

## 임신말기 C<sub>3</sub>H쥐의 복강내 Lipopolysaccharide 주사가 태반, 태아 및 자궁내막에서의 IL-6, IL-13 및 TIMP-3의 발현에 미치는 영향

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 병리과 및 <sup>1</sup>내분비연구실, <sup>2</sup>울산대학교 의과대학 병리학교실  
이화여자대학교 의과대학 <sup>3</sup>미생물학교실 및 <sup>4</sup>병리학교실

홍성란 · 문인걸<sup>1</sup> · 서주영<sup>3</sup> · 김의정 · 김성숙<sup>2</sup> · 한운섭<sup>4</sup>

### A Study for IL-6, IL-13 and TIMP-3 Expressions of Placenta, Fetus and Endometrium in Pregnant Mice after Treatment with Lipopolysaccharide

Sung Ran Hong, In Gul Moon<sup>1</sup>, Ju Young Seoh<sup>3</sup>, Yee Jeong Kim,  
Sung Sook Kim<sup>2</sup>, and Woon Sup Han<sup>4</sup>

Departments of Pathology & <sup>1</sup>Endocrinology Research Laboratory, Samsung Cheil Hospital, Medical College, Sung Kyun Kwan University, Seoul 100-380, Korea, <sup>2</sup>Department of Pathology, Ulsan University  
<sup>3</sup>Departments of Microbiology & <sup>4</sup>Pathology, Ewha Womans University

We examined C<sub>3</sub>H pregnant mice at 15 days (70% gestation) after treatment of lipopolysaccharide (LPS) to observe the changes of IL-6 concentration in maternal serum and amniotic fluid and expression of IL-6, IL-13 & TIMP-3 in placenta, fetus and endometrium, and to investigate the correlation among IL-6, IL-13 and TIMP-3. The results were as follows: 1) IL-6 in serum and amniotic fluid after treatment of LPS was significantly elevated; peaked at 1, 2, 4, 5 hours and decreased to control level at 8 hours ( $P < 0.05$ ). IL-6 in placental disc, chorioamniotic membrane, fetus, decidua and endometrial epithelium was overexpressed significantly at 1, 2, 4 hours after treatment of LPS ( $P < 0.05$ ). IL-6 overexpression was more significantly increased in maternal tissue than fetal tissue ( $P < 0.05$ ). 2) Increased concentration of amniotic fluid IL-6 was equally originated from transplacental crossage of maternal serum IL-6, and direct local production of IL-6 from placenta, fetus and endometrium ( $P < 0.05$ ). 3) IL-13 in placental disc, chorioamniotic membrane, fetus, decidua and endometrial epithelium was overexpressed after treatment of LPS, but not significant statistically. 4) TIMP-3 was overexpressed in placental disc, chorioamniotic membrane, fetus and decidua. TIMP-3 overexpression was more significant in placental disc than other tissues ( $P < 0.05$ ). 5) Overexpressions in IL-13 and IL-6 revealed direct proportional correlation coefficient (Spearman correlation coefficient, 0.5212 ;  $P < 0.05$ ). IL-6 expression was a head of overexpression of TIMP-3, but not significant. In conclusion, all of IL-6, IL-13 and TIMP-3 relate with inflammatory response, especially IL-6 in maternal serum, amniotic fluid and tissue of placenta, fetus and endometrium was so sensitive that it can be an indicator for antenatal diagnosis of chorioamnonitis, and amniotic fluid IL-6 is equally originated from maternal serum and from tissue of placenta, fetus and endometrium. IL-13 and TIMP-3 may have parallel correlation to the IL-6 in fetal and maternal tissue after treatment of LPS. (**Korean J Pathol 1998; 32: 352-361**)

**Key Words:** Placenta, Mouse, IL-6, IL-13, TIMP-3

접 수: 1997년 11월 13일, 게재승인: 1998년 3월 23일

주 소: 서울 중구 북정동 1-23, 우편번호 100-380, 삼성제일병원 병리과, 홍성란

ISSN : 0379-1149

## 서 론

Interleukin-6 (IL-6)은 감염 후 조직 손상시 나타나는 숙주의 주된 cytokine으로서 다양한 세포에 작용을 하여 급성기 염증반응 및 면역반응과 조혈등의 다양한 기능을 나타낸다.<sup>1</sup> IL-6은 림프구와 비림프구 세포에서 생성되며, 임신과 관련되어 IL-6을 분비하는 세포로는 탈락막, 융모양막이 보고되어 있고,<sup>2,3</sup> 염증시 양수에서 IL-6의 증가를 보인다.<sup>4</sup> 또한 양수에서의 IL-6의 증가가 급성 융모양막 염증의 진단에 예민한 표지자로 보고되어 있어 임상적으로 중요하게 인식되고 있다.<sup>5</sup>

Interleukin-13 (IL-13)은 새로이 기술된 cytokine으로 활성화된 T-helper 세포에서 생성되며 염증과 면역반응의 조절 기능에 관여한다.<sup>6</sup> 최근 보고에 의하면 IL-13은 비조혈세포인 각화성 상피세포와 내피 및 중피세포에서 IL-6의 표현을 자극하며 전신 및 국소 염증반응의 조절에 중요한 cytokine으로 기술되어 있다.<sup>7,8</sup>

Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)는 세포 밖 간질조직 (extracellular matrix)을 손상시키는 모든 종류의 matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성화를 저해하는 조절기능을 갖고 있는 것으로, 정상조직의 개형,<sup>9</sup> 악성종양의 침윤,<sup>10</sup> 배란,<sup>11</sup> 착상<sup>12</sup> 및 임신<sup>13</sup>에서의 중요한 역할이 보고되어 있다. 임신 기간동안 일어나는 세포밖 간질조직의 개형과 일치되게 TIMP의 변화를 보이며, 자궁, 탈락막, 태반, 양막, 난소등에서 TIMP가 관찰된다.<sup>13</sup> TIMP에는 TIMP-1,<sup>14</sup> TIMP-2,<sup>15</sup> TIMP-3<sup>16,17</sup>의 3가지 유형이 있다. TIMP-3은 유전자의 클론과 염기배열 순서가 최근에 밝혀진 새로운 유형으로 TIMP-1 및 TIMP-2와 분명히 다른 DNA 염기서열을 보여준다.<sup>18</sup> 염증에 따른 TIMP의 변화는 주로 류마치스성 관절염에서 연구되었는데, 류마치스성 관절염 환자의 혈청과 섬유아세포성 윤할막 세포에서 MMPs, TIMP-1, IL-6의 증가를 보였다.<sup>19,20</sup> IL-6과 TIMP의 관계에 있어 IL-6은 TIMP의 생성을 유도하여 간접적으로 적혈구 조혈과 결체조직 대사에 관여함이 보고되었다.<sup>21</sup>

임신시 양수에서의 IL-6 증가가 급성 융모양막의 임상적 진단에 가장 예민한 표지자의 하나로 보고되어 있고 요즘 새로이 밝혀진 IL-13과 TIMP-3이 IL-6과의 연관성을 보이므로, 본 연구는 LPS 처치 후 발생된 전신성 염증을 동반한 임신말기 C<sub>3</sub>H 쥐의 혈청과 양수에서의 IL-6의 농도변화를 관찰하고, 태반, 태아, 자궁내막조직에서 IL-6, IL-13, TIMP-3의 발현 변화와 이들의 상호관계를 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

내독소에 영향을 쉽게 받는 C<sub>3</sub>H쥐를 대상으로 하

였다.<sup>22,23</sup> C<sub>3</sub>H의 수컷과 암컷을 8주령까지 키운 후, 수컷 2마리에 암컷 1마리를 한 우리에 넣고 임신 시킨 후 암컷을 격리시켰다. 임신은 질 입구의 백색 프러그의 존재로 확인하였고, 확인한 그날을 임신 제1일로 하였다. 전 임신 기간의 70%에 해당하는 임신 제15일까지 키운 46마리를 다음과 같이 실험에 이용하였다.

실험군: Lipopolysaccharide (LPS)의 100ug/ul를 복강내 주사: 38마리

대조군: Phosphate-buffered saline (PBS)의 100ul를 복강내 주사: 8마리

LPS은 Escherichia coli, serotype 055 : B5의 것으로 페놀추출로 정제된 것 (Sigma, St. Louis)을 이용하였다. 주사된 LPS의 농도는 Fidel에 의한 실험을 참고로 하였다.<sup>4</sup> LPS로 처치 후 30분 (7마리), 1시간 (5마리), 2시간 (5마리), 4시간 (8마리), 5시간 (7마리), 8시간 (6마리) 때에 말초혈액에서 혈청과 태반에서 양수를 채취하여 영하 70℃에 동결보관하였고, 태아 및 태반조직을 포함한 자궁을 10% 중성 포르말린에 고정하였으며, RNA의 추출을 위하여 표본의 일부인 30분 (4마리), 2시간 (3마리), 5시간 (4마리)의 11마리의 신선조직을 이용하였다. 각 경우에서 탈락막, 태반, 융모양막, 태아로 구분된 신선조직을 Tri reagent<sup>R</sup> (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA) 1ml 에 저장하였다.

## 2. 방 법

1) IL-6의 enzyme linked immunosorbent assay (EIA): ELISA kit (R & D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량적 sandwich ELISA법으로 혈청과 양수에서 IL-6를 정량하였다. 영하 70℃에 보관되어 있던 혈청과 양수의 검체를 1 : 2로 희석하였다. 생쥐IL-6에 특이한 다클론성 1차 항체가 이미 부착되어 있는 플레이트에 혈청과 양수의 검체를 각각 넣고 상온에서 2시간 반응을 시켰다. 완충용액으로 세척 후 horseradish peroxidase가 부착된 생쥐IL-6의 2차항체를 첨가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 완충용액으로 세척 후 hydrogen peroxide와 tetramethyl benzidine 혼합제로 발색 후 염산으로 반응을 중지 시켰다. 450nm 자외선 파장의 precision microplate reader (Molecular devices, USA)에서 광학 밀도를 측정하여 혈청 및 양수에서의 IL-6을 정량하였다.

2) IL-6 및 IL-13의 면역조직화학 염색: 태반, 태아를 포함한 자궁조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매하고 4um 두께로 박절하여 유리 슬라이드에 붙였다. 면역조직화학 염색은 avidin-biotin complex 방법으로 하였다. 일차 항체로는 1 : 100으로 희석한 rat anti-mouse IL-6 단클론성 항체 (Kendall square, Cambridge, MA, USA)와 1 : 50으로 희석한 anti-murine IL-13 neutralizing antibody (R&D system,

Minneapolis, USA)을 이용하였다. Anti-IL-6 항체 및 anti-IL-13 항체가 세포질에 과점상으로 염색된 경우를 양성으로 하였다. 태반, 태아, 용모양막, 탈락막 및 자궁내막 상피세포 각각에서 H-score 이용하여 양성의 정도를 정량으로 표기하였다.<sup>24</sup>  $H\text{-score} = \sum P_i (i+1)$ 의 공식으로 구하였고 여기서  $i$ 는 각각 세포가 나타내는 양성도로서 0 (음성), 1 (약양성), 2 (중간양성), 3 (강양성)으로 구분하여 관찰하였으며  $P_i$ 는 각각 주어진  $i$ 가 나타내는 백분율이다.

### 3) TIMP-3의 polymerase chain reaction (PCR):

① RNA 추출; Chomczynski방법을<sup>25</sup> 변형하여 상품화된 Tri reagent<sup>R</sup> (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) kit의 방법에 따라 RNA를 추출하였다. 신선한 조직 상태의 임신된 자궁에서 태반, 태아, 용모양막, 탈락막을 구분 채취하여 4°C의 Tri reagent<sup>R</sup> 1ml에 보관한 후 조직을 잘고 균등하게 분쇄한 후 혼탕하여 상온에서 5분간 방치하였다. 0.2 ml의 chloroform을 넣은 후 15초간 세게 흔들고 15분간 상온에 두었다가 4°C에서 10,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 수용성 상층액을 피펫으로 새 시험관에 조심스럽게 옮겼다. 0.5 ml의 isopropanol을 넣고 vortexing하여 상온에서 10분간 보관했다가 10,000 rpm으로 8분간 원심 분리후 RNA를 침전시켰다. 상층액을 따라버리고 75% ethanol 1ml를 넣고 섞은 후 원심 분리하여 RNA pellet을 세정하고, 상층액을 다시 제거한 후 상온에서 RNA pellet을 건조시킨 후 diethyl pyrocarbonate로 처리된 증류수에 녹여서, 분광광도계 (150-20, Hitachi Co., Tokyo, Japan)로 260 nm의 분광광도에서 각 조직에서 추출된 RNA의 농도를 측정 후 RNA가 1 ug/ul의 동일농도가 되도록 만든 다음 영하 80°C에 보관하였다.

② TIMP-3 primer의 제작; 유전적 또는 세포 유전 검사법을 이용하여 생쥐의 10번 염색체에 생쥐TIMP-3의 유전자좌를 지정하고 생쥐TIMP-3 cDNA 클론 pSAmT39를 분리한 Apte등의 보고를 참고로 하여 생쥐TIMP-3 primer를 제작하였다.<sup>16</sup> 제작된 생쥐TIMP-3의 primer는 324bp로 생쥐TIMP-3 cDNA 클론의 염기 서열 231-251과 534-554에 해당하는 sense primer 5' ATT AAG CAG ATG AAG ATG TAC 3'와 anti-sense 5' ACC TGG CTG TAC GAG AGG TTA 3'였다.

③ 역전사 중합효소연쇄 반응; 총 RNA 2ug, oligo(dt) primer 100 pmol, dNTP (각 nucleotide 500 uM), 5X 역전사반응 완충용액 (250mM Tris[pH8.4], 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT), 5 unit RNase inhibitor, 200 unit MMLV 역전사 효소 (BRL Co., Grand Island, NY, USA)를 넣고 총 부피를 20ul로 만들어 37°C에서 90분 가온 후 다시 95°C에서 4분간 가온하여 반응을 정지시켰다. 이렇게 생성된 cDNA를 영하 20°C에 보관하였다.

④ TIMP-3 PCR; 위에서 기술한 생쥐TIMP-3 primer를 이용하여 다음과 같은 조건에서 PCR을 수행하였다. cDNA 합성물 2ul, primer 각 25pmol, dNTP (각 nucleotide 200 M), 10x PCR 완충용액 (20mM Tris[pH 7.4], 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 100mM KCL, 0.1% Triton X-100, 200ug/ml BSA, 50% glycerol), 동위원소  $\alpha$ <sup>32</sup>P dCTP (Amersham International plc, Buckinghamshire, England) 3,000Ci, 0.1 unit Taq polymerase (Dynazyme Co., Rijhitontuntie, Finland)를 혼합하여 총부피가 50ul되게 한 후 9600 Thermocycler (Perkin Elmer Co., Norwalk, CT, USA)에서 95°C에서 50초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 40초간 extension의 반복과정을 26회 실시한 후 마지막 회는 72°C에서 7분간 가온하였다. PCR 산물은 agarose gel (3% NuSieve 3 : 1[FMC Bioproducts, Thomaston, USA])에서 전기영동하여 0.5 g/ml의 ethidium bromide로 염색한 후 300 nm UV발광기 (Fotodyne Co., New Berlin, USA)하에서 324bp의 DNA 띠를 확인한 다음 DNA 띠를 분리하였다 (Fig. 1A). 1 ml cocktail solution (Ultima gold, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA)에 DNA 띠를 담그어  $\beta$ -counter (Beckman Instrument Ins, Pald Alto, CA, USA)에서 발광된 <sup>32</sup>P와 결합된 324bp의 DNA 띠를 정량하였다.

⑤ PCR 산물의 정량적분석; Higuchi등에 의한 PCR 산물의 정량방법을 참고로 하여 TIMP-3의 PCR 산물을 정량하였다. 임의 검체 한 개를 표준검체로 정하였다.<sup>26</sup> 위에서 기술한 동일 PCR 조건에서 25, 28, 30, 35 회의 한정된 주기로 PCR을 실시하여 3% agarose gel 에서 전기영동하여  $\beta$ -counter에서 각각의 제한된 주기의 <sup>32</sup>P와 결합된 TIMP-3의 DNA 띠를 정량한 다음 semilogarithm 그래프를 얻었다 (Fig. 1 B). 회기방정식은  $y = -17419.613 + 775.038^x$ ;  $R^2 = 997$ 이었다. PCR산물의 양은 PCR 주기가 증가하면서 비례적으로 증가하였고, 25회와 28회 사이에서 증가폭이 가장 컸으므로 표준검체와 각 실험검체와의 상대치를 비교적 쉽게 구별 위하여 PCR의 주기를 26회로 정하였다. 그리하여 26회에서 실험검체의 PCR 산물과 임의로 정한 표준검체의 PCR 산물에서의 TIMP-3의 <sup>32</sup>P의 양을 백분율로 비교하여 각 검체에서 PCR 산물의 비교 정량을 하였다.

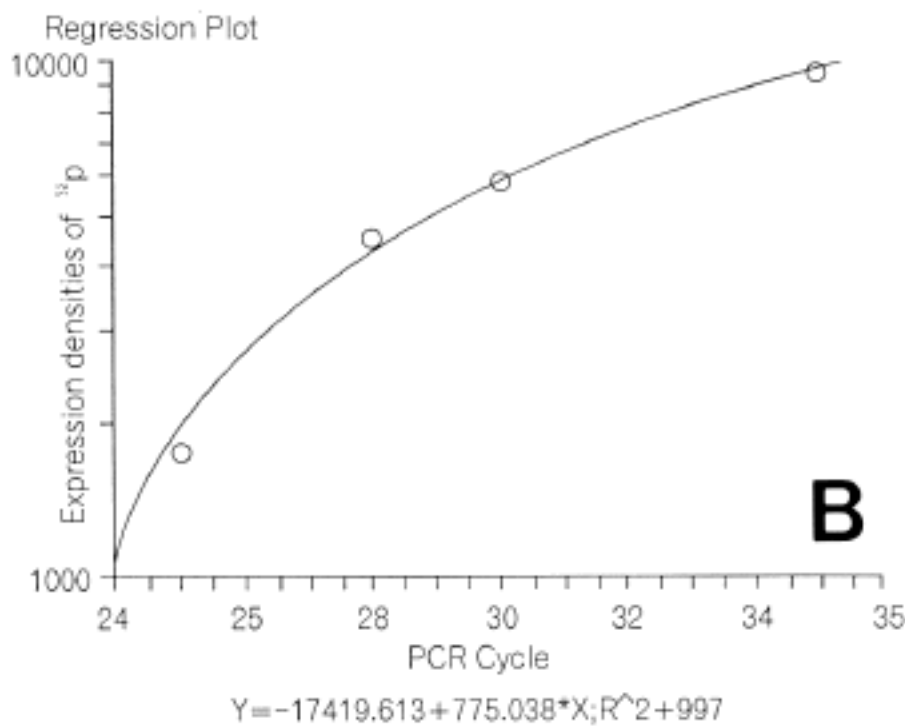
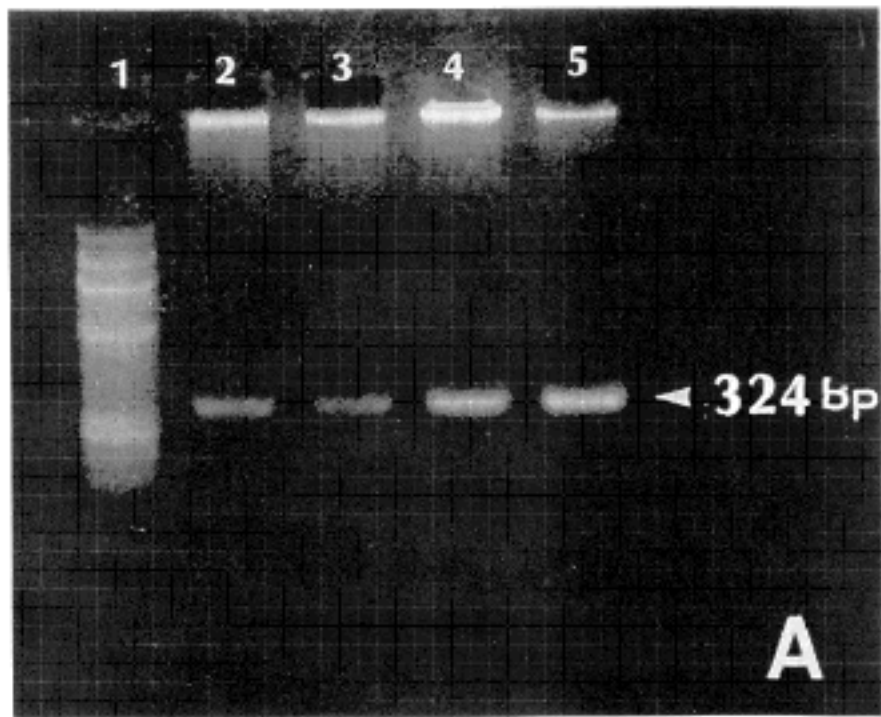
4) 통계학적 분석; 통계학적 검사는 PC-SAS version 6.04 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)로 student t-test 및 Spearman correlation coefficients 시행하여 95% 유의수준으로 검정하였다.

## 결 과

### 1. EIA방법에 의한 혈청과 양수에서의 IL-6의 농도

LPS을 복강내 주사 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간,

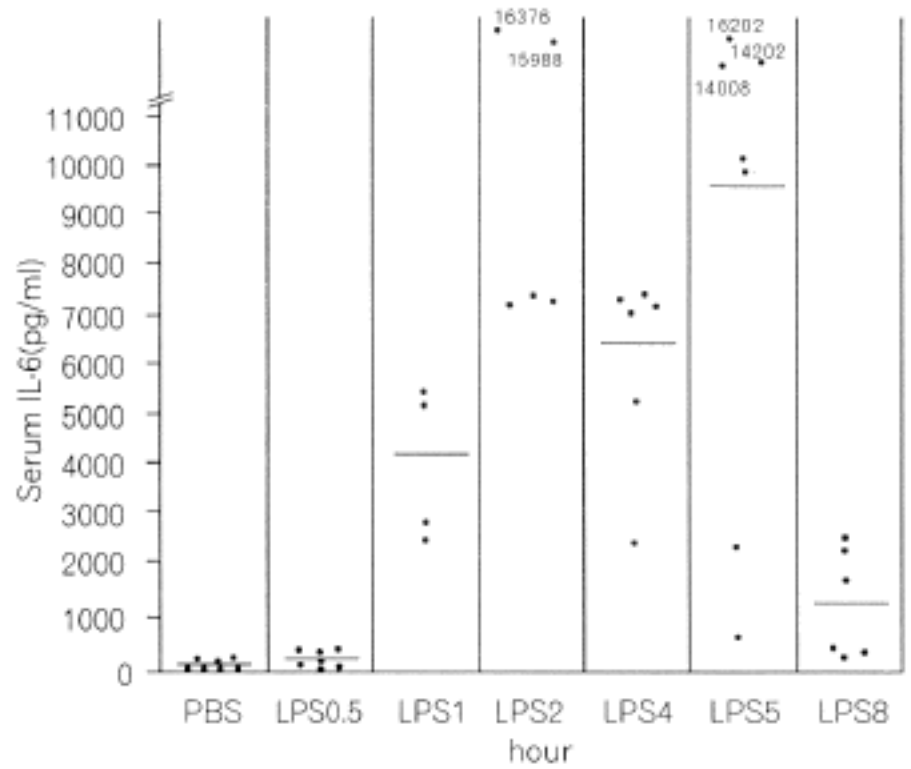




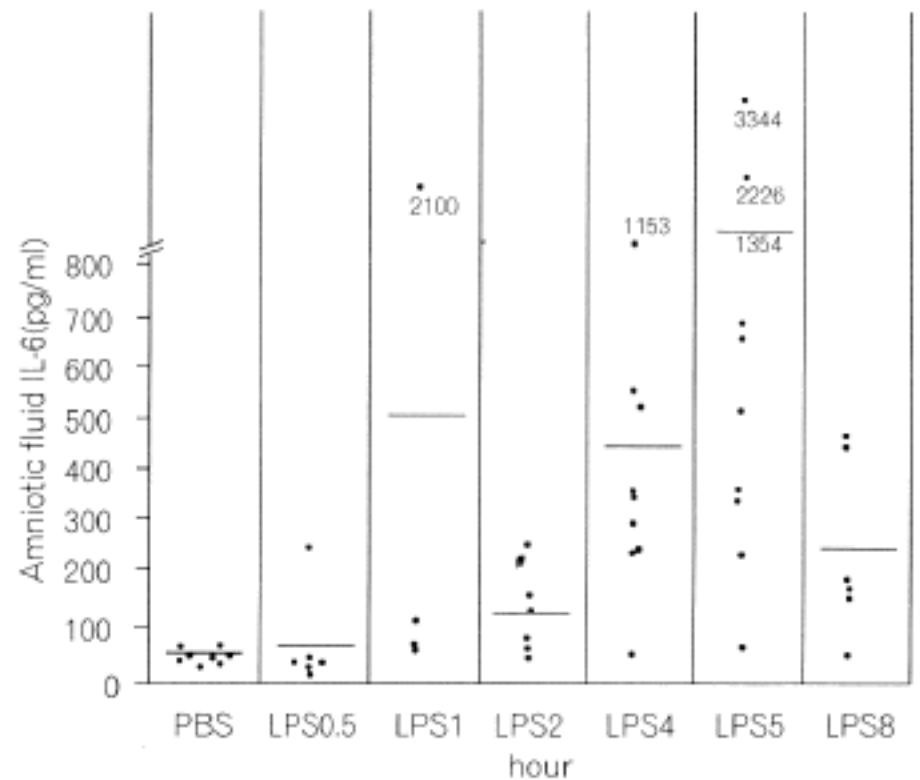
**Fig. 1.** Quantitative PCR analysis of TIMP-3. A: 324 bp PCR products. Lane 1: size marker of  $\phi$ x174DNA/HAEIII, 2: LPS 2 hours placental disc, 3: PBS 2 hours placental disc, 4: PBS 2 hours uterus, 5: LPS 2 hours uterus. B: quantitative PCR analysis.

5시간, 8시간 후에 혈청과 양수에서 IL-6의 농도 변화를 관찰하였다. LPS가 주입된 실험군이 대조군에서 보다 IL-6의 농도 증가를 보였고, IL-6은 혈청과 양수에서 LPS 주사 후 1시간 후 부터 증가 하기 시작하여 8시간 후에는 다시 감소하였다. LPS 주사 후 30분에는 IL-6의 증가는 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 2, Fig. 3). 시간에 따른 농도변화를 볼 때 혈청과 양수에서 1시간, 2시간, 4시간, 5시간에 통계학적으로 유의하게 높은 증가율을 보였고 8시간 후에는 다시 감소하였다 (Table 1).

**2. 태반, 용모양막, 태아, 탈락막 및 자궁내막 상피에서의 면역조직화학적 방법에 의한 IL-6의 발현**  
LPS 주사 전과 후에 태반, 용모양막, 태아, 탈락막



PBS: Treatment of phosphate buffered saline  
LPS: Treatment of lipopolysaccharide  
**Fig. 2.** Time dependent IL-6 concentration in serum by enzyme linked immunosorbent assay.



PBS: Treatment of phosphate buffered saline  
LPS: Treatment of lipopolysaccharide  
**Fig. 3.** Time dependent IL-6 concentration in amniotic fluid by enzyme linked immunosorbent assay.

및 자궁내막 상피조직에서 IL-6의 발현도 차이를 비교하여 보았다 (Table 2). 실험군은 전체적으로 발현도의 증가를 보이나 통계학적 유의성은 없었다. 이는 IL-6이 비교적 높이 증가하기 전의 30분 실험군과 다시 떨어지는 8시간 실험군 때문으로 생각된다. 혈청 및 양수의 IL-6이 비교적 높은 증가를 보이는 1시간, 2시간, 4시간 때에 조직면역화학 염색도 통계학적으로 유의하게 IL-6의 발현 증가를 보였다 (Fig. 4 A, B). 또한 조직에 따라서 발현도를 비교하여 보면, 태

**Table 1.** Mean value of time dependent IL-6 concentration in serum and amniotic fluid by enzyme linked immunosorbent assay

IL-6 Time (hour)	Serum* (pg/ml)		Amniotic fluid** (pg/ml)	
	control (n=8)	study (n=38)	control (n=8)	study (n=38)
0.5	63.3	146.6 ± 85.4	42.2	73.3 ± 78.4
1 ***	29.5 ± 0	4107.2 ± 1420.6	39.4 ± 1.2	503.0 ± 894.2
2 ***	45.2	10898.8 ± 4824.9	52.3	128.9 ± 75.3
4 ***	53.1 ± 34.5	6073.7 ± 1957.3	38.6 ± 4.8	445.9 ± 340.6
5 ***	29.2	9731.8 ± 5975.7	55.4	1354.8 ± 1163.2
8	37.7	1337.9 ± 1000.7	32.7	249.2 ± 172.3

n: Number of animal, \*: P=0.000 (student t-test), \*\*: P=0.043 (student t-test), \*\*\*: P=0.001 (student t-test)

**Table 2.** Mean value of time dependent IL-6 density in placenta, fetus and endometrium by immunohistochemistry

Tissue Time (hour)	Fetal tissue			Maternal tissue****		
	PD	Fetus	CAM	Decidua**	EME***	
Control	218.1 ± 51.7	169.2 ± 70.5	199.0 ± 52.3	110.8 ± 16.2	172.2 ± 61.0	
Study	0.5	205.0 ± 46.8	116.4 ± 35.6	216.8 ± 51.4	125.0 ± 18.2	108.0 ± 10.9
	1*	301.0 ± 58.4	664.2 ± 806.3	291.4 ± 49.7	124.8 ± 15.6	332.0 ± 48.5
	2*	276.0 ± 69.9	151.0 ± 73.5	222.0 ± 43.2	150.0 ± 40.8	209.2 ± 84.4
	4*	351.3 ± 28.4	288.3 ± 87.2	294.7 ± 58.8	170.0 ± 10.0	316.2 ± 33.7
	8	249.2 ± 17.4	193.8 ± 42.3	271.0 ± 59.7	217.6 ± 9.8	330.0 ± 36.8 <sup>1</sup>

PD: placental disc, CAM: chorioamnionic membrane, EME: endometrial epithelium.

\*: P=0.018 (student t-test), \*\*: P=0.011 (student t-test), \*\*\*: P=0.017 (student t-test), \*\*\*\*: P=0.000 (student t-test)

<sup>1</sup>: H-score =  $\sum Pi(i+1)$  : i = optical desity degree (0, 1, 2, 3)

Pi = percentage of stained cells for each given i (from 0% to 100%)

아조적인 태반, 융모양막, 태아에서는 대체적으로 그 발현도가 강하게 나타났으나 LPS 주사 전, 후의 IL-6 증가 차이 비교에서 통계학적 유의성은 없었다. 이와 반대로 모체조직인 탈락막 및 자궁내막 상피세포에서는 대체적으로 그 발현도가 낮게 나타났으나 LPS 주사 전, 후의 증가 비교에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 그러므로 LPS 주사 후 탈락막 및 자궁내막 상피세포의 IL-6이 유의성 있게 증가하나 기본적으로는 임신시 태아 조직이 모체조직보다 IL-6을 많이 분비함을 알 수 있었다.

LPS 주사 후 증가된 양수 IL-6이 모체 혈청에서 기인된 것인지 또는 양수의 주변 조직인 태반, 융모양막, 태아, 탈락막, 자궁내막 상피등에서 직접 생성된 IL-6에서 기인된 것인지를 비교하여 보았다 (Table 3). Spearman correlation coefficients 검정을 하였을 때 양수에서의 IL-6의 증가는 모체 혈청에서 0.55정도 영향을 받았고 양수 주변조직에서 0.59정도 영향을 받았다. 그러므로 양수의 IL-6의 농도 증가는 모체 혈청과 양수 주변조직 의하여 비슷하게 영향받

**Table 3.** Correlation coefficients of IL-6 concentration in amniotic fluid between serum concentration and expression density in placenta and endometrium

IL-6	Serum*	PL & EM**
Amniotic fluid	0.55	0.59 <sup>1</sup>

PL: Placental disc, chorioamnionic membrane, fetus, EM: Decidua and endometrial epithelium, \*: P=0.001 (student t-test), \*\*: P=0.002 (student t-test), <sup>1</sup>: Spearman correlation coefficients

는 것을 알 수 있었다.

**3. 태반, 융모양막, 태아, 탈락막 및 자궁내막 상피에서의 면역조직화학적 방법에 의한 IL-13의 발현**

LPS 주사 전, 후에 태반, 융모양막, 태아, 탈락막, 자궁내막 상피조직에서 IL-13의 발현도 차이를 비교하여 보았다 (Table 4). 대조군에 비하여 LPS 주사 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 5시간, 8시간의 각 조직에

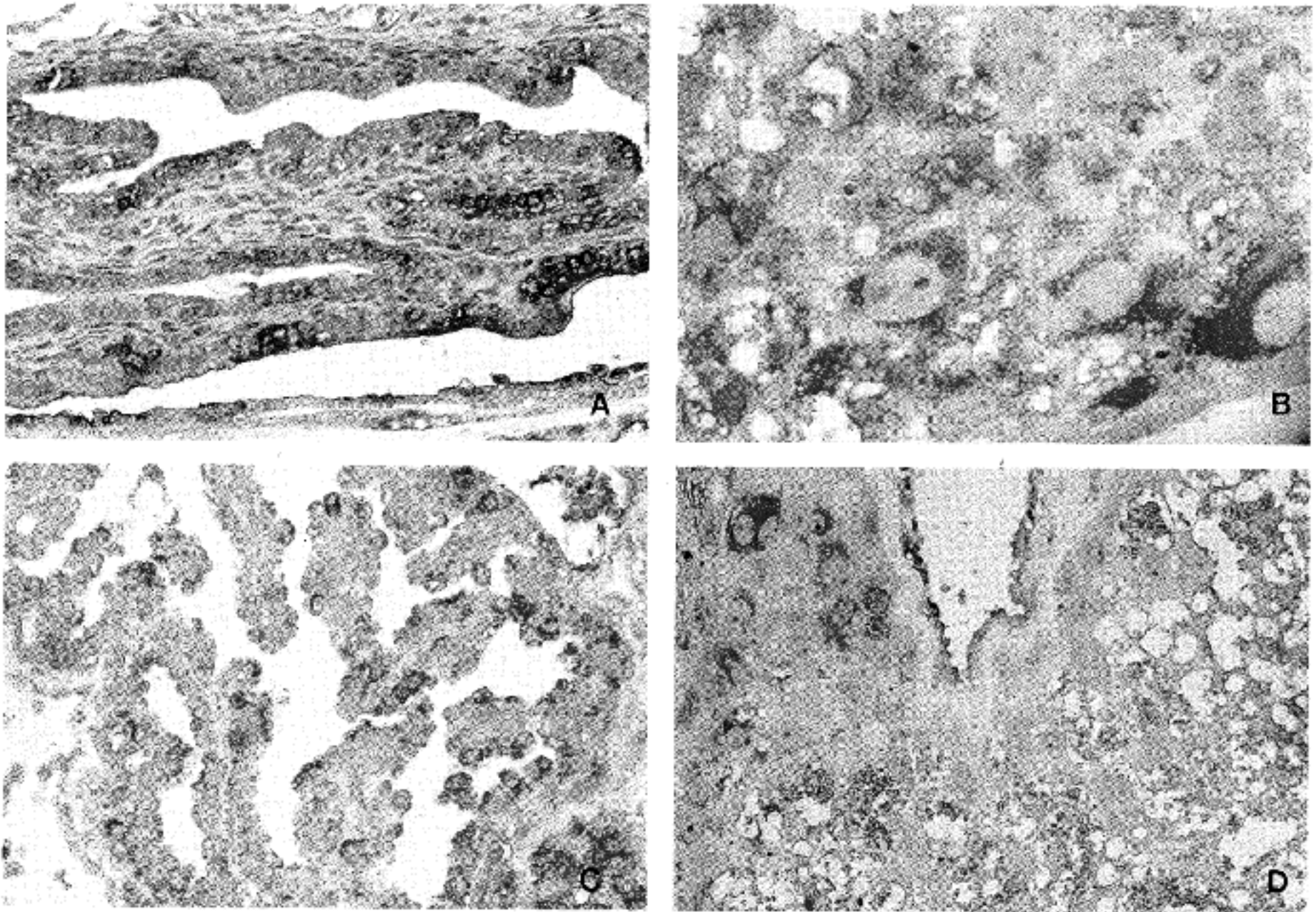


Fig. 4. Immunohistochemistry of IL-6 and IL-13 in placenta and endometrium. A: IL-6 in endometrial epithelium, B: IL-6 in placental disc, C: IL-13 in chorioamnionic membrane, D: IL-13 in placental disc.

Table 4. Time dependent IL-13 density in placenta, fetus and endometrium by immunohistochemistry

Tissue	Time (Hour)	Fetal tissue			Maternal tissue	
		PD	Fetus	CAM	Decidua	EME
Study	Control	141.8 ± 18.2	135.8 ± 17.4	189.4 ± 20.4	138.8 ± 10.5	176.2 ± 21.2
	0.5	206.6 ± 71.5	136.4 ± 25.4	196.2 ± 74.7	181.3 ± 11.1	177.2 ± 83.9
	1	193 ± 78.2	158.3 ± 38.2	201.7 ± 12.6	201.3 ± 45.9	257 ± 72.5
	2	222.6 ± 21.3	129.8 ± 34.7	171.8 ± 46.5	167 ± 39.8	179.6 ± 53.3
	4	201.4 ± 60.2	120.4 ± 44.5	230.5 ± 58.6	157.5 ± 65.1	243.7 ± 53.2
	5	158.6 ± 29.6	135 ± 20.5	175.6 ± 24.8	146.2 ± 46.8	237.3 ± 76.9
	8	176.7 ± 52.3	123.8 ± 33.5	241.8 ± 30.3	159.8 ± 26.7	261.7 ± 19.11

PD: placental disc, CAM: chorioamnionic membrane, EME: endometrial epithelium

† : H-score =  $\sum Pi(i+1)$  ; i = optical desity degree (0, 1, 2, 3), Pi = percentage of stained cells for each given i (from 0% to 100%)

시 IL-13이 증가하는 경향을 보였으나(Fig. 4 C, D), 통계적 유의성은 없었다. 또한 모체조직과 태아조직 간의 IL-13의 발현도 비교시 태아 조직이 좀 더 많은 발현을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

#### 4. 태반, 응모양막, 태아, 탈락막에서의 PCR방법에 의한 TIMP-3의 정량

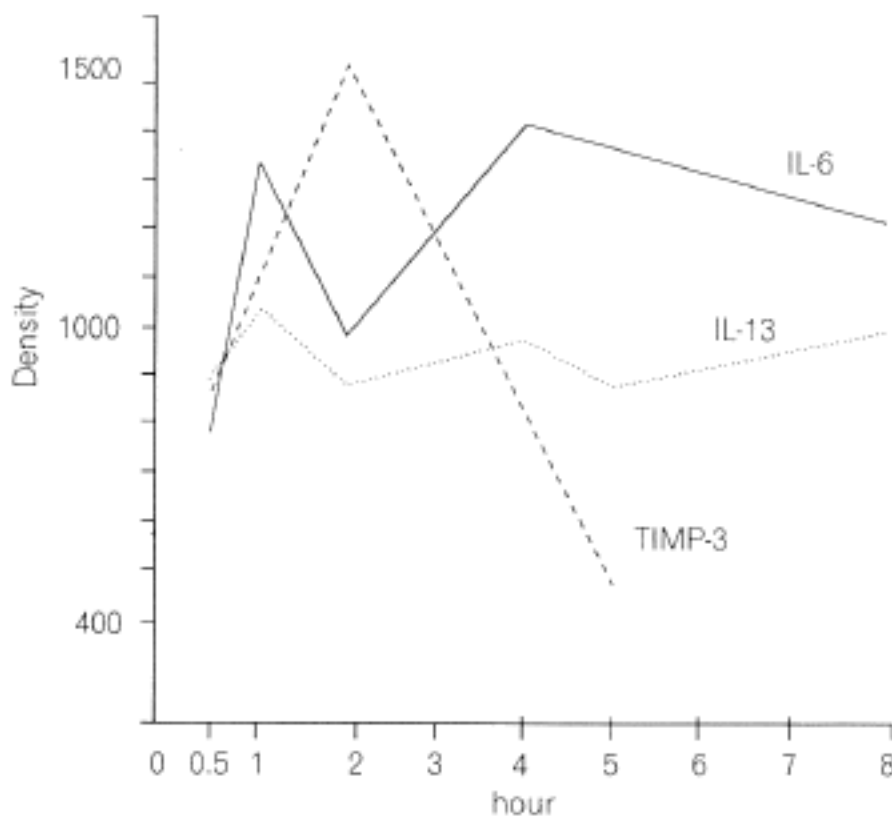
LPS 주사 전, 후의 태반, 응모양막, 태아 및 탈락막



**Table 5.** Mean value of time dependent quantitation of TIMP-3 in placenta, fetus and decidua by PCR

Tissue	Time (hour)	Fetal			Maternal
		PD*	CAM	Fetus	Decidua
Control		121.1 ± 22.9	135.6 ± 18.4	116.8 ± 41.6	105.17 ± 13.5
Study	0.5	162.0 ± 59.8	254.7 ± 8.2	182.3 ± 43.6	218.2 ± 45.3
	2	358.2 ± 133.1	358.2 ± 133.1	416.7 ± 130.0	402.9 ± 23.7
	5	132.0 ± 13.8	105.6 ± 15.0	86.7 ± 9.4	99.5 ± 27.4 <sup>1</sup>

PD: placental disc, CAM: chorioamnionic membrane, \*P=0.041 (student t-test), <sup>1</sup>: Relative level of each cDNA



**Fig. 5.** Correlation of expression densities of IL-6, IL-13 and TIMP-3 in placenta, fetus and endometrium.

의 모든 조직에서 324bp의 TIMP-3의 생성을 확인하였다 (Fig. 1 A). 태아조직인 태반, 용모양막, 태아는 모체조직인 탈락막과 유사한 양으로 TIMP-3을 발현하였다 (Table 5). 전반적으로 대조군 보다 실험군에서 TIMP-3의 발현이 증가되었다. LPS 주사 후 태반 조직에서는 통계적으로 유의하게 TIMP-3이 증가하였으나, 기타 조직에서는 통계적인 유의성이 없었다. 이는 실험 개체가 적었기 때문인 것으로 여겨진다. 반응 시간과 비교시 LPS주사 후 2시간에 가장 높게 나타났으며 5시간에는 다시 감소하여 대조군보다 낮게 나타났다. TIMP-3의 반응 시간은 IL-6과 비슷하게 조기 반응을 나타내었다.

**5. 태반, 태아, 자궁내막에서의 IL-6, IL-13과 TIMP-3 발현의 상호관계**

태반, 태아 및 자궁내막 조직에서의 반응 시간에 따른 IL-6, IL-13, TIMP-3의 발현 관계를 보면, IL-6와

IL-13은 LPS 주사 1시간 후에 같이 올라갔고, 2시간 후에는 같이 내려갔으며, 4시간 및 8시간 후에도 비슷한 상승률을 보였다 (Fig. 5). 통계학적으로 이 둘 사이의 Spearman correlation coefficients는 0.5212 (P=0.027, student t-test)로 서로 비례적 연관성을 보였다.

IL-6과 TIMP-3의 관계는 30분 및 1시간에 IL-6이 먼저 상승하기 시작하여 2시간 까지 먼저 하강하기 시작하는 양상을 나타내어 (Fig. 5), IL-6과 TIMP-3 사이의 어떤 연관성이 예상되었으나 통계적 상관관계는 보이지 않았다.

**고 찰**

감염과 동반된 조기 진통에서 IL-1, TNF, IL-6, IL-8등의 염증성 cytokines이 혈청이나 양수에서 증가되었음이 보고 된 바 있다.<sup>4,27,28</sup> 이 중 IL-6은 가장 예민한 표지자로서 양수에서의 IL-6의 증가는 용모양막의 급성염증을 진단하는데 임상적으로 중요하게 이용될 수 있다.<sup>5</sup> 이와같은 염증의 급성반응 (acute-phase reactions)은 여러 세포에서 유도된 IL-6가 간세포에서 화이브리노젠, α-1-antichymotrypsin, 당단백, hepatoglobin, C-reactive protein과 같은 급성기 단백질의 생합성을 유도하여 나타낸다.<sup>1</sup> 본 연구에서도 LPS 주사 후 혈청과 양수에서 IL-6이 통계적으로 유의있게 증가하였다. Fidel등에 의하면 혈청에서의 IL-6 농도는 LPS 주사 후 4시간에 최고치로 있다가 8시간에는 다시 감소하는 급성반응을 보였고, 양수에서의 IL-6은 LPS 주사 후 8시간까지 시간이 경과하면서 점차 더 증가하는 소견을 보였다.<sup>4</sup> 본 연구에서도 혈청과 양수 모두에서 LPS 주사 후 2, 4, 5시간에 최고치를 보이다가 8시간에 감소하였다. 시간에 따른 변화를 볼 때 혈청의 IL-6은 Fidel등에 의한 연구와 같은 결과를 보였지만, 양수 IL-6은 반응속도에 조금 다른 결과를 보였다. 이와 같이 양수 IL-6의 반응 속도에 차이 나는 이유는 양수에서의 IL-6의 증가 기전 때문이라 생각된다. 양수에서의 IL-6 증가는 1) 모체 혈청 IL-6의 태반 투과, 2) 탈락막등 모체 자궁조직에

서 생성된 IL-6의 태반 투과, 3) 태아 및 태반에서의 직접적인 IL-6의 생성등에 의한다고 가정할 수 있다. 양수 IL-6 농도가 위와같이 다양한 기전에 의하여 영향을 받을 수 있기 때문에 그 반응 속도가 다양하게 나타날 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서 LPS 주사 후 양수 IL-6의 증가가 모체 혈청에서 증가된 IL-6이 양수로 투입하여 들어온 것인지 아니면 양수 주변조직인 태반, 태아, 탈락막의 자궁내막등에 의하여 IL-6이 생성되어 증가된 것인지를 비교하여 보았을 때 양수 IL-6은 비슷한 비율로 모체의 혈청 농도와 양수 주변조직의 IL-6 생성에 의하여 영향을 받았다. 이와 같은 결과는 양수에서 IL-6이 증가할 수 있는 다양한 기전의 가능성을 뒷받침하여 주었다.

IL-6은 염증 후 섬유아세포, 단구세포, 내피세포, 각화성 상피세포등 다양한 세포에서 생성되나,<sup>2</sup> 임신과 연관되어서는 탈락막, 융모양막에서 증가됨이 보고 되어 있다.<sup>3,29</sup> 본 연구에서는 탈락막, 융모양막 뿐만 아니라, 자궁내막 상피세포, 태반, 태아에서도 IL-6의 생성을 보였고, 이들 조직의 IL-6 발현은 LPS 주사 후 통계적으로 유의성있게 증가하였다. LPS 주사 후에 모체조직이 더 예민하게 반응을 나타냈으나, 태아 조직인 태반, 융모양막, 태아가 모체조직인 자궁내막, 탈락막에서 보다 전체적으로 강하게 IL-6을 발현하였다.

최근에 기술된 cytokine인 IL-13은 이 전에 P600 단백질로 알려져 있는 것과 동일한 것으로서 쥐와 사람의 T-helper 세포에서 생성된다.<sup>6</sup> IL-13은 10KDa 분자량으로 132 아미노산의 unglycosylated protein으로 분비되고 주로 단구세포와 B 림프구에 영향을 주어 염증, 알레르기 및 면역 조절과정의 중요한 인자로 여겨진다.<sup>30</sup> IL-13은 주로 단구세포와 B 림프구에 작용하여 이들 세포의 형태, 표현형, 기능과 다른 cytokines의 생성에 영향을 준다. IL-13이 다른 cytokines의 생성에 미치는 영향을 보면, IL-13은 단구세포에서 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8과 TNF $\alpha$ 의 염증성 cytokines의 생성을 저해하나,<sup>30</sup> 비조혈세포인 각화성 상피세포와 내피세포 및 중피세포에서는 IL-6의 생성 및 표현을 증가시킨다.<sup>7,8</sup> 본 연구에서는 LPS로 자극 후 태반, 융모양막, 태아, 탈락막, 자궁내막 상피세포의 비조혈세포에서 IL-6 및 IL-13의 발현 증가를 보였다. 그러나 IL-13의 발현 증가 정도는 조직 및 LPS와의 반응 시간에 통계학적 유의성이 없이 비슷하게 증가하였다. LPS 주사 후 IL-6와 IL-13의 상승 관계를 보면, IL-13이 증가 할 때 IL-6이 증가하였고 IL-13이 감소 할 때 IL-6의 감소를 보였으므로 (Spearman correlation coefficient, 0.5212) 비조혈세포에서 IL-13이 IL-6의 생성 및 표현을 증가시킨다는 먼저 보고들과 일치되는 소견을 보였다.<sup>7,8</sup> 그러므로 IL-13이 태반, 태아, 자궁내막조직에서 IL-6 생성을 증가시킴으로 국소적 또는 전신적 염증과정을 조절하고 있음을

간접적으로 확인할 수 있었다.

TIMPs는 세포 밖 기질의 모든 단백을 분해 시키는 Collagenase (MMP-1), gelatinase (MMP-2)와 stromyelin (MMP-3)등의 MMPs 효소의 활성화를 억제시킨다.<sup>9</sup> TIMPs는 적혈구 조절,<sup>21</sup> 골 흡수,<sup>31</sup> 관절염시 주변조직 손상등<sup>9</sup>의 기능 외에 임신과 관련하여 배란,<sup>11</sup> 착상<sup>12</sup>과 임신<sup>13</sup>에 중요한 역할이 보고되어 있다. TIMP-3은 최근 밝혀진 새로운 유형으로 쥐 및 사람의 유전인자의 클론 및 염기서열이 알려져 있고 쥐에서는 10번 염색체에 사람에서는 22번 염색체에 존재한다.<sup>16,18,32</sup> Apte등은 임신 하반기에 태반의 영양막 세포와 태아 및 신생아의 여러 장기에서 TIMP-3을 관찰하여 발생에서의 어떤 특정 역할을 가정하였다.<sup>16</sup> 본 실험은 임신 제 15일에서 대조군 및 실험군의 태반, 융모양막, 태아, 탈락막의 모든 조직에서 TIMP-3의 존재를 보였다. LPS 주사 후에 TIMP-3의 증가가 관찰되었으며, 특히 태반에서 통계적으로 유의성있게 증가하였다. 태반을 제외한 다른 조직에서는 유의성이 없었다. LPS 처치 후 반응 시간에 따른 TIMP의 발현을 볼 때 LPS 주입 후 30분에 증가하기 시작하여 2시간에 높게 나타났으며 5시간때에는 다시 감소하여 IL-6에서와 같이 급성 반응을 나타낸다고 추정하였다.

TIMP의 생성은 cytokines과 성장 및 발생인자에 의하여 조절되어진다. Cytokines과의 관계를 보면, IL-1과 TNF는 MMPs와 TIMP 모두의 생성을 자극하나, IL-6은 MMPs를 제외한 TIMP만을 자극한다.<sup>21,33</sup> IL-6이 TIMP를 자극시키는 기전으로는 TIMP의 5' flanking region에 STAT3와 AP-1 단백질로 구성된 IL-6/oncostatin M 이 존재하므로 IL-6에 의하여 자극된다고 설명하고 있다.<sup>34</sup> 본 연구에서 TIMP-3와 IL-6과의 관계를 보면, 태반, 태아, 탈락막에서 LPS 주사 후 30분 및 1시간에서 IL-6이 TIMP-3 보다 먼저 상승하였고 1시간 및 2시간에서 IL-6이 TIMP-3보다 먼저 하강하는 양상을 보여 IL-6이 TIMP-3보다 조기에 작용 할 것이라는 가능성을 제시할 수 있었으나 통계적 유의성은 없었다.

## 결 론

임신 제15일 된 46마리의 C<sub>3</sub>H 쥐를 대상으로 하여 이 중 실험군 38마리에는 복강내 LPS를 주사하였고 대조군 8마리에는 phosphate buffered saline를 주사하였다. 주사 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 5시간과 8시간 때에 모체 혈청 및 양수에서 EIA 방법으로 IL-6를 측정하였고, 태반, 태아 및 자궁내막에서 면역조직화학적 및 PCR 방법으로 IL-6, IL-13과 TIMP-3의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) LPS가 주사된 후 모체 혈청 및 양수에서 뿐만 아니라, 태반, 태아, 자궁조직에서 IL-6 표현이 증가하



였다. LPS 주사 후 1, 2, 4, 5 시간에 증가되었다가 8 시간에는 감소되는 급성 반응을 보였다. 모체조직이 태아조직 보다 더 예민하게 IL-6 발현의 증가를 보였다.

2) LPS 주사 후 양수의 IL-6 농도 증가는 모체 혈청과 태반, 태아 및 자궁과 같은 주변 조직에서의 IL-6 생성에 기인하였고, 이들은 비슷한 비율로 영향을 주었다.

3) IL-13은 LPS 처치 후 태반, 태아, 음모양막, 탈락막, 자궁내막 상피세포 모두에서 발현이 증가되었으나 통계적 의의는 없었다.

4) TIMP-3은 LPS 처치 후 태반, 태아, 음모양막 및 탈락막 모두에서 발현이 증가되었고, 특히 태반에서의 의의있게 증가되었다. 또한 IL-6에서와 같이 급성 반응을 보였다.

5) IL-6과 IL-13은 서로 비례적 상관 관계를 보였다. IL-6과 TIMP-3의 관계에서는 IL-6이 TIMP-3보다 조기에 작용할 것이라는 가능성을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다.

위와같은 결과를 종합하여 보면 임신 말기 쥐에서 LPS로 염증 반응을 유도시 IL-6, IL-13 및 TIMP-3이 모두 염증에 관여하며, 특히 혈청, 양수 및 태반, 태아, 자궁내막에서의 IL-6은 염증에 가장 유의성 있게 반응하여 임신시 염증진단에 가장 예민한 표지자로 사용할 수 있음을 확인하였으며, 양수의 IL-6의 증가는 모체 혈청에서 뿐만아니라 태반, 태아 및 자궁내막과 같은 주변조직에서 기인되었음을 알 수 있었다. 또한 이들 IL-6, IL-13과 TIMP-3이 서로 비례적인 관계에 있다는 가능성을 제시 할 수 있었으나, IL-13과 TIMP-3은 연구의 초기 상태이므로 이에 관하여 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Thomson AW. The cytokine handbook. 2nd ed. San Diego: Academic Press 1994; 145-262.
2. May LT, Torica G, Cozzolino F, et al. Interleukin-6 gene expression in human endothelial cells: RNA start sites, multiple IL-6 proteins and inhibition of proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159: 991-3.
3. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato SJ. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 493-500.
4. Fidel PL, Romero R, Wolf N, et al. Systemic and local cytokine profiles in edotoxin-induced preterm parturition in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1467-75.
5. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, et al. Amniotic fluid interleukin-6: a sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 960-70.
6. McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3735-9.
7. Derocq JM, Segui M, Poinot-Chazel C, et al. Interleukin-13 stimulates interleukin-6 production by human keratinocytes. Similarity with interleukin-4. *FEBS Lett* 1994; 343: 32-6.
8. Sironi M, Sciacca FL, Matteucci C, et al. Regulation of endothelial and mesothelial cell function by interleukin-13: selective induction of vascular cell adhesion molecule-1 and amplification of interleukin-6 production. *Blood* 1994; 84: 1913-21.
9. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet* 1990; 6: 121-5.
10. Khokha R, Waterhouse P, Yagel S, et al. Antisense RNA induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science* 1989; 243: 947-50.
11. Curry TE, Mann JS, Estee RS, Jones PB.  $\alpha$ 2-macroglobin and tissue inhibitor of metalloproteinase : collagenase inhibitor in human pre-ovulatory ovaries. *Endocrinology* 1990; 127: 63-8.
12. Graham CH, Lala PK. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J Cell Physiol* 1991; 148: 228-34.
13. Clark IM, Morrison JJ, Hackett MGA, Powell MEK, Cawston TE, Smith SK. Tissue inhibitor of metalloproteinases: serum levels during pregnancy and labor, term and preterm. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 532-7.
14. Waterhouse P, Denhardt DT, Khokha R. Temporal expression of tissue inhibitors metalloproteinase in mouse reproductive tissue. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 219-26.
15. Leco KJ, Hayden LJ, Sharma RR, Rocheleau H, Greenberg AH, Edwards DR. Differential regulation of TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in normal and Ha-ras-transformed murine fibroblasts. *Gene* 1992; 117: 209-17.
16. Apte S, Hayashi K, Seldin MF, Mattei MG, Hayashi M, Olsen BR. Gene encoding a novel murine tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP): TIMP-3, is expressed in developing mouse epithelia, cartilage, and muscle, and is located on mouse chromosome 10. *Dev Dyn* 1994; 200: 177-97.
17. Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes S, Edwards DR. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3(TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 1994; 269: 9352-60.
18. Sun Y, Hegamyer G, Kim H, et al. Molecular cloning of mouse tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and its promoter: specific lack of expression in neoplastic JB6

- cells may reflect altered gene methylation. *J Biol Chem* 1995; 270: 19312-9.
19. Manicourt DH, Fujimoto N, Obata K, Thonar EJ. Levels of circulating collagenase, stromelysin-1, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1031-9.
  20. Ritchlin C, Dwyer E, Bucala R, Winchester R. Sustained and distinctive patterns of gene activation in synovial fibroblasts and whole synovial tissue obtained from inflammatory synovitis. *Scand J Immunol* 1994; 40: 292-8.
  21. Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA) *J Biol Chem* 1991; 266: 2017-20.
  22. Verghese MW, Snyderman R. Differential anti-inflammatory effects of LPS in susceptible and resistant mouse strains. *J Immunol* 1981; 127: 288-93.
  23. Evans TJ, Strivens E, Carpenter A, Cohen J. Differences in cytokine response and induction of nitric oxide synthase in endotoxin-resistant and endotoxin-sensitive mice after intravenous gram-negative infection. *J Immunol* 1993; 150: 5033-40.
  24. Nisolle M, DeMenten Y, Casanas-Roux F, Mathien PE, Wyns C, Donnez J. Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: a new quantitative method. *Fertil Steril* 1994; 62: 751-9.
  25. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
  26. Higuchi T, Narukawa S, Kanzaki H, Fujita J, Iwai M, Mori Y. Expression of messenger ribonucleic acid for gonadal steroid receptors in the human periyoneum. *Fertil Steril* 1995; 63: 52-7.
  27. Bry K, Hallman M. Transforming growth factor- $\beta_2$  prevents preterm delivery induced by interleukin-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 1318-22.
  28. Romero R, Ceska M, Avila C, Mazor M, Behnke E, Lindley I. Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8 in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 813-20.
  29. Dudley DJ, Trautman MS, Araneo B, Edwin SS, Mitchell MD. Decidual cell biosynthesis of IL-6 : regulation by inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol* 1992; 74: 884-9.
  30. Minty A, Chalon P, Derocq JM, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 1993; 362: 248-50.
  31. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Inhibition of stimulated bone resorption in vitro by TIMP-1 and TIMP-2. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1177: 71-4.
  32. Apte SS, Mattei M, Olsen BR. Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP-3 gene to chromosome 22. *Genomics* 1994; 19: 86-90.
  33. Sato T, Ito A, Mori Y. Interleukin-6 enhances the production of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) but not that of matrix metalloproteinases by human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 824-9.
  34. Bugno M, Graeve L, Gatsios P, et al. Identification of the interleukin-6/oncostatin M response element in the rat tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promoter. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 5041-7.
-