

论 著

结直肠癌肝转移患者癌细胞白细胞介素-13受体 $\alpha 2$ 的表达及其与骨髓源性抑制细胞的关系

余姝彦¹, 杨逸¹, 胡婷¹, 曹艳佩²

(复旦大学附属华山医院, 1. 普外科, 2. 护理部, 上海, 200041)

摘要: **目的** 探讨白细胞介素-13受体 $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$)在结直肠癌肝转移患者细胞中的表达及其与骨髓源性抑制细胞(MDSCs)的关系。**方法** 回顾性分析2000—2013年复旦大学附属华山医院手术的68例结直肠癌肿瘤患者石蜡切片,使用常规免疫染色方案,切片观察IL-13R $\alpha 2$ 表达。采用抗CD11B抗体和抗CD33抗体进行双重染色,采用荧光抗体、山羊抗兔免疫球蛋白(H+L)抗体和山羊抗鼠免疫球蛋白(H+L)抗体对CD33进行显示。3位病理专家进行双盲独立评估IL-13R $\alpha 2$ 染色载玻片。**结果** 结直肠癌肝转移患者IL-13R $\alpha 2$ 阳性率最高(90.8%),其次为脑转移(65.0%)、原发病灶(60.0%)、其他转移(53.0%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。在肝转移病例中,IL-13R $\alpha 2$ 表达与MDSCs数量呈线性相关($r = 0.740$, $P < 0.05$)。48例远处转移病例的平均生存期为(12.6 \pm 5.2)个月。**结论** IL-13R $\alpha 2$ 水平升高提示结直肠癌远处转移患者的预后较差,推测IL-13R $\alpha 2$ 通过调节结直肠癌细胞来诱导MDSCs增殖并促进肿瘤肝转移。

关键词: 白细胞介素-13受体; 骨髓源性抑制细胞; 结直肠癌; 肝转移; 脑转移

中图分类号: R 735.3; R 329.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2020)23-065-05 DOI: 10.7619/jcmp.202023021

Expression of interleukin-13 receptor $\alpha 2$ in cancer cells of colorectal cancer patients with liver metastasis and its relationship with myeloid-derived suppressor cells

YU Shuyan¹, YANG Yi¹, HU Ting¹, CAO Yanpei²

(1. Department of General Surgery, 2. Nursing Department, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai, 200041)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of interleukin-13 receptor $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$) in cells of colorectal cancer patients with liver metastasis and its relationship with myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). **Methods** Paraffin sections of 68 patients with colorectal cancer surgery in Huashan Hospital Affiliated to Fudan University from 2000 to 2013 were retrospectively analyzed. The expression of IL-13R $\alpha 2$ was observed after routine immunostaining. Anti-CD11B antibody and anti-CD33 antibody were used for double staining. Fluorescent antibody, goat anti-rabbit immunoglobulin (H+L) antibody and goat anti-mouse immunoglobulin (H+L) antibody were used to display CD33. Three pathologists independently evaluated IL-13R $\alpha 2$ stained slides in a double-blind manner. **Results** The positive rate of IL-13R $\alpha 2$ in colorectal cancer patients with liver metastasis was the highest (90.8%), followed by brain metastasis (65.0%), primary lesions (60.0%), and other metastases (53.0%), and there were significant differences ($P < 0.05$). There was a linear correlation between the expression of IL-13R $\alpha 2$ and the number of MDSCs in cases with liver metastasis ($r = 0.740$, $P < 0.05$). The average survival time of 48 patients with distant metastasis was (12.6 \pm 5.2) months. **Conclusion** The increased level of IL-13R $\alpha 2$ suggests that the prognosis of colorectal cancer patients with distant metastasis is poor, and it is speculated that IL-13R $\alpha 2$ can induce proliferation of MDSCs and promote liver metastasis by regulating colorectal cancer cells.

Key words: interleukin-13 receptor; myeloid-derived suppressor cells; colorectal cancer; liver metastasis; brain metastasis

肝脏是结直肠癌血行转移最常见的部位,发生肝转移后的治疗效果是非常有限的^[1]。肝脏切除术联合射频消融术(RFA)是目前根治结直肠癌肝转移的唯一选择^[2-3],但仅有30%的患者术后可存活4~5年。考虑到与肝切除术相关的严重并发症和较高死亡风险^[4-5],若能预先辨别有发生肝转移倾向的患者并予以针对性的干预,将会使其获得巨大的收益。白细胞介素-13(IL-13)是一种由活化的T细胞、自然杀伤T细胞(NKT细胞)、人气道平滑肌细胞、肾细胞癌和Hodgkin-Reed-Sternberg肿瘤细胞分泌的分子量17 kDa的细胞因子,参与过敏性炎症、纤维化、杯状细胞增生和肿瘤细胞生长等过程^[6]。目前研究^[7-9]已发现3种类型的IL-13受体(IL-13R),包括IL-4R、IL-13R α 1、IL-13R α 2, IL-13R α 2只在正常人的睾丸组织中表达,而其他部位发现IL-13R α 2表达都与癌症有关,提示IL-13R α 2的高表达与肿瘤肝转移有关。

骨髓源性抑制细胞(MDSCs)是由骨髓祖细胞产生,其最终未能分化为成熟的粒细胞和巨噬细胞。MDSCs表达CD33、CD11b、IL-4R α 和低水平的CD15,并含有高水平的精氨酸酶^[10]。近年来,研究^[11-13]报道MDSCs在肿瘤的发生和转移中发挥关键作用。胰腺癌、食管癌和胃癌中发现MDSCs升高,并与IL-13的显著升高有关^[14-15]。本研究中,作者检测了结直肠癌肝转移病例IL-13R α 2的表达情况,阐明了IL-13R α 2与MDSCs的关系,分析了IL-13R α 2水平对患者预后的影响,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

回顾性收集2000—2013年在复旦大学华山医院手术的68例结直肠癌患者的肿瘤石蜡切片标本,行转移切除术或根治术时的年龄为41~87岁,中位年龄为61岁,男32例,女36例;病灶部位包括原发灶20例(T₄N_xM₀结直肠癌),脑转移20例,肝转移11例,其他远处转移17例,均为单一部位转移灶;肝转移患者原发肿瘤部位包括结肠癌9例,直肠癌2例;肝转移灶部位包括右半肝5例,左半肝6例。所有患者均获得知情同意,妥善处理患者的隐私信息,本研究方案得到了医院医学伦理委员会的批准。

1.2 免疫组化

所有病例均使用常规免疫染色方案,切片厚

度为4.0 μ m,组织切片经二甲苯浸泡、一系列酒精中再水化脱蜡,在900 W条件下微波5 min,1次,然后在600 W条件下微波3次,5 min/次,采用0.5% H₂O₂处理以抑制内源性过氧化物酶活性。将载玻片用适当的一级抗体稀释液培养并在4 °C冰箱中过夜。切片进行抗原回收程序,然后与小鼠抗人IL-13R α 2单克隆抗体(抗人IL-13R α 2抗体ab55275, Abcam)在37 °C孵育1 h,采用enVision Plus系统试剂盒(丹麦达科)短暂处理后,观察IL-13R α 2表达。采用抗CD11B抗体(克隆EP1345Y; Abcam)和抗CD33抗体(克隆WM53; EMD微孔)进行双重染色。每次试验均包括阳性和阴性对照;采用荧光抗体、山羊抗兔免疫球蛋白(H+L)抗体和山羊抗鼠免疫球蛋白(H+L)抗体对CD33进行显示。由3位经验丰富的病理专家在不了解患者临床病理信息的情况下,进行双盲独立评估IL-13R α 2染色载玻片。

IL-13R α 2的免疫反应强度和百分比以半定量的方式进行评分,评定结果分为0、+、++、+++ ,其中0、+定义为阴性,++、+++定义为阳性。采用图像分析系统对免疫组化结果进行定量分析,仪器包括松下MV-CP410摄像机、奥林巴斯BH2显微镜、尼康4500摄像机。图像采集输入计算机后,选择正负区,测量吸光度值(OD值)。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计学软件进行数据分析,定性变量的频率以(%)表示,比较采用 χ^2 检验和分类变量线性回归, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

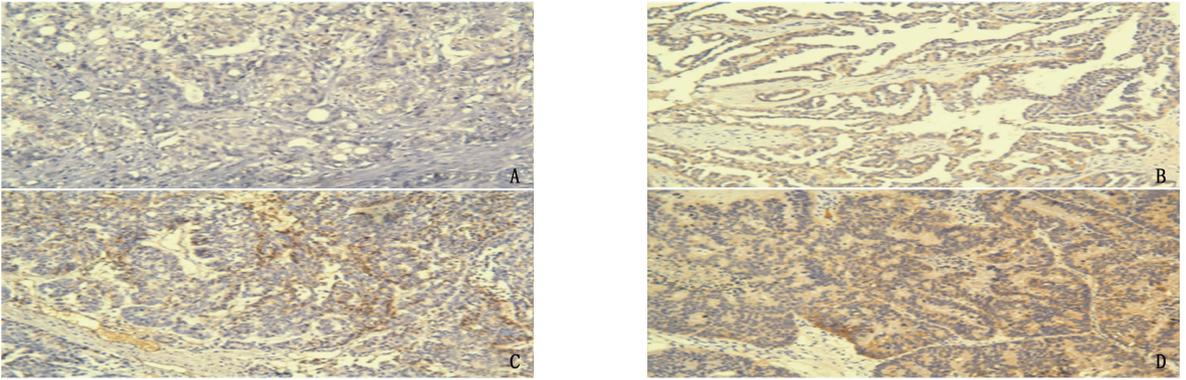
2 结果

2.1 IL-13R α 2与结直肠癌转移的关系

结果显示,68例患者IL-13R α 2的免疫反应强度和百分比为3例0(4.4%),21例+(30.8%),13例++(19.1%),31例+++ (45.6%)。见图1。IL-13R α 2的免疫反应强度在肝转移与原发灶、脑转移和其他转移比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。肝转移的IL-13R α 2阳性率高于原发灶、脑转移及其他转移,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.2 转移性结直肠癌中MDSCs与IL-13R α 2的关系

通过测量OD值分析IL-13R α 2的表达水平与MDSCs数量的关系,结果显示,IL-13R α 2的表达与MDSCs数量呈线性相关($r = 0.740$, $P < 0.05$),见图2。



A: IL-13Rα2 染色得分为 0; B: IL-13Rα2 染色得分为 +; C: IL-13Rα2 染色得分为 ++; D: IL-13Rα2 染色得分为 +++。

图 1 IL-13Rα2 的免疫组织化学载玻片表现 (放大倍数 40 倍)

表 1 IL-13Rα2 的免疫反应强度与病灶转移的关系 [n(%)]

免疫反应强度	原发灶 (n = 20)	肝转移 (n = 11)	脑转移 (n = 20)	其他转移 (n = 17)
0	2 (10.0)*	0	0	1 (5.8)*
1 +	6 (30.0)*	1 (9.1)	7 (35.0)*	7 (41.2)*
2 +	2 (10.0)*	3 (27.2)	6 (30.0)*	2 (11.8)*
3 +	10 (50.0)*	7 (63.6)	7 (35.0)*	7 (41.2)*

与肝转移比较, *P < 0.05。

表 2 不同病灶转移的 IL-13Rα2 阳性率与阴性率比较 [n(%)]

样本	IL-13Rα2 阳性	IL-13Rα2 阴性
肝转移 (n = 11)	10 (90.8)	1 (9.2)
原发灶 (n = 20)	12 (60.0)*	8 (40.0)*
脑转移 (n = 20)	13 (65.0)*	7 (35.0)*
其他转移 (n = 17)	9 (53.0)*	8 (47.0)*

与肝转移比较, *P < 0.05。

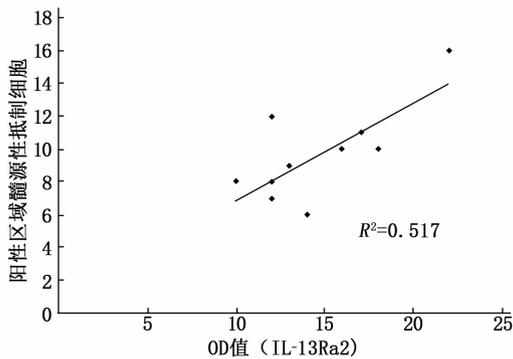


图 2 转移性结直肠癌 MDSCs 与 IL-13Rα2 的线性回归图

2.3 IL-13Rα2 不同表达水平患者的预后

本研究包括了 48 例结直肠癌远处转移患者,均接受了转移灶切除术,其中男 23 例,女 25 例,年龄 44 ~ 87 岁,平均(64.5 ± 10.7)岁,生存期 4 ~ 25 个月,平均生存期为(12.6 ± 5.2)个月。本研究结束时,46 例患者死亡(95.8%),1 年存活率为 47.9%。将 48 例患者分为 IL-13Rα2 阳性组、IL-13 Rα2 阴性组。2 组患者生存曲线见图 3。

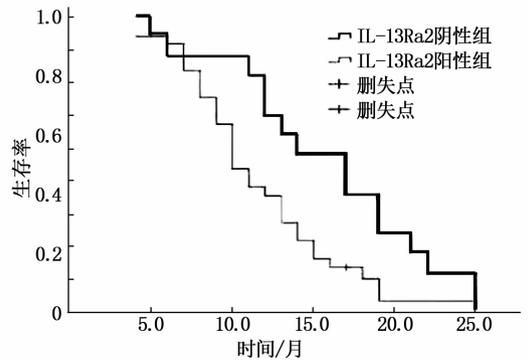


图 3 IL-13Rα2 阳性组与阴性组的生存曲线

3 讨论

结直肠癌是男性常见的癌症类型,有 20% 以上患者可诊断为转移性结直肠癌(IV 期),高达 25% 的患者会有孤立的肝转移^[16-17],但仅有 30% 的患者在手术后存活 4 ~ 5 年。因此,结直肠癌的潜在发病机制和治疗已成为基础研究的重要方向。

3.1 结直肠癌肝转移与 IL-13Rα2 的关系

IL-13Rα2 高亲和力结合 IL-13 并内化,推测 IL-13Rα2 的细胞外结构域可以作为 II 型 IL-13R 复合物的诱导受体^[18],其信号传导与信号传导及转录激活蛋白 6 (STAT6) 无关,并涉及激活蛋白-1 (AP-1) 途径来诱导转化生长因子 β₁ 活性的激活^[19]。IL-13Rα2 在某些类型的人类癌症如胶质母细胞瘤、头颈癌、肾癌、卵巢癌中都过表达^[20-22]。研究^[23-24]报道,IL-13Rα2 基因的表达与乳腺癌、胰腺癌和结直肠癌的转移、浸润有关。BARDERAS R 等^[25]研究发现,IL-13Rα2 的表达促进了结直肠癌细胞的转移、侵袭和黏附,同时 IL-13Rα2 也导致了小鼠肝脏归巢的减少。然而,IL-13Rα2 在原发性或转移性癌症中的临床意义尚不清楚。本研

究中,结直肠癌肝转移灶的 IL-13R α 2 阳性率为 90.8%,肝转移的 IL-13R α 2 阳性率高于原发灶、脑转移及其他转移,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 IL-13R α 2 的过表达与结直肠癌肝转移的发生具有相关性^[26-27]。

3.2 IL-13R α 2 与 MDSCs 的关系

很多癌细胞具有刺激一系列免疫和细胞因子过度表达的特征。MDSCs 通过多种机制引发免疫抑制和肿瘤免疫逃逸:① 精氨酸的消耗,MDSCs 表达高水平的精氨酸酶 I,将 L-精氨酸水解为鸟氨酸、精氨酸和尿素,同时有两种不同基因编码的精氨酸酶亚型。MDSCs 表达精氨酸酶 I,其消耗 L-精氨酸抑制 T 细胞功能^[28]。② 活性氧产物过氧亚硝酸盐硝酸盐氧化 TCR-CD8,从而阻止 CD8⁺ T 细胞结合主要组织相容性复合体(MHC)^[29-30]。③ 诱导调节性 T 细胞。HOECHST B^[31] 发现肝细胞癌中的 MDSCs 直接抑制肿瘤特异性 CD4⁺ T 细胞,在体外也可间接诱导 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg。KO JS^[31] 研究发现,使用舒尼替尼治疗的肾细胞癌患者 MDSCs 数量减少,同时 T 调节细胞也减少。HALL B^[32] 发现,当 IL-13R α 2 的表达下降时,在体内头颈部鳞状细胞癌中 MDSCs 的数量也显著减少。本研究发现,结直肠癌肝转移患者 IL-13R α 2 的表达与 MDSCs 数量呈线性关系,MDSCs 数量较多,则 IL-13R α 2 的表达较高。

3.3 IL-13R α 2 与结直肠癌存活率的关系

高表达 IL-13R α 2 的样本有更多的 MDSCs,而 MDSCs 具有免疫抑制作用,结直肠癌肝转移中 IL-13R α 2 的最高阳性率可能与 MDSCs 诱导的肿瘤免疫逃逸有关。IL-13R α 2 表达增高可导致患者术后生存时间缩短,预后较差,因此 IL-13R α 2 可作为术前预测结直肠癌远处转移的新标志物。

(致谢:在此感谢上海华山医院病理科许祖德医师在提供病理样品方面的合作!)

参考文献

[1] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.

[2] FONG Y, COHEN A M, FORTNER J G, *et al.* Liver resection for colorectal metastases[J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(3): 938-946.

[3] ABDALLA E K, RIBERO D, PAWLIK T M, *et al.* Resection of hepatic colorectal metastases involving the caudate lobe: perioperative outcome and survival[J]. *J Gastrointest Surg*,

2007, 11(1): 66-72.

[4] LEPORRIER J, MAUREL J, CHICHE L, *et al.* A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer[J]. *Br J Surg*, 2006, 93(4): 465-474.

[5] RUERS T J, WIERING B, VAN DER SIJJP J R, *et al.* Improved selection of patients for hepatic surgery of colorectal liver metastases with (18)F-FDG PET: a randomized study[J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(7): 1036-1041.

[6] WYNN T A. IL-13 effector functions[J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 425-456.

[7] FUJISAWA T, JOSHI B, NAKAJIMA A, *et al.* A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(22): 8678-8685.

[8] MANDAL D, LEVINE A D. Elevated IL-13Ralpha2 in intestinal epithelial cells from ulcerative colitis or colorectal cancer initiates MAPK pathway[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(5): 753-764.

[9] HUSAIN S R, JOSHI B H, PURI R K. Interleukin-13 receptor as a unique target for anti-glioblastoma therapy[J]. *Int J Cancer*, 2001, 92(2): 168-175.

[10] OSTRAND-ROSENBERG S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(10): 1593-1600.

[11] GABRILOVICH D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(12): 941-952.

[12] OSTRAND-ROSENBERG S, SINHA P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer[J]. *J Immunol*, 2009, 182(8): 4499-4506.

[13] SICA A, BRONTE V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1155-1166.

[14] GABITASS R F, ANNELS N E, STOCKEN D D, *et al.* Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(10): 1419-1430.

[15] HALL B, NAKASHIMA H, SUN Z J, *et al.* Targeting of interleukin-13 receptor α 2 for treatment of head and neck squamous cell carcinoma induced by conditional deletion of TGF- β and PTEN signaling[J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 45.

[16] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, *et al.* Global cancer statistics[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[17] SIMMONDS P C, PRIMROSE J N, COLQUITT J L, *et al.* Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(7): 982-999.

[18] CHIARAMONTE M G, MENTINK-KANE M, JACOBSON B A, *et al.* Regulation and function of the interleukin 13 receptor α 2

- during a T helper cell type 2 - dominant immune response[J]. *J Exp Med*, 2003, 197(6): 687-701.
- [19] FICHTNER-FEIGL S, STROBER W, KAWAKAMI K, *et al.* IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis[J]. *Nat Med*, 2006, 12(1): 99 - 106.
- [20] JOSHI B H, PLAUTZ G E, PURI R K. Interleukin-13 receptor alpha chain: a novel tumor-associated transmembrane protein in primary explants of human malignant gliomas [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1168 - 1172.
- [21] KAWAKAMI M, KAWAKAMI K, KASPERBAUER J L, *et al.* Interleukin-13 receptor alpha2 chain in human head and neck cancer serves as a unique diagnostic marker [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(17): 6381 - 6388.
- [22] PURI R K, LELAND P, OBIRI N I, *et al.* Targeting of interleukin-13 receptor on human renal cell carcinoma cells by a recombinant chimeric protein composed of interleukin-13 and a truncated form of Pseudomonas exotoxin A (PE38QQR) [J]. *Blood*, 1996, 87(10): 4333 - 4339.
- [23] MINN A J, GUPTA G P, SIEGEL P M, *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung[J]. *Nature*, 2005, 436(7050): 518 - 24.
- [24] FUJISAWA T, JOSHI B, NAKAJIMA A, *et al.* A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(22): 8678 - 8685.
- [25] BARDERAS R, BARTOLOMÉR A, FERNANDEZ-ACEÑERO M J, *et al.* High expression of IL-13 receptor alpha2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(11): 2780 - 2790.
- [26] APRILE G, DE MAGLIO G, MENIS J, *et al.* HER-2 expression in brain metastases from colorectal cancer and corresponding primary tumors; a case cohort series [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(2): 2370 - 2387.
- [27] RODRIGUEZ P C, ZEA A H, DESALVO J, *et al.* L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 Zeta chain in T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 2003, 171(3): 1232 - 1239.
- [28] RODRIGUEZ P C, QUICENO D G, ZABALET A J, *et al.* Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(16): 5839 - 5849.
- [29] NAGARAJ S, GUPTA K, PISAREV V, *et al.* Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8 + T cell tolerance in cancer [J]. *Nat Med*, 2007, 13(7): 828 - 835.
- [30] HOECHST B, ORMANDY L A, BALLMAIER M, *et al.* A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4 + CD25 + Foxp3 + T cells [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(1): 234 - 243.
- [31] KO J S, ZEA A H, RINI B I, *et al.* Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(6): 2148 - 2157.
- [32] HALL B, NAKASHIMA H, SUN Z J, *et al.* Targeting of interleukin-13 receptor alpha2 for treatment of head and neck squamous cell carcinoma induced by conditional deletion of TGF-beta and PTEN signaling [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 45 - 53.

(上接第 55 面)

综上所述,改良阴式骶棘韧带固定术具有较好的临床效果,能显著改善患者生活质量,减轻患者焦虑、抑郁情绪。

参考文献

- [1] B T, DE RIDDER D, FREEMAN R M, *et al.* An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction[J]. *Int Urogynecol J*, 2010, 21(1): 5 - 26.
- [2] 周严娟, 凌斌. 子宫脱垂的腹腔镜手术治疗进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2010, 37(2): 101 - 103, 118.
- [3] CHEN C H, WU W Y, SHEU B C, *et al.* Comparison of recurrence rates after anterior colporrhaphy for cystocele using three different surgical techniques[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2007, 63(4): 214 - 221.
- [4] 朱兰. 盆腔器官脱垂的盆底重建手术应重视的几个问题[J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 50(6): 406 - 408.
- [5] 倪观太, 张莹, 丁锦. 经阴道前壁路径骶棘韧带悬吊术治疗盆腔器官脱垂的短期疗效分析[J]. *现代妇产科进展*, 2017, 26(8): 595 - 598.
- [6] 陈敬华, 洪莉, 蒋敏. 改良骶棘韧带固定术与高位宫骶韧带悬吊术治疗中年女性盆腔脱垂的疗效[J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(23): 2524 - 2527.
- [7] 张庆霞, 朱兰, 郎景和. 中盆腔缺陷的手术治疗[J]. *实用妇产科杂志*, 2008, 24(5): 276 - 279.
- [8] PETRI E, ASHOK K. Sacrospinous vaginal fixation: current status [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2011, 90(5): 429 - 436.