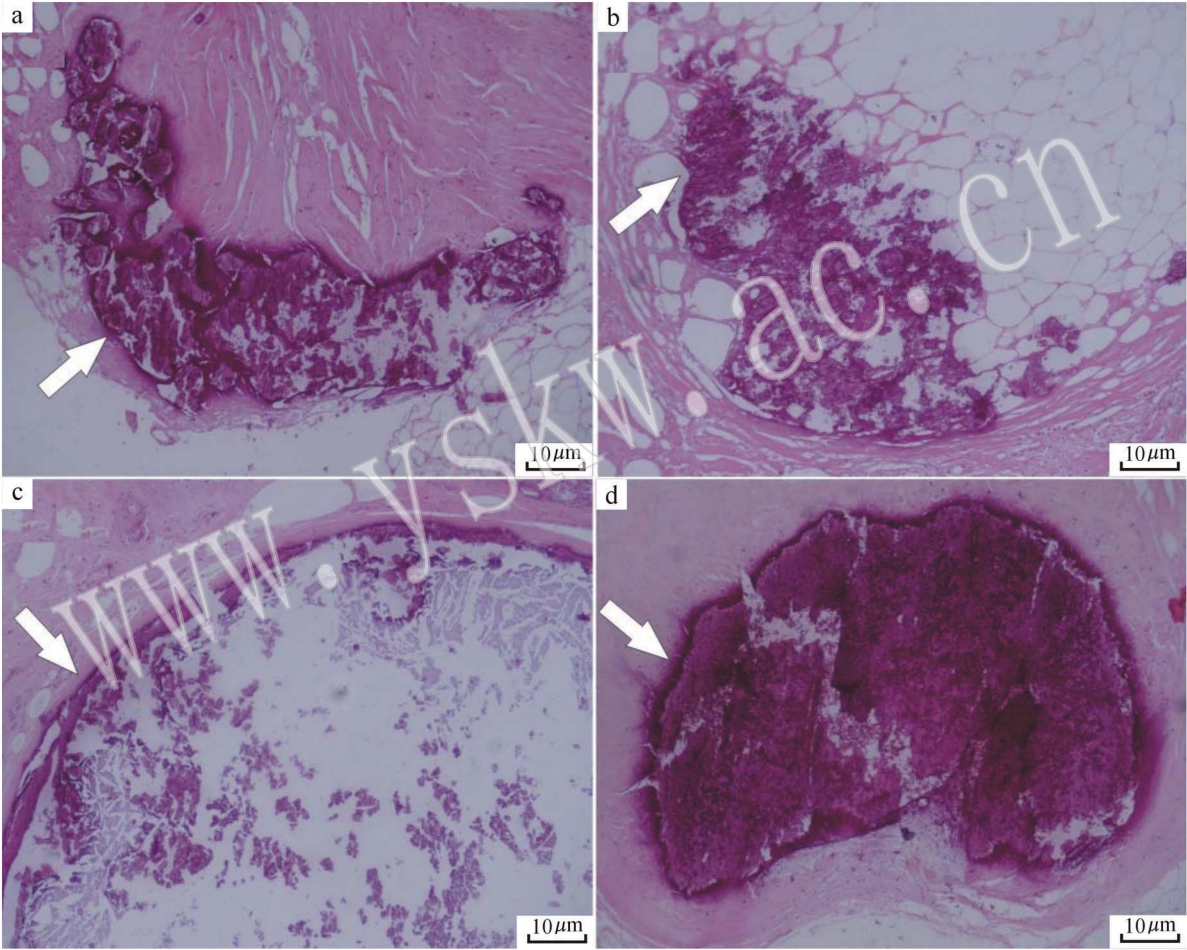


图 1 乳腺炎症(a、b)和增生症(c、d)钙化灶及其周围组织特征 HE 显微照片

Fig. 1 HE photomicrograph of calcification in inflammation (a, b) and hyperplasia (c, d) of breast

2.1.1.2 环境扫描电镜观察

ESEM 观察脂肪坏死后的钙化区域,可见圆球形空腔钙化的剖面,推断是原脂肪细胞壁由大量钙化小球堆积而成的空腔取代(图 2a),钙化逐渐向中间发展,形成了球体状的钙化(图 2b),球体状钙化的中间区域较为致密,没有形成明显的环带构造。空腔钙化和球体状钙化周围还存在胶原包裹的大量纳

米级的钙化小球(图 2a、2b)。

放大观察大片钙化的边缘部位,大量大小不一的钙化小球堆积在一起,部分还呈细胞分裂未完成状,可见胶原对小球的包裹和共生关系(图 2c)。对应于图 1a 所示中间部位致密钙化的剖面为隐晶质结构(图 2d),钙化碎裂,说明钙化的硬度大,剖面可见不同的颗粒状构造。

ESEM 观察扩张导管区域的钙化,在 ESEM 下观察到扩张的导管内较空,可能是由于处理样品的脱蜡过程中流失了导管中间较为松散的钙化,而在扩张导管边缘部位有粒径不等的钙化小球在胶原上沉积(图 2e),在胶原的包裹中小球紧密聚集,钙化和胶原间的共生关系较为明显,边缘部位较大面积处钙化的剖面致密,且较为平整(图 2f),较脂肪坏死后

钙化的硬度小。
ESEM 观察增生症中坏死型钙化,显示钙化没有明显的核结构,性质有层状差异,钙化和有机组织之间附着紧密,并且在钙化附近外围区域有很多圆形的钙化小颗粒松散沉积在胶原上(图 2g)。由放大图可见钙化的自然断面呈参差状断口,呈现出层间差异和大小不等的颗粒状构造(图 2h)。

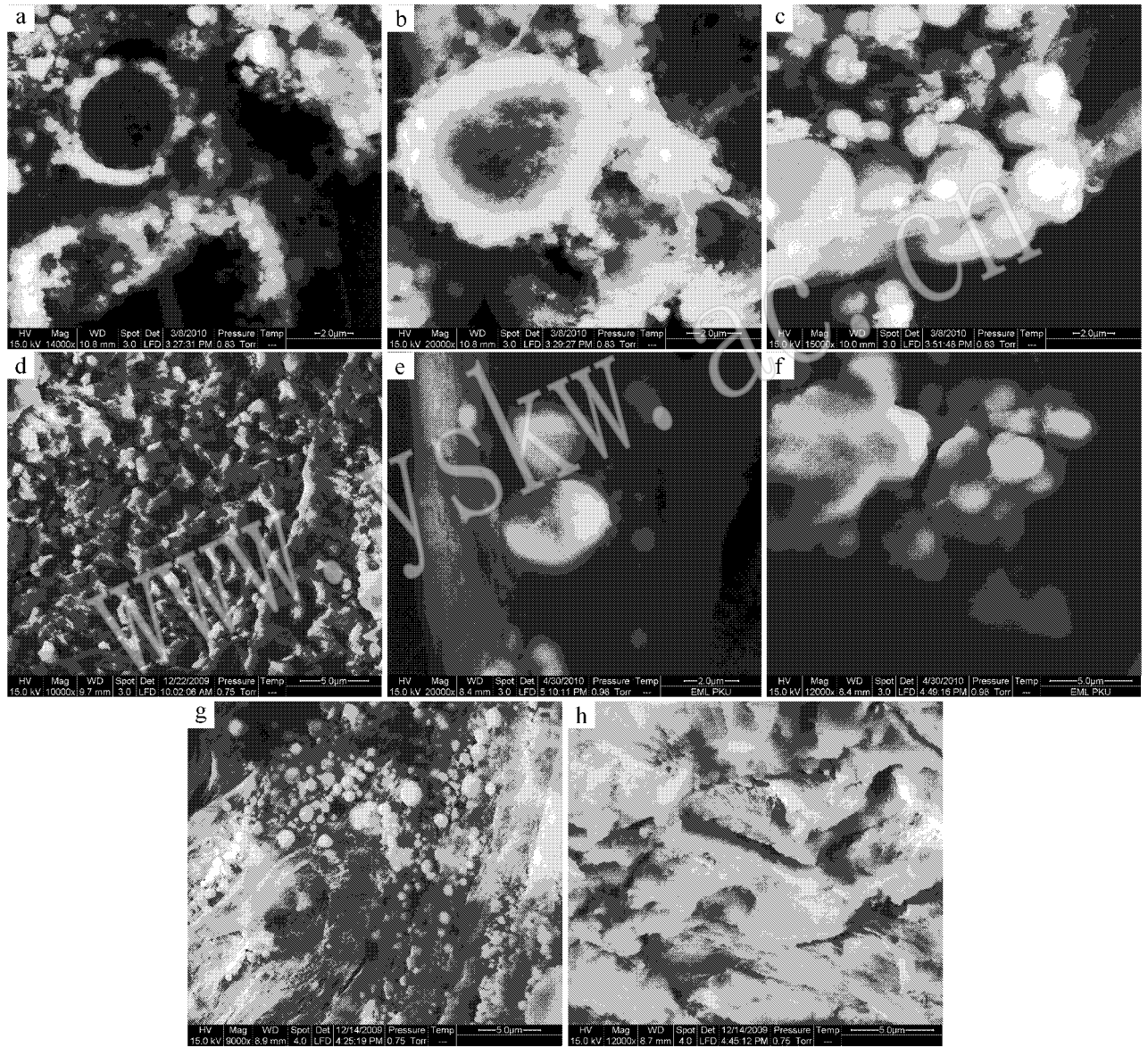


图 2 脂肪坏死钙化(a、b、c、d)和增生症中坏死钙化的 ESEM 形貌像(e、f、g、h)

Fig. 2 ESEM morphologic photographs of adiponecrosis calcification(a, b, c, d) and thanatosis calcification of hyperplasia(e, f, g, h)

2.2 分离后微区 X 射线衍射物相及成分分析

将分离出的钙化颗粒进行 μ -XRD 测试,结果显示乳腺炎症和增生症病灶中的钙化和标准数据 09-

0432# PDF 卡片都能进行很好的匹配(表 1),表明炎症和增生症中钙化的主要物相均为碳羟磷灰石。对病灶中钙化测试结果的强峰进行标定,结果如图 3

所示,实线和虚线分别代表两例炎症和两例增生症病灶中的钙化。由衍射峰的高度和宽度等形状特征差异可以看出不同病例中钙化的结晶程度有差异,在炎症和增生症中的钙化均有结晶程度较好和较差的病例。

表 1 钙化的微区衍射标定结果

Table 1 Calibration results of μ -XRD spectra of calcifications

面网指数 (hkl)	面网间距 d/Å	I/I ₀ 碳羟磷灰石(09-0432# PDF)	I/I ₀ (炎症钙化) I/I ₀ (增生症钙化)			
			点 1	点 2	点 1	点 2
002	3.44	40	35	40	70	50
102	3.17	12	10	10	10	10
210	3.08	18	14	12	10	12
211	2.81	100	100	100	100	100
112	2.77	60	100	100	100	100
300	2.72	60	60	60	50	60
202	2.63	25	25	25	25	25
310	2.26	20	20	20	15	15
222	1.94	30	25	20	20	20
213	1.84	40	30	30	30	30
004	1.72	20	20	15	20	15

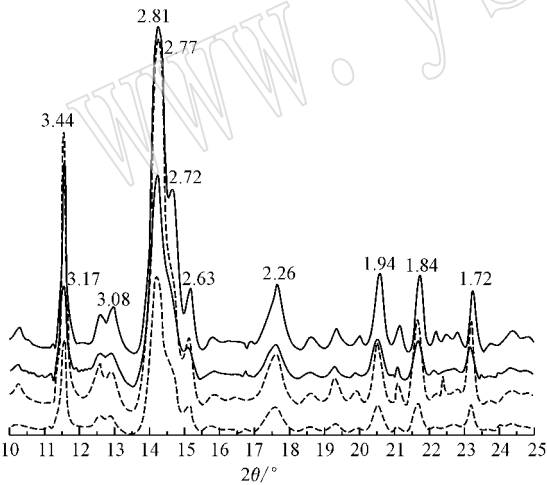


图 3 钙化的微区 X 射线衍射图(实线为炎症,虚线为增生症中的钙化)

Fig. 3 μ -XRD patterns of calcification(solid lines representing inflammation and dashed lines representing hyperplasia)

2.3 讨论

软组织钙化和胶原病变密切相关(Kim *et al.* , 2004),生物特殊染色研究结果显示脂肪坏死和纤维腺瘤伴发的矿化均与Ⅲ型胶原有关,乳腺增生症伴

发的矿化与Ⅳ型胶原有关,而乳腺导管原位癌矿化与上述两种胶原的关系不大(梅放等,2011)。已有研究证实胶原分子的羧基和羰基是骨矿化的成核点(Cui *et al.* , 2008),胶原纤维老化过程中纤维结缔组织增生,会导致多量糖蛋白聚集,而糖蛋白上的氨基聚糖含有大量阴离子能结合 Ca^{2+} 等阳离子,而为钙化提供了成核位点,引发钙化(Barth *et al.* , 1977 ;杨光华,2001)。

形貌分析结果显示炎症病灶中脂肪坏死后钙化是由坏死后的脂肪细胞膜成核,期初形成的是空泡状,后期不断发展,形成球体状钙化,最后和外部在Ⅲ型胶原中及其他钙化小球融合形成光学显微镜下观察到的 HE 染色片中主要成分为碳羟磷灰石的大片钙化。球体状钙化没有形成明显的环带结构,与胶体环境成因没有明显的直接关系。但是球体状钙化的中间区域较为致密,在后期的发展过程中是否发生了物相的改变还需要更精细的测试。钙化的剖面可见不同的颗粒状构造,这可能是因为大片钙化是由大小不一的钙化小球不断生长融合而成。

增生症中扩张的导管腺腔中间潴留物钙化由于和周围的组织附着不紧密,较难观察到微形貌,导管边缘处的钙化可能是由钙化小球在导管上皮中变性的Ⅳ型胶原上成核,不断发展为聚集体,最后形成断面致密的钙化。增生症中的坏死钙化是由于 Ca^{2+} 等阳离子与变性Ⅲ型胶原中大量的氨基聚糖上的羟基和羧基结合,钙化由此发生,伴随病变发展成纳米尺度的钙化小球,致使有机组织营养不良也发生钙化,有机组分和无机组分不断演变为小的团块状钙化,最后形成结晶程度较差的碳羟磷灰石。

由 μ -XRD 测试结果衍射峰的高度和宽度等形状特征差异可以看出不同病例中钙化的结晶程度不相同,在炎症和增生症中的钙化均有结晶程度较好和较差的病例,可能随着病变不断发展由结晶程度差的演变为结晶较好的碳羟磷灰石晶体。

3 结论

(1)在光学显微镜下观察到的发生在炎症病灶中的钙化主要是脂肪坏死后的钙化,其发生和死亡的脂肪细胞和周围病变后期修复性Ⅲ型胶原有关。而增生症中的钙化主要有发生在扩张的导管内和在束状深度交联胶原中的坏死型钙化,扩张的导管边缘处Ⅳ型胶原和大片变性Ⅲ型胶原为钙化提供了成

核位点,继而参与无机矿物的形成过程,最后形成较为致密的钙化。

(2)乳腺炎症和增生症中的钙化的主要成分均为碳羟磷灰石,不同病例病灶中钙化的结晶程度不同,这与乳腺肿瘤病灶中的成分研究结果一致(待发表)。区别于发生在恶性肿瘤中的钙化,炎症和增生症中的钙化面积较大,钙化的形成位置特殊,对判断钙化的良恶性指向具有临床指导意义。

致谢 微区X射线衍射部分的分析测试是在中国科学院上海应用物理研究所微聚焦线站(BL15U)完成的,在此表示衷心感谢。

References

- Ahmed A. 1975. Calcification in human breast carcinomas: ultrastructural observations[J]. *Journal of Pathology*, 117(4): 247~251.
- Baker R, Matousek P, Ronayne K L, *et al.* 2007. Depth profiling of calcifications in breast tissue using picosecond Kerr-gated Raman spectroscopy[J]. *Analyst*, 132(1): 48~53.
- Barth V, Franz E D and Scholl A. 1977. Microcalcifications in mammary gland[J]. *Naturwissenschaften*, 64(5): 278~279.
- Busing C M, Keppler U and Menges V. 1981. Differences in microcalcification in breast tumors[J]. *Virchows Arch Pathol Anat.*, 393: 307~313.
- Cui F Z, Wang Y, Cai Q, *et al.* 2008. Conformation change of collagen during the initial stage of biomineralization of calcium phosphate[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 18: 3835~3840.
- Fandos-Morera A, Prats-Estevé M, Tura-Soteras J M, *et al.* 1988. Breast tumors: composition of microcalcification[J]. *Radiology*, 169(2): 325~327.
- Frappart L, Boudeulle M, Boumendil J, *et al.* 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 diffraction[J]. *Human Pathology*, 15: 880~889.
- Frappart L, Remy I, Lin H C, *et al.* 1986. Different types of microcalcifications observed in breast pathology[J]. *Virchows Arch A*, 410: 179~187.
- Fu Li and Fu Xilin. 2008. *Breast Cancer Pathology*[M]. Beijing: People's Health Publishing House(in Chinese).
- Haka A S, 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: 5375~5380.
- Hassler O. 1969. Microradiographic investigations of calcifications of female breast[J]. *Cancer*, 23(5): 1103~1109.
- Imamura K, Ehara N, Inada Y, *et al.* 2008. Microcalcifications of breast tissue: Appearance on synchrotron radiation imaging with 6- μ m resolution[J]. *American Journal of Roentgenology*, 190(4): 234~236.
- Keppler U and Nitsche D. 1979. Mammary-carcinoma Microcalcification[J]. *Naturwissenschaften*, 66(4): 214~214.
- Kim S M, Park J M and Moon W K. 2004. Dystrophic breast calcifications in patients with collagen diseases[J]. *Clinical Imaging*, 28(1): 6~9.
- Kopans D B. 1998. The mammography screening controversy[J]. *Cancer Journal from Scientific American*, 4(1): 22~24.
- Mei Fang, Liu Jianying, Zhang Yan, *et al.* 2011. A study on the main types and formation mechanisms of biomineralization associated with breast lesions[J]. *Acta Mineralogica Sinica*, 31(4)(in press).
- Morgan M P, Cooke M-M and McCarthy G M. 2005. Microcalcifications associated with breast cancer: An epiphenomenon or biologically significant feature of selected tumors? [J]. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10(2): 181~187.
- Muir B, Lamb J, Anderson T, *et al.* 1983. Microcalcification and its relationship to cancer of the breast: Experience in a screening clinic [J]. *Clin Radiol.*, 34: 193~200.
- Poggi S H, Skinner H C, Ague J J, *et al.* 1998. Using scanning electron microscopy to study mineral deposits in breast tissues[J]. *American Mineralogist*, 83: 1122~1126.
- Radi M J. 1989. Calcium-oxalate crystals in breast biopsies-an overlooked form of microcalcification associated with benign breast disease[J]. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 113(12): 1367~1369.
- Tian Jie. 2003. *Medical Image Processing and Analysis*[M]. Beijing: Electronics Industry Press(in Chinese).
- Wang Changqiu, Zhao Wenwen, Lu Anhuai, *et al.* 2011. Characteristics of mineralized focuses in several breast diseases[J]. *Geological Journal of China Universities*, 17(1): 29~38(in Chinese with English abstract).
- Winters C, Davies R L, Morgan A J, *et al.* 1986. Human-breast microcalcification-comparative study involving contact microradiography and Backscattered-electron-imaging Plus X-ray-microanalysis[J]. *Micron and Microscopica Acta*, 17(1): 11~23.
- Xue Weicheng and Liu Jianying(translation). 2008. *Breast Pathology: Needle Biopsy*[M]. Beijing: People's Health Publishing House(in Chinese).
- Xun Junliang. 2005. *Basic and Clinical Research on Expressing Osteopontin Protein of the Cut Breast Microcalcifications with Mammotome System*[D]. Shanghai: Second Military Medical University(in Chinese).
- Yang Guanghua. 2001. *Pathology*[M]. Beijing: People's Health Publishing House(in Chinese).

lishing House(in Chinese).

Zhao Wenwen, Wang Changqiu, Lu Anhuai, *et al.* 2009. Mineralogy of psammoma bodies in papillary thyroid carcinoma[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 28(6): 623 ~ 628(in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

付 丽,傅西林. 2008. 乳腺肿瘤病理学[M]. 北京:人民卫生出版社.

梅 放,柳剑英,张 燕,等. 2011. 乳腺病变伴发生物矿化的类型

及机制研究[J]. 矿物学报, 31(4)(印刷中).

田 捷. 2003. 医学影像处理与分析[M]. 北京:电子工业出版社.

王长秋,赵文雯,鲁安怀,等. 2011. 几种乳腺疾病矿化特征初步研究[J]. 高校地质学报, 17(1): 29 ~ 38.

薛卫成,柳剑英(译). 2008. 乳腺病理学:粗针活检诊断[M]. 北京:人民卫生出版社.

杨光华. 2001. 病理学[M]. 北京:人民卫生出版社.

邹军亮. 2005. 乳腺钙化组织的微创切取、钙化组织中骨桥蛋白表达的基础和临床研究[D]. 上海:第二军医大学.

赵文雯,王长秋,鲁安怀,等. 2009. 甲状腺乳头状癌中砂粒体矿物学研究[J]. 岩石矿物学杂志, 28(6): 623 ~ 628.

www.yskw.ac.cn