

抗炎因子 TSG-6 抑制兔耳瘢痕增生的实验研究

王 晖 李小静 陈 钊

摘要 目的 通过建立兔耳增生性瘢痕模型,研究肿瘤坏死因子 α 刺激基因-6(TSG-6)在增生性瘢痕形成过程中的作用及机制。方法 建立兔耳增生性瘢痕模型,右侧耳创面为实验组,注射 TSG-6,左侧均注射等量 PBS 作为对照组,通过比较各组瘢痕指数(SEI)及 I、III 型胶原表达的不同来评价瘢痕增生程度的差异。采用免疫组化法及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)在各组中的表达;以透射电镜观察及 TUNEL 法检测瘢痕组织成纤维细胞凋亡的变化。结果 与 PBS 对照组比较,TSG-6 治疗组炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 表达减少,炎症反应明显减轻,瘢痕组织成纤维细胞凋亡明显增多,且 SEI 及 I、III 型胶原含量均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 抗炎因子 TSG-6 能明显减弱增生性瘢痕的形成,其对瘢痕形成的抑制作用可能与抑制炎症反应及促进成纤维细胞凋亡相关。

关键词 动物模型;增生性瘢痕;兔;炎症;TSG-6

中图分类号 R 619+.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0045-05

肿瘤坏死因子 α 刺激基因-6(tumor necrosis factor α stimulated gene 6, TSG-6)是肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白-6(tumor necrosis factor alpha induced protein, TNFAIP6)的编码基因,是在筛选肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)干预的人纤维细胞 cDNA 表达文库时发现的一个新基因,其表达可被 TNF- α 和白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)等许多信号分子诱导^[1-2]。由于基因启动子序列中存在激活物蛋白 1 和核因子白细胞介素结合位点, TNF- α 、IL-1 等促炎因子刺激后,该基因在成纤维细胞中表达显著增高,因此被认为是一个受 TNF- α 调节的、参与多种炎症反应的基因。TSG-6 基因编码蛋白含 277 个氨基酸,属透明质酸(hyaluronic acid, HA)结合蛋白家族,主要由相邻的连接组件和 CUB 组件组成,可与 HA、硫酸软骨素、蛋白多糖以及蛋

白聚糖的 G1 链结合^[3]。Tan et al^[4]实验证实抗炎因子 TSG-6 在瘢痕疙瘩、正常瘢痕和无瘢痕皮肤中的差异分布。然而, TSG-6 对瘢痕组织形成的影响未见报道。该研究以兔耳瘢痕模型为基础观察 TSG-6 局部创面注射对增生性瘢痕形成的影响,并探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 rhTSG-6 购于美国 R&D Systems 公司, I 型、III 型胶原及 TNF- α 抗兔抗体购于美国 Biorbyt 公司, 兔白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 抗体、兔白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) 抗体购于美国 Bioss 公司, 二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 原位细胞凋亡检测试剂盒购于美国 Trevigen 公司, 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 引物设计合成于上海捷瑞生物工程有限公司, 逆转录试剂盒、RT-PCR 扩增试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 兔耳瘢痕模型的建立及用药 选用健康成年新西兰大白兔 6 只(购自安徽医科大学实验动物中心)雌雄不拘, 体重 2.5~3.0 kg, 分笼饲养。兔耳瘢痕模型的制作参照 Morris et al^[5]方法: 用 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 进行耳缘静脉麻醉, 严格无菌操作条件下, 选取兔耳腹侧面远离耳根部位无毛或少毛区, 沿长轴避开可见血管, 以角膜环钻在兔耳腹侧作直径为 7 mm 创面, 去除兔耳全层皮肤并刮除软骨膜, 每只兔耳作 6 个相同创面, 共计 72 个创面, 术后创面暴露。选择兔右耳瘢痕作为 TSG-6 实验组, 兔左耳瘢痕为 PBS 对照组。1 μ g TSG-6 予 10 μ l PBS 溶解后用微量注射器分别于术后当天及术后 5、10、15 d 进行右侧耳创面局部注射, 左侧兔耳创面同时注射等量 PBS 作对照。术后 26 d 3% 戊巴比妥钠做耳缘静脉麻醉, 切取标本。用作 HE、免疫组化染色的标本置于 4% 中性甲醛中固定, 其余均用深低温冰箱 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 方法

1.3.1 HE 染色 标本行 4% 多聚甲醛固定, 梯度酒精脱水; 二甲苯透明; 常规石蜡包埋、切片、HE 染

2014-09-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81272107)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院整形外科, 合肥 230022

作者简介: 王 晖, 男, 硕士研究生;

李小静, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lixiaojing5@163.com

色;光镜观察并摄片。瘢痕增生程度以光镜下测量的瘢痕指数(scar elevation index ,SEI) [5] 表示。

1.3.2 透射电镜观察 标本行 2.5% 戊二醛 4 ℃ 预固定 2 h; PBS 缓冲液漂洗 3 次; 1% 锇酸 4 ℃ 后固定 2 h; 常规电镜样品脱水、浸透、包埋、超薄切片和铀铅染色; 透射电镜观察并照相。

1.3.3 免疫组化染色 各组兔耳病理性瘢痕组织石蜡切片入梯度乙醇溶液中脱蜡; 水化; PBS(pH 7.4) 冲洗; 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶; 枸橼酸钠缓冲液热抗原修复; 小牛血清封闭; 一抗分别为 I 型、III 型胶原及 TNF-α 抗兔抗体和兔 IL-1β 抗体、兔 IL-6 抗体; DAB 显色; 苏木精复染; 中性树胶封片。已知阳性片作阳性对照 ,PBS 代替一抗作阴性对照。显微镜观察并拍照。

1.3.4 TUNEL 法检测细胞凋亡情况 实验操作参照原位凋亡检测试剂盒说明书进行 ,基本步骤如下: 各组兔耳病理性瘢痕组织石蜡切片置于梯度乙醇溶液中脱蜡 ,水化 ,PBS(pH 7.4) 冲洗 20 μg/ml 蛋白水解酶 K(10 mmol/L Tris/HCl pH 7.4) 室温下消化 30 min ,PBS 漂洗切片 2 次 ,吸干样品周围水分 ,滴加 50 μl TUNEL 反应混合液(阴性对照滴加 50 μl 标记液) ,湿盒内 37 ℃ 避光孵育 60 min; PBS 漂洗玻片 3 次 样品直接或封片后显微镜观察。染色区域位于细胞核 光镜下观察正常的成纤维细胞细胞核呈蓝色 ,为阴性反应 ,凋亡细胞的细胞核呈深浅不一的棕褐色 ,为阳性反应 ,即凋亡细胞。在高倍镜(× 400) 视野下 ,每张切片选择 5 个阳性视野 ,每个视野计数 100 个成纤维细胞中的阳性细胞数 ,计算平均阳性细胞数所占的百分比 ,即凋亡指数。

1.3.5 RT-PCR 检测炎症因子 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的表达 将冻存的瘢痕组织放入研钵中加入液氮研磨 加入 TRIzol 后经过震荡、离心将提取出的 RNA 沉淀溶于 0.1% 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate ,DEPC) 水中 ,用紫外分光光度计分别检测 260、280 nm 处吸光度(absorbance ,A) 值(A₂₆₀、A₂₈₀) ,并计算 RNA 浓度。逆转录反应参照逆转录试剂盒说明严格执行。扩增引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成 ,见表 1。

扩增条件: 95 ℃ 预变性 3 min ,94 ℃ 变性 30 s ,56 ℃ 退火 30 s ,72 ℃ 延伸 90 s ,72 ℃ 终末延伸 8 min ,共 35 个循环。最终获得产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 ,用凝胶成像分析系统对图像进行分析 ,测定条带光密度值 ,以 β-actin 作比较计算炎症因子相对 mRNA 比值 ,并行统计学分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,两组之间数据比较采用 *t* 检验。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	片段长度 (bp)
β-actin	F: ATTGGCATGGCTTTATTTCGT	105
	R: CACCTTCACCGTTCCAGTTT	
IL-1β	F: ATCTCCTGCCAACCCCTACAAC	269
	R: AGTCATACGTGCCAGACAAC	
IL-6	F: ATTTGAATGAAGAAGCCACCC	289
	R: AATAGTGTCTAACCCTCATCTTC	
TNF-α	F: CTGCCTCAGCCTCTTCTCTTT	205
	R: TTGCGGTTTGCTACTACG	

2 结果

2.1 大体观察 术后 3 d 死亡 1 只 ,剩余 5 只 ,全部纳入实验分析 ,创面均于术后 12 ~ 14 d 完全愈合 ,PBS 对照组的 30 个创面模型中 ,术后 21 d 左右 瘢痕组织逐渐高出皮肤 ,呈现淡红色 ,术后 26 d ,30 个创面共形成增生性瘢痕 24 个 ,占 80.0% 瘢痕增生明显高出皮面且有挛缩现象。PBS 对照组瘢痕块颜色较红 ,质地较硬 ,瘢痕高出皮肤平面 ,增生范围未超出原创缘; TSG-6 实验组瘢痕颜色淡 ,质地较柔软。

2.2 TSG-6 与瘢痕增生 显微镜下用测微尺进行测量并计算瘢痕指数 ,TSG-6 实验组瘢痕指数为 (1.92 ± 0.15) ,PBS 对照组瘢痕指数为 (1.29 ± 0.18) ,两组比较差异有统计学意义 (*n* = 12 ,*t* = 9.31 *P* < 0.01) 。免疫组化染色结果显示 TSG-6 实验组 I 型、III 型胶原沉积明显较 PBS 对照组减轻。见图 1。

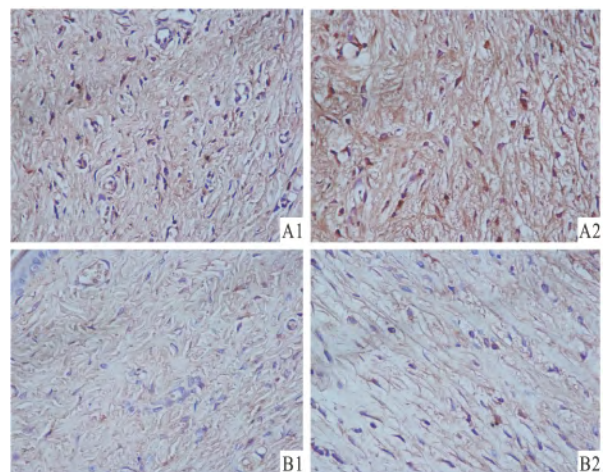


图 1 I 型、III 型胶原免疫组化染色结果 DAB × 400
A: PBS 对照组; B: TSG-6 实验组; 1: I 型胶原; 2: III 型胶原

2.3 TSG-6 与细胞凋亡 透射电镜形态学观察可见 TSG-6 实验组细胞凋亡显著,细胞内可见核固缩、线粒体肿胀及凋亡小体等,而 PBS 对照组细胞内未见明显凋亡表现。见图 2。TUNEL 半定量检测分析发现 TSG-6 实验组凋亡指数为 (0.42 ± 0.05) ,明显高于 PBS 对照组 (0.30 ± 0.03) ,差异有统计学意义 ($n=12, t=7.13, P<0.01$),见图 3。结果证实 TSG-6 实验组细胞凋亡显著。

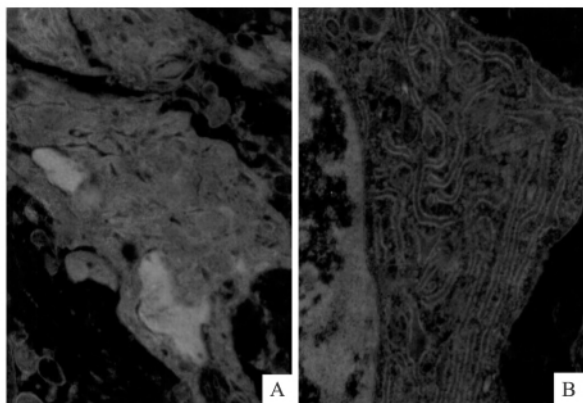


图 2 电镜观察瘢痕组织成纤维细胞 $\times 15\ 000$
A: TSG-6 实验组; B: PBS 对照组

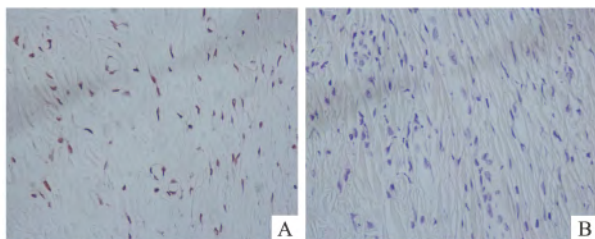


图 3 TUNEL 法检测细胞凋亡 DAB $\times 400$
A: TSG-6 实验组; B: PBS 对照组

2.4 TSG-6 与炎症反应 免疫组化染色显示 TSG-6 实验组 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 表达较 PBS 对照组显著。见图 4。所有提取 RNA 样品 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8~2.0,说明标本提取 RNA 纯度较理想,RT-PCR 半定量检测证明 3 种炎症因子于 TSG-6 实验组表达均明显低于 PBS 对照组。见表 2。结果提示 TSG-6 具有抑制炎症因子释放,抑制炎症反应的作用。

表 2 两组瘢痕组织 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α mRNA 相对定量值 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
TSG-6 实验	$0.675 \pm 0.009^*$	$0.585 \pm 0.029^*$	$0.596 \pm 0.013^*$
PBS 对照	0.756 ± 0.036	0.624 ± 0.020	0.618 ± 0.012

与 PBS 对照组比较: * $P<0.05$

3 讨论

皮肤创伤愈合一般经历炎症、增殖和成熟或重塑 3 个阶段。炎症反应可作为抗感染的免疫屏障,同时刺激纤维蛋白合成以闭合创面。因此,适度的炎症反应有利于创面愈合,然而过度炎症反应将导致病理性瘢痕的形成。TSG-6 是已被证实的具有明显抗炎作用的细胞因子。它可以抑制炎症因子 IL-6、IL-1 β 等的表达、抑制中性粒细胞浸润、减少炎症损伤,从而保护角膜免受化学及机械损害^[6];在关节炎鼠模型中,TSG-6 可使炎症局限,明显减轻关节水肿,软骨和骨质破坏得到很好地控制^[7]。研究^[8]证实,TSG-6 主要是通过 HA、间 α 胰蛋白酶抑制物 (I α 1)、CD44 等氨基葡聚糖类物质结合发挥上述

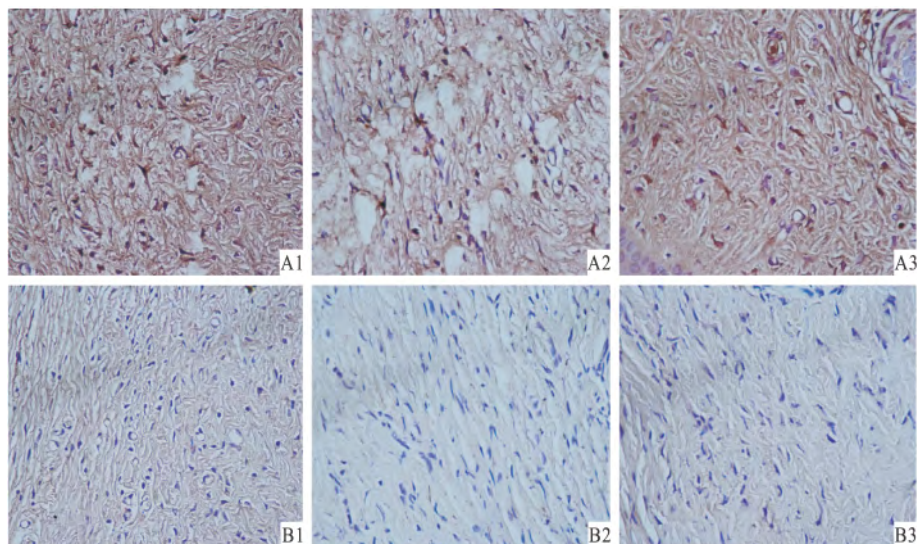


图 4 瘢痕组织 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 免疫组化染色结果 DAB $\times 400$

A: TSG-6 实验组; B: PBS 对照组; 1: IL-1 β ; 2: IL-6; 3: TNF- α

生物学特性。本实验通过免疫组化染色及 RT-PCR 检测发现瘢痕组织炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 于 TSG-6 实验组表达均低于 PBS 对照组,结果提示 TSG-6 在瘢痕形成过程中亦具有明显抗炎作用。

病理性瘢痕常以成纤维细胞过度增殖、胶原等细胞外基质大量沉积为特征,其中成纤维细胞是参与组织修复的主要功能细胞和效应细胞,胶原等细胞外基质主要是由成纤维细胞合成和分泌的。因此,如何诱导瘢痕组织成纤维细胞凋亡可能是瘢痕治疗新的方式。Seidita et al^[9] 研究表明 p53 基因缺损的细胞中无 TSG-6 基因的表达,而在 p53 基因依赖的凋亡途径中 TSG-6 表达水平上调,且在 p53 介导的细胞周期 G1 期静止中, TSG-6 直接受 p53 下游效应因子的调控。由此,可推测 p53 介导的细胞凋亡途径可能是 TSG-6 的另一生物学作用。同时, Choi et al^[10] 发现 TSG-6 可抑制核转录因子 NF- κ B 的表达,而 NF- κ B 在增生性瘢痕形成中具有抑制细胞凋亡的作用。这些研究提示 TSG-6 可能具有诱导细胞凋亡的作用。Qi et al^[11] 实验显示 TSG-6 的抗纤维化作用。为进一步探讨 TSG-6 对瘢痕组织成纤维细胞凋亡的影响,本研究以透射电镜观察及 TUNEL 法检测瘢痕组织成纤维细胞凋亡的变化,结果显示 TSG-6 实验组凋亡指数明显升高,但其机制尚不明确。

Tan et al^[4] 发现瘢痕疙瘩中 TSG-6 表达水平较无瘢痕修复皮肤明显减少,但较正常皮肤增多,且 HA、I α 1 的表达及分布与 TSG-6 相一致。TSG-6 序列含有高度保守的 HA 结合区,HA 和 TSG-6 结合非常稳定^[12]。已知 HA 可通过抑制前列腺素 E2 的水平、炎性细胞的趋化及氧自由基的产生等抗炎作用及抑制成纤维细胞分化等减少瘢痕形成,且在胎儿皮肤无瘢痕愈合过程中存在高浓度的 HA^[13]。课题组前期研究^[14] 表明 TSG-6 与病理性瘢痕形成具有相关性,本研究显示 TSG-6 实验组 I 型、III 型胶原沉积明显减低,同时证实 TSG-6 对瘢痕形成具有明显抑制作用。

综上所述,通过早期创面 TSG-6 干预并予瘢痕组织局部注射 TSG-6 的方法对瘢痕形成及增生具有抑制作用,其抗疤作用可能与抑制炎症反应及促进瘢痕组织细胞凋亡相关。

参考文献

- [1] Lee T H, Lee G W, Ziff E B, et al. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(5): 1982-8.
- [2] Klampfer L, Lee T H, Hsu W, et al. NF-IL6 and AP-1 cooperatively modulate the activation of the TSG-6 gene by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(10): 6561-9.
- [3] 洪学哲, 李小静, 马莉. TSG-6 与炎症反应 [J]. *安徽医学*, 2012, 33(2): 105-6.
- [4] Tan K T, McGrouther D A, Day A J, et al. Characterization of hyaluronan and TSG-6 in skin scarring: differential distribution in keloid scars, normal scars and unscarred skin [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2011, 25(3): 317-27.
- [5] Morris D E, Wu L, Zhao L L, et al. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: Quantitative studies [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1997, 100(3): 674-81.
- [6] Oh J Y, Roddy G W, Choi H, et al. Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(39): 16875-80.
- [7] Milner C M, Higman V A, Day A J. TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator? [J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt3): 446-50.
- [8] Danchuk S, Ylostalo J H, Hossain F, et al. Human multipotent stromal cells attenuate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via secretion of tumor necrosis factor- α -induced protein 6 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2011, 2(3): 27.
- [9] Seidita G, Polizzi D, Costanzo G, et al. Differential gene expression in p53-mediated G(1) arrest of human fibroblasts after gamma-irradiation or N-phosphoacetyl-L-aspartate treatment [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(12): 2203-10.
- [10] Choi H, Lee R H, Bazhanov N, et al. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages [J]. *Blood*, 2011, 118(2): 330-8.
- [11] Qi Y, Jiang D, Sindrilaru A, et al. TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds [J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(2): 526-37.
- [12] Lauer M E, Cheng G, Swaidani S, et al. Tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) amplifies hyaluronan synthesis by airway smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(1): 423-31.
- [13] Longaker M T, Peled Z M, Chang J, et al. Fetal wound healing: Progress report and future directions [J]. *Surgery*, 2001, 130(5): 785-7.
- [14] 洪学哲, 李小静, 宁金龙. TSG-6 在病理性瘢痕中的表达及意义 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(6): 685-7.

雌二醇及中波紫外线在豚鼠皮肤色素沉着形成中的作用及其机制

周颖丽 宋秀祖 洪为松 相文忠

摘要 目的 研究雌二醇和中波紫外线(UVB)辐射对豚鼠背部棕色皮肤中黑素代谢的影响,探讨雌激素及UVB在皮肤色素沉着中的作用。方法 选取健康花色豚鼠,设立溶媒对照组、UVB照射组、雌二醇处理组和雌二醇预处理后UVB照射组(雌二醇+UVB组);雌二醇浓度设为 3.67×10^{-5} 、 3.67×10^{-4} 、 3.67×10^{-3} mol/L;UVB照射剂量统一为500 mJ/cm²。采用皮肤在体共聚焦激光扫描显微镜(简称皮肤CT)以及透射电子显微镜等观察雌二醇和UVB对黑素小体合成及降解的影响。结果 ①一定浓度雌二醇可加深豚鼠皮肤色素沉着,且随着雌二醇浓度的递增,沉着程度逐渐加深($P < 0.05$)。②UVB照射组豚鼠皮肤色素沉着较未照射组明显增加($P < 0.05$)。③UVB照射后豚鼠表皮角质形成

细胞中自噬体增加,而雌二醇处理后自噬体减少。结论 雌二醇及UVB照射均可促进豚鼠皮肤色素沉着,其机制可能与促进黑素小体合成有关,黑素小体的降解异常也参与了豚鼠皮肤色素沉着的形成。

关键词 雌二醇;色素沉着;黑素小体;中波紫外线

中图分类号 R 364.23

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0049-05

黄褐斑等色素沉着性皮肤病是临床上常见的皮肤病,引起皮肤色素沉着的原因有很多,且相当复杂。其中紫外线照射(ultraviolet radiation,UV)、体内性激素失调等与皮肤色素沉着密切相关。UV是造成皮肤色素沉着最为重要的外源性因素^[1]。此外,雌激素也与色素沉着性疾病有着重要关系,是引起皮肤表面色素沉着的重要内源性因素之一^[2]。由于造成光损伤的UV波段主要包括长波紫外线(ultraviolet radiation A,UVA)和中波紫外线(ultraviolet radiation B,UVB),而UVB导致色素沉着的作用较UVA强,雌激素中雌二醇的生物学效应最强,因

2014-09-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81000697);杭州市医学重点专科专病项目(编号:20130733Q24)

作者单位:安徽医科大学杭州临床学院(杭州市第三人民医院)皮肤性病科 杭州 310009

作者简介:周颖丽,女,硕士研究生;

宋秀祖,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: songxiuzu@yahoo.com

The experimental study of anti-inflammatory cytokine TSG-6 inhibits hypertrophic scar formation in rabbit ears model

Wang Hui, Li Xiaojing, Chen Zhao

(Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the effect of tumor necrosis factor α stimulated gene-6 (TSG-6) on hypertrophic scarring by using a rabbit ear model. **Methods** TSG-6 and PBS were injected intradermally in the right and left ear wounds, respectively. Collagen I and III expression detected by immunohistochemistry and scar elevation index (SEI) was used to evaluate the extent of scarring. The expression of inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction. Transmission electron microscope (TEM) and TUNEL analyses were used to detect fibroblast apoptosis. **Results** Compared with control scars, TSG-6-treated wounds exhibited decreased inflammation significantly as evidenced by the lower levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α . The apoptosis rate was higher and the SEI and the synthesis of collagens I and III were significantly decreased in the TSG-6-treated scars ($P < 0.05$). **Conclusion** Immediate topical injection of TSG-6 during the wound healing process can reduce the severity of hypertrophic scarring in a rabbit model. The anti-cicatrix effect of TSG-6 may result from controlling inflammation, inducing fibroblast apoptosis and promoting collagen degradation.

Key words animal model; hypertrophic scar; rabbit; inflammation; TSG-6