



史晓光, 主任医师, 教授, 北京中医药大学东直门医院通州院区普外三区科主任, 东城院区乳腺科主任, 北京中医药大学中西医结合外科学临床学系副主任, 北京中西医慢病防治促进会乳腺癌防治全国专家委员会副主任委员, 北京乳腺病防治学会常委, 中华中医药学会乳腺分会第一届委员会常务委员, 北京中医药学会中医外科委员会常务委员, 北京中西医结合普外科专业委员会常务委员、肿瘤外科委员会常务委员, 中国中西医结合普外科专业委员会委员, 国家肿瘤微创治疗产业技术创新战略联盟专家委员会委员, 中国整形美容协会医学美学文饰分会理事, 北京抗癌协会理事, 中国中医药研究促进会疑难杂症分会常务理事, 世界中医药学会联合会痘证专业委员会常务理事、固脱疗法研究专业委员会常务理事。主要科研领域涉及肉芽肿小叶性乳腺炎病理生理学及临床药物疗效研究, 中西医结合快速康复外科的分子生物学基础研究, 参芪扶正注射液研发及药理学研究等。主编《西医外科学》, 副主编《外科学》, 编写《中西医结合外科学》《西医外科学》等配套教学用书; 副主编《胃肠癌彩色手术图谱》1部。先后参与并主导成立了东直门医院乳腺肿瘤中心、乳腺炎性疾病中心、乳腺修复中心、乳腺外治法中心, 为肉芽肿小叶性乳腺炎等疾病真实世界数据整合做出了重要的推进工作。

肉芽肿小叶性乳腺炎大鼠模型建立初探

左禧萌, 史晓光, 刘洁丽, 杨臻瑞, 高翔, 赖瑞, 赵泽, 汪唐顺

(北京中医药大学东直门医院普通外科, 北京 100700)

[摘要] **目的** 利用人肉芽肿小叶性乳腺炎标本匀浆和完全弗氏佐剂的混悬液构建肉芽肿小叶性乳腺炎动物模型。**方法** 将25只孕产史的SD大鼠随机分为5组: 空白对照组、完全弗氏佐剂组、正常乳腺组织匀浆组、病变乳腺组织匀浆低剂量组和病变乳腺组织匀浆高剂量组, 每组5只。病变乳腺组织匀浆组以人肉芽肿性乳腺炎组织匀浆制备的完全弗氏佐剂混悬液, 接种于大鼠第3、4对乳腺组织(高剂量组注射0.2 mL, 低剂量组注射0.1 mL); 正常乳腺组织匀浆组接种肉芽肿性乳腺炎患者的正常乳腺组织匀浆液; 空白对照组接种生理盐水(即0.9% NaCl溶液); 完全弗氏佐剂组接种完全弗氏佐剂。造模完成后维持饲养14 d, 观察组织形态学及HE切片染色后的组织病理学特征, 比较肉芽肿小叶性乳腺炎模型的建立效果。**结果** 与空白对照组、完全弗氏佐剂组、正常乳腺组织匀浆组对比, 病变乳腺组织匀浆高低剂量组均呈现不同程度的肉芽肿小叶性乳腺炎特有的形态学改变及病理学特征, 组间对比差异具有统计学意义($P < 0.001$)。**结论** 人肉芽肿小叶性乳腺炎标本匀浆和完全弗氏佐剂的混悬液可成功建立肉芽肿小叶性乳腺炎大鼠模型, 为该病的病因学研究奠定了基础。

[关键词] 肉芽肿小叶性乳腺炎; 动物模型; SD大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)04-0299-06

Establishment of a Rat Model of Granulomatous Lobular Mastitis

ZUO Ximeng, SHI Xiaoguang, LIU Jieli, YANG Zhenrui, GAO Xiang, LAI Rui, ZHAO Ze, WANG Tangshun

(Department of Surgery, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[基金项目] 北京中医药大学2017年度青年教师科研项目(2017-JYB-JS-063); 北京中医药大学2021年度新教师启动基金项目(2021-BUCMXJKY001)

[作者简介] 左禧萌(1995—), 女, 硕士, 住院医师, 研究方向: 中西医结合普外科。E-mail: ravernyflun@outlook.com

[通信作者] 史晓光(1972—), 男, 医学博士, 主任医师, 研究方向: 中西医结合普外科。E-mail: 13301119560@163.com

Correspondence to: SHI Xiaoguang, E-mail: 13301119560@163.com

[Abstract] Objective In this study, an animal model of granulomatous lobular mastitis was constructed using human granulomatous lobular mastitis specimen homogenates and a suspension of complete Freund's adjuvant. **Methods** Twenty-five rats with a history of maternity were randomly divided into five groups with five rats each: a blank control group, Freund's adjuvant group, normal mammary homogenate group, low-dose lesion homogenate group, and high-dose lesion homogenate group. In the lesion homogenization groups, rats were injected with complete Freund's adjuvant homogenate prepared from granulomatous mastitis patient tissues, and the third and fourth pair of mammary gland injections were administered to the rats at 0.2 mL in the high-dose group and 0.1 mL in the low-dose group. The normal mammary gland homogenate group was injected with normal mammary gland tissue homogenate from patients with granulomatous mastitis. The blank control group was injected with saline. The Freund's adjuvant group was injected with complete Freund's adjuvant. The histomorphological and pathophysiological characteristics of the mammary tissues were observed for 14 days after the completion of modeling, and the effects of the granulomatous lobular mastitis model were compared. **Results** The morphological changes and physiopathological characteristics of granulomatous lobular mastitis in the high- and low-dose groups were significantly different when compared with the blank control, Freund's adjuvant, and normal breast homogenate groups ($P < 0.001$). **Conclusion** Human granulomatous lobular mastitis specimen homogenates and suspensions of complete Freund's adjuvant for granulomatous lobular mastitis can successfully establish an animal model of the disease and lead to insights and new ideas for the etiology of the disease.

[Key words] Granulomatous lobular mastitis; Animal model; SD rats

肉芽肿小叶性乳腺炎是一类好发于已孕已产妇女的非哺乳期乳腺炎，其临床特点为突发乳房肿块，在短时间内红肿热痛，进而迅速化脓、破溃，形成难以愈合的窦道，侵犯乳房小叶组织；该病常常在不同阶段出现多个病灶发作，给患者造成极大的身心损害。该病目前病因尚不明确，治疗方法以手术治疗与激素冲击治疗为主，但针对剂量、术式等尚未形成统一规范；而且医院的经验性治疗往往参差不齐^[1]，通常以患者自身意愿作为手术指征，有时导致非必要的医源性乳房损毁，因此针对该病的最佳治疗方法仍有待探讨^[2]。本实验目的是构建合适的肉芽肿小叶性乳腺炎大鼠模型，为临床药物疗效的初步观察提供一个基础平台，并为该病机制研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 人肉芽肿小叶性乳腺炎病变组织

选取在北京中医药大学东直门医院乳腺科或普通外科就诊的20~45岁肉芽肿小叶性乳腺炎患者5例，住院手术治疗时收集这些患者的乳腺

病变腺体组织标本及病灶切缘正常腺体组织标本各5份。由于肉芽肿小叶性乳腺炎的病灶较为广泛，切除范围往往比病灶本身更大，因此从离体病灶样本中挑选无肉芽肿样变的正常乳腺组织是可行的。取材前所有患者均签署知情同意书。标本切取后，每份组织样本约0.5 g，并用2 mL冻存管密封，置于液氮罐内保存，然后经样本库-80℃冰箱保存。本研究方案经过本院医学伦理委员会审批（批号为2017-JYB-JS-063）。

1.2 实验动物

本实验用SD大鼠均有孕产史，购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK（京）2016-0006]，质量为300~400 g，共计25只。所有实验动物均饲养于北京中医药大学东直门医院SPF级环境屏障动物实验室[SYXK（京）2020-0013]，饲养环境温度为18~29℃，日温差≤3℃，相对湿度40%~70%，全新风换气次数10次/h，气流速度≤0.18 m/s，压差25 Pa，洁净度1万级，氨浓度15 mg/m³，噪音≤60 dB，照度150~300 lx。动物实验方案经北京中医药大学动物福利委员会批准（编号为19-56）。

1.3 主要试剂及仪器

完全弗氏佐剂 5881 型 (Freund's complete adjuvant 5881) 购自美国 Sigma 公司; 手持超声波匀浆机购自德国 Hiescher 公司 (型号 UP100 H); 光学显微镜购自德国 Leica 公司 (型号 DM000LED)。

1.4 病变乳腺组织匀浆液接种物制作^[3-5]

将人肉芽肿小叶性乳腺炎组织的液氮保存标本运送至实验室后, 封装的组织标本放入 37 °C 恒温水浴箱中复冻。复冻后将冷冻管内组织取出称量, 人工研磨至无明显大颗粒组织后, 与生理盐水 (即 0.9% NaCl 溶液) 按 1 : 3 比例 (每 1 g 组织对应 3 mL 生理盐水) 混合, 装入离心管中置于冰上, 手持超声波匀浆机做细胞粉碎匀浆处理, 进一步粉碎细胞结构, 破坏细胞膜, 使包浆中的蛋白释放到溶液中。经细胞粉碎后的匀浆取上清液, 置于无菌离心管内, 与完全弗氏佐剂按体积比为 1 : 1 混匀, 制成油包乳混悬液 (混匀过程在冰上进行, 过程约 20 min; 注意保持其周围温度为 0~4 °C, 以保持完全弗氏佐剂的活性)。制备好的混悬液即为病变乳腺组织匀浆液, 置于 4 °C 保存备用。

1.5 肉芽肿小叶性乳腺炎动物模型的建立及分组

造模用大鼠随机分为 5 组, 每组 5 只, 分别为空白对照组、完全弗氏佐剂组、正常乳腺组织匀浆组、病变乳腺组织匀浆低剂量组和病变乳腺组织高剂量组。SD 大鼠入住实验室动物饲养室适应环境 3 d, 用 1.5% 戊巴比妥溶液以 0.2 mL/100 g 的剂量腹腔注射大鼠。麻醉后大鼠固定于木板上, 第 3 和第 4 对乳房剔除毛发, 碘伏溶液消毒皮肤。使用眼科镊提起乳头, 使用接种注射器, 将每组不同的接种物沿乳头根部斜行进针, 进针深度 2~4 mm, 注入大鼠第 3 和第 4 对乳腺内, 即可完成人工种植包埋过程, 出针后简单按压止血。注意不可进针过深导致接种物被注射至肌层。空白对照组接种 0.2 mL 生理盐水, 完全弗氏佐剂组接种 0.2 mL 完全弗氏佐剂, 正常乳腺组织匀浆组接种正常组织匀浆 0.2 mL, 病变乳腺组织匀浆低剂量组及高剂量组分别接种病变乳腺组

织匀浆 0.1 mL 和 0.2 mL。

1.6 临床观察

各组大鼠接种后, 常规维持性饲养。每天对各组大鼠的临床表现进行观察, 并记录各组动物的变化, 包括大鼠体质量、乳房横径及皮肤颜色。肉芽肿小叶性乳腺炎改变的大鼠往往表现为乳房局部皮肤红肿、乳房横径增大, 甚至出现破溃表现。

1.7 HE 染色及病理诊断标准

于接种后第 14 天将全部大鼠以断颈法处死, 切取第 3 对和第 4 对乳腺组织, 注意不要带入毛发及皮肤, 清水稍冲洗后放入 4% 的甲醛溶液中固定。常规石蜡包埋和切片, 切片厚度为 4 μm 。取切片理想的乳腺组织, 脱蜡后行 HE 染色, 最后脱水封固。光学显微镜下观察乳腺组织形态, 进行病理诊断。

病理诊断标准: 炎症轻者乳腺小叶中可见导管和腺泡成分, 终末导管扩张, 腔内空虚或含有坏死物, 导管及腺泡上皮可萎缩、消失或增生, 伴淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞浸润, 小叶特化间质疏松, 呈水肿样改变。炎症重者上皮成分破坏或消失, 有大量中性粒细胞为主的炎细胞浸润, 可见上皮样细胞和多核巨噬细胞, 多核巨噬细胞为朗格汉型或杜顿型, 极少或无异型, 巨噬细胞内无 Schaumann 小体, 大多数病例的小叶中央可见小脓肿和脂质空泡。病变融合者的小叶结构消失, 形成大片状和 (或) 结节状慢性化脓性肉芽肿性病灶, 并可形成脓肿、皮肤破溃及窦道; 小叶内、小叶间导管周围见多种炎性细胞浸润, 以嗜中性粒细胞为主, 可有单核细胞、淋巴细胞; 乳腺间质可有纤维组织增生和 (或) 硬化, 亦可见有小血管炎。因此, 病理组织中可见慢性化脓性肉芽肿性病灶, 并伴有炎性细胞浸润, 且以巨噬细胞及中性粒细胞为主, 则可诊断为肉芽肿小叶性乳腺炎^[6-8]。

1.8 数据统计及处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析处理。结果数据使用百分比及频次表示, 计数资料的组间比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床观察

自接种后第1天起,大鼠体质量在各组之间无明显差异。病变乳腺组织匀浆高剂量组与低剂量组均出现肉芽肿小叶性乳腺炎的临床改变,即被接种的乳房出现红肿、体积增大、破溃后不易愈合等表现(图1),而且1只大鼠出现了非接种乳房的肉芽肿小叶性乳腺炎样改变。空白对照组、完全弗氏佐剂组和正常乳腺组织匀浆组均无乳房红肿表现,其中完全弗氏佐剂组有1只大鼠出现了乳腺体积增大,经病理诊断为少量炎性细胞浸润的炎症改变,无明显肉芽肿组织生成。对各组大鼠的临床表现进行每日观察后,记录发病情况见表1。

2.2 病理诊断

接种2周后处死大鼠,取乳腺组织进行HE染色,病理诊断结果见图2。其中,病变乳腺组织匀浆高剂量组的乳腺小叶完全破坏,大片结节样慢性肉芽肿炎性病灶生成;病变乳腺组织匀浆低剂量组可见乳腺小叶组织边界不清,腺叶内出现空泡,且伴随大量淋巴细胞及中性粒细胞浸

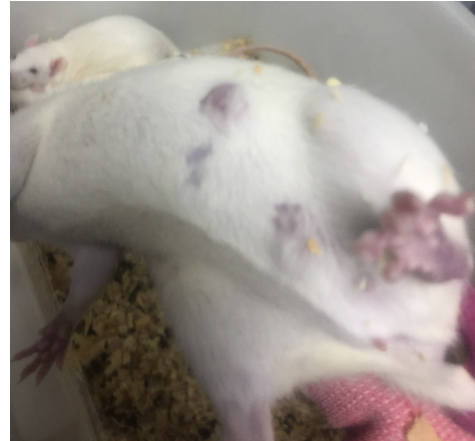


图1 乳腺病变大鼠外观

Figure 1 Appearance of mammary gland lesions in a rat

润,高倍镜下可见多核巨细胞。完全弗氏佐剂组与正常乳腺组织匀浆组虽然可见少量淋巴细胞浸润,但未见乳腺小叶出现肉芽肿样改变。本研究中仅接种病变乳腺组织匀浆液的组别出现了阳性改变,正常乳腺组织匀浆组、完全弗氏佐剂组、空白对照组均未出现肉芽肿样改变。组间对比使用卡方检验,提示 $P<0.001$,差异有统计学意义。

表1 各组大鼠乳腺发病情况

Table 1 Morbidity of mammary glands in the rats of each group

(各组 $n=5$)

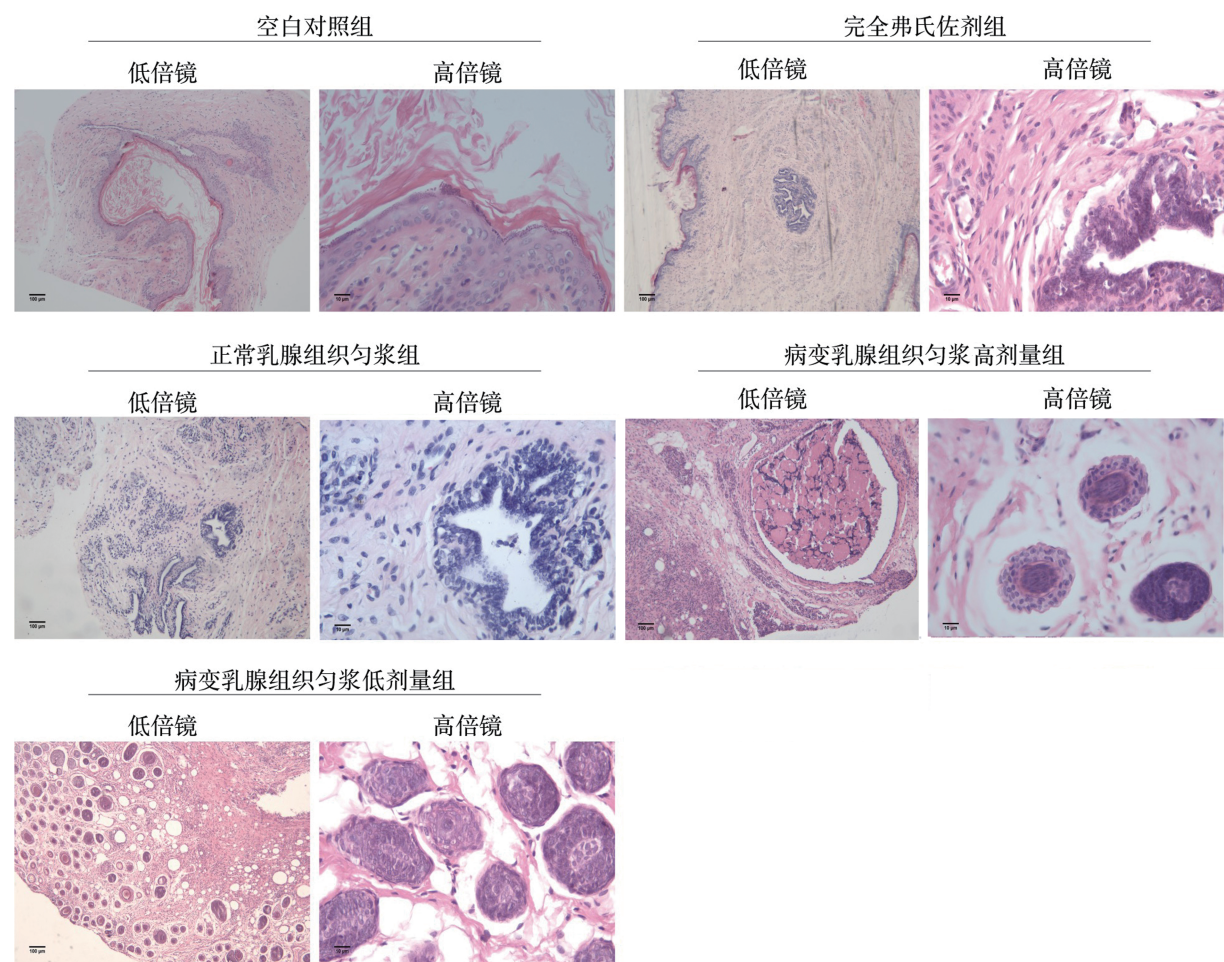
组别	乳腺直径/mm	发病率/%							
		接种时	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D14
空白对照组	4.54±0.50	0	0	0	0	0	0	0	0
完全弗氏佐剂组	4.94±0.41	0	0	0	0	0	0	0	0
正常乳腺组织匀浆组	4.36±0.49	0	0	0	0	0	0	0	0
病变组织高剂量匀浆组	9.88±0.60	0	40	80	100	100	100	100	100
病变组织低剂量匀浆组	7.90±0.75	0	0	20	40	40	60	100	100

注:D1、D3、D5、D7、D9、D11和D14分别代表接种后第1、3、5、7、9、11和14天。经卡方检验,组间对比 $P<0.001$ 。

3 讨论

目前针对肉芽肿小叶性乳腺炎的病因理论假说主要有细菌感染与自身免疫反应两种^[9-12]。超声波细胞粉碎机是一种利用强超声在液体中产生空化效应,对物质进行超声处理的多功能、多用途的仪器,能用于动植物组织、细胞、细菌、芽

胞菌种的破碎,同时可用来乳化、分离、分散、匀化、提取、脱气、清洗及加速化学反应等。由于本实验中病变乳腺组织匀浆经超声破碎,细胞结构已经破坏,不存在细菌及其他细胞,因此本研究中动物模型建立结果说明仅依靠病变组织内活性成分即可导致疾病发作,提示肉芽肿小叶性乳腺炎并非细菌感染性疾病,这为证明该病是由



注：病变乳腺组织匀浆低剂量组及高剂量组的乳腺小叶组织边界不清，可见大量中性粒细胞及巨噬细胞聚集于乳腺组织，同时表现为乳腺导管扩张及腺叶内空泡。完全弗氏佐剂组与正常乳腺组织匀浆组虽然可见少量淋巴细胞浸润，但未见乳腺腺叶出现肉芽肿样改变。低倍镜（40倍）图中比例尺为100 μm ，高倍镜（400倍）图中比例尺为10 μm 。

图2 各组大鼠乳腺组织HE染色

Figure 2 HE staining of rat mammary gland specimens in each group

自身免疫反应异常引起提供了一定依据。但是需要说明，病变组织匀浆中也可能存在细菌死亡后释放的内毒素等物质，因此本研究结果并不能否定肉芽肿小叶性乳腺炎与细菌的相关性。除此之外，肉芽肿小叶性乳腺炎的发病原因在本实验中尚无明确体现，仅证明了人肉芽肿乳腺炎匀浆可导致大鼠乳腺组织发生同类型改变，还无法证明最初引起该病的原因。

本文所用完全弗氏佐剂是一种增强免疫原性制剂，主要作用如下：（1）形成抗原储存库^[13]；

（2）形成局部肉芽肿；（3）刺激淋巴细胞增殖和分化^[14]。上述3点作用均为肉芽肿小叶性乳腺炎的发生提供了需要的条件。既往针对浆细胞乳腺炎的研究提示，经单纯完全弗氏佐剂注射后的乳腺组织会产生中性粒细胞和淋巴细胞浸润，但未发现浆细胞或类浆细胞性乳腺炎改变。本研究完全弗氏佐剂组也出现了炎性细胞浸润的改变，但不明显，说明完全弗氏佐剂对炎症形成有促进作用，但其单独使用并不能诱导建立病变模型。

除此之外，本实验中1只大鼠出现了除第3、

第4对乳房之外其他乳房的红肿改变,经取材后病理观察提示为慢性化脓性炎症肉芽肿性乳腺炎,推测可能是诱发疾病的物质进入血液循环导致疾病在其他乳房发生。另外,1只注射了单纯完全弗氏佐剂的大鼠出现了乳房腺体下油包乳溶液的炎性包裹,但光学显微镜下病理诊断提示非肉芽肿小叶性乳腺炎改变,可能是由于注射操作失误导致完全弗氏佐剂未被大鼠乳腺吸收。

本次实验的优点是建立了首个肉芽肿小叶性乳腺炎动物模型,该模型与人肉芽肿小叶性乳腺炎相近且造模时间较短,而且其发病过程受注射抗原剂量影响可控。本实验的缺点是样本量较小,需要进一步扩大样本量做验证实验;另外,本实验建立的模型尚无法针对患者下肢红斑、关节疼痛等症状进行模拟^[15],有待后续进一步改进。

综上所述,本实验为肉芽肿小叶性乳腺炎动物造模提供了一个新思路,通过对造模动物的干预,或许在未来可以找到除激素冲击治疗之外疗效迅速、治愈率高的新的用药方式,从而进一步对肉芽肿小叶性乳腺炎的病因学做深入研究。

参考文献:

- [1] 徐飏,王蕾,刘晓雁,等.肉芽肿性小叶性乳腺炎国内诊疗现状调查研究[J].新中医,2019,51(2):279-283. DOI:10.13457/j.cnki.jncm.2019.02.086.
- [2] 陈玲,张晓云,王延文,等.肉芽肿性小叶性乳腺炎300例临床病理学分析[J].中华病理学杂志,2019,48(3):231-236. DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2019.03.012.
- [3] 崔振,余建军,张大庆,等.浆细胞性乳腺炎小鼠模型的建立[J].中华全科医学,2013,11(12):1831-1832,2001. DOI:10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2013.2.057.
- [4] 程涓,丁华野,杜玉堂,等.肉芽肿性小叶性乳腺炎伴

发乳腺导管扩张症及结节性红斑4例临床病理分析[J].诊断病理学杂志,2014,21(8):488-490,494. DOI:10.3969/j.issn.1007-8096.2014.08.008.

- [5] 郭梅芳,赵露霞.肉芽肿性乳腺炎的临床病理特征及鉴别诊断研究[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(9):98. DOI:10.3969/j.issn.1671-3141.2016.09.066.
- [6] 郭慧,吴立琦,唐泽飞.硬化性淋巴细胞性小叶性乳腺炎的病理分析[J].中国实用医药,2019,14(22):196-197. DOI:10.14163/j.cnki.11-5547/r.2019.22.108.
- [7] 屠道远,甄林林,李振,等.非哺乳期乳腺炎病因学研究进展[J].中华乳腺病杂志(电子版),2018,12(1):55-59. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2018.01-011.
- [8] 肖敏,李三荣,周戎.特发性肉芽肿性乳腺炎发病的危险因素分析[J].中华乳腺病杂志(电子版),2019,13(5):277-280. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2019.05.004.
- [9] 李学钊,洪炆,王治仓,等.免疫佐剂研究进展及前景展望[J].中国动物传染病学报,2014,22(4):81-86. DOI:10.3969/j.issn.1674-6422.2014.04.014.
- [10] 王云.完全弗氏佐剂诱导颞下颌关节炎模型关节周围组织早期的组织病理变化[C].广州:中华口腔医学会第四届颞下颌关节病学及(殆)学专业委员会换届大会暨第十一次全国颞下颌关节病学及(殆)学学术研讨会,2014.
- [11] 孙岩峰,王永,李玉胜,等.特发性肉芽肿性乳腺炎的诊疗进展[J].中华乳腺病杂志(电子版),2017,11(6):372-374. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2017.06.011.
- [12] 陈凯.浆细胞乳腺炎家兔模型建立及胸腺肽a1免疫干预机制的研究[D].银川:宁夏医科大学,2013.
- [13] 张大庆.人浆细胞性乳腺炎小鼠模型的建立[D].银川:宁夏医科大学,2012.
- [14] 刘晓雁,佟琳,罗强,等.肉芽肿性小叶性乳腺炎细菌学分析[J].广东医学,2016,37(16):2454-2456. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2016.16.023.
- [15] ALTINTOPRAK F, KARAKECE E, KIVILCIM T, et al. Idiopathic granulomatous mastitis: an autoimmune disease? [J]. Sci World J, 2013, 2013: 148727. DOI:10.1155/2013/148727.

(收稿日期:2020-09-23 修回日期:2020-12-10)