

周雪, 万贵平, 张真真. 人源异种皮下注射移植法建立子宫内膜异位症纤维化裸鼠模型的评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 19-26.

Zhou X, Wan GP, Zhang ZZ. Evaluation of a nude mouse model of endometriosis fibrosis via the human xenograft subcutaneous transplantation method [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 19-26.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.003

人源异种皮下注射移植法建立子宫内膜异位症纤维化裸鼠模型的评价

周 雪^{1,2}, 万贵平^{1,2*}, 张真真^{1,2*}

(1.南京中医药大学附属中西医结合医院,南京 210028;2.江苏省中医药研究院,南京 210028)

【摘要】 目的 评估人源子宫内膜异位症纤维化裸鼠模型建立的可行性,确定子宫内膜间充质干细胞是否参与诱导子宫内膜异位症纤维化。**方法** 收集人源子宫内膜标本 4 例,采用皮下注射的方式 1 : 3 移植到 12 只 BABL/c 裸鼠体内。记录病灶皮表形态及体积变化,移植后第 15 天处死裸鼠,观察病灶形态及其与腹壁周围粘连情况,HE 染色评判造模结果,Masson 染色评定纤维化程度,免疫荧光追踪子宫内膜间充质干细胞在子宫内膜异位症纤维化进程中的作用。**结果** 裸鼠异位病灶体积随时间增长,呈局限性、囊泡样改变,与腹壁粘连紧密,镜下可见子宫内膜腺体、胶原纤维沉积,造模成功率为 83.4%,造模后病灶胶原纤维容积分数显著升高 ($P < 0.01$),共聚焦成像提示子宫内膜间充质干细胞(SUSD2⁺)可在体内向肌成纤维细胞(α -SMA⁺)分化。**结论** 人源异种皮下注射移植的方法建立的裸鼠模型符合子宫内膜异位症纤维化的病变特点,操作简单,可行性高,此外体内观察到子宫内膜间充质干细胞参与诱导子宫内膜异位症纤维化形成,为进一步探究其发病机制提供较好的模型参考。

【关键词】 子宫内膜异位症;动物模型;异种移植;纤维化;BABL/c 裸鼠;子宫内膜间充质干细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0019-08

Evaluation of a nude mouse model of endometriosis fibrosis via the human xenograft subcutaneous transplantation method

ZHOU Xue^{1,2}, WAN Guiping^{1,2*}, ZHANG Zhenzhen^{1,2*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China. 2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028)

【Abstract】 Objective To assess the feasibility of establishing a nude mouse model of endometriosis fibrosis of human origin and to determine whether endometrial mesenchymal stem cells are involved in inducing endometriosis fibrosis. **Methods** Four endometrial tissue specimens were collected and transplanted 1 : 3 into 12 BABL/c nude mice by subcutaneous injection. The morphology and volume of the lesions were recorded. The nude mice were sacrificed on the 15th day after transplantation to observe the morphology of the lesions and their adhesion to the periphery of the abdominal wall. HE staining was used to judge the result of modelling, Masson staining was used to assess the extent of fibrosis, and immunofluorescence was used to track the role of endometrial mesenchymal stem cells in the fibrotic process of

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82074319,82174420);江苏省中医药研究院自主科研项目(BM2018024-2019007)。

【作者简介】 周雪(1998—),女,硕士研究生,研究方向:妇科肿瘤临床研究。E-mail:2929229069@qq.com

【通信作者】 张真真(1985—),女,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:干细胞生物学。E-mail:zhenzhen_0618@163.com

万贵平(1964—),男,硕士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:妇科肿瘤临床研究。E-mail:wanguiping@263.net

* 共同通信作者

endometriosis. **Results** The volume of ectopic lesions in nude mice increased over time and showed restricted, vesicular-like changes. The tight adhesion of the lesions to the abdominal wall, endometrioid glands, and collagen fiber deposition were seen microscopically. The success rate of the modelling was 83.4%, and the collagen fiber volume fraction of the lesions was significantly higher after modelling ($P<0.01$). Confocal imaging suggested that endometrial mesenchymal stem cells (SUSD2⁺) differentiated into myofibroblasts (α -SMA⁺) *in vivo*. **Conclusions** The nude mouse model established by human allogeneic transplantation via subcutaneous injection was consistent with the lesion characteristics of endometriosis fibrosis. The modelling method is simple and feasible and provides a better reference model for further investigating the pathogenesis of endometriosis fibrosis. In addition, *in vivo* observations using the model indicated that endometrial mesenchymal stem cells are involved in inducing the formation of endometriosis fibrosis.

[Keywords] endometriosis; animal model; xenotransplantation; fibrosis; BABL/c nude mice; endometrial mesenchymal stem cells

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)指子宫内膜腺体及间质生长在子宫腔以外的部位^[1],因其具有恶性肿瘤过度增殖和侵袭的特性,被称为“良性癌”^[2],困扰着 10%~15%的育龄期女性^[3]。纤维化是其固有的病理学特征^[4],广泛的纤维化是引起 EMS 患者盆腔粘连、疼痛、不孕的主要原因^[5]。EMS 纤维化的发病机制尚未阐明,现有研究发现子宫内膜间充质干细胞(endometrial mesenchymal stem cells, eMSCs)与 EMS 纤维化进程密切相关^[6],重复的腹腔镜监测限制了临床实施对照实验的可能,因此构建可靠的动物模型参考尤为重要。本研究尝试采用皮下注射移植人源子宫内膜组织的方法建立 EMS 纤维化裸鼠模型,评估该模型建立的可能性,在此基础上体内追踪 eMSCs 的命运,为进一步探究 EMS 纤维化的发病机制、药物治疗提供可信的体内研究基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雌性 SPF 级 BABL/c 裸鼠 12 只,6 周龄,体重 18~22 g。购于扬州大学比较医学中心[SCXK(苏)2022-0009]。在江苏省中医药研究院动物中心进行实验[SYXK(苏)2021-0025],本实验遵循 3R 原则,通过江苏省中医药研究院动物实验伦理审查(AEWC-202211125-250)。

1.1.2 标本

造模所用子宫内膜组织选自 2023 年 3 月,因子宫肌瘤等良性病变在江苏省中西医结合医院行宫腔镜下诊断性刮宫术的患者,共 4 例。患者年龄 23~48 岁,手术前 6 个月内未使用激素类药物、未放置宫内避孕装置,2 例患者宫内物术后病理提示为增

生期子宫内膜,2 例为分泌期子宫内膜。标本获取已通过江苏省中西医结合医院伦理委员会批准(2023-LWKYZ-016)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12 培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,PM150316);通用型组织固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司,G1101-500ML);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS,江苏凯基生物技术股份有限公司, KGB5001);青霉素-链霉素溶液(Gibco,美国,15070063); α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(爱必信(上海)生物科技有限公司, abs130621);SUSD2(Sushi domain containing 2)抗体(Sigma,美国,HPA004117)。

1300 系列 II 级 A2 型生物安全柜(赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司,1374);电子称量仪(常熟市双杰测试仪器厂, JJ300);脱水机(DIAPATH, Donatello);包埋机(武汉俊杰电子有限公司, JB-P5);病理切片机(上海徠卡仪器有限公司, RM2016);冻台(武汉俊杰电子有限公司, JB-L5);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司, KD-P);光学显微镜(奥林巴斯(中国)有限公司, CKX41);眼科剪、眼科镊(山东新华医疗器械股份有限公司);20 mL 一次性使用侧孔无菌溶药注射器、1 mL 一次性使用无菌注射器(山东威高集团医用高分子制品股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本获取与处理

取自宫腔镜下诊刮术的人源子宫内膜由经验丰富的妇科医师留足临床病理送检的部分后收取实验用途。将搔刮的内膜组织 1/4 用于固定和石蜡切片制作,剩余置于 1×青霉素-链霉素溶液中,冰盒转移至生物安全柜处理。将标本按照患者来源依

次编号为 A、B、C、D,同一患者来源的内膜组织用预冷的 PBS 漂洗 3 次后称量并记录重量,内膜组织来源临床资料及漂洗后内膜组织重量见表 1,眼科剪将其分剪成约为 4 mm² 大小的碎片,10~12 块为一组,置于 0.3 mL 的 DMEM/F12 培养基中混合,冰盒转移混悬液至动物房准备接种,标本处理过程控制在 30 min 内。

1.3.2 皮下注射成模

选取裸鼠腹正中线与右下乳头连线中点为进针点,右侧腋下与侧腹壁之间血供丰富处为种植点;用 1 mL 针筒吸取含有内膜组织碎片的混悬液,连接 20 mL 侧孔注射器针头,吸取前均匀吹打,完全吸取组织碎片后排尽空气;左手握抓裸鼠背部皮肤,保持裸鼠头稍低,进针点局部皮肤消毒,针尖开口向上,右手持注射器斜 30°进针突破进针点皮下后,斜 5°推针至种植点,回抽无血后将内膜组织缓慢注入;消毒棉签按压进针点,待进针点无液体组织流出轻放回笼,1 例内膜组织标本造 3 只裸鼠。标本获取与处理、皮下注射成模流程如下(图 1)。

1.3.3 病灶取材

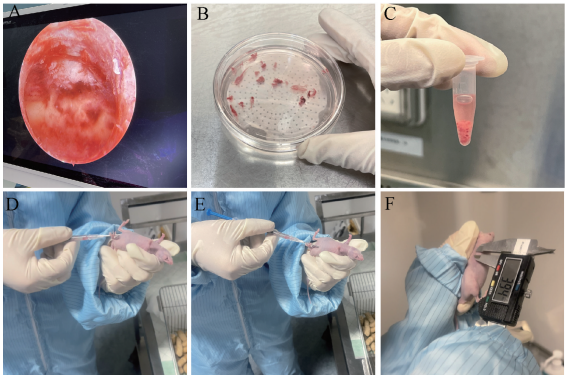
造模当日记为 D0,D15 颈椎脱臼法处死裸鼠,消毒腹部皮肤,持眼科剪沿腹中线剪开皮肤,镊子钝性分离暴露异位病灶生长处,剥离异位病灶,PBS 漂洗后 4 ℃固定于通用型组织固定液,24 h 后梯度脱水、石蜡切片备用。

1.3.4 观察指标

裸鼠一般状态及病灶形态肉眼观:自 D0 起每日观察饮食、饮水情况、有无异常活动等,记录每日裸鼠皮表病灶位置、形状、外观,D15 暴露病灶观察其与腹壁粘连情况、表面有无毛细血管覆盖;病灶

表 1 人子宫内膜组织来源临床资料
Table 1 Clinical data of human endometrial tissue in four cases

组织来源 编号 Tissue number	年龄/岁 Age/year	病理类型 Pathological findings	漂洗后子宫内膜 组织重量/g Endometrial tissue weight after rinsing
A	42	子宫内膜增殖期改变 Proliferative endometrium	0.26
B	46	子宫内膜分泌期改变 Secretory endometrium	0.24
C	48	子宫内膜分泌期改变 Secretory endometrium	0.24
D	23	子宫内膜增殖期改变 Proliferative endometrium	0.25



注:A:宫腔镜下搔刮内膜组织;B:内膜组织漂洗;C:制成内膜碎片混悬液;D、E:皮下推送移植;F:病灶测量。

图 1 人源子宫内膜异位症纤维化裸鼠模型建立
Note. A, Hysteroscopic scratching of endothelial tissue. B, Endothelial tissue rinsing. C, Making an endothelial debris suspension. D/E, Subcutaneous push grafts. F, Lesion measurement.

Figure 1 Establishment of a nude mouse model of endometriosis fibrosis of human origin

体积测量:D1 起用游标卡尺测量皮表病灶的最大直径(L)与最大横径(W),后每隔 1 d 测量 1 次,参照公式 $V=0.52\times L\times W^2$ 计算体积,绘制体积生长曲线;镜下组织学改变:将造模后异位病灶及相对应的造模前内膜标本切片进行 HE 染色,比较造模前、后组织形态改变;纤维化程度评估:将切片进行 Masson 染色,镜下观察胶原纤维沉积情况,随机截取镜下($\times 100$)3 个视野,用 Image J 软件对图像进行分析,比较胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF),即胶原阳性面积与组织总面积的比值;免疫荧光染色:将切片进行免疫荧光染色,DAPI 标记的细胞核,采用 SUSD2 标记子宫内膜间充质干细胞, α -SMA 标记肌成纤维细胞,比较二者共定位情况。

1.4 统计学方法

使用 Graphpad Prism 9.5 软件对实验数据进行统计分析,正态分布的计量数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)进行统计描述,均数间两两比较采用独立样本 t 检验,多组间比较使用双因素方差分析,Tukey 法进行多重比较检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠模型建立情况

2.1.1 裸鼠模型的一般观察及成模率

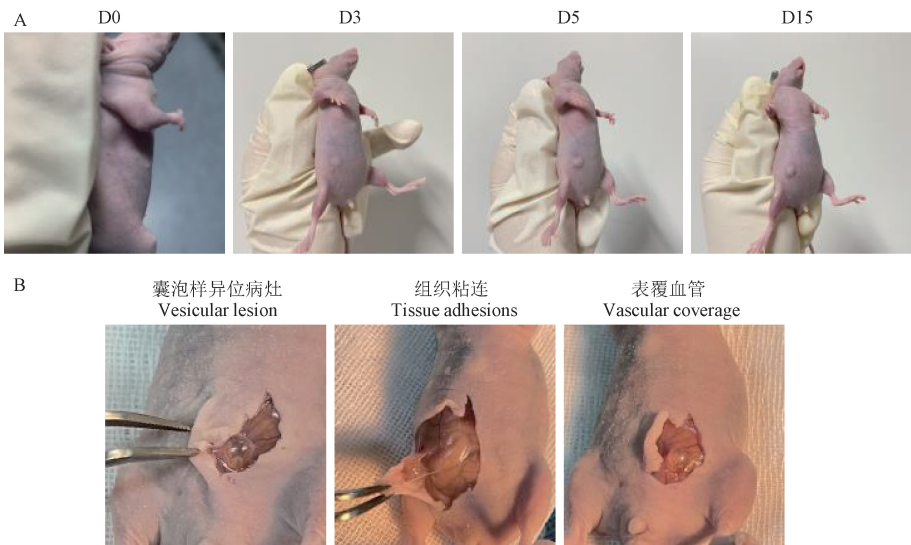
造模前裸鼠饮食、饮水量正常,反应迅速,状态

活跃,无异常活动;造模后病灶逐渐增大,D10 起各模型裸鼠出现舔舐、搔抓病灶周围皮肤现象的异常活动,状态活跃,兴奋多动,其可能与异位病灶增大、刺激局部神经传导引发疼痛等有关。12 只裸鼠注射部位无感染表现、无死亡,其中组织来源 C 组有 2 只裸鼠的病灶缩小,呈质硬结节改变,后证实造模失败,可能与该组织来源患者的年纪过大(48 岁)、内膜的生长活力差有关,造模成功率为 83.4%(10/12)。

2.1.2 病灶形态肉眼观

D0~D1 移植部位充满混悬液体,范围弥漫;D2

~D4 液体逐渐被吸收,病灶范围局限,位置下移;D5~D7 囊泡样异位病灶形成,皮表可见不规则的椭圆形凸起,透光良好;囊泡样病灶形成后,异位病灶体积缓慢增长;D15 病灶凸起明显,皮表隐约可见病灶周围细小血管,暴露皮肤后,可见内含澄清液体的单个囊泡样病灶,与腹壁、皮下粘连紧密,周围可见呈灰白色的结缔组织增生,病灶的表面覆有丰富毛细血管(图 2)。弥漫局限与囊泡样改变是异位病灶形成过程中最具特征性的两个标志,模型裸鼠多在 D3 时形成局限病灶,囊泡样病灶多在 D5 时出现(图 3)。

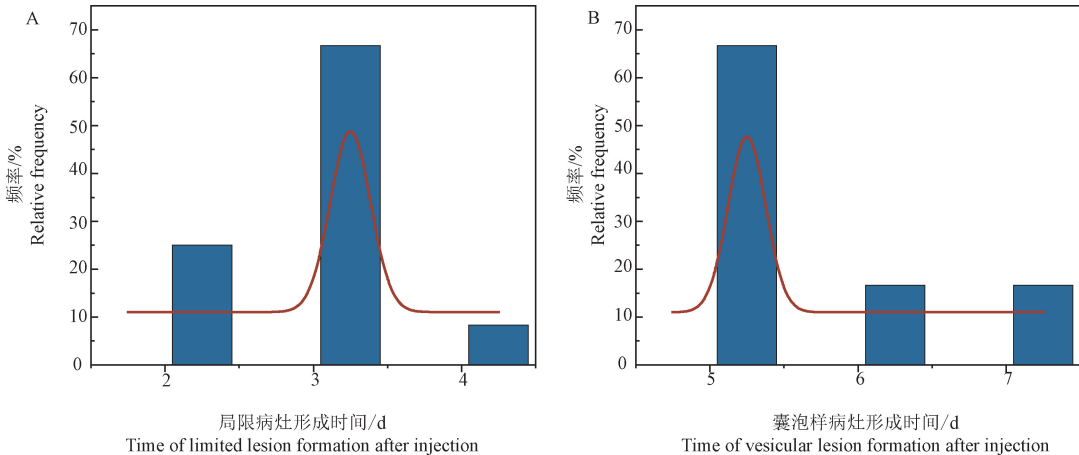


注:A:不同时间下皮表的病灶形态;B:D15 暴露皮肤后病灶形态。

图 2 病灶形态肉眼观

Note. A, Lesion morphology on the skin surface at different times. B, Lesion morphology after skin exposure at D15.

Figure 2 Lesion morphology by naked eyes



注:A:局限病灶形成时间频率分布直方图;B:囊泡样病灶形成时间频率分布直方图。

图 3 特征性病灶形成时间的频率分布直方图

Note. A, Histogram of frequency distribution of limited lesion formation. B, Histogram of frequency distribution of vesicular lesion formation.

Figure 3 Histogram of frequency distribution of characteristic lesion morphology formation

2.2 病灶体积变化

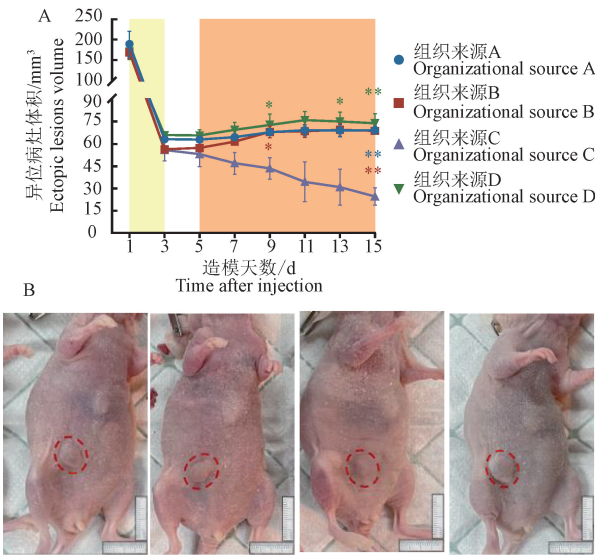
图中黄色区域所示,造模后混悬液液体逐渐被吸收,病灶局限,造模成功的组织来源 A、B、D 裸鼠病灶体积在 D3 时达到谷值,与病灶形态肉眼观察相符;图中橙色区域所示,组织来源 C 裸鼠病灶体积随时间缩小,在 D9、D13 时小于组织来源 B、D 裸鼠病灶,差异有统计学意义 ($P<0.05$),D15 时差异显著 ($P<0.01$),HE 染色评判该组织来源裸鼠中仅有 1 只造模成功,以上提示成功的裸鼠模型病灶随时间增长,其体积的连续测量可直观反映造模结果 (图 4)。

2.3 镜下组织学改变

造模前留存的组织标本具有典型的子宫内膜腺体和间质结构,腺上皮呈柱状排列,核下可见空泡,腺体数目多,形态较为规则,基本无毛细血管及纤维结缔组织增生,或间质较致密,腺体呈增殖期改变;或腺体呈分泌期改变,间质较疏松,与常规病理结果相符。造模后异位病灶腺体丰富,呈不典型增生改变,形态不规则,囊泡增大,或见单个囊泡,其内覆扁平或矮柱状腺上皮,间质厚薄不一,间质邻近有较多毛细血管,纤维组织增生明显 (图 5)。

2.4 纤维化程度评估

Masson 染色后,造模前内膜组织细胞形态正



注:A:病灶体积变化曲线。D9、D13、D15 时,与组织来源 C 裸鼠病灶体积相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;B:红色虚线所圈区域依次为 D15 时组织来源 A、B、C、D 裸鼠的皮表病灶。

图 4 病灶体积变化

Note. A, Lesion volume change curve. At D9, D13, and D15, compared with the volume of lesions in tissue-derived C nude mice, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. B, Area circled by the red dotted line is the skin surface lesions of tissue sources A, B, C, and D nude mice at D15.

Figure 4 Lesion volume change

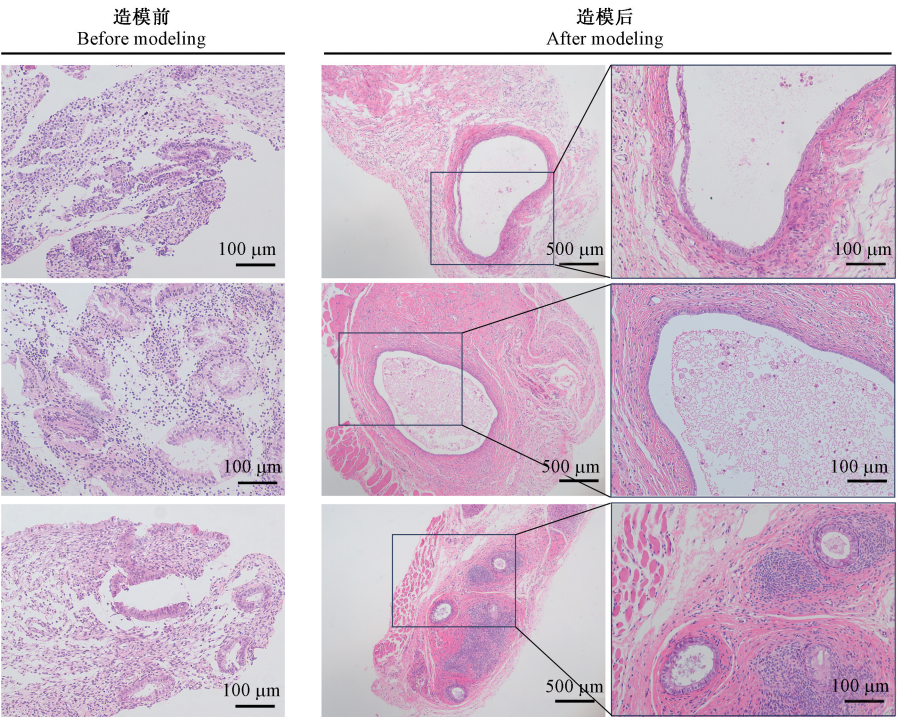


图 5 造模前、后组织学对比

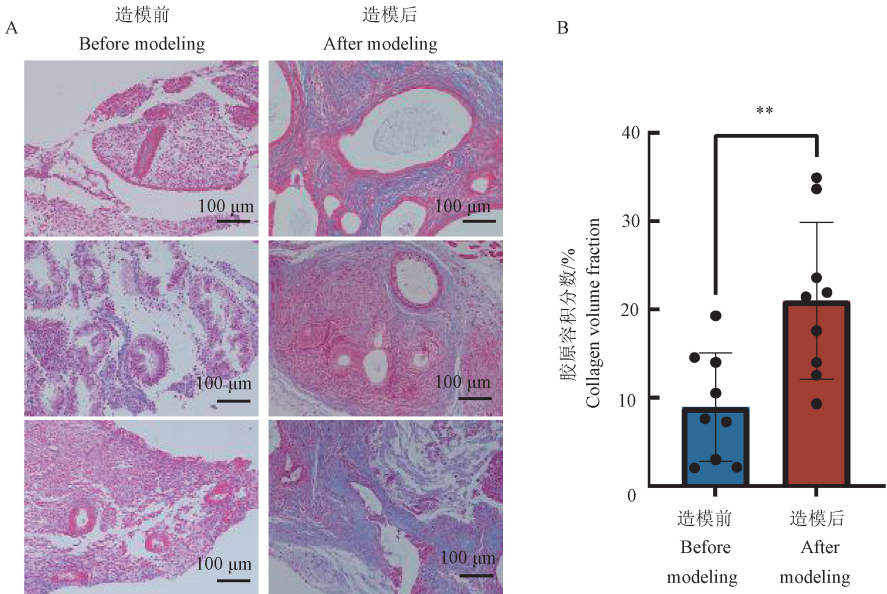
Figure 5 Histological comparison before and after modeling

常,蓝色胶原纤维偶见;而造模后病灶切片镜下可见大量胶原纤维聚集,增大的囊泡内可见少许胶原纤维沉积。造模后病灶组织的胶原纤维容积分数显著升高($P<0.01$),差异有统计学意义(图 6)。

2.5 共聚焦成像结果

共聚焦成像结果显示,用于造模的人源子宫内

膜中,呈绿色的 SUSD2 整齐地表达于血管周,较少见到呈红色的 α -SMA,二者无明显共定位;而造模后,异位病灶中 eMSCs 表达明显增多,并伴随着与 α -SMA 的共定位表达广泛存在(图 7),表明 eMSCs 在 EMS 纤维化病灶形成过程中向肌成纤维细胞分化。



注:A:造模前、后胶原纤维分布;B:造模前、后胶原容积分数。与造模前相比,** $P<0.01$ 。

图 6 造模前、造模后 Masson 染色与 CVF

Note. A, Distribution of collagen fibers before and after modeling. B, Collagen volume fraction before and after modeling. Compared with before modeling, ** $P<0.01$.

Figure 6 Masson staining and CVF before and after modeling

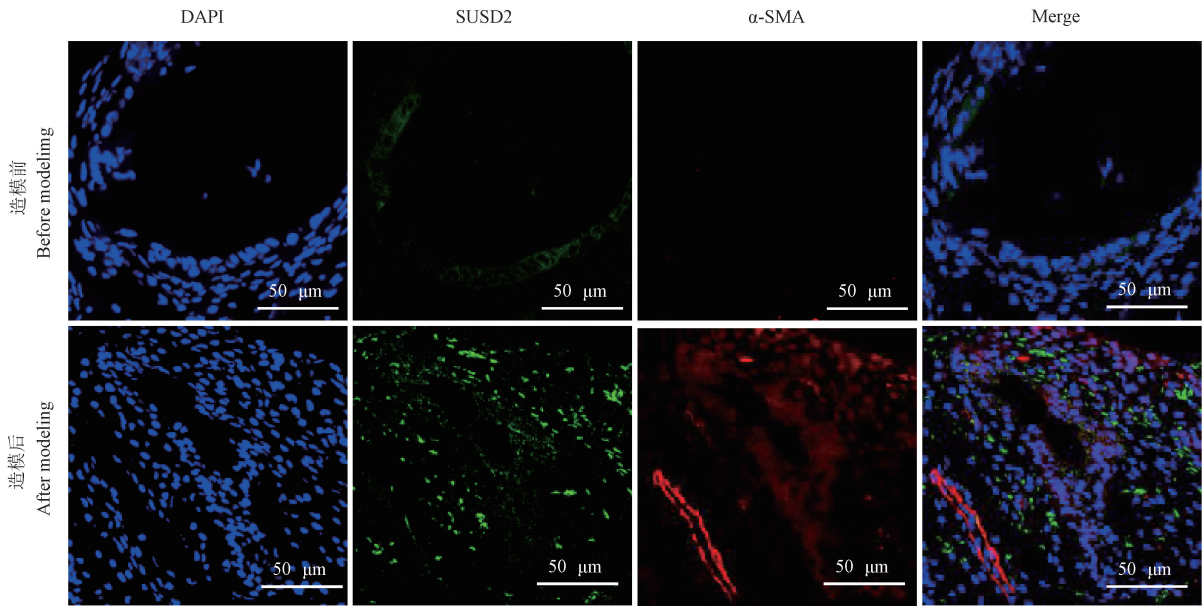


图 7 造模前、后免疫荧光染色对比

Figure 7 Comparison of immunofluorescence staining before and after modeling

3 讨论

纤维化是 EMS 主要的病理组织学特征,多由肌成纤维细胞过度沉积细胞外基质形成^[7-8],抑制纤维化是目前治疗 EMS 的潜在策略^[9-10]。现有报道表明 eMSCs 可以通过向肌成纤维细胞分化^[11-12]或旁分泌途径^[6],参与 EMS 纤维化的进程,然而其研究多缺乏相应的体内验证,因而适宜的动物模型构建可为体外深层次分子机制研究提供印证,是 EMS 纤维化发病机制及治疗药物研究的重要载体。为了确定 eMSCs 在 EMS 纤维化进程中的诱导作用,本实验在成功探索人源 EMS 纤维化裸鼠模型的基础上,利用 SUSD2(eMSCs 的标记物)、 α -SMA(肌成纤维细胞的标记物)对组织切片进行双染色,共聚焦成像结果显示,造模后异位病灶中 eMSCs 表达明显增多,并伴随着与 α -SMA 的共定位表达广泛存在,表明在人源 EMS 纤维化裸鼠体内,eMSCs(SUSD2⁺)可以向肌成纤维细胞(α -SMA⁺)分化。

在既往的动物模型探索中,非人灵长类动物虽具备自发形成 EMS 纤维化的条件^[13],但因成本高昂、造模成功率低等无法普及^[14]。啮齿类动物成本低廉、造模可行性高被广泛应用于 EMS 动物模型构建^[15],同源异体移植将供体大鼠或小鼠的子宫(包含子宫肌层和子宫内膜)通过腹膜缝合、腹腔注射或皮下注射的方式植入受体大鼠或小鼠体内诱发 EMS 纤维化;人源异种移植解决了同源内膜移植在种属起源、生化特性方面与人类异位病灶间存在差异的问题^[16],BALB/c 裸鼠是理想的人源子宫内膜组织植入受体,Grümmer 等^[17]研究显示造模后 2 d 种植内膜发生附着,第 4~7 天即可在移植灶处观察到血管内生,病灶可在腹膜内维持 4 周。

基于此,本实验采用人源异种皮下注射移植的方法建立 EMS 纤维化裸鼠模型。首先,在移植内膜类型及处理方式选择上,研究提示子宫内膜所处的月经周期对异位病变的影响无显著性差异^[18],使用新鲜的、未经体外培养的子宫内膜组织可明显提高病灶粘附率^[17],本实验利用腔镜可视化的条件,由高年资妇产科医师取材,再经术后病理筛除病变的内膜,确保裸鼠异位病灶保留人源组织的形态特征与生长侵袭活力;其次在移植方法的选择上,腹腔种植法^[14]须经麻醉、腹部切口手术、缝合等步骤,操作耗时长,裸鼠术后感染风险高;腹腔注射法造模后,受肠管蠕动的影响种植部位散在,不利于异位

病灶的定量评估,本实验选用皮下注射的方式,操作简便,节省了麻醉及缝合等步骤,缩短造模时间;此外,研究提示宿主的雌激素水平^[17]、外源性激素的补充^[19]及所处动情周期^[20]不影响异位病灶的形成及移植结果,故本研究造模前不予裸鼠去势或动情周期的统一,造模后也不予裸鼠外源性雌激素的补充。

移植后异位病灶体积增大、肉眼观察到内含澄清液体的类圆形囊状结构是评定模型成功的重要标准^[21],囊泡样异位病灶的形成符合 EMS 诊断中“异位包块”的核心特征,本实验中移植的人源子宫内膜碎片随时间定植、增长,在裸鼠体表即可观察异位病灶形态及生长情况,较为直观,而移植灶逐渐缩小至质硬结节,可用于初步判定造模结局。EMS 镜下病理诊断应至少包含以下三项中的两项^[1]:(1)子宫内膜基质细胞;(2)子宫内膜上皮细胞;(3)子宫内膜样组织内部或周围具有慢性出血征象。本实验对裸鼠异位病灶切片进行 HE 染色,镜下观察到子宫内膜样腺体和间质即判定为造模成功。Masson 染色是评估纤维化程度的重要依据,常用于纤维化相关研究^[22],本实验发现与移植前留存的内膜标本相比,模型移植灶 Masson 染色后镜下可见大量蓝色胶原纤维沉积,胶原纤维容积分数升高明显,提示移植后人源子宫内膜在受体裸鼠体内形成异位病灶的同时发生纤维化,符合 EMS 病变特点。该模型的建立,使体内追踪 eMSCs 命运成为可能,共聚焦成像提示 eMSCs(SUSD2⁺)可以在体内向肌成纤维细胞(α -SMA⁺)分化,这一发现验证了此前相关的体外研究^[11-12],因而在此基础上探究其深入的病理机制、开发 EMS 纤维化临床诊断的新型标志物、筛选治疗该病的有效药物是今后的新方向,以期为 EMS 纤维化患者提供个体化治疗。与此同时,观察到模型裸鼠存在舔舐、搔抓腹部等异常活动,可能与移植后异位病灶生长刺激局部神经传导引发疼痛有关,为在此模型基础上探索 EMS 疼痛模型提供借鉴。

综上所述,本实验采用皮下注射移植的方式将人源子宫内膜组织注射到裸鼠体内,成功建立 EMS 纤维化裸鼠模型,操作简便;通过对异位病灶皮表观察与体积测量初步评估造模成效,镜下组织学观察、纤维化程度评估以判定造模结果,可行性高;成功验证 eMSCs 在体内可以通过向肌成纤维细胞分化从而诱导 EMS 纤维化形成,为从抑制纤维化角度

治疗 EMS、探索 EMS 纤维化发病机制提供较好的模型基础。然而,裸鼠作为免疫缺陷小鼠,其作为造模受体限制了该模型在免疫、炎症等相关领域的研究^[23];此外,皮下移植的术式尚不能替代“逃逸”的子宫内膜碎片组织在盆腹腔中自由粘附、侵袭和血管生成的全过程,忽略了盆腹腔微环境在 EMS 纤维化致病过程中的作用。

参考文献:

[1] BULUN S E, YILMAZ B D, SISON C, et al. Endometriosis [J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(4): 1048–1079.

[2] VERCELLINI P, VIGANÒ P, SOMIGLIANA E, et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(5): 261–275.

[3] CZYZYK A, PODFIGURNA A, SZELIGA A, et al. Update on endometriosis pathogenesis [J]. *Minerva Ginecol*, 2017, 69(5): 447–461.

[4] BERNACCHIONI C, ROSSI M, VANNUZZI V, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 is a non-hormonal target to counteract endometriosis-associated fibrosis [J]. *Fertil Steril*, 2024, 121(4): 631–641.

[5] 王安琪, 孙佳凡, 徐炜, 等. 子宫内位症纤维化相关细胞及其活化机制研究进展 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(11): 1637–1642.

WANG A Q, SUN J F, XU W, et al. Research progress of fibrosis-related cells and their activation mechanism in endometriosis [J]. *J Nanjing Med Univ Soc Sci*, 2022, 42(11): 1637–1642.

[6] LI J, DAI Y, ZHU H, et al. Endometriotic mesenchymal stem cells significantly promote fibrogenesis in ovarian endometrioma through the Wnt/ β -catenin pathway by paracrine production of TGF- β 1 and Wnt1 [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(6): 1224–1235.

[7] GARCIA GARCIA J M, VANNUZZI V, DONATI C, et al. Endometriosis: cellular and molecular mechanisms leading to fibrosis [J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(5): 1453–1461.

[8] VIGANÒ P, OTTOLINA J, BARTIROMO L, et al. Cellular components contributing to fibrosis in endometriosis: a literature review [J]. *J Minim Invasive Gynecol*, 2020, 27(2): 287–295.

[9] GUO S W. Fibrogenesis resulting from cyclic bleeding: the Holy Grail of the natural history of ectopic endometrium [J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(3): 353–356.

[10] ZHANG L, LI Y, GUAN C Y, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on injured rat endometrium during its chronic phase [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 36.

[11] ZHANG Z, WANG J, CHEN Y, et al. Activin a promotes myofibroblast differentiation of endometrial mesenchymal stem cells via STAT3-dependent Smad/CTGF pathway [J]. *Cell*

Commun Signal, 2019, 17(1): 45.

[12] ZHANG Z, SUO L, CHEN Y, et al. Endometriotic peritoneal fluid promotes myofibroblast differentiation of endometrial mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 6183796.

[13] CUI M, LIU Y, MEN X, et al. Large animal models in the study of gynecological diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1110551.

[14] 孟鑫, 陈景伟. 子宫内位症小鼠模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(6): 857–863.

MENG X, CHEN J W. Research progress in a mouse model of endometriosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(6): 857–863.

[15] GU Z Y, JIA S Z, LENG J H. Establishment of endometriotic models: the past and future [J]. *Chin Med J*, 2020, 133(14): 1703–1710.

[16] GRÜMMER R. Animal models in endometriosis research [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(5): 641–649.

[17] GRÜMMER R, SCHWARZER F, BAINCZYK K, et al. Peritoneal endometriosis: validation of an *in vivo* model [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(8): 1736–1743.

[18] NISOLLE M, CASANAS-ROUX F, MARBAIX E, et al. Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(3): 572–577.

[19] BELIARD A, NOËL A, GOFFIN F, et al. Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(5): 973–978.

[20] 张薇, 沈洪沁, 黄启玲, 等. 非动情期 SD 大鼠子宫内位症模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(1): 21–24.

ZHANG W, SHEN H Q, HUANG Q L, et al. Establishment of endometriosis model in SD rats during non-estrus [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2004, 12(1): 21–24.

[21] 锁澍萱, 张真真, 开红英, 等. 子宫内位症纤维化与 M2 型巨噬细胞的关系 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(12): 1928–1932.

SUO L X, ZHANG Z Z, KAI H Y, et al. Relationship between fibrosis and M2 macrophages in endometriosis [J]. *J Pract Med*, 2017, 33(12): 1928–1932.

[22] PARK S J, CHO S W, KIM S M, et al. Assessment of myocardial fibrosis using multimodality imaging in severe aortic stenosis: comparison with histologic fibrosis [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2019, 12(1): 109–119.

[23] 刘馨雨, 张艳芹, 邓梦琪, 等. 异种移植裸鼠子宫内位症纤维化模型的构建 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2023, 24(4): 397–400.

LIU X Y, ZHANG Y Q, DENG M Q, et al. Establishment of endometriosis fibrosis nude mice model using xenotransplantation of human endometrium [J]. *Chin J Clin Obstet Gynecol*, 2023, 24(4): 397–400.