

• 临床检验研究论著 •

# miRNAs 对乳腺癌诊断价值的系统评价<sup>\*</sup>

葛梦圆, 桂 珍, 唐锦莉, 竺明晨, 严 枫<sup>△</sup>

(南京医科大学附属肿瘤医院检验科/江苏省恶性肿瘤分子生物学与转化医学重点实验室, 江苏南京 210000)

**摘 要:**目的 系统评价微小 RNA(miRNA)定量 PCR 检测对乳腺癌的诊断价值。方法 通过对 Medline、Embase 以及 Cochrane Library 数据库的检索, 选出 miRNA 与乳腺癌诊断相关的研究。按照纳入和排除标准独立筛选文献, 提取相关数据建立四格表, 用诊断性实验准确性质量评价工具(QUADAS)评价纳入研究的文献质量。统计分析软件选用 MetaDisc1.4、STATA11.0, 分析 miRNA 的诊断价值。结果 16 个研究被纳入, 其中包括 1 303 例病例组样本, 711 例对照组样本。研究间存在阈值效应(Spearman 相关系数为  $-0.758, P=0.001$ )。采用随机效应模型进行 meta 分析, miRNA 的合并敏感度为  $0.77(95\%CI: 0.75 \sim 0.79)$ , 合并特异度为  $0.77(95\%CI: 0.74 \sim 0.80)$ , 阳性似然比为  $4.19(95\%CI: 2.79 \sim 6.30)$ , 阴性似然比为  $0.25(95\%CI: 0.19 \sim 0.35)$ , 诊断比值比为  $19.91(95\%CI: 9.68 \sim 40.95)$ 。综合受试者工作特征(SROC)曲线的曲线下面积(AUC)为  $0.895 0$ 。结论 评价结果提示 miRNA 在乳腺癌诊断中一定的精确性, 但它还不足以替代现有的诊断方法, 乳腺癌的诊断仍然需要结合临床症状和传统检查共同进行。

**关键词:**微小 RNA; 乳腺癌; meta 分析; 诊断性试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.21.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)21-2875-04

## A systematic review of diagnostic value of miRNA for breast cancer<sup>\*</sup>

Ge Mengyuan, Gui Zhen, Tang Jinli, Zhu Mingchen, Yan Feng<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory/Key Laboratory of Molecular Biology and Translational Medicine Malignancies of Jiangsu Province, Nanjing Medical University Affiliated Cancer Hospital, Nanjing, Jiangsu 210000, China)

**Abstract:** Objective To systematically review the diagnostic value of microRNA(miRNA) quantitation in breast cancer. **Methods** Literatures about miRNA and breast cancer diagnosis were selected by retrieving Medline, Embase and Cochrane Library. According to the inclusion and exclusion criteria, the literatures were independently screened, and a  $2 \times 2$  contingency table was constructed. Quality of literatures was assessed by quality assessment of diagnostic accuracy studies(QUADAS). Statistical analysis was performed by employing Meta-Disc 1.4 software and STATA 11.0. **Results** 16 studies were included, which contained 1 303 patients and 711 control samples. There were threshold effects among these studies (the spearman's correlation coefficient was  $-0.758, P=0.001$ ). A random effects model was used for meta-analysis. The summary sensitivity, specificity, positive likelihood ratio, negative likelihood ratio, and diagnostic odds ratio for miRNA in breast cancer diagnosis were  $0.77(95\%CI: 0.75 \sim 0.79)$ ,  $0.77(95\%CI: 0.74 \sim 0.80)$ ,  $4.19(95\%CI: 2.79 \sim 6.30)$ ,  $0.25(95\%CI: 0.19 \sim 0.35)$ ,  $19.91(95\%CI: 9.68 \sim 40.95)$ . The area under curve of SROC was  $0.895 0$ . **Conclusion** These results suggest that miRNAs have potential value to diagnose breast cancer. However, effective diagnosis of breast cancer still needs to be conducted with assistance of clinical findings and traditional lab investigations.

**Key words:** microRNAs; breast neoplasms; meta-analysis; diagnostic tests

乳腺癌是女性排名第一的常见恶性肿瘤。有研究估计在 2014 年乳腺癌将成为女性癌症新发病例之首<sup>[1]</sup>。目前临床医生主要根据患者临床体征、影像表现及相关的肿瘤标志物来初步判断是否为乳腺癌。早期诊断是提高乳腺癌治愈率的关键, 但乳腺癌早期缺乏明显的临床特征。用于乳腺癌的诊断标志物主要有癌胚抗原(CEA)和糖类抗原 15-3(CA15-3), 但它们的灵敏度和特异性有限, 临床应用受到一定的限制。

近年来研究发现, 肿瘤患者外周血中存在大量的微小 RNA(miRNA), 而且不同肿瘤中的 miRNA 表达谱不同, 这提示 miRNA 在肿瘤诊断中的价值<sup>[2]</sup>。miRNA 在调控细胞凋亡、增殖、分化、转移等多种生物学过程中起重要作用<sup>[3-4]</sup>。据估计, miRNA 调控大约 30% 的人类基因组的表达<sup>[5]</sup>。在各种体液(血浆、唾液、眼泪、尿液、羊水、母乳、支气管灌洗液、脑脊

液、腹腔积液、胸腔积液、精液等)中都可以检测出 miRNA<sup>[6]</sup>。并且 miRNA 在富含核糖核酸酶(RNase)的环境中仍然能保持自身稳定, 具有作为生物标志物的潜在优势<sup>[7-8]</sup>。目前已有多篇关于 miRNA 可作为乳腺癌诊断标志物的文献报道, 研究结果不甚一致。为此, 本研究旨在系统评价有关 miRNA 诊断乳腺癌的研究, 从而为临床工作者选择乳腺癌的诊断试验提供有用的信息<sup>[9]</sup>。

## 1 资料与方法

**1.1 纳入和排除标准** 纳入标准: (1) 研究设计为 miRNA 诊断乳腺癌与金标准对比的诊断试验; (2) 提供的数值能推算出四格表、敏感度、准确度; (3) 每一个分组包含 10 例以上的患者; (4) 研究组为未经治疗的乳腺癌患者, 对照组为健康志愿者或体检者; (5) 组织学诊断作为金标准。排除标准: (1) 综述和

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21075055); 江苏省科技厅临床医学专项(BL2013036); 江苏省医学领军人才与创新团队项目(LJ201131)。作者简介: 葛梦圆, 女, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤标志物研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: yanfeng1895@163.com。

会议文献;(2)数据不完整无法利用的文献;(3)重复发表的文献。

**1.2 文献检索策略** 检索在 Medline、Embase 以及 Cochrane Library 的数据库中进行,语言限定为英文。检索词为“breast cancer”、“microRNA”、“receiver operating characteristic”、“false negative”、“false positive”、“sensitivity and specificity”。检索时间截止于 2014 年 5 月 21 日。另外,也参阅了一些在相关文献中的参考文献。

**1.3 文献筛选和资料提取** 两位评价者按预先制定的纳入和排除标准独立筛选、核对文献。存在异议之处通过讨论协商或参考第三方意见做出评价。从所纳入文章中提取的相应的资料,包括作者、出版时间、国家、检测方法、研究组人数、对照组人数、敏感度、特异度、miRNA 种类。

**1.4 质量评价** 两位评价者独立对文章进行评估,每一个文献质量标准都根据诊断性实验准确性质量评价工具(QUADAS)打出相应的分数(满分 14 分),评价分“是”、“否”和“不清楚”三个判断标准,“是”记 1 分,“否”与“不清楚”记 0 分<sup>[10]</sup>。

**1.5 统计学处理** 统计学分析使用 meta 分析诊断准确性试验指导方法<sup>[11]</sup>。所得数据转化为四格表中的真阳性、假阳性、假阴性、真阴性的人数数值。相关数据利用 MetaDisc1.4 进行 meta 分析、STATA11.0 进行发表偏移分析<sup>[12]</sup>。各研究之间的差异是否由于本身的异质性造成运用卡方检验、似然比检

验。用  $I^2$  评估异质性的 size, <25% 表示异质性较小, 25~50% 表示中等异质性, >50% 表示高度异质性<sup>[13]</sup>。若存在异质性则采用随机效应模型,反之则使用固定效应模型<sup>[14]</sup>。绘制综合受试者工作特征(SROC)曲线<sup>[15]</sup>,当 SROC 曲线平面图上的点呈现“肩壁”状分布,提示存在阈值效应。亦采用敏感性对数与(1-特异性对数)的 Spearman 相关系数检验阈值效应,并用 Cochran-Q 检验判断非阈值效应的存在。检验水准为  $P=0.05$ 。计算合并敏感度、合并特异度、阳性似然比(PLR)、阴性似然比(NLR)、诊断比值比(DOR)值、曲线下面积(AUC)等。发表偏移用漏斗图表示,其对称性与发表偏移相关<sup>[16]</sup>。

2 结 果

**2.1 纳入研究的基本情况** 通过筛选及排除重复题录,最终共收集到 152 篇相关文献。最终纳入的 14 篇文献,研究组和对照组共 2 014 例,其中病例组 1 303 例,对照组 711 例。所有的患者都被组织病理学诊断为乳腺癌,对照组为健康的志愿者或体检者。研究涉及多种 miRNA 的亚型。其中研究有 8 个在中国进行,3 个在墨西哥,爱尔兰、美国、德国分别 1 个。14 篇文献的 16 组研究中,14 组应用 RT-PCR 方法,2 组应用 FQ-PCR 方法。提取的相关信息参见表 1。

**2.2 纳入研究的方法学质量评价** 利用 QUADAS 对 16 组研究做出评价,其中的 7 篇文献分数大于 10。见表 1。

表 1 纳入研究的基本特征

研究 编号	作者	出版时间	国家	检测方法	患者		检测结果(n)				QUADAS 评分	miRNA 亚型
					n	样本类型	TP	FP	FN	TN		
1	Heneghan 等 <sup>[19]</sup>	2010	爱尔兰	FQ-PCR	83	全血	73	4	10	40	11	miR-195
2	Asage 等 <sup>[20]</sup>	2011	美国	RT-PCR	102	血清	68	5	34	15	10	miR-21
3	Sun 等 <sup>[21]</sup>	2012	中国	RT-PCR	103	血清	67	10	36	45	9	miR-155
4	Guo 等 <sup>[22]</sup>	2012	中国	RT-PCR	152	血清	107	30	45	45	9	miR-181a
5	Hu 等 <sup>[23]</sup>	2012	中国	RT-PCR	48	血清	44	5	4	43	10	miR-16, miR-25, miR-222, miR-324-3p
6	Hu 等 <sup>[23]</sup>	2012	中国	RT-PCR	76	血清	70	5	6	71	10	miR-16, miR-25, miR-222, miR-324-3p
7	Wu 等 <sup>[24]</sup>	2012	中国	RT-PCR	50	血清	37	20	13	30	9	miR-222
8	Wang 等 <sup>[25]</sup>	2012	中国	RT-PCR	50	血清	40	4	10	26	8	miR-21
9	Zhao 等 <sup>[26]</sup>	2012	中国	RT-PCR	122	血清	79	18	43	41	9	miR-10b miR-148b, miR-409- 3p,
10	Cuk 等 <sup>[27]</sup>	2012	德国	RT-PCR	127	血浆	89	36	38	44	10	miR-801 miR-10b, miR-373
11	Chen 等 <sup>[28]</sup>	2013	中国	RT-PCR	60	血浆	43	1	17	9	10	miR-30a
12	Zeng 等 <sup>[29]</sup>	2013	中国	RQ-PCR	100	血浆	74	22	26	42	9	miR-145, miR-451
13	Ng 等 <sup>[30]</sup>	2013	中国	RT-PCR	70	血浆	58	4	12	46	11	miR-145, miR-155, miR-382
14	Mar-Aguilar 等 <sup>[31]</sup>	2013	墨西哥	RT-PCR	60	全血	59	0	1	10	8	miR-125b, miR-191
15	Mar-Aguilar 等 <sup>[32]</sup>	2013	墨西哥	RT-PCR	50	组织	50	1	0	19	8	miR-21, miR-191
16	Mar-Aguilar 等 <sup>[32]</sup>	2013	墨西哥	RT-PCR	50	组织	46	0	4	20	8	

TP:真阳性;FP:假阳性;FN:假阴性;TN:真阴性。

**2.3 Meta 分析结果** 本研究中,敏感度卡方值为 116.25,自由度 15,  $P<0.01$ ,  $I^2=87.1\%$ , 特异度卡方值为 100.79,自由

度 15,  $P<0.01$ ,  $I^2=85.1\%$ 。因此认为,异质性可以被检出。Spearman 相关系数为 -0.758,  $P=0.001$ ,提示存在阈值效应。

经过 Cochran-Q 检验,  $Cochran-Q=0.8259, P<0.05$  提示存在非阈值效应引起的异质性, 可能与 miRNA 的不同亚型有关。根据 Moses 模型作图, 图 1、2 的森林图显示的是 16 个研究中 miRNA 诊断乳腺癌的敏感度以及特异度。取 95%CI, 结果显示合并敏感度为: 0.77(95%CI: 0.75~0.79), 合并特异度为 0.77(95%CI: 0.74~0.80)。图 3、4 中, 阳性似然比为 4.19(95%CI: 2.79~6.30), 阴性似然比为 0.25(95%CI: 0.19~0.35)。DOR 的范围是 0 到正无穷, 值越大, 说明实验的诊断能力越强, 图 5 显示 DOR 值为 19.91(95%CI: 9.68~40.95)。SROC 的 AUC 为 0.8950。Q 值是 SROC 曲线与 ROC 平面对角线的交点, 表示 miRNA 在乳腺癌检测中的汇总灵敏度和特异度, 代表实验的诊断能力, SROC 曲线显示 Q 值为 0.8259。随后对不同的样本中 miRNA 在乳腺癌中的表达进行了分析, 结果见表 2。

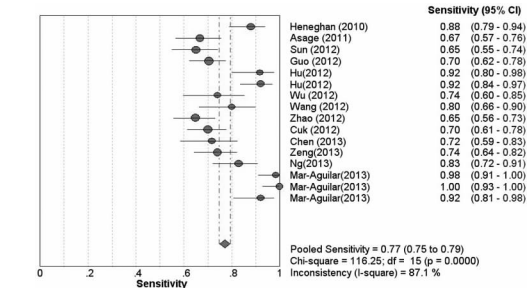


图 1 miRNAs 诊断乳腺癌诊断敏感性的 meta 分析

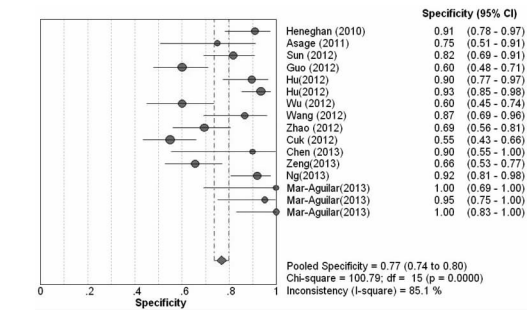


图 2 miRNAs 诊断乳腺癌特异度的 meta 分析

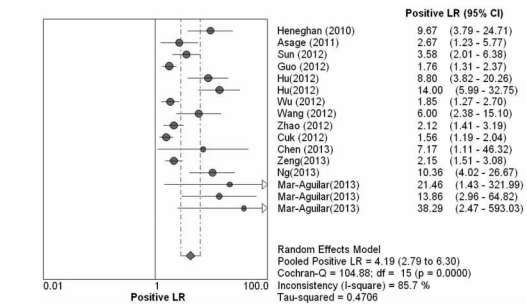


图 3 miRNAs 诊断乳腺癌的 PLR

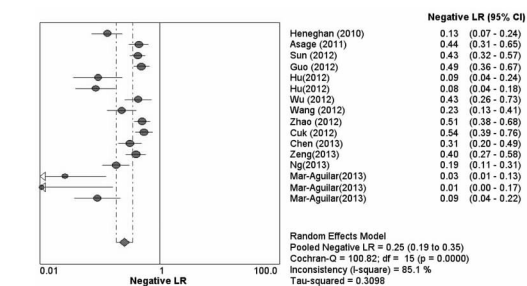


图 4 miRNAs 诊断乳腺癌的 NLR

表 2 按样本种类进行亚组分析

样本	n	PLR(95%CI)	NLR(95%CI)	DOR(95%CI)
全血	2	10.54(4.34~25.56)	0.07(0.01~0.33)	150.96(17.00~1 340.19)
血清	8	3.12(2.05~4.74)	0.35(0.25~0.48)	10.24(4.71~22.24)
血浆	4	3.12(1.50~6.49)	0.35(0.25~0.53)	10.08(2.89~35.15)
组织	2	4.34(0.83~22.70)	0.23(0.08~0.70)	18.92(1.47~242.93)

2.4 发表偏移 发表偏移分别用 Begg's test 和 Egger's test 进行检测, 对应结果见图 5, 提示无明显的发表偏移。

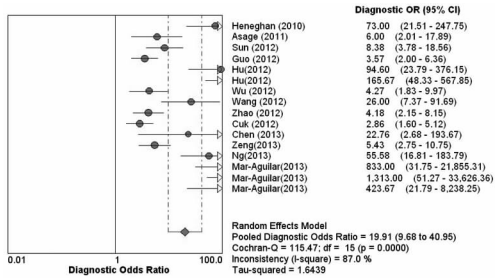


图 5 miRNAs 诊断乳腺癌的诊断比数比

3 讨论

寻找敏感度和特异度都较高的生物标志物能大大地提高乳腺癌的诊断效力, 并能及时发现早期的病变。目前, CA15-3 是临床上公认的对乳腺癌较为特异的肿瘤标志物, 其他如 CEA、CA125 也有相应的检测能力, 但它们检测的阳性率都较低。CA15-3 属于糖链抗原类标志物, 对于原发性乳腺癌患者, 单项检测 CA15-3 敏感度仅约 20% 左右, 在健康人及乳腺良性病变也可能出现阳性结果。到后期随病情进展, 血清 CA15-3 的浓度和阳性率会逐步提高。然而 CA15-3 漏诊率和假阳性的局限, 限制了对更广泛地使用。相比之下, miRNA 在乳腺癌的诊断中存在优势。

在这 16 个纳入的研究中, miRNA 的检测呈现出较高的敏感度(0.77)和特异度(0.77), 同时其较高的 DOR 值(19.91), 提示一定的准确性<sup>[17]</sup>。似然比指患者群中试验结果的概率与无患者群中实验结果概率之比。似然比大于 10 或小于 0.1 提示结论有较大意义, 似然比在 5 到 10 之间及 0.1 到 0.2 之间有中等大小的意义, 似然比在 2 到 5 之间及 0.2 到 0.5 之间提示具有虽然小但往往重要的意义, 似然比在 1 到 2 及 0.5 到 1 之间提示有较小且不重要的意义<sup>[18]</sup>。在本次 meta 分析中, PLR 为 4.19, 提示乳腺癌患者 miRNA 检测阳性的概率比非乳腺癌人群检测阳性的概率高 4.19 倍。NLR 为 0.25, 提示 miRNA 检测结果为阴性的人群中, 25% 的人有可能是患有乳腺癌的, 因而没有足够的能力排除乳腺癌。AUC 正常值在 1.0 和 0.5 之间。在 AUC>0.5 的情况下, AUC 越接近于 1, 说明诊断效果越好。在 0.5~0.7 之间时有较低准确性, 在 0.7~0.9 之间时有一定准确性, AUC 在 0.9 以上时有较高准确性。本次 meta 分析中, miRNA 的 AUC 为 0.8950, 可以认为具备一定的准确性。14 个文献中总共包括 20 多种 miRNA, 不同的 miRNA 可用于不同的诊断目的, 如早期诊断或对预后的判断等, 这些还需要进一步的研究。当传统标志物与 1 种 miRNA 或多种 miRNA 联合诊断, 可以大大增加诊断试验的敏感度和特异度。

本研究不足之处在于, 由于电子检索的局限可能导致相关文献的缺失, 并且仅局限于英文文献, 可能漏检以其他语种发

表的符合纳入标准的试验,最终使得纳入文献较少。不同的研究中,样本处理及储存的时间、方式的不同,诊断试验所用试剂和仪器的不同,实验者的不同都使各研究存在一定的差异,影响分析的结果。在今后的诊断性试验研究中,应明确金标准和评价标准的间隔时间,且病例组和对照组尽可能使用同样的金标准,应明确研究对象的选择标准,还应保证试验过程中的盲法。

综上所述,miRNA 作为新兴的标志物,已显示出优于传统标志物的潜力,但它仍然存在一定的误诊率和漏诊率。同时,相关 miRNA 与某些特定肿瘤的关系,检测技术的选择还需要进一步的研究,因此对乳腺癌的诊断需要结合临床症状和传统检查同时进行。

参考文献

[1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2013[J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1):11-30.

[2] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004,431(7006):350-355.

[3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.

[4] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs;are the answers in sight? [J]. Nat Rev Genet,2008,9(2):102-114.

[5] Weber JA,Baxter DH,Zhang S,et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids[J]. Clin Chem,2010,56(11):1733-1741.

[6] Mitchell PS,Parkin RK,Kroh EM,et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2008,105(30):10513-10518.

[7] Kosaka N,Iguchi H,Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid;a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis [J]. Cancer Sci,2010,101(10):2087-2092.

[8] Deeks JJ,Higgins JPT,Altman DG. Analysing and presenting results[M]//Higgins JPT,Green S. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions. Chichester,UK: Wiley,2006:97-166.

[9] Whiting PF,Weswood ME,Rutjes AW,et al. Evaluation of QUADAS,a tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies[J]. BMC Med Res Methodol,2006,6:9.

[10] Deville WL,Buntinx F,Bouter LM,et al. Conducting systematic reviews of diagnostic studies: didactic guidelines[J]. BMC Med Res Methodol,2002,2:9.

[11] Zamora J,Abaira V,Muriel A,et al. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data[J]. BMC Med Res Methodol, 2006,6:31.

[12] Higgins JP,Thompson SG,Deeks JJ,et al. Measuring inconsistency in meta-analyses[J]. BMJ,2003,327(7414):557-560.

[13] Vamvakas EC. Meta-analyses of studies of the diagnostic accuracy of laboratory tests;a review of the concepts and methods[J]. Arch Pathol Lab Med,1998,122(8):675-686.

[14] Moses LE,Shapiro D,Littenberg B. Combining independent studies of a diagnostic test into a summary ROC curve;data-analytic approaches and some additional considerations [J]. Stat Med, 1993,12(14):1293-1316.

[15] Deeks JJ,Macaskill P,Irwig L. The performance of tests of publication bias and other sample size effects in systematic reviews of diagnostic test accuracy was assessed[J]. J Clin Epidemiol,2005, 58(9):882-893.

[16] Zweig MH,Campbell G. Receiver-operating characteristic(ROC)

plots;a fundamental evaluation tool in clinical medicine[J]. Clin Chem,1993,39(4):561-577.

[17] Glas AS,Lijmer JG,Prins MH,et al. The diagnostic odds ratio;a single indicator of test performance[J]. J Clin Epidemiol,2003,56 (11):1129-1135.

[18] Jaeschke R,Guyatt GH,Sackett DL. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The evidence-based medicine working group[J]. JAMA, 1994,271(9):703-707.

[19] Heneghan HM,Miller N,Kelly R,et al. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease [J]. Oncologist,2010,15(7):673-682.

[20] Asaga S,Kuo C,Nguyen T,et al. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer[J]. Clin Chem,2011,57(1):84-91.

[21] Sun Y,Wang M,Lin G,et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer[J]. PLoS One,2012,7 (10):e47003.

[22] Guo LJ,Zhang QY. Decreased serum miR-181a is a potential new tool for breast cancer screening[J]. Int J Mol Med,2012,30(3): 680-686.

[23] Hu Z,Dong J,Wang LE,et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls[J]. Carcinogenesis,2012,33(4):828-834.

[24] Wu Q,Wang C,Lu Z,et al. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection[J]. Clin Chim Acta,2012, 413(13/14):1058-1065.

[25] Wang B,Zhang Q. The expression and clinical significance of circulating microRNA-21 in serum of five solid tumors[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2012,138(10):1659-1666.

[26] Zhao FL,Hu GD,Wang XF,et al. Serum overexpression of microRNA-10b in patients with bone metastatic primary breast cancer[J]. J Int Med Res,2012,40(3):859-866.

[27] Cuk K,Zucknick M,Heil J,et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer[J]. Int J Cancer, 2013,132(7):1602-1612.

[28] Chen W,Cai F,Zhang B,et al. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer;potential biomarkers[J]. Tumour Biol,2013,34(1):455-462.

[29] Zeng RC,Zhang W,Yan XQ,et al. Down-regulation of miRNA-30a in human plasma is a novel marker for breast cancer[J]. Med Oncol,2013,30(1):477.

[30] Ng EK,Li R,Shin VY,et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection[J]. PLoS One,2013,8(1): e53141.

[31] Mar-Aguilar F,Mendoza-Ramirez JA,Malagon-Santiago I,et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers[J]. Dis Markers,2013,34(3):163-169.

[32] Mar-Aguilar F,Luna-Aguirre CM,Moreno-Rocha JC,et al. Differential expression of miR-21,miR-125b and miR-191 in breast cancer tissue[J]. Asia Pac J Clin Oncol,2013,9(1):53-59.