芪慈三苓汤调控 RNF180 抑制膀胱癌细胞株 T24/DDP 顺铂耐药性的作用机制*

张军[1]，王伟峰[2]，郝继东[2]，廖国强[2]，杨波[2]，龚华[1,2]

1. 上海中医药大学研究生院，上海 201203；2. 上海健康医学院附属周浦医院泌尿外科，上海 201318

摘要：目的：探讨芪慈三苓汤（Qici Sanling decoction，QCSL）通过调控环指蛋白 180（ring finger protein 180，RNF180）影响膀胱癌细胞株 T24/DDP 顺铂耐药的作用机制。方法：将 T24 细胞分为 T24 组、T24/DDP 组、T24/DDP + QCSL 组，顺铂浓度为 0、2.5、5、10 μmol · L^{-1}，采用 CCK－8 法检测 0、24、48、72 h 的细胞活性。将 T24/DDP 细胞分为 Control 组、DDP 组、QCSL 组、QCSL + DDP 组，采用流式细胞术检测细胞凋亡率，Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移数量。qPCR 法检测膀胱癌患者癌组织（Cancer 组）和癌旁正常组织（Normal 组）中 *RNF180* mRNA 表达水平。将 T24/DDP 细胞分为 Control 组、QCSL 低浓度组（0.5 g · mL^{-1}）、QCSL 中浓度组（1 g · mL^{-1}）、QCSL 高浓度组（2 g · mL^{-1}），Western blot 和 qPCR 法检测 RNF180 蛋白和基因表达水平。将 T24/DDP 细胞分为 Control 组、Control + DDP 组、QCSL + DDP 组及 QCSL + DDP + siRNF180 组，采用 Western blot 法检测 RNF180 蛋白表达水平，流式细胞术检测细胞凋亡率，Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移数量。结果：CCK－8 显示，培养 48 h、72 h 时随着顺铂浓度增加，各组细胞增殖活性降低（$P<0.001$），QCSL 能明显改善 T24/DDP 细胞的顺铂耐药性。与 Control 组比较，DDP 组细胞凋亡率升高（$P<0.001$）；与 DDP 组、QCSL 组比较，QCSL + DDP 组细胞凋亡率升高（$P<0.001$）。与 Control 组比较，QCSL 组、DDP 组细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.001$）；与 DDP 组、QCSL 组比较，QCSL + DDP 组细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.001$）。与 Normal 组比较，Cancer 组患者癌组织中 *RNF180* mRNA 水平降低（$P<0.01$）。与 Control 组比较，QCSL 中浓度组、高浓度组细胞 RNF180 蛋白和基因表达水平升高（$P<0.05$）。与 Control + DDP 组比较，QCSL + DDP 组和 QCSL + DDP + siRNF180 组细胞 RNF180 蛋白表达水平升高（$P<0.001$）；与 QCSL + DDP 组比较，QCSL + DDP + siRNF180 组细胞 RNF180 蛋白表达水平降低（$P<0.001$）。与 Control 组比较，Control + DDP 组细胞凋亡率升高、细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.001$）；与 Control + DDP 组比较，QCSL + DDP 组和 QCSL + DDP + siRNF180 组细胞凋亡率升高、细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.001$）；与 QCSL + DDP 组比较，QCSL + DDP + siRNF180 组细胞凋亡率降低、细胞迁移和侵袭数量增加（$P<0.001$）。结论：芪慈三苓汤可能通过上调 RNF180 表达改善 T24/DDP 细胞的顺铂耐药性。

关键词：芪慈三苓汤；膀胱癌；RNF180；顺铂；耐药；T24/DDP 细胞

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2026.05.163

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2026)05－1096－10

Mechanism of Qici Sanling Decoction Regulating RNF180 to Inhibit Cisplatin Resistance in Bladder Cancer Cell Line T24/DDP

ZHANG Jun[1], WANG Weifeng[2], HAO Jidon[2], LIAO Guoqiang[2], YANG Bo[2], GONG Hua[1,2]

1. Graduate School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai China 201203; 2. Department of Urology, Zhoupu Hospital Affiliated to Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai China 201318

* **基金项目**：上海市浦东新区卫生健康委员会学科建设项目（PWZzk2022－22）；上海健康医学院自然重点项目（SSF－23－17－008）

Abstract: Objective: To explore the mechanism by which Qici Sanling decoction (QCSL) affects cisplatin resistance in the bladder cancer cell line T24/DDP by regulating ring finger protein 180 (RNF180). Methods: Cells were divided into T24 group, T24/DDP group, and T24/DDP QCSL group, with cisplatin concentrations of 0, 2.5, 5, 10 μmol · L^{-1}; cell viability at 0, 24, 48, and 72 h was measured using CCK-8 assay. T24/DDP cells were divided into Control group, DDP group, QCSL group, and QCSL DDP group; cell apoptosis rate was measured by flow cytometry, and cell invasion and migration were assessed using Transwell assay. qPCR was used to detect *RNF180* mRNA expression in bladder cancer patient tumor tissues (Cancer group) and adjacent normal tissues (Normal group). T24/DDP cells were divided into Control group, low-concentration QCSL group (0.5 g · mL^{-1}), medium-concentration QCSL group (1 g · mL^{-1}), and high-concentration QCSL group (2 g · mL^{-1}); RNF180 protein and gene expression levels were detected by Western blot and qPCR. T24/DDP cells were divided into Control group, Control DDP group, QCSL DDP group, and QCSL DDP siRNF180 group; RNF180 protein expression levels were measured by Western blot, cell apoptosis rate by flow cytometry, and cell invasion and migration by Transwell assay. Results: CCK-8 assay showed that at 48 h and 72 h of culture, cell proliferation activity decreased with increasing cisplatin concentration in all groups ($P<0.001$), and QCSL could significantly improve cisplatin resistance in T24/DDP cells. Compared with the Control group, the apoptosis rate of cells in the DDP group increased ($P<0.001$); compared with the DDP group and QCSL group, the apoptosis rate of cells in the QCSL DDP group increased ($P<0.001$). Compared with the Control group, the numbers of cell migration and invasion in the QCSL and DDP groups decreased ($P<0.001$); compared with the DDP group and QCSL group, the numbers of cell migration and invasion in the QCSL DDP group decreased ($P<0.001$). Compared with the Normal group, the *RNF180* mRNA levels in cancer tissues of patients in the Cancer group were reduced ($P<0.01$). Compared with the Control group, the RNF180 protein and gene expression levels in the medium and high concentration groups of QCSL increased ($P<0.05$). Compared with the Control DDP group, RNF180 protein expression levels in the QCSL DDP group and QCSL DDP siRNF180 group increased ($P<0.001$); compared with the QCSL DDP group, RNF180 protein expression levels in the QCSL DDP siRNF180 group decreased ($P<0.001$). Compared with the Control group, apoptosis rate increased, and cell migration and invasion decreased in the Control DDP group ($P<0.001$); compared with the Control DDP group, apoptosis rate increased, and cell migration and invasion decreased in the QCSL DDP group and QCSL DDP siRNF180 group ($P<0.001$); compared with the QCSL DDP group, apoptosis rate decreased and cell migration and invasion increased in the QCSL DDP siRNF180 group ($P<0.001$). Conclusion: Qici Sanling Decoction may improve cisplatin resistance in T24/DDP cell by upregulating RNF180 expression.

Key words: Qici Sanling Decoction; bladder cancer; RNF180; cisplatin; resistance; T24/DDP cell

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤[1-2]，据国家癌症中心统计，2022 年我国膀胱癌新发病例约 92 000 人，死亡约 41 000 人[3]。膀胱癌 90% 以上发生在尿路上皮，也称为膀胱移行细胞癌（bladder transitional cell carcinoma，BTCC）[4]。在新确诊的患者中，约 75% 局限于黏膜或仅侵犯固有层，称为非肌层浸润性膀胱癌（non-muscle invasive bladder cancer，NMIBC）；25% 侵入膀胱壁深层，称为肌层浸润性膀胱癌（muscle invasive bladder cancer，MIBC）[5-6]。移行细胞癌术后容易复发、转移、化疗耐药，尤其是 MIBC 的 5 年生存率仅为 30% ~ 50%[7-8]。含顺铂（cisplatin，DDP）的联合化疗是膀胱癌的标准疗法[9]，多种铂类化合物诸如卡铂、奥沙利铂及皮铂可减轻不良反应，并保留 DDP 的抗癌特性[10]。但仅有 35% 的膀胱癌患者最初对 DDP 化疗敏感，并最终产生耐药性[11]，对 DDP 的耐药性是膀胱癌患者预后不良的一个关键因素。结合中医药理论发掘能够逆转或改善 DDP 耐药性的新型抗癌药物，对提高患者生存率和生活质量都具有重要的意义。

芪慈三苓汤（Qici Sanling decoction，QCSL）是上海市名中医周智恒教授治疗膀胱癌的经典方剂[12]。本课题组前期研究发现，QCSL 可以通过下调 Wnt/β-catenin 通路下游基因 *c-Myc* 的表达来抑制膀胱癌细胞的谷氨酰胺消耗，进而抑制膀胱癌细胞的生长[13-14]。临床研究也发现，QCSL 联合吡柔比星灌注治疗 NMIBC 术后患者，可以明显降低复发率[15]，提示 QCSL 不仅能抑制膀胱癌的发生与发展，还可能提高膀胱癌对化疗药物的敏感性。环指蛋白 180（ring finger protein 180，RNF180）属于

RING 型 E3 连接酶家族中的一员，参与肿瘤的发生发展等多种生物学过程[16]。本研究通过探讨 QCSL 调控 RNF180 的表达影响膀胱癌细胞株 T24/DDP 顺铂耐药的作用机制，为 QCSL 的临床运用提供理论依据。

1　材料

1.1　细胞　人膀胱癌 T24 细胞株购自上海碧云天生物技术有限公司，货号：C6928，传至第 2 代进行后续研究。顺铂耐药 T24/DDP 细胞株购自上海信裕生物科技有限公司，货号：XY－H189DDP，传至第 4 代进行后续研究。

1.2　药物与试剂　QCSL 组成包括黄芪 30 g，山慈菇 30 g，茯苓 15 g，土茯苓 15 g，猪苓 15 g，白术 15 g，莪术 15 g，桂枝 12 g，生甘草 9 g，QCSL 颗粒剂购自广东一方制药有限公司。顺铂（上海阿拉丁公司，货号：C296524）；胎牛血清（GIBCO 公司，批号：21000－132）；RPMI－1640 细胞培养基（上海沪震实业公司，批号：BL303A）；PBS（北京索莱宝科技有限公司，批号：P1022）；CCK－8 试剂盒（Invitrogen，批号：CP002）；Transwell 小室、Matrigel 基质胶（美国 Corning 公司，批号：BV－75682.6、MN－765893）；Annexin V－FITC 细胞凋亡试剂盒（上海索佳科技有限公司，批号：522314）；BCA 蛋白定量测定试剂盒（赛默飞世尔科技公司，批号：PICPI23223）；Lip2000 转染试剂盒（美国 Invitrogen 公司，批号：15628536）；RNA 提取试剂盒（成都福际生物科技有限公司，批号：10606ES60）；HRP 羊抗兔二抗、HRP 羊抗鼠二抗、GAPDH 抗体（Proteintech 公司，批号：A0208、A0216、60009－1－AP）；RNF180 抗体（Abcam 公司，批号：Ab127548）。

1.3　仪器　流式细胞仪（Beckman，型号：CytoFLEX）；多功能酶标仪（北京普朗新技术有限公司，型号：DNM－9602）；SIGMA3－K 超速低温离心机（上海卢湘仪离心机仪器有限公司，型号：TDZ4－WS）；荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司，型号：ABI－2720）；凝胶成像分析仪（上海天能有限公司，型号：Tanon－5200）；yh－09 倒置光学显微镜（上海蔡康光学仪器有限公司，型号：XDS－500C）；二氧化碳恒温培养箱（赛默飞世尔科技公司，型号：Thermo Forma 3111）；超净工作台（苏州金净净化设备有限公司，型号：PHO200）。

2　方法

2.1　药物制备　QCSL 提取方法：生药使用 6 倍量的 80% 乙醇浸泡 20 min，85 ℃水浴回流提取 2 次，滤渣用 10 倍量水回流提取 1 次，合并所得滤液，浓缩制成质量浓度为 0.5、1、2 g·mL^{-1}的混悬液，4 ℃冰箱冷藏备用。

2.2　细胞培养、转染及分组　将贴壁的 T24 细胞接种于含 100 U·mL^{-1}青霉素－链霉素和 10% 胎牛血清的 RPMI－1640 培养基中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。T24/DDP 细胞的培养基中额外添加 0.6 g·mL^{-1}顺铂，以维系其耐药性。实验前 2 d 更换为无顺铂的培养基，每隔 2 d 更换 1 次培养液。取对数生长期细胞用于后续实验。

将 3 条 siRNF180 序列转染 T24 细胞，分为 siNC 组、siRNF180－1 组、siRNF180－2 组、siRNF180－3 组，siNC 组仅添加等量转染试剂。通过 Western blot 和 qPCR 筛选出抑制效率最高的 siRNA 序列，用于后续实验。

2.3　CCK－8 法检测 QCSL 对 T24/DDP 细胞顺铂耐药性的影响　将处于对数生长期的 T24 细胞、T24/DDP 细胞进行消化，计数后制成 3×10^4 mL^{-1}的细胞悬浮液，随后取 100 μL 至 96 孔培养板。将 T24 细胞分为 T24 组、T24/DDP 组、T24/DDP＋QCSL 组，顺铂浓度分别为 0、2.5、5、10 μmol·L^{-1}，使用等体积的培养液作为空白对照，在不同时间点（0、24、48、72 h）加入 100 μL CCK－8 和无血清培养基混合物，混合体积比例为 1∶10。在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h 后，酶标仪测定 450 nm 波长下光密度值，以此来表示细胞活力。

2.4　流式细胞术检测 QCSL 联合顺铂对 T24/DDP 细胞凋亡的影响　取处于对数生长期的 T24/DDP 细胞，分为 Control 组、DDP 组、QCSL 组、QCSL＋DDP 组，培养 24 h 后收集各组细胞，PBS 洗涤，再将 100 μL 细胞悬液添加到流式细胞仪的样品管中，然后加入 1×结合缓冲液 100 μL 重悬细胞并分别加入 FITC 标记的 Annexin V 与 PI 各 5 μL，混合均匀，室温避光孵育 15 min 后加入 400 μL PBS，用流式细

胞仪检测各组细胞凋亡率。重复以上操作 3 次。

2.5　Transwell 实验检测 QCSL 联合顺铂对 T24/DDP 细胞侵袭、迁移的影响　细胞侵袭：实验前 24 h 将各组细胞换成无血清基本培养基继续培养。在 Transwell 上室底部加入 80 μL Matrigel 胶，将细胞浓度调整为 7.5×10^4 mL^{-1}。在下室中添加含有 15% 血清的培养基 800 μL，上室中加入 200 μL 细胞悬液。每组设置 3 个复孔，培养 48 h。每孔加入 1 mL 4% 甲醛溶液，在室温下固定 10 min 后吸去固定液，PBS 洗涤 1 次。0.5% 结晶紫染色 10 min，流动水冲洗小室中残留的结晶紫染液，轻拭去 Transwell 小室上层细胞，使用倒置显微镜选取 3 个随机视野进行拍照并计数。细胞迁移实验使用未包被基质胶的 Transwell 小室，剩余步骤同上述细胞侵袭实验。

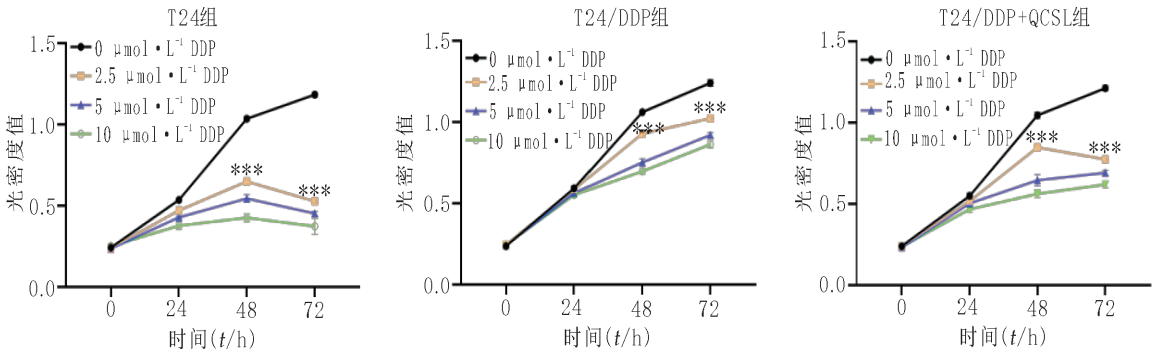
2.6　qPCR 法检测细胞 *RNF180* mRNA 表达水平　各组细胞加入 Trizol 试剂提取总 RNA，使用逆转录试剂盒合成 cDNA。扩增体系（20 μL）：10 μL SYBR Green 混合液，0.4 μL 正向引物，0.4 μL 反向引物，1 μL cDNA，8.2 μL DEPC 水。扩增条件为：95 ℃ 5 min，1 个循环；95 ℃ 10 s，60 ℃ 20 s，72 ℃ 20 s，40 次循环。*RNF180* 基因引物序列：F：5′ - CAACTCTGCAAAATGGCCCC - 3′；R：5′ - AACCAC-CATCCACGGCTATC - 3′；*GAPDH* 基因引物序列：F：5′ - AATCCCATCACCATCTTC - 3′；R：5′ - AGGCT-GTTGTCATACTTC - 3′。以 *GAPDH* 为内参基因，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 *RNF180* mRNA 相对表达水平。每个样品设 3 个复孔。

2.7　Western blot 法检测细胞 RNF180 蛋白表达水平　每组细胞加入 500 μL RIPA 蛋白裂解液，提取细胞总蛋白，BCA 法测定细胞总蛋白浓度。每孔上样 20 μg 蛋白，电泳，之后进行转膜。使用抗体稀释液将抗体稀释到所需浓度，RNF180（1∶1 000）、GAPDH（1∶10 000）抗体 4 ℃孵育过夜。一抗孵育完毕后，使用 TBST 缓冲液洗膜 4 次，每次 10 min，随后在室温下与适量的 HRP 偶联的二抗孵育 1 h，继续使用 TBST 缓冲液洗膜 4 次，滴加 ECL 发光液显色、显影，采用 Image J 软件定量各蛋白条带灰度值。

2.8　统计学方法　采用 SPSS 20.0 统计软件分析实验数据，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。若数据服从正态分布，两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐时两两比较采用 *LSD* 检验，方差不齐时采用 *Games - Howell* 检验；若数据不服从正态分布，采用非参数检验。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　QCSL 对 T24/DDP 细胞顺铂耐药性的影响　CCK - 8 实验显示，培养 24 h 时各组细胞增殖活性的差异无统计学意义（$P > 0.05$）；培养 48 h、72 h 时随着顺铂浓度增加，各组细胞增殖活性明显降低（$P < 0.001$），而 QCSL 能明显改善 T24/DDP 细胞的顺铂耐药性，见图 1。



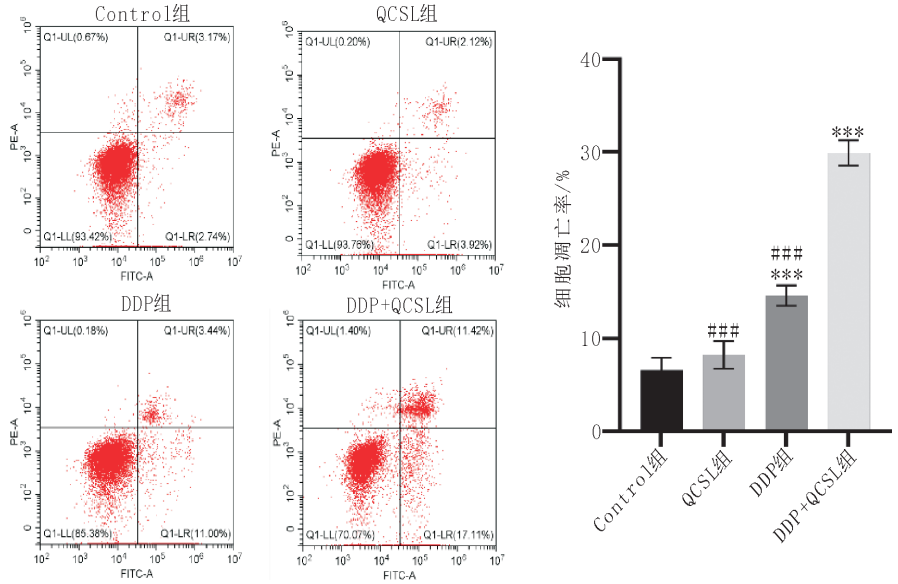
注：与 0 μmol · L^{-1} DDP 组比较，*** $P < 0.001$。

图 1　各组细胞的增殖活性比较

3.2　QCSL 联合顺铂对 T24/DDP 细胞凋亡的影响　流式细胞术显示，与 Control 组比较，DDP 组细胞凋亡率升高（$P < 0.001$）；与 DDP 组、QCSL 组比较，QCSL + DDP 组细胞凋亡率升高（$P < 0.001$），见图 2。

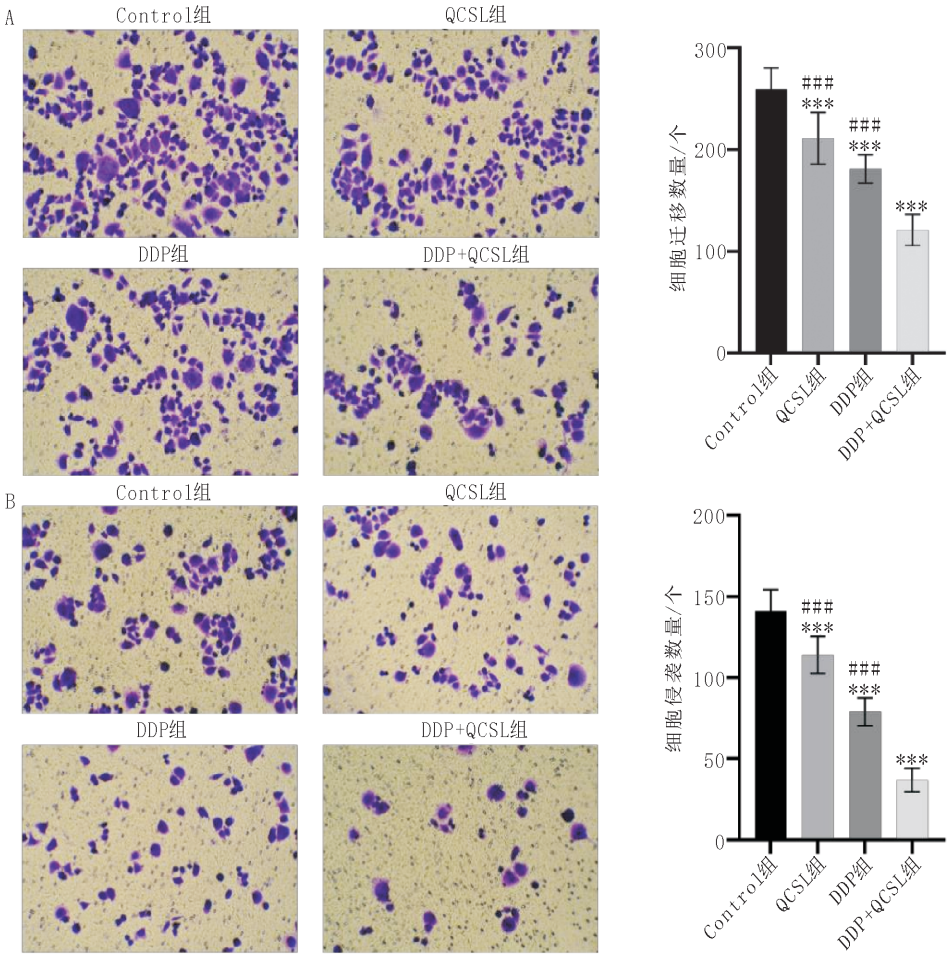
3.3　QCSL 联合顺铂对 T24/DDP 细胞侵袭和迁移的影响　Transwell 实验显示，与 Control 组比较，QCSL 组、DDP 组细胞迁移和侵袭数量减少（$P < 0.001$）；与 DDP 组、QCSL 组比较，QCSL + DDP 组细

胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.001$），见图 3。



注：与 Control 组比较，*** $P<0.001$；与 QCSL + DDP 组比较，### $P<0.001$。

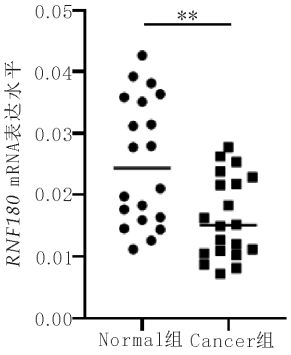
图 2　各组细胞凋亡率比较



注：A：Transwell 实验检测各组细胞的迁移能力；B：Transwell 实验检测各组细胞的侵袭能力；与 Control 组比较，*** $P<0.001$；与 QCSL + DDP 组比较，### $P<0.001$。

图 3　各组细胞迁移和侵袭数量比较

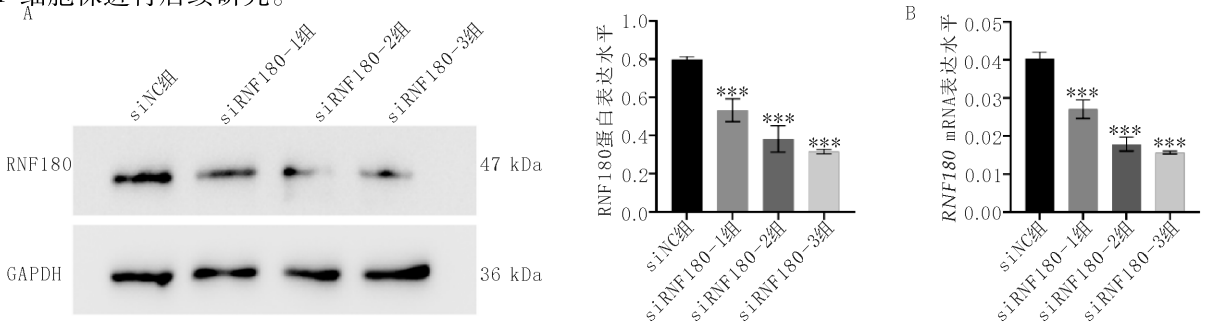
3.4　正常组织和膀胱癌组织中 *RNF180* mRNA 表达水平　采用 qPCR 法检测 20 例膀胱癌患者癌组织（Cancer 组）和癌旁正常组织（Normal 组）中 *RNF180* mRNA 表达水平，结果显示，与 Normal 组比较，Cancer 组患者癌组织中 *RNF180* mRNA 表达水平明显降低（$P<0.01$），见图 4。



注：与 Normal 组比较，** $P<0.01$。

图 4　膀胱癌患者癌组织与癌旁正常组织 *RNF180* mRNA 水平比较

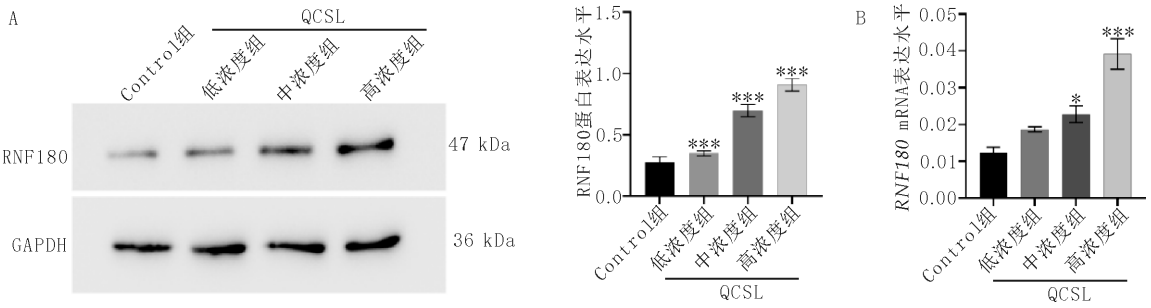
3.5　siRNF180 干扰效率　Western blot 和 qPCR 法检测 siRNF180 序列转染 T24/DDP 细胞的干扰效率，结果显示，与 siNC 组比较，siRNF180－3 组细胞中 RNF180 蛋白和基因表达水平降低（$P<0.001$），抑制效果最明显，见图 5，因此选择该序列转染 T24/DDP 细胞株进行后续研究。



注：A：Western blot 法检测各组细胞 RNF180 蛋白表达水平；B：qPCR 法检测各组细胞 *RNF180* mRNA 表达水平；与 siNC 组比较，*** $P<0.001$。

图 5　各组 T24 细胞中 RNF180 蛋白和基因表达水平比较

3.6　QCSL 对 T24/DDP 细胞 RNF180 表达的影响　将 T24/DDP 细胞分为 Control 组、QCSL 低浓度组（0.5 g·mL^{-1}）、QCSL 中浓度组（1 g·mL^{-1}）、QCSL 高浓度组（2 g·mL^{-1}），采用 Western blot 和 qPCR 法检测各组细胞 RNF180 蛋白和基因表达水平。结果显示，与 Control 组比较，QCSL 低浓度组、中浓度组、高浓度组细胞 RNF180 蛋白和基因（QCSL 低浓度组除外）表达水平升高，见图 6。

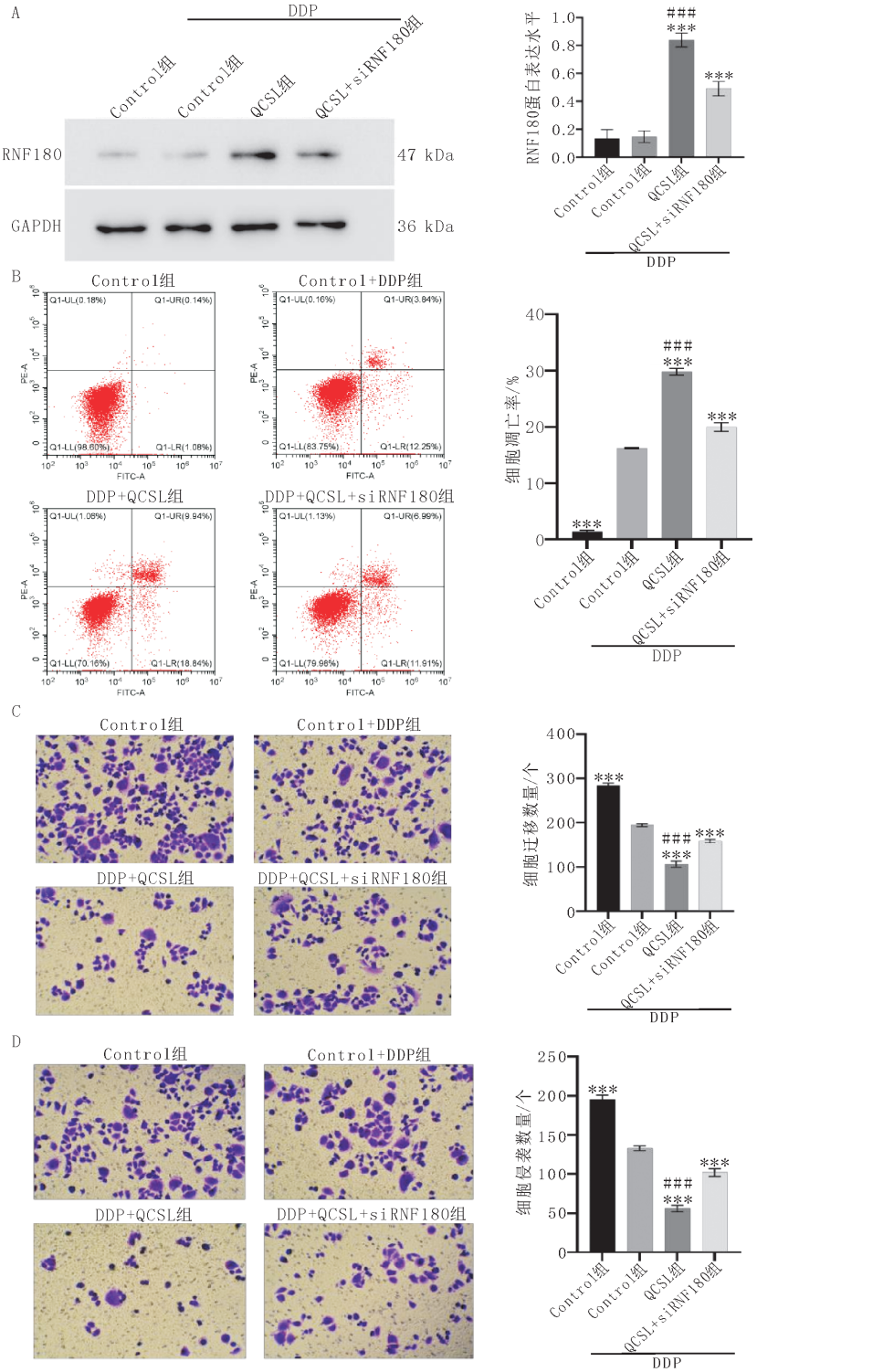


注：A：Western blot 法检测各组细胞 RNF180 蛋白表达水平；B：qPCR 法检测各组细胞 *RNF180* mRNA 表达水平；与 Control 组比较，* $P<0.05$，*** $P<0.001$。

图 6　各组 T24/DDP 细胞 RNF180 蛋白和基因表达水平比较

3.7　QCSL 调控 RNF180 对 T24/DDP 细胞顺铂耐药性的影响　将 T24/DDP 细胞分为 Control 组、Control + DDP 组、QCSL + DDP 组及 QCSL + DDP + siRNF180 组，采用 Western blot 法检测 RNF180 蛋白表达水平，流式细胞术检测细胞凋亡率，Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移数量。结果显示，与 Control + DDP 组比较，QCSL + DDP 组和 QCSL + DDP + siRNF180 组细胞 RNF180 蛋白表达水平升高（$P<0.001$）；与 QCSL + DDP 组比较，QCSL + DDP + siRNF180 组细胞 RNF180 蛋白表达水平降低（$P<0.001$），见图 7A。与 Control 组比较，Control + DDP 组细胞凋亡率升高（$P<0.001$）；与 Control + DDP 组比较，QCSL + DDP 组和 QCSL + DDP + siRNF180 组细胞凋亡率升高（$P<0.001$）；与 QCSL + DDP 组比

较，QCSL + DDP + siRNF180 组细胞凋亡率降低（$P<0.001$），见图 7B。与 Control 组比较，Control + DDP 组细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.001$）；与 Control + DDP 组比较，QCSL + DDP 组和 QCSL + DDP + siRNF180 组细胞迁移和侵袭数量减少（$P<0.001$）；与 QCSL + DDP 组比较，QCSL + DDP + siRNF180 组细胞迁移和侵袭数量增加（$P<0.001$），见图 7C、7D。



注：A：Western blot 法检测各组细胞 RNF180 蛋白表达水平；B：流式细胞术检测各组细胞凋亡率；C：Transwell 实验检测各组细胞迁移能力；D：Transwell 实验检测各组细胞侵袭能力；与 Control + DDP 组比较，*** $P<0.001$；与 QCSL + DDP + siRNF180 组比较，### $P<0.001$。

图 7　QCSL 调控 RNF180 对 T24/DDP 细胞顺铂耐药的影响

4　讨论

QCSL 由黄芪、山慈菇、茯苓、土茯苓、猪苓、莪术、白术、桂枝、生甘草组成。方中黄芪味甘性微温，归肺、脾经，功效补气升阳、利水消肿、扶正益气、利尿排毒；山慈菇味甘性微辛凉，功效清热解毒、消痈散结，两者一补一清，补而不滞，共为君药；猪苓淡渗利水，茯苓健脾利水，土茯苓利水解毒，三苓利水通淋，寓补于通，共为臣药；白术健脾益气，莪术行气破瘀，桂枝温通经脉，助药至病所，共为佐药；生甘草清热解毒，调和诸药；诸药合用，共奏益气通淋、消癥散结之功。现代药理学研究表明，QCSL 中黄芪[17]、山慈菇[18]、白术[19]、甘草[20]均有增强机体免疫功能、促进癌细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、抑制新生血管生成及侵袭转移等作用。猪苓提取物猪苓多糖可调控 JAK2/NF－κB 通路在肿瘤微环境中将巨噬细胞极化为 M1 型抑制膀胱癌的发展[21]。茯苓酸可以通过上调 DR5、生成 ROS、调节 Bcl－2 和 IAP 家族成员诱导 EJ 膀胱癌细胞凋亡[22]。体外实验证实，从土茯苓中分离的化合物对多种癌细胞具有抑制作用，包括前列腺癌[23]、肝癌[24]、乳腺癌[25]等。莪术中有效成分姜黄素可以通过 NF－κB、Wnt/β－catenin、PI3K/AKT、mTOR、JNK、KLF5、Nrf2 等多种信号通路治疗膀胱癌[26]。研究发现，猪苓汤、五苓散对刀豆蛋白 A 诱导的大鼠膀胱癌具有明显的抑制作用[27]。本研究结果显示，膀胱癌顺铂耐药细胞株 T24/DDP 在 QCSL 和顺铂联合处理情况下，能明显增加细胞的凋亡，降低细胞的侵袭和迁移，说明 QCSL 可以提高膀胱癌细胞对顺铂的敏感性。

RNF180 属于 RING 型 E3 连接酶家族中的一员，它最先作为胃癌中的抑癌基因被鉴定出，并因其环指结构域命名，是一种膜结合 E3 连接酶[28]。研究发现，一些具有环指 E3 连接酶特性的蛋白和恶性肿瘤顺铂耐药相关，RNF138 可通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡和诱导 G2/M 细胞周期阻滞来介导胃癌顺铂耐药性[29]。在肺腺癌和鼻咽癌中，E3 连接酶 NEDD4－1 可通过激活 AKT 信号通路和上皮－间质转化成为致癌因子，从而导致顺铂耐药性[30-31]。RNF180 在多种肿瘤中被报道具有抑癌基因的作用，RNF180 通过泛素化 WISP1 抑制结直肠癌增殖和促进凋亡[32]。RNF180 也可调节 CBX4 泛素化抑制骨肉瘤的发展[33]。RNF180 甲基化（mRNF180）导致 RNF180 的表达降低，而 mRNF180 水平与胃癌患者的年龄、肿瘤大小、TNM 分期及临床分期呈正相关，并可能是胃癌的诊断标志物[34]。RNF180 也被报道与肿瘤靶向治疗敏感性有关，RNF180 可以通过泛素化降解 RAD51 抑制三阴性乳腺癌细胞的生长和转移，并提高其对吉非替尼化疗的敏感性[35]。本研究中，通过临床膀胱癌和癌旁正常组织样本（$n=20$）筛选确定了候选差异表达基因 *RNF180*；针对 QCSL 与 T24/DDP 中 RNF180 的调控关系，将低、中、高浓度 QCSL 处理 T24/DDP 细胞，发现 RNF180 表达水平与 QCSL 浓度呈正相关。为了进一步验证 QCSL 调控 RNF180 对 T24/DDP 细胞顺铂耐药的影响，通过 siRNF180 序列转染 T24/DDP 细胞下调 RNF180 的表达，结果发现，与 DDP 组比较，QCSL＋DDP 组和 QCSL＋DDP＋siRNF180 组中 RNF180 的表达水平均上调（$P<0.001$），表明 QCSL 能够在顺铂环境中显著上调膀胱癌耐药细胞中 RNF180 的表达。通过流式细胞术和 Transwell 实验发现，在相同顺铂环境下，QCSL＋DDP 组和 QCSL＋DDP＋siRNF180 组均能促进 T24/DDP 细胞的凋亡、抑制 T24/DDP 细胞的侵袭和迁移能力；但与 QCSL＋DDP 组比较，QCSL＋DDP＋siRNF180 组 T24/DDP 细胞的凋亡率下降、侵袭和迁移能力增强，说明 QCSL 可能是通过调控 T24/DDP 细胞中 RNF180 的表达进而促进 T24/DDP 细胞的凋亡并抑制 T24/DDP 细胞的迁移和侵袭。

综上所述，QCSL 可能通过调控 RNF180 的表达改善膀胱癌细胞株 T24/DDP 顺铂耐药性。RNF180 对 T24/DDP 细胞顺铂敏感性的调控很大程度上是通过对其靶基因的调控实现的，有研究表明 RNF180 通过泛素化降解 c－Myc 抑制非小细胞肺癌细胞增殖并抑制糖酵解反应，限制其在体内的致瘤性[36]。前期研究发现，QCSL 通过抑制 c－Myc 的表达，抑制谷氨酰胺的消耗和膀胱癌细胞的生长[13]。因此后续研究将探讨 QCSL 是否通过 RNF180 调控 c－Myc 的表达影响膀胱癌的顺铂耐药，以期更全面揭示 QCSL 治疗膀胱癌的分子机制，为 QCSL 的临床应用提供理论依据。

参考文献：

[1]国家癌症中心，国家肿瘤质控中心膀胱癌质控专家委员

会. 中国膀胱癌规范诊疗质量控制指标(2022 版)[J]. 中华肿瘤杂志,2022,44(10):1003 - 1010.

[2]SHI M J,FONTUGNE J,MORENO - VEGA A,et al. FGFR3 mutational activation can induce luminal - like papillary bladder tumor formation and favors a male sex bias[J]. Eur Urol,2023,83(1):70 - 81.

[3]HAN B F,ZHENG R,ZENG H,et al. Cancer incidence and mortality in China[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi,2024,46(3):221 - 231.

[4]HEATH E I,ROSENBERG J E. The biology and rationale of targeting nectin - 4 in urothelial carcinoma[J]. Nat Rev Urol,2021,18(2):93 - 103.

[5]DYRSKJT L,INGERSOLL M A. Biology of nonmuscle - invasive bladder cancer:pathology,genomic implications,and immunology[J]. Curr Opin Urol,2018,28(6):598 - 603.

[6]BABJUK M,BURGER M,CAPOUN O,et al. European association of urology guidelines on Non - muscle - invasive bladder cancer (ta,T1,and carcinoma in situ)[J]. Eur Urol,2022,81(1):75 - 94.

[7]SIEGEL R,MILLER K,FUCHS H E,et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2022,72(1):7 - 33.

[8]DOBRUCH J,OSZCZUDOWSKI M. Bladder cancer:current challenges and future directions[J]. Medicina (Kaunas),2021,57(8):749.

[9]CATHOMAS R,LORCH A,BRUINS H M,et al. The 2021 updated European association of urology guidelines on metastatic urothelial carcinoma[J]. Eur Urol,2022,81(1):95 - 103.

[10]LI F,ZHENG Z S,CHEN W,et al. Regulation of cisplatin resistance in bladder cancer by epigenetic mechanisms[J]. Drug Resist Updat,2023,68:100938.

[11]BUTTIGLIERO C,TUCCI M,VIGNANI F,et al. Molecular biomarkers to predict response to neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer[J]. Cancer Treat Rev,2017,54:1 - 9.

[12]郁超,陈磊,冯懿赓,等. 周智恒辨治泌尿男科疾病经验举隅[J]. 上海中医药杂志,2014,48(7):17 - 19,43.

[13]CHEN W H,WANG W F,ZHANG J,et al. Qici sanling decoction suppresses glutamine consumption and bladder cancer cell growth through inhibiting c - myc expression[J]. J Oncol,2022,2022:7985468.

[14]GONG H,CHEN W H,MI L H,et al. Qici Sanling Decoction suppresses bladder cancer growth by inhibiting the Wnt/B - catenin pathway[J]. Pharm Biol,2019,57(1):507 - 513.

[15]郁超,曹宏文,陈磊,等. 芪慈三苓汤对非肌层浸润性膀胱癌术后患者复发率影响的临床研究[J]. 上海中医药杂志,2018,52(7):43 - 47.

[16]BALASTIK M,FERRAGUTI F,PIRES - DA SILVA A,et al. Deficiency in ubiquitin ligase TRIM2 causes accumulation of neurofilament light chain and neurodegeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2008,105(33):12016 - 12021.

[17]叶懿祥,陈冬梅,贾立群,等. 黄芪抗肿瘤药理作用机制与临床应用研究进展[J]. 世界中医药,2023,18(11):1615 - 1620.

[18]陈诗,赵玥,王振,等. 山慈菇药理作用及临床应用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2023,41(6):247 - 250.

[19]YANG L,YU H,HOU A J,et al. A review of the ethnopharmacology,phytochemistry,pharmacology,application,quality control,processing,toxicology,and pharmacokinetics of the dried rhizome of Atractylodes macrocephala[J]. Front Pharmacol,2021,12:727154.

[20]TULI H S,GARG V K,MEHTA J K,et al. Licorice (Glycyrrhiza glabra L.) - derived phytochemicals target multiple signaling pathways to confer oncopreventive and oncotherapeutic effects[J]. Onco Targets Ther,2022,15:1419 - 1448.

[21]JIA W Y,LUO S W,LAI G N,et al. Homogeneous polyporus polysaccharide inhibits bladder cancer by polarizing macrophages to M1 subtype in tumor microenvironment[J]. BMC Complement Med Ther,2021,21(1):150.

[22]JEONG J W,LEE W S,GO S I,et al. Pachymic acid induces apoptosis of EJ bladder cancer cells by DR5 up - regulation,ROS generation,modulation of bcl - 2 and IAP family members[J]. Phytother Res,2015,29(10):1516 - 1524.

[23]WILLY S,JADHAV R N,VAIDYA V,et al. Study of bactericidal potency of Smilax glabra rhizome[J]. Int J Pharmacogn Phytochem Res,2015,1:117 - 118.

[24]TEWTRAKUL S,ITHARAT A,RATTANASUWAN P. Anti - HIV - 1 protease - and HIV - 1 integrase activities of Thai medicinal plants known as Hua - Khao - Yen[J]. J Ethnopharmacol,2006,105(1/2):312 - 315.

[25]OOI L S,WONG E Y,CHIU L C,et al. Antiviral and anti - proliferative glycoproteins from the rhizome of Smilax glabra Roxb (Liliaceae)[J]. Am J Chin Med,2008,36(1):185 - 195.

[26] ASHRAFIZADEH M, YARIBEYGI H, SAHEBKAR A. Therapeutic effects of curcumin against bladder cancer: a review of possible molecular pathways[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2020, 20(6): 667 – 677.

[27] 叶祖光. 在刀豆蛋白作用下的短期试验中汉方药对大鼠膀胱癌发生的抗促癌作用[J]. 国外医学(中医中药分册), 1995, 17(5): 22.

[28] OGAWA M, MIZUGISHI K, ISHIGURO A, et al. Rines/RNF180, a novel RING finger gene – encoded product, is a membrane – bound ubiquitin ligase[J]. Genes Cells, 2008, 13(4): 397 – 409.

[29] LU Y L, HAN D Q, LIU W J, et al. RNF138 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells via activating Chk1 signaling pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(12): 1128 – 1138.

[30] SONG Y H, ZHANG C Q, CHEN F F, et al. Upregulation of neural precursor cell expressed developmentally downregulated 4 – 1 is associated with poor prognosis and chemoresistance in lung adenocarcinoma[J]. Chin Med J, 2018, 131(1): 16 – 24.

[31] FENG S Y, YANG G W, YANG H D, et al. NEDD4 is involved in acquisition of epithelial – mesenchymal transition in cisplatin – resistant nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Cell Cycle, 2017, 16(9): 869 – 878.

[32] WEI F, BA S, JIN M, et al. RNF180 inhibits proliferation and promotes apoptosis of colorectal cancer through ubiquitination of WISP1[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 623455.

[33] ZHAO Q R, LIU N, XU T T, et al. RING finger gene 180 inhibits osteosarcoma progression through regulating chromobox homolog 4 ubiquitination[J]. Cell Cycle, 2023, 22(10): 1246 – 1258.

[34] ZHAO L Y, LIU Y D, ZHANG S W, et al. Plasma methylated RNF180 for noninvasive diagnosis of gastric cancer[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 6548945.

[35] LIU P, ZHOU W, YANG L, et al. E3 ubiquitin ligase RNF180 reduces sensitivity of triple – negative breast cancer cells to Gefitinib by downregulating RAD51[J]. Chem Biol Interact, 2022, 354: 109798.

[36] DING Y, LU Y, XIE X J, et al. Correction: Ring finger protein 180 suppresses cell proliferation and energy metabolism of non – small cell lung cancer through downregulating C – myc[J]. World J Surg Oncol, 2022, 20(1): 235.

收稿日期: 2025 – 12 – 26

作者简介: 张军(1997 –), 男, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治膀胱癌的临床与基础研究。

通信作者: 龚华(1977 –), 男, 医学博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 中西医结合防治膀胱癌的临床与基础研究。E – mail: drgonghua@126.com

编辑: 刘凯歌