doi:10.11659/jjssx.07E022080

·基础研究·

靶向调控Claudin-4基因表达介导DNA损伤修复增强膀胱癌细胞化疗敏感性的研究

艾克帕尔·阿布拉江,崔 涛,杜 恒 (新疆医科大学第二附属医院泌尿外科,新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘 要] **目的** 探究靶向下调紧密连接蛋白4(Claudin-4)基因表达对膀胱癌细胞DNA损伤修复及其化疗敏感性的影响。**方法** 采用si-Claudin-4及阴性对照(si-NC)转染人膀胱癌细胞系EJ下调Claudin-4的表达,采用qRT-PCR和Western blot检测细胞Claudin-4的表达,以确定转染效果。不同浓度顺铂(DDP)处理转染后的EJ细胞,CCK-8法检测细胞存活率。将EJ细胞随机分为对照组、si-Claudin-4组、DDP组、DDP+si-Claudin-4组。经转染处理与DDP处理后,CCK-8法检测各组细胞存活率;平板克隆形成实验检测各组细胞克隆形成能力;细胞免疫荧光染色观察各组细胞内γ-H2AX焦点生成情况;单细胞凝胶电泳法检测各组细胞DNA损伤情况;Western blot检测各组细胞内γ-H2AX、Ku70、Ku80以及DNA-PKcs的蛋白表达水平。**结果** 细胞转染后,si-Claudin-4组细胞内Claudin-4 mRNA和蛋白相对表达量均显著低于对照组和si-NC组($P<0.05$)。经不同浓度DDP处理后,si-Claudin-4组EJ细胞存活率显著低于对照组和si-NC组($P<0.05$)。与对照组比较,si-Claudin-4组和DDP组细胞存活率显著下降,细胞克隆形成数目显著减少,细胞内γ-H2AX焦点形成显著增加,细胞出现典型拖尾形状,彗星尾长和尾部DNA比例均显著增加,γ-H2AX蛋白相对表达量显著上调,Ku70、Ku80及DNA-PKcs的蛋白相对表达量显著下调,差异均具有统计学意义($P<0.05$);与DDP组比较,DDP+si-Claudin-4组细胞存活率显著下降,细胞克隆形成数目显著减少,细胞内γ-H2AX焦点形成显著增加,细胞拖尾现象更加明显,细胞彗星尾长和尾部DNA比例均进一步增加,同时,γ-H2AX蛋白相对表达量显著上调,且Ku70、Ku80、DNA-PKcs的蛋白相对表达量均显著下调,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 在膀胱癌细胞系EJ中靶向下调Claudin-4基因表达,能够增强肿瘤细胞对DDP的敏感性,该作用可能是通过抑制DNA损伤修复能力实现的。

[关键词] 膀胱癌;紧密连接蛋白4;顺铂;化疗敏感性;DNA损伤修复

[中图分类号] R737.14 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-07-21

Targeted regulation of Claudin-4 gene expression to mediate DNA damage repair and enhance chemosensitivity of bladder cancer cells

Aikepaer·Abulajiang, CUI Tao, DU Heng (Department of Urology, Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of targeted down-regulation of Claudin-4 gene expression on DNA damage repair and chemosensitivity of bladder cancer cells. **Methods** Human bladder cancer cell line EJ was transfected with si-Claudin-4 and negative control (si-NC) to down-regulate the expression of Claudin-4. The expression of Claudin-4 in cells was detected by qRT-PCR and Western blot to determine the transfection effect. The transfected EJ cells were treated with different concentrations of cisplatin (DDP), and the survival rate of cells was detected by CCK-8 method. The EJ cells were randomly divided into control group, si-Claudin-4 group, DDP group, DDP+si-Claudin-4 group. After transfection and DDP treatment, the CCK-8 method was used to detect the survival rate of cells in each group; Plate colone formation assay was used to detect the colony formation ability of cells in each group; Immunofluorescence staining was used to observe the γ-H2AX foci formation in each group; Single-cell gel electrophoresis was used to detect DNA damage of cells in each group; Western blot was used to detect the protein expression levels of γ-H2AX, Ku70, Ku80 and DNA-PKcs of cells in each group. **Results** After transfection, the relative expression of Claudin-4 mRNA and protein in si-Claudin-4 group were significantly lower than those in control group and si-NC group ($P<0.05$). The survival rate of EJ cells which treated with different concentrations of DDP in si-Claudin-4 group was significantly lower than those in control group and si-NC group ($P<0.05$). Compared with control group, the survival rates of cells in si-Claudin-4 group and DDP group were significantly decreased, the numbers of cell clones were significantly reduced, the intracellular γ-H2AX foci formations were significantly increased, and the cells showed typical trailing shape, the comet tail length and tail DNA ratio were significantly increased, the relative expression of γ-H2AX protein were significantly up-regulated, and the relative protein expression of Ku70, Ku80 and DNA-PKcs were significantly down-regulated, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with DDP group, the survial rate of cells and the number of cell clones were decresed, the intracellular γ-H2AX foci formation was increased, the cell tailing is more obvious, the

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2021D01C364)

[通信作者] 杜 恒,E-mail:536559255@qq.com

comet tail length and tail DNA ratio were increased, the relative expression of γ-H2AX protein was significantly up-regulated, the relative protein expression of Ku70, Ku80 and DNA-PKcs were significantly down-regulated in DDP+si-Claudin-4 group, and the differences were statistically significant (P<0.05). **Conclusion** Targeted down-regulation of Claudin-4 gene expression in bladder cancer cell line EJ can enhance the sensitivity of tumor cells to DDP, which may be achieved by inhibiting the ability of DNA damage repair.

Keywords: bladder cancer; Claudin-4; cisplatin; chemosensitivity; DNA damage repair

膀胱癌是一种常见的泌尿道恶性肿瘤,临床将其分为非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌[1]。目前,常见的治疗方式是手术切除结合化疗药物灌注,大部分患者在治疗后症状得以缓解,但仍有部分患者会出现转移性复发,其原因可能是肿瘤细胞产生了化疗耐药,对化疗药物的敏感性大大降低,影响化疗效果[2-3]。因此,如何逆转肿瘤细胞耐药并提高其对化疗药物的敏感性是膀胱癌研究中的重要内容。

在各种上皮细胞中,紧密连接充当管腔空间和上皮细胞之间的屏障或栅栏,封闭了细胞之间的空隙,可防止有害物质的渗透。此外,紧密连接通过抑制化疗药物侵入肿瘤组织,并保留了肿瘤内生长因子,从而在维持肿瘤微环境中发挥作用[4]。紧密连接蛋白4(Claudin-4)属于紧密蛋白家族一员,是上皮紧密连接的主要成分,其不仅在上皮组织中呈高表达,在前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌等多种肿瘤中均异常高表达,靶向下调Claudin-4能够提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性[5-9]。但关于Claudin-4是否能够对膀胱癌化疗产生作用及具体机制尚未明确,鉴于此,本研究通过靶向调控Claudin-4基因表达探究其对膀胱癌顺铂(cisplatin,DDP)敏感性的影响,并初步探究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人膀胱癌细胞系EJ(中国科学院上海细胞库),DDP(石药控股集团),RPMI 1640培养基和1%青-链霉素双抗液(美国Sigma公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程公司),Lipofectamine2000转染试剂盒(美国Invitrogen公司),TRIzol试剂盒(南京诺唯赞生物公司),BalbScript First Strand cDNA Synthesis Kit(gDNA Removal)和2×SYBR qPCR Mix(北京百奥博莱生物科技公司),CCK-8检测试剂盒(北京百奥博莱科技公司),RIPA裂解液、BCA蛋白测定试剂盒、结晶紫染液及DAPI染料(上海碧云天生物研究所),ECL显影液(上海吉至生化科技公司),Claudin-4兔多克隆抗体、γ-H2AX兔多克隆抗体、Ku70兔多克隆抗体、Ku80兔多克隆抗体、DNA-PKcs兔多克隆抗体、GAPDH兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗及Alexa Fluor®488荧光标记的二抗(英国Abcam公司)。其他实验试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 将冻存的人膀胱癌细胞系EJ复苏,添加RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清和1%青-链霉素双抗液),于37 ℃、5%CO_2培养箱中进行培养,待贴壁生长融合至80%以上传代。将对数生长期的细胞按3×10^{5}个/孔的密度接种于6孔板,并随机分为对照组、si-NC组、si-Claudin-4组,置于培养箱过夜,采用脂质体Lipofectamine2000分别转染si-NC、si-Claudin-4至si-NC组、si-Claudin-4组细胞中,转染具体操作按试剂盒说明书进行,对照组细胞正常培养不进行转染。转染6 h后,换用新鲜完全培养基培养48 h后,收集各组EJ细胞进行后续实验。

1.2.2 RNA提取 qRT-PCR TRIzol法提取各组EJ细胞总RNA,通过NanoVueTM Plus仪检测总RNA的纯度、浓度,反转录合成cDNA,保存于-20 ℃。以cDNA为模板,qRT-PCR扩增来检测各组细胞内Claudin-4 mRNA的表达,反应程序:95 ℃ 10 min,1次循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40次循环。所有操作均按试剂盒说明书进行。各组设置3个复孔,根据比较循环阈值$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因的相对表达水平,内参基因设为GAPDH。引物序列:Claudin-4上游引物5′-CGGCCCACAACATCATCCAA-3′,下游引物5′-GGCGGAGTAAGGCTTGTCT-3′;GAPDH上游引物5′-TGTGGGCATCAATGGATTTGG-3′,下游引物5′-ACACCATGTATTCCGGGTCAAT-3′。

1.2.3 Western blot法 在各组EJ细胞中加入预冷的RIPA裂解液,置于冰上充分裂解,12 000 r/min低温离心5 min,弃沉淀取上清,BCA法测定上清蛋白浓度。取等量上样缓冲液与蛋白混匀,100 ℃金属浴变性10 min,制备10%聚丙烯酰胺凝胶,将变性后的蛋白上样至凝胶孔,通过电泳分离蛋白,并电转至PVDF膜上,TBST洗膜,将膜在5%山羊血清中室温封闭2 h,洗涤后,加入Claudin-4兔多克隆抗体、γ-H2AX兔多克隆抗体、Ku70兔多克隆抗体、Ku80兔多克隆抗体、DNA-PKcs兔多克隆抗体,均按照1∶1 000进行稀释,置于4 ℃孵育过夜。次日,TBST洗膜,加入对应辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶5 000),室温孵育2 h,TBST再次洗膜,加入ECL显影液,以GAPDH为内参,Image-Pro Plus 6.0软件分析统计蛋白条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量(目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值之比)。

1.2.4 细胞分组处理与CCK-8法检测 将收集的对照组、si-NC组及si-Claudin-4组的EJ细胞常规消化、离心，重悬后按2×10^3个/孔的密度接种于96孔板，放入37 ℃、5%CO_2培养箱中恒温过夜培养；换用不同浓度（0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L）的DDP刺激处理3组EJ细胞，24 h后，每孔加入CCK-8试剂，37 ℃避光培养2 h，采用酶联免疫检测仪测定450 nm波长处各孔的吸光度（absorbance，A）值，计算细胞存活率，并绘制细胞存活率曲线。将对数生长期的EJ细胞随机分为对照组（细胞正常培养）、si-Claudin-4组（转染si-Claudin-4至细胞）、DDP组（采用25 μmol/L DDP刺激细胞）和DDP+si-Claudin-4组（转染si-Claudin-4至细胞，48 h后再用25 μmol/L DDP刺激细胞）。将各组细胞置于培养箱内，24 h后收集各组细胞，并以CCK-8法检测各组细胞存活率，方法同上。

1.2.5 平板克隆形成实验 收集对照组、si-Claudin-4组、DDP组及DDP+si-Claudin-4组处理后的EJ细胞，以1 000 r/min低温离心5 min，制备单细胞悬液，调整密度以1×10^3个/皿接种到无菌培养皿内，期间轻晃使细胞分散均匀，放于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养，14 d后细胞集落长出，PBS洗涤，加入预冷的4%多聚甲醛进行固定，滴加0.5%结晶紫染液染色15 min，流水冲洗干净，自然晾干。在光学显微镜下观察各组细胞克隆形成情况并计数（将≥50个细胞聚集计数为1个菌落），拍摄图片。

1.2.6 细胞免疫荧光染色 收集对照组、si-Claudin-4组、DDP组及DDP+si-Claudin-4组处理后的EJ细胞常规消化、离心，按1×10^4个/孔的密度接种于含盖玻片的24孔板，使用预冷的4%多聚甲醛进行固定，PBS洗涤，用含0.1% Triton X-100的PBS封闭液室温封闭30 min，弃封闭液，PBS洗涤，滴加γ-H2AX兔多克隆抗体（1∶200）于盖玻片的细胞面上，4 ℃过夜孵育。次日，PBS洗涤，滴加Alexa Fluor® 488荧光标记的二抗（1∶500），室温避光孵育1 h，PBS再次洗涤后，DAPI避光染核10 min，抗荧光淬灭封片液封固，自然干燥。在荧光显微镜下观察各组细胞内γ-H2AX焦点形成情况并计数细胞内焦点数目，拍摄图片。

1.2.7 单细胞凝胶电泳法 收集对照组、si-Claudin-4组、DDP组及DDP+si-Claudin-4组处理后的EJ细胞，加入100 mmol/L乙醇培养12 h后，调整密度为1×10^5/mL，将细胞与0.7%低熔点琼脂糖按1∶10比例混匀，平铺在涂有1%琼脂糖的磨砂载玻片上，盖玻片将胶压平，待其凝固后，将载玻片浸入裂解液中，4 ℃避光处理2 h。PBS洗涤，将载玻片平放于单细胞凝胶电泳仪的托盘上，并填充TBE缓冲溶液，避光孵育30 min，电泳20 min（电压25 V，电流300 mA），结束后，0.9%NaCl洗涤载玻片，中和液中和15 min，梯度乙醇脱水，滴加2 μg/mL溴化乙锭染色30 s，超纯水漂洗，自然晾干。在荧光显微镜下观察细胞拖尾现象，拍摄图片，利用CASP 1.2.3和Image-Pro Plus 6.0软件分析细胞彗尾区域DNA含量和拖尾彗星数量。

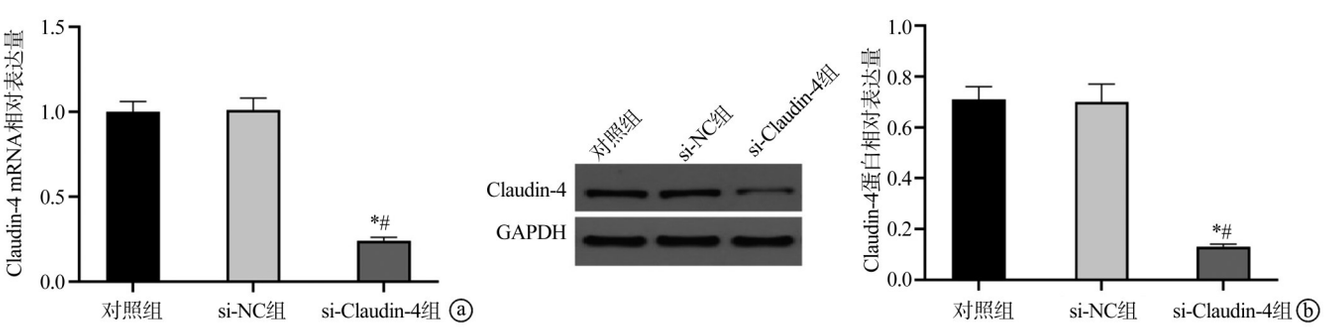
1.3 统计学分析

利用SPSS 23.0软件对实验数据进行统计学分析，GraphPad Prism 8.30软件绘制统计图，*K-S*检验正态性，符合正态性的计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。多组间比较采用单因素方差（*ANOVA*）分析，组内两两比较采用*LSD-t*法，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞转染效率测定结果

si-Claudin-4组细胞内Claudin-4 mRNA和蛋白相对表达量均显著低于对照组和si-NC组（$P<0.05$），见图1，表明成功构建Claudin-4表达下调的EJ细胞株。



a：qRT-PCR检测细胞内Claudin-4 mRNA表达变化；b：Western blot检测细胞内Claudin-4蛋白表达变化 *：与对照组比较，$P<0.05$；#：与si-NC组比较，$P<0.05$

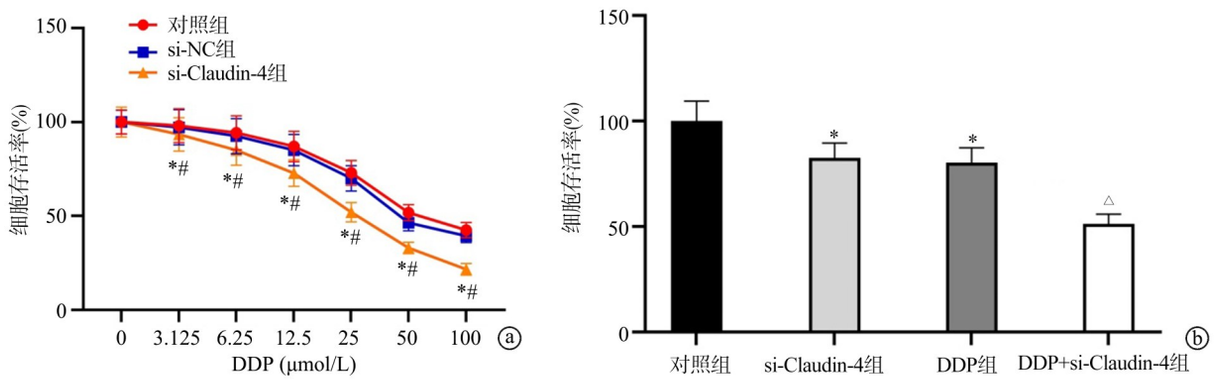
图1 转染后EJ细胞Claudin-4表达水平检测

2.2 靶向下调Claudin-4对DDP诱导下的膀胱癌细胞存活率的影响

经不同浓度DDP处理后，与对照组和si-NC组比较，si-Claudin-4组的细胞存活率显著下降（$P<0.05$），见图2a。si-Claudin-4组对DDP的IC_{50}值为27.31 μmol/L，因此选择25 μmol/L DDP进行后续研究。细胞转染后再以DDP进行处理，结果显示，与对照组比较，si-Claudin-4组和DDP组的细胞存活率均显著下降（$P<0.05$）；与DDP组比较，DDP+si-Claudin-4组细胞存活率进一步显著下降（$P<0.05$），见图2b。

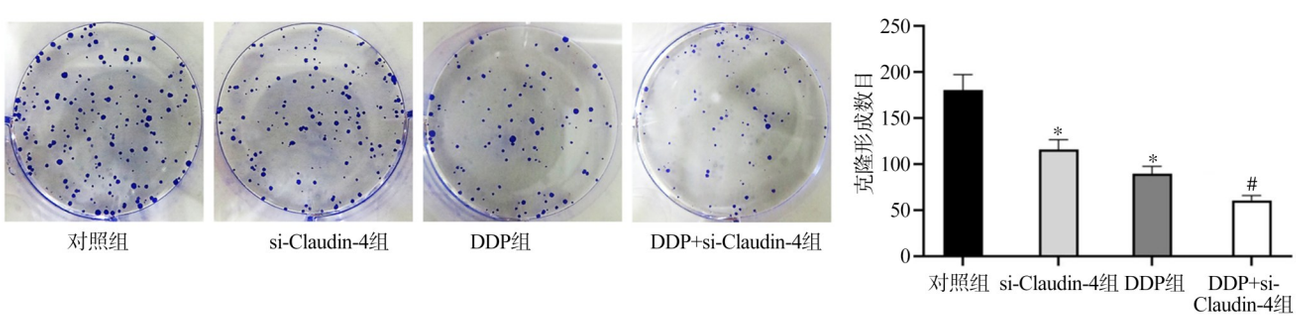
2.3 靶向下调Claudin-4对DDP诱导下的膀胱癌细胞克隆形成能力的影响

与对照组比较，si-Claudin-4组和DDP组的细胞克隆形成数目均显著减少（$P<0.05$）；与DDP组比较，DDP+si-Claudin-4组细胞克隆形成数目显著减少（$P<0.05$），见图3。



a：CCK-8检测不同浓度DDP处理后各组细胞存活率；b：CCK-8检测各组细胞存活率 *：与对照组比较，$P<0.05$；#：与si-NC组比较，$P<0.05$；△：与DDP组比较，$P<0.05$

图2 不同处理下EJ细胞存活率比较



*：与对照组比较，$P<0.05$；#：与DDP组比较，$P<0.05$

图3 各组EJ细胞克隆形成能力比较（结晶紫染色）

2.4 靶向下调Claudin-4对DDP诱导下的膀胱癌细胞内γ-H2AX焦点形成的影响

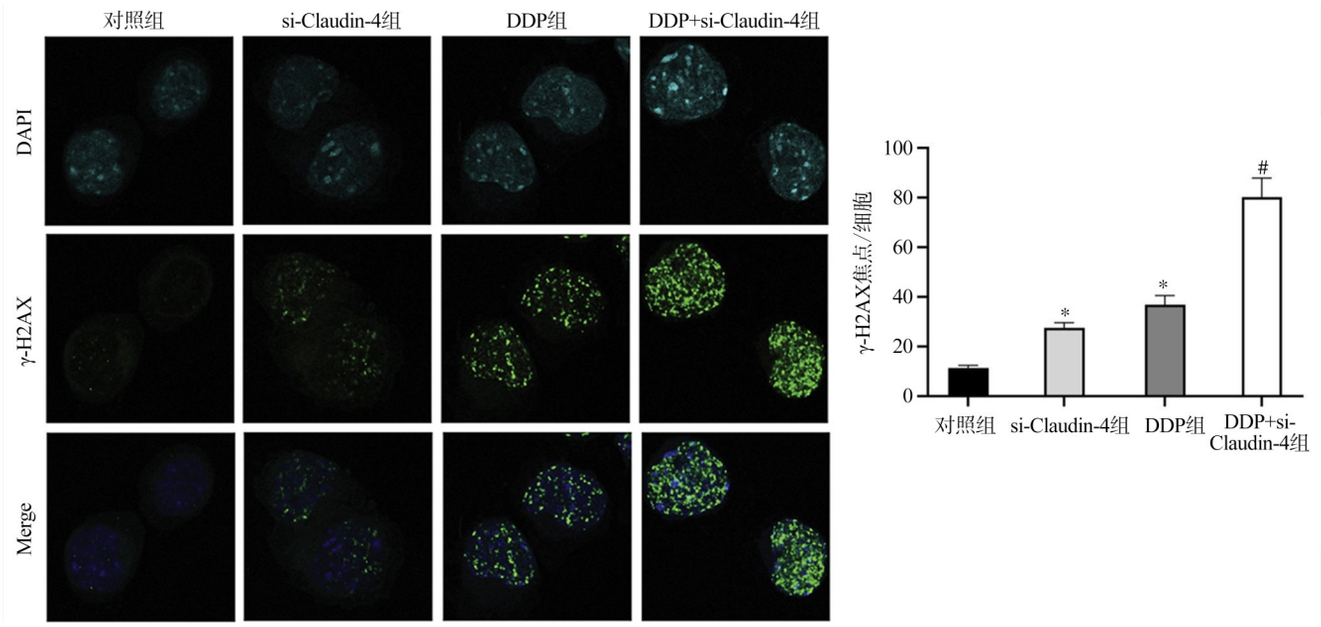
荧光显微镜下观察到各组EJ细胞内呈不同强度的绿色荧光，表明γ-H2AX焦点形成情况不同。与对照组比较，si-Claudin-4组和DDP组细胞内荧光变强，γ-H2AX焦点形成均显著增加（$P<0.05$）；与DDP组比较，DDP+si-Claudin-4组细胞内荧光进一步增强，细胞内γ-H2AX焦点形成也显著增加（$P<0.05$），见图4。

2.5 靶向下调Claudin-4对DDP诱导下的膀胱癌细胞DNA损伤的影响

单细胞凝胶电泳图像显示，对照组的细胞DNA呈球形，结构完整且边缘清晰，无拖尾现象；si-Claudin-4组和DDP组的细胞核头部缩小，出现典型拖尾形状，彗星尾长和尾部DNA比例均显著高于对照组（$P<0.05$）；与DDP组比较，DDP+si-Claudin-4组的细胞拖尾现象更加明显，彗星尾长和尾部DNA比例显著增加（$P<0.05$），见图5。

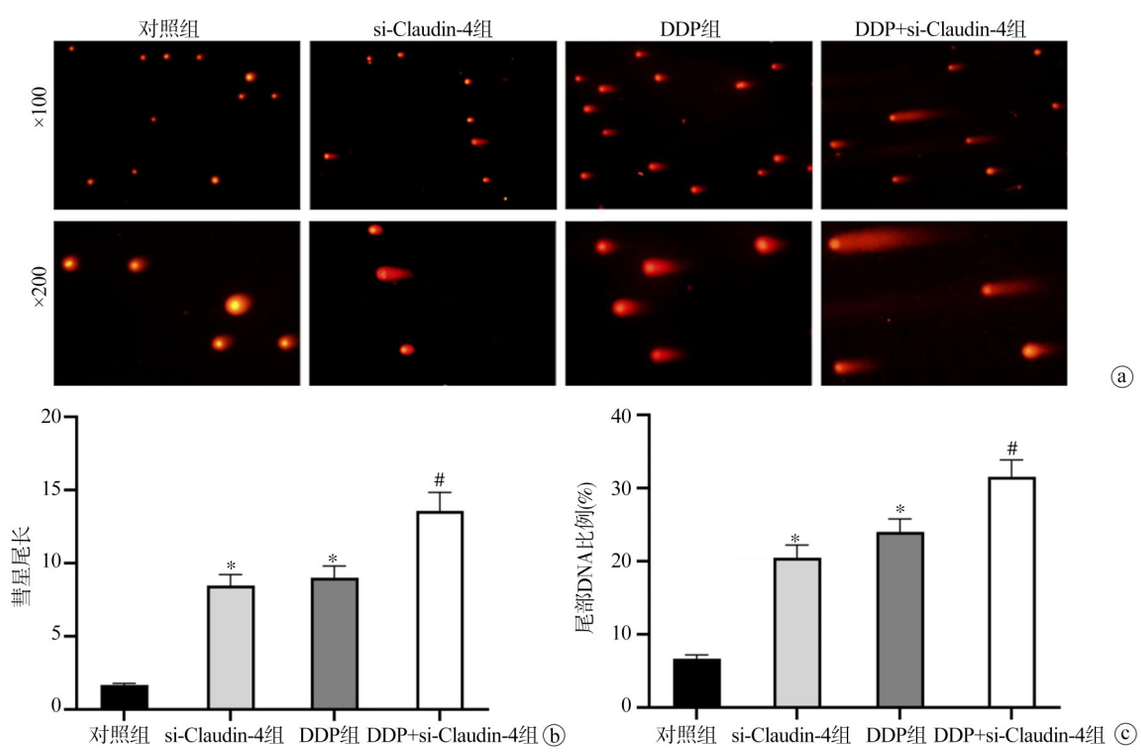
2.6 靶向下调Claudin-4对DDP诱导下的膀胱癌细胞中DNA损伤修复相关蛋白表达的影响

与对照组比较，si-Claudin-4组和DDP组细胞中γ-H2AX蛋白相对表达量显著上调（$P<0.05$），Ku70、Ku80以及DNA-PKcs蛋白相对表达量均显著下调（$P<0.05$）；与DDP组比较，DDP+si-Claudin-4组细胞中γ-H2AX蛋白相对表达量显著上调，且Ku70、Ku80、DNA-PKcs蛋白相对表达量均显著下调（$P<0.05$），见图6。



*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与DDP组比较,$P<0.05$

图4　各组EJ细胞内γ-H2AX表达情况(免疫荧光染色×200)

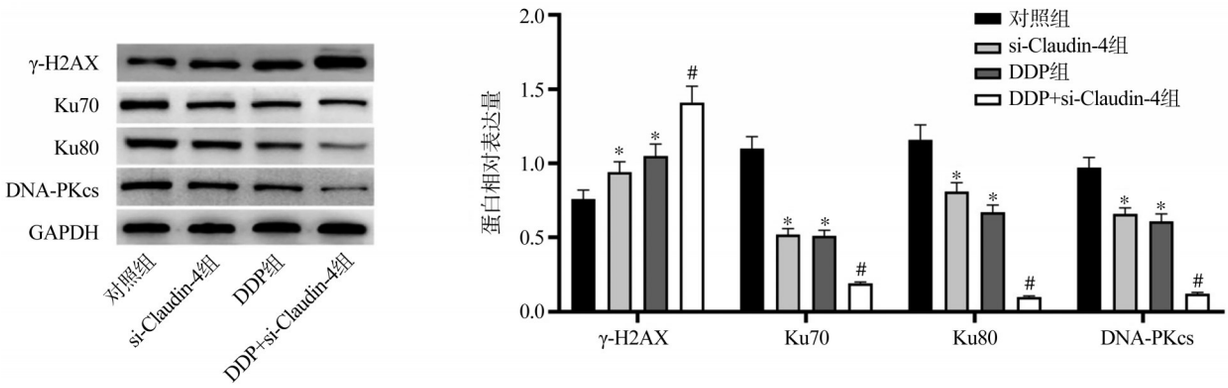


a:单细胞凝胶电泳图;b:彗星尾长;c:尾部DNA比例　*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与DDP组比较,$P<0.05$

图5　各组EJ细胞DNA损伤情况

3　讨论

目前,临床上治疗膀胱癌的常用化疗药物包括DDP、阿霉素、吉西他滨、表柔比星等,其中,以DDP为基础进行化疗一直是膀胱癌的一线治疗方法,可提高患者的5年总生存率[10]。然而,化疗耐药性的出现严重影响了膀胱癌的治疗效果,膀胱癌患者对化疗的总体反应率仅为20%~40%,且对DDP的敏感性差异很大,由此导致术后复发率和转移率均居高不下[3]。在肿瘤组织或细胞中异常表达的基因或分子能够促进肿瘤细胞的增殖、分化、浸润及转移,且与肿瘤细胞



*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与DDP组比较,$P<0.05$

图6 各组EJ细胞内γ-H2AX、Ku70、Ku80及DNA-PKcs蛋白表达

DDP耐药的形成密切相关[11]。由此可见,了解膀胱癌的发病机制及探究DDP化疗增敏的靶点基因对于膀胱癌的治疗至关重要。

Claudin-4的结构高度保守,其表达发生变化时会影响细胞间的通透性,从而导致多种疾病发生。目前,已发现Claudin-4在乳腺癌[6]、胃癌[12]、卵巢癌[7]等多种肿瘤中表达异常升高,并被证明作为一种癌基因促进了肿瘤的进程,此外,其异常高表达导致蛋白定位和功能出现异常,进而影响肿瘤细胞的化疗敏感性。本研究结果显示,在靶向下调膀胱癌细胞中Claudin-4表达后再经DDP处理,肿瘤细胞存活率明显下降,此外,靶向下调Claudin-4表达后再经DDP处理的膀胱癌细胞存活率和细胞克隆形成能力均明显低于DDP单独处理的膀胱癌细胞,由此推测,Claudin-4可能参与膀胱癌细胞对DDP耐药形成,靶向抑制其表达能够提高膀胱癌细胞DDP化疗敏感性。

本研究结果还显示,靶向下调Claudin-4表达后再经DDP处理的膀胱癌细胞拖尾现象十分明显,彗星尾长和尾部DNA比例均增加,说明DNA发生严重损伤。目前,多种抗癌药物包括DDP均是通过诱导肿瘤细胞发生DNA损伤而诱导细胞凋亡,以此发挥对肿瘤的抑制作用[13]。然而,当肿瘤细胞出现DNA损伤后,其能够通过增强抗氧化代谢、提高DNA修复机制及功能等来抵御持续性损伤的发生,使肿瘤细胞对DNA损伤产生一定的耐受能力,进而阻止细胞进一步凋亡[14]。组蛋白变体H2AX可以通过启动DNA修复过程的早期步骤,促进DNA双链断裂修复的信号级联反应来维持细胞结构稳定。在DNA发生损伤出现双链断裂的现象时,H2AX发生磷酸化产生γ-H2AX,进而招募DNA修复蛋白及凋亡蛋白到DNA损伤部位,在DNA双链断裂区形成γ-H2AX焦点,使用γ-H2AX抗体进行免疫荧光检测是衡量细胞DNA发生损伤的重要指标[15-16]。DNA损伤后主要通过两种途径进行修复,即非同源末端连接(non-homologous end joining,NHEJ)途径和同源重组(homologous recombination,HR)途径,其中NHEJ途径是人类细胞中的主要修复途径[17]。DNA-PKcs是NHEJ途径的重要参与者,在NHEJ修复过程中,Ku70与Ku80通过非共价键紧密结合形成异源二聚体,并在迅速识别DNA末端后与其结合,从而招募DNA-PKcs及其他修复因子,在损伤处对DNA进行加工和连接,完成DNA损伤修复过程[18]。在本研究中,经检测发现在靶向下调Claudin-4表达再经DDP诱导处理后,膀胱癌细胞内γ-H2AX焦点形成增加,γ-H2AX蛋白表达明显上调而Ku70、Ku80、DNA-PKcs蛋白表达均明显下调。由此推测,Claudin-4可能参与调控DDP诱导的膀胱癌细胞DNA损伤修复过程,进而影响肿瘤细胞的化疗敏感性。

综上所述,本研究认为靶向下调Claudin-4能够提高膀胱癌细胞的DDP药物敏感性,该作用可能是通过抑制DNA损伤修复过程实现的,这为提高肿瘤药物的治疗效果提供了新思路。但本研究只是初步探究了靶向调控Claudin-4对膀胱癌细胞DNA损伤的作用,关于其与DNA损伤以及化疗敏感性之间的具体作用机制尚不清楚,有待后续进行深入探讨。

[参考文献]

[1] Richters A, Aben KKH, Kiemeney LALM. The global burden of urinary bladder cancer: an update[J]. World J Urol, 2020, 38(8): 1895-1904. doi: 10.1007/s00345-019-02984-4.

[2] Dobruch J, Oszczudłowski M. Bladder cancer: current challenges and future directions[J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57(8): 749. doi: 10.3390/medicina57080749.

[3] Royce TJ, Liu Y, Milowsky MI, et al. Trimodalitytherapywith or without neoadjuvantchemotherapy for muscle-invasive bladder cancer[J]. Clin Genitourin Cancer, 2021, 19(4): 362-368. doi: 10.1016/j.clgc.2021.03.007.