

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00502

· 论 著 ·

结核分枝杆菌 MPT64 抗原对巨噬细胞凋亡的抑制作用

王庆敏^{1*}, 雷呈祥¹, 肖安², 刘秋红¹

1. 海军医学研究所航空医学研究室, 上海 200433

2. 成都军区昆明总医院传染结核科, 昆明 650032

[摘要] **目的** 探讨结核分枝杆菌 MPT64 抗原对 RAW264.7 巨噬细胞的影响及相关机制。**方法** 将 MPT64 基因在大肠杆菌中表达、纯化, 获得的纯化蛋白用于后续实验。将用佛波醇酯(PMA)分化的 RAW264.7 巨噬细胞分为对照组、卡介菌纯蛋白衍生物(BCG-PPD)诱导组、BCG-PPD+MPT64 共同作用组, 分别给予相应的处理。孵育 16 h 后, 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况, 用 ELISA 试剂盒检测培养细胞上清的细胞因子 TNF- α 及 IL-10 水平。**结果** BCG-PPD 可以诱导 RAW264.7 巨噬细胞凋亡, BCG-PPD+MPT64 组的细胞凋亡水平低于 BCG-PPD 组 ($P < 0.05$)。细胞因子上清检测结果表明, 与对照组相比, BCG-PPD 作用组的 TNF- α 水平升高 ($P < 0.01$), 而 IL-10 水平无明显变化; 与 BCG-PPD 组相比, BCG-PPD+MPT64 共同孵育组的 IL-10 水平升高 ($P < 0.01$), 而 TNF- α 水平无明显变化。**结论** MPT64 抗原可能是一种毒力因子, 能够抑制 BCG-PPD 诱导的巨噬细胞凋亡, 该作用可能是通过提高 IL-10 水平来实现的。

[关键词] 结核分枝杆菌; MPT64 抗原; 巨噬细胞; 细胞凋亡**[中图分类号]** R 378.911 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)05-0502-05

Inhibitory effect of MPT64 antigen from *Mycobacterium tuberculosis* against apoptosis of macrophages

WANG Qing-min^{1*}, LEI Cheng-xiang¹, XIAO An², LIU Qiu-hong¹

1. Department of Aviation Medicine, the Institute of Naval Medical Research, Shanghai 200433, China

2. Department of Tuberculosis, Kunming General Hospital, PLA Chengdu Military Area Command, Kunming 650032, Yunnan, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of MPT64 antigen from *Mycobacterium tuberculosis* on RAW264.7 macrophages and the related mechanism. **Methods** MPT64 was purified after expression in *E. coli* and verified by Western blotting analysis. The RAW264.7 differentiation was induced by phorbol myristate acetate (PMA) and the resultant cells were divided into three groups according to different treatments: negative control, purified protein derivative of BCG(BCG-PPD) and BCG-PPD+MPT64 treatment groups. After 16 h incubation, flow cytometry was used to examine apoptosis of macrophages, and the levels of TNF- α and IL-10 in the supernatants were determined by ELISA. **Results** BCG-PPD treatment induced apoptosis of RAW264.7 macrophages, and compared with BCG-PPD group, the apoptotic level of macrophages was significantly lower in BCG-PPD+MPT64 group ($P < 0.05$). We also found that the supernatant TNF- α level in the BCG-PPD group was significantly higher than that in negative group ($P < 0.01$) and the IL-10 levels were not significantly different between the two groups. Compared with BCG-PPD group, the IL-10 level was significantly increased in BCG-PPD+MPT64 group ($P < 0.01$) and the TNF- α levels were not significantly different between the two groups. **Conclusion** MPT64 may act as a virulence factor and can inhibit the apoptosis of macrophages induced by BCG-PPD, which is probably through increasing IL-10 level.

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis*; MPT64 antigen; macrophages; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(5):502-506]

结核病发生、发展过程中常伴随机体免疫细胞 $\gamma\delta$ T 细胞等, 其中巨噬细胞是否凋亡直接影响着结核分枝杆菌在体内的存活状态^[1]。巨噬细胞是结核

[收稿日期] 2012-12-23 **[接受日期]** 2013-03-20**[基金项目]** 国家自然科学基金(31070121), 上海市自然科学基金(08ZR1405600). Supported by National Natural Science Foundation of China (31070121) and Natural Science Foundation of Shanghai (08ZR1405600).**[作者简介]** 王庆敏, 博士, 副研究员。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81883260, E-mail: wqmm_888@yahoo.com

分枝杆菌主要的宿主细胞,在感染过程中,结核分枝杆菌与巨噬细胞相互适应、相互作用。一方面,结核分枝杆菌感染后,巨噬细胞的凋亡水平可以被上调,这被认为是巨噬细胞发挥抗结核分枝杆菌感染的重要途径之一,是一种有利于清除病原菌的细胞死亡方式;另一方面,结核分枝杆菌的某些菌体成分或分泌的一些分子可以抑制巨噬细胞的凋亡,从而保持菌体赖以生存的环境,形成免疫逃避。目前,研究者认为结核分枝杆菌对巨噬细胞凋亡的抑制是其抵抗机体免疫系统杀伤的重要机制之一^[2-4]。

MPT64 抗原是结核分枝杆菌重要的保护性抗原,编码这种蛋白的基因在一些弱毒性的卡介菌株中缺失,提示 MPT64 抗原是一种毒力相关因子,参与机体与免疫系统的相互作用^[5]。但 MPT64 抗原对巨噬细胞产生何种作用,目前尚不清楚。本研究观察了 MPT64 抗原对巨噬细胞凋亡的影响以及这一过程中巨噬细胞分泌的细胞因子水平变化,旨在探讨 MPT64 抗原在结核分枝杆菌感染中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 细胞株、质粒 小鼠 RAW264.7 巨噬细胞株购于中国科学院上海细胞生物研究所,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液传代培养。pGEX5T 质粒、DH5 α 、K802 菌株购自 Pharmacia 公司。结核病患者血清和正常人血清由成都军区昆明总医院提供。

1.2 主要试剂 卡介菌纯蛋白衍生物 (purified protein derivative of BCG, BCG-PPD) 购自中国兽医研究所, TNF- α 及 IL-10 细胞因子检测试剂盒购自 Invitrogen 公司, Annexin V 凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司, 小牛血清购自 Hyclone 公司, 佛波醇酯 (PMA) 购自 Sigma 公司。工具酶购自 TaKaRa 公司, 羊抗人辣根过氧化物酶二抗购于 Dako 公司。多黏菌素 B (polymyxin B) 购自 Sigma 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 pGEX5T-MPT64 重组子的鉴定 从结核分枝杆菌基因组扩增 MPT64 cDNA^[6], 经 BamH I 和 Xho I 酶切, 与 pGEX5T 质粒相连后 (pGEX5T-MPT64), 转化 K802 菌株, 挑取阳性转化子进行酶切鉴定并测序 (测序服务由上海生工生物工程股份有限公司提供)。

1.4 MPT64 蛋白的表达、纯化及鉴定 将鉴定好的 K802 菌培养至菌液浓度达到 $D_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 时, 进行异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导, 诱导终浓度为 1 mmol/L, 诱导 5 h 后收集菌体, 进行 10% SDS-PAGE, 观察表达条带。将超声处理后的菌体蛋白经 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析, 经超滤和分子筛纯化, 获得纯化蛋白。将纯化蛋白电泳、转膜, 进行蛋白质印迹鉴定, 一抗为 1:200 稀释的结核病患者血清或正常血清对照, 二抗为 1:1000 羊抗人血清。

1.5 热源的控制处理

1.5.1 器皿的处理 为了排除热源的影响, 玻璃器皿 250 $^{\circ}$ C 下, 干烤 1.5 h。培养板采用 Costar 的无热源培养板。所有试剂均采用无热源水配制。

1.5.2 纯化蛋白内毒素的去除 采用 Sigma 公司的 polymyxin B 去除纯化蛋白中的内毒素。操作步骤按照说明书进行, 即将 polymyxin B 混悬液与纯化的 MPT64 蛋白混合, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 去掉 polymyxin B, 取上清 MPT64 蛋白用于后续实验。

1.6 细胞分组和处理 复苏冻存的 RAW264.7 细胞, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育箱中培养, 收获指数生长期细胞, 以 2×10^5 /mL 密度接种于 6 孔细胞培养板, 每孔 2 mL 细胞悬液, 加入终浓度为 10 ng/mL 的 PMA, 孵育 24 h。观察细胞贴壁情况, 保留贴壁牢固的细胞继续后续实验。将细胞分为阴性对照组、BCG-PPD 诱导组 (BCG-PPD 终浓度为 10 μ g/mL)、BCG-PPD (10 μ g/mL) + MPT64 (10 μ g/mL, 15 μ g/mL, 20 μ g/mL) 共同作用组, 孵育 16 h 后, 进行相关实验检测。实验中设立谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 蛋白 (15 μ g/mL) 对照组, 以排除接头蛋白 GST 对实验的可能影响; 设热变性 MPT64 蛋白 (15 μ g/mL) 作为对照, 排除纯化的 MPT64 中内毒素的影响。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 将刺激过的各组细胞用 PBS 洗涤 1 次, 随后用 0.25% 的胰酶消化贴壁细胞, 2000 \times g 离心 5 min, 收集细胞, 加新鲜培养液 1 mL 悬浮细胞, 按照 Annexin V 凋亡检测试剂盒的说明对细胞进行处理, 最后上流式细胞仪采集数据, 记录细胞计数结果, 得出凋亡率。

1.8 培养细胞上清中细胞因子的检测 各组细胞培养 16 h, 离心取上清, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 待用。取冻存的上清, 稀释 10 倍, 用 ELISA 法分别检测上清中的 TNF- α 及 IL-10 水平, 具体检测方法参照试剂盒说明进行。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较采用方差分析,两两比较采用 LSD *t* 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 pGEX5T-MPT64 重组子的鉴定 MPT64 基因经 PCR 扩增后,经琼脂糖凝胶电泳,发现扩增条带单一,大小约为 0.7 kb(图 1A),测序结果与 GenBank 登录的序列完全一致。pGEX5T-MPT64 重组子经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,电泳后可见一大一小的两条片段;大片段约为 5 kb,为线性载体;小片段为 0.6 kb,为去掉信号肽的 MPT64 基因(图 1B)。

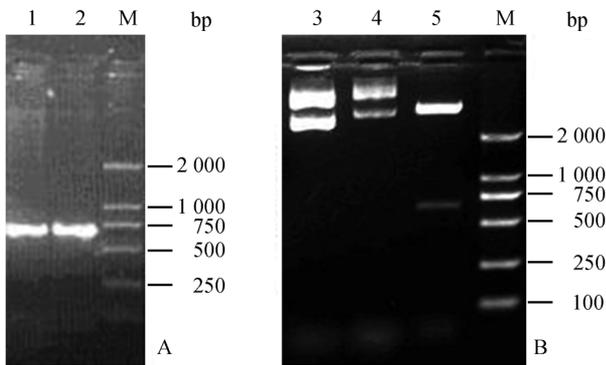


图 1 pGEX5T-MPT64 重组子的鉴定

Fig 1 Identification of recombinant pGEX5T-MPT64

A: PCR results of MPT64; B: Endonuclease digestion of pGEX5T-MPT64. M: DL2000 marker; 1,2: MPT64 gene; 3: pGEX5T plasmid; 4: pGEX5T-MPT64 recombinant plasmid; 5: pGEX5T-MPT64 digested by *Bam*H I and *Xho* I

2.2 MPT64 蛋白的表达、纯化及蛋白质印迹鉴定结果 将诱导表达后的菌体蛋白进行 10% SDS-PAGE,结果发现 MPT64 蛋白获得了表达,相对分子质量约为 24 000,与预期大致相符。目的蛋白约占菌体蛋白的 40%。表达蛋白多在上清中以可溶的方式存在,少数存在于包含体中。经 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析、超滤和分子筛纯化、polymyxin B 热源处理,获得单一的蛋白条带。蛋白质印迹鉴定结果显示,表达蛋白可以被结核病患者血清特异识别,而不能被正常人血清所识别,说明表达的蛋白保持了天然的免疫原性。详见图 2。

2.3 MPT64 蛋白对巨噬细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果(图 3)表明,与阴性对照组相比,BCG-PPD可以诱导 RAW264.7 巨噬细胞凋亡($P < 0.01$)。BCG-PPD+MPT64(10、15 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组

巨噬细胞凋亡率随着 MPT64 浓度的升高而逐渐降低,均低于 BCG-PPD 诱导组($P < 0.05$),而 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组的凋亡抑制作用差异无统计学意义,提示 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度可能是最佳作用浓度,所以在后续实验中,均采用 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度。对照 BCG-PPD+GST(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组的巨噬细胞凋亡率与 BCG-PPD 组相比无明显变化,提示是 MPT64 抗原抑制 BCG-PPD 诱导的巨噬细胞凋亡,而非接头 GST 蛋白的作用。热灭活的 MPT64(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组与 BCG-PPD 组差异无统计学意义,可以进一步说明本实验中的凋亡抑制作用来自于 MPT64 蛋白。

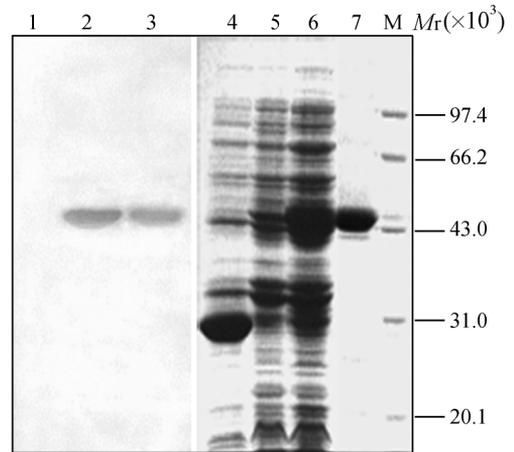


图 2 MPT64 蛋白的表达、纯化及鉴定

Fig 2 Expression, purification and identification of MPT64

1-3: Western blotting results. 1: The expression product of K802 transduced with pGEX5T; 2: The expression product of K802 transduced with pGEX5T-MPT64; 3: Purified MPT64; 4-7: Protein electrophoresis. 4: The expression product of K802 transduced with pGEX5T; 5, 6: The expression product of K802 transduced with pGEX5T-MPT64 before or after induction; 7: Purified MPT64; M: Protein marker

2.4 MPT64 蛋白对巨噬细胞分泌细胞因子的影响 采用 ELISA 方法检测巨噬细胞培养上清中的细胞因子水平(图 4),结果显示,与阴性对照组相比,BCG-PPD 组 TNF- α 水平升高($P < 0.01$),而 IL-10 的水平没有明显变化;与 BCG-PPD 组相比,PPD+MPT64 共同作用组的 IL-10 水平升高($P < 0.01$),而 TNF- α 水平没有显著变化。

3 讨论

已有研究表明,结核菌不产生内毒素和外毒素,其致病性与菌体的某些成分密切相关,如 38 000 蛋

白、葡萄糖脂蛋白 19 000(P19)等菌体成分可以促进巨噬细胞凋亡,而结核分枝菌酸、索状因子、6,6-双分枝海藻糖、脂多糖(LPS)、脂阿拉伯甘露糖(Man-LAM)等可以抑制巨噬细胞凋亡^[7-11]。MPT64 抗原存在于结核分枝杆菌的 RD2 区,在一些弱毒性的 BCG 菌株中缺失,提示它与菌株毒力相关^[5]。另外

也有实验表明在结核性肉芽肿组织内,MPT64 的表达量与肉芽肿组织内凋亡的细胞数成反比,并且此部位的凋亡相关蛋白表达量下降,提示 MPT64 蛋白确实参与了结核分枝杆菌与机体免疫系统之间的相互作用过程^[12-13]。

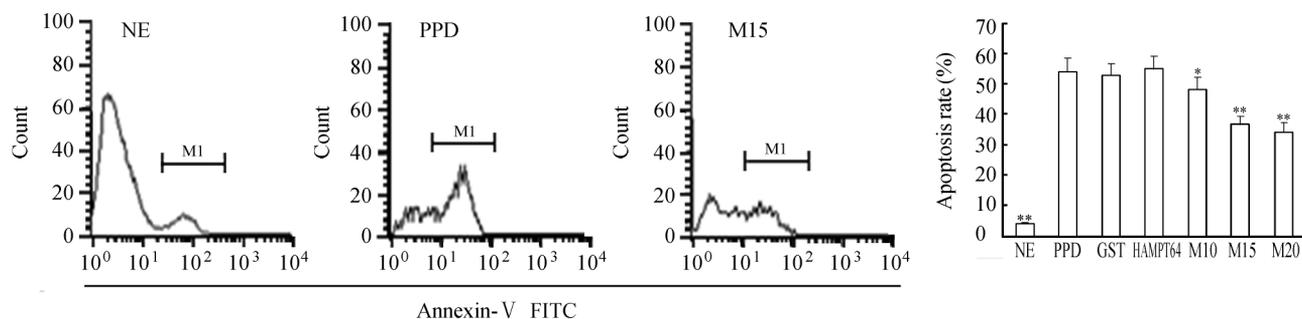


图3 MPT64 蛋白对巨噬细胞凋亡的抑制作用

Fig 3 Inhibitory effect of MPT64 against apoptosis of macrophage

NE: Negative group; PPD: Purified protein derivative of BCG (BCG-PPD) group; GST: BCG-PPD+GST (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group; HAMPT64: BCG-PPD+heat-activated MPT64 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group; M10, M15, M20: BCG-PPD+MPT64 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PPD group

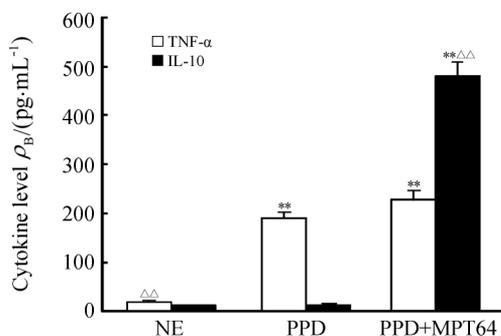


图4 MPT64 蛋白对巨噬细胞分泌细胞因子的影响

Fig 4 Effect of MPT64 on cytokine secretion from macrophage

NE: Negative group; PPD: Purified protein derivative of BCG (BCG-PPD, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group; PPD+MPT64: BCG-PPD (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)+MPT64 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group. ** $P < 0.01$ vs NE group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs PPD group

本研究利用大肠杆菌系统表达了 MPT64 蛋白,并通过亲和层析、超滤及分子筛等过程,获得了纯化蛋白,蛋白质印迹分析表明纯化的 MPT64 蛋白可以被结核病患者血清特异性地识别,说明表达的蛋白保持了天然的免疫原性。相关研究表明 PPD 不仅引起巨噬细胞产生免疫应答,而且不同毒力的 PPD 引起巨噬细胞的转归是不同的,BCG-PPD 主要引起巨噬细胞凋亡,而 H37Rv-PPD 主要引起巨

噬细胞坏死,说明二者具有不同的免疫机制,最终导致宿主免疫细胞和不同毒力的分枝杆菌的转归差异^[14]。据此,我们首先在体外建立了 BCG-PPD 诱导巨噬细胞凋亡的模型,随后将 BCG-PPD、MPT64 抗原共同孵育巨噬细胞,发现 MPT64 可以抑制由 BCG-PPD 诱导的巨噬细胞凋亡。

随后我们又对巨噬细胞表达上清中的 TNF- α 及 IL-10 水平进行了 ELISA 检测,探讨相关作用机制。研究表明在结核分枝杆菌诱导的巨噬细胞凋亡过程中, TNF- α 首先与肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) 结合,最终激活下游的半胱天冬酶 3 (caspase-3)、caspase-9,诱导巨噬细胞凋亡^[15];而 IL-10 可能通过诱导 sTNFR2 的产生来竞争性地抑制 TNF- α 与 TNFR1 的结合,最终削弱 TNF- α 诱导的凋亡作用^[16]。可见,在结核分枝杆菌感染的过程中, TNF- α 和 IL-10 功能的相对强弱,直接影响到机体对病原体的免疫杀伤和病原体在机体免疫细胞内的存活^[17-18]。

本研究发现与 BCG-PPD 组相比,BCG-PPD+MPT64 组的 IL-10 水平上升,而 TNF- α 水平没有明显变化。这说明在 MPT64 抗原抑制巨噬细胞凋亡的过程中, TNF- α 的分泌水平没有发生变化,升高的 IL-10 水平可能发挥了重要的凋亡抑制作用。

MPT64 抗原如何通过提高 IL-10 水平来抑制 BCG-PPD 诱导的巨噬细胞凋亡,是通过抑制 TNF- α 的功能,还是作用于某些凋亡相关分子,具体机制有待进一步深入研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Xue L J, Cao M M, Luan J, Ren H, Pan X, Cao J, et al. Mammalian cell entry protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces the proinflammatory response in RAW 264. 7 murine macrophage-like cells[J]. Tuberculosis (Edinb), 2007, 87: 185-192.
- [2] Ríos-Barrera V A, Campos-Peña V, Aguilar-León D, Lascurain L R, Meraz-Ríos M A, Moreno J, et al. Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence[J]. Eur J Immunol, 2006, 36: 345-353.
- [3] Bocchino M, Galati D, Sanduzzi A, Colizzi V, Brunetti E, Mancino G. Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2005, 9: 375-383.
- [4] Lee J, Hartman M, Kornfeld H. Macrophage apoptosis in tuberculosis[J]. Yonsei Med J, 2009, 50: 1-11.
- [5] Wang Z, Potter B M, Gray A M, Sacksteder K A, Geisbrecht B V, Laity J H. The solution structure of antigen MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* defines a new family of beta-grasp proteins[J]. J Mol Biol, 2007, 366: 375-381.
- [6] 王庆敏, 胡振林, 孙树汉. 结核杆菌保护性抗原-遍在蛋白质系统的建立[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24: 61-63.
Wang Q M, Hu Z L, Sun S H. Construction of *Mycobacterium tuberculosis* protective antigens-ubiquitin system[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2003, 24: 61-63.
- [7] Ciaramella A, Cavone A, Santucci M B, Garg S K, Sanarico N, Bocchino M, et al. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 beta by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection[J]. J Infect Dis, 2004, 190: 1167-1176.
- [8] Sanchez A, Espinosa P, Esparza M A, Colon M, Bernal G, Mancilla R. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages[J]. Scand J Immunol, 2009, 69: 20-28.
- [9] Derrick S C, Morris S L. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression[J]. Cell Microbiol, 2007, 9: 1547-1555.
- [10] Danelishvili L, Yamazaki Y, Selker J, Bermudez L E. Secreted *Mycobacterium tuberculosis* Rv3654c and Rv3655c proteins participate in the suppression of macrophage apoptosis[J]. PLoS One, 2010 4, 5: e10474.
- [11] Dao D N, Kremer L, Guérardel Y, Molano A, Jacobs W R Jr, Porcelli S A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages[J]. Infect Immun, 2004, 72: 2067-2074.
- [12] Mustafa T, Wiker H G, Mørkve O, Sviland L. Reduced apoptosis and increased inflammatory cytokines in granulomas caused by tuberculous compared to non-tuberculous mycobacteria; role of MPT64 antigen in apoptosis and immune response[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 150: 105-113.
- [13] Mustafa T, Wiker H G, Mørkve O, Sviland L. Differential expression of mycobacterial antigen MPT64, apoptosis and inflammatory markers in multinucleated giant cells and epithelioid cells in granulomas caused by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Virchows Arch, 2008, 452: 449-456.
- [14] 史会连, 虞胜镭, 路蝉伊, 张文宏, 翁心华, 陈澍. 不同毒力结核杆菌的纯化蛋白质衍生物对巨噬细胞凋亡的诱导及其与 Toll 样受体-2 的相关性[J]. 中华传染病杂志, 2011, 29: 6-10.
- [15] Spira A, Carroll J D, Liu G, Aziz Z, Shah V, Kornfeld H, et al. Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated *Mycobacterium tuberculosis*: a pivotal role for tumor necrosis factor [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 29: 545-551.
- [16] Balcewicz-Sablinska M K, Keane J, Kornfeld H, Remold H G. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha[J]. J Immunol, 1998, 161: 2636-2341.
- [17] Cavalcanti Y V, Brelaz M C, Neves J K, Ferraz J C, Pereira V R. Role of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-10 in the development of pulmonary tuberculosis[J]. Pulm Med, 2012, 2012: 745483.
- [18] Marino S, Myers A, Flynn J L, Kirschner D E. TNF and IL-10 are major factors in modulation of the phagocytic cell environment in lung and lymph node in tuberculosis: a next-generation two-compartmental model[J]. J Theor Biol, 2010, 265: 586-598.