

Myostatin通过PI3K-Akt-c-Jun信号通路调节 VEGFA在MG-63细胞中的表达

赵津¹ 潘新灵¹ 金璐璐¹ 苏振铭^{2*}

(¹温州医科大学附属东阳医院生物实验室, 金华 322100; ²中国医药大学, 台湾 40402)

摘要 类风湿关节炎患者高表达肌抑素(myostatin)和血管内皮生长因子A(VEGFA), 但两者之间的关系尚不明确。该研究采用Western blot技术和RT-qPCR技术分析了myostatin刺激MG-63细胞后VEGFA蛋白和mRNA表达量的变化, 采用PI3K、Akt、c-Jun的抑制剂或siRNA处理细胞后分别检测相应蛋白的磷酸化程度以及VEGFA的表达水平。结果表明, myostatin促进VEGFA蛋白和mRNA的表达, 且浓度为3 ng/mL时表达量最高; myostatin处理后, PI3K、Akt、c-Jun蛋白的磷酸化程度增加, 相应的抑制剂处理细胞后myostatin促进VEGFA蛋白上调的作用减弱。该研究表明, 在MG-63细胞中, myostatin通过激活PI3K-Akt-c-Jun信号通路促进VEGFA的表达。

关键词 成骨样细胞; 肌抑素; 血管内皮生长因子A; PI3K/Akt/c-Jun信号通路

Myostatin Regulates VEGFA Expression in MG-63 Cells Through the PI3K-Akt-c-Jun Signaling Pathway

ZHAO Jin¹, PAN Xinling¹, JIN Lulu¹, SU Zhenming^{2*}

(¹Department of Biomedical Sciences Laboratory, Affiliated Dongyang Hospital of Wenzhou Medical University, Jinhua 322100, China; ²China Medical University, Taiwan 40402, China)

Abstract Myostatin and VEGFA highly expressed in patients with rheumatoid arthritis, but the relationship between them is unclear. In this study, the paper analyzed the expression of VEGFA by Western blot and RT-qPCR. The phosphorylation levels of PI3K, Akt, c-Jun were detected after treatment with inhibitors or siRNAs. The results showed that VEGFA protein and mRNA expression increased when the cells were treated with myostatin, and the highest level was at the concentration of 3 ng/mL. After myostatin treatment, the phosphorylation degrees of PI3K, Akt and c-Jun protein increased, and the up-regulation effect of myostatin on VEGFA protein was weakened after the corresponding inhibitor treatment. Myostatin up-regulates the expression of VEGFA in MG-63 cells through the PI3K-Akt-c-Jun signaling pathway.

Keywords osteoblast like cell; myostatin; VEGFA; PI3K/Akt/c-Jun signaling pathway

肌抑素(myostatin)是由肌细胞产生和分泌的小分子肌球蛋白, 属于转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族成员, 对肌肉生长

起负调控作用^[2], RAMÍREZ CAROLINA等^[3]发现, 在肌肉发炎的大鼠中, myostatin的表达水平明显上调。本课题组前期研究发现, 在类风湿关节炎

收稿日期: 2020-01-02

接受日期: 2020-05-29

国家自然科学基金(批准号: 81702117)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18458096003, E-mail: proof814@gmail.com

Received: January 2, 2020

Accepted: May 29, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81702117)

*Corresponding author. Tel: +86-18458096003, E-mail: proof814@gmail.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5285>

(rheumatoid arthritis, RA)滑膜细胞中, myostatin表达量上调, 外源myostatin能够诱导RA滑膜细胞中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达增加, 且这一促进作用是通过PI3K/Akt/c-Jun信号通路完成的^[4]。结合在RA患者滑膜组织和血清中血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)表达量均增加的数据^[5], 考虑到RA滑膜细胞中VEGFA的表达也可由PI3K/Akt信号通路调节^[6], 且VEGFA通过刺激内皮细胞重新分裂及分化来促进新生血管的形成, 增加血管的通透性^[7], 可能为RA患者炎症的发生提供炎症细胞和营养物质。为此, 本研究将探讨myostatin是否也经由PI3K/Akt信号通路调节VEGFA的表达, 从而为RA的发病机制提供新的理论数据, 为RA治疗提供可能的靶点。

1 材料和方法

1.1 细胞系

成骨样细胞MG-63购自广州吉妮欧生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、PBS及其他细胞培养试剂购自Thermo Fisher Scientific公司。抗体p-PI3K、p-Akt、p-c-Jun、 β -Actin购自Cell Signaling Technology公司。抗体PI3K、Akt、c-Jun和VEGFA购自Santa Cruz Biotechnology公司。Myostatin购自PeproTech公司。PI3K抑制剂(LY294002)、Akt1/2激酶抑制剂(别名: Akti-1/2三氟乙酸盐水合物, 货号A6730)、c-Jun抑制剂(Tanshinone IIA)购自Sigma-Aldrich公司。PI3K siRNA、Akt siRNA、c-Jun siRNA购自GE Dharmacon Research公司。Trizol Kit试剂购自TaKaRa生物公司。DharmaFECT 1载体购自Lafayette公司。甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、吐温-20、脱脂奶粉、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)购自温州美谷生物科技有限公司。RT-qPCR仪器购自Beckman公司。化学发光成像仪器购自Bio-Rad公司。Bio Drop Duo分光光度计购自上海启文生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 在37 °C、5% CO₂条件下用含10% FBS的DMEM培养基培养MG-63细胞。每两天换一次新鲜的培养基, 细胞密度达到80%以上后进

行myostatin及抑制剂等处理并收获细胞。

1.3.2 Western blot技术检测myostatin刺激对VEGFA表达的影响 不同浓度myostatin(0、0.1、0.3、1、3、10 ng/mL)刺激MG-63细胞24 h并收集细胞。用RIPA裂解细胞提取总蛋白质, BCA试剂盒测定总蛋白浓度, 经SDS-PAGE电泳分离后转移蛋白质到PVDF膜上(400 mA, 90 min), 接着用4%的脱脂牛奶室温封闭1 h, 然后室温孵育VEGFA或 β -actin抗体1 h。经过TBST三次洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育1 h并洗涤三次, 最后使用化学发光成像仪进行检测。

1.3.3 RT-qPCR法分析myostatin刺激对VEGFA表达的影响 不同浓度myostatin(0、0.1、0.3、1、3、10 ng/mL)刺激MG-63细胞24 h并收集细胞, 按照Trizol Kit试剂盒的操作说明书提取总RNA, 用Bio Drop Duo分光光度计测定总RNA的浓度并按逆转录试剂盒的操作说明书逆转录为cDNA。采用染料法(SYBR)进行RT-qPCR实验。引物序列如下: GAPDH上游引物为5'-TGG GTG TGA ACC ATG AGA AG-3', 下游引物为5'-GCT AAG CAG TTG GTG GTG C-3'; VEGFA上游引物为5'-GTC CCT CTT GGA ATT GGA T-3', 下游引物为5'-TGT ATG TGG GTG GGT GTG TC-3'。

1.3.4 Myostatin上调VEGFA表达的信号分子检测 37 °C、5% CO₂条件下培养MG-63细胞, 待细胞密度达到80%时, 给予最佳浓度的myostatin刺激不同时间(0、10、15、30、60、120 min), 收集细胞后检测p-PI3K、p-Akt、p-c-Jun的表达量, 确定PI3K、Akt、c-Jun活化的时间点, 给予10 μ mol/L相应抑制剂(LY294002, Akt抑制剂, Tanshinone IIA)处理30 min或使用DharmaFECT 1转染试剂进行siRNA转染24 h, 再给以最佳浓度myostatin刺激并收集细胞, 分析VEGFA的表达量及PI3K、Akt、c-Jun的磷酸化程度及三者之间的上下游关系。

1.3.5 统计学分析 采用Graphpad Prism 7.0软件对实验数据进行统计学分析。数据以均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s$)表示, 两两比较采用t检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 Myostatin在MG-63细胞中促进VEGFA的表达

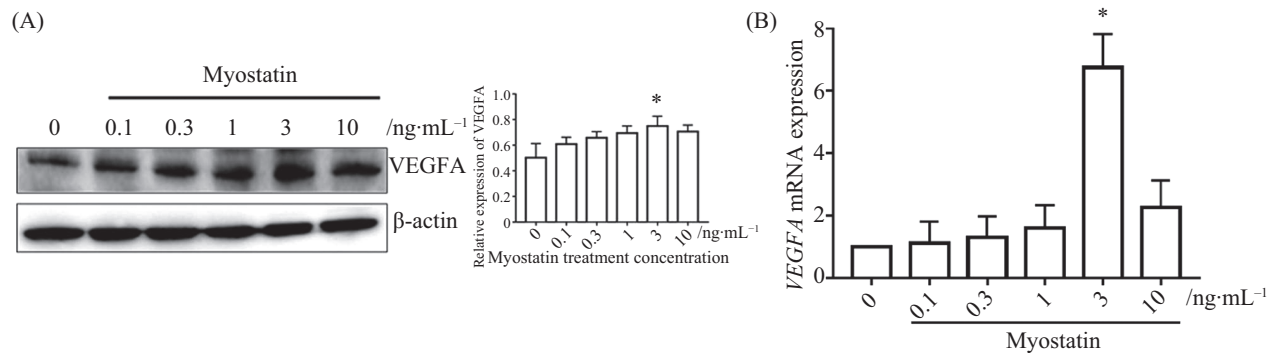
不同浓度的myostatin作用于MG-63细胞后, VEGFA

表达水平如图1所示。当myostatin浓度为3 ng/mL时, VEGFA蛋白的表达量最高(图1A), mRNA表达量与蛋白水平一致, 即myostatin浓度为3 ng/mL时*VEGFA*的mRNA表达水平最高(图1B)。

2.2 PI3K信号蛋白参与myostatin诱导VEGFA的表达

PI3K-Akt信号通路参与调控细胞增殖、代谢、蛋白质合成等多种生命活动, 也与RA的发生发展密切相关。因此, 我们检测了myostatin刺激后PI3K的磷酸化程度。随着myostatin作用时间的延长(0~60 min),

PI3K的磷酸化程度明显增高, 在60 min时磷酸化水平最高, 在120 min时有所下降(图2A); 通过加入PI3K的抑制剂LY294002或者加入PI3K siRNA抑制其表达, 再给以3 ng/mL的myostatin刺激后检测PI3K磷酸化水平, 发现被抑制或干扰后, PI3K的磷酸化水平低于myostatin处理组(图2B); 3 ng/mL的myostatin刺激细胞后VEGFA蛋白表达水平升高, 然而加入PI3K的抑制剂LY294002后, VEGFA蛋白表达量有所下降(图2C), 表明PI3K参与调节myostatin促进VEGFA蛋白合成的过程。

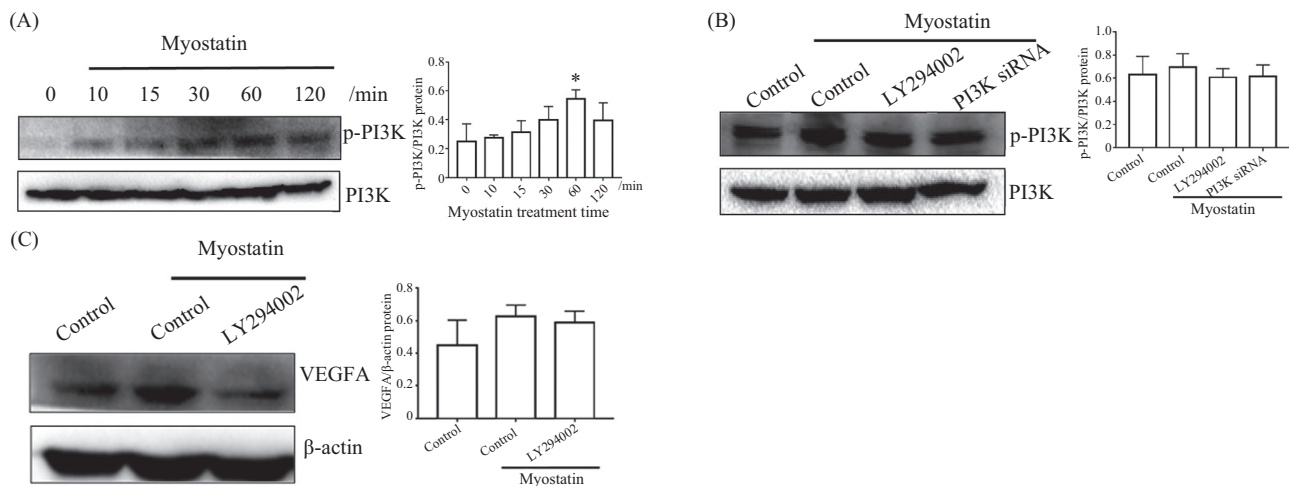


A: 不同浓度myostatin处理MG-63细胞24 h后VEGFA蛋白表达量, $n=3$; B: 不同浓度myostatin处理MG-63细胞24 h后*VEGFA* mRNA表达量, $n=10$ 。* $P<0.05$, 与myostatin处理浓度为0 ng/mL的对照组相比。

A: MG-63 cells were incubated with various concentrations of myostatin for 24 h and VEGFA protein expression level were measured by Western blot ($n=3$); B: MG-63 cells were incubated with various concentrations of myostatin for 24 h and *VEGFA* mRNA expression level were measured by RT-qPCR ($n=10$). * $P<0.05$ compared with myostatin untreated controls.

图1 Myostatin刺激对MG-63细胞中VEGFA表达的影响

Fig.1 VEGFA expression in MG-63 following treatment of different concentrations of myostatin



A: myostatin作用不同时间后PI3K蛋白的磷酸化水平; B: PI3K siRNA(1 nmol/L)或者抑制剂LY294002(10 μ mol/L)处理后PI3K磷酸化水平; C: LY294002(10 μ mol/L)抑制剂处理后VEGFA蛋白表达水平。 $n=3$, * $P<0.05$, 与myostatin未处理组相比。

A: phosphorylation of PI3K protein after myostatin stimulation at different times; B: phosphorylation level of PI3K after treatment with PI3K siRNA (1 nmol/L) or inhibitor LY294002 (10 μ mol/L); C: expression level of VEGFA after treatment with LY294002 (10 μ mol/L) inhibitor. $n=3$, * $P<0.05$ compared with myostatin untreated controls.

图2 PI3K信号蛋白参与myostatin诱导VEGFA的表达

Fig.2 PI3K protein was involved in potentiating the expression of myostatin

2.3 Akt信号蛋白参与myostatin诱导VEGFA的表达

研究发现, Akt的磷酸化程度随着myostatin作用时间的增加, 在60 min时活化程度达到最高(图3A)。Akt抑制剂和siRNA的作用降低了myostatin对其磷酸化水平的促进作用(图3B), 说明Akt信号蛋白参与myostatin诱导VEGFA表达的过程。

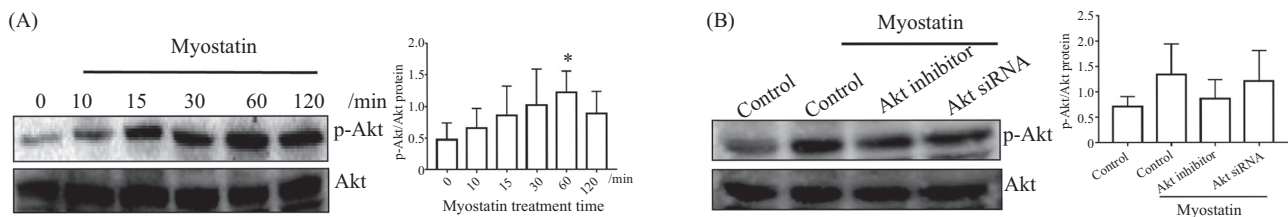
2.4 c-Jun信号蛋白参与myostatin诱导VEGFA的表达

c-Jun是核转录激活蛋白家族的成员, 参与基因的转录调控进而影响细胞分化、凋亡等过程。随着myostatin作用时间的增加, 在30 min时, c-Jun的磷酸

化程度最高, 随后逐步降低(图4A); c-Jun抑制剂Tanshinone IIA或者siRNA的作用降低了myostatin上调c-Jun的活化程度(图4B); LY294002、Akt抑制剂处理也会降低myostatin上调c-Jun的磷酸化水平, 表明c-Jun是PI3K-Akt的下游蛋白(图4C), Tanshinone IIA处理细胞后再给以myostatin处理, VEGFA蛋白的表达量显著低于myostatin处理组(图4D), 即c-Jun蛋白参与myostatin诱导VEGFA的表达。

2.5 在MG-63细胞中, Myostatin通过激活PI3K-Akt-c-Jun信号通路调控VEGFA的表达

对MG-63细胞进行LY294002、Akt抑制剂和

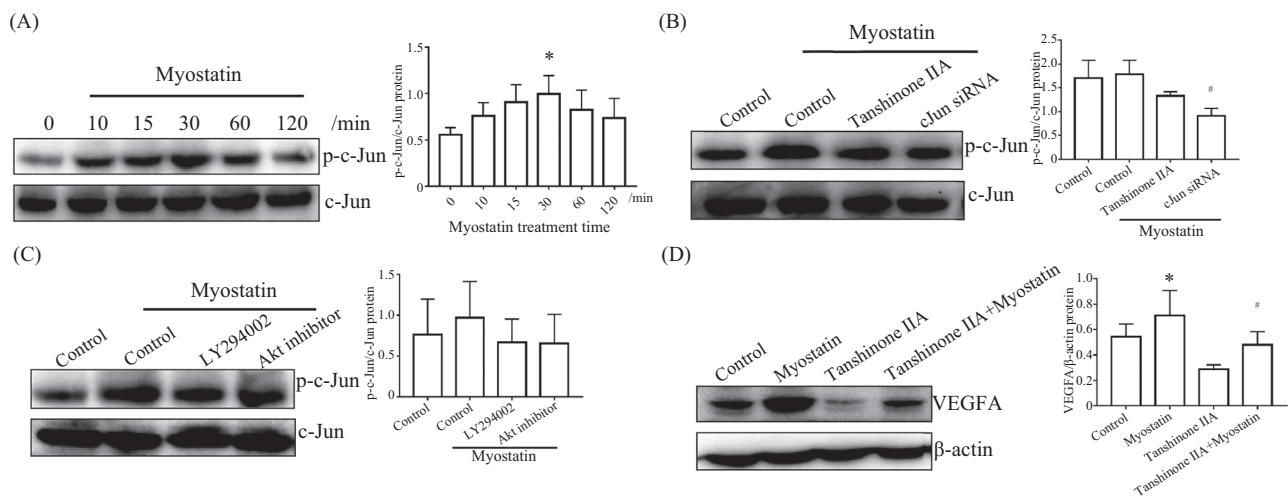


A: myostatin作用不同时间后Akt蛋白的磷酸化水平; B: Akt siRNA(1 nmol/L)或者Akt抑制剂(10 μ mol/L)处理后Akt蛋白磷酸化水平。n=3, * P <0.05, 与myostatin未处理组相比。

A: phosphorylation of Akt protein after myostatin stimulation at different times; B: phosphorylation level of Akt after treatment with Akt siRNA (1 nmol/L) or Akt inhibitor (10 μ mol/L). n=3, * P <0.05 compared with myostatin untreated controls.

图3 Akt信号蛋白参与myostatin诱导VEGFA的表达

Fig.3 Involvement of Akt in myostatin-induced VEGFA expression

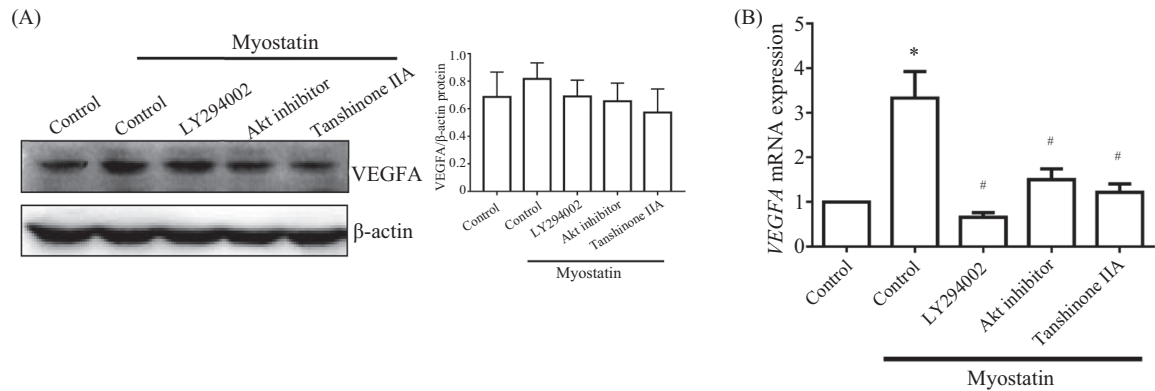


A: myostatin作用不同时间后c-Jun蛋白的磷酸化水平; B: c-Jun siRNA(1 nmol/L)或抑制剂Tanshinone IIA(10 μ mol/L)处理后c-Jun的磷酸化水平; C: PI3K抑制剂LY294002(10 μ mol/L)、Akt抑制剂(10 μ mol/L)处理后c-Jun的活化程度; D: Tanshinone IIA(10 μ mol/L)处理后VEGFA蛋白的表达量。n=3, * P <0.05, 与myostatin未处理组相比。# P <0.05, 与只进行myostatin处理的组别相比。

A: phosphorylation of c-Jun protein after myostatin stimulation at different times; B: phosphorylation level of c-Jun after treatment with c-Jun siRNA (1 nmol/L) or c-Jun inhibitor Tanshinone IIA (10 μ mol/L); C: activation degree of c-Jun after treatment with PI3K inhibitor LY294002(10 μ mol/L) or Akt inhibitor (10 μ mol/L); D: expression of VEGFA after Tanshinone IIA (10 μ mol/L) treatment. n=3, * P <0.05 compared with myostatin untreated controls, # P <0.05 compared with the myostatin-treated group.

图4 c-Jun信号蛋白参与myostatin诱导VEGFA的表达

Fig.4 c-Jun protein was involved in potentiating the expression of myostatin



A、B: LY294002(10 $\mu\text{mol/L}$)、Akt抑制剂(10 $\mu\text{mol/L}$)或Tanshinone IIA(10 $\mu\text{mol/L}$)处理后VEGFA表达水平。Western blot实验, $n=3$, RT-qPCR实验, $n=10$ 。* $P<0.05$, 与myostatin处理浓度为0 ng/mL的组别相比, # $P<0.05$, 与只进行myostatin处理的组别相比。

A、B: VEGFA expression levels after treatment with LY294002 (10 $\mu\text{mol/L}$), Akt inhibitor (10 $\mu\text{mol/L}$) or Tanshinone IIA (10 $\mu\text{mol/L}$). * $P<0.05$ compared with myostatin untreated controls, # $P<0.05$ compared with the myostatin-treated group.

图5 Myostatin经由PI3K-Akt-c-Jun信号通路诱导VEGFA的表达

Fig.5 Myostatin induced VEGFA expression through the PI3K-Akt- c-Jun signaling pathway

Tanshinone IIA的处理及myostatin的刺激后检测VEGFA蛋白和mRNA表达量。与myostatin处理组相比, 抑制剂+myostatin组中VEGFA蛋白的表达量有所下降(图5A), 且VEGFA mRNA表达量显著降低(图5B)。由此可知, 在MG-63细胞中, myostatin通过激活PI3K-Akt-c-Jun信号通路调控VEGFA的表达。

3 讨论

前期数据和文献数据发现, RA患者中myostatin和VEGFA表达上调, 为此本研究在MG-63细胞中检测了PI3K、Akt、c-Jun经myostatin刺激后的活化程度及VEGFA的表达量, 发现myostatin可以促进PI3K-Akt-c-Jun信号通路的活化, 从而上调VEGFA的表达。

VEGFA参与RA疾病发生发展中的血管翳形成、维持滑膜炎性反应等环节, 进而促进滑膜炎加重^[8-9]; 炎症因子白细胞介素1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、TNF- α 等均能诱导VEGFA的释放, 促进RA滑膜血管新生^[10]。关节软骨和骨侵蚀是RA发展的重要环节, 与疾病严重程度密切相关。破骨细胞在RA骨侵蚀中有重要作用: 巨噬细胞、淋巴细胞和炎症因子(IL-1、IL-6、TNF- α)等刺激破骨细胞分化, 成熟的破骨细胞与骨形成一种孤立的腔隙微环境, 在酸性条件下骨钙溶解, 骨基质被降解及破坏^[11]。VEGF可以诱导破骨细胞的分化^[12], RA中VEGFA可以上调破骨细胞分化关键因子核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator

for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)而间接促进破骨细胞产生, 进而使RA骨遭到破坏^[13]。此外, 滑液中VEGFA的水平可作为RA关节损伤的一个指标^[14]。因此, VEGFA参与血管翳形成, 维持滑膜炎性反应, 调节骨稳态, 在RA发生发展中起着重要作用。近几年以VEGF为靶标治疗RA的药物(TNF- α 抑制剂、中药雷公藤)受到关注, 而本研究发现, myostatin可影响VEGFA表达。

Myostatin是由肌细胞产生和分泌的小分子肌球蛋白, 属于TGF- β 超家族成员, 对肌肉生长起负调控作用^[2]。有研究表明, myostatin可能在维持骨量平衡方面发挥作用: 在体外, myostatin间接促进破骨细胞分化和骨吸收^[15]; 另外, myostatin使成骨细胞分化的关键因子runx相关转录因子2(runx-related transcription factor 2, RUNX2)表达下调, 影响成骨细胞功能, 导致新骨无法形成^[16]。此外, myostatin在RA中表达上调, 并且能够促进IL-1、TNF- α 的表达, 结合本研究结果, myostatin还可以上调VEGFA的表达量, 且这一过程是通过PI3K/Akt通路进行调节的。PI3K/Akt通路参与新生血管的形成, 活化的Akt激活内皮型一氧化氮合酶, 释放NO, 促进VEGFA和其他血管生成因子的表达, 引起内皮细胞迁移和增殖, 促进血管通透性, 引起血管扩张和新生^[17-19], 为炎症细胞进入关节参与炎症反应提供条件, 进而加重RA的严重程度。

综上所述, VEGFA在RA滑膜炎、骨侵蚀及血管翳形成三个主要病变过程中都发挥重要作用,

外源 myostatin 刺激能够经 PI3K-Akt-c-Jun 信号通路上调 MG-63 细胞中 VEGFA 的表达。由此提示, myostatin 可能参与 RA 整个病变过程, 可作为 RA 治疗的一个新的潜在靶点, 但 myostatin 在 RA 组织和动物模型中的作用特点需要进一步的研究和探索。

参考文献 (References)

- [1] MCLNNES I B, SCHETT G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10086): 2328-37.
- [2] WHITE T A, LEBRASSEUR N K. Myostatin and sarcopenia: opportunities and challenges-a mini-review [J]. *Gerontology*, 2014, 60(4): 289-93.
- [3] RAMÍREZ C, RUSSO T L, SANDOVAL M C, et al. Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats [J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2011, 90(11): 930-9.
- [4] SU C M, HU S L, SUN Y, et al. Myostatin induces tumor necrosis factor- α expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the PI3K-Akt signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9793-801.
- [5] SCHROEDER M, VIEZENS L, FUHRHOP I, et al. Angiogenic growth factors in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2013, 33(2): 523-7.
- [6] 张行, 保国锋, 崔志明. PI3K/AKT 信号通路在类风湿关节炎发病机制中的研究进展[J]. *东南大学学报*(ZHANG X, BAO G F, CUI Z M. Research progress of PI3K/AKT signaling pathway in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Southeast University*), 2019, 38(2): 358-63.
- [7] 韩乔燕. 血管内皮生长因子与类风湿性关节炎[J]. *医学综述*(HAN Q Y. Vascular endothelial growth factor and rheumatoid arthritis [J]. *Medical Recapitulate*), 2007, 13(22): 1696-8.
- [8] MACDONALD I J, LIU S C, SU C M, et al. Implications of angiogenesis involvement in arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1212.
- [9] GONG Y Y, YU Z Y, WANG Y N, et al. Effect of moxibustion on HIF-1 α and VEGF levels in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Pain Res Manag*, 2019, 2019: 4705247.
- [10] JIANG S Y, LI Y X, LIN T T, et al. IL-35 inhibits angiogenesis through VEGF/Ang2/Tie2 pathway in rheumatoid arthritis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(5): 1105-16.
- [11] 陈红梅, 王友莲. 破骨细胞在类风湿关节炎致骨破坏病理变化中的作用及其调控[J]. *中国骨质疏松杂志*(CHEN H M, WANG Y L. Function and regulation of the osteoclast in the pathological changes of bone destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*), 2016, 22(9): 1168-73.
- [12] ALDRIDGE S E, LENNARD T W, WILLIAMS J R, et al. Vascular endothelial growth factor receptors in osteoclast differentiation and function [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(3): 793-8.
- [13] KIM H R, KIM K W, KIM B M, et al. The effect of vascular endothelial growth factor on osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124909.
- [14] LATOUR F, ZABRANIECKI L, DROMER C, et al. Does vascular endothelial growth factor in the rheumatoid synovium predict joint destruction? A clinical, radiological, and pathological study in 12 patients monitored for 10 years [J]. *Joint Bone Spine*, 2001, 68(6): 493-8.
- [15] QIN Y W, PENG Y Z, ZHAO W, et al. Myostatin inhibits osteoblastic differentiation by suppressing osteocyte-derived exosomal microRNA-218: a novel mechanism in muscle-bone communication [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(26): 11021-33.
- [16] BOWSER M, HERBERG S, AROUNLEUT P, et al. Effects of the activin a-myostatin-follistatin system on aging bone and muscle progenitor cells [J]. *Exp Gerontol*, 2013, 48(2): 290-7.
- [17] EVERAERT B R, VAN CRAENENBROECK E M, HOYMANS V Y, et al. Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on Pi3K/AKT/eNOS pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 144(3): 350-66.
- [18] ZHOU Y, LI S, LI J, et al. Effect of micro-RNA-135a on cell proliferation, migration, invasion, apoptosis and tumor angiogenesis through the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(4): 1431-46.
- [19] YANG W, LI Z, QIN R, et al. YY1 promotes endothelial cell-dependent tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma by transcriptionally activating VEGFA [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1187.