

耻垢分枝杆菌感染人脐带间充质干细胞模型的建立及其特征

康亚莉^{1,2}, 宁唤唤¹, 谢燕玲^{1,3}, 任瑞¹, 白鹭^{1,3}, 路延之¹, 康健¹, 韦垠^{1,2}, 张琳娜^{*2}, 柏银兰^{*1}

1 空军军医大学基础医学院微生物与病原生物学教研室, 陕西 西安 710032

2 宁夏医科大学基础医学院生理学和神经生物学系, 宁夏 银川 750001

3 延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000

康亚莉, 宁唤唤, 谢燕玲, 任瑞, 白鹭, 路延之, 康健, 韦垠, 张琳娜, 柏银兰. 耻垢分枝杆菌感染人脐带间充质干细胞模型的建立及其特征[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 5031-5044.

KANG Yali, NING Huanhuan, XIE Yanling, REN Rui, BAI Lu, LU Yanzhi, KANG Jian, WEI Yin, ZHANG Linna, BAI Yinlan. Establishment and characterization of a hUCMSC model of *Mycobacterium smegmatis* infection[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 5031-5044.

摘要:【背景】结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)休眠菌形成被认为是潜伏结核感染(latent tuberculosis infection, LTBI)的主要原因,但目前缺乏体内和体外模型进行机制研究。新近研究表明 Mtb 可感染间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)并以休眠状态在细胞中长期存活。然而 Mtb 感染细胞模型存在周期长和生物安全要求高等问题,需要探索可用的 MSC 感染细胞模型用于 Mtb 休眠机制的研究。【目的】建立快速生长型耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, Ms)感染人脐带间充质干细胞(human umbilical cord MSC, hUCMSC)的细胞模型并研究其特征。【方法】取分离好的 hUCMSC, 流式细胞术鉴定其表面标志性抗原; 以 Ms 菌株感染 hUCMSC, DiI 标记细胞膜, 荧光显微镜下观察细胞吞噬作用; 平板法计数 Ms 胞内存活率; 油红 O 染色观察细胞脂滴形成; 鬼笔环肽荧光染色观察细胞骨架变化; 实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR)检测 Ms 感染的 hUCMSC 脂质代谢、静息和分化相关基因转录水平。【结果】Ms 感染 hUCMSC 后在胞内以非复制方式存活, 其感染率与感染复数呈正相关; Ms 感染 hUCMSC 可诱导脂滴合成相关基因表达, 而抑制降解相关基因转录水平, 从而促进细胞内脂滴形成。Ms 感染促进 hUCMSC 细胞骨架发生重构, RT-qPCR 检测结果显示细胞增殖和分化相关基因表达增加, Ms 感染促进 hUCMSC 向成脂、成骨细胞分化。【结论】本研究建立了可模拟 Mtb 休眠形成的 Ms 感染

资助项目: 国家自然科学基金(82272343, 81971560); 国家“十三五”重大传染病专项课题(2018ZX10302302002004); 陕西省重点研发计划(2022ZDLSF01-07)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82272343, 81971560), the National “13th Five Year Plan” Major Infectious Disease Special Project of China (2018ZX10302302002004), and the Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2022ZDLSF01-07).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Linna, zhangln@nxmu.edu.cn; BAI Yinlan, yinlanbai@fmmu.edu.cn

Received: 2023-04-11; Accepted: 2023-07-11; Published online: 2023-08-28

hUCMSC 模型, 可进一步用于 LTBI 机制的相关研究。

关键词: 结核分枝杆菌; 耻垢分枝杆菌; 间充质干细胞; 休眠菌; 结核潜伏感染

Establishment and characterization of a hUCMSC model of *Mycobacterium smegmatis* infection

KANG Yali^{1,2}, NING Huanhuan¹, XIE Yanling^{1,3}, REN Rui¹, BAI Lu^{1,3}, LU Yanzhi¹,
KANG Jian¹, WEI Yin^{1,2}, ZHANG Linna^{*2}, BAI Yinlan^{*1}

1 Department of Microbiology and Pathogen Biology, Basic Medical Science Academy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

2 Department of Physiology and Neurobiology, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, Ningxia, China

3 School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

Abstract: [Background] The formation of dormant *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is considered to be the main cause of latent tuberculosis infection (LTBI), the mechanism of which remains to be studied with *in vivo* and *in vitro* models. Mtb can infect mesenchymal stem cells (MSC) and survive in the cells in a dormant state for a long time. However, the modeling of Mtb-infected cells requires long time and high laboratory biosafety level. Therefore, it is essential to explore the available MSC for modeling Mtb infection and further deciphering the dormancy mechanism of Mtb. [Objective] To establish and characterize the human umbilical cord MSC (hUCMSC) model of *Mycobacterium smegmatis* (Ms) infection. [Methods] After hUCMSC were infected with Ms, flow cytometry was employed to identify the surface antigen. The cell membrane was labeled with DiI and then the phagocytosis of the hUCMSC infected with Ms was observed in a fluorescence microscope. The plate counting method was employed to measure the intracellular survival rate of Ms. The formation of lipid droplets in hUCMSC was observed by oil red O staining. Cytoskeletal changes were observed by fluorescence staining with phalloidin. The transcription levels of the genes involved in the lipid metabolism, resting, and differentiation of the hUCMSC infected with Ms were determined by RT-qPCR. [Results] Ms survived in hUCMSC in a non-replicating state, and the infection rate was positively correlated with the multiplicity of infection. Ms simulated the expression of the genes involved in lipid biosynthesis and inhibited the transcription of the genes involved in lipid degradation to promote the formation of lipid droplets in the Ms-infected hUCMSC. Ms promoted the cytoskeleton remodeling of hUCMSC. The RT-qPCR results showed up-regulated expression of the genes related to proliferation and differentiation, indicating that Ms promoted the differentiation of hUCMSC into lipoblasts and osteoblasts. [Conclusion] We successfully established a hUCMSC model of Ms infection, which could mimic the main characteristics of Mtb dormancy and be used in the study of LTBI mechanism.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium smegmatis*; mesenchymal stem cells; dormant bacteria; latent tuberculosis infection

结核病(tuberculosis, TB)是一种主要由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)感染引起的慢性传染病^[1-2]。人对 Mtb 普遍易感, 超过 90%感染者处于 Mtb 感染而无临床症状的潜伏结核感染(latent tuberculosis infection, LTBI)状态^[3]。约 5%–10%的 LTBI 可转化为活动性 TB, 是成人 TB 的主要来源^[1]。Mtb 在结核性肉芽肿中形成休眠菌, 被认为是形成 LTBI 的主要原因^[2,4-5]。由于缺少 Mtb 休眠菌的体内和体外模型, LTBI 形成和复苏机制仍有待阐明。目前对 Mtb 休眠菌宿主细胞的研究主要为巨噬细胞。研究表明, 巨噬细胞内的 Mtb 仍复制生长且对抗 Mtb 药物敏感^[4-5]。此外, 巨噬细胞寿命短, 巨噬细胞 Mtb 感染模型难以解释 LTBI 持续时间长、复发和药物治疗效果不佳等问题。因此, 寻找和建立 Mtb 休眠菌感染模型有助于 LTBI 相关机制的深入研究。

近年来研究发现, Mtb 可感染间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC), 并以非复制的休眠状态在 MSC 中长期存活^[4,6-9]。从 Mtb 休眠菌动物模型或 TB 患者肉芽肿组织中均可分离出包含 Mtb 休眠菌的 MSC, 将该 MSC 注射至健康小鼠体内可引起活动性 TB^[5,10-12]。MSC 作为干细胞, 它内部低氧、静息和低药物浓度的微环境抑制了 Mtb 在细胞内的繁殖^[13]。此外, Mtb 诱导 MSC 脂滴形成, 从而有利于 Mtb 在细胞中存活^[13]。因此, MSC 被认为是一种新的 Mtb 吞噬和休眠的宿主细胞。

由于 Mtb 生长缓慢, 因而模型制备及检测周期长, 且毒株操作需要的实验室生物安全防护水平高, 使得 Mtb 相关机制包括 LTBI 研究进展缓慢。耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, Ms)是一种非致病性分枝杆菌, 与 Mtb 同属革兰阳性杆菌。Ms 在进化上与 Mtb 关系相近, 染色体排列和 Mtb 非常相似, 并含有与 Mtb 相似的 VII 型分泌系统, 常作为模式菌株用于 Mtb 基因功能、致病机制等感染与相关免疫学研究, 以及抗结核药物的研究

中^[14-17]。在环境胁迫和宿主免疫应答的情况下, 分枝杆菌可进入代谢和转录降低的休眠状态, 对 Ms 和 Mtb 的竞争性研究表明, 复苏后 Ms 和 Mtb 的再激活特性非常相似^[18], 因此, Ms 也被认为是研究分枝杆菌休眠的一种模式菌^[18-20]。本研究建立 Ms 感染 MSC 细胞模型, 对 Ms 在细胞内存活及其感染 MSC 的生理特征进行研究, 以期为该模型用于 LTBI 机制研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和菌株

采集一名足月健康新生儿脐带组织, 分离 hUCMSC, 传代培养至第 5 代用于本试验。本研究经空军军医大学唐都医院医学伦理委员会批准进行(批准号为 202103-138), 由产妇自愿捐赠并签署知情同意书。耻垢分枝杆菌 Ms MC²-155 菌株为本实验室保存, 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的 Ms-GFP 菌株为本实验室前期构建。

1.1.2 主要试剂和仪器

DMEM/F12 培养基, HyClone 公司; 胎牛血清, 杭州四季青生物工程有限公司; AF647-抗人 CD90、PE-A-抗人 CD105、PerCP-抗人 CD73、FITC-抗人 CD271、APC-抗人 CD45, eBioscience 公司; Total RNA Kit I, Omega 公司; HiScript II QRT SuperMix for qPCR 逆转录试剂盒、ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒, 南京诺唯赞生物公司; 油红 O 染色试剂盒, 北京索莱宝科技公司; 鬼笔环肽荧光染料、细胞膜红色荧光(DiI)染色试剂盒, 上海碧云天生物公司。流式细胞分析仪, 贝克曼库尔特有限公司; 活细胞荧光显微镜, 赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术鉴定 hUCMSC 表型

取 10⁶ 个 hUCMSC 细胞, 磷酸缓冲盐溶液

(phosphate buffer solution, PBS)清洗后加入 Zombie NIRT™ Dye, 室温避光孵育 15 min; 加入预冷的 PBS 洗涤; 加入 Trustain FCX™ plus 封闭细胞表面 Fc 受体, 冰上避光孵育 10 min。对细胞表面标记进行染色: 将细胞表面抗体按比例混匀(AF647-抗人 CD90, PE-A-抗人 CD105, PerCP-抗人 CD73, FITC-抗人 CD271, APC-抗人 CD45), 4 °C 避光孵育 15 min; 加入流式细胞术缓冲液(flow cytometry buffer, FCM buffer)洗涤 3 次; 将细胞重悬于 FCM buffer, 经流式细胞仪检测, 结果用 CytExpert 软件分析。

1.2.2 Ms 感染 hUCMSC 及存活率

将 hUCMSC 接种至 6 孔板(3×10^5 cells/well), 培养至生长密度为 80% 后, Ms 菌株分别以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10、20 和 50 感染 2 h, 用含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素(gentamicin, GM)的完全培养基处理 2 h, 杀死胞外的细菌, 此时记为感染后 0 h。分别于感染后 0、6 和 24 h 弃上清, 加入 0.025% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)裂解细胞 1 min, 取原液、 10^{-1} 和 10^{-2} 稀释液各 100 μL 涂布 LB 平板, 37 °C 倒置培养 3 d 后菌落计数。同上, 用 Ms-GFP 菌株感染(MOI=20) hUCMSC 后, 荧光显微镜下观察细菌。

1.2.3 DiI 红色荧光标记细胞膜

Ms-GFP 以 MOI=20 感染 hUCMSC 24 h, Hoechst 对细胞核染色后, 用 37 °C 预热的 PBS 清洗 2 次; 根据说明书加入适当体积的细胞膜染色工作液, 37 °C 避光孵育细胞 15 min; PBS 洗涤 2 次, 加入 37 °C 预热的细胞培养液, 在活细胞荧光显微镜下观察。DiI 最大激发波长 549 nm, 最大发射波长 565 nm。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测 Ms 感染后 hUCMSC 基因转录水平

Ms 以 MOI=20 感染 hUCMSC, 24 h 后收集细胞, Total RNA Kit I 提取细胞总 RNA; 取

500 ng RNA 逆转录为 cDNA, 用于 RT-qPCR 检测。以 *gapdh* 为内参基因, 目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\Delta C_t = \text{目的基因 } C_t - \text{内参基因 } C_t$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{试验组}) - \Delta C_t(\text{对照组})$ 。RT-qPCR 引物序列如表 1 所示。

1.2.5 油红 O 染色

Ms 以 MOI=20 感染 hUCMSC 24 h 后, PBS 清洗 2 次, 加油红 O 固定液固定 30 min; ddH₂O 清洗 2 次; 加入 60% 异丙醇浸洗 5 min, 再加入新鲜配制的油红 O 染色液浸染 20 min; ddH₂O 清洗后加入 Mayer 苏木素染色液, 复染核 1 min; ddH₂O 清洗 5 次, 加入油红 O 缓冲液, 1 min 后弃去, 加入 ddH₂O 覆盖细胞, 光学显微镜下观察拍照。

1.2.6 细胞骨架 F-actin 鬼笔环肽染色

Ms 以 MOI=20 感染 hUCMSCs 24 h 后, 37 °C 预热的 PBS 清洗细胞 2 次; 4% 多聚甲醛溶液室温固定细胞 10 min; PBS 清洗 3 次; 用 0.5% Triton X-100 溶液透化处理 5 min; PBS 清洗后加入 100 nmol/L 的 TRITC 标记鬼笔环肽(Phalloidin), 室温避光孵育 30 min; PBS 清洗 3 次; 加入 100 nmol/L DAPI 溶液复染 30 s; PBS 清洗后, 使用活细胞荧光显微镜观察 F-actin 结构, 用 Image J 软件分析平均荧光强度。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.1 软件进行统计学分析, 试验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。两组间比较采用 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计学差异标注为: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 hUCMSC 的形态特征和表型鉴定结果

MSC 细胞高表达 CD105、CD73 和 CD90, 且表达 CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79a、CD19 或人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,

表 1 RT-qPCR 基因引物信息

Table 1 RT-qPCR gene primer information

| Gene name | Primer sequence (5'→3') | | Product length (bp) |
|---------------|----------------------------|---------------------------|---------------------|
| <i>sod2</i> | F: GCTCCGGTTTTGGGGTATCTG | R: GGCGTTGATGTGAGGTTCCAG | 93 |
| <i>chek2</i> | F: TCTCGGGAGTCGGGATGTTGAG | R: CCTGAGTGGACACTGTCTCTAA | 206 |
| <i>foxp3</i> | F: CGGACAAACGGCTTCACTCT | R: GGACCCGCATGAATCGACTAT | 151 |
| <i>foxo4</i> | F: GGCTGCCGCGATCATAGAC | R: GGCTGGTTAGCGGATCTCTGG | 100 |
| <i>sox9</i> | F: AGCGAACGCACATCAAGAC | R: CTGTAGGCGATCTGTTGGGG | 85 |
| <i>cdkn1c</i> | F: GCGGCGATCAAGAAGCTAT | R: GCTTGCGAAGAAATCGGAGA | 52 |
| <i>foxo1</i> | F: TCGTCATAATCTGTCCCTACACA | R: CGGCTTCGGCTCTTAGCAAA | 168 |
| <i>hdac10</i> | F: CAGTTCGACGCCATCTACTTC | R: CAAGCCCATTTGCACAGCTC | 115 |
| <i>pcna</i> | F: CCTGCTGGGATATTAGCTCCA | R: CAGCGGTAGGTGTCGAAGC | 109 |
| <i>cdk2</i> | F: CCAGGAGTTACTTCTATGCCTGA | R: TTCATCCAGGGGAGGTACAAC | 90 |
| <i>Plk4</i> | F: AAGCTCGACGCTTCATGCACC | R: GCATTTTCAGTTGAGTTGCCAG | 156 |
| <i>notch1</i> | F: GAGGCGTGGCAGACTATGC | R: CTTGTACTCCGTCAGCGTG | 140 |
| <i>hdac1</i> | F: CTACTACGACGGGGATGTTGG | R: GAGTCATGCGGATTCCGGTGAG | 77 |
| <i>skp2</i> | F: ATGCCCAATCTTGTCCATCT | R: CACCGACTGAGTGATAGGTGT | 111 |
| <i>ido1</i> | F: GCCTTGACGCTCTAGTTCTG | R: ACTGCAGTCTCCATCACGAA | 251 |
| <i>tdo2</i> | F: AGAGCACTTCAGGGAGCATT | R: TCTTCGGTATCCAGTGTCGG | 283 |
| <i>gpat3</i> | F: TGGTTCTCGGCTTCATCCTT | R: TCCCTTCCTCGTAGACCAGA | 220 |
| <i>gpat4</i> | F: CCTGCCTCCCATGACTAGAG | R: GTTCCCCACGATCATCTTGC | 187 |
| <i>fasn</i> | F: CCCTCATCTCCCCACTCATC | R: CAGCGTCTCCACACTATGC | 215 |
| <i>lxra</i> | F: TGTTTGCAAGAACTCAGGCC | R: ACCTGCCTCTTCATCATGCT | 169 |
| <i>sreb-1</i> | F: GGGGACAAGGAATTCTCGGA | R: TCACCACAGCTGTCAGAGAG | 166 |
| <i>agpat1</i> | F: TGAGGGAACGAGAAACCACA | R: TGACATTGTCCCGAGGTGAA | 159 |
| <i>agpat2</i> | F: ATCGTCTCCAACCACCAGAG | R: AAGGAAGAGTACACCACGGG | 245 |
| <i>dgat1</i> | F: AACTACCGTGGCCTCCTGAA | R: AGACATTGGCCGCAATAACC | 178 |
| <i>dgat2</i> | F: TGGGAGTGGCAATGCTATCA | R: ACTTCTTCTGGACCCATCGG | 224 |
| <i>mgll</i> | F: AAAGACTACCCTGGGCTTCC | R: AAGGTTGAGCACTTTCGCAG | 183 |
| <i>Runx-2</i> | F: CTGTGGTACTGTGATGGCG | R: AGGTAGCTACTTGGGGAGGA | 183 |
| <i>ALP</i> | F: GTACAACACCAATGCCCAGG | R: CAGATTTCCAGCGTCCTTG | 182 |
| <i>COL6A2</i> | F: TCAGCCCTCAAGTTTGCTA | R: CAGGCGATGGAGTAGAGGTT | 218 |
| <i>CD73</i> | F: AAGTGTGAGTGCCAGTTA | R: TGATCCGACCTTCAACTGCT | 208 |
| <i>CD271</i> | F: CCCGAGCACATAGACTCCTT | R: ACTCACTGCACAGACTCTCC | 154 |
| <i>CD105</i> | F: TCCATTGTGACCTTCAGCCT | R: CTTGGATGCCTGGAGAGTCA | 176 |
| <i>CD45</i> | F: TGTGGCTTAAACTCTTGGA | R: CCACCAACTGAAGGCTGAAC | 176 |
| <i>CD11b</i> | F: AGGTCACCTTCTTCTCCCG | R: GACCTCTGAGTTTTCCGGGA | 182 |
| <i>CD90</i> | F: AGTACGAGTTCAGCCTGACC | R: TCTGAGCACTGTGACGTTCT | 227 |

HLA) II类分子的细胞不应超过总数的 2%^[21-22]。本研究采集一名足月健康新生儿脐带组织, 分离 hUCMSC, 经流式细胞术检测第 3 代 hUCMSC 细胞表面抗原, 结果显示其特异抗原 CD73 (图 1A)、CD90 (图 1B)和 CD105 (图 1C) 高表达, 造血细胞标志抗原 CD45 (图 1D)低表达, 表明分离获得的 hUCMSC 符合 MSC 表型特征。显微镜下观察发现, 细胞呈梭形贴壁聚集生长, 形态均一, 生长状态良好(图 1E、1F), 可用于后续试验研究。

2.2 Ms 可感染 hUCMSC 且在胞内呈增殖趋势

Hoechst33342 细胞核染色和 DiI 细胞膜染色后, 荧光显微镜下观察可见, 感染 6 h 后, 被 hUCMSC 吞噬的 Ms-GFP 呈散在、单个存在, 存活但不增殖(图 2A); 而细胞外残留的 Ms-GFP 随培养时间的延长而增殖; 感染 24 h 后, 细胞内吞噬的 Ms-GFP 增加, 呈簇状, 提示细菌增殖。

Ms 分别以不同 MOI 感染 hUCMSC 细胞, 细菌计数结果显示, 随着 MOI 增加, hUCMSC

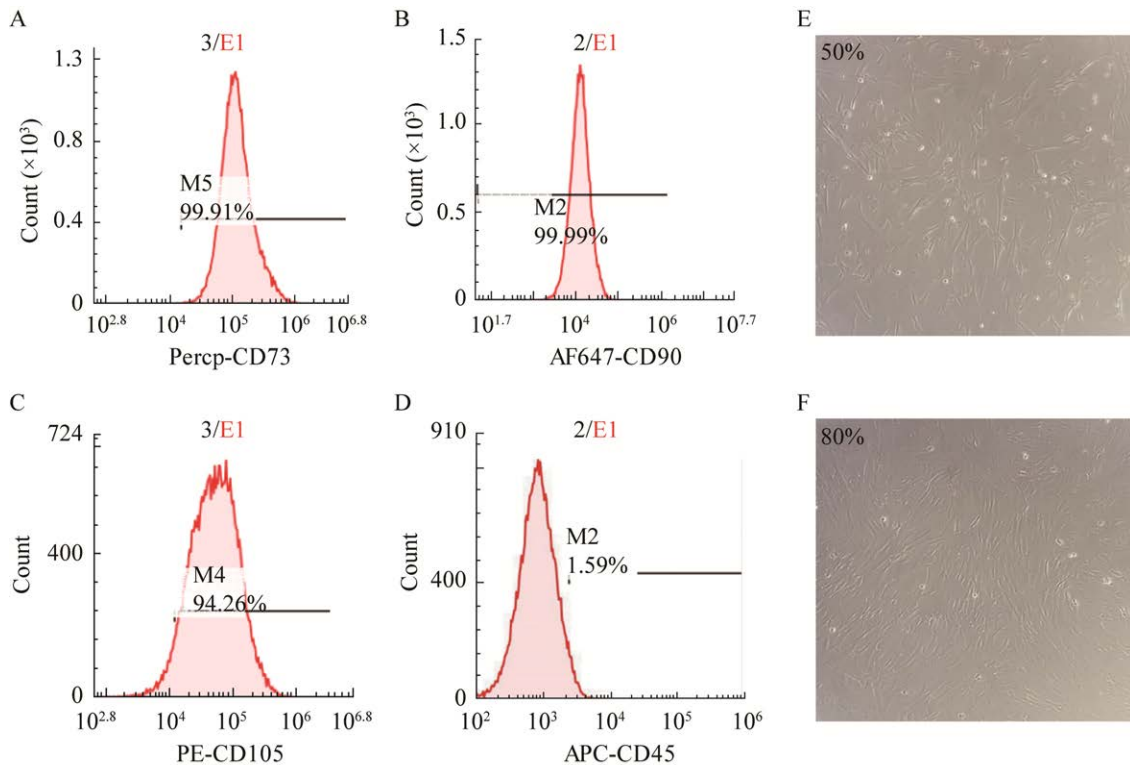


图 1 hUCMSC 的表型鉴定和形态特征 A: 流式细胞术检测 hUCMSC 表面标志性抗原 CD73. B: 流式细胞术检测 hUCMSC 表面标志性抗原 CD90. C: 流式细胞术检测 hUCMSC 表面标志性抗原 CD105. D: 流式细胞术检测 hUCMSC 表面标志性抗原 CD45. E: 显微镜观察生长密度为 50% 时细胞形态(100×). F: 显微镜观察生长密度为 80% 时细胞形态(100×)

Figure 1 Phenotypic identification and morphological characteristics of hUCMSC. A: Detection of hUCMSC surface antigen CD73 by flow cytometry. B: Detection of hUCMSC surface antigen CD90 by flow cytometry. C: Detection of hUCMSC surface antigen CD105 by flow cytometry. D: Detection of hUCMSC surface antigen CD45 by flow cytometry. E: The cell morphology observed by microscope at a growth density of 50% (100×). F: The cell morphology observed by microscope at a growth density of 80% (100×).

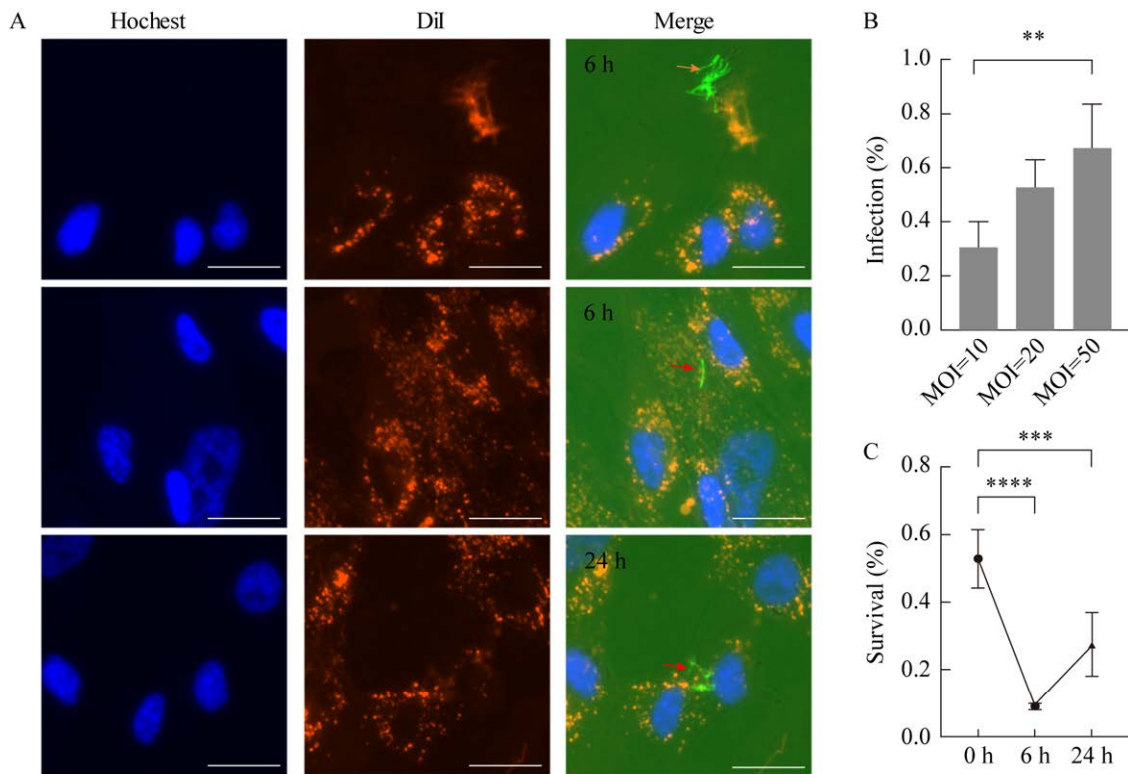


图 2 Ms 感染 hUCMSC 及存活率观察 A: Ms-GFP 感染 hUCMSC 6 h 和 24 h 后在胞内胞外存活情况观察(200 \times)。橙色箭头: 胞外菌; 红色箭头: 胞内菌; Bar: 50 μ m. B: Ms 对 hUCMSC 感染率(3 次重复)。[感染率(%)=感染后胞内细菌数/感染细菌数 \times 100]。C: Ms 在 hUCMSC 中的胞内存活率(3 次重复)。存活率(%)=感染后胞内存活细菌数/感染后胞内细菌数 \times 100. **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, ****: $P<0.0001$

Figure 2 The percentages of Ms infection and survival in hUCMSC. A: The hUCMSC was infected with Ms-GFP for 24 hours and observed the survival of Ms-GFP on intracellular or extracellular (400 \times). Orange arrow: Extracellular bacteria; Red arrow: Intracellular bacteria; Bar: 50 μ m. B: Ms infection of hUCMSC (triplicates). Infection (%)=The number of intracellular bacteria after infection/The number of infected bacteria \times 100. C: Intracellular survival of Ms in hUCMSC (triplicates). Survival (%)=The number of live bacteria in cells after infection/The number of bacteria engulfed by cells after infection \times 100. **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, ****: $P<0.0001$.

细胞中 Ms 数量逐渐增加, 且 MOI=50 的 Ms 感染率显著高于 MOI=10 ($P<0.01$) (图 2B), 表明 hUCMSC 感染率与 Ms 感染复数呈正相关。Ms 以 MOI=20 感染 hUCMSC, 加入含庆大霉素(gentamicin, GM)的培养液继续培养, 6 h 后 hUCMSC 胞内 Ms 仍存活, 但其数量显著下降($P<0.0001$), 而 24 h 后胞内 Ms 数升高, 但仍显著低于 0 h ($P<0.001$) (图 2C)。表明 hUCMSC 对 Ms 的胞内存活具有明显的抑制作用, 但随着感染时间持续, hUCMSC 中的

Ms 数量增加, 但与 6 h 无显著差异, 提示 hUCMSC 中的 Ms 随感染时间呈增殖趋势。

2.3 Ms 感染促进 hUCMSC 脂滴形成

Mtb 感染可促进巨噬细胞脂滴形成增加, 诱导泡沫细胞形成^[23], 也可诱导 MSC 脂滴生成显著增加^[4]。hUCMSC 感染 Ms 后, 油红 O 染色观察结果显示, 细胞内脂滴形成增加(图 3A)。细胞内脂滴的生成和脂解过程如图 3B 所示。

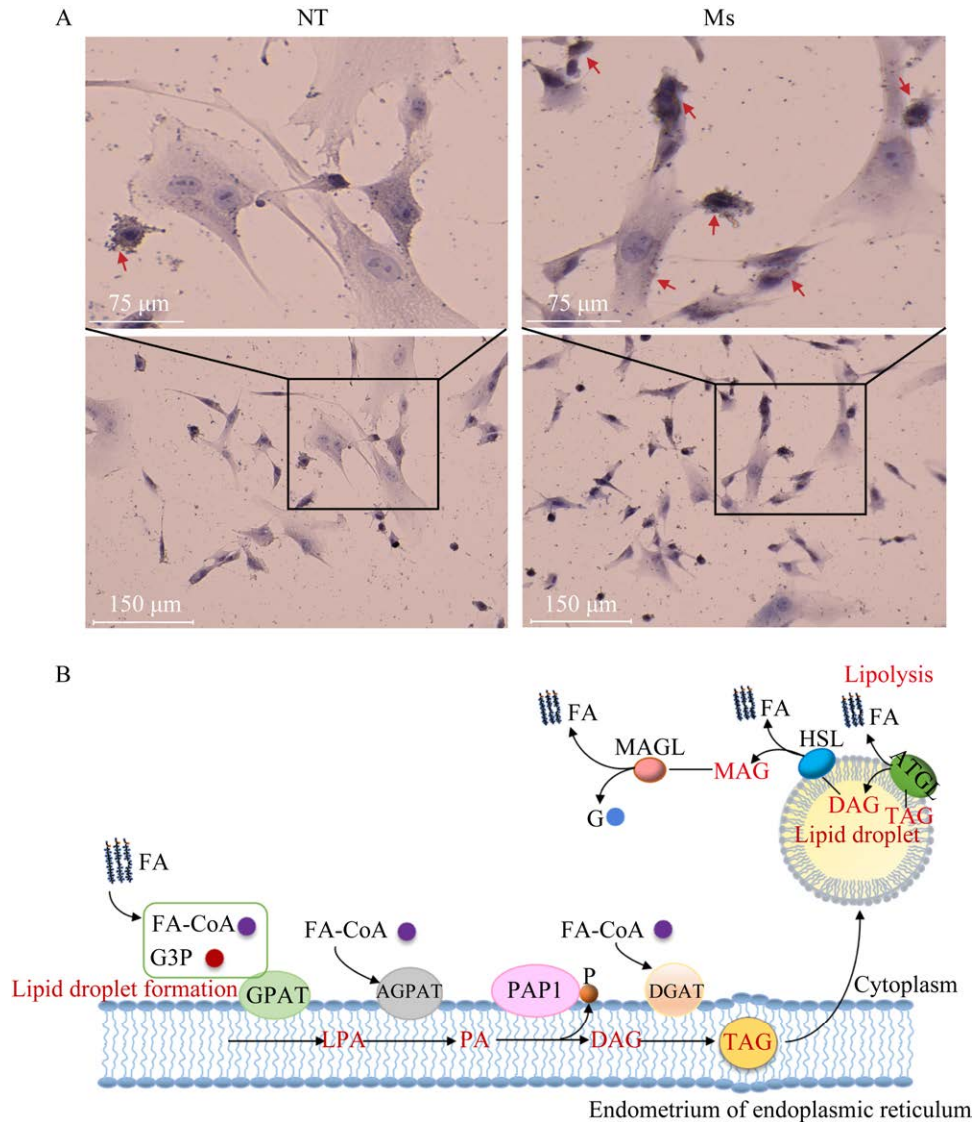
RT-qPCR 检测脂质形成相关基因转录水平, 结果

显示 Ms 感染使得 hUCMSC 中甘油三酯合成酶 1-酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶 1 (1-acylglycerol-3-phosphate-acyltransferase 1, AGPAT1)、二酰基甘油 O-酰基转移酶 1 (diacylglycerol O-acyltransferase 1, DGAT1) 转录水平均显著升高 ($P < 0.001$), 而对脂肪酸合成相关基因 (Srebf-1、Fasn、LXRA) 转录水平无显著影响; 而且与对照组相比, Ms 感染诱导 hUCMSC 单酰基甘油脂肪酶 (monoacylglycerol Lipase, MAGL) 转录水平显著下调 ($P < 0.01$) (图 3C)。上述结果表明, Ms 感染促进 hUCMSC 细胞内甘油三酯合成, 而抑制甘油三酯降解, 最终

促进脂滴形成, 有助于其在细胞内的存活。

2.4 Ms 诱导 hUCMSC 细胞骨架发生重构

肌动蛋白(F-actin)是构成细胞骨架的主要成分, hUCMSC 经 Ms 感染后用鬼笔环肽(phalloidin)标记 F-actin, 荧光显微镜下观察结果显示, NT 组正常 hUCMSC 细胞铺展呈梭形, F-actin 分布规律且密度均匀, Ms 感染后 hUCMSC 细胞形态趋于不规则变化, 肌动蛋白缩短增粗(图 4A)。Image J 分析其平均荧光强度, Ms 感染组显著高于 NT 组 ($P < 0.01$) (图 4B)。表明 Ms 感染可诱导 hUCMSC 细胞骨架发生重构, 提示 hUCMSC 趋向增殖分化的状态。



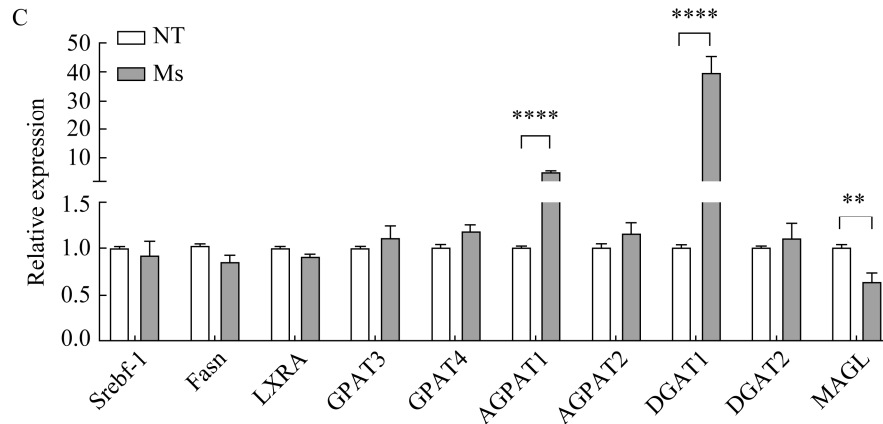


图3 Ms感染促进hUCMSC细胞内脂滴形成 A: 油红O染色观察细胞内脂滴(200×). 红色箭头: 脂滴. B: 脂滴的形成和脂解过程. Lipid droplet: 脂滴; Lipid droplet formation: 脂滴形成; FA: 脂肪酸; FA-CoA: 脂酰辅酶A; G3P: 三磷酸甘油; GPAT: 甘油-3-磷酸酰基转移酶; LPA: 溶血磷脂酸; AGPAT: 1-酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶; PA: 磷脂酸; PAP1: 磷脂酸磷酸酶1; P: 磷酸基; DAG: 1,2-二酰基甘油; DGAT: 二酰基甘油O-酰基转移酶; TAG: 甘油三酯; ATGL: 甘油三酯脂肪酶; HSL: 激素敏感性脂肪酶; MAGL: 单酰基甘油脂肪酶; G: 甘油; Lipolysis: 脂解; Cytoplasm: 细胞质; Endometrium of endoplasmic reticulum: 内质网内膜. C: RT-qPCR检测脂质合成相关基因转录水平(3次重复). NT: 未处理组; Ms: Ms感染组. **: $P < 0.01$, ****: $P < 0.0001$

Figure 3 Ms infection promotes lipid droplet formation in hUCMSC. A: The intracellular lipid droplets were detected by oil red O staining (200×). Red arrow: Lipid droplet. B: Formation and lipolysis of lipid droplets. FA: Fatty acid; FA-CoA: Fatty acyl coenzyme A; G3P: Glycerol-3-phosphate; GPAT: Glycerol-3-phosphate acyltransferases; LPA: Lysophosphatidic acid; AGPAT: 1-acylglycerol-3-phosphate-acyltransferase; PA: Phosphatidic acid; PAP1: Phosphatidic acid Phosphatase 1; P: Phosphate group; DAG: 1,2-diacylglycerol; DGAT: Diacylglycerol O-acyltransferase; TAG: Triacylglycerol; ATGL: Adipose triacylglyceride lipase; HSL: Hormone-sensitive lipase; MAGL: Monoacylglycerol Lipase; G: Glycerol. C: Transcriptional levels of lipid synthesis related genes by RT-qPCR (triplicates). NT: Untreated group; Ms: Ms infection group. **: $P < 0.01$, ****: $P < 0.0001$.

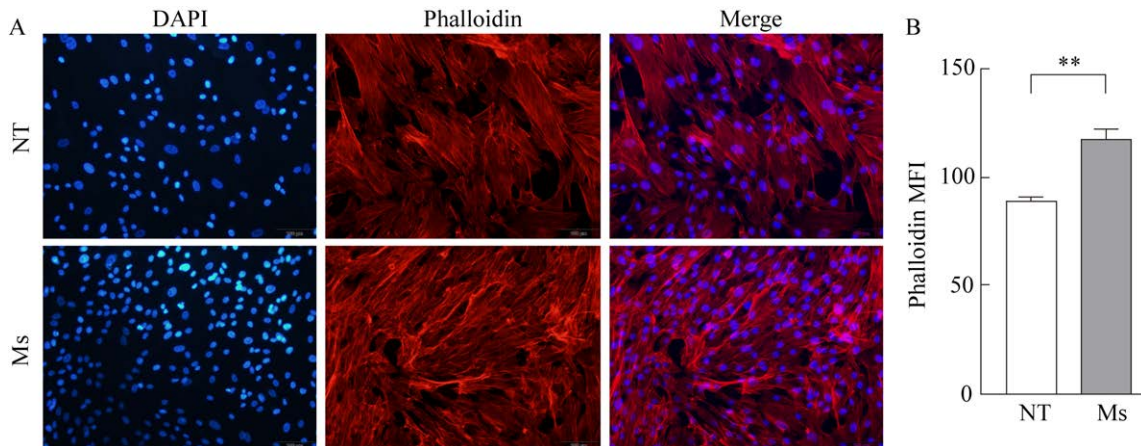


图4 hUCMSC细胞骨架观察 A: 鬼笔环肽荧光染色观察hUCMSC细胞骨架(200×). Bar: 150 μm. B: Image J定量分析平均荧光强度(3次重复). NT: 未处理组; Ms: Ms感染组; **: $P < 0.01$

Figure 4 Ms infection induces proliferation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. A: Observation of cytoskeleton of human umbilical cord mesenchymal stem cells by phalloidin fluorescence staining (200×). Bar: 150 μm. B: Quantitative analysis of mean fluorescence intensity by Image J (triplicates). NT: Untreated group; Ms: Ms infection group; **: $P < 0.01$.

2.5 Ms 感染诱导 hUCMSC 增殖

hUCMSC 保持静息状态抑制 Mtb 胞内存活, 另外, Mtb 诱导 MSC 分化而有利于其在 MSC 内存活。RT-qPCR 检测结果表明, Ms 感染 hUCMSC 24 h 后静息相关基因 FOXO1、FOXO3、SOX9 和 SOD2 表达下调(图 5A), 而诱导 PCNA、SKP2、HDAC1、PLK4 和 HDAC10 等增殖相关基因表达上调(图 5B)。表明 Ms 感染

24 h 后 hUCMSC 呈增殖趋势。

2.6 Ms 感染诱导 hUCMSC 分化

MSC 具有分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等的能力^[24]。RT-qPCR 检测结果显示, Ms 感染后 hUCMSC 干细胞表面标志性抗原转录水平保持不变或有下降趋势, 差异无统计学意义($P>0.05$), 但 CD271、CD11b 和 CD45 等的转录水平显著升高(图 6A) ($P<0.01$ 、 $P<0.001$), 表

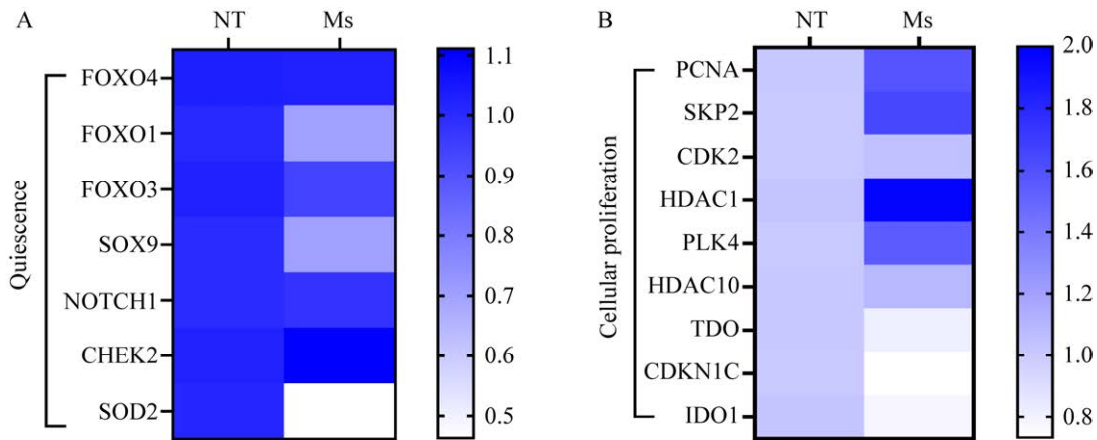


图 5 hUCMSC 后静息和增殖相关基因转录水平变化 A: Ms 感染后 hUCMSC 静息相关基因转录水平 (3 次重复)。B: Ms 感染后 hUCMSC 增殖相关基因转录水平(3 次重复)

Figure 5 The transcription levels of resting and proliferation related genes in human umbilical cord mesenchymal stem cells after Ms infection (triplicates). A: Transcription levels of resting related genes in human umbilical cord mesenchymal stem cells after Ms infection (triplicates). B: Transcription levels of proliferation related genes in human umbilical cord mesenchymal stem cells after Ms infection (triplicates).

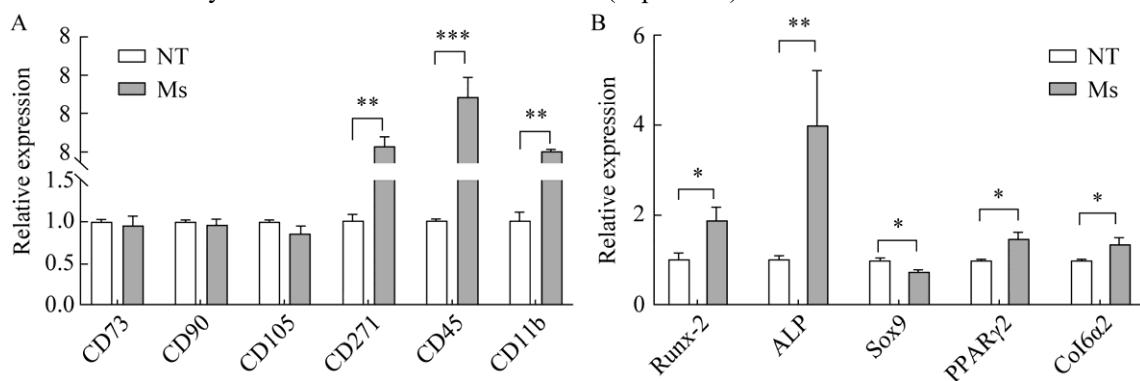


图 6 hUCMSC 相关基因转录水平 A: RT-qPCR 检测 hUCMSC 干细胞表面标志性抗原转录水平(3 次重复)。B: RT-qPCR 检测 hUCMSC 细胞分化相关基因转录水平(3 次重复)。NT: 未处理组; Ms: Ms 感染组; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$

Figure 6 Transcription levels of human hUCMSC related genes. A: The transcription levels of surface marker antigen in human hUCMSC were detected by RT-qPCR (triplicates). B: The transcription levels of differentiation related genes in human hUCMSC were detected by RT-qPCR (triplicates). NT: Untreated group; Ms: Ms infection group; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$.

明细胞呈现分化趋势。进一步检测发现, Ms 感染后, hUCMSC 成骨分化早期转录因子 Runx-2、成骨分化早期标志物碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、脂肪形成早期转录因子 PPAR γ 2 和成脂分化早期标志因子 COL6 α 2 转录水平均显著升高(图 6B) ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。表明 Ms 感染后 hUCMSC 的干细胞特性降低, 呈现向成骨细胞、脂肪细胞分化的趋势。

3 讨论与结论

目前卡介苗(bacille Calmette-Guerin, BCG)是结核病(tuberculosis, TB)的唯一批准疫苗, 但无法预防 LTBI 复发。TB 的治疗主要依靠药物化疗, 但药物治疗 LTBI 效果不佳。因此, LTBI 是 TB 防治的主要难题之一, 其形成和复苏机制仍有待阐明^[25-26]。研究发现 MSC 是一种新的 Mtb 吞噬细胞。由于 Mtb 生长缓慢和需要较高的试验条件, 非致病性、生长快速的 Ms 常作为模式菌株用于 Mtb 感染与免疫机制研究^[14-15]。本研究首次证实 Ms 感染 hUCMSC 可在胞内以非复制方式存活, 并诱导 hUCMSC 脂滴形成增加, 因此具有 Mtb 感染 MSC 细胞模型的相似表型。

McCune 等最早于 1950 年建立的 Cornell 模型提出: 感染宿主体内存在少量、不可培养状态的 Mtb 休眠菌^[27-28]。现已证实, 低的氧饱和度^[29]、NO 暴露、pH 值小于 5.0 的酸性环境^[27]、营养缺乏^[30-31]、离子浓度变化^[32]、低浓度药物^[33]和细胞吞噬等因素是 Mtb 进入休眠的诱导因素^[4,27,34]。Mtb 体外可感染人和鼠的骨髓 MSC 以及 hUCMSC, Mtb 在 MSC 中以非复制方式存活^[13,35]。课题组前期研究发现, Ms 感染小鼠肺泡巨噬细胞后可在胞内增殖, 24 h 胞内细菌数量增加 3 个 log₁₀CFU 左右^[36]。在本研究中, Ms 感染 hUCMSC 后 6 h, 胞内的 Ms 仍为单个、散在分布, 胞内细菌 CFU 计数呈现显著降低趋势, 而

胞外细菌成簇存在, 表明 Ms 可在 hUCMSC 内以非复制方式存活。

Mtb 可诱导 MSC 脂滴生成显著增加, Mtb 隐藏在脂滴内, 不仅以脂质作为碳源, 还可逃避宿主防御机制^[4]。本研究中, Ms 感染也可诱导 hUCMSC 脂滴形成增加。上述 Ms 感染 hUCMSC 后的表型与文献报道 Mtb 感染 hUCMSC 的特征相似^[4]。本研究还发现, Ms 感染促进 hUCMSC 甘油三酯合成酶转录水平显著上调, 使分解酶转录水平显著下调, 说明 Ms 感染诱导 hUCMSC 脂肪合成代谢促进细胞内脂滴的形成, 以利于 Ms 在胞内存活。根据本研究结果, 推测 Mtb 诱导 hUCMSC 脂滴形成也与促进脂肪合成代谢有关。

MSC 是具有多向分化潜力的成体干细胞。MSC 内低氧、静息和低分化的干细胞微环境可抑制 Mtb 胞内繁殖^[4,10,37]。MSC 由于本身干细胞特性抑制 Mtb 胞内复制, 另外, Mtb 感染通过促进 MSC 脂质代谢等影响其生理状态, 两者达到平衡时, Mtb 可在 MSC 中长期保持存活但不复制的休眠菌状态。MSC 分化后, 细胞内的 Mtb 繁殖增加^[4,10]。表明 MSC 静息状态是抑制 Mtb 繁殖的重要因素。肌动蛋白是细胞骨架的主要成分之一, 对于细胞移动、生长发育、细胞内物质运输以及细胞的分裂和分化至关重要^[38-39]。有研究表明, 在人 MSC 向成骨细胞分化时, 细的微丝束转变为粗厚的肌动蛋白丝束, 使细胞骨架发生显著变化^[40]。本研究中, 感染 24 h 后, hUCMSC 细胞肌动蛋白增加, 细胞趋于皱缩状态, 使细胞骨架发生重构。RT-qPCR 结果显示, hUCMSC 细胞静息相关基因表达下调, 而增殖相关基因表达上调, 表明 hUCMSC 由静息向成脂成骨细胞分化, 使对胞内 Ms 的抑制作用减弱, 胞内 Ms 复制增加。

据研究报道, Mtb 感染 MSC 后, 在 MSC

未出现生长状态改变的情况下,胞内 Mtb 的 CFU 保持不变至少可持续 22 d^[13,29]。Mtb 和 Ms 同属分枝杆菌属,具有类似的细胞结构和代谢途径,但是其基因组和生物学特性仍存在差异。例如,一些 Mtb 毒力相关基因并不存在于 Ms 基因组中,推测 Ms 对 MSC 免疫功能的抑制作用或胞内的存活能力比 Mtb 弱,Ms 在 MSC 中维持非复制状态的时长可能比较短。随着感染时间延长至 24 h, hUCMSC 内 Ms 呈现上升趋势,但与 6 h 无显著差异,此时培养可观察到胞外 Ms 生长。Ms 代时约 2–4 h, Mtb 的代时约为 20 h, 一般 Mtb 感染细胞试验观察时间最长 5–7 d, 因此, 该 Ms 感染 hUCMSC 模型用于分枝杆菌休眠形成机制研究, 观察时间不宜超过 24 h。此外, 研究发现不同供者来源的 hUCMSC 生物学特性存在一定差异^[41], 但都具有典型的间充质干细胞特性, 相似的细胞因子谱以及一致的增殖和生长特性^[42]。因此, 用于试验研究的间充质干细胞需先进行表面标志性抗原鉴定。综上所述, 本研究表明, Ms 感染 hUCMSC 后呈现出胞内存活抑制表型, 可模拟 Mtb 非复制的休眠菌形成过程。因此, Ms 感染 hUCMSC 细胞模型可用于 Mtb 休眠菌的相关研究, 为进一步阐明 LTBI 机制奠定了一定的基础。

REFERENCES

- [1] CHAKAYA J, PETERSEN E, NANTANDA R, MUNGAI BN, MIGLIORI GB, AMANULLAH F, LUNGU P, NTOUMI F, KUMARASAMY N, MAEURER M, ZUMLA A. The WHO global tuberculosis 2021 report-not so good news and turning the tide back to End TB[J]. International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases, 2022, 124(Suppl 1): S26-S29.
- [2] ALSAYED SSR, GUNOSEWOYO H. Tuberculosis: pathogenesis, current treatment regimens and new drug targets[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(6): 5202.
- [3] CHEE CBE, REVES R, ZHANG Y, BELKNAP R. Latent tuberculosis infection: opportunities and challenges[J]. Respirology, 2018, 23(10): 893-900.
- [4] FATIMA S, KAMBLE SS, DWIVEDI VP, BHATTACHARYA D, KUMAR S, RANGANATHAN A, van KAER L, MOHANTY S, DAS G. *Mycobacterium tuberculosis* programs mesenchymal stem cells to establish dormancy and persistence[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2020, 130(2): 655-661.
- [5] BEAMER G, MAJOR S, DAS B, CAMPOS-NETO A. Bone marrow mesenchymal stem cells provide an antibiotic-protective niche for persistent viable *Mycobacterium tuberculosis* that survive antibiotic treatment[J]. The American Journal of Pathology, 2014, 184(12): 3170-3175.
- [6] YANG H, SHA W, LIU ZH, TANG TQ, LIU HP, QIN LH, CUI ZL, CHEN JX, LIU F, ZHENG RJ, HUANG XC, WANG J, FENG YH, GE BX. Lysine acetylation of DosR regulates the hypoxia response of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Emerging Microbes & Infections, 2018, 7(1): 34.
- [7] SHI SD, HSUEH PR, YANG PC, CHOU CC. Use of DosR dormancy antigens from *Mycobacterium tuberculosis* for serodiagnosis of active and latent tuberculosis[J]. ACS Infectious Diseases, 2020, 6(2): 272-280.
- [8] JIANG H, LUO rTL, KANG J, XU ZK, WANG LM. Expression of Rv2031c-Rv2626c fusion protein in *Mycobacterium smegmatis* enhances bacillary survival and modulates innate immunity in macrophages[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(5): 7307-7312.
- [9] SALINA EG, GRIGOROV AS, BYCHENKO OS, SKVORTSOVA YV, MAMEDOV IZ, AZHIKINA TL, KAPRELYANTS AS. Resuscitation of dormant “non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* is characterized by immediate transcriptional burst[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019, 9: 272.
- [10] DAS B, KASHINO SS, PULU I, KALITA D, SWAMI V, YEGER H, FELSHER DW, CAMPOS-NETO A. CD271(+) bone marrow mesenchymal stem cells may provide a niche for dormant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Science Translational Medicine, 2013, 5(170): 170ra13.
- [11] GARHYAN J, BHUYAN S, PULU I, KALITA D, DAS B, BHATNAGAR R. Preclinical and clinical evidence of *Mycobacterium tuberculosis* persistence in the hypoxic

- niche of bone marrow mesenchymal stem cells after therapy[J]. *The American Journal of Pathology*, 2015, 185(7): 1924-1934.
- [12] TORNACK J, REECE ST, BAUER WM, VOGELZANG A, BANDERMANN S, ZEDLER U, STINGL G, KAUFMANN SHE, MELCHERS F. Human and mouse hematopoietic stem cells are a depot for dormant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169119.
- [13] SINGH VK, MISHRA A, BARK S, MANI A, SUBBIAN S, HUNTER RL, JAGANNATH C, KHAN A. Human mesenchymal stem cell based intracellular dormancy model of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Microbes and Infection*, 2020, 22(9): 423-431.
- [14] SAKALLIOGLU IT, MAROLI AS, de LIMA LEITE A, MARSHALL DD, EVANS BW, ZINNIEL DK, DUSSAULT PH, BARLETTA RG, POWERS R. Multi-omics investigation into the mechanism of action of an anti-tubercular fatty acid analogue[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(46): 21157-21173.
- [15] KIM JS, KIM HK, CHO E, MUN SJ, JANG S, JANG J, YANG CS. PE_PGRS38 interaction with HAUSP downregulates antimycobacterial host defense via TRAF6[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 862628.
- [16] TANG YT, MU A, ZHANG YY, ZHOU S, WANG WW, LAI YZ, ZHOU XT, LIU FJ, YANG XN, GONG HR, WANG Q, RAO ZH. Cryo-EM structure of *Mycobacterium smegmatis* DyP-loaded encapsulin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(16): e2025658118.
- [17] 侯晓青, 刘丹, 王易. 耻垢分枝杆菌在感染与免疫研究中的应用[J]. *微生物与感染*, 2014, 9(4): 238-244. HOU XQ, LIU D, WANG Y. *Mycobacterium smegmatis*: a model bacterium for tuberculosis and its current roles in research of infection and immunity[J]. *Journal of microbes and infections*, 2014, 9(4): 238-244 (in Chinese).
- [18] MAMADOU D, MARIE-ANGE D, NICOLE G. The cell envelope of *Mycobacterium smegmatis*: cytochemistry and architectural implications[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 61(1-2): 89-93.
- [19] JOSEPH SUNDARSINGH T, RANJITHA J, RAJAN A, SHANKAR V. Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2020, 13(9): 1255-1264.
- [20] GRIGOROV A, BYCHENKO O, SALINA EG, SKVORTSOVA Y, MAZUROVA A, SKVORTSOV T, KAPRELYANTS A, AZHIKINA T. Small RNA F6 provides *Mycobacterium smegmatis* entry into dormancy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11536.
- [21] DOMINICI M, Le BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP D, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- [22] PENG X, ZHANG Y, BAI GC, ZHOU XD, WU H. Cyclic di-AMP mediates biofilm formation[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 99(5): 945-959.
- [23] SINGH V, KAUR C, CHAUDHARY VK, RAO KVS, CHATTERJEE SM. Tuberculosis secretory protein ESAT-6 induces metabolic flux perturbations to drive foamy macrophage differentiation[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12906.
- [24] VATER C, KASTEN P, STIEHLER M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells[J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(2): 463-477.
- [25] JAGGER A, REITER-KARAM S, HAMADA Y, GETAHUN H. National policies on the management of latent tuberculosis infection: review of 98 countries[J]. *Bulletin of the World Health Organization*, 2018, 96(3): 173-184F.
- [26] GETAHUN H, MATTEELLI A, ABUBAKAR I, ABDEL AZIZ M, BADDELEY A, BARREIRA D, den BOON S, GUTIERREZ SMB, BRUCHFELD J, BURHAN E, CAVALCANTE S, CEDILLOS R, CHAISSON R, CHEE CBE, CHESIRE L, CORBETT E, DARA M, DENHOLM J, de VRIES G, FALZON D, et al. Management of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: who guidelines for low tuberculosis burden countries[J]. *The European Respiratory Journal*, 2015, 46(6): 1563-1576.
- [27] BATYRSHINA YR, SCHWARTZ YS. Modeling of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy in bacterial cultures[J]. *Tuberculosis*, 2019, 117: 7-17.
- [28] LIU YJ, PERTINEZ H, DAVIES GR, GILLESPIE SH, COATES AR, HU YM. Moxifloxacin replacement in contemporary tuberculosis drug regimens is ineffective against persistent *Mycobacterium tuberculosis* in the Cornell mouse model[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62(7): e00190-18.
- [29] TIZZANO B, DALLENGA TK, UTPATEL C,

- BEHREND S, HOMOLKA S, KOHL TA, NIEMANN S. Survival of hypoxia-induced dormancy is not a common feature of all strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 2628.
- [30] CHANG DPS, GUAN XL. Metabolic versatility of *Mycobacterium tuberculosis* during infection and dormancy[J]. Metabolites, 2021, 11(2): 88.
- [31] GARCIA-MORALES L, LEON-SOLIS L, MONROY-MUÑOZ IE, TALAVERA-PAULIN M, SERAFIN-LÓPEZ J, ESTRADA-GARCIA I, RIVERA-GUTIERREZ S, CERNA-CORTES JF, HELGUERA-REPETTO AC, GONZALEZ-Y-MERCHAND JA. Comparative proteomic profiles reveal characteristic *Mycobacterium tuberculosis* proteins induced by cholesterol during dormancy conditions[J]. Microbiology, 2017, 163(8): 1237-1247.
- [32] SALINA EG, WADDELL SJ, HOFFMANN N, ROSENKRANDS I, BUTCHER PD, KAPRELYANTS AS. Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states[J]. Open Biology, 2014, 4(10): 140106.
- [33] RAGHUNANDANAN S, JOSE L, KUMAR RA. Dormant *Mycobacterium tuberculosis* converts isoniazid to the active drug in a Wayne's model of dormancy[J]. The Journal of Antibiotics, 2018, 71(11): 939-949.
- [34] PETERSON EJ, ABIDI AA, ARRIETA-ORTIZ ML, AGUILAR B, YURKOVICH JT, KAUR A, PAN M, SRINIVAS V, SHMULEVICH I, BALIGA NS. Intricate genetic programs controlling dormancy in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Cell Reports, 2020, 31(4): 107577.
- [35] KHAN A, MANN L, PAPANNA R, LYU MA, SINGH CR, OLSON S, EISSA NT, CIRILLO J, DAS G, HUNTER RL, JAGANNATH C. Mesenchymal stem cells internalize *Mycobacterium tuberculosis* through scavenger receptors and restrict bacterial growth through autophagy[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 15010.
- [36] NING HH, ZHANG W, KANG J, DING TB, LIANG X, LU YZ, GUO CX, SUN WJ, WANG HP, BAI YL, SHEN LX. Subunit vaccine ESAT-6: c-di-AMP delivered by intranasal route elicits immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 647220.
- [37] PEDDIREDDY V, DODDAM SN, AHMED N. Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 84.
- [38] ZANOTELLI MR, ZHANG J, REINHART-KING CA. Mechanoresponsive metabolism in cancer cell migration and metastasis[J]. Cell Metabolism, 2021, 33(7): 1307-1321.
- [39] SENGUPTA S, PARENT CA, BEAR JE. The principles of directed cell migration[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021, 22(8): 529-547.
- [40] SAIDOVA AA, VOROBEV IA. Lineage commitment, signaling pathways, and the cytoskeleton systems in mesenchymal stem cells[J]. Tissue Engineering Part B, Reviews, 2020, 26(1): 13-25.
- [41] 王荣. 不同供者来源脐带间充质干细胞生物学特性差异的初步研究[D]. 北京: 北京协和医学院中国医学科学院清华大学医学部硕士学位论文, 2014.
- WANG R. Preliminary study on biologic characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells from different donors[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Union Medical College Chinese Academy of Medical Sciences Tsinghua University Department of Medicine, 2014 (in Chinese).
- [42] RAILEANU VN, WHITELEY J, CHOW T, KOLLARA A, MOHAMED A, KEATING A, ROGERS IM. Banking mesenchymal stromal cells from umbilical cord tissue: large sample size analysis reveals consistency between donors[J]. Stem Cells Translational Medicine, 2019, 8(10): 1041-1054.