

[18]

Bocci F, Jolly M K, George J T, *et al.* A mechanism-based computational model to capture the interconnections among epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and Notch-Jagged signaling[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(52): 29906-29920.

[19]

Zhong C H, Li X, Tao B, *et al.* LIM and SH3 protein 1 induces glioma growth and invasion through PI3K/AKT signaling and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 116: 1-18.

[20]

Gibbs, P E, Miralem T, Maines M D. Biliverdin reductase: a target for cancer therapy? [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6 (119): 1-18.

[21]

Zhang M, Song S S, Yi Z, *et al.* Human biliverdin reductase promotes EMT through the ERK1/2 signal pathway in breast cancer[J]. *Eur J Phampcol*, 2016, 788: 45-53.

[22]

Arena V, Pennacchia I, Guerriero G, *et al.* The heme oxygenase/biliverdin reductase system in skin cancers [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2015, 29(1): 259-264.

[23]

Zhang J, Wang K, Liu S S, *et al.* Using proteomic approach to identify tumor-associated proteins as biomarkers in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(6): 2863-2872.

延龄草总皂苷体内外抗结肠癌活性的作用

陈静文^{1,2}, 陈先勇¹, 赵龙飞^{1,3}, 柳蔚^{1,4}, 李世刚^{1,4}, 喻玲玲^{1,3,4*}

[1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 三峡大学人民医院 (宜昌市第一人民医院) 病理科, 湖北宜昌 443000; 3. 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002; 4. 国家中医药管理局中药药理 (肿瘤) 科研三级实验室, 湖北 宜昌 443002]

摘要: **目的** 基于 RAS/AKT/ERK 信号通路探讨延龄草总皂苷体内外抗结肠癌作用及机制。**方法** 建立移植瘤小鼠模型, 延龄草总皂苷水溶液 (5、10、15 mg/kg) 灌胃给药, 通过 RT-PCR 方法检测瘤体组织细胞基因表达, HE 染色法测定组织病理学变化, Western blot 法测定瘤组织中 RAS 蛋白的表达; 体外实验包括 MTT 法检测延龄草总皂苷对其抑制率的影响, Western blot 法检测细胞中 RAS 蛋白、AKT、ERK1/2 蛋白及其磷酸化蛋白的表达。**结果** 体内实验结果表明对照组瘤重为 (3.101±0.301) g、延龄草总皂苷低剂量组为 (2.325±0.241) g、延龄草总皂苷中剂量组为 (2.019±0.305) g、延龄草总皂苷高剂量组为 (1.513±0.178) g; 瘤体组织细胞 RAS 基因表达呈现剂量依赖性降低; HE 染色显示延龄草总皂苷 (10、15 mg/kg) 可见大片肿瘤细胞坏死; 瘤组织 RAS 蛋白表达呈现浓度依赖性降低。细胞毒性实验结果表明延龄草总皂苷可以有效抑制结肠癌 CT26 细胞增殖; Western blot 实验结果显示延龄草总皂苷能够下调结肠癌 CT26 细胞中 RAS 蛋白以及磷酸化 AKT、磷酸化 ERK1/2 蛋白的表达。**结论** 延龄草总皂苷可以在体内外产生抗结肠癌作用, 其机制可能与干扰 RAS/AKT/ERK 信号通路相关。

关键词: 延龄草总皂苷; 结肠癌; RAS/AKT/ERK 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)08-2188-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.08.040

结肠癌是消化系统中最为常见的恶性肿瘤之一^[1], 严重威胁人类健康。化疗仍是治疗结肠癌的主要手段, 但化疗药物严重的不良反应等问题使其临床应用受到很大的限制。因此寻找能高效杀伤肿瘤细胞同时毒副作用小的药物, 是当今抗肿瘤新药研发的热点。

延龄草 *Trillium tschonoskii* Maxim. 是土家族四大名药之一, 别名“头顶一颗珠、芋儿七”。其味甘性温, 有消痛

去肿、止血解毒、安神活血等功效, 主治肺痈疮肿、疔疮肿毒、头痛眩晕、神经衰弱等疾病, 因其果实呈圆球形生长在上部故得名“天珠”。而其根茎下方生多数细根, 加工成药材时常将其编扎在根茎之外方, 形成球状, 又因其生长在地下, 又称“地珠”^[2]。延龄草总皂苷是其主要的化学成分^[3]。研究表明, 延龄草总皂苷 (Trillium Total Saponins, TTB) 对结肠癌、肺癌、宫颈癌等均有显著抑制

收稿日期: 2019-08-24
基金项目: 国家自然科学基金 (81503355); 湖北省教育厅项目 (Q20131309)
作者简介: 陈静文 (1993—), 女, 硕士生, 研究方向为天然药物的抗肿瘤作用。E-mail: 361499836@qq.com
* 通信作者: 喻玲玲 (1983—), 女, 博士生, 研究方向为天然产物化学及抗肿瘤活性。E-mail: yulingling@ctgu.edu.cn
网络出版日期: 2020-08-20
网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20200819.1659.002.html>

作用^[4]。*RAS*是目前所知最保守的癌基因之一，参与细胞生长、增殖、发育及分化调控等重要生理过程，也在细胞恶性转化中起重要作用。*RAS*蛋白的持续活化可引起细胞快速增殖和抗凋亡信号亢进，由此导致肿瘤的发生和发展。Hans Raskov 等^[5-6]研究发现，结肠癌的发生与 *K-ras*、*APC* 和 *P53* 基因突变高度相关。目前，已有许多研究证实延龄草总皂苷可以显著抑制结肠癌细胞增殖^[7]，诱导结肠癌细胞凋亡^[8]，抑制结肠癌细胞转移^[9]，但其可能的分子机制尚未阐明。因此，本课题组观察了延龄草总皂苷对裸鼠皮下肿瘤的抑制作用以及其对结肠癌 CT26 细胞增殖的抑制作用，探讨其可能发生的作用机制，以期为结肠癌的临床治疗提供基础理论支撑。

1 材料

1.1 药材 本实验所用中药延龄草地珠采摘于神农架林区，经三峡大学生物技术研究中心陈发菊教授鉴定为延龄草地珠 *Trillium tschonoskii* Maxim.，植物标本保存于三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室（编号 TT200509SNJ）。

1.2 试剂 甲醇购自天津市天力化学试剂有限公司（批号 20180708）；乙醇购自上海沪试化学试剂有限公司（批号 20190123）；石油醚购自天津市科密欧化学试剂有限公司（批号 20161207）；乙酸乙酯购自广东西陇科学股份有限公司（批号 160805）；正丁醇购自广东华大化学试剂有限公司（批号 20130810）；RPMI-1640 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司（批号 WHO1111803SP）；胰蛋白酶购自杭州吉诺生物有限公司（批号 20180806）；胎牛血清（批号 1856032）购自美国 gibco 公司；二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide, DMSO）购自国药集团化学试剂有限公司（批号 20160704）；MTT 试剂购自武汉塞维尔生物科技有限公司（批号 180909）；BCA 试剂盒（批号 RC230516）购自美国 Thermo Scientific 公司；β-actin 抗体（批号 181109）购自武汉塞维尔生物科技有限公司；RAS 抗体（批号 5）、Akt 抗体（批号 20）、p-Akt 抗体（批号 23）、ERK1/2 抗体（批号 21）、p-ERK1/2 抗体（批号 17）均购自美国 CST 公司。

1.3 仪器 EYELAN-1100 型旋转蒸发仪购自上海爱郎仪器有限公司；电子天平购自上海天平仪器厂；全波长酶标仪购自美国 Thermo Electron 公司；MCD175 型 CO₂ 培养箱购自日本 Sanyo 公司；Eppendorf centrifuge 5804R 型低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司；超净台购自苏州安泰空气技术有限公司；微型瞬时离心机、免疫印迹仪，凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.4 瘤株 小鼠 CT26 细胞购自上海柯雷生物技术有限公司。

1.5 动物 BALB/c-nu 雌性鼠与雄性鼠各 20 只，SPF 级，体质量 18~20 g，由湖北省实验动物研究中心供应，由三峡大学动物实验中心饲养，实验动物使用许可证编号为 SYXK（鄂）2011-0061。

2 方法

2.1 延龄草总皂苷制备 取延龄草地珠于 48 ℃ 恒温干燥，粉碎后过 60 目筛，得到 6.4 kg 原药材粉末。以甲醇为溶剂，利用多功能强制渗漉罐（常压，65 ℃）提取，每 2 h 提取 1 次，反复 3 次。提取液过滤后用旋转蒸发仪减压浓缩（温度 48 ℃），干燥得深棕色醇提物浸膏共 2.4 kg。甲醇提取浸膏和蒸馏水以 1：1 比例充分混匀，依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取，萃取液减压浓缩（0.1 mPa，50 ℃），真空冷冻干燥得各个萃取物。其中正丁醇萃取部分浸膏 723 g，为延龄草总皂苷。经比色法测定延龄草中总皂苷的含有量为 19.78%。

2.2 建立移植瘤小鼠模型 BALB/c-nu 鼠在三峡大学动物实验中心适应性饲养一周后开始实验（体质量 18~20 g）。取对数生长期结肠癌 CT26 细胞，台盼蓝拒染显示活细胞>95%，调整细胞浓度至 4×10⁶/L，制成细胞悬液，于右腋皮下接种 0.2 mL 形成实体瘤。待肿瘤大小约为 100 mm³ 后将荷瘤小鼠随机分为对照组、5-FU 组及高、中、低浓度组，每组 8 只。模型组给予生理盐水灌胃（0.2 mL），低、中、高剂量组分别用延龄草总皂苷水溶液（5、10、15 mg/kg）灌胃。每天给药 1 次，共 9 d。

2.3 肿瘤抑制率的计算 每 2 天测量 1 次体质量，观察给药组和对照组荷瘤小鼠体征和体质量变化情况，并绘制出体质量变化图。给药第 9 天，处死荷瘤小鼠，剥取瘤组织并称取质量，计算肿瘤抑制率。抑瘤率=〔（对照组平均瘤重-给药组平均瘤重）/对照组平均瘤重〕×100%。

2.4 病理切片 HE 染色 荷瘤小鼠称定质量处死后，剥离瘤体组织，剪取 1 cm×1 cm 组织固定于 10% 甲醛溶液中，常规石蜡包埋切片，苏木精-伊红染色法（hematoxylin-eosin staining, HE）染色，镜下观察肿瘤组织病理学变化。

2.5 RT-PCR 检测瘤体组织细胞 RAS 基因表达 称取 150 mg 瘤组织置于干燥的玻璃匀浆器内，加 1 mL TRIzol，充分研磨，提取 RNA，利用反转录试剂盒将其反转录为 cDNA，然后 RT-PCR 的方法检测 RAS 基因的表达。采用 2^{-ΔΔCT} 法分析实验组和对照组细胞之间 RAS mRNA 表达的相对差异。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	序列
RAS	正向 5'-ATGACTGAGTATAAACTTGT-3'
	反向 5'-TCACATAACTGTACACCTTG-3'
β-actin	正向 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'
	反向 5'-CTGGGTCATCTTTTCACGGT-3'

2.6 MTT 法检测延龄草总皂苷对 CT26 体外增殖抑制作用 将处于对数生长期的结肠癌 CT26 细胞以 5×10⁴/mL 接种于 96 孔板内，每孔 100 μL，置于 5% CO₂、37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h。分别加入含有不同浓度的延龄草总皂苷（0、3.125、6.25、12.5、25、50 μg/mL）的培养液 100 μL，溶剂对照组仅加入含有 0.054% DMSO 的培养液，每孔设置 3 个平行复孔，细胞继续培养 24 h。然后取出培养板，

每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL，继续孵育 4 h 后，弃去留存的孵育液，每孔加入 150 μL DMSO 置摇床低俗振荡 10 min 使得结晶充分溶解，酶标仪上检测各孔 490 nm 处吸光度值 (OD)。计算细胞增殖率 = $[(OD_{\text{给药组}} - OD_{\text{对照组}}) / OD_{\text{对照组}}] \times 100\%$ 。

2.7 Western blot 测定结肠癌细胞中 RAS、Akt、p-Akt、ERK1/2、p-ERK1/2 的表达以及瘤体组织细胞 RAS 蛋白的表达 收集对照组和延龄草总皂苷处理各组结肠癌 CT26 细胞，用细胞刮收集后加入 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白，用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。蛋白变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜。聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h，分别加兔抗 RAS (1 : 1 000)、Akt (1 : 1 000)、p-Akt (1 : 1 000)、ERK1/2 (1 : 1 000)、p-ERK1/2 (1 : 1 000) 及兔抗 β-actin (1 : 1 000) 一抗 4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗膜后加对应 HRP 标记二抗，室温孵育 2 h，TBST 洗膜后，进行化学发光。瘤体组织细胞的处理与之类似，取 0.1 g 瘤组织放入玻璃匀浆器，加入 1 mL RIPA 裂解液，冰上充分研磨，提取蛋白，用相同的方法检测其中 RAS 蛋白的表达。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据统计，Western blot 采用 Image J 进行灰度分析。定量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，*n* 为样本数量，两组间计量资料的比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 肿瘤抑制率 如表 2 所示，5-FU 组肿瘤抑制率最高为 65.15%，延龄草总皂苷高、中、低浓度组也都表现出较好的抑制率，分别为 51.22%、34.88% 和 25.02%，呈一定的浓度依赖趋势。此结果说明延龄草总皂苷对小鼠体内肿瘤的生长有抑制效果。

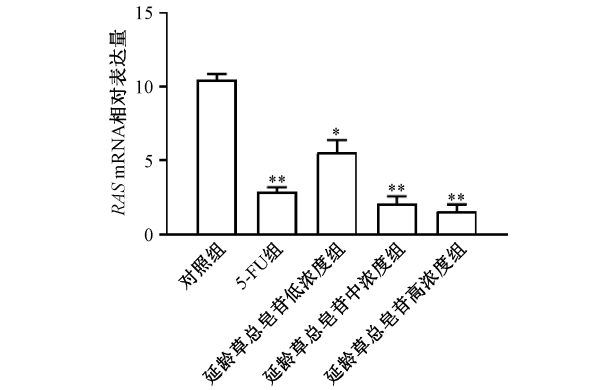
表 2 延龄草总皂苷对小鼠瘤重的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	瘤重/g	抑瘤率/%
对照组	—	3.101±0.301	—
5-FU	10	1.081±0.118 **	65.15
延龄草总皂苷低浓度组	5	2.325±0.241 **	25.02
延龄草总皂苷中浓度组	10	2.019±0.305 **	34.88
延龄草总皂苷高浓度组	15	1.513±0.178 **	51.22

注:与对照组比较,** *P* < 0.01。

3.2 延龄草总皂苷对 RAS 基因表达的影响 如图 2 所示，与对照组相比，延龄草总皂苷的低、中、高浓度组均能降低 RAS 基因的表达 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)，呈浓度依赖性。因此推测延龄草总皂苷抑制肿瘤的生长与抑制 RAS 基因表达或者其下游通道基因相关联。

3.3 延龄草总皂苷作用肿瘤组织及脾组织 HE 染色结果 与对照组相比，延龄草总皂苷的低、中、高浓度组均可见肿瘤细胞坏死，尤其以中高浓度组明显，其中可见大片肿瘤细胞坏死。由此说明延龄草总皂苷可促进结肠癌细胞的凋亡 (图 3)。结果显示多数细胞核显深色，且胞质致密、嗜酸性染色 (伊红染色) 增强，呈凋亡状态。同时，为了观



注:与对照组比较,* *P* < 0.05,** *P* < 0.01。

图 2 延龄草总皂苷对 RAS 基因表达的影响 (*n* = 8)

察延龄草总皂苷对小鼠是否有器质性的影响，对荷瘤鼠的脾脏进行切片。如图 4 所示，与对照组相比，各组脾脏切片均未见明显病变，无明显差异，说明延龄草总皂苷对正常组织的毒副作用小。

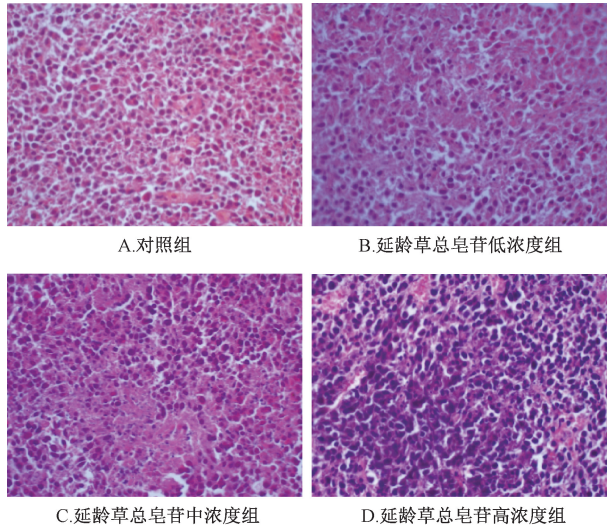


图 3 延龄草总皂苷作用后肿瘤组织 HE 染色 (×40)

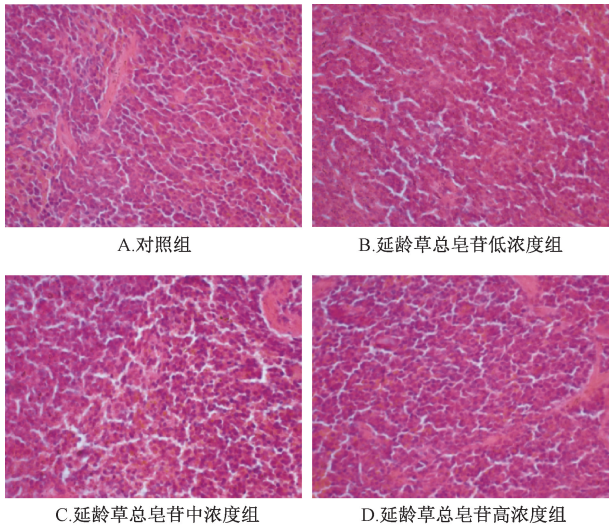
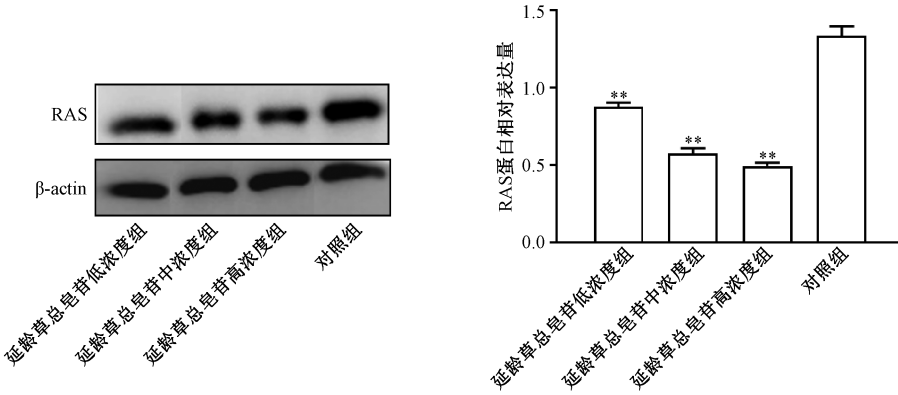


图 4 延龄草总皂苷作用后脾脏组织 HE 染色 (×40)

3.4 延龄草总皂苷降低体内 RAS 蛋白的表达 如图 5 所示,与对照组相比,延龄草总皂苷的低、中、高浓度组均

能降低 RAS 蛋白的表达 ($P<0.01$),而且呈剂量依赖性。

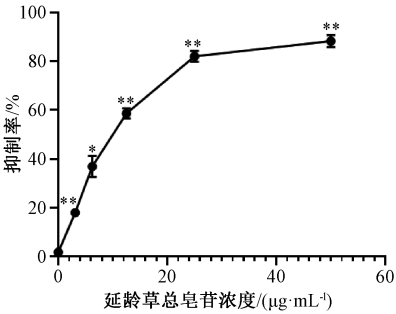


注:与对照组比较,** $P<0.01$ 。

图 5 延龄草总皂苷对肿瘤组织 RAS 蛋白表达的影响 ($n=8$)

3.5 延龄草总皂苷抑制结肠癌 CT26 细胞增殖 延龄草总皂苷处理体外培养 CT26 细胞 24 h 后,MTT 法分析药物对细胞增殖能力的影响,图 6 显示延龄草总皂苷对 CT26 细胞增殖具有抑制作用,抑制效果随总皂苷浓度的增加而增强。在处理 24 h 条件下,延龄草总皂苷作用于 CT26 细胞的 IC_{50} 为 $(10.23\pm1.02)\mu\text{g/mL}$ 。依据上述结果,后续实验使用终质量浓度分别为 5、10 $\mu\text{g/mL}$ 延龄草总皂苷处理的细胞作为实验组,以 0 $\mu\text{g/mL}$ 处理的细胞作为对照组。

癌原发灶形成中扮演着重要角色,其主要通过丝裂原活化蛋白激酶 (RAS-RAF-ERK) 和磷脂酰肌醇激酶 (PI3K-PTEN-AKT) 两条途径,将细胞外信号转导至细胞内细胞核,从而引起核内基因转录水平的增加,进而调控细胞的增殖、分化、转化和凋亡等重要的生理过程^[10]。目前也有许多针对 RAS/RAF/MEK/ERK 这一信号通路的靶向药物出现^[11],Jeong 等^[12]提出了通过降低蛋白质活性从而干预 RAS-ERK 信号通路抗结肠癌治疗的一系列新策略。因此阐明延龄草总皂苷是否通过干扰 Ras 信号通路发挥其抗结肠癌效果成为本研究的重要内容。



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 6 延龄草总皂苷对结肠癌 CT26 细胞的增殖抑制作用 ($n=3$)

3.6 延龄草总皂苷降低结肠癌 CT26 细胞 RAS 相关蛋白的表达 进一步分析延龄草总皂苷对于结肠癌 CT26 细胞中 RAS/AKT/ERK 信号通路的影响。结果发现延龄草总皂苷的高浓度组 (10 $\mu\text{g/mL}$)、低浓度组 (5 $\mu\text{g/mL}$) 均能呈浓度依赖性降低 RAS 蛋白以及 AKT、ERK1/2 及其磷酸化蛋白的表达。由此推测延龄草总皂苷抑制肿瘤生长与抑制 RAS/AKT/ERK 信号通路有关。

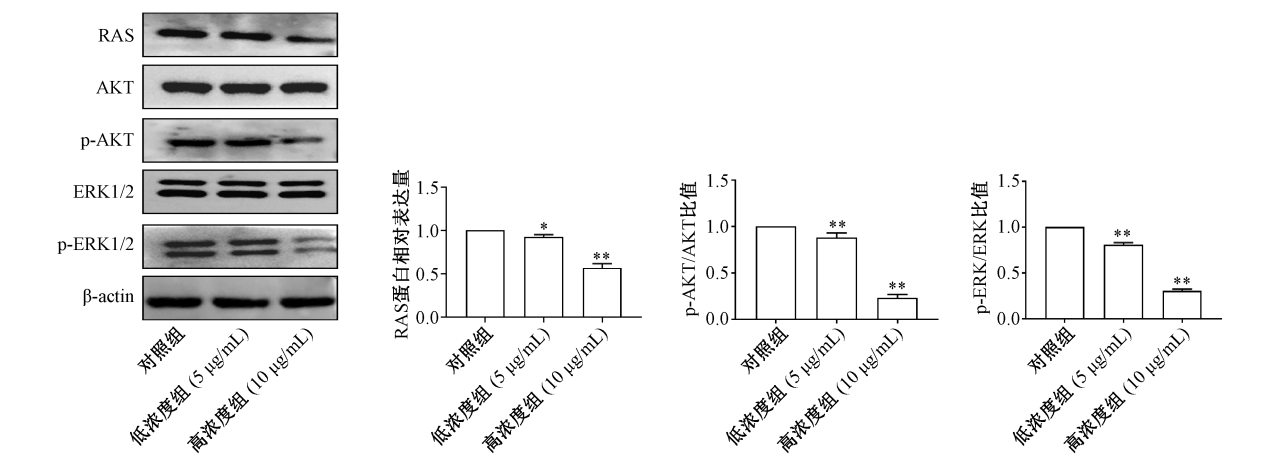
4 讨论

RAS 基因在许多肿瘤的发生发展过程中产生重要的作用,参与细胞生长、增殖、发育、分化以及恶性调控等重要的生理过程,同时 RAS 蛋白也是表皮生长因子受体信号通路中的重要成员。表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 参与的细胞信号传导通路在结肠

在本研究中,体外细胞实验表明延龄草总皂苷对于体外培养的结肠癌 CT26 细胞的增殖具有抑制作用,其 24 h 时 IC_{50} 值为 $(10.23\pm1.02)\mu\text{g/mL}$,表明其可能是抗结肠癌的有效成分。体内实验表明延龄草总皂苷有效抑制了裸鼠皮下肿瘤的生长,延龄草总皂苷高、中、低三个浓度也都表现出较好的抑制率,分别为 51.22%、34.88% 和 25.02%,呈一定的浓度依赖趋势 (见表 1)。此结果说明延龄草总皂苷体内对肿瘤的生长有抑制效果,与体外细胞实验符合。

结肠癌的发生与 RAS 蛋白的持续活化有关,体内实验瘤组织蛋白水平的结果进一步验证其剂量依赖性作用 (见结果 2),而延龄草总皂苷的高、中、低 3 个剂量组在 mRNA 水平上均能显著降低 RAS 基因的表达,而且呈剂量依赖性。因此推测延龄草总皂苷抑制肿瘤的生长与抑制 RAS 基因表达或者其下游通道有关联。随后在体外实验中使用 Western blot 法检测细胞中 RAS、AKT、ERK1/2 蛋白及其磷酸化蛋白的表达水平进一步证实其作用机制,发现 RAS 蛋白、磷酸化 AKT 蛋白、磷酸化 ERK1/2 蛋白同时呈现浓度依赖性降低趋势。说明延龄草总皂苷在 RAS 信号通路的活化过程中下调 RAS 信号通路下游分子的表达。HE 染色结果同时也提示体内中高剂量组延龄草总皂苷可以促进结肠癌细胞的凋亡。

综上所述,延龄草总皂苷在体内外均具有抗结肠癌药



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 6 延龄草总皂苷对结肠癌 CT26 细胞蛋白表达的影响 (n=3)

理活性，其机制可能是通过 RAS/AKT/ERK 信号通路干扰其下游蛋白的表达，至于其具体的作用靶点还有待进一步研究。本研究有望为抗结肠癌药物开发提供一个新思路。

参考文献：

[1] Siegel R, Miller K, Fedewa S, *et al.* Colorectal cancer statistics, 2017[J]. *Ca A Cancer J Clin*, 2017, 67(3): 104-117.

[2] 詹亚华. 中国神农架中药资源 [M]. 武汉：湖北科学技术出版社, 1994: 249; 450.

[3] 喻玲玲, 邹 坤. 延龄草属植物的化学成分及药理活性研究进展[J]. *中成药*, 2008, 30(9): 1350-1354.

[4] 欧阳俊摇, 邹海艳, 李慢中, 等. 延龄草的化学成分和药理作用研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(2): 433-437.

[5] Raskov H, Pommergaard H C, Burcharth J, *et al.* Colorectal carcinogenesis-update and perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(48): 18151-18164.

[6] Ling C, Wang L, Wang Z, *et al.* A pathway-centric survey of somatic mutations in Chinese patients with colorectal carcinomas [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116753.

[7] 周慧萍, 岳正刚, 李志泉, 等. 延龄草总皂苷抑制结肠癌细胞增殖作用及机制研究[J]. *华南国防医学杂志*, 2013, 27(5): 310-312; 323.

[8] 万仲贤, 朱诗立, 张思波, 等. 延龄草诱导人结肠癌 RKO 细胞凋亡的作用机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(6): 1461-1464.

[9] 谈 弘, 李志泉, 陈建发, 等. 延龄草总皂苷抑制结肠癌细胞 SW-620 转移作用及机制研究[J]. *华南国防医学杂志*, 2014, 28(7): 619-621; 626.

[10] Simanshu D, Nissley D, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease[J]. *Cell*, 2017, 170(1): 17-33.

[11] Yang S F, Liu G H. Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13 (3): 1041-1047.

[12] Jeong W J, Ro E J, Choi K Y. Interaction between Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy *via* degradations of β -catenin and RAS by targeting the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *NPJ Precis Oncol*, 2018, 2(1): 5.