

활동성 전신홍반루푸스 환자의 FSC^{high} Memory B 세포의 특징 분석

가톨릭대학교 의과대학 연구원 류마티스연구센터, 의과대학 내과학교실

전주연 · 김영주 · 주지현 · 박성환 · 장숙희 · 김호연

= Abstract =

Characterization of FSC^{high} Memory B Cells from Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus

Joo-Yeon Jhun, Young-Joo Kim, Ji-Hyun Ju, Sung-Hwan Park,
Soog-Hee Chang, Ho-Youn Kim

*The Rheumatism Research Center (RhRC), Catholic Research Institute of Medical Science,
and Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

Objective: To determine phenotypic and functional characteristics of memory B cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE).

Methods: The percentage of memory B cell subsets in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from normal control (n=11), inactive (n=15) and active (n=10) SLE patients was determined by Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS). In addition, the activation status of memory B cells was measured by the surface expression of CD86 (B7-2). The production of antibodies to chromatin and dsDNA (IgG and IgM type) by isolated memory B cell subsets was examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: In this study, we analyzed 2 subtypes of memory B cells: FSC (Forward Side Scatter)^{low} and FSC^{high} memory B cell. The percentage of both subtypes from active and inactive SLE patients was significantly reduced compared to that of normal controls ($p < 0.01$). In addition, the expression of activation markers, CD86 on FSC^{high} memory B cells from active SLE patients was higher than those of inactive SLE patients and normal controls ($p = 0.014$). Upon stimulation with CpG and IL-15 in vitro for 8 days, isolated FSC^{high} memory B cells from active SLE patients

< 접수일 : 2007년 4월 25일, 심사통과일 : 2007년 5월 23일 >

※통신저자 : 김호연, 장숙희

서울시 서초구 반포동 505번지

가톨릭대학교 의과대학 의과학연구원

Tel : 02) 590-2963, Fax : 02) 599-4287, E-mail : rheuma@catholic.ac.kr

revealed augmented production of autoantibodies to chromatin and dsDNA.

Conclusion: Our results suggest that abnormally activated FSC^{high} memory B cells from active SLE patients might be involved in spontaneous production of autoantibodies and induce transition from inactive to active phase of the patients.

Key Words: Systemic lupus erythematosus, Anti nuclear autoantibodies, Memory B cell CD86 (B7-2), CPG

서 론

전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE)는 대표적 자가 면역질환으로 환자의 혈액에서는 다량의 자가 항핵항체(antinuclear antibody, ANA)가 나타나 질환 활성과 관련 있는 것으로 밝혀졌으나 아직까지 이 자가 항핵항체의 발생기전에 대해서는 정확하게 규명이 되지 않은 상태이다 (1,2).

대표적인 자가 항핵항체인 anti-dsDNA antibodies IgG 아형의 경우, 염기서열 분석을 통해서 heavy chain complementarity determining region (HCDR) 부위에 체세포 돌연변이의 비율이 높다는 것이 알려져 있다 (3). 이 변이를 통해서 dsDNA에 대한 결합력이 증가하며, 배선염기서열로 복귀되었을 때 dsDNA에 대한 결합력이 감소되는 연구 결과가 발표되면서, anti dsDNA 자가항체는 non-dsDNA 반응(reactive) B 세포가 체세포 돌연변이와 항원 추진 선택을 통해서 생성된 것이라고 추론되고 있다 (4-7).

체세포 돌연변이와 항원 추진 선택은 이차 림프계 기관의 배증심(germinal center)에서 이루어지고 선택되어진 배증심 B 세포, 중심세포(centrocyte) (CD19+CD27-CD38+)는 기억(Memory) B 세포(CD19+CD27+)나 항체를 분비하는 장기생존 형질세포(plasma cell) (CD19+CD27++)로 분화된다고 알려져 있다 (8). 그러나 배증심 B 세포가 어떤 기전에 의해 기억 B 세포 혹은 형질세포로의 분화가 결정되는지에 관해서는 아직 정확하게 알려져 있지 않다. 또한 기억 B 세포가 형질세포로 분화되는데 필요한 전사인자(transcription factor)는 시험관 내(in vitro) 실험을 통해서 밝혀졌지만 분화유발 인자와 분화기전에 관해서는 정확히 알려져 있지 않고 다만 존속하는 항원이나 사이토카인 수용체 혹은 toll-like receptor (TLR)를 통한 신호에 의해 유발될 것이라고 추론되고 있다

(9,10).

SLE 환자의 말초혈액 단핵세포에는 CD27+ B 세포의 비율, 특히 CD27++ 형질세포의 비율이 질병의 활성도와 비례하여 증가되어 있음이 알려져 있다 (11,12). 이는 기억 B 세포가 형질세포로 분화가 촉진됨이 그 원인 중의 하나일거라고 가정하고 자가항체 생성과 활동성(active) 기억B세포의 상관관계에 관한 연구가 진행되고 있다. 최근 전신성경화증 (SSc) 환자 기억 B 세포의 경우 CD80 (B7.1)+ 기억 B 세포 수가 증가되어 있으며, 생체 외 자극에 의해서 정상인보다 2.5배 이상의 IgG를 분비함이 알려졌다 (13). 하지만 자가항체 분비에는 차이가 없는 것으로 확인됨으로써 자가반응 기억 B세포가 항체 생성세포로의 분화에는 비 자가반응 기억 B 세포와는 다른 요소가 작용할 것이라는 추론이 가능하다.

본 연구에서는 자가반응 기억 B 세포 특이적인 분화요소를 규명하기 위한 전 단계로서, SLE 환자와 정상인의 말초혈액 단핵 기억 B 세포의 표현형과 생체 외에서의 자가항체 생성을 비교 분석하였다.

대상 및 방법

1. 대상

본 연구는 강남성모병원 류마티스 연구센터에서 1997년에 개정된 미국 류마티스 학회(American College of Rheumatology, ACR)의 SLE 분류 기준을 4가지 이상 만족시키는 25명의 환자를 대상으로 진행되었다. 연구 대상이 된 환자는 모두 여자였고 연령은 34.1 ± 7.9 (mean \pm SD)세였다. 건강 대조군은 의료종사자중 최근의 건강검진에서 정상으로 판명된 11명의 자원자로 모두 여자이며 연령은 30 ± 5.7 (mean \pm SD) 세였다. 본 연구는 가톨릭 중앙의료원 강남 성모병원 임상연구관리 규정과 헬싱키 선언을 준수하여 시행하였다. 환자 군은 채혈 당시에 SLE 질병 활성도

(SLE Disease Activity Index, SLEDAI)를 측정하였고, 복용 약물의 종류를 기록하였다 (14). SLEDAI 측정 값이 8점 이상을 활동성군으로(n=10), 8점 이하를 비 활동성군으로(n=15) 분류하였다.

2. 세포 분리

말초혈액 단핵세포는 다음과 같이 분리하였다. 헤파린을 처리한 주사기로 혈액을 phosphate-buffered saline (PBS, Gibco BRL, Carlsbad, CA)와 1 : 1로 섞어 Ficoll (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England) 과 1 : 4의 비율로 Ficoll층에 섞이지 않게 조심스럽게 50mL tube에 천천히 띄운 다음 혈액을 20°C의 2,000 rpm에서 30분간 원심 분리하였다. Buffy Coat 층만을 따서 새 용기에 옮긴 후 PBS로 세척하였다. 말초혈액 단핵세포의 FSC^{high}와 FSC^{low} 세포는 FACs Ventage (Becton Dickinson, San Jose, CA)로 분리하였다. 세포를 anti-CD19 PE Cy5 (Pharmingen San Diego, CA)와 anti-CD27 FITC (Pharmingen, San Diego, CA), anti-CD86 PE (Pharmingen, San Diego, CA) 항체로 4°C에서 30분간 염색하고 PBS (Gibco BRL, Carlsbad, CA)로 2번 씻어준 후 10% 우태아 혈청이 포함된

RPMI1640 (Gibco BRL, Carlsbad, CA)에 다시 부유시켜서 분리 분석하였다.

3. 세포 자극 및 배양

유세포 분석기(FACs Ventage)로 분리해서 얻은 FSC^{high}와 FSC^{low} 세포는 3×10^4 개 세포 수를 맞추어 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI1640 세포 배양액과 함께 CpG2006 (Invivogen, San Diego, CA) 2.5 μ g/mL와 IL-15 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 10 μ g/mL와 함께 자극하여 8일 동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

4. 자가항체 측정

FSC^{high} 세포와 FSC^{low} 세포를 IL-15와 CPG로 자극하고 8일간 배양하고 난 후 그 상층액에서 항 chromatin 항체(chromatin IgG, chromatin IgM), dsDNA IgG 및 dsDNA IgM의 농도를 ELISA 법으로 측정하였다. 항 Chromatin 항체의 ELISA 측정 방법은 다음과 같다. dsDNA (Sigma Chemical, Co.)를 50 μ g/mL 농도로 PBS에 희석하여 96 well Immuno plates (Dyna-tech Laboratories, Chantilly, Virginia, USA)에 도포한

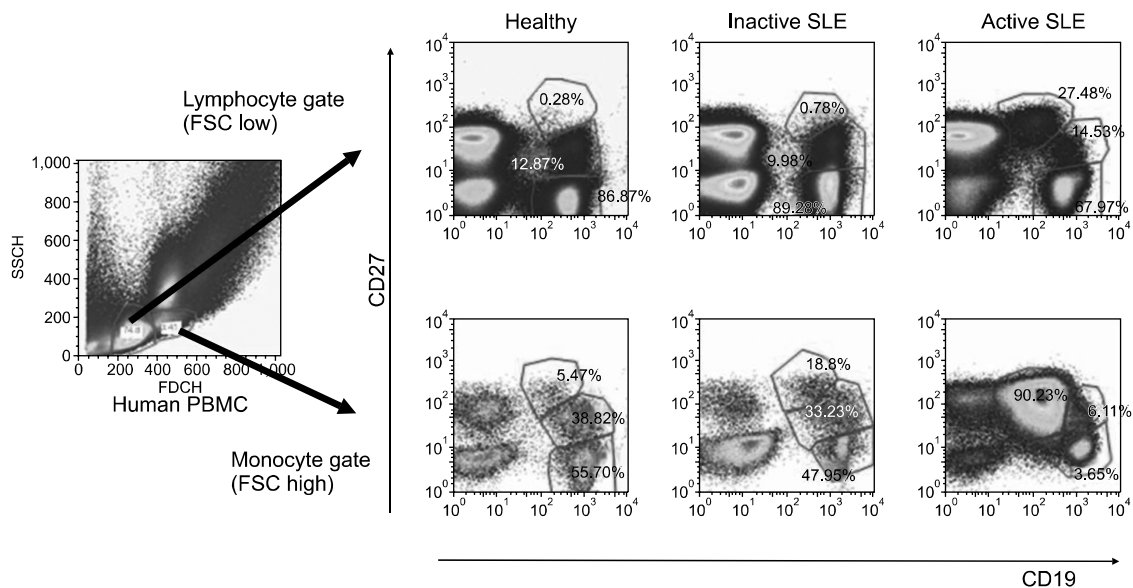


Fig. 1. Frequency of B cell subsets in human PBMC CD19⁺, CD27⁻ naïve B cells, CD19⁺, CD27⁺ memory B cell, and CD19^{low}, CD27⁺⁺ plasma cells were determined in patients with active and inactive SLE and in healthy controls by flow cytometric analysis using 2 different gates; Lymphocyte gate (FSC^{low}) and monocyte gate (FSC^{high}).

다음 4°C에서 18시간 방치하였다. 도포된 용액을 제거한 후 비 특이적인 결합을 억제하기 위해 3% PBS에 0.1% bovine serum albumin (BSA; Amresco, Solon, OH)이 포함된 용액을 200 μ L씩 넣고 2시간 실온에서 방치 시킨다. 항 chromatin 항체를 측정하기 위해서 FSC^{high}와 FSC^{low} 세포를 배양하여 얻은 상층액을 1 : 5 비율로 희석하여, 샘플을 well당 50 μ L씩 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 PBS로 3번 세척후, 검출항체 alkaline phosphatase-conjugated 항-human IgG와 IgM (Jackson Immuno-Reserch Laboratories Inc, West Grove, Pennsylvania, USA)를 도포한 후 실온에서 2시간 동안 반응 시킨다. 기질로는 Para-nitrophenyl phosphate를 사용 하였고 405 nm에서 흡광도로 측정하였다.

5. 통계적 유의성의 검증

실험 결과는 평균±표준오차로 표현하였으며, SPSS 통계 프로그램(version 10.0)을 사용하였다. 정상인과 환자군의 평균비교는 Mann-Whitney test 와 질병 활성도, 항체 역가등과의 상관관계는 Spearman 상관 계수를 이용하였으며, p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의 하다고 분석하였다.

결 과

1. CD19⁺ CD27⁺ 기억 B 세포 아형 분석

기억 B 세포가 naïve B 세포에 비해 세포의 사이

즈가 커져 있기 때문에 일반적인 lymphocyte 구획 (FSC^{low})과 monocyte 구획 (FSC^{high})에서 CD19+CD27+ 기억 B 세포의 빈도를 각 구획의 CD19+ B 세포에 대한 %로 분석하였다 (11)(그림 1). Odendahl 등 (15)의 결과와 유사하게 활동성 SLE 환자의 말초혈액 단핵세포는 항체생성세포의 빈도가 비정상적으로 증가된 것을 관찰할 수 있었다 (표 1). 기억 B 세포의 경우, 그와 반대로 활동성과 비활동성 환자 모두에서 정상인에 비해 감소되어 있음이 관찰되었다(표 2). 특히 활동성 환자의 FSC^{high} 기억 B 세포의 경우 정상인 (p<0.01)에 비해 현저히 감소했으며 비활동성 환자의 경우와 비교할 때에도 뚜렷이 감소되어 있었다(p=0.018).

2. 활동성 SLE 환자의 FSC^{high} 기억 B세포에서 CD86 발현 증가

기억 B 세포의 빈도가 비활동성 SLE 환자에 비해 서 활동성 환자에서 감소되어 있고 항체생성세포가 현저하게 증가해 있는 사실을 근거로 하여 활성화된 FSC^{high} 기억 B 세포가 항체생성세포로 활성 촉진됨을 가정할 수 있다. 그리하여 FSC^{low} 기억 B 세포와 FSC^{high} 기억 B 세포 각각의 활성 표지(activation marker)인 CD86 (B7-2)의 발현정도를 유세포분석기로 비교 분석하였다(그림 2A, B).

정상인과 비활동성 환자의 경우는 FSC^{low} 기억 B 세포와 FSC^{high} 기억 B 세포의 CD86 발현 정도에는 서로 차이가 없었으나 활동성 환자의 FSC^{high} B세포에서 CD86 발현이 뚜렷이 증가되어 있음이 관찰되었다.

Table 1. Frequency of plasma cells from healthy, inactive SLE and active SLE

	FSC ^{low} CD27++CD19 ^{low} /FSC ^{low} CD19+cells	FSC ^{high} CD27++CD19 ^{low} /FSC ^{high} CD19+cells
Healthy (n=11)	0.43±0.33*,**	13.40±7.39*,***
Inactive SLE (n=15)	1.38±1.38 [†]	26.27±14.85 [†]
Active SLE (n=10)	5.82±8.13	59.93±20.58

*Significant difference between healthy and inactive SLE(p<0.01), **No Significant difference between healthy and active SLE (p=0.065), ***Significant difference between healthy and active SLE (p<0.001), [†]Nosignificant difference between inactive and active SLE (p=0.119), [†]Significant difference between inactive and active SLE (p<0.001)

Table 2. Frequency of memory B cells from healthy, inactive SLE and active SLE

	FSC ^{low} CD27+CD19+ /FSC ^{low} CD19+cells	FSC ^{high} CD27+CD19+ /FSC ^{high} CD19+cells
Healthy (n=11)	29.23±8.24*,**	54.48±9.70*,**
Inactive SLE (n=15)	17.56±12.49***	35.09±10.22 [†]
Active SLE (n=10)	15.20±9.67	21.54±13.79

*Significant difference between healthy and inactive SLE (p<0.01), **Significant difference between healthy and active SLE (p=0.002), ***No significant difference between inactive and active SLE (p=0.601), [†]Significant difference between inactive and active SLE (p=0.018)

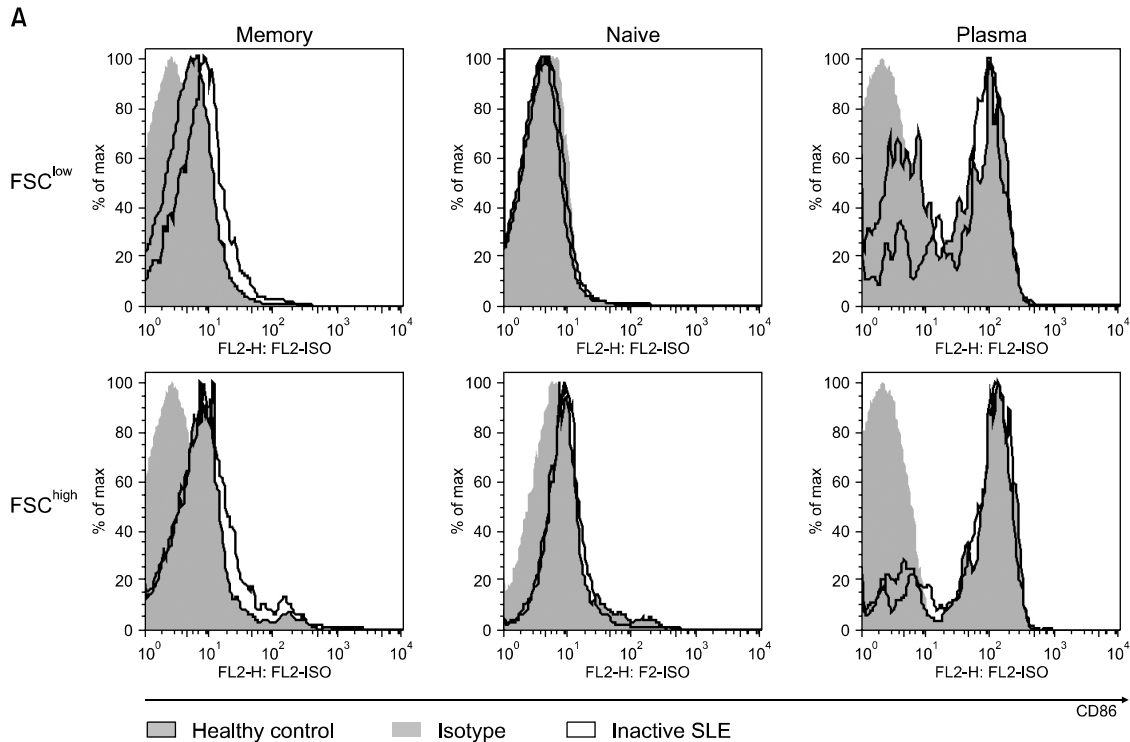


Fig. 2A. CD86 expression on the memory , naïve and plasma cells from normal control and inactive lupus patients. one of three independent experiments is shown.

3. SLE 환자의 FSC^{high} 기억 B세포에서 anti-chromatin과 anti-dsDNA 항체 생성의 증가

항핵항체의 표적항원은 알려져 있지만 이 항원이 실제로 항핵항체 생성을 유발하는 인자인지는 알려져 있지 않다. 인간 기억 B 세포는 항원 특이적인 T 세포 도움과 상관없이 CpG 혹은 CpG와 인터루킨 15 동시 자극에 의해서 항체를 생성한다 (10). FSC^{high} 기억 B 세포가 자가항체를 분비할 수 있는지를 알아보기 위해 말초혈액 단핵세포에서 분리한 FSC^{high} 기억 B 세포를 생체 외에서 CpG와 IL-15으로 8일 동안 자극 후 자가항체 생성을 ELISA로 측정 하였다(그림 3).

활동성 환자의 FSC^{high} 기억 B 세포는 정상인과 비활동성 환자에 비해 IgM형과 IgG형 anti-dsDNA 항체와 anti-chromatin 항체의 역가가 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

고 찰

정상인의 경우, 자가항체를 분비하는 자가반응 (autoreactive) B 세포는 중심 관용 메카니즘(central tolerance mechanism)에 의해 말초에 도달하기 전에 여러 check point에서 대부분 제거되지만, 배중심 상호작용을 통해서 새롭게 생성될 가능성이 있다 (4). 대표적인 자가 항체인 anti-dsDNA 항체의 heavy chain complementarity determining region에 발견되는 체세포 돌연변이는 자가반응 B 세포가 배중심에서 새로 발생했을 가능성을 보여주고 있다 (4). 하지만 배중심을 통해서 새롭게 생성된 자가반응 B 세포 제거 기전에 대해서는 알려진 바가 없다. 최근 SLE 환자의 기억 B 세포의 이상이 알려지면서 기억 B 세포에서 형질세포로의 분화과정이 자가반응 B 세포의 검색 및 제거표적지점으로 연구되고 있다 (15).

본 연구에서는 인간 말초혈액 단핵 기억 B 세포

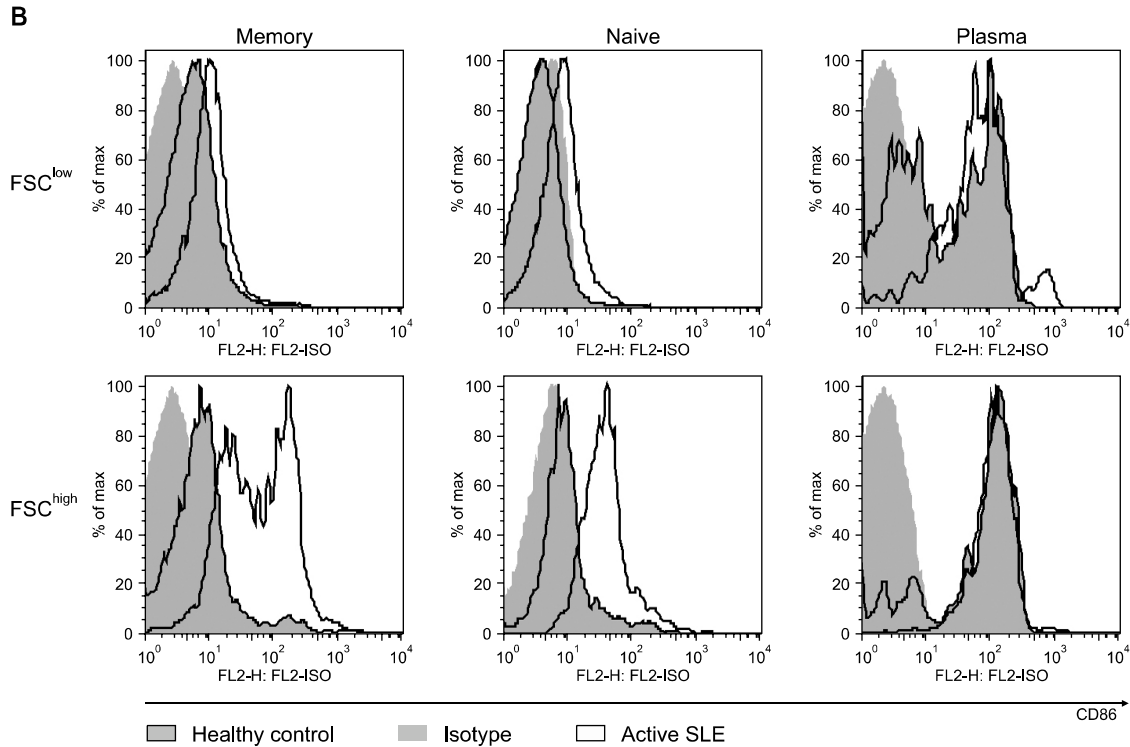


Fig. 2B. CD86 expression on the memory, naïve and plasma cells from normal control and active lupus patients. one of three independent experiments is shown.

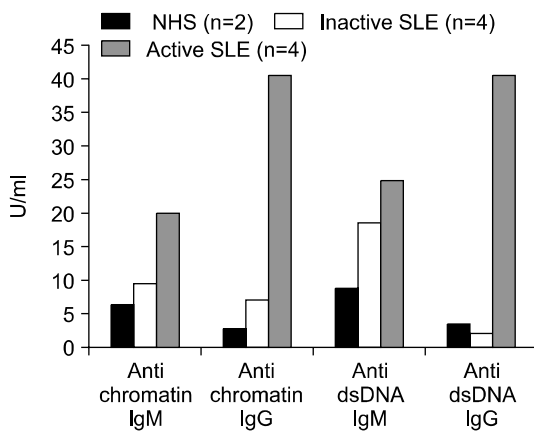


Fig. 3. Autoantibody production by FSC^{high} memory B cells stimulated with CpG and IL-15 for 8 days in vitro each histogram shows the mean results obtained from each group. *(normal healthy supermatant).

를 세포 크기에 따라 2개의 아형(FSC^{high} 기억 B 세포와 FSC^{low} 기억 B 세포)으로 나누고 각각의 빈도를 정상인과 SLE 환자에서 비교 분석하였다. SLE 환자의 경우는 정상인에 비해 두가지 아형의 기억 세포 빈도율이 모두 감소 하는 것을 관찰하였다.

본 연구결과와 다르게 Odendahl 등 (15)의 연구결과에 따르면, SLE 환자의 특징인 림프구 감소증이 기억 B 세포 개체 보다 naïve B 세포에서 더 현저하게 나타나기 때문에 상대적으로 기억 B 세포의 빈도율이 증가하고, 면역억제 치료(immunosuppressive therapy)에 반응하여 기억 B 세포의 반응성이 naïve B 세포의 반응성에 비해 감소 되어 있어 상대적으로 naïve B 세포 보다는 기억 B 세포의 숫자가 증가 되어 있다고 보고 되었다. Odendahl 그룹의 고찰에서 언급 한대로 면역 억제 치료를 전혀 하지 않은 환자의 경우, 특히 활성 환자의 경우에 기억 B 세포의 감소율이 더 현저하게 나타나는 것을 우리 실험 결과에서도 확인할 수 있었다. 따라서 우리 결과와

Odendahl의 결과와의 차이는 결국 환자의 면역억제 치료제의 투약 정도나 유무에 의한 차이라고 보여진다. 하지만 면역억제제가 기억 B 세포의 활성화에 미치는 연구보고가 없으므로, 앞으로의 연구에서는 가능한 면역 억제제를 복용하지 않은 환자군도 포함한 실험군이 추가되어야 할 것 이다. 그러나 항체 생성 세포의 경우 Odendahl의 보고와 같이 SLE 환자에게서 현저히 증가되는 현상을 확인할 수 있었다.

우리는 활동성 환자의 기억 B 세포 빈도율이 비 활동성 환자의 경우에 비해 감소되어 있는 원인으로 서 현재까지 알려지지 않은 원인이 있을 것을 생각하고 기억 B 세포가 활성화 되고, 항체생성세포로 분화 됨으로써 상대적으로 감소될 것이라고 가정해 보았다.

이러한 가정에 따라 기억 B 세포의 활성화 상태를 B 세포 활성 지표 중 하나인 CD86 발현 정도를 가지고 분석했을 때, 활동성 환자의 기억 B 세포, 특히 FSC^{high} 기억 B 세포에서 그 발현이 증가되어 있었다. 이 결과로는 활성환자의 FSC^{high} 기억 B 세포가 활성화 되어있음을 확인할 수 있었다. 하지만 이러한 결과만으로 이 활성화 상태가 직접적으로 형질세포로의 분화를 촉진하는지는 알 수 없다. 그러나 활동성 환자의 FSC^{high} 기억 B 세포가 항원 비 특이적인 생체 외 자극에 의해서 비활동성 환자나 정상인에 비해서 더 많은 양의 자가항체(anti-dsDNA, anti chromatin antibody)를 분비하는 사실로 활성화된 기억 B 세포는 외부자극에 의해서 쉽게 항체생성 세포로 전환되는 것 같다. 이런 사실로 보아 SLE 환자의 기억 B 세포는 어떤 원인에 의해 세포가 활성화 되고 형질 세포로 분화되어 자가항체를 분비하고 그 결과로 환자의 상태가 활성상태로 전환되는데 기여할 것이라고 가정할 수 있다. 하지만 환자의 질병 활성도가(활동성과 비활동성) 자가 항체의 혈중 존재 정도와 항상 비례하지 않고, SLE의 임상적 특성과 자가항체와의 연관성이 불분명하므로 SLE 발병에 미치는 활성 기억 B 세포의 역할을 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다.

결 론

활동성 SLE 환자의 말초혈액에 존재하는 FSC^{high}

기억 B 세포는 정상인이나 비활동성 환자의 세포군들과 비교할 때 B 세포 활성 표지자인 CD86을 더 많이 발현하고 있다. 그리고 항원 비특이성 자극에 의해서도 많은 양의 자가항체가 형성됨을 관찰하였다. 이런 결과는 말초에서 자가면역 반응의 기전을 밝히고 활성 SLE 환자의 병인을 규명하는 기초 자료가 될 것이다.

REFERENCES

- 1) Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nature Immunol* 2001;2:764-6.
- 2) Thomas HW, Holger F, Joachim R, Kalden. Analysis of immunoglobulin variable region genes from human IgG anti-DNA hybridomas. *Eur J Immunol* 1992;22: 1718-28.
- 3) Gregory CI, Robert LS, Michael Z, Ivaylo I, Ryoki K, Cosima Z, et al. Forced usage of positively charged amino acids in immunoglobulin CDR-H3 impairs B cell development and antibody production. *J Exp Med* 2006;203:1567-78.
- 4) Wellman U, Letz M, Hermann M, Angermuller S, Kalden JR, Winkler TH. The evolution of human anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:9258-63.
- 5) Mark JS, Ann HA, David SP, Martin GW. Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *PNAS* 1987;84:9150-4.
- 6) Dan E, Malka H, Francois T, Laurent J, Jean-Francois B. The VH gene sequences of anti-DNA antibodies in two different strains of lupus prone mice are highly related. *Eur J Immunol* 1989;19:1241-6.
- 7) Marion TN, Tillman DM, Jou NT. Interclonal and intracloal diversity among anti-DNA antibodies from (NZBxNZW) F1 mouse. *J Immunol* 1990;145:2322-32.
- 8) Louise J, Michael G. Antigen-Specific Memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 2005;23:487-513.
- 9) Neal NI, Ann HL, Prasanth V, Kevin LO, Klaus R, Laurie HG. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nature immunology* 2003;4:321-9.
- 10) Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 2002;298: 291-4.
- 11) Wirths S, Lanzavecchia A. ABCB1 transporter discri-

- minates human resting naïve B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol* 2005;35:3433-41.
- 12) Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, et al. Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;48:1332-42.
- 13) Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naïve B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* 2004;50:1918-27.
- 14) Bombardier D, Cladman DD, Urowith MB, Chang CH, and the Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
- 15) Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2000;165:5970-9.
-