

单增李斯特菌胎盘感染的体内外模型研究进展

闫辉, 吴梦洁, 董庆利, 李卓思*

上海理工大学健康科学与工程学院, 上海 200093

闫辉, 吴梦洁, 董庆利, 李卓思. 单增李斯特菌胎盘感染的体内外模型研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 3985-4003.

YAN Hui, WU Mengjie, DONG Qingli, LI Zhuosi. Advances in *in vitro* and *in vivo* models for *Listeria monocytogenes* placental infection[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 3985-4003.

摘 要: 单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)是重要的食源性致病菌, 能引发人类的李斯特菌病, 是全球公共卫生问题之一。该菌易感染孕妇, 引起胎儿和新生儿的侵袭性李斯特菌病, 严重威胁母婴健康。因此, 建立有效的单增李斯特菌感染胎盘体内外模型, 解析和探究单增李斯特菌经胎盘感染机制, 是预防和控制单增李斯特菌感染母婴的关键所在。本文综述了可用于研究单增李斯特菌母婴感染的体内外胎盘模型, 总结和讨论了各类模型的优势和局限性; 并着重分析了体外三维胎盘屏障模型在单增李斯特菌感染方面的研究进展和未来研究方向。以期为深入解析该菌经胎盘感染的途径、发病机制提供支持, 并为预防和控制母婴李斯特菌病提供科学参考。
关键词: 单增李斯特菌; 胎盘屏障; 动物模型; 类器官

Advances in *in vitro* and *in vivo* models for *Listeria monocytogenes* placental infection

YAN Hui, WU Mengjie, DONG Qingli, LI Zhuosi*

School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

Abstract: *Listeria monocytogenes* is recognized as a significant foodborne pathogen, capable of causing listeriosis in humans, which is a global public health concern. This pathogen is particularly dangerous for pregnant women, as it can lead to invasive listeriosis in fetuses and neonates, posing a significant threat to both maternal and fetal health. Therefore, establishing suitable *in vitro* and *in vivo* models for *L. monocytogenes* placenta infection, as well as analyzing and exploring the infection process and its pathogenic mechanism, are important

资助项目: 国家自然科学基金(32200078)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32200078).

*Corresponding author. E-mail: lizhuosi@usst.edu.cn

Received: 2023-04-09; Accepted: 2023-06-08; Published online: 2023-06-13

approaches to prevent and control *L. monocytogenes* infection in mothers and infants. In this study, we reviewed the *in vitro* and *in vivo* placental models used for studying the infection of *L. monocytogenes* in maternal and infant, summarized and discussed the advantages and limitations of each model, and explored the potential of *in vitro* cell models and organoids for the study of *L. monocytogenes* infection. This paper aims to support the study of the infection pathway and pathogenesis of listeriosis and provide scientific references for the prevention and control of *L. monocytogenes* infection.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; placental barrier; animal models; organoid

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*), 简称单增李斯特菌, 属革兰氏阳性小杆菌, 是一种广泛存在于自然界的食源性致病菌。单增李斯特菌能引起李斯特菌病, 主要表现为脑膜炎与败血症, 常见于老年人和孕妇等免疫功能低下的群体中^[1], 住院率为 97.0%, 死亡率为 15.6%^[2], 其中, 孕妇感染单增李斯特菌的风险比其他健康的成年人高 20 倍^[3], 感染单增李斯特菌后通常发展为非特异性的感染性发热疾病, 进一步引发胎盘感染, 导致胎儿的早产、流产甚至死产等严重后果^[4]。单增李斯特菌引起的人类妊娠中期流产占比为 3.9%^[5], 足月前后母亲感染可能导致新生儿的败血症、脑膜炎、神经系统损伤甚至死亡等症状, 新生儿死亡率高达 22%–47%^[6-7]。

人类李斯特菌病的暴发与单增李斯特菌污染的食品种类息息相关, 单增李斯特菌常在即食食品、奶制品、水产和肉制品中被检出^[8-10]。虽然相比于其他食源性致病菌该菌污染率不高, 但易感人群感染后病死率较高, 其中, 大约 14% 的李斯特菌病发生在孕妇中, 妊娠相关李斯特菌病使胎儿和新生儿死亡的风险增加约 21%^[11]。1999–2011 年间, 法国公共卫生监测研究所报告李斯特菌病病例总计 606 例, 其中妊娠期间李斯特菌病占总病例的 17.8%^[12]; 2009–2011 年间, 美国疾病预防控制中心报告的 1 651 例李斯特菌病中有 292 例感染病例与胎儿流

产和死亡相关, 病死率为 21%^[13]。2004–2014 年间, 英国新生儿感染监测网络报告了李斯特菌病总病例 722 例, 显示妊娠期李斯特菌病的发病率约为一般人群的 17 倍, 新生儿死亡率为 21%, 新生儿死亡病例的母亲患李斯特菌病的比率为 58%^[14]。2016 年孙照琨等^[15]报告了中国部分地区(不包括香港、澳门和台湾地区) 1964–2013 年间李斯特菌病病例共 256 例, 新生儿李斯特菌病占 86 例, 围产期孕妇占 48 例, 新生儿李斯特菌病死亡率为 52.6%。2008–2017 年间, 中国 22 个省共报告了 759 例李斯特菌病病例, 514 例与妊娠相关, 其中新生儿死亡率高达 73%^[16]。以上流行病学数据均说明, 妊娠期孕妇是单增李斯特菌的主要感染人群, 经过母胎传播的单增李斯特菌会导致流产和死产等严重后果。因此, 亟需深入解析妊娠期孕妇感染单增李斯特菌的传播途径、深度入侵胎盘以及感染胎儿的详细机制。

目前, 单增李斯特菌感染母胎的研究还存在许多不足。单增李斯特菌致病的具体剂量尚不清楚, 例如流行病学数据表明能够引起李斯特菌病的最小剂量约为 10^6 CFU^[17], 也有研究表明达到致病的感染剂量还取决于具体的菌株毒力和宿主免疫力^[18]。单增李斯特菌经胎盘跨屏障进入胎儿的机制、在感染过程中引起的免疫反应与胎盘屏障之间的相互作用等, 仍有待深入探究, 为此, 需构建合适的体内外模型以

求全面解析单增李斯特菌感染胎盘到达胎儿的途径和机制。动物模型和体外模型均已被用于研究单增李斯特菌经胎盘感染机制。动物模型等体内模型可用于研究单增李斯特菌经胎盘传播途径,感染后各脏器细菌负荷,在体内的发病机制和宿主防御能力,而体外模型可用于研究单增李斯特菌入侵胎盘的详细分子机制^[19]。然而,由于这些模型均无法高度模拟人类母胎界面的生理结构和功能特征,使单增李斯特菌感染胎盘的机制研究无法深入。因此,亟需建立可高度复制人类母胎界面的模型系统,目前已有诸多研究者开展了这方面的研究,但针对新型模型的总结和归纳相关综述性文章较少。基于此,本文首先描述了单增李斯特菌经胎盘传播的生物学特征;其次,总结了基于小鼠(*Mus musculus*)、豚鼠(*Cavia porcellus*)、沙鼠(*Meriones*)和其他哺乳动物体内模型以及二维细胞、三维组织等体外模型研究单增李斯特菌感染胎盘的最新研究成果,比较了各类模型的优势和局限性;也包括人类胎盘外植体体外模型的最新研究进展;最后,介绍并总结了近几年开发出的新型体外模型——类器官和胎盘芯片的相关研究进展。将为今后深入开展单增李斯特菌感染胎盘研究提供理论支持,并有助于进一步研究、预防及治疗妊娠期的李斯特菌病。

1 单增李斯特菌经胎盘感染的生物学特征

单增李斯特菌被人体摄入后,在胃中存活下来的菌体首先会侵袭小肠,再从肠系膜淋巴结散播到脾脏和肝脏,最后,单增李斯特菌可以到达大脑或胎盘^[20],分别引起中枢神经系统感染和妊娠期孕妇的宫内或宫颈感染^[21]。在妊娠期间,由于孕妇体内黄体酮含量增加等原因,

抑制了母体细胞免疫功能^[22],从而使孕妇极易受到单增李斯特菌的感染^[23]。

单增李斯特菌能通过母胎屏障感染胎儿。蜕膜(子宫内层)和母体血液中的胎儿绒毛共同构成了母体屏障(图1)^[24]。在人类胎盘中,漂浮在母体血液中和附着在蜕膜上的胎儿绒毛代表

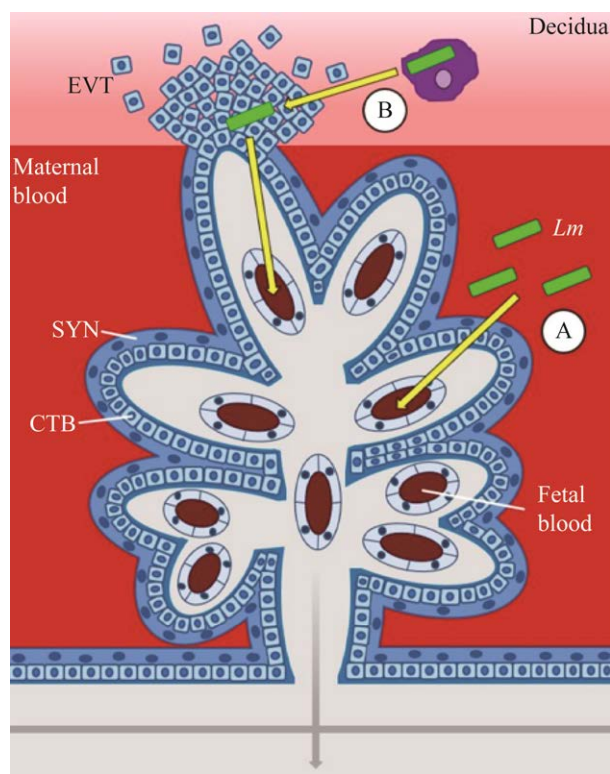


图1 单增李斯特菌通过胎盘屏障示意图^[24] A: 单增李斯特菌(*Lm*)经合体滋养层(SYN)和细胞滋养层(CTB)直接侵袭侵入胎盘。B: 单增李斯特菌通过从蜕膜或位于母体白细胞内的细菌经绒毛外细胞滋养层(EVT)的细胞间扩散侵入胎盘

Figure 1 *Listeria monocytogenes* crossing the placenta^[24]. A: *Listeria monocytogenes* (*Lm*) invades the placenta by direct invasion via the syncytial trophoblast (SYN) and cytotrophoblast (CTB). B: *Listeria monocytogenes* invades the placenta via intercellular spread from the meconium or from bacteria located in maternal leukocytes via the extravillous trophoblast (EVT).

了母胎屏障的两个界面点。其中,构成胎儿绒毛的细胞层包括固定于母体蜕膜中的绒毛外细胞滋养层(extravillous trophoblast, EVT)、外层的合体滋养层(syncytio trophoblast, SYN)、细胞滋养层(cytotrophoblast, CTB)以及内层的胎儿血管内皮细胞(图 1)^[25]。单增李斯特菌以一种基于肌动蛋白的隐性的细胞-细胞间的传播机制,在胎盘中传播、扩散并定殖^[20],且在单增李斯特菌感染非灵长类动物胎盘模型的研究中已经证实了这种细胞间扩散机制的重要性^[21-22]。在胎盘屏障处,单增李斯特菌可以通过 SYN 直接侵袭胎盘(图 1A),或通过蜕膜和母体免疫细胞内的细菌运输侵入绒毛外细胞滋养层(EVT)的细胞间并进一步扩散侵入胎盘(图 1B)^[24]。

单增李斯特菌通常通过自身诱导感染巨噬细胞、上皮细胞和胃肠道内皮细胞等宿主细胞^[26]。单增李斯特菌的感染包括内化、裂解并逃逸液泡、肌动纤维聚集和细胞间的传播扩散 4 个阶段,该过程涉及多个毒力因子。其中单增李斯特菌依赖内化素 A (internalin A, InlA)和内化素 B (internalin B, InlB)分别与宿主细胞受体 E-钙黏蛋白(E-cadherin, Ecad)或酪氨酸激酶受体 c-Met 结合感染胎盘^[24]。单增李斯特菌经 InlA 和 InlB 介导黏附入侵宿主细胞后,通过分泌毒素李斯特菌溶血素 O (listeriolysin O, LLO)与吞噬液泡膜上的胆固醇结合并形成孔状结构从而裂解吞噬液泡,同时分泌磷脂酶 PlcA 和磷脂酶 PlcB 裂解并脱离膜结合液泡进入胞质内进行细菌的增殖,完成细菌在宿主细胞内的逃逸过程^[27];肌动蛋白聚合蛋白 A (actin polymerizing protein, ActA)刺激宿主细胞的肌动蛋白聚合,为单增李斯特菌提供通过细胞质运动的动力并形成质膜突起,迫使其进入相邻的细胞,以重新启动感染周期,最终单增李斯特菌利用上述细胞间的扩散机制通过胎盘细胞到达胎儿^[28-30]。

2 单增李斯特菌感染胎盘的体内模型

动物模型是研究病原体感染胎盘的重要体内模型,这类模型具有高度分化的胎盘,包含所有的滋养层细胞亚群,能够在不同的胎龄下对单增李斯特菌的感染途径和机制进行分析^[31]。胎盘在发育过程中不仅起到为胎儿提供营养和清除废物的作用,还进化出重要的屏障功能,能防止病原体感染胎儿,同时保持母体对同种异体胎儿的免疫耐受^[23]。动物模型能够重现这种复杂的生理状态,因此对于理解单增李斯特菌在母体妊娠期间如何通过穿越胎盘屏障进而感染胎儿组织至关重要。然而,动物模型由于与人类在物种上的差异而不能完全复制人类胎盘独特的细胞亚型、母胎界面解剖结构以及胎盘屏障功能,因此,动物模型也具有一定的局限性。

2.1 啮齿类动物模型

2.1.1 小鼠模型

小鼠是实验室最常用和最经济的动物模型之一,可用于研究单增李斯特菌的毒力因子在胎盘中的作用,剖析宿主对胎盘感染的反应和了解宿主免疫系统如何平衡对胎儿耐受的需求与母胎对病原体的防御需求等。小鼠胎盘有着与人类相似的血绒毛膜胎盘^[32],但与人类胎盘的滋养层结构相比仍存在许多差异。人类胎盘中,漂浮的胎儿绒毛横截面解剖结构(图 2C)表明了 SYN 顶端表面上覆盖着分支微绒毛,这些微绒毛使其表面积最大化,更有利于母体和胎儿营养和废物的交换^[25]。与人类相比,小鼠的 EVT 在锚定胎盘能力方面更弱,在胎盘蜕膜中的侵入程度比人类浅(图 2A、2D),这导致小鼠模型在单增李斯特菌对滋养层的侵袭研究方面不是最佳的选择^[31]。小鼠胎盘呈迷宫状,有 3 层滋养层(图 2D)^[25];小鼠的母体血液与一层单核

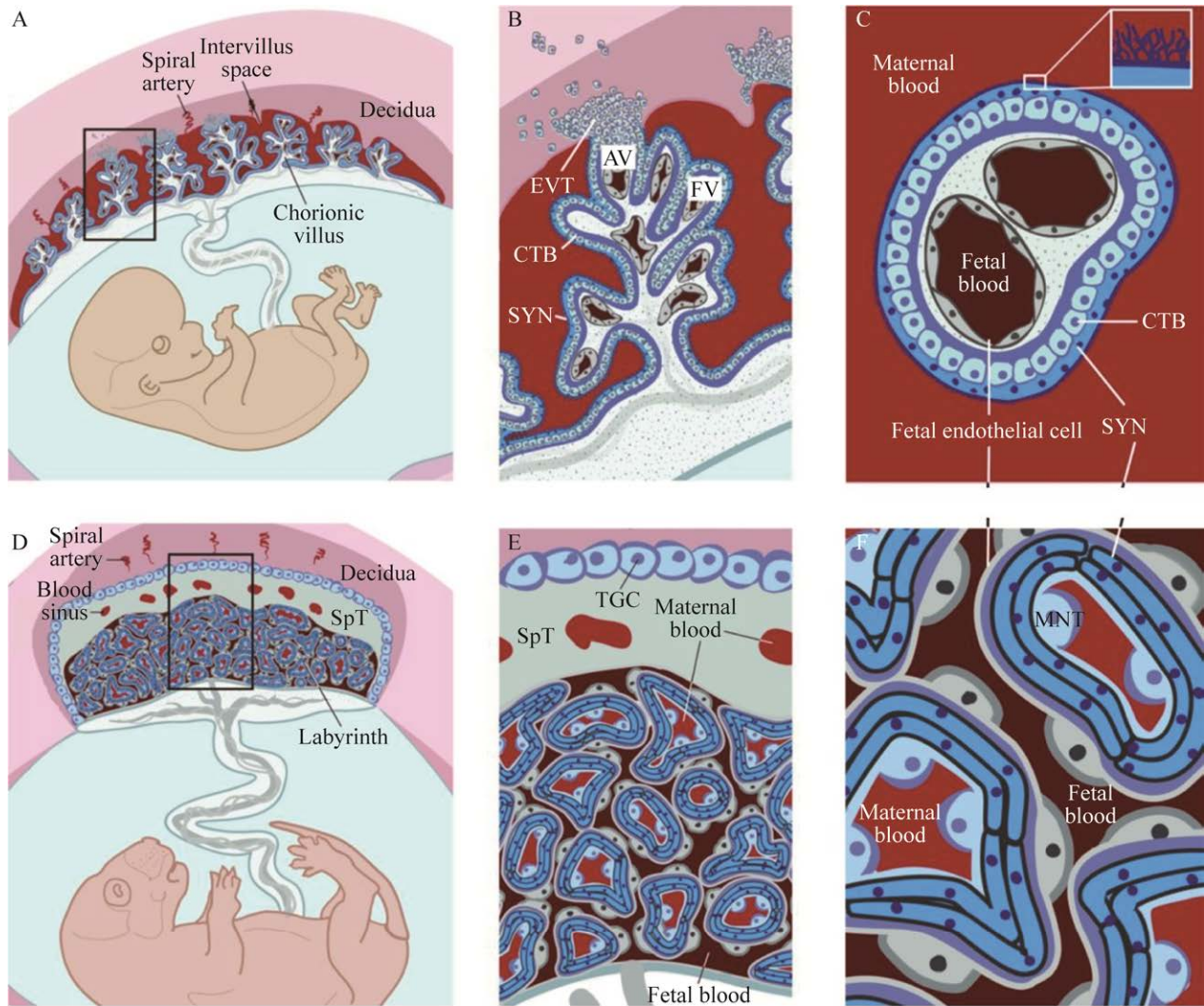


图 2 人类与小鼠胎盘组织对比图^[25] A: 人类血绒毛膜胎盘结构. B: 人类胎盘母胎界面. C: 人类滋养层横截面解剖放大图. D: 小鼠迷宫状胎盘结构. E: 小鼠胎盘母胎界面. F: 小鼠滋养层细胞结构放大图
 Figure 2 Comparison of human and mouse placental tissue^[25]. A: Structure of human blood chorionic placenta. B: Maternal-fetal interface of human placenta. C: Anatomical magnification of cross section of human trophoblast. D: Maze-like structure of mouse placenta. E: Maternal-fetal interface of mouse placenta. F: Zoomed-in structure of mouse trophoblast.

滋养层(mononuclear trophoblast, MNTs)直接接触, 该单核滋养层覆盖着 2 层 SYN, 营养物质、气体和废物必须穿过一层 MNT 和 SYN 双层细胞层才能到达胎儿血液(图 2E)^[31]。相比小鼠, 人类胎盘呈分支绒毛状(图 2A), 有 2 层滋养层, 母亲血液中的物质通过一层合体滋养层 SYN 以及单层细胞滋养层 CTB 到达胎儿血管内皮细

胞中(图 2C)。小鼠模型的特点是妊娠期短、繁殖力高; 但小鼠幼崽有晚熟的特征, 如幼崽的眼睛、毛发以及大部分器官均在小鼠分娩后才会发育, 因此病原菌的侵入对胎儿的影响与人类相比存在一定差异^[31]; 小鼠模型的另外一个关键优势是转基因小鼠品系的广泛可用性和遗传突变体的多样性, 许多决定胎盘发育的小鼠

基因是已知的, 例如对先天免疫细胞的发育和存活非常重要的细胞因子 CSF-1, 它在母胎界面具有高度的表达水平, Guleria 等^[33]通过基因编辑技术构建了 CSF-1 隐形突变小鼠, 并基于该基因突变型妊娠小鼠模型发现了在胎盘中的单增李斯特菌胎盘负荷明显高于野生型小鼠, 这可以归因于滋养层的 CSF-1 因子产生减少, 并减少了中性粒细胞向植入部位的聚集。随着近年来 CRISPR 等新兴基因编辑技术的兴起, 对小鼠胎盘发育及免疫相关基因的改造有望更进一步。

当小鼠作为感染模型时, 单增李斯特菌对某些细胞入侵的显著物种特异性是值得注意的一个方面。单增李斯特菌表达多种与宿主细胞侵袭相关表面蛋白, 其中内蛋白家族的富含亮氨酸的重复蛋白 InlA 和 InlB 已被证明对单增李斯特菌通过靶向宿主细胞黏附分子 Ecad 受体侵袭宿主上皮细胞具有重要意义^[34]。在人的肠道中, 单增李斯特菌通过其表面蛋白内蛋白 InlA 与其宿主受体 Ecad 相互作用感染肠上皮细胞, 然而, 小鼠的 Ecad 谷氨酸取代人类的脯氨酸的单一氨基酸变异, 导致在野生型小鼠体内不能发生 InlA-Ecad 相互作用^[35]。Disson 等^[35]通过转基因系使 E13 小鼠 Ecad 人源化解决了这一缺陷, 并利用这种人源化 Ecad 小鼠模型揭示了 InlA 和 InlB 在胎儿李斯特菌病中的相互依赖作用, 破译了微生物靶向和穿过胎盘屏障的能力的分子机制。另外, 在小鼠中, 口服单增李斯特菌不会自然地感染小鼠肠道, 所以一般通过尾静脉注射给药, 静脉注射给药途径由于其具有高度可重复性, 在表征大多数的单增李斯特菌毒力基因方面有重要作用^[36]。尾静脉注射给药可以使单增李斯特菌在肝脏和脾脏迅速定殖, 同时引发血行散播, 但同时也会导致细菌不能充分暴露于上消化道中存在的酸性 pH 和

胆汁中, 从而在诱导单增李斯特菌在肠道内产生具有侵入性的转录变化方面具有局限性^[36]。单增李斯特菌的胎盘感染是先在全身其他器官定殖最后才到胎盘, 所以小鼠静脉给药模型的细菌定殖顺序不能完全模拟人体胎盘感染。这导致小鼠模型在研究该菌感染胎盘上具有明显局限性。其他感染胃肠道的新技术有望改善全身传播的局限性, 例如 Williams 等^[37]建立的非侵入性自然喂养 BALB/c 小鼠模型, 密切模仿人类李斯特菌病的所有阶段, 研究发现小鼠性别、喂食时间和食物类型都会影响对单增李斯特菌的易感性, 并且使用这种自然喂养模型, 增强了单增李斯特菌向肠系膜淋巴结和脾脏的播散, 但对于在肝脏处的播散仍具有局限性; 另外, 也可以使用眶后静脉窦注射, 但这种接种方法需要对小鼠进行麻醉, 而使用的麻醉剂种类不同可能会影响小鼠对细菌的抵抗力。Czuprynski 等^[38]研究发现使用戊巴比妥麻醉远交封闭群小鼠(Institute of Cancer Research), 进行胃肠道注射单增李斯特菌感染小鼠, 特异性地降低了小鼠的抵抗力, 大幅增加了对单增李斯特菌的易感性; Sahaghian 等^[39]研究发现使用异氟醚麻醉小鼠, 再用单增李斯特菌感染小鼠胃肠道并未改变宿主免疫应答能力。尽管小鼠模型在单增李斯特菌感染研究上有局限性, 但随着口腔感染模型的改进, 包括开发有针对性的方法以提高与肠道微生物群竞争的效率, 将促进小鼠模型在研究单增李斯特菌感染胎盘方面的应用。

单增李斯特菌感染胎盘的小鼠模型被广泛用于研究宿主感染反应。le Monnier 等^[40]采用对 BALB/c 小鼠静脉注射方法, 在血液、器官(肝脏、脾脏和大脑)以及所有胎儿和胎盘中跟踪细菌生长的动力学, 首次系统分析了单增李斯特菌在胎盘内的侵袭和定殖途径, 表明大多数

单增李斯特菌会黏附在被分化的胎盘滋养细胞并被其内化,随后在其中生长,最终到达胎儿毛细血管感染胎儿。Abram 等^[41]为了确定妊娠李斯特菌病的易感时间点,利用 BALB/c 小鼠模型观察其妊娠期第 15–20 天(即实验第 1–6 天)小鼠的免疫反应,发现在妊娠晚期单增李斯特菌感染导致的胎儿流产概率上升,另外,也证实了单增李斯特菌在小鼠妊娠期间的侵入会导致母体对抗单增李斯特菌的核心保护型免疫因子水平变化,即宿主细胞内的干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的水平降低,最终因无法消除病原体而造成母体免疫功能的损害,增加发生不良妊娠结局的概率。单增李斯特菌在母体免疫反应低下时感染胎儿,同时破坏母体免疫系统对细菌的清除能力。此外,小鼠模型也被用来研究单增李斯特菌在体内对器官和细胞的靶向传播机制以及单增李斯特菌毒力因子在体内的作用。Lamond 等^[42]对妊娠第 13 天的 Swiss Webster 小鼠通过尾静脉分别注射分离自人体心脏的有毒和无毒的单增李斯特菌,结果表明,与感染无毒菌株小鼠相比,怀孕小鼠表现出显著增强的单增李斯特菌胎盘-胎儿向性,并发现细菌表面蛋白 InlB 水平增加,表明了 InlB 在促进单增李斯特菌垂直传播方面的核心作用。除了早期发现的内化素家族的 InlA 和 InlB, Faralla 等^[43]通过建立 C6BL/8J 小鼠动物模型及绒毛膜癌 BeWo 细胞体外模型系统,发现了一种影响李斯特菌病的新型毒力因子——InlP,研究进一步发现其具有强烈的胎盘嗜性,可显著促进妊娠期小鼠模型的胎盘感染,约为对小鼠其他组织感染力度的 1 000 倍。这揭示了单增李斯特菌入侵胎盘屏障的分子机制,为单增李斯特菌毒力因子介导的细菌入侵研究提供了参考。

小鼠模型有助于研究孕妇在妊娠期间对单

增李斯特菌的易感性,并确定其在胎盘内的定殖机制;小鼠模型还可以测试特定细胞类型和细胞因子在母胎界面的作用。虽然使用小鼠模型存在与人体解剖结构差异、InlA-Ecad 相互作用和给药途径等多种局限性,但该模型仍是研究单增李斯特菌垂直传播和胎盘感染最经济、快速的动物模型。

2.1.2 豚鼠模型

另一种研究单增李斯特菌胎盘感染的常用动物模型是豚鼠。在所有啮齿类动物中,豚鼠胎盘与人类胎盘是最相似的,其胎盘侵入蜕膜程度也较深^[44]。另外,豚鼠是单增李斯特菌的天然宿主,单增李斯特菌在其体内的感染过程表现出与人类相似的胎盘向性,但不表现出强烈的中枢神经系统向性^[24]。然而豚鼠的妊娠期大约为小鼠的 3 倍,延长实验所耗时间的同时也增加了实验成本。另外,由于受体基因敲入豚鼠尚未构建,缺乏基因缺失和转基因模型,但随着规律成簇的间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)技术的出现,这种情况有望发生改变。

单增李斯特菌感染人类细胞时,细菌表面蛋白 InlB 利用肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)受体酪氨酸蛋白激酶 c-Met 和多功能分子 gC1qR 与宿主细胞特异性结合,促进细菌内化^[45]。而对于豚鼠,细菌表面蛋白 InlB 不与豚鼠的 c-Met 和 gC1q-R 受体高亲和力结合^[46],进而影响单增李斯特菌在豚鼠妊娠期间的趋向性。Khelef 等^[47]成功将人 c-Met 和 gC1q-R 受体转化到豚鼠细胞中,并证明了转化后的豚鼠细胞中受体与 InlB 结合的功能有所增强,但与豚鼠细胞受体亲和力增强的细菌 InlB 突变至今尚未被分离出来。Bakardjiev 等^[48]通过静脉注射建立了李斯特菌病怀孕 Hartley 豚鼠模型,并构

建 InlA、InlB 缺失突变体和 InlA、InlB 双缺失突变体菌株, 聚焦于单增李斯特菌毒力因子在跨越母胎循环之间的物理屏障方面的重要作用, 并以红霉素敏感的 InlA 缺失突变体和红霉素耐药野生型单增李斯特菌进行 1:1 的竞争性指数分析, 结果显示在接种 24 h 后, 胎盘和母体其他器官的平均竞争指数之间没有统计学上的显著差异, 这表明 InlA 和 InlA、InlB 双缺失突变体和野生型单增李斯特菌在所有测试器官中增殖效果相同, 结果表明这些内蛋白在胎盘侵袭与定殖中可能不是必需的。Williams 等^[49]使用豚鼠模型, 在其怀孕第 10–35 天口服接种 10^6 CFU 的单增李斯特菌, 评估母胎组织受侵袭情况, 表明单增李斯特菌早在接种后 2 d 就穿过胎盘屏障并侵入胎儿, 但侵袭发生的确切时间过程还需进一步确定。当豚鼠口服接种了单增李斯特菌的鲜奶油时, 在较低剂量下细菌感染定殖胎盘^[50], 高剂量导致豚鼠流产、死产等严重妊娠后果, 这与人类和非人类灵长类动物基本一致, 这些研究表明豚鼠是研究单增李斯特菌在人类胎盘中的传播及其剂量反应的合适替代动物模型并可用于人类李斯特菌病风险评估。

总之, 豚鼠是单增李斯特菌的天然宿主, 怀孕豚鼠模型常被用于探究单增李斯特菌的垂直传播、胎盘内的潜在感染机制以及在宿主体内引起的相关免疫反应^[50]。然而, 单增李斯特菌对怀孕豚鼠与人类中枢神经系统趋向性的差异、豚鼠胎盘厚度对单增李斯特菌在此模型内的动态运输限制, 以及 InlB 与 c-Met 相互作用缺陷等因素, 使豚鼠作为单增李斯特菌感染胎盘动物模型具有一定的局限性。

2.1.3 沙鼠模型

沙鼠天生对单增李斯特菌易感。沙鼠具有能与单增李斯特菌 InlA 和 InlB 相互作用并结合的各自受体, 使其成为细菌感染怀孕动物的流

行模型^[36]。与其他啮齿类动物相似, 沙鼠胎盘呈迷宫状, 有 3 层滋养细胞^[24]。沙鼠的每窝产仔数与豚鼠(1–8 个幼崽)相似, 小于小鼠(10–14 个幼崽), 但沙鼠的妊娠期与小鼠相似, 约为 25 d, 远小于豚鼠的 65 d, 这有利于快速进行试验^[24]。Disson 等^[35]使用蒙古沙鼠和人源化的 Ecad 敲入小鼠互补动物模型研究单增李斯特菌穿越胎盘屏障的机制, 发现 2 种毒力因子 InlA 和 InlB 是将单增李斯特菌转移到胎盘所必需的。因此, 通过阻断其中一条或两条通路, 就有可能阻止单增李斯特菌进入胎儿体内, 并靶向治疗妊娠期李斯特菌病。另外, 沙鼠 Ecad 活性位点与人类相同, 并且沙鼠 c-Met 受体含有与单增李斯特菌表面蛋白 InlB 有效相互作用所需的关键氨基酸^[35]。另外, 基于沙鼠模型, 经口投喂的单增李斯特菌可感染沙鼠各器官并定殖于其胎盘中。Roulo 等^[50]通过使蒙古沙鼠口服 0 、 10^3 、 10^5 、 10^7 CFU 和 10^9 CFU 单增李斯特菌的生奶油来检测病原菌导致胎儿流产的剂量反应, 研究发现暴露于 10^9 CFU 的沙鼠几乎在所有器官中检测到高剂量负荷的单增李斯特菌, 并且仅在此浓度下发现有胎儿流产的不良妊娠结局, 剂量与非人类灵长类动物(non-human primates, NHPs)所需的剂量相似^[35]。

与豚鼠和小鼠相比, 沙鼠模型有许多缺点, 其患李斯特菌病的特征较差, 在妊娠期小鼠、豚鼠和非人类灵长类动物中的单增李斯特菌感染都可能导致胎儿的流产或死产, 但在针对怀孕沙鼠的研究当中均未发现上述严重后果^[50], 所以在研究单增李斯特菌感染胎盘的免疫反应时, 应谨慎使用沙鼠模型。另外, 沙鼠的可用抗体有限, 甚至没有遗传工具可用。

2.2 非人类灵长类动物模型

小鼠、豚鼠、沙鼠都可作为研究人类李斯特菌病的动物模型; 但大多数模型都与人类胎

盘有较大差异。恒河猴(*Macaca mulatta*)和食蟹猴(*Macaca fascicularis*)等非人类灵长类动物的胎盘结构和组织与人类最相似,它们与人类在妊娠时长、对环境变化的反应以及激素分泌过程等方面高度相似,也具有类似的绒毛状胎盘和生殖周期^[51]。最关键的是,非人类灵长类动物模型与人类在单增李斯特菌感染胎盘的病理变化上基本相同^[51]。

恒河猴的胎盘结构以及生殖周期与人类高度相似^[52],该模型可用于评估感染和疾病的机制、剂量反应和单增李斯特菌感染的干预治疗。与人类一样,妊娠期的非人类灵长类动物感染单增李斯特菌后可能导致流产、死产或新生儿死亡^[53-54]。非人类灵长类动物表达与 InlA 和 InlB 相互作用的 Ecad 和 c-Met 亚型,允许单增李斯特菌胃肠道感染^[55-56]。Alice Smith 等^[55]发现当怀孕的恒河猴在妊娠晚期暴露于单增李斯特菌时,分娩死胎的概率增加,进一步病理研究发现了急性炎症、胎盘炎和胎儿肝坏死等与人类感染单增李斯特菌相似的后果,并从胎盘和胎儿组织中分离出单增李斯特菌。Wolfe 等^[56]使用食蟹猴作为研究单增李斯特菌感染胎盘的体内模型,观察到母体蜕膜和胎盘的细菌负荷相较于肝脏、脾脏和淋巴结更高,而胎儿组织中的细菌负荷量最高,且发现暴露于单增李斯特菌前 3 个月的 4 只怀孕猴均有胎儿死亡的不良妊娠结局。虽然目前已知李斯特菌病会导致较高的胎儿发病率和死亡率,但通常在人类妊娠晚期才会被发现,其对妊娠初期的影响尚不明确,并在流产前未观察到母体有明显的外部疾病表现,证实母胎感染单增李斯特菌后缺乏特定的早期症状^[56]。因此,今后应高度关注单增李斯特菌感染后的早期母体症状,进一步研究妊娠早期单增李斯特菌入侵的相关毒力因子动态变化及感染机制。

虽然非人类灵长类动物是目前为止最理想的胎盘感染模型,但其需要高昂的实验成本和较长的妊娠期;并且在使用非人类灵长类动物时,必须通过严格的伦理和试验审查^[57];另外,非人类灵长类动物的基因文库非常小,远远落后于小鼠和豚鼠。以上诸多因素限制了在该类模型中进行单增李斯特菌分子机制研究的发展。

3 单增李斯特菌感染胎盘的体外模型

理论上来说,能够自然感染单增李斯特菌的动物物种应作为研究人类李斯特菌病病理生理学的最佳模型。然而,这些模型不是常用的实验动物,而是如绵羊、牛和山羊等饲养在农场的动物。这些动物与人类的胎盘结构差异较大,且大多数研究机构不具备饲养大型动物的条件,导致使用这些模型作为实验动物具有更多的局限性。小型实验动物模型常被用于研究单增李斯特菌在胎盘的传播途径、定殖机制以及对母体的免疫反应,但由于与人类种的差异,小鼠、豚鼠和非人类灵长类动物等体内动物模型均不能完全模拟人类复杂的胎盘环境,也不能完整地提供单增李斯特菌侵袭人类胎盘的详细分子机制。二维(two-dimensional, 2D)、三维(three-dimensional, 3D)细胞模型等体外模型使用来源于人体细胞,为深入研究细菌感染宿主的分子机制提供了可能性。

3.1 二维细胞模型

近年来,原代细胞培养、绒毛膜癌细胞系和永生化细胞系已被用于人类胎盘的基础及病理研究^[58]。如图 3 所示,将细胞培养在培养皿底部,形成贴壁生长的单层 2D 培养系统(图 3A),可以用于研究细菌对胎盘细胞的黏附、侵袭、细胞内增殖,并用于分析细胞对细菌感

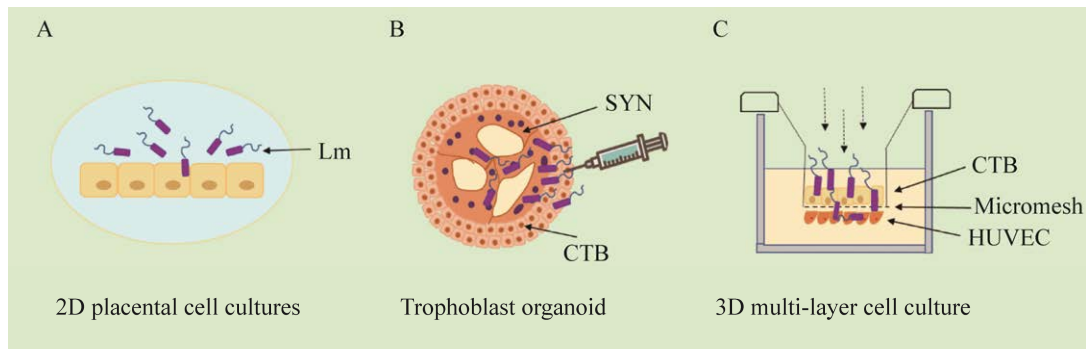


图3 二维细胞与三维细胞模型对比图^[64]

Figure 3 Two-dimensional cell model versus three-dimensional cell model^[64].

染过程中的响应。2D 系统常用的细胞是 BeWo、JEG-3 等人类绒毛膜癌细胞以及人原代滋养层细胞。研究人员还使用野生型和 *inlA* 基因缺失型单增李斯特菌菌株侵袭人原代滋养层细胞和人绒毛膜癌 BeWo 细胞, 发现 *inlA* 基因在促进单增李斯特菌与胎盘细胞的结合和内化方面起重要作用^[59]。Phelps 等^[60]也使用单增李斯特菌野生型菌株及 *inlA/inlB* 基因缺失型菌株对 BeWo 细胞进行侵袭研究, 结果证明 *inlA* 基因在细菌与细胞结合中起主要作用的同时不影响内化过程的效率, 并且在对 BeWo 细胞的侵袭中没有观察到 *InlB* 的作用。Lecuit 等^[61]使用 BeWo 细胞和人原代滋养细胞探究 *Ecad* 与肌动蛋白相互作用是否促进 *InlA* 介导的单增李斯特菌的侵袭, 结果表明 *InlA* 介导的单增李斯特菌进入宿主细胞基于 *Ecad* 与肌动蛋白细胞骨架的相互作用。在研究细菌感染胎盘时, BeWo 等绒毛膜癌构成的 2D 培养系统, 由于操作简单、易培养等优点受到了多数学者的青睐, 但这类细胞由于来自于肿瘤, 在分化特性、细胞特征、基因表达上均与人类正常的胎盘组织细胞差异明显^[62]。相比人绒毛膜癌细胞, 原代滋养层细胞是正常的胎盘细胞, 更适用于研究单增李斯特菌侵入胎盘的研究。Johnson 等^[59]的研究中表

征了合胞体(融合)和非融合滋养层细胞中单增李斯特菌的生命周期, 以建立 SYN 抗感染的分子机制, 并首次证明胎盘对单增李斯特菌的抗菌作用是由于 SYN 对其摄取量的显著减少, 而不是通过抑制细菌在细胞内的分裂或细胞间的传播。然而, 维持原代滋养层细胞的存活较为困难, 难以继代, 且来源于成熟胎盘组织的原代滋养层细胞其妊娠早期滋养层的所有关键特征未被保留^[63]。绒毛膜癌和永生化细胞系中所使用的培养物可能会破坏原本胎盘细胞抵抗单增李斯特菌入侵的各种分子机制^[58]。另外, 原代滋养层细胞来源于人体胎盘组织, 来源的个体差异导致实验结果难以重复, 也存在伦理质疑, 这些局限性使原代滋养层细胞作为单增李斯特菌的 2D 胎盘模型难以被广泛使用。

在人类胎盘中, CTB 细胞也被称为胎盘干细胞, 是一种未分化和增殖的细胞群体, 在胎盘发育的过程中, 可进一步分化为 EVT 和 SYN 细胞^[50]。人类 CTB 细胞 2D 培养模型的建立加深了对滋养层分化的理解, 为研究人类滋养层的发育、功能以及胎盘细胞抗菌机制提供强有力的工具。Okac 等^[63]首次从胎盘组织中提取了人类 CTB 细胞, 经过对细胞培养液的调整, 能够在体外培养该细胞, 具有和体内相似的分化

为 SYN 和 EVT 的能力,分化效率很高。另外,笔者团队^[64]用人类多功能干细胞 iPS 细胞,在体外分化得到了人类 CTB 干细胞系,该细胞系在体外可增殖到至少 60 代,且具有融合为 SYN 的能力,由于该 CTB 细胞系来源于人多功能干细胞,因此为今后基于免疫力低下人群或特殊人群的 CTB 细胞系来研究单增李斯特菌的感染机制,提供了可能性。Kaletka 等^[65]使用单增李斯特菌感染人类 CTB 细胞,发现 CTB 细胞有着封闭膜的细胞外囊泡(extracellular vesicles, tEVs)在胎盘免疫中起关键作用,这些 tEVs 能够诱导受体细胞产生促炎细胞因子 TNF- α ,证实了滋养层在感染期间具有免疫调节作用。笔者团队^[62]比较了 BeWo 细胞、原代滋养层细胞以及多功能干细胞诱导的 CTB 细胞之间在分化、基因表达、激素分泌、体外模型存活能力上的差异,基于滋养层基因表达谱发现 CTB 干细胞与原代滋养层细胞相似度为 92%,明显高于二者与 BeWo 细胞系的相似度为 79%–83%;同时 CTB 干细胞与原代滋养层细胞相似,都能在培养皿中高效地分化为 SYN 并分泌足量的人绒毛膜促性腺激素,而 BeWo 细胞的这种能力非常弱。这些研究也证实了,相比绒毛膜癌细胞系以及原代细胞,人类 CTB 干细胞更具优势,然而,目前几乎没有应用 CTB 干细胞构建的 2D 模型开展单增李斯特菌感染研究的报告,未来可应用该模型研究单增李斯特菌感染母胎的炎症反应以及胎盘细胞的免疫响应,尤其是可用于研究单增李斯特菌对不同类型滋养层细胞的靶向效率。2D 模型在研究单增李斯特菌感染胎盘的炎症反应以及毒力因子的作用方面具有潜在贡献,然而,2D 模型只有一种细胞系,只能用于分析单增李斯特菌对单一细胞的感染过程。同时,由于该模型不能明显地重建整个母胎界面,不能体现胎盘屏障的立体结构,从而导致在研

究单增李斯特菌的感染途径、跨细胞层感染的机制上仍存在较大困难。

3.2 三维细胞模型

体外人类胎盘细胞培养系统对研究细菌感染细胞的机制具有重要意义。但传统的 2D 体外模型系统无法以解剖学相关的方式在体外再现人类胎盘的许多重要特征和病原菌在细胞间的侵袭过程,也限制了细菌感染细胞分子机制的理解,以 2D 单层培养细胞会导致它们缺乏原本来自胎盘周围基质的环境刺激,而这些刺激在细胞生理过程中起主要作用^[66]。近几年,一些提出使用 3D 细胞培养物,包括球状体、层状体和类器官等,用以更准确地模拟母胎界面^[67-68]。3D 胎盘模型弥补了 2D 胎盘细胞模型在研究致病菌与细胞相互作用时的一些局限性。

其中,胎盘类器官是一类新兴的 3D 胎盘模型(图 3B),通常来源于可以自我更新的干细胞或体外培养的胎盘组织,这种培养并分化后的细胞群样类器官模型可以模拟胎盘组织和器官的复杂结构,具有生物学功能特征,能够弥补体内模型的局限性^[69-70]。Turco 等^[71]从妊娠 6–9 周的孕早期胎盘组织中富集了表达增殖型滋养细胞标志物 EPCAM10 的细胞簇,将其接种到类器官基质胶滴中传代二次后(10–14 d)建立了滋养层类器官;该滋养层类器官在结构和表型上都与绒毛胎盘非常相似,在滋养层类器官中检测到与人胎盘绒毛表达水平相当的滋养层分化调控相关基因 *GCM1* 和 *ERVW-1*,同时检测到妊娠期间重要的内分泌激素 GDF15 和人绒毛膜促性腺激素 hCG。这类体外培养的滋养层类器官,对研究滋养层的发育、生理、病理等具有重要的意义。然而,值得注意的是,该类器官细胞层结构中基底膜在外部与基质胶接触,SYN 合胞体团块排列在中央腔内^[71],这与人体胎盘组织外层是 STN 细胞内层是 CTB

细胞的构造是相反的(图 2), 因此在进行细菌感染实验时, 需要采用显微技术手段用注射器将细菌注射到类器官内侧, 这也一定程度上限制了这类模型的应用。未来, 可以用细胞外基质反向变换这一构造, 或者开发新的细胞支架将类器官展开以促进这类模型在单增李斯特菌感染上的应用。目前没有应用胎盘类器官研究单增李斯特菌在母胎界面的传播、相互作用、感染分子机制的研究。未来应用胎盘类器官研究单增李斯特菌与宿主细胞之间的互作, 可能会得到一些在体内模型中无法深入解析的结果。

除人体胎盘类器官外, 一些其他 3D 胎盘模型也得到了发展。Ma 等^[72]以经化学改性的聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)纤维基质为细胞培养支架, 使滋养层细胞附着在该细胞培养支架上, 构建了灌流生物反应器体系, 该生物反应器的双室设计模拟人体内母体和胎儿循环系统, 形成三维结构并能维持细胞内正常的功能活动, 并利用该模型进行一系列代谢和激素分泌的监测, 结果证明了人滋养细胞灌注生物反应器系统在体外药物试验模型系统开发中的可行性。Michael 等^[73]建立了与 2D 单层细胞全局转录组表达不同的 EVT 细胞 3D 球体模型, 并证明了其在妊娠期间药物和毒素筛查中的潜在用途。另外, Cui 等^[74]利用人类多能干细胞(human pluripotent stem cells, HPSCs)建立了 3D 滋养层样组织模型, 此模型可以显示微绒毛结构并能分泌人胎盘特异性激素, 说明该模型在胎盘病理方面的研究潜力。笔者之一等^[75]利用微镍网和纤维芽细胞作为支架, 用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)和 CTB 胎盘干细胞, 构建了层式结构的 3D 胎盘细胞屏障模型, 能分泌激素并能用于药物的跨膜研究(图 3C), 相比球状的 3D 胎盘模型, 该层式模型没有里外

之分, 不需要显微技术手段, 更适合用于细菌的跨屏障研究。同时, 理论上而言, 层式模型还可以叠加若干其他类型的细胞, 未来, 如果叠加培养胎儿神经细胞系, 或可用于研究细菌跨胎盘屏障后对胎儿神经系统损伤机制的研究。

类器官等 3D 细胞模型, 与传统的绒毛膜癌细胞系和原代细胞培养物相比, 具有更有利的特性, 能够深入解析单增李斯特菌与胎盘中复杂细胞群的相互作用及靶向入侵滋养层细胞的分子机制等方面。目前, 有必要基于胎盘 3D 细胞模型研究单增李斯特菌感染胎盘屏障的机制, 并通过与体内模型联合使用验证研究结果。

3.3 人类胎盘外植体

人类胎盘外植体是另一种替代体内动物模型的策略。由于致病菌的临床试验较难开展, 因此这类体外模型被广泛用于研究细菌与宿主的互相作用^[76]。Rizzuto 等^[77]通过将单增李斯特菌接种于蜕膜外植体中, 荧光染色结果显示 CD68 荧光标记的巨噬细胞不会在单增李斯特菌病灶周围积聚, 表明巨噬细胞无法对单增李斯特菌的感染作出反应, 这一发现为今后研究单增李斯特菌逃脱母体免疫的机制提供新的思路。Lecuit 等^[61]将足月胎盘绒毛外植体暴露于单增李斯特菌 EGD-e 菌株及其 *inlA* 基因缺失型菌株中, 发现明显的 *InlA* 蛋白依赖性附着和侵袭合体滋养层, 而 *inlA* 基因缺失突变体菌株未观察到上述过程, 也进一步表明了单增李斯特菌依赖 *InlA* 侵入合胞滋养细胞并进入胎盘绒毛的核心位置, 为单增李斯特菌的显著胎盘趋向性提供了分子解释。另外, Robbins 等^[78]通过培养人孕早期胎盘绒毛外植体研究单增李斯特菌入侵胎盘的初始位点, 表明 SYN 作为主要的感染门户, 与 Lecuit 等^[61]认为 EVT 作为侵袭初始部位的研究结果有所区别。

人类胎盘外植体模型相对于细胞模型来说具有胎盘组织高度有序、细胞分化状态和细胞表型显著的优势^[70]。然而,这类模型除了具有伦理质疑以外,在使用上也有一定的局限性,因为来源于人体组织,因此由采样部位和采样时间的差异等导致模型个体差异较大,例如,在特定的培养条件下,足月胎盘绒毛外植体在体外 4 h 后其存活力会有所下降,而孕早期胎盘外植体能够在体外培养物中形成锚定绒毛^[79]。孕早期胎盘外植体能够更好地代表人体内母胎屏障的结构,有助于理解人类胎盘抵抗感染的准确途径。这种体外模型可以用于研究针对单增李斯特菌在胎盘外植体中某一时间和空间的状态,但必须考虑到胎盘和蜕膜在整个妊娠过程中都在发生变化,因此,对于需要实时检测单增李斯特菌侵袭过程的研究具有一定的局限性。

3.4 胎盘芯片

由于胎盘的结构和功能存在巨大差异,传统的动物和细胞模型在深入研究单增李斯特菌侵袭胎盘的动态机制方面都受到限制。近年,随着微流控技术的快速发展,该技术也应用到胎盘芯片的构建中。近几年兴起的基于微流体原理的胎盘芯片体外模型能够显示母胎界面各

种复杂的生理反应,包括滋养层细胞分泌的炎症细胞因子的水平变化和病原菌感染母体后巨噬细胞的黏附等^[80-81]。

胎盘芯片这类易于设置和复制的动态模型对实时检测妊娠期间病原菌对母胎屏障感染和治疗具有重要意义。Patrick 等^[81]开发了一种高度集成的胎盘芯片系统(图 4),使用位于高分子 PET 薄膜顶部的多孔膜为基础的交叉指状电极结构来支持人胎盘绒毛膜 BeWo 细胞屏障,连续地监测该屏障的完整性。这种模型或许可以研究单增李斯特菌等病原菌通过该屏障过程中,对胎盘屏障的影响。Mosavati 等^[82]开发了一种模拟沐浴在血液中的母胎界面的离体胎盘芯片模型,利用该模型分析母胎屏障中葡萄糖的流速和膜孔隙率监测对葡萄糖在胎盘屏障上扩散的影响。这种胎盘芯片体外模型或许可以用来研究单增李斯特菌等病原菌感染过程中对各物质通过母胎屏障运输过程的影响。Zhu 等^[80]应用胎盘芯片研究大肠杆菌在母体内引起的急性胎盘炎症,数据表明了滋养层分泌炎症细胞因子水平的增加以及大肠杆菌感染后诱导母体激活以巨噬细胞为核心的免疫反应等。另外,还监测到两个胎盘细胞之间的信号交换,这一

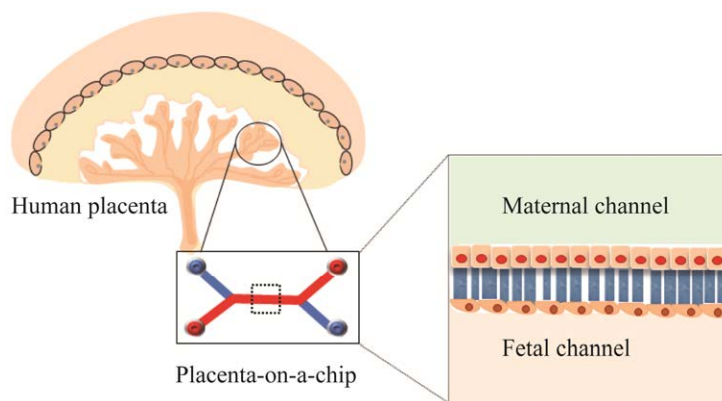


图 4 体外模拟人胎盘屏障的多层芯片示意图^[82]

Figure 4 Schematic diagram of a multilayer chip simulating the human placental barrier *in vitro*^[82].

发现暗示了滋养层在临床上针对大肠杆菌等食源性致病菌引起母婴炎症反应综合症的潜在作用。另外,在评估妊娠期所使用药物的安全性和有效性时,需要开发能够密切模拟人类妊娠特别是在胎盘屏障方面的实验模型,而胎盘芯片这种重复性好且可长期存活的离体模型有望为研究妊娠期间病原菌感染的靶向治疗提供机会^[81]。总的来说,胎盘屏障芯片为探索人类胎盘中复杂物质通过过程提供了一个简单易操作的动态平台,可能有助于理解单增李斯特菌的在母胎屏障界面感染的微观动态过程以及分子机制。

4 总结与展望

为深入探究单增李斯特菌感染孕妇和经胎盘屏障传播机制,建立有效的单增李斯特菌感染胎盘的体内外模型极其重要。本文总结了单增李斯特菌在胎盘中垂直传播的生物学特征,并详细介绍了几种动物体内模型和体外模型系统,分析了它们在研究胎盘感染方面的研究进展、优势和局限性,讨论了它们在研究病原菌-宿主相互作用机制方面的潜在作用(表 1)。在今后的研究当中,首先需要注意的重点是:李斯特菌病的早期诊断存在许多不足,这导致未能及时进行

表 1 应用于研究单增李斯特菌感染胎盘的不同模型之间的比较

Model	Characterized	Advantages	Disadvantages	References
Mouse	Economical and fast	Short gestation period; High fecundity; Large number of editable genes; More research	Intravenous infection; Shallow EVT invasion of the meconium; Late maturation of pups	[32]
Guinea pig	Natural hosts of <i>L. monocytogenes</i>	Similar to humans in terms of susceptibility and route of infection; EVT invades the meconium to a greater extent; Placental structure is similar to that of humans	Long gestation period, lack of transgenic models, higher rearing costs	[44]
Gerbil	Effective placental colonization	Can be modeled orally	Poorly characterized for listeriosis; No genetic tools available	[24]
Non-human primates	High structural similarity to human placenta	Placental structure and reproductive cycle similar to humans; Hormonal changes and immune response similar to humans	High experimental cost; Long experimental period; Small genomic library	[51]
2D cell model	Simple and repeatable; Static	Simple operation, easy cultivation	Lack of three-dimensional structure, single cell type	[58]
Placenta-like organs	Simulation of the mother-fetus interface	Able to secrete placenta-specific hormones; Conducive to the study of molecular dynamic mechanisms	Microscopic techniques are required to inject the bacteria into the inner part of the organoid by means of a syringe	[69]
Human placental explants	Derived from human tissue	With a more complete maternal-fetal barrier structure; Highly ordered placental tissue, significant cellular differentiation status and cellular phenotype	Large individual variation in models; Ethical limitations	[70]
Placenta Chip	Dynamic	Simulation of changes in the levels of various hormonal factors; Facilitates observation of microscopic dynamic processes at the maternal-fetal interface	More efforts are required to investigate the correlation with <i>in vivo</i> conditions	[80]

抗菌治疗,因此发现单增李斯特菌感染妊娠期孕妇的早期表征非常关键;国内外对单增李斯特菌在人体内的定殖有不少研究,但未能阐明胎盘李斯特菌病的详细机制和李斯特菌的发病机制;目前未解决的问题需要通过找到能够复制人类母胎界面的可处理模型系统,进一步探究单增李斯特菌感染胎盘的详细机制来解决。目前,研究人员通过啮齿类动物和非人类灵长类动物模型明确单增李斯特菌感染胎盘的详细机制、李斯特菌病的发病机理及免疫反应等方面的技术手段较为成熟。同样地,人类胎盘细胞 2D、3D 培养模型等新兴体外模型也都逐渐被开发并应用于单增李斯特菌等食源性致病菌的研究中,但寻找更贴近人类胎盘的体内模型及高度复制胎盘屏障的体外模型系统尚有较大空间。另外,选择使用多个体内外互补模型进行实验,并与人体组织的表型表征进行比较,将会增加解析单增李斯特菌与宿主相互作用的可能性。不断开发并验证体内外胎盘模型系统,将提高对单增李斯特菌感染胎盘的机制理解,并为临床治疗李斯特菌感染提供潜在依据。

REFERENCES

- [1] 杨炳辉. 食品中单增李斯特菌国内外控制要求有哪些[J]. 中国海关, 2023(3): 50-52.
YANG BH. What are the domestic and international control requirements for *Listeria monocytogenes* in food[J]. China Customs, 2023(3): 50-52 (in Chinese).
- [2] European Food Safety Authority [EFSA], and European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC] (2019)[J]. The European Union One Health 2018, 17: e05926.
- [3] WANG ZY, TAO XJ, LIU S, ZHAO YT, YANG XH. An update review on *Listeria* infection in pregnancy[J]. Infection and Drug Resistance, 2021, 14: 1967-1978.
- [4] HO AEP, RASHEED ZBM, NORMAN J, GABRIEL C, DIXON L, ASHWORTH S, FRISE C, YU CKH, SYKES L. Rhombencephalitis in pregnancy—a challenging case of probable *Listeria* infection[J]. Life, 2022, 12(10): 1600.
- [5] AHMADI A, RAMAZANZADEH R, DERAKHSHAN S, KHODABANDEHLOO M, FARHADIFAR F, ROSHANI D, MOUSAVI A, AHMADI HEDAYATI M, TAHERI M. Prevalence of *Listeria monocytogenes* infection in women with spontaneous abortion, normal delivery, fertile and infertile[J]. BMC Pregnancy and Childbirth, 2022, 22(1): 1-6.
- [6] CHARLIER C, DISSON O, LECUIT M. Maternal-neonatal listeriosis[J]. Virulence, 2020, 11(1): 391-397.
- [7] CHARLIER C, KERMORVANT-DUCHEMIN E, PERRODEAU E, MOURA A, MAURY MM, BRACQ-DIEYE H, THOUVENOT P, VALÈS G, LECLERCQ A, RAVAUD P, LECUIT M, STUDY GROUP NM. Neonatal listeriosis presentation and outcome: a prospective study of 189 cases[J]. SSRN Electronic Journal, 2021: 8-16.
- [8] PRASAD MCB, MILTON AAP, MENON VK, GHATAK S, SRINIVAS K, MOMIN KM, VINEESHA SL, DAS S, SEN A, LATHA C, SUNIL B, JOLLY D. Saltatory rolling circle amplification assay for simple and visual detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products[J]. International Dairy Journal, 2023, 137: 105498.
- [9] ZAKRZEWSKI AJ, CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA W, ZADERNOWSKA A, PODLASZ P. Virulence characterization of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri* isolated from fish and shrimp using *in vivo* early zebrafish larvae models and molecular study[J]. Pathogens, 2020, 9(12): 1028.
- [10] CAVALCANTI AAC, LIMEIRA CH, de SIQUEIRA IN, de LIMA AC, de MEDEIROS FJP, de SOUZA JG, de ARAÚJO MEDEIROS NG, ALVES de OLIVEIRA FILHO A, ALMEIDA de MELO M. The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in Brazil: a systematic literature review and meta-analysis[J]. Research in Veterinary Science, 2022, 145: 169-176.
- [11] WADHWA DESAI R, ALICE SMITH M. Pregnancy-related listeriosis[J]. Birth Defects Research, 2017, 109(5): 324-335.
- [12] GIRARD D, LECLERCQ A, LAURENT E, LECUIT M, de VALK H, GOULET V. Pregnancy-related listeriosis in France, 1984 to 2011, with a focus on 606 cases from 1999 to 2011[J]. Eurosurveillance, 2014, 19(38): 11-18.
- [13] BENJAMIN J, BARBARA E, PATRUCIA M, GOULD H, ROBERT V, STACY M, KELLY A,

- GERNER-SMIDT P, KAREN M, OLGA L. Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks—United States, 2009–2011[J]. *Annals of Emergency Medicine*, 2013, 62(22): 448-452.
- [14] SAPUAN S, KORTSALIOUDAKI C, ANTHONY M, CHANG J, EMBLETON ND, GEETHANATH RM, GRAY J, GREENOUGH A, LAL MK, LUCK S, PATTNAYAK S, REYNOLDS P, RUSSELL AB, SCORRER T, TURNER M, HEATH PT, VERGNANO S. Neonatal listeriosis in the UK 2004–2014[J]. *Journal of Infection*, 2017, 74(3): 236-242.
- [15] 孙照琨, 吴璇, 陈蕊, 王玲玲, 董家辉, 郭振辉. 李斯特菌既往中国文献报告病例分析[J]. *中国微生物生态学杂志*, 2016, 28(11): 1323-1326.
- SUN ZK, WU X, CHEN R, WANG LL, DONG JH, GUO ZH. Analysis of previously reported cases of listeriosis in the Chinese literature[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2016, 28(11): 1323-1326 (in Chinese).
- [16] CHEN SS, MENG FZ, SUN XW, YAO H, WANG YT, PAN ZM, YIN YL, JIAO XA. Epidemiology of human listeriosis in China during 2008–2017[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2020, 17(2): 119-125.
- [17] POVOLYAEVA O, CHALENKO Y, KALININ E, KOLBASOVA O, PIVOVA E, KOLBASOV D, YURKOV S, ERMOLAEVAS. *Listeria monocytogenes* infection of bat *Pipistrellus nathusii* epithelial cells depends on the invasion factors InlA and InlB[J]. *Pathogens*, 2020, 9(11): 867.
- [18] SWAMINATHAN B, GERNER-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis[J]. *Microbes & Infection*, 2007, 9(10): 1236-1243.
- [19] LOWE DE, ROBBINS JR, BAKARDJIEV AI. Animal and human tissue models of vertical *Listeria monocytogenes* transmission and implications for other pregnancy-associated infections[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(6): e00555-18.
- [20] LA PIETRA L, HUDEL M, PILLICH H, ABU MRAHEIL M, BERISHA B, ADEN S, HODNIK V, LOCHNIT G, RAFIQ A, PERNISS A, ANDERLUH G, CHAKRABORTY T. Phosphocholine antagonizes listeriolysin O-induced host cell responses of *Listeria monocytogenes*[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2020, 222(9): 1505-1516.
- [21] XIA XC, CHEN Y, XU JM, YU CD, CHEN WB. SRC-3 deficiency protects host from *Listeria monocytogenes* infection through increasing ROS production and decreasing lymphocyte apoptosis[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 96: 107625.
- [22] HANSEN S, HALL M, GRUNDSTRÖM C, BRÄNNSTRÖM K, ELISABETH SAUER-ERIKSSON A, JOHANSSON J. A novel growth-based selection strategy identifies new constitutively active variants of the major virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(11): e00115-20.
- [23] YOUSEFZADEH Y, SOLTANI-ZANGBAR MS, HEMMATZADEH M, SHOMALI N, MAHMOODPOOR A, AHMADIAN HERIS J, YOUSEFI M. Fetomaternal immune tolerance: crucial mechanisms of tolerance for successful pregnancy in humans[J]. *Immunological Investigations*, 2022, 51(4): 1108-1125.
- [24] LAMOND N, FREITAG N. Vertical transmission of *Listeria monocytogenes*: probing the balance between protection from pathogens and fetal tolerance[J]. *Pathogens*, 2018, 7(2): 52.
- [25] HUPPERTZ B. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development[J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 2012, 94(1): 28.
- [26] RYAN VE, BAILEY TW, LIU DQ, VEMULAPALLI T, COOPER B, COX AD, BHUNIA AK. *Listeria* adhesion protein-expressing bioengineered probiotics prevent fetoplacental transmission of *Listeria monocytogenes* in a pregnant Guinea pig model[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 151: 104752.
- [27] GABALLA A, GUARIGLIA-OROPEZA V, WIEDMANN M, BOOR KJ. Cross talk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* facilitates transitions between extra- and intracellular environments[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2019, 83(4): e00034-19.
- [28] JENNIFER R, ROBBINS. Pathogens and the placental fortress[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2012, 15(1): 36-43.
- [29] TURCO MY, MOFFETT A. Development of the human placenta[J]. *Development*, 2019, 146(22): dev163428.
- [30] FREITAG NE, PORT GC, MINER MD. *Listeria monocytogenes*—from saprophyte to intracellular pathogen[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(9): 623-628.
- [31] CARTER AM. Animal models of human pregnancy and placentation: alternatives to the mouse[J]. *Reproduction*, 2020, 160(6): R129-R143.

- [32] CINDROVA-DAVIES T, SFERRUZZI-PERRI AN. Human placental development and function[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2022, 131: 66-77.
- [33] GULERIA I, POLLARD JW. The trophoblast is a component of the innate immune system during pregnancy[J]. *Nature Medicine*, 2000, 6(5): 589-593.
- [34] TSAI YH, DISSON O, BIERNE H, LECUIT M. Murinization of internalin extends its receptor repertoire, altering *Listeria monocytogenes* cell tropism and host responses[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(5): e1003381.
- [35] DISSON O, GRAYO S, HUILLET E, NIKITAS G, LANGA-VIVES F, DUSSURGET O, RAGON M, LE MONNIER A, BABINET C, COSSART P, LECUIT M. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis[J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1114-1118.
- [36] D'ORAZIO SEF. Animal models for oral transmission of *Listeria monocytogenes*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4: 15.
- [37] WILLIAMS D, DUNN S, RICHARDSON A, FRANK JF, ALICE SMITH M. Time course of fetal tissue invasion by *Listeria monocytogenes* following an oral inoculation in pregnant Guinea pigs[J]. *Journal of Food Protection*, 2011, 74(2): 248-253.
- [38] CZUPRYNSKI CJ, FAITH NG, STEINBERG H, NEUDECK B. Sodium pentobarbital anesthesia transiently enhances the severity of infection following intragastric, but not intravenous, inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2003, 35(2): 81-86.
- [39] SAHAGHIAN R, FAITH NG, CZUPRYNSKI C. Comparison of systemic *Listeria monocytogenes* infection in esophageally inoculated mice anesthetized with isoflurane or pentobarbital[J]. *Lab Animal*, 2009, 38(4): 126-130.
- [40] le MONNIER A, JOIN-LAMBERT OF, JAUBERT F, BERCHE P, KAYAL S. Invasion of the placenta during murine listeriosis[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(1): 663-672.
- [41] ABRAM M, SCHLÜTER D, VUCKOVIC D, WRABER B, DORIC M, DECKERT M. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2003, 35(3): 177-182.
- [42] LAMOND NM, DAVID MCMULLEN P, PARAMASVARAN D, VISVAHABRATHY L, EALLONARDO SJ, MAHESWHARI A, FREITAG NE. Cardiotropic isolates of *Listeria monocytogenes* with enhanced vertical transmission dependent upon the bacterial surface protein InlB[J]. *Infection and Immunity*, 2021, 89(2): e00321-20.
- [43] FARALLA C, RIZZUTO GA, LOWE DE, KIM B, COOKE C, SHIOW LR, BAKARDJIEV AI. InlP, a new virulence factor with strong placental tropism[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(12): 3584-3596.
- [44] CARTER AM. Unique aspects of human placentation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(15): 8099.
- [45] BAKARDJIEV AI, THERIOT JA, PORTNOY DA. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back[J]. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(6): e66.
- [46] MELTON-WITT JA, RAFELSKI SM, PORTNOY DA, BAKARDJIEV AI. Oral infection with signature-tagged *Listeria monocytogenes* reveals organ-specific growth and dissemination routes in Guinea pigs[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(2): 720-732.
- [47] KHELEF N, LECUIT M, BIERNE H, COSSART P. Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein[J]. *Cellular Microbiology*, 2006, 8(3): 457-470.
- [48] BAKARDJIEV AI, STACY BA, FISHER SJ, PORTNOY DA. Listeriosis in the pregnant Guinea pig: a model of vertical transmission[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(1): 489-497.
- [49] WILLIAMS D, IRVIN EA, CHMIELEWSKI RA, FRANK JF, SMITH MA. Dose-response of *Listeria monocytogenes* after oral exposure in pregnant Guinea pigs[J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(5): 1122-1128.
- [50] ROULO RM, FISHBURN JD, AMOSU M, ETCHISON AR, SMITH MA. Dose response of *Listeria monocytogenes* invasion, fetal morbidity, and fetal mortality after oral challenge in pregnant and nonpregnant Mongolian gerbils[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(11): 4834-4841.
- [51] SARGENT J, ROBERTS V, D'SOUZA K, WRIGHT A, GAFFNEY J, FRIAS A. Correction: micro-anatomic alterations of the placenta in a non-human primate model of gestational protein-restriction[J]. *PLoS One*, 2020, 15(11): e0242769.
- [52] WOLFE B, KERR AR, MEJIA A, SIMMONS HA, CZUPRYNSKI CJ, GOLOS TG. Sequelae of fetal infection in a non-human primate model of

- listeriosis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2021.
- [53] TARANTAL AF, HARTIGAN-O'CONNOR DJ, NOCTOR SC. Translational utility of the nonhuman primate model[J]. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 2022, 7(5): 491-497.
- [54] MCCLURE HM, BRODIE AR, ANDERSON DC, BRENT SWENSON R. Bacterial infections of nonhuman primates[M]//*Primates*. New York, NY: Springer New York, 1986: 531-556.
- [55] ALICE SMITH M, TAKEUCHI K, BRACKETT RE, MCCLURE HM, RAYBOURNE RB, WILLIAMS KM, BABU US, WARE GO, BRODERSON JR, DOYLE MP. Nonhuman primate model for *Listeria monocytogenes*-induced stillbirths[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(3): 1574-1579.
- [56] WOLFE B, WIEPZ GJ, SCHOTZKO M, BONDARENKO GI, DURNING M, SIMMONS HA, MEJIA A, FAITH NG, SAMPENE E, SURESH M, KATHARIOU S, CZUPRYNSKI CJ, GOLOS TG. Acute fetal demise with first trimester maternal infection resulting from *Listeria monocytogenes* in a nonhuman primate model[J]. *mBio*, 2017, 8(1): e01938-16.
- [57] BOURGEOIS-GIRONDE S, ADDESSI E, BORAUD T. Economic behaviours among non-human primates[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2021, 376(1819): 20190676.
- [58] SHIBATA S, KOBAYASHI EH, KOBAYASHI N, OIKE A, OKAE H, ARIMA T. Unique features and emerging *in vitro* models of human placental development[J]. *Reproductive Medicine and Biology*, 2020, 19(4): 301-313.
- [59] JOHNSON LJ, AZARI S, WEBB A, ZHANG XL, GAVRILIN MA, MARSHALL JM, ROOD K, SEVEAU S. Human placental trophoblasts infected by *Listeria monocytogenes* undergo a pro-inflammatory switch associated with poor pregnancy outcomes[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 709466.
- [60] PHELPS CC, VADIA S, ARNETT E, TAN YB, ZHANG XL, PATHAK-SHARMA S, GAVRILIN MA, SEVEAU S. Relative roles of listeriolysin O, InlA, and InlB in *Listeria monocytogenes* uptake by host cells[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(10): e00555-18.
- [61] LECUIT M, NELSON DM, SMITH SD, KHUN H, HUERRE M, VACHER-LAVENU MC, GORDON JI, COSSART P. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(16): 6152-6157.
- [62] LI ZS, KUROSAWA O, IWATA H. A comparative study of key physiological stem cell parameters between three human trophoblast cell lines[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 525(4): 1038-1045.
- [63] OKAE H, TOH H, SATO T, HIURA H, TAKAHASHI S, SHIRANE K, KABAYAMA Y, SUYAMA M, SASAKI H, ARIMA T. Derivation of human trophoblast stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(1): 50-63.
- [64] LI ZS, KUROSAWA O, IWATA H. Establishment of human trophoblast stem cells from human induced pluripotent stem cell-derived cystic cells under micromesh culture[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10(1): 1-14.
- [65] KALETKA J, LEE KH, ALTMAN J, KANADA M, HARDY JW. *Listeria monocytogenes* infection alters the content and function of extracellular vesicles produced by trophoblast stem cells[J]. *Infection and Immunity*, 2022, 90(10): e00347-22.
- [66] BAKER BM, CHEN CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues[J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(Pt 13): 3015-3024.
- [67] BARROS AS, COSTA EC, NUNES AS, de MELO-DIOGO D, CORREIA IJ. Comparative study of the therapeutic effect of *Doxorubicin* and *Resveratrol* combination on 2D and 3D (spheroids) cell culture models[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 551(1/2): 76-83.
- [68] SOUZA AG, SILVA IBB, CAMPOS-FERNANDEZ E, BARCELOS LS, SOUZA JB, MARANGONI K, GOULART LR, ALONSO-GOULART V. Comparative assay of 2D and 3D cell culture models: proliferation, gene expression and anticancer drug response[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24(15): 1689-1694.
- [69] MATSUI T, SHINOZAWA T. Human organoids for predictive toxicology research and drug development[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 767621.
- [70] HEIDARI-KHOEI H, ESFANDIARI F, HAJARI MA, GHORBANINEJAD Z, PIRYAEI A, BAHARVAND H. Organoid technology in female reproductive

- biomedicine[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2020, 18(1): 1-19.
- [71] TURCO MY, GARDNER L, KAY RG, HAMILTON RS, PRATER M, HOLLINSHEAD MS, MCWHINNIE A, ESPOSITO L, FERNANDO R, SKELTON H, REIMANN F, GRIBBLE FM, SHARKEY A, MARSH SGE, O'RAHILLY S, HEMBERGER M, BURTON GJ, MOFFETT A. Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation[J]. *Nature*, 2018, 564(7735): 263-267.
- [72] MA T, YANG ST, KNISS DA. Development of an *in vitro* human placenta model by the cultivation of human trophoblasts in a fiber-based bioreactor system[J]. *Tissue Engineering*, 1999, 5(2): 91-102.
- [73] MICHAEL K, WAHED M, SHAWKY SA, DVORKIN-GHEVA A, RAHA S. Transcriptomic and functional analyses of 3D placental extravillous trophoblast spheroids[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 12607.
- [74] CUI KL, ZHU YJ, SHI Y, CHEN TW, WANG H, GUO YQ, DENG PW, LIU HT, SHAO XG, QIN JH. Establishment of trophoblast-like tissue model from human pluripotent stem cells in three-dimensional culture system[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(3): 2100031.
- [75] LI ZS, KUROSAWA O, IWATA H. A novel human placental barrier model based on trophoblast stem cells derived from human iPS cells[J]. *Tissue Engineering, Part A*, 2020, 26(13/14): 780-791.
- [76] COSTA J, MACKAY R, de AGUIAR GRECA SC, CORTI A, SILVA E, KARTERIS E, AHLUWALIA A. The role of the 3Rs for understanding and modeling the human placenta[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10(15): 3444.
- [77] RIZZUTO G, TAGLIANI E, MANANDHAR P, ERLEBACHER A, BAKARDJIEV AI. Limited colonization undermined by inadequate early immune responses defines the dynamics of decidual listeriosis[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(8): e00153-17.
- [78] ROBBINS JR, SKRZYPCZYNSKA KM, ZELDOVICH VB, KAPIDZIC M, BAKARDJIEV AI. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*[J]. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(1): e1000732.
- [79] SOORANNA SR, OTENG-NTIM E, MEAH R, RYDER TA, BAJORIA R. Characterization of human placental explants: morphological, biochemical and physiological studies using first and third trimester placenta[J]. *Human Reproduction*, 1999, 14(2): 536-541.
- [80] ZHU YJ, YIN FC, WANG H, WANG L, YUAN JL, QIN JH. Placental barrier-on-a-chip: modeling placental inflammatory responses to bacterial infection[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2018, 4(9): 3356-3363.
- [81] PATRICK S, MARIO R, KRATZ SEBASTIAN RA, GREGOR H, PHILLIPP T, MARKUS S, JAKOB G, NEUS B, MORIONES OSCAR H, VICTOR P, BERTHOLD H, MONIKA S, HEINZ W, PETER E. A lab-on-a-chip system with an embedded porous membrane-based impedance biosensor array for nanoparticle risk assessment on placental Bewo trophoblast cells[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 312(prepublish): 127946.
- [82] MOSAVATI B, OLEINIKOV AV, DU E. Development of an organ-on-a-chip-device for study of placental pathologies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22): 8755.

(本文责编 陈宏宇)