

异烟肼耐药结核分枝杆菌感染人源巨噬细胞的蛋白质组学研究*

刘丽蓉¹⁾ 乐 军^{1,2)} 王洪海¹⁾**

(¹⁾ 复旦大学生命科学学院, 遗传学研究所, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433; ²⁾ 上海市肺科医院, 上海 200433)

摘要 利用双向电泳技术, 对人源巨噬细胞 U937 感染异烟肼耐药结核分枝杆菌前后的全细胞蛋白表达图谱进行差异比较和分析, 发现其中产生差异的有 32 个蛋白质斑点, 利用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱技术, 对其中 5 个表达明显上调的蛋白质斑点进行分析鉴定, 获得 5 个明确的肽质量指纹图谱, 通过在数据库中进行检索分析, 确定这 5 个蛋白质分别为热休克蛋白 105_B、凋亡抑制蛋白-1、磷酸甘油酸变位酶 1、组织蛋白酶 B、桥粒胶蛋白 3。上述发现有助于了解耐药结核分枝杆菌入侵早期导致的巨噬细胞蛋白质组表达变化, 为深入研究耐药结核分枝杆菌-宿主相互作用提供了探索方向。

关键词 巨噬细胞 U937, 耐药, 结核分枝杆菌, 异烟肼, 蛋白质组, 差异表达

学科分类号 Q51

结核病仍然是目前严重威胁人类健康的传染病之一。结核病的致病菌——结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 是典型的胞内致病菌, 主要在人巨噬细胞等宿主免疫系统的细胞内存活和繁殖, MTB 感染的后果与巨噬细胞初期的应答反应有密切的关系。近年来, 随着 MTB 的耐药菌株的发生和蔓延, 对耐药 MTB-宿主相互作用的研究又成为该领域的重点和难点^[1]。研究耐药 MTB 和巨噬细胞间感染初期的相互作用, 有利于宿主的抗感染机理的研究, 有助于新药的开发和设计, 为感染性疾病的防治提供基础^[2]。本研究利用双向电泳技术 (2-DE) 结合基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF-MS), 直接从差异表达的蛋白质来探讨耐药 MTB-宿主相互作用的机理, 弥补了从基因水平研究差异蛋白表达时会忽略的一些重要因素, 例如 mRNA 的剪切、修饰, 蛋白质的糖基化、磷酸化和翻译调控等的影响, 从蛋白质组学的水平, 探索了一条研究新路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养: 异烟肼耐药 MTB 由上海市肺科医院检验科分枝杆菌检验室提供。细菌在 Middlebrook 7H9 (Difco) 添加 OADC (0.5% 牛血清白蛋白, 0.2% 葡萄糖, 0.06% 油酸甘油酯, 140 mmol/L NaCl) 的液体培养基中 37℃ 培养。

200 ml Middlebrook 7H9 培养基内接种总数为 2×10^8 的耐药结核分枝杆菌, 37℃ 培养 6 ~ 8 天, 至细菌密度为 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 或吸光值 A_{600} 为 0.8 ~ 1 之间后, 4 000 r/min, 4℃ 离心 15 min 沉淀细菌, 用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤沉淀细菌 2 次, 加入 RPMI Meddium 1640 细胞液体培养基, 超声破碎处理 2 min, 重复 3 次, 去除菌块, 血球计数板记细菌数, 以确保实验中每次细胞感染的细菌数量相同。

1.1.2 细胞株和培养: 人源巨噬细胞 U937 (ATCC CRL1593) 由复旦大学上海医学院闻玉梅院士赠送。细胞在含有 10% 小牛血清, 100 U/ml 青霉素的 RPMI-1640 细胞液体培养基中 37℃ 培养, 培养箱中 CO₂ 的浓度为 5%。培养约 48 h, 细胞达到对数生长期。

1.1.3 主要仪器: PROTEAN IEF Cell 等电聚焦电泳仪, PROTEAN II Xi Cell 垂直板电泳仪, Molecular Image Fx 凝胶图像扫描仪, PDQuest 6.0 图像分析软件, 均为美国 Bio-Rad 公司产品。U-3000 分光光度计为 HITACHI 公司产品, 质谱分析

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (2002CB512804) 和上海市基础研究项目 (02DJ14002)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-65643777, Fax: 021-65648376

E-mail: hhwang@fudan.edu.cn

收稿日期: 2003-10-08, 接受日期: 2003-12-09

系统为美国 Applied Biosystems 公司的 Voyager System 6192 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF-MS)。

1.2 方法

1.2.1 细菌感染巨噬细胞: 感染实验时, 按照巨噬细胞: 细菌 = $10^7:10^8$ 的比例混合, 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 24 h. 对照为未感染细菌的巨噬细胞^[3].

1.2.2 细胞蛋白样品的制备: 感染及未感染耐药 MTB 的巨噬细胞以 2 000 r/min 离心 10 min, 分别收集, 去上清, 用 PBS 吹打洗涤, 重复 3 次. 按每 4×10^6 个细胞加入 400 μl 裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 40 mmol/L DTT, 5 g/L Bio-Lyte, 0.001% 溴酚蓝), 反复吹打至黏度降低. 超声破碎细胞 1 min, 振幅 70%, 超声 1 s, 停止 1 s. 以 14 000 r/min, 4°C , 25 min, 离心去沉淀^[4]. Bradford 法测细胞蛋白质浓度^[5].

1.2.3 双向凝胶电泳: 第一向——固相 pH 梯度等电聚焦凝胶电泳, 采用低电压胶内泡胀法. 将 20 μl 细胞蛋白样品与 380 μl 上样缓冲液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 2 g/L Bio-Lyte, 0.001% 溴酚蓝) 混合, 加入样品水化盘中, 放入 17 cm, pH 4~7 的 IPG 胶条, 加盖 1~2 ml 石蜡油. 水化和等电聚焦按设置的程序进行, 即水化 50 V 12 h, 除盐 250 V 30 min、1 000 V 1 h, 聚焦 8 000 V 5 h、8 000 V, 80 000 Vh. 等电聚焦后的 IPG 胶条在平衡缓冲液 (6 mol/L 尿素, 2% SDS, 1.5 mol/L Tris-HCl pH 8.8, 20% 甘油) 中平衡 30 min, 转移至 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶的上端. 第二向——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 以每一胶条 10 mA 恒流电泳 30 min, 再加大电流至 30 mA 直至溴酚蓝达到胶的底线. 按照文献 [6] 方法进行高灵敏度的银氨染色.

1.2.4 凝胶图像的分析: 凝胶用 Molecular Image Fx 激光图像扫描仪扫描, 选择未感染细菌的巨噬细胞全蛋白凝胶图像作为参考胶, 感染了异烟肼耐药 MTB 的巨噬细胞全蛋白凝胶图像与之进行配比, 配比分析采用 PDQuest 6.0 软件完成.

1.2.5 MALDI-TOF-MS 肽指纹图谱分析: 重点筛选异烟肼耐药 MTB 感染后的巨噬细胞全蛋白质组中新出现的蛋白质斑点, 切下放入样品管中, 用 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液配制的 50% 乙腈溶液 100 μl 脱色, 真空冷冻干燥后加入 0.01 g/L 胰蛋白酶 10 μl , 4°C 放置 30 min, 37°C 保温 18 h, 再加入 5% 三氟乙酸溶液 100 μl , 40°C 作用 1 h, 吸出上清, 加 2.5% 三氟乙酸溶液和 50% 乙腈溶液各 100 μl , 30°C 保温 1 h, 吸出上清, 合并两次上清, 冷冻干燥. 用 10 μl 0.5% 三氟乙酸溶液冷冻干燥肽段, 取 1 μl 做 MALDI-TOF-MS 肽指纹图谱分析.

1.2.6 蛋白质序列数据库检索: 根据 MALDI-TOF-MS 肽指纹图谱搜索 NCBI 的冗余数据库 (redundant database). 搜索限定条件为人源巨噬细胞, 蛋白质分子质量范围 10~100 ku, 等电点 pI 值为 4~7, 胰蛋白酶消化.

2 结果

2.1 感染后的细胞全蛋白 2-DE 图谱产生差异

与对照 (未感染的巨噬细胞全蛋白 2-DE 图谱) 比较, 用 PDQuest 软件对两张 2-DE 图谱进行比对分析^[7], 发现未感染的巨噬细胞表达 793 个蛋白质斑点, 异烟肼耐药 MTB 感染后的巨噬细胞表达 644 个蛋白质斑点, 两者差异的斑点为 32 个, 蛋白质分子质量均处于 10~100 ku, pI 值分布于 4~7 之间, 对其中表达明显上调的 5 个蛋白质斑点进行切割, 做肽指纹图谱分析, 见图 1a 和图 1b.

2.2 MALDI-TOF-MS 质谱分析及数据库检索

对 2-DE 凝胶上表达明显上调的 5 个蛋白质斑点进行切割, 用胰蛋白酶消化后, 进行 MALDI-TOF-MS 检测, 得到肽质量指纹图谱, 如图 2~图 6 所示. 通过数据库搜索, 结合 2-DE 图谱上相应蛋白质的分子质量、 pI 值, 确定这 5 个蛋白质分别为: Spot1, 热休克蛋白 105_B (HSP105_B); Spot2, 凋亡抑制蛋白-1 (inhibitor of apoptosis protein-1); Spot3, 磷酸甘油酸变位酶 1 (phosphoglycerate mutase 1); Spot4, 组织蛋白酶 B (cathepsin B); Spot5, 桥粒胶蛋白 3 (desmocollin 3) (表 1).

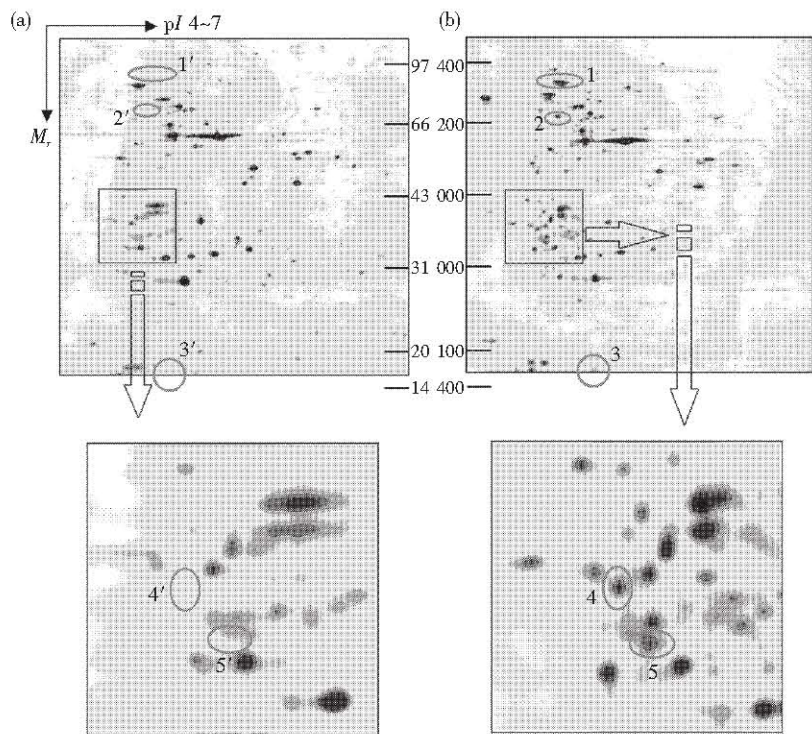


Fig.1 Two dimensional electrophoretic (2-DE) maps of U937 cells uninfected (a) and infected with INH resistant *M. tuberculosis* strains (b)

Five protein spots which remarkably increased in U937 infected with MTB INH-resistant strains were identified as: Spot 1, HSP105 β ; Spot 2, inhibitor of apoptosis protein-1; Spot 3, phosphoglycerate mutase 1; Spot 4, cathepsin B; Spot 5, desmocollin
3.1', 2', 3', 4', 5'are the corresponding area with Spot 1, Spot 2, Spot 3, Spot 4, Spot 5 respectively.

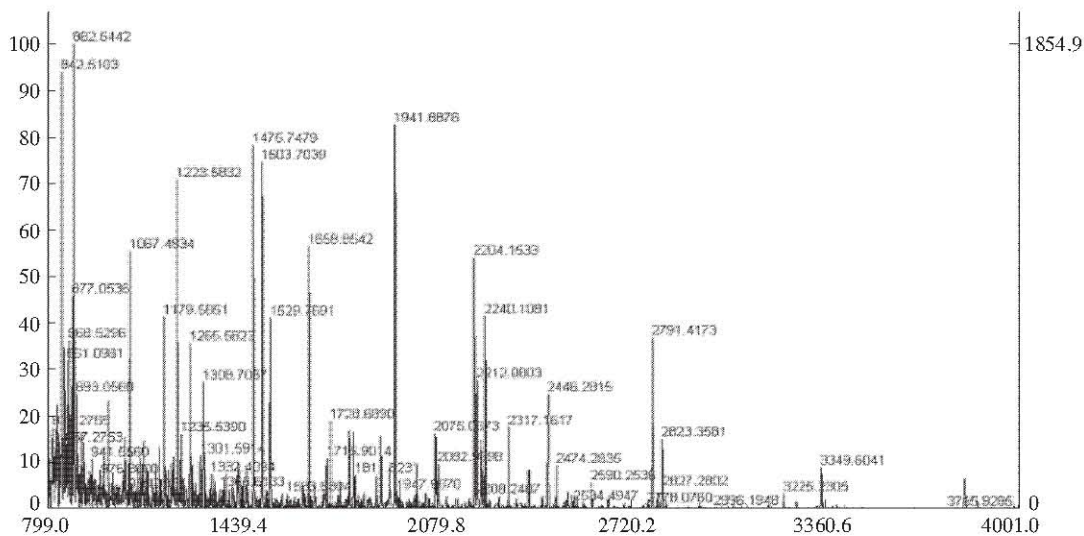


Fig.2 Peptide mass fingerprinting of HSP105 β (Spot 1)

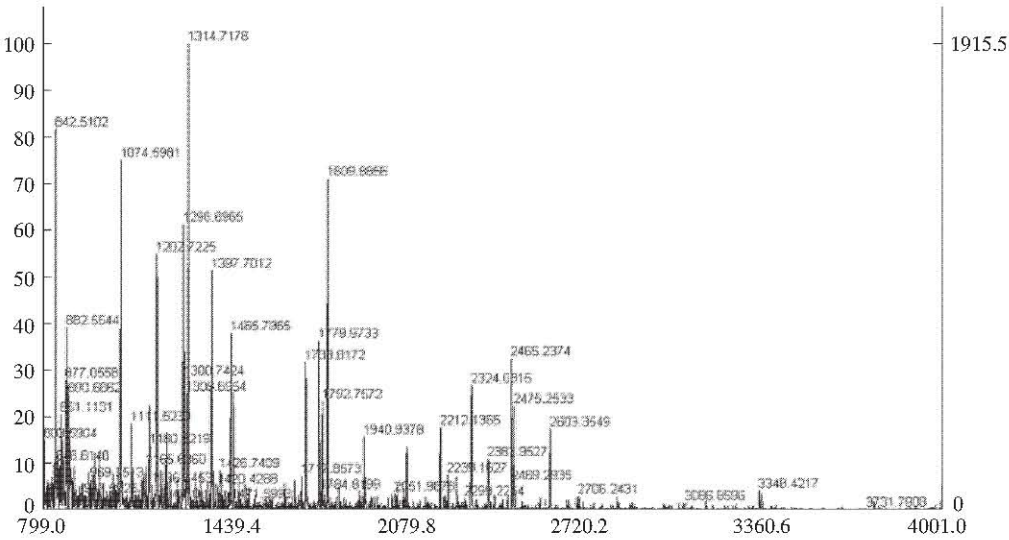


Fig. 3 Peptide mass fingerprinting of IAP-1 (Spot 2)

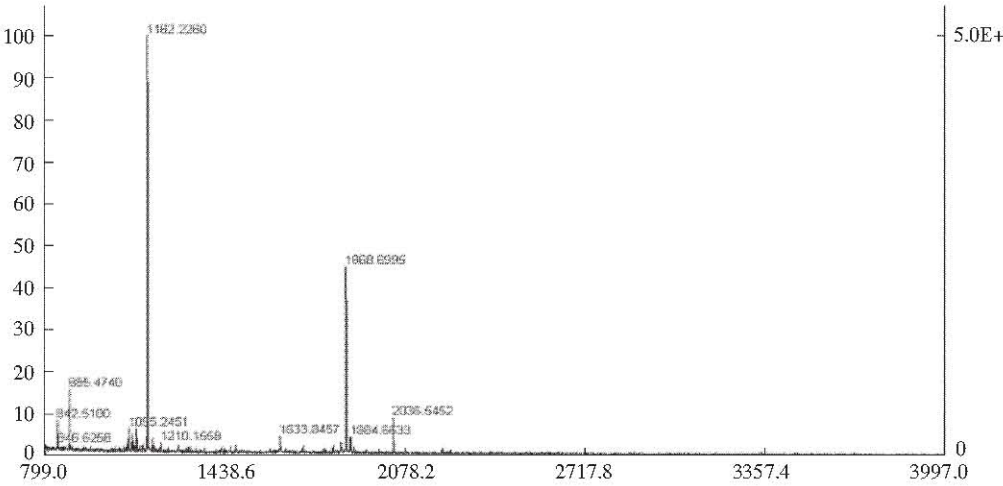


Fig. 4 Peptide mass fingerprinting of phosphoglycerate mutase 1 (Spot 3)

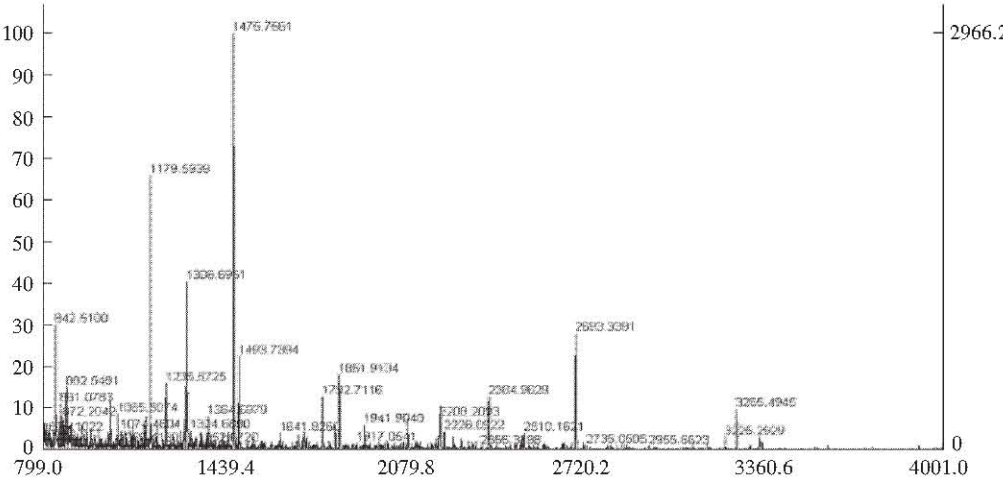


Fig. 5 Peptide mass fingerprinting of cathepsin B (Spot 4)

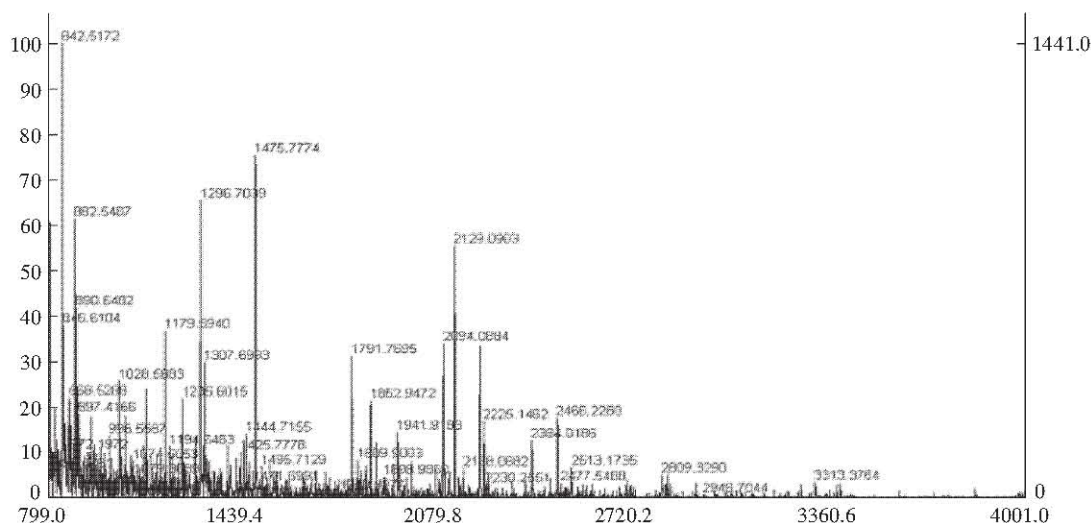


Fig. 6 Peptide mass fingerprinting of desmocollin 3 (Spot 5)

Table 1 Differentially expressed U937 proteins between normal and MTB INH-resistant strains infected, isolated and identified by 2-DE and MALDI -TOF-MS analysis

Spot No.	Protein name	M_r	pI	Intensity matched/%
1	HSP105 _β	92 116	5.4	52
2	inhibitor of apoptosis protein-1	68 421	5.7	59
3	phosphoglycerate mutase 1	17 200	4.8	83
4	cathepsin B	37 778	5.9	44
5	desmocollin 3	34 688	6.3	39

3 讨 论

细菌感染宿主细胞,在与宿主细胞相互作用的过程中,造成宿主细胞内部的多种改变,包括 RNA 表达调节、靶受体诱导、肌动蛋白骨架重排、信号传导途径的激活和吞噬泡的运输等^[8]. 认识细菌感染初期,宿主细胞蛋白表达的改变有助于新药的设计并鉴定药物靶位作用的特异途径. 蛋白质组学的研究,恰好提供了这样一个高效的分析全局性蛋白质表达变化的策略. 本研究运用蛋白质组学的技术,解码出了 5 个与异烟肼耐药结核分枝杆菌感染人源巨噬细胞相关的重要蛋白质.

Spot 1: 热休克蛋白 (HSP) 又称应激蛋白, 在体内具有分子伴侣 (chaperones) 的活性, 帮助蛋白质折叠成正确构象或参与基因修饰。当细菌感染细胞时, 细胞受到胁迫, 胞内的蛋白质发生部分变性, HSP 诱导表达, HSP 通过识别暴露于变性蛋白表面的疏水性区域, 参与变性蛋白的重新折叠、转位和装配, 对无法恢复的变性蛋白将其转移给蛋

白质降解系统,使之降解,避免细胞进一步受到损害,因此保证了细胞的生命功能. HSP 在体内的作用为: a. 提高细胞的应激能力,特别是热耐受能力; b. 调节 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性; c. 促进细胞内糖原异生和糖原生成,使细胞内糖原储量增加,从而提高适应能力; d. 热、乙醇、亚砷酸钠的预处理不仅能使某些细胞产生热耐受,还能使细胞对阿霉素(adriamycin)的耐受性提高,提示 HSP 可以提高对各种损伤的抵抗能力; e. 抑制凋亡,例如 HSP27 可以通过与细胞色素 c 相互作用,抑制 U937 细胞中依赖于细胞色素 c 的 caspase-2, caspase-3、caspase-8、caspase-9 的活性,从而抑制细胞凋亡, HSP70 可以通过直接与 AIF (apoptosis-inducing factor) 相互作用,抑制细胞凋亡^[9,10]. HSP105_β 是哺乳动物中主要的 HSP 之一,属于 HSP105/110 家族. HSP105 有可能影响与 SOS 应急系统有关的蛋白质折叠或基因修饰^[11]. 最新报道称,在神经细胞中, HSP105 抑制神经细胞凋亡的作用,并阻止热休克产生的蛋白质聚集^[12].

Spot 2: 凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 是活性 caspases 的天然抑制物. IAP 的定义为包含 baculovirus IAP repeat (BIR) 的一组抑制细胞凋亡的蛋白质. BIR 包括 70 个氨基酸的锌指结构, 但并非所有包含 BIR 的蛋白质都是 IAP, BIR 对于 IAP 的抗凋亡作用是很重要的, 还有一些 IAP 除了 BIR 结构, 还包含另外的锌指结构, 称为 RING 区域. 在应激状态和生长因子的诱导下均可使大量的 IAP 表达. IAP 的大量表达, 可以达到抑制细胞凋亡的作用, 抑制凋亡的作用是通过 IAP 直接或间接地与 caspases 相互作用来实现的. IAP-1 是哺乳动物 IAP 家族之一, 通过直接与 caspase 相互作用, 抑制 caspase-3、caspase-7、caspase-9 的活性, 从而抑制细胞凋亡^[13,14].

Spot 4: 组织蛋白酶 B (cathepsin B, Cat B) 是人的溶酶体半胱氨酸蛋白酶家族成员之一. 这一家族的蛋白质广泛存在于细胞的内涵体和溶酶体成分中. 传统观点认为这一族管家蛋白是专门用于处理细胞产生的废物, 末端水解异常的、不需要的蛋白质. 但最近的研究表明, 组织蛋白酶在肺部疾病的病理学方面扮演重要角色^[15]. 组织蛋白酶调控病理生理学过程中的细胞内外基质的重建、免疫应答, 其中组织蛋白酶 B 更是与细胞基质重建及细胞凋亡相关^[16,17]. 推测细菌入侵宿主细胞后, 破坏了宿主细胞内外的基质, 而组织蛋白酶 B 参与修复重建基质, 并未末端水解一些细胞在受到胁迫的应激状态下产生的异常蛋白质, 使细胞存活, 抑制细胞凋亡. 其中更精确的机理, 还有待进一步研究.

通过以上三种差异蛋白的分析可以看出, 他们均具有抑制细胞凋亡的作用. 我们知道, MTB 入侵人体免疫系统之初, 首先遇到的是人体免疫系统巨噬细胞的抵御, 而 MTB 采取的策略并不是杀死巨噬细胞, 而是采取潜伏在巨噬细胞中, 与巨噬细胞长期共存的策略, MTB 在人体的潜伏期可达数十年之久. 以上结果提示, MTB 入侵人体巨噬细胞后, 可能采取了抑制细胞凋亡的手段, 来达到长期潜伏, 并与宿主长期共存的目的.

Spot 5: 桥粒胶蛋白 (desmocollin, Dsc) 是细胞之间的粘着斑, 即桥粒 (desmosomes) 的组成部分, 桥粒是相邻细胞之间连接的部位^[18]. 推测 MTB 入侵人体巨噬细胞后, 桥粒胶蛋白表达量上升, 相邻细胞之间的粘附增加, 细胞聚集, 这样就一定程度上抑制了更多细菌的侵入. 这样的推测,

也是和倒置显微镜下观察到的 MTB 感染 U937 之初, 原本分散的 U937 产生了聚集现象相一致的.

Spot 3: 磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase) 参与糖酵解反应. 在糖酵解反应的第二阶段, 在磷酸甘油变位酶的催化下, 3-磷酸甘油酸 C3 位上的磷酸基转移到 C2 位上, 生成 2-磷酸甘油酸, 反应可逆. 糖酵解是生物界普遍存在的供能途径, 但释放能量不多, 一般生理情况下, 有足够的氧气供氧化之需, 很少进行糖酵解. 在某些情况下, 如剧烈运动, 糖酵解有重要生理意义, 在某些病理情况下, 如严重贫血、呼吸障碍、肿瘤组织, 也需要糖酵解供能. 另外, 磷酸戊糖途径也可以经由非氧化阶段进入糖酵解. 磷酸戊糖途径是葡萄糖在体内生成 5-磷酸核糖的唯一途径, 5-磷酸核糖是合成核苷酸辅酶及核酸的主要原料, 故损伤后修复时此代谢活跃. 磷酸戊糖途径可以产生 NADPH^+ , NADPH^+ 参与体内噬中性粒细胞和巨噬细胞产生离子态氧的反应, 因而有杀菌作用^[19,20]. 由此推测, MTB 入侵人体巨噬细胞后, 体内的糖酵解途径、磷酸戊糖途径比较活跃, 这样有利于在应激状态下供能, 组织损伤修复和杀灭 MTB.

致谢 感谢复旦大学上海医学院闻玉梅院士提供 U937 细胞株及实验指导.

参 考 文 献

- 1 谢建平, 李 瑶, 乐 军, 等. 结核分枝杆菌入侵诱导的人巨噬细胞全局性基因表达变化. 中国科学 (C 辑), 2003, **33** (3): 231 ~ 239
XIE J P, LI Y, YUE J, *et al.* Science in China (Series C), 2003, **33** (3): 231 ~ 239
- 2 Monahan I M, Betts J, Banerjee D K, *et al.* Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. Microbiology, 2001, **147** (2): 459 ~ 471
- 3 Ragno S, Romano M, Howell S, *et al.* Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. Immunology, 2001, **104** (1): 99 ~ 108
- 4 Emmert-Buck M R, Gillespie J W, Pawletz C P, *et al.* An approach to proteomic analysis of human tumors. Molecular Carcinogenesis, 2000, **27** (3): 158 ~ 165
- 5 Kruger N J. The Bradford method for Protein quantitation. Methods Mol Biol, 1994, **32** (1): 9 ~ 15
- 6 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 2001. 142 ~ 144
GUO Y J. Experimental Technique in Protein Electrophoresis. Beijing: Science Press, 2001. 142 ~ 144
- 7 贾宇峰, 林秋霞, 郭尧君, 等. 蛋白质双向电泳图像分析. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28** (2): 246 ~ 250
JIA Y F, LIN Q-X, GUO Y-J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2001, **28** (2): 246 ~ 250

- 8 Sturgill-Koszycki S, Haddix P L, Russell D G. The interaction between *Mycobacterium* and the macrophage analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 1997, **18** (14): 2558 ~ 2565
- 9 Nau G J, Richmond J F L, Schlesinger A, *et al.* Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Immunology*, 2002, **99** (3): 1503 ~ 1508
- 10 Zugel U, Kaufmann S H E. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, **12** (1): 19 ~ 39
- 11 Perkins E L, Sterling J F, Hashem V I, *et al.* Yeast and human genes that affect the *Escherichia coli* SOS response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (5): 2204 ~ 2209
- 12 Ishihara K, Yamagishi N, Saito Y, *et al.* Hsp105 α suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity. *J Biol Chem*, 2003, **278** (27): 25143 ~ 25150
- 13 LeBlanc A C. Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biological Psychiatry*, 2003, **27** (2): 215 ~ 229
- 14 Holeik M, Lefebvre C A, Hicks K, *et al.* Cloning and characterization of the rat homologues of the inhibitor of apoptosis protein 1, 2, and 3 genes. *BMC Genomics*, 2002, **3** (1): 5 ~ 10
- 15 Wolters P J, Chapman H A. Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respiratory Research*, 2000, **1** (3): 170 ~ 177
- 16 Reddy V Y, Zhang Q Y, Weiss S J. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (9): 3849 ~ 3853
- 17 Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J*, **20** (17): 4629 ~ 4633
- 18 Tselepis C, Chidgey M, North A, *et al.* Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Cell Biology*, 1998, **95** (14): 8064 ~ 8069
- 19 Motshwene P, Brandt W, Lindsey G. Insights into the catalytic mechanism of cofactor-independent phosphoglycerate mutase from X-ray crystallography, simulated dynamics and molecular modeling. *J Mol Biol*, 2003, **328** (4): 909 ~ 920
- 20 Torshin I Y. Functional maps of the junctions between interglobular contacts and active sites in glycolytic enzymes—a comparative analysis of the biochemical and structural data. *Med Sci Monit*, 2002, **8** (4): BR123 ~ 135

Proteome Study of Macrophage Infected with *Mycobacterium tuberculosis* Isoniazid Resistant Strain*

LIU Li-Rong¹⁾, YUE Jun^{1,2)}, WANG Hong-Hai¹⁾**

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China;

²⁾ Shanghai Pulmonary Hospital, Shanghai 200433, China)

Abstract Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was employed to compare the global protein patterns between human macrophage cell line U937 infected and that uninfected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) isoniazid (INH) resistant strains, and 32 protein spots were found to express differentially. Five protein spots which remarkably increased in U937 infected with MTB INH-resistant strains were measured by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The data obtained from peptide mass fingerprinting were used in protein database search. Five protein spots in gel were identified as HSP105 β , inhibitor of apoptosis protein-1, phosphoglycerate mutase 1, cathepsin B, desmocollin 3. These data provide insight into the changed global protein patterns of the U937 while in stasis shortly after infection and may prove useful for further study in the interaction between MTB INH-resistant strains and host.

Key words macrophage U937, resistance, *Mycobacterium tuberculosis*, isoniazid, proteome, differentially express

* This work was supported by The Special Funds for Major State Basic Research of China (2002CB512804) and Shanghai Basic Research (02DJ14002).

** Corresponding author. Tel: 86-21-6564 3777, Fax: 86-21-65648376; E-mail: hhwang@fudan.edu.cn

Received: October 8, 2003 Accepted: December 9, 2003