

子宫内膜癌内源竞争 RNA 网络的构建及综合分析^①

乔 峰^{1,2}, 张 旭¹

1. 西南大学 数学与统计学院, 重庆 400715; 2. 重庆师范大学附属科学城学校, 重庆 401331

摘要: 本研究基于癌症基因组图谱(TCGA)数据库中的子宫内膜癌基因表达数据集, 通过基因差异表达分析共鉴别出 1 906 个 mRNA、753 个 lncRNA 和 56 个 miRNA 在 EC 样本中的异常表达. 然后对鉴别出的 1 906 个差异表达的 mRNA 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析. 基于筛选出的差异基因, 构建了一个包含 66 个 mRNA、16 个 miRNA 和 66 个 lncRNA 的内源竞争 RNA(ceRNA)调控网络. 在这个网络中, 16 个 mRNA, 5 个 lncRNA 和 1 个 miRNA 的表达量与 EC 患者的总体生存率密切相关(P value <0.01). 通过多变量 Cox 回归, 构建了一个包含 5 个 lncRNA 的风险评分系统, 对 EC 患者生存期具有良好的鉴别和预测能力. 本研究深入挖掘了 EC 的分子相互作用机制并进一步缩小了靶向 lncRNA 的范围, 将有助于 EC 的早期诊断、预后及新的治疗策略的制定.

关键词: 子宫内膜癌; TCGA; ceRNA 网络; 生物标志物; Cox 风险评分系统

中图分类号: Q522

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2021)11-0015-08

On Construction and Comprehensive Analysis of A Competitive Endogenous RNAs Network for Endometrial Carcinoma

QIAO Feng^{1,2}, ZHANG Xu¹

1. School of Mathematics and Statistics, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. The Science Cite Secondary School Affiliated to Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

Abstract: This study is based on the dataset of endometrial cancer gene expression from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. The abnormal expression of 1906 mRNAs, 753 lncRNAs and 56 miRNAs in EC samples were identified by gene differential expression analysis. Then 1906 differentially expressed mRNAs were analyzed by GO function enrichment analysis and KEGG pathway analysis. Based on the identified differentially expressed genes, a competitive endogenous RNA (ceRNA) regulatory network containing 66 mRNAs, 16 miRNAs and 37 lncRNAs was constructed. In this network, the expression levels of 16 mRNAs, 5 lncRNAs and 1 miRNA were closely related to the overall survival rate of EC patients (P value <0.01). By multivariate Cox regression analysis, we constructed a risk score system containing 5 lncRNAs, which has good identification and prediction ability for the survival of EC patients. In this study-

① 收稿日期: 2020-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(11701471); 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2017jcyjAX0476).

作者简介: 乔 峰, 硕士研究生, 主要从事生物数学研究.

通信作者: 张 旭, 副教授.

y, the molecular interaction mechanism of EC was deeply explored and the scope of targeting lncRNAs further reduced, which will be helpful for the early diagnosis, prognosis and new treatment strategy of EC.

Key words: Endometrial carcinoma; ceRNA network; TCGA; Biomarkers; Cox risk score system

子宫内膜癌(EC)是世界上最常见的女性恶性肿瘤之一^[1-4]. 因此, 研究 EC 的分子发病机制, 寻找与 EC 发生、发展和预后相关的生物标志物尤为重要.

长非编码 RNA(lncRNA)被定义为长度大于 200 bp 且无蛋白质编码潜力的转录物^[5]. 近年来, 越来越多的研究表明, lncRNA 在细胞发育、分化、增殖、迁移和转移的生理和病理过程中起着重要作用^[6-11]. 研究表明, 某些 lncRNA 可作为潜在的癌症诊断生物标志物^[12-14]; MALAT1 可作为筛查肺癌、子宫内膜间质肉瘤、宫颈癌和肝癌的生物标志物^[15]. TRIB3 已被证明是 EC 的潜在治疗靶点, 因为它可以通过调节 AKT 信号通路促进 EC 细胞凋亡和抑制 EC 细胞增殖和迁移^[16].

内源竞争 RNA(ceRNA)假说揭示了 RNA 相互作用的新机制, 认为信使 RNA(mRNA)和其他非编码 RNA 可以通过共同的 microRNA(miRNA)反应元件竞争性地与 miRNA 结合, 从而调节某些基因的表达水平^[17]. 近年来, 越来越多的研究证实 ceRNA 调控理论与肿瘤的发生、发展和预后密切相关^[18].

目前, EC 中的 ceRNA 调节网络机制尚不清楚.

本文先对 mRNA, lncRNA 和 miRNA 分别进行差异表达分析; 随后通过 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析, 进一步挖掘了差异表达的 mRNA 潜在的生物学功能; 接着通过成对预测, 整合差异表达的 mRNA(DEmRNA)、差异表达的 lncRNA(DElncRNA)和差异表达的 miRNA(DEmiRNA), 构建了与 EC 相关的 ceRNA 网络, 帮助我们挖掘 EC 发生的分子机制. 为了确定与 EC 相关的预后因素, 对 ceRNA 网络中的 RNA 进行了生存分析. 通过多变量 Cox 回归, 构建了一个风险评分系统, 对 EC 患者生存期具有良好的鉴别和预测能力. 本研究对理解 EC 的分子相互作用机制提供了新的见解, 进一步缩小了靶向 lncRNA 的范围, 也将有助于 EC 的早期诊断、预后及新治疗策略的制定.

1 数据和方法

1.1 数据来源及处理

本文所使用的数据集来自从肿瘤基因图谱(TCGA)数据库、EC 的 mRNA(包括 lncRNA)和 miRNA 表达数据及相应临床数据(<https://genome-cancer.ucsc.edu/>, 2019 年 7 月 31 日更新). 下载的 mRNA 和 miRNA 表达数据分别包含 583 个样本(35 个正常样本, 548 个肿瘤样本)和 575 个样本(33 个正常样本, 542 个肿瘤样本). 我们用 GENCODE 数据库(<https://www.gencodegenes.org/>, 版本 32)以识别 mRNA 和 lncRNA. RNA 表达数据包含 19 668 个 mRNA、14 090 个 lncRNA 和 1881 个 miRNA.

1.2 差异分析

应用 R 软件中的 edge 软件包筛选 548 例肿瘤组织与 35 例正常组织的差异表达的 mRNA 和 lncRNA. 用 R 软件中的 limma 软件包对 542 例肿瘤组织和 33 例正常组织样本进行了 miRNA 的差异表达分析^[18]. 分别在两组水平分析显著异常表达的 lncRNA, miRNA 和 mRNA: 中分化至高分化(G1-G2 期)EC 样本与正常样本、低分化(G3-G4 期)EC 样本与正常样本. DEmRNA, DElncRNA 和 DEmiRNA 的筛选标准为: 假发现率(FDR) < 0.01 且 $|\log_2(FC)|$ (fold change) > 2. 然后, 用火山图显示符合标准的差异表达的 lncRNA, miRNA 和 mRNA. 另外, 通过韦恩(Venn)图显示了 G1-G2 期与 G3-G4 期两组样本中相交的异常表达基因, 便于进行下游分析.

1.3 DEmRNA 的功能富集分析

为了探索 DEmRNA 的潜在生物学功能, 利用 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery(DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库对异常表达的基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析^[19-20]. 在 GO 和 KEGG 通路分析中, P. value < 0.01 被认为具有统计学意义.

1.4 构建 ceRNA 调控网络

为了进一步理解 mRNA, lncRNA 和 miRNA 在 EC 中的相互作用机制, 构建了基于 DEmRNA, DEmiRNA 和 DELncRNA 相互作用的 ceRNA 网络. DEmiRNA 的靶向 lncRNA 是基于 miRcode 数据库^[21] (<http://www.mircode.org/>) 进行预测. 然后, 利用 miRTarBase^[22] (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>), miRDB^[23-24] (<http://www.mirdb.org/>) 和 TargetScan^[25] (<http://www.targetscan.org/>) 数据库预测 miRNA 靶向的 mRNA. 为了获得更可靠的 miRNA 与 mRNA 的关系, 利用 3 个数据库预测结果的交集, 建立了一个 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络. 最后用 Cytoscape^[26] (<http://www.cytoscape.org/>) 软件可视化 ceRNA 网络.

1.5 生存分析

用 R 软件中的 survival 软件包对 ceRNA 网络包含的 mRNA, lncRNA 和 miRNA 进行生存分析. 以 RNA 表达水平的中位数作为截止值, 将患者分为高表达组和低表达组. 对数秩 P. value<0.05 被认为具有统计学意义. 通过对 ceRNA 中的 RNA 进行 Kaplan-Meier (K-M) 生存分析, 获得了与总体生存时间相关的 mRNA, lncRNA 和 miRNA. 另外, 用 R 软件中的 survminer 软件包绘制 K-M 生存曲线, 进一步验证 mRNA, lncRNA 和 miRNA 的预后价值.

1.6 构建风险评分系统

构建 lncRNA 风险评分系统为子宫内膜癌患者的早期诊断提供便利. 将 EC 患者样本按照 1:1 的比例随机分为训练集和测试集, 然后, 基于训练集利用最大似然法建立与生存相关的 DELncRNA 的 Cox 风险比例回归模型, 并计算模型的回归系数(β). 最后, 构建了一个包含 5 个 lncRNA 的子宫内膜癌预后风险评分系统.

$$P = \beta_1 \times x_1 + \beta_2 \times x_2 + \beta_3 \times x_3 + \beta_4 \times x_4 + \beta_5 \times x_5$$

其中: P 表示预后指数 (Prognostic index), x_i ($i=1, 2, 3, 4, 5$) 分别代表 WT1-AS, PRICKLE2-AS2, LINC00491, ALDH1L1-AS2 和 ADAMTS9-AS1 的表达水平. 为了评估风险评分系统的识别和预测能力, 构建了 K-M 生存曲线和时间依赖性受试者操作特征 (ROC) 曲线.

1.7 单变量和多变量 Cox 回归分析

为了探索 EC 患者的临床特征, 包括年龄 (Age)、临床分期 (Clinical stage)、组织学分级 (Neoplasm histologic grade)、体重 (Weight) 和种族 (Race) 是否与总体生存率有显著相关, 我们进行了单变量 Cox 回归分析. 然后, 年龄、临床分期、组织学分级和风险评分水平作为候选变量被纳入多元 Cox 回归分析. P. value<0.05 被认为具有显著统计学意义, 并计算各变量的风险比和 95% 置信区间.

2 结果与分析

2.1 差异表达分析

如图 1(a) 所示, 在 G1-G2 期的 EC 组织和正常组织样本中识别了 2 548 个 DEmRNA (1 224 个上调, 1 324 个下调), 1 146 个 DELncRNA (640 个上调, 506 个下调), 72 个 DEmiRNA (13 个上调, 59 个下调); 如图 1(b) 所示, 在 G3-G4 期的 EC 组织和正常组织样本中发现了 2 695 个 DEmRNA (940 个上调, 1 755 个下调), 1 347 个 DELncRNA (373 个上调, 974 个下调), 80 个 DEmiRNA (14 个上调, 66 个下调). 两组差异基因的交叉部分由 753 个 lncRNA, 58 个 miRNA 和 1 906 个 mRNA 组成, 这些被认为是早期 EC 发展的关键基因 (图 1(c)).

2.2 DEmRNA 的功能富集分析

我们进一步研探究了 1 960 个 DEmRNA 的潜在生物学功能. 通过 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析, 筛选出 121 个显著富集的 GO 术语 (P. value<0.01). 在这些术语中, “表皮发育” “端粒组织” “细胞信号” “肌肉收缩” 和 “依赖 DNA 复制的核小体组装” 是前 5 位的 GO 术语 (图 2(a)); 确定了 56 条 DEmRNA 显著富集的 KEGG 通路, 22 条 KEGG 通路在 P. value<0.01 时被确定为具有统计学意义, DEmRNA 在 “hsa04080: 神经活性配体-受体相互作用” “hsa04270: 血管平滑肌收缩” “hsa04020: 钙信号通路” “hsa04022: cGMP-PKG 信号通路” “hsa04110: 细胞周期” “hsa04014: Ras 信号通路” 等信号通路显著富集 (图 2(b)).

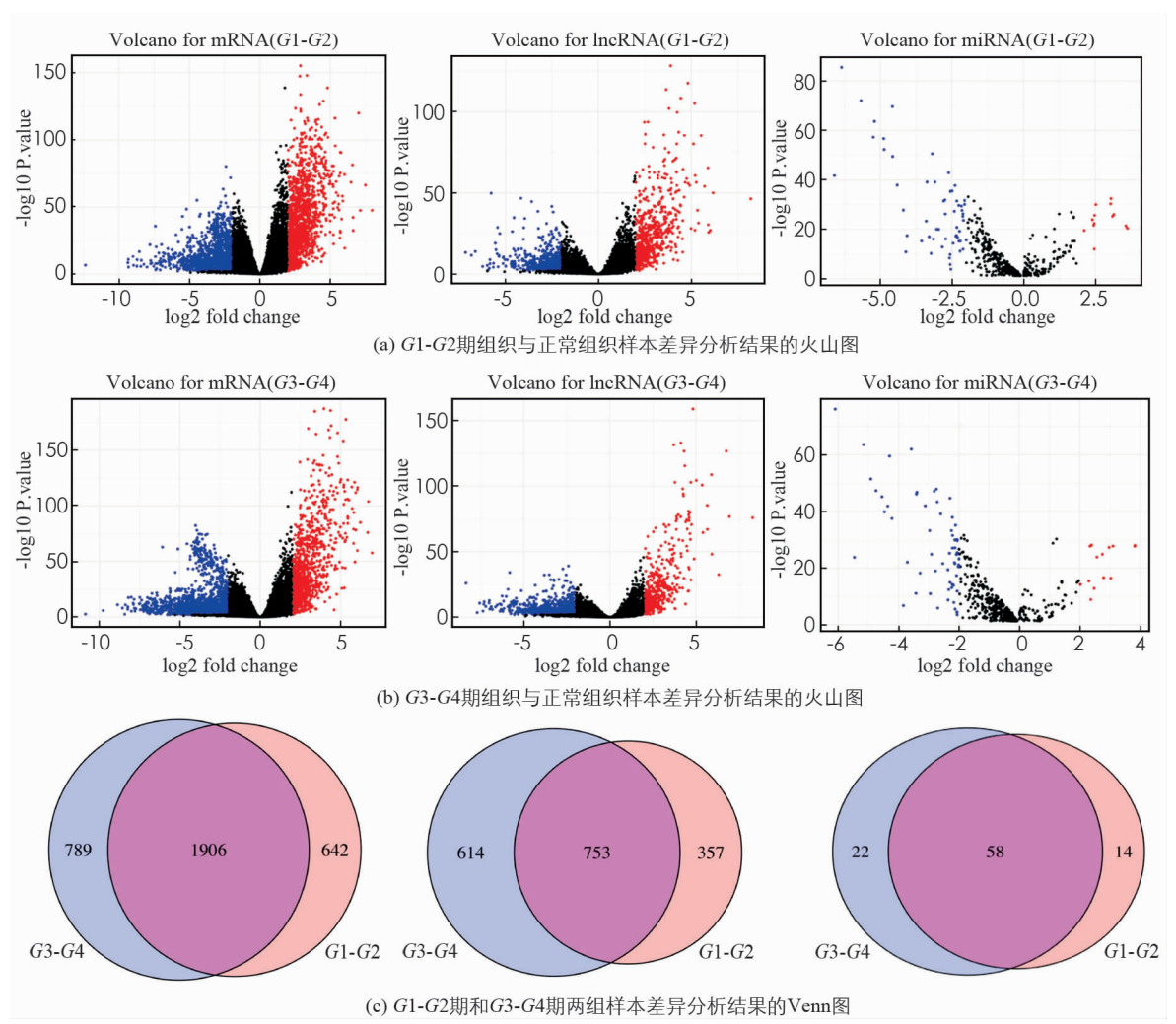


图 1 差异分析结果

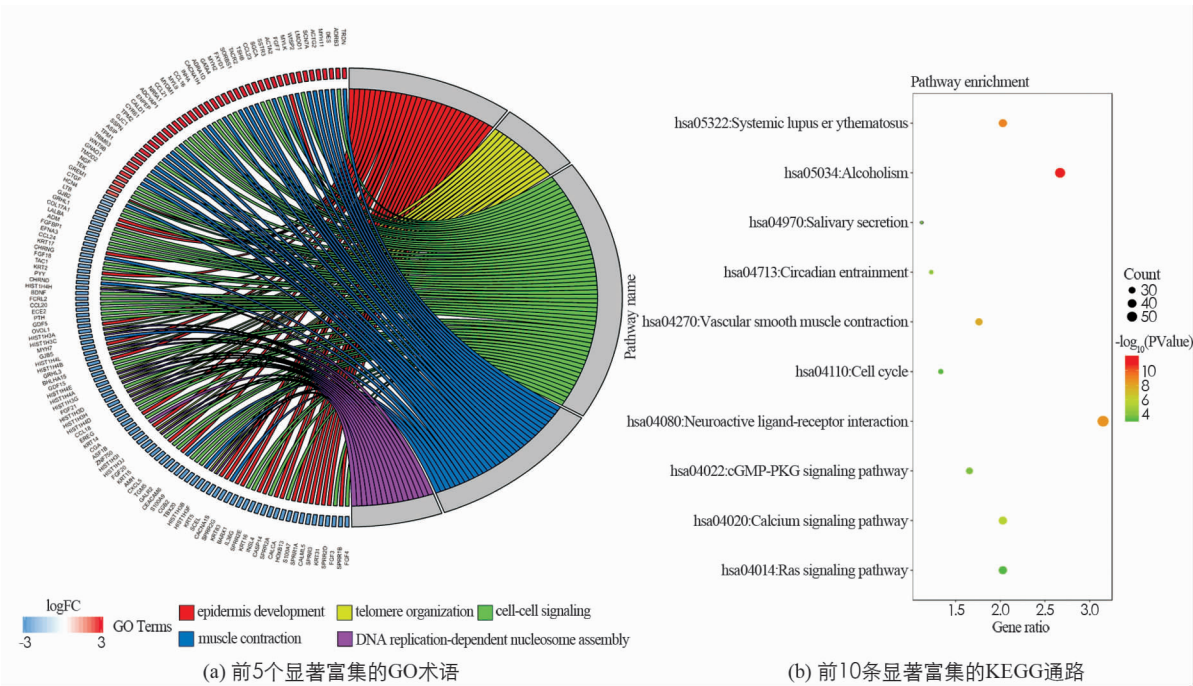
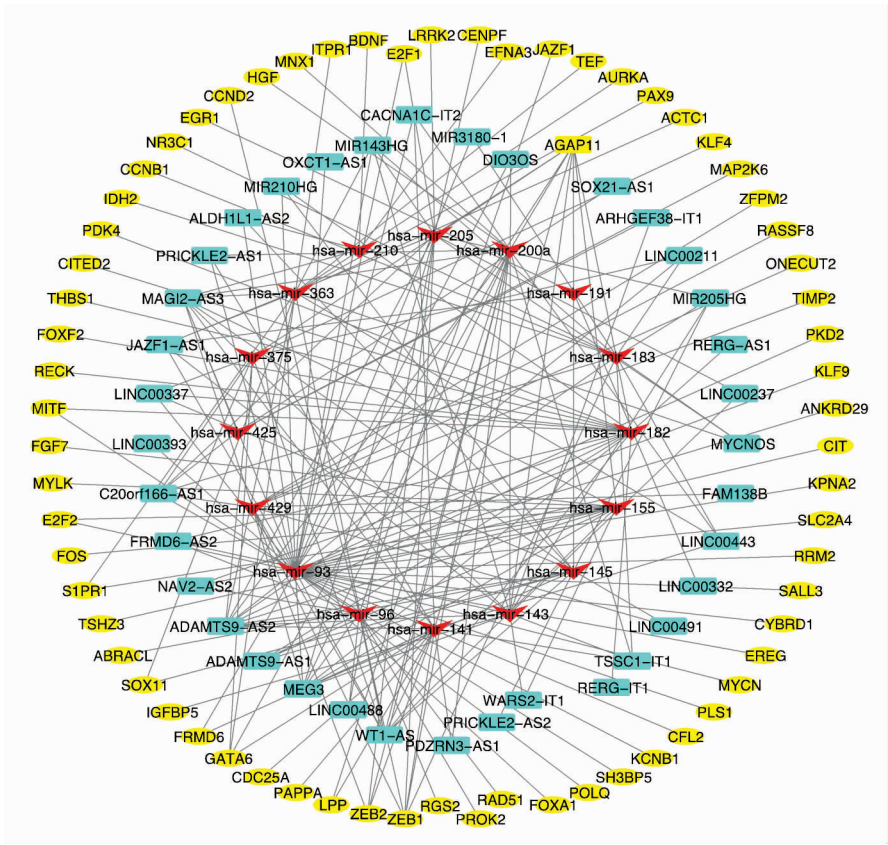


图 2 DEmRNA 的功能富集分析结果

2.3 构建 ceRNA 调控网络

利用 miRcode 数据集预测 753 个 DElncRNA 和 53 个 DEmiRNA, 成功地鉴定出 136 个 miRNA-lncRNA 对. 然后, 利用 TargetScan, miRDB 和 miRTarBase 数据库, 分析了 58 个 DEmiRNA 和 1 906 个 DEmRNA, 发现了 84 个 miRNA 和 mRNA 相互作用对. 最后构建了一个包含 66 个 mRNA, 16 个 miRNA 和 37 个 lncRNA 的 ceRNA 调控网络(图 3).



注: 红色节点代表 miRNA, 蓝色节点代表 lncRNA, 黄色节点代表 mRNA, 线条表示两个 RNA 之间存在相互作用关系.

图 3 ceRNA 网络

2.4 生存分析

为了确定与 EC 患者预后相关的 mRNA,lncRNA 和 miRNA, 对 ceRNA 中的每个 RNA(66 个 mRNA, 37 个 lncRNA 和 16 个 miRNA)进行了 K-M 生存分析和 Log-Rank 检验. 最后发现, 16 个 mRNA(NR3C1, CIT, SOX11, CDC25A, RECK, AURKA, E2F1, ONECUT2, SALL3, SLC2A4, GFBP5, POLQ, RGS2, MNX1,KLF9 和 RRM2), 5 个 lncRNA(WT1-AS,PRICKLE2-AS2, ADAMTS9-AS1,ALDH1L1-AS2 和 LINC00491)和 1 个 miRNA(hsa-mir-182)与 EC 患者的总体生存率显著相关($P. value<0.05$)(图 4).

2.5 构建与 lncRNA 相关的风险评分系统

基于与总体生存率显著相关的 5 个 lncRNA, 应用多元 Cox 回归分析来构建风险评分系统, 其贡献由其相关系数加权, 最终的风险评分公式为:

$$P = 0.154\ 6 \times x_1 + 0.098\ 4 \times x_2 + 0.051\ 0 \times x_3 + 0.113\ 7x_4 + 0.0137 \times x_5$$

其中: P 表示预后指数 (Prognostic index), $x_i (i = 1, 2, 3, 4, 5)$ 分别代表 WT1-AS, PRICKLE2-AS2, LINC00491,ALDH1L1- AS2 和 ADAMTS9-AS1 的表达水平. 风险评分大于最佳截断值 0.945 的患者被视为高危患者(212 名患者), 而风险评分小于或等于 0.945 的患者被视为低危患者(308 名患者). 特别的, 根据 K-M 和时间依赖性 ROC 曲线分析, 这两个组的设计均提高了对子宫内膜癌高、低危患者的预测正确率(图 5(b), (c)). 基因表达热图和患者评分散点图(图 5(a))显示了 520 例 EC 患者生存期的 5 个 lncRNA 表

达谱和风险评分以及垂直虚线 0.945 的风险评分的截止值。采用单因素 Cox 回归分析筛选 520 例临床资料完整的 EC 患者总体生存率相关的特征，结果表明，年龄、临床分期、组织学分级的预后价值具有统计学意义。在多因素 Cox 回归分析中，年龄、临床分期、组织学分级和风险评分与 EC 患者的预后密切相关。因此，我们构建的 lncRNA 风险评分系统可以作为子宫内膜癌患者的独立预后指标(表 1)。

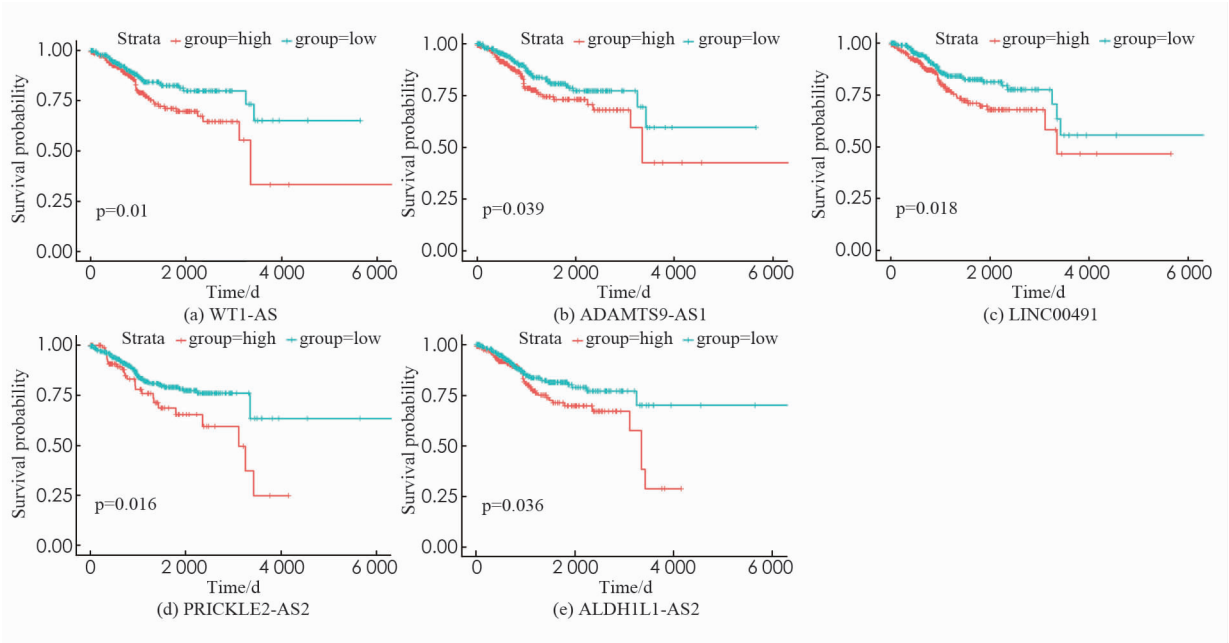


图 4 与子宫内膜癌患者总体生存率密切相关的 5 个 lncRNA 的 K-M 生存曲线

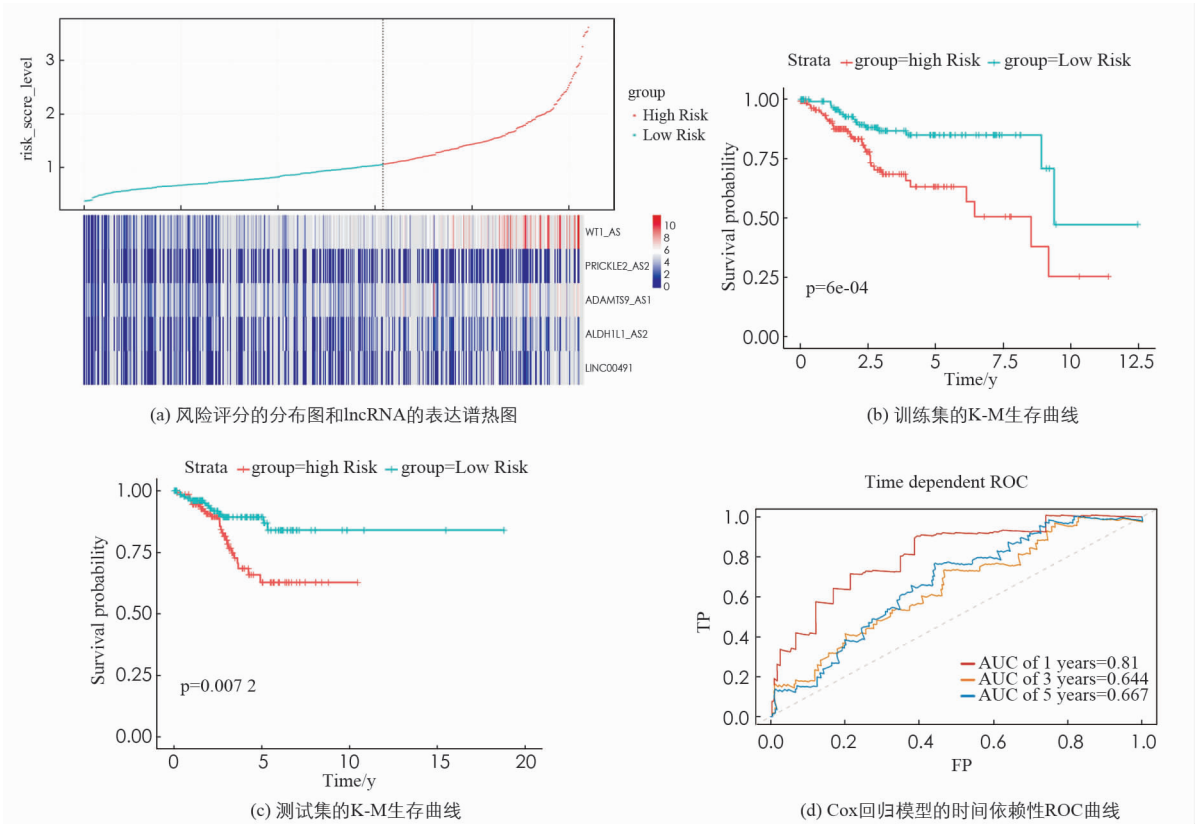


图 5 构建 EC 的风险评估系统

表 1 单因素和多因素 Cox 回归分析结果

临床特征	单因素 Cox 回归			多因素 Cox 回归		
	风险率/%	95%置信区间	P. value	风险率/%	95%置信区间	P. value
年龄	1.895	1.177—3.05	0.008	1.713	1.054—2.783	0.030
临床分期	3.878	2.548—5.902	<0.001	3.261	2.114—5.029	<0.001
组织学分级	3.467	2.016—5.961	<0.001	2.225	1.261—3.924	0.006
种族	1.162	0.732—1.845	0.525			
风险等级	2.353	1.542—3.59	<0.001	1.640	1.05—2.563	0.030
体重	1.04	0.684—1.583	0.853			

3 讨 论

子宫内膜癌是一种致命的女性恶性肿瘤. 在过去的 20 年里, EC 死亡率翻了一番. 只有 20% 的 EC 患者在绝经前被诊断出来^[27-28]. 因此, 研究 EC 的分子发病机制, 寻找与 EC 发生、发展和预后相关的生物标志物尤为重要. 我们首先对收集到的 EC 患者的样本, 分别对 mRNA, lncRNA 和 miRNA 数据进行了差异表达分析, 最终得到在 EC 组织中异常表达的 mRNA, lncRNA 和 miRNA. 然后, 在此基础上通过成对预测获得了 miRNA 的靶向 lncRNA 和 mRNA. 最终构建了 EC 的一个 ceRNA 调控网络进一步去理解 EC 分子间相互作用机制. 接下来, 通过对包含在 ceRNA 网络中的 RNA 进行了生存分析, 筛选出了与 EC 患者总体生存显著相关的 mRNA, lncRNA 和 miRNA. 最后, 根据筛选出的 5 个与 EC 患者总体生存时间密切相关的 lncRNA, 利用 Cox 多元回归构建了一个风险评分系统. K-M 生存曲线和时间依赖性 ROC 曲线进一步验证了该风险评分系统具备良好的预测能力, 有助于子宫内膜癌早期诊断. 单因素 Cox 回归和多因素 Cox 回归分析的结果也证明了这个风险评分可以作为 EC 患者生存时间的独立预后指标. 本研究深入挖掘了 EC 的分子相互作用机制并进一步缩小了靶向 lncRNA 的范围, 将有助于 EC 的早期诊断、预后及新的治疗策略的制定. 由于缺乏其它类似的 EC 相关 lncRNA 数据库, 因此未进行外部验证.

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer Statistics, 2019 [J]. CaA Cancer Journal for Clinicians, 2019, 69(1): 7-34.

[2] SIEGELR L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer Statistics, 2020 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2020, 70(1): 7-30.

[3] CHEN W, ZHENG R, BAADEP D, et al. Cancer Statistics in China, 2015 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132.

[4] CHAUDHRY P, ASSELIN E. Resistance toChemotherapy and Hormone Therapy in Endometrial Cancer [J]. Endocrine-Related Cancer, 2009, 16(2): 363-380.

[5] PONTINGC P, OLIVER P L, REIK W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs [J]. Cell, 2009, 136(4): 629-641.

[6] JU C, LIU R F, ZHANG Y W, et al. MesenchymalStem Cell-Associated lncRNA in OsteogenicDifferentiation [J]. Bio-medicine & Pharmacotherapy, 2019, 115: 108912.

[7] KOIRALA P, HUANG J, HOT T, et al. LncRNA AK023948 is a Positive Regulator of AKT [J]. Nature Communica-tions, 2017, 8: 14422.

[8] BA Z W, GU LL, HAO S N, et al. Downregulation of lncRNA CASC2 Facilitates Osteosarcoma Growth and Invasion through MiR-181a [J]. Cell Proliferation, 2018, 51(1): e12409.

[9] BESTERA C, LEE J D, CHAVEZ A, et al. An Integrated Genome-Wide CRISPRa Approach to FunctionalizelncRNAs in Drug Resistance [J]. Cell, 2018, 173(3): 649-664. e20.

[10] CASTELLANOS-RUBIOA, FERNANDEZ-JIMENEZN, KRATCHMAROVR, et al. A Long Noncoding RNA Associ-

- ated with Susceptibility to Celiac Disease [J]. *Science*, 2016, 352(6281): 91-95.
- [11] ZHANG L, YAN J, LIU Q, et al. LncRNA Rik-203Contributes to Anesthesia Neurotoxicity via MicroRNA-101a-3p and GSK-3 β -Mediated Neural Differentiation [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 6822.
- [12] GE X S, CHEN Y B, LIAO X Y, et al. Overexpression of Long Noncoding RNA PCAT-1 is a Novel Biomarker of Poor Prognosis in Patients with Colorectal Cancer [J]. *Medical Oncology*, 2013, 30(2): 1-6.
- [13] YANG L, ZHANG J, JIANG A L, et al. Expression Profile of Long Non-Coding RNAs is Altered in Endometrial Cancer [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(4): 5010-5021.
- [14] RAZAVI M, GHORBIAN S. Up-Regulation of Long Non-Coding RNA-PCAT-1 Promotes Invasion and Metastasis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. *EXCLI Journal*, 2019, 18: 422-428.
- [15] GIBB E A, VUCIC E A, ENFIELD K S S, et al. Human Cancer Long Non-Coding RNA Transcriptomes [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25915.
- [16] QUJ, LIUB, LIB, et al. TRIB3 Suppresses Proliferation and Invasion and Promotes Apoptosis of Endometrial Cancer CellsbyRegulatingthe AKT Signaling Pathway [J]. *OncoTargetsand Therapy*, 2019, 12: 2235-2245.
- [17] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, et al. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358.
- [18] 侯丽云, 张旭, 吴珍. 多种归一化方法对 miRNA 微阵列数据的作用分析及比较 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 45(5): 98-102.
- [19] HUANG DA W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources [J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(1): 44-57.
- [20] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Bioinformatics Enrichment Tools: Paths Toward the Comprehensive Functional Analysis of Large Gene Lists [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(1): 1-13.
- [21] JEGGARI A, MARKS D S, LARSSON E. MiRcode: a Map of Putative microRNA Target Sites in the Long Non-Coding Transcriptome [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(15): 2062-2063.
- [22] CHOU C H, SHRESTHA S, YANG C D, et al. MiRTarBaseUpdate 2018: a Resource for Experimentally Validated MicroRNA-Target Interactions [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D296-D302.
- [23] LIU W J, WANG X W. Prediction of Functional microRNA Targets by Integrative Modeling of microRNA Binding and Target Expression Data [J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 1-10.
- [24] CHEN Y H, WANG X W. MiRDB: an Online Database for Prediction of Functional microRNA Targets [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D127-D131.
- [25] AGARWAL V, BELL GW, NAM JW, et al. Predicting Effective microRNA Target Sites in Mammalian mRNAs [J]. *eLifeSciences*, 2015, 4: e05005.
- [26] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: aSoftware Environment for Integrated Models of BiomolecularInteraction Networks [J]. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [27] BRAUNM M, OVERBEEK-WAGER E A, GRUMBO R J. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer [J]. *American Family Physician*, 2016, 93(6): 468-474.
- [28] SOROSKY J I. Endometrial Cancer [J]. *Obstetrics & Gynecology*, 2012, 120(2, Part 1): 383-397.