

# 牦牛源鲍氏志贺菌人工感染 BALB/c 小鼠的组织病理学观察

冉丹丹, 周芳, 黄志宏, 汤承\*, 刘亚刚

(西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041)

**摘要:** 为了解牦牛源鲍氏志贺菌对实验动物除肠道外的心、肝等的快速致病性损伤, 本研究以牦牛源鲍氏志贺菌感染 SPF 小鼠, 剂量为  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{只}^{-1} (2 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1})$ , 感染后 6、18、30、42、54、66 h 剖杀、取样并对剖解进行详细观察, 在每个安排的时间点平行采集 3 只小鼠的脑、心、肝、脾、肺、肾、小肠、大肠和胰腺等组织, 制备组织切片, 通过 HE 染色和免疫组化染色, 对感染小鼠的组织病理学变化和细菌定位进行观察, 收集小鼠血液进行乳酸脱氢酶、尿素、肌酐、 $\alpha$ -淀粉酶、甘油三酯、总蛋白、白蛋白、磷酸激酶、 $\text{CO}_2$  结合力、P、血糖、白细胞数等血液生化指标检测。试验结果表明, 小鼠除小肠上皮细胞损伤外, 心外膜下出现凝固性坏死病灶, 肝组织有炎性细胞浸润及肉芽肿形成, 肺泡壁炎性细胞浸润, 胰腺上皮细胞肿胀, 细胞质溶解, 细胞核固缩或碎裂等; 心肌细胞、肝细胞、肺泡壁、肾小管细胞、胰岛细胞、肠上皮细胞细胞质内均有待检菌体抗原阳性反应; 生化指标除甘油三酯外均有一定变化。试验证实病变的严重程度与菌体抗原检出量成正相关, 分离株能在实验动物体内进行大面积侵袭, 心、肝、肺、胰腺、肾也是牦牛源鲍氏志贺菌分离株的主要靶器官。生化指标和病理损伤的特征性变化对该病诊断与研究拓展具有重要价值。

**关键词:** 牦牛源鲍氏志贺菌; 病理观察; 抗原分布

中图分类号: S852.61; S852.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)02-0367-07

## Histopathological Observation in BALB/c Mice Experimentally Infected with *Shigella boydii* from Yak

RAN Dan-dan, ZHOU Fang, HUANG Zhi-hong, TANG Cheng\*, LIU Ya-gang

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The objective of this study was to research the fast pathogenic damage of *Shigella boydii* from yak in BALB/c mice organs except intestine. The 4-week-old mouse were given  $0.5 \text{ mL}$  of *Shigella boydii* isolate ( $2 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) by gavage. Tissue samples of cerebrum, heart, liver, spleen, lung, kidney, intestine and pancreas were taken from the infected mouse after being infected for 6, 18, 30, 42, 54 and 66 h, and ever since for every 12 hours to make tissue biopsies, which were then stained with haematoxylin and eosin (H. E) and immunohistochemistry to observe the changes of histopathology and the bacterial antigen localization in experimentally infected ducklings. Mouse serum were collected for biochemical indicators detection including lactate dehydrogenase, urea, creatinine,  $\alpha$  amylase, triglyceride, total protein, albumin, phosphokinase,  $\text{CO}_2$  binding force, P, blood glucose and white blood cell count. The HE staining results showed a series of pathologic changes, not only the pathological damage in intestine epithelial cell as reports in

收稿日期: 2015-05-05

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金青年教师基金项目(2015NZYQN55); 牛羊主要疫病综合防控技术集成、创新与应用(2012BAD13B06-4)

作者简介: 冉丹丹(1988-), 女, 土家族, 贵州沿河人, 助教, 硕士, 主要从事动物传染病防治研究, Tel: 028-85709991, E-mail: 244934359@qq.com

\* 通信作者: 汤承, E-mail: tangcheng101@163.com

other references, but also coagulation necrosis under the epicardium, cellular infiltration and granuloma in hepatic cells, inflammatory cells infiltrating in alveolar wall, pancreas epithelial cell swelling and cytoplasm dissolving and karyopyknosis or fragmentation. Immunocytochemistry staining results showed that positive bacterial antigen signals were found in cytoplasm of cardiac muscle cell, hepatocyte, alveolar wall, renal tubular epithelium cell, islet cell and intestinal epithelial cell. Pathological damages, heart and hepatic necrosis of *Shigella boydii* from yak experimentally infecting mice was first reported in this study. Eleven kinds of blood biochemical indexes of experimental mice changed apparently in each infected time point except triglyceride. This study verified that the severity of the pathology was positively correlated with the *Shigella boydii* antigen distribution. It was concluded that the isolate was the pantropic bacteria injuring most tissues and cells in mouse, and as well as intestinal, heart, liver, lung, pancreas and kidney were the principal target organs.

**Key words:** *Shigella boydii* from Yak; pathological observation; antigen distribution

志贺菌属(*Shigella*)是具有高度传染性和严重危害性的革兰阴性胞内致病菌,与沙门菌、金黄色葡萄球菌一并认为是导致全球范围内大量人畜死亡的食源性疾病病原菌<sup>[1-3]</sup>。根据现有文献,志贺菌的相关病理研究主要针对其对肠道的致病性<sup>[4-5]</sup>,也有感染肺致病的报道<sup>[6]</sup>,M. M. Islam 等<sup>[7]</sup>证实志贺菌可引起人的包括败血症、低血钠、低血钾和低血糖等生化指标异常。笔者在 2011 年首次分离获得一株牦牛源鲍氏志贺菌<sup>[8]</sup>,在研究其毒力过程中发现该分离株对除肠道以外的机体脏器存在致病性,可导致试验动物肝炎症,心房外壁出现白色病灶等,重复试验均可出现相应病变,具有一定特点。为深入研究该分离株在机体组织、器官的动态分布及致病机制,进行了实验动物人工感染、常规组织病理学检查、免疫酶组织化学染色和生化指标检测。本研究针对牦牛源鲍氏志贺菌分离株建立实验病理模型,针对分离株感染实验小鼠出现的临床症状、部分生化指标变化、病理变化和细菌抗原定位进行系统研究,以期了解该菌株的致病机制,为更好地防控人畜志贺菌病和深入拓展相关研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和实验动物

牦牛源鲍氏志贺菌,由西南民族大学动物医学四川省重点实验室保存;4 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,26 只,雌雄各半,购自四川省成都达硕生物科技有限公司。

### 1.2 实验器材

兔抗鲍氏志贺菌多克隆 IgG 抗体(bs-4583R,

Beijing biosynthesis biotechnology Co., Ltd, China); 过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒 SP-9001(SP-9001 Histostain™-Plus Kits,); DAB 显色试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;石蜡组织切片机,美国 Leica 公司;ECLIPSE 6200 显微镜,日本 Nikon 公司;4%多聚甲醛溶液、LB 试剂、微量加样器及配套枪头、1 mL 无菌注射器、消毒灌胃针等。

### 1.3 人工感染实验动物

4 周龄 BALB/c 小鼠购回后正常饲喂观察 2 d。将 26 只 BALB/c 小鼠随机分为 2 组,其中试验组 22 只,对照组 4 只。先观察 3 d 无异常后再进行人工感染试验。根据预试验结果,用分离株 0.5 mL ( $2 \times 10^9$  CFU · mL<sup>-1</sup>)<sup>[8]</sup>灌胃进行人工感染试验,对照组灌胃生理盐水。以出现嗜睡、精神萎靡、被毛耸立为感染成功发病指标,感染后 6、18、30、42、54、66 h 剖杀、取样并对剖解变化进行详细观察,在每个安排的时间点平行采集 3 只小鼠的脑、心、肝、脾、肺、肾、小肠、大肠和胰腺等组织固定于 4%多聚甲醛,常规制作石蜡切片(4 μm)。收集小鼠血液进行乳酸脱氢酶(LDH)、尿素、肌酐、α-淀粉酶、甘油三酯(TG)、总蛋白、白蛋白、磷酸激酶、CO<sub>2</sub> 结合力、P、血糖、白细胞数等血液生化指标检测。

### 1.4 病理组织切片 HE 染色和免疫酶组织化学染色

小鼠组织切片进行 HE 染色和免疫酶组织化学染色。HE 染色按常规方法进行。免疫组化一抗采用兔抗鲍氏志贺菌多克隆 IgG 抗体(bs-4583R),免疫组织化学染色按过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒说明书进行。染色操作步骤大致如下:石

蜡切片脱蜡至水,3%  $H_2O_2$  浸泡,避光 20 min 后蒸馏水冲洗 3 min $\times$ 3 次;枸橼酸缓冲盐(pH6.0)高压修复 3 min,PBS 冲洗 5 min $\times$ 2 次;1:20 羊血清封闭 37 $^{\circ}C$  30 min;甩去多余血清,加一抗 37 $^{\circ}C$  1~2 h,PBS 冲洗,5 min $\times$ 2 次;1:200 二抗 37 $^{\circ}C$  40 min,PBS 冲洗,5 min $\times$ 2 次;SP(1:200)37 $^{\circ}C$  30 min,PBS 冲洗,5 min $\times$ 2 次;3,3-二氨基联苯胺显色,镜下控制显色时间,自来水中止显色;自来水充分冲洗,复染,封片;阴性对照以 PBS 代替一抗。

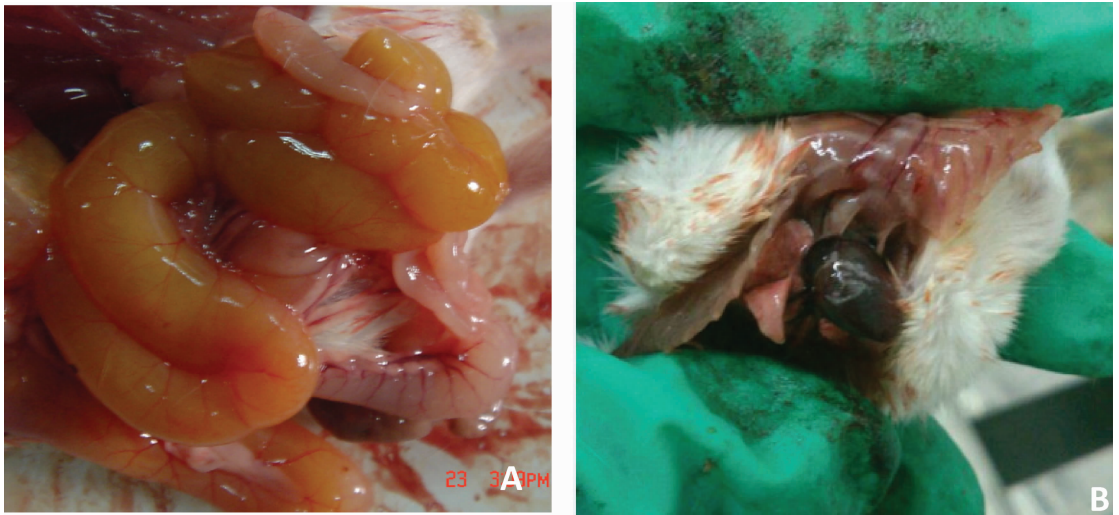
染色切片置于 Nikon ECLIPSE 6200 显微数码图像采集系统上采集图像,用 ImagePro-Plus6.0 图像分析软件测量其阳性颗粒累积光密度值(IOD),所得数据用 Excel 表格进行统计处理,分别计算各

时间点各组织脏器的平均累积光密度值,并绘制阳性累积光密度值动态柱形图。

## 2 结果

### 2.1 志贺菌人工感染 BALB/c 小鼠模型的建立

接菌后 2 h 小鼠出现嗜睡、精神萎靡、被毛耸立等临床症状,36 h 有一只试验组小鼠死亡,48 h 后小鼠精神恢复。观察期内对照组小鼠精神均正常,未出现死亡。经剖检,试验组小鼠于感染后 18 h 即可见小肠内充盈黄色透亮内容物,感染后 6 h 即可见小鼠心外膜下有细小白色病灶,且随时间点的延长病灶扩大和融合(图 1)。



A. 感染后 18 h 小鼠肠道黄色内容物;B. 感染后 6 h 小鼠心白色病灶

A. Yellow contents in intestine at 18 h PI;B. White focus on the epicardium at 6 h PI

图 1 小鼠组织感染后病变

Fig. 1 Pathologic changes in experimental BALB/c mice infected with *Shigella boydii* from yak

### 2.2 志贺菌人工感染 BALB/c 小鼠后主要血液生化指标

小鼠血液生化指标检测结果除甘油三酯外,乳酸脱氢酶、尿素、肌酐、 $\alpha$ -淀粉酶、甘油三酯、总蛋白、白蛋白、磷酸激酶、 $CO_2$  结合力、P、血糖、白细胞数等指标均有一定的变化。其中,血清总蛋白、 $CO_2$  结合力、乳酸脱氢酶水平先降低后升高,尿素、肌酐、白蛋白、白细胞数水平总体上呈降低趋势,血糖、磷酸激酶、 $\alpha$ -淀粉酶水平先升高后降低,P 水平总体升高。变化趋势曲线见图 2。其中,由于各项指标数值和单位相差较大,为了在同一个图中展示做了相应处理,处理方法见生化指标名称后。

### 2.3 病理组织学检查

小鼠组织切片 HE 染色观察,感染小鼠除脾、大肠未见明显病理变化外,其余脏器均出现不同程度病理变化(图 3)。其中,小鼠心组织切片可见各时间点心肌组织充血,心腔内有多少不一血凝块,6、30、42、54 h 可见心外膜下有坏死和炎症细胞增生浸润病灶,且随时间的延长而增大;肝组织切片各时间点均见不同程度充血,54、66 h 偶见凝固性坏死灶,少量散在巨噬细胞与淋巴细胞浸润病灶,18、30、54 h 可见肝细胞内出现细小空泡;肺组织切片可见随感染时间的延长,肺泡壁细胞增多,肺泡壁增宽,肺泡腔狭窄或消失。42、54 h 可见血管周围或支气



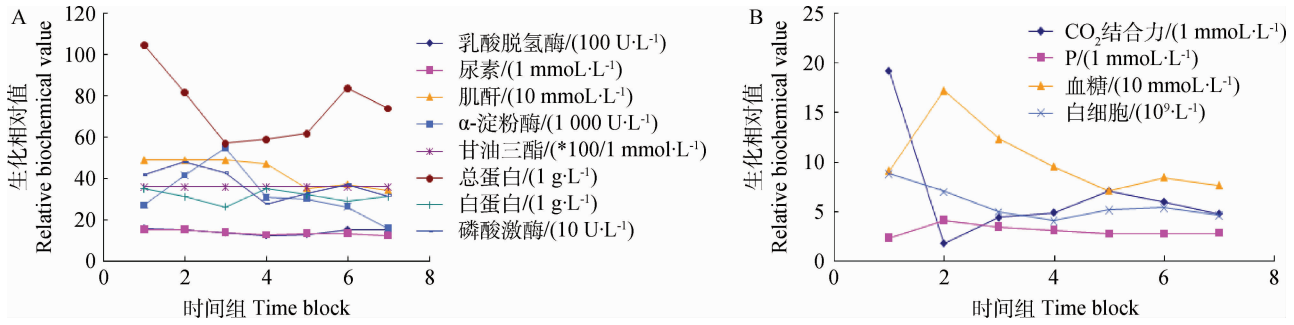
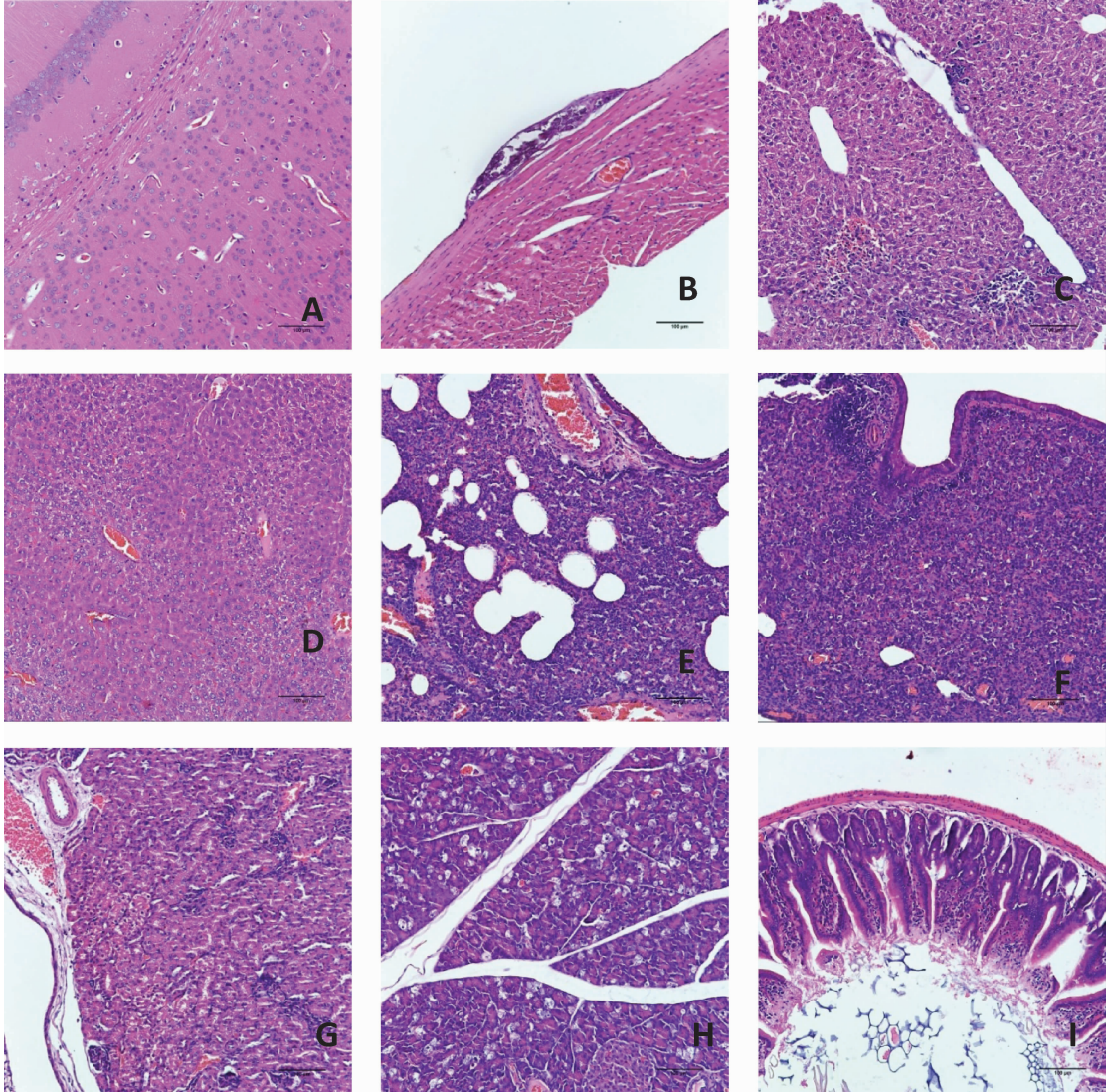


图 2 感染后小鼠血液部分生化指标

Fig. 2 The results of blood biochemical indicators in experimental BALB/c mice infected with *Shigella boydii* from yak



A. 大脑毛细血管扩张; B. 心外膜内侧细胞坏死与炎症增生浸润病灶; C、D. 肝细胞出现凝固性坏死, 巨噬细胞和淋巴细胞浸润病灶; E. 肺泡壁细胞增多, 肺泡壁增宽, 肺泡腔狭窄或消失; F. 支气管旁有灶性或散在的巨噬细胞与淋巴细胞等炎症细胞浸润, 肺泡腔多已狭窄或消失; G. 肾小管上皮细胞空泡变性; H. 胰腺上皮细胞细胞质溶解; I. 小肠绒毛顶端凝固性坏死

A. Encephalon congested; B. Necrosis and inflammatory cells infiltration in cardiac muscle; C、D. Coagulative necrosis and granulomas including macrophages and lymphocytes, and vacuolar degeneration in liver; E. Increase of alveolar epithelial cells, alveolar wall broaden, and the stenosis of alveolar space; F. Infiltrated with inflammatory cells nearby bronchi; G. Vacuolar degeneration in renal tubular epithelial cells; H. The epithelial cell cytoplasm of the pancreas dissolved; I. Coagulative necrosis on the top of the intestinal villi

图 3 牦牛源鲍氏志贺菌人工感染 BALB/c 小鼠后主要脏器组织病理变化 (200×, HE 染色)

Fig. 3 Histopathologic changes of BALB/c mice experimentally infected with *Shigella boydii* from yak (200×, HE staining)

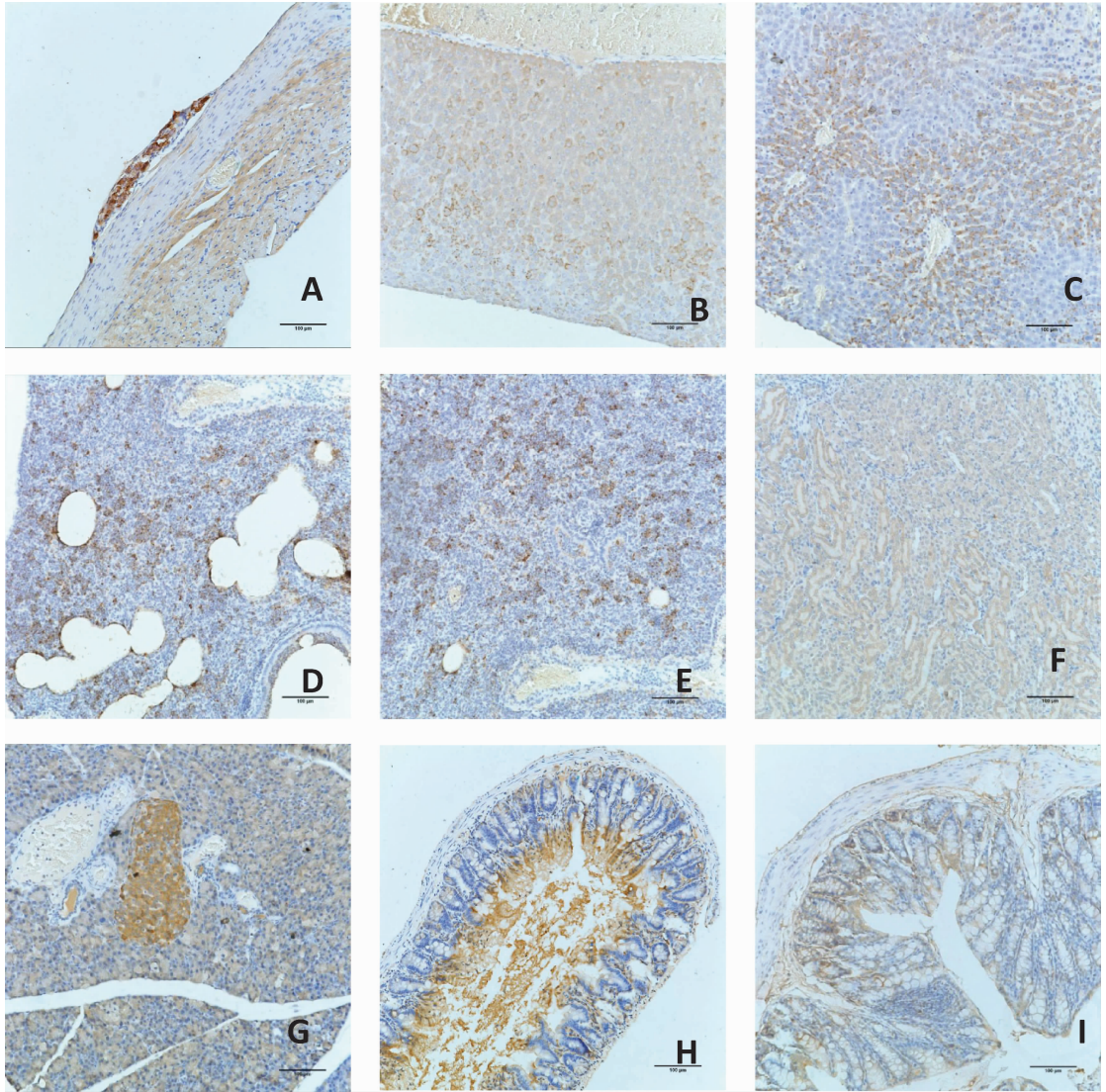


管旁有灶性或散在的巨噬细胞与淋巴细胞等炎症细胞浸润;肾组织切片可见感染组小鼠肾间质均充血,6、18 h 可见肾小管上皮细胞肿胀,细胞质内出现小空泡;胰组织切片 42、54 h 可见胰腺上皮细胞肿胀,浆细胞质溶解,遗留少量丝网状红染物,细胞核固缩或已碎裂、溶解;小肠组织切片于 2、66 h 可见小肠绒毛顶端凝固性坏死,组织细胞结构破坏,遗留红染无细胞结构碎片;大脑组织切片可见感染小鼠均出现脑膜充血。

## 2.4 免疫组织化学检查

免疫组化染色见鲍氏志贺菌感染小鼠的心、肝、

肺、肾、小肠、大肠、胰腺共 7 个器官组织细胞的细胞质出现黄色阳性颗粒。鲍氏志贺菌抗原最早于感染后 6 h 的小鼠心、肝、肺、肾、小肠、大肠、胰岛等脏器组织细胞质中检出。除小肠上皮细胞、大肠上皮细胞、胰岛细胞随感染时间的延长表达量有所降低外,其余组织器官的细菌抗原检出量随感染时间的持续进一步增多。各组织中的细菌抗原含量以肺和胰岛最高,其余组织器官次之。各组织器官的免疫组化结果见图 4,图 5。



A. 心外膜下出现阳性反应;B、C. 肝小叶中央静脉周围呈阳性反应;D、E. 肺泡壁增厚,肺泡壁细胞出现阳性反应;F. 肾小管上皮细胞阳性反应;G. 胰岛细胞强阳性反应;H. 小肠肠上皮细胞阳性反应;I. 大肠肠腺上皮细胞阳性反应  
A. Antigens locating under the epicardium in the heart tissue;B,C. Antigens locating around the Lobular central vein in the liver tissue;D,E. Antigens locating in the alveolar wall cells;F. Antigens locating in the renal tubular epithelial cells;G. Antigens locating in the islet cells;H. Antigens locating in the small intestinal epithelial cells;I. Antigens locating in the intestinum crassum epithelial cells

图 4 牦牛源鲍氏志贺菌人工感染 BALB/c 小鼠后免疫组化染色示细菌在主要脏器中的动态分布(200×) IHC  
Fig. 4 Positive signals detected in 9 tissues stained with immunohistochemistry (200×)

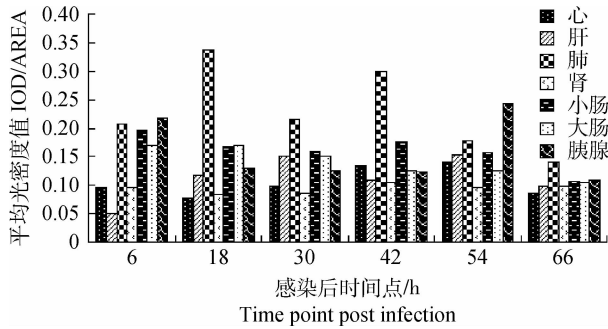


图5 免疫组化检测鲍氏志贺菌感染小鼠各时间点各脏器中平均光密度值(IOD/AREA)动态变化

Fig. 5 Average IOD (IOD/AREA) of immunohistochemical stained *Shigella boydii* in different organs at different time point PI

### 3 讨论

#### 3.1 分离株致病特性

肠道致病菌是导致发展中国家婴儿和五岁以下儿童、年长和免疫功能不全人群发病、死亡的主要原因<sup>[9]</sup>。人和灵长类是志贺菌的适宜宿主,根据宿主的健康状况和年龄,只需10个细菌细胞就可致病,其强致病性使其成为重要的食源性肠道致病菌<sup>[10]</sup>。本文中的分离株分离自高海拔川西北草地外表健康牦牛体内。志贺菌血清型和种的确定对于疾病的预防和治疗极为重要,而福氏志贺菌被认为是亚洲地区的优势血清型<sup>[11]</sup>,高原生态环境特殊,病原微生物交流有限,通常认为病原菌血清型较为单一。但本次牦牛源鲍氏志贺菌的分离和其致病性试验,提示在高原地区人畜志贺菌病的防治过程中,混合血清型的交互影响增强病原菌对宿主的致病性现象不容忽视。在高原人畜志贺菌病的防治中不能仅仅是按照单一的优势血清型进行。

作为典型的肠道致病菌,对肠道的致病性研究是重点,目前针对志贺菌感染肠道的免疫应答、致病作用、致病机制以及相应分子生物学研究较为成熟,常采用恒河猴、小鼠、大鼠等实验动物或肠上皮细胞培养等离体试验观察<sup>[12-13]</sup>。本次试验在此基础上同时也关注分离株在实验动物体内多个脏器的动态分布和致病损伤。在本次试验中,细菌抗原广泛分布于除脑组织以外的各个脏器中。细菌抗原在6h的心、肝、肺等组织中被检出,通过免疫酶组织化学染色观察,细菌抗原不仅存在于组织病灶位置的细胞质内,同时也广泛存在于心肌细胞细胞质、肝细胞细胞质、肾小管上皮细胞和肠上皮细胞。这一结果证实了鲍氏志贺菌是一种胞内致病菌,与师润等<sup>[5]</sup>利

用免疫组化方法定位细菌于肠上皮细胞的报道相符。在病理切片上观察到的心外膜下坏死和炎症细胞增生浸润病灶、肝凝固性坏死灶、肺泡内炎性细胞浸润、胰腺上皮细胞核固缩等病变现象更说明本分离株是一株广泛侵嗜性致病菌,提示在志贺菌病症的治疗中也应考虑其对多个脏器的影响。为后续相关志贺菌研究奠定基础。

#### 3.2 致病机制

志贺菌致病的关键是侵蚀和定殖肠上皮细胞。通过利用滤泡相关上皮中的M细胞通过肠道上皮壁屏障,随后进入肠道基底组织,从基底外膜表面侵入肠上皮细胞。在滤泡相关上皮细胞下的圆形淋巴组织区域被巨噬细胞等炎性细胞所吞噬。细菌被吞噬后会启动巨噬细胞的细胞凋亡模式致使细胞死亡。被感染的巨噬细胞在死亡之前会释放促炎性细胞因子白介素IL-1 $\beta$ 和IL-18通过IpaB侵袭素激活细胞蛋白凋亡酶-1。这些细胞因子联合如IL-8之类的趋化因子,扩充了中性粒细胞数,侵入感染位点,使上皮细胞的防御壁垒更为薄弱。其直接结果是摧毁了肠上皮细胞的防御屏障,使更多的细菌进入到上皮下的空间,入侵肠上皮细胞,最终遍布所有肠上皮细胞<sup>[14-15]</sup>。结合实验动物血清多个生化指标检测结果,证实细菌在肠道的分布过程中侵入血管,随血液移行至体内多个脏器。其中,在肝、心这两个血液流量较大的器官集中发挥其免疫损伤作用。生化指标的检测表现一定的特征性,为疾病诊断提供参考。以肝组织病变为例,细菌透过血管壁进入肝细胞,干扰细胞内粗面内质网的作用以影响肝细胞蛋白质的合成作用。肝细胞在外因素干扰作用下发生的细胞凋亡和细胞坏死可分别在数小时和数天内表现<sup>[16]</sup>,与本试验中肝细胞坏死灶首先出现时间54h大致相符。肝细胞损伤或坏死后,向血液中释入大量LDH,致使血中LDH值升高<sup>[17]</sup>,如本试验中随着时间的延长,LDH总体增高趋势持续。肝出现病理损伤,在日常诊断中仅能依靠相关血液生化指标改变进行判定。类似的生化指标与病理损伤对应呈现同样出现在肺和CO<sub>2</sub>结合力、胰腺和血糖等。将生化指标、病理损伤和致病机制联系在一起,对相应生化指标的持续性监控,一方面可对脏器损伤程度进行预测,另一方面可对疾病诊断提供参考,同时引出人志贺菌病诊断试剂盒研究新选项。

### 4 结论

牦牛源鲍氏志贺菌分离株能在小鼠体内产生快

速致病性损伤,导致除肠道、肺等已知脏器以外脏器(如心、胰腺、肾)的病变。通过免疫组化染色检测,细菌抗原不仅存在于组织病灶位置的细胞质内,同时也广泛存在于心肌细胞细胞质、肝细胞细胞质、肾小管上皮细胞和肠上皮细胞。对应脏器生化指标的改变提示可作为志贺菌病程诊断的重要依据。

### 参考文献(References):

- [1] 马凯,李宝明,白羽,等.基于免疫磁分离的三重荧光定量 PCR 检测食品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌[J].微生物学通报,2014,41(11):2369-2377.
- MA K,LI B M,BAI Y,et al. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in food using a multiplex RT-PCR assay based on immunomagnetic separation[J]. *Microbiology China*,2014,41(11):2369-2377. (in Chinese)
- [2] NI X M,WEI X T,JIANG Y H. Colloidal gold strip-NASBA technique for rapid detection of *Shigella*[J]. *International Journal of Technology Management*,2014(9):121-123.
- [3] 陈君石.食源性疾病成为我国头号食品安全问题[J].中国科技信息,2012(9):7.
- CHEN J S. Foodborne diseases have become the first food safety problem in China[J]. *China Science and Technology Information*,2012(9):7. (in Chinese)
- [4] 许兰菊,藏为民,康相涛,等.鸡志贺菌病的病原鉴定[J].畜牧兽医学报,2004,35(4):420-423.
- XU L J,ZANG W M,KANG X T,et al. pathogen identification of Shigellosis of flock[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*,2004,35(4):420-423. (in Chinese)
- [5] 师润,刘红英,陈陆,等.人源福氏志贺菌对鸡肠上皮原代细胞侵袭特性研究[J].畜牧兽医学报,2013,44(1):95-101.
- SHI R,LIU H Y,CHEN L,et al. Invasive characteristics of human source *S. flexneri* on chicken intestinal epithelial cells[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*,2013,44(1):95-101. (in Chinese)
- [6] VAN DE VERG L L,MALLET C P,COLLINS H H,et al. Antibody and cytokine responses in a mouse pulmonary model of *Shigella flexneri* serotype 2a infection[J]. *Infect Immun*,1995,63(5):1947-1954.
- [7] ISLAM M M,AZAD A K,BARDHAN P K,et al. Pathology of shigellosis and its complications[J]. *Histopathology*,1994,24(1):65-71.
- [8] 冉丹丹,于学辉,汤承,等.牦牛源鲍氏志贺菌的鉴定及对 BALB/c 小鼠的致病性[J].畜牧兽医学报,2013,44(1):145-151.
- RAN D D,YU X H,TANG C,et al. Identification of *Shigella boydii* in yak and its pathogenicity to BALB/c mice[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*,2013,44(1):145-151. (in Chinese)
- [9] RATH S,PADHY R N. Antibacterial efficacy of five medicinal plants against multidrug-resistant enteropathogenic bacteria infecting under-5 hospitalized children[J]. *J Integr Med*,2015,13(1):45-57.
- [10] 李丹丹,徐义刚,王绥家,等.动物源性食品中志贺氏菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J].东北农业大学学报,2014,45(8):98-102.
- LI D D,XU Y G,WANG S J,et al. Development of a dual real-time PCR for the rapid detection of *Shigella* in animal-originated food[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*,2014,45(8):98-102. (in Chinese)
- [11] 陈伟蛟,张成龙,王欢,等.腹泻病原菌属及耐药性的 10 年变化趋势[J].临床检验杂志(电子版),2012,1(2):82-86.
- WEN W J,ZHANG C L,WANG H,et al. The tendency of distribution and antimicrobial resistant of diarrhoea bacteria group during 10 years[J]. *Clinical Laboratory Journal (Electronic Edition)*,2012,1(2):82-86. (in Chinese)
- [12] ATHMAN R,FERNANDEZ M I,GOUNON P,et al. *Shigella flexneri* infection is dependent on villin in the mouse intestine and in primary cultures of intestinal epithelial cells[J]. *Cell Microbiol*,2005,7(8):1109-1116.
- [13] RENÉ K,VIDAL P K E,CHRISTINE F M,et al. *Shigella dysenteriae* type1-induced diarrhea in rats[J]. *Jpn J Infect Dis*,2005,58:335-337.
- [14] FERNANDEZ M I,THUIZAT A,PEDRON T,et al. A newborn mouse model for the study of intestinal pathogenesis of shigellosis[J]. *Cell Microbiol*,2003,5(7):481-491.
- [15] SANSONETTI P J,PHALIPON A,ARONDEL J,et al. Caspase-1 activation of IL-1 $\beta$  and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation[J]. *Immunity*,2000,12(5):581-590.
- [16] KANDUC D,MITTELMAN A,SERPICO R,et al. Cell death:Apoptosis versus necrosis(review)[J]. *Int J Oncol*,2002,21(1):165-170.
- [17] SUMMERMATTER S,SANTOS G,PÉREZ-SCHINDLER J,et al. Skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor  $\alpha$ -dependent activation of LDH B and repression of LDH A[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2013,110(21):8738-8743.