

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.10.005

## RBM15通过ATAD3A调控Wnt/ $\beta$ -catenin通路对宫颈癌细胞增殖、迁移与侵袭的影响

张春年, 何静, 肖娟, 顾丽琴, 韩贤华(赣州市人民医院 妇科, 江西 赣州 341000)

**摘要** **目的:**探讨RNA结合蛋白15(RBM15)通过三磷酸腺苷酶家族蛋白3A(ATAD3A)调控Wnt/ $\beta$ -catenin通路对宫颈癌细胞恶性生物学行为的影响。**方法:**利用TCGA数据库分析宫颈癌组织中RBM15 mRNA表达水平及其与患者预后的关系。收集2024年1月至10月期间在赣州市人民医院手术切除的32例宫颈癌组织及癌旁组织标本,以及宫颈癌细胞HeLa、MS-751、C-33A和SiHa,通过免疫组化、WB法检测宫颈癌组织和细胞中RBM15的表达水平。利用SRAMP在线数据库筛选ATAD3A mRNA的m<sup>6</sup>A修饰位点。通过RNA免疫沉淀实验、RNA衰变实验及挽救实验鉴定RBM15与ATAD3A mRNA的相互作用。采用RNA干扰技术和病毒感染技术,在宫颈癌HeLa和SiHa细胞敲低或过表达RBM15和ATAD3A, qPCR和WB法检测mRNA和蛋白表达, CCK-8法、划痕实验和Transwell实验检测各组细胞的增殖、迁移和侵袭能力。**结果:**宫颈癌组织中RBM15 mRNA和蛋白阳性率均显著高于癌旁组织(均 $P < 0.001$ )。宫颈癌HeLa、MS-751、C-33A和SiHa细胞RBM15蛋白表达水平显著高于正常宫颈细胞Ect1/E6E7(均 $P < 0.01$ )。RBM15 mRNA高表达组患者5年无进展生存率低于低表达组患者( $P < 0.01$ )。宫颈癌组织中ATAD3A的表达水平显著高于癌旁组织( $P < 0.001$ ), RBM15 mRNA与ATAD3A mRNA呈正相关( $r = 0.601, P < 0.05$ )。ATAD3A mRNA的501、5312、12137位点存在高可信度的m<sup>6</sup>A修饰位点。HeLa、SiHa细胞中过表达RBM15后, ATAD3A mRNA和蛋白表达升高, 而敲低RBM15后, ATAD3A mRNA和蛋白表达降低(均 $P < 0.001$ )。RNA免疫沉淀实验显示, 与IgG组相比, RBM15抗体的免疫沉淀中ATAD3A mRNA显著富集(均 $P < 0.001$ )。MeRIP-qPCR实验显示, ATAD3A mRNA 501、5312、12137位点均存在明显的m<sup>6</sup>A甲基化富集(均 $P < 0.001$ )。RNA衰变实验显示, 敲低RBM15能降低HeLa、SiHa细胞ATAD3A mRNA的半衰期和稳定性(均 $P < 0.001$ )。敲低HeLa、SiHa细胞RBM15的表达, 显著抑制癌细胞的增殖、迁移及侵袭, Wnt/ $\beta$ -catenin通路相关蛋白Wnt3、 $\beta$ -catenin、vimentin表达均显著降低(均 $P < 0.001$ ); 而过表达ATAD3A可完全逆转上述抑制作用(均 $P < 0.001$ )。**结论:** RBM15通过m<sup>6</sup>A修饰ATAD3A mRNA调控Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路, 从而促进宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭。

**关键词** RNA结合蛋白15; 三磷酸腺苷酶家族蛋白3A; 宫颈癌; 增殖; 迁移; 侵袭; Wnt/ $\beta$ -catenin通路

**[中图分类号]** R737.33; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 10-1036-08

## Effects of RBM15 on the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells by regulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway through ATAD3A

ZHANG Chunnian, HE Jing, XIAO Juan, GU Liqin, HAN Xianhua (Department of Gynecology, Ganzhou People's Hospital, Ganzhou 341000, Jiangxi, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the effects of RNA binding protein 15 (RBM15) on the malignant biological behaviors of cervical cancer cells by regulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway through ATPase family AAA-domain containing 3A (ATAD3A). **Methods:** TCGA database was used to analyze the expression level of RBM15 mRNA in cervical cancer tissues and its relationship with patient prognosis. 32 samples of cervical cancer tissues and adjacent para-cancerous tissues surgically removed in Ganzhou People's Hospital between January and October 2024, as well as cervical cancer cells HeLa, MS-751, C-33A, and SiHa, were collected. The expression levels of RBM15 in cervical cancer tissues and cells were detected by immunohistochemistry and WB assay. m<sup>6</sup>A modification sites in ATAD3A mRNA were screened by the SRAMP online database. The interaction between RBM15 and ATAD3A mRNA were identified by RNA immunoprecipitation assay, RNA decay assay, and salvage assay. Knockdown or overexpression of RBM15 and ATAD3A in cervical cancer HeLa and SiHa cells were conducted by RNA interference and viral infection. The expressions of mRNA and protein were detected by qPCR and WB methods, while the proliferation, migration, and invasion abilities of cells in each group were assessed

**[基金项目]** 江西省卫生健康委科研项目(No. 202410848)

**[作者简介]** 张春年(1978—),女,硕士,副主任医师,主要从事妇科肿瘤的研究

**[通信作者]** 何静(扫码获取作者联系方式)



by CCK-8 method, scratch assay, and Transwell assay. **Results:** The positivity rates of RBM15 mRNA and protein in cervical cancer tissues were significantly higher than those in adjacent para-cancerous tissues (both  $P < 0.001$ ). The protein expression levels of RBM15 in cervical cancer cell lines HeLa, MS-751, C-33A, and SiHa were significantly higher than those in normal cervical cell lines Ect1/E6E7 (all  $P < 0.001$ ). The 5-year progression free survival rate of the RBM15 mRNA high expression group was lower than that of the low expression group ( $P < 0.001$ ). Compared with that in adjacent para-cancerous tissues, the expression level of ATAD3A was significantly upregulated in cervical cancer tissues ( $P < 0.001$ ). RBM15 mRNA was positively correlated with ATAD3A mRNA ( $r = 0.601$ ,  $P < 0.05$ ). There were highly reliable m<sup>6</sup>A modification sites at position 501, 5 312, 12 137 in ATAD3A mRNA. Overexpression of RBM15 in HeLa and SiHa cells led to an increase in ATAD3A mRNA and protein expressions, while knockdown of RBM15 resulted in a decrease in ATAD3A mRNA and protein expression (all  $P < 0.001$ ). RNA immunoprecipitation experiment showed that compared with the IgG group, ATAD3A mRNA was significantly enriched in the immunoprecipitation of RBM15 antibody (both  $P < 0.001$ ). MeRIP-qPCR experiment showed that there was significant m<sup>6</sup>A methylation enrichment at positions ATAD3A mRNA 501, 5 312 and 12 137 (all  $P < 0.001$ ). RNA decay experiments showed that knocking down RBM15 in HeLa and SiHa cells could reduce the half-life and stability of ATAD3A mRNA (all  $P < 0.001$ ). Knocking down the expression of RBM15 in HeLa and SiHa cells could significantly inhibit the proliferation, migration, and invasion of cancer cells and significantly reduce the expressions of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway related proteins Wnt3,  $\beta$ -catenin, and vimentin, while overexpression of ATAD3A could completely reverse the above inhibiting effects (all  $P < 0.001$ ). **Conclusion:** RBM15 can modify ATAD3A mRNA and regulate the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway through m<sup>6</sup>A, and thus promote the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells.

**[Key words]** RNA binding protein 15 (RBM15); ATPase family AAA-domain containing 3A (ATAD3A); cervical cancer; proliferation; migration; invasion; Wnt/ $\beta$ -catenin pathway

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(10):1036-1043. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.10.005]

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤,全球每年约有 57 万新增病例,其中约有 31.1 万例死亡病例<sup>[1]</sup>。目前,宫颈癌的治疗主要包括手术、放疗、化疗等,尽管患者的生存状况已有所改善,但仍有部分患者在接受治疗后仍会出现疾病进展<sup>[2]</sup>。因此,阐明宫颈癌发生发展的机制,对于提高患者的生存率至关重要。N<sup>6</sup>-腺苷酸甲基化(N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A)是一种可逆的 RNA 甲基化修饰形式,是真核生物 RNA 最常见的转录后修饰<sup>[3]</sup>。RNA 结合蛋白 15(RNA binding protein 15, RBM15)是一种 m<sup>6</sup>A RNA 甲基转移酶,参与调控 Notch、Wnt 等多条信号通路,在细胞增殖、凋亡过程中发挥关键作用<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明,RBM15 在肺癌细胞中呈高表达,其能以 m<sup>6</sup>A 的方式激活转化生长因子  $\beta$ ,促进癌细胞增殖、侵袭和迁移,抑制脂质过氧化和铁死亡的发生。三磷酸腺苷酶家族蛋白 3A(ATPase family AAA-domain containing 3A, ATAD3A)是一种定位于线粒体内膜的 ATP 酶家族蛋白,在维持线粒体功能、能量代谢和细胞稳态中发挥关键作用<sup>[6]</sup>。近年研究<sup>[7]</sup>发现,ATAD3A 在肺癌、肝癌等多种恶性肿瘤中高表达,通过调控线粒体动力学、氧化磷酸化和细胞凋亡等途径促进肿瘤进展。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是宫颈癌发生发展的重要机制,该通路的激活能够促进癌细胞侵袭、转移及化疗耐药性的形成<sup>[8]</sup>。目前,RBM15 在宫颈癌中的表达及其对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响尚不清楚。因此,本研究通过检测宫颈癌组织中 RBM15 的表达水平,观察其对宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,进一步探

讨 RBM15 在宫颈癌发生发展中的作用及其分子机制,为宫颈癌的诊断与治疗提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 RBM15 表达数据的获取及分析

从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载并整理 33 种肿瘤类型的 RNAseq 转录组数据。应用 R (4.2.1)版本对原始数据进行了  $\log_2(\text{value} + 1)$  的标准化处理,根据数据格式特征情况选择合适的统计方法进行统计,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验,用 ggplot2 包对数据进行可视化。

### 1.2 组织标本、细胞与主要试剂

收集 2024 年 1 月至 2024 年 10 月期间在赣州市人民医院接受手术切除的 32 例宫颈癌患者的癌组织及相应的癌旁组织标本,均经病理组织学明确。患者均签署知情同意书,本研究方案通过医院伦理委员会审核批准(伦理审批号:TY-ZKY2024-052-13)。

人宫颈癌细胞 HeLa、MS-751、C-33A、SiHa 及正常宫颈细胞 Ect1/E6E7 购自北京协和细胞库。

DMEM 培养基(货号:C11995500BT)及胎牛血清(货号:04-001-1ACS)均购自美国 Gibco 公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,兔/鼠通用免疫组化二抗购自北京中杉金桥公司,PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit(货号:RRO47A)、TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Tag<sup>TM</sup> II(货号:RR820A)购自日本 TaKaRa 公司,RNA 免疫沉

试剂盒(货号:CHP1-24RXN)、RBM15抗体(货号:ab96544)、m<sup>6</sup>A抗体(货号:SAB5600251)购自美国Sigma公司,放线菌素D(货号:50-76-0)和嘌呤霉素(货号:58-58-2)购自美国默克公司,引物由上海华大公司设计合成。shRNA-NC、shRNA-RBM15、shRNA-ATAD3A、过表达RBM15、过表达ATAD3A病毒液及过表达空载质粒液均购自上海吉玛生物科技公司。

### 1.3 细胞培养转染及分组

**敲低实验:**将HeLa与SiHa细胞分为sh-NC组、sh-RBM15组和sh-ATAD3A组。在sh-NC组中加入shRNA-NC病毒液,sh-RBM15或sh-ATAD3A组加入1 mL完全培养液及shRNA-RBM15或shRNA-ATAD3A相应病毒液,混匀后在继续进行细胞培养,以2 μg/mL嘌呤霉素筛选3日,换用正常培养基后用于蛋白检测和mRNA检测。

**过表达实验:**HeLa与SiHa细胞接种于细胞培养板后,当细胞汇合度达80%后进行转染实验。根据处理方式不同将HeLa与SiHa细胞分为对照组(NC组)、oe-RBM15和oe-ATAD3A组,分别滴入空载质粒液、过表达RBM15和过表达ATAD3A病毒液,嘌呤霉素筛选细胞,以WB和qPCR法验证其转染效率。

### 1.4 qPCR法检测宫颈癌组织与细胞中RBM15、ATAD3A等mRNA的表达水平

使用TRIzol试剂提取宫颈癌组织与细胞中总蛋白,测量RNA样品的浓度和纯度后,将其逆转录为cDNA。按照qPCR试剂盒说明书进行PCR反应。引物序列:RBM15上游引物为5'-ACGACCCGCAACAATGAAG-3',下游引物为5'-GAAGTCGAGTCCTCACCAC-3';ATAD3A上游引物为5'-GTGAGGACTCGACTTCCCG-3',下游引物为5'-GCCGCTATCGGTCTTCCG-3';ATAD3A-501上游引物为5'-AGCGCGAGTATGATACCG-3',下游引物为5'-GCCCCAAGAATTTTTGGTGCTC-3';ATAD3A-5312上游引物为5'-TACACGGAGGCTACCAGTACA-3',下游引物为5'-GTCGTACAGCCCGTAGTAGTC-3';ATAD3A-12137上游引物为5'-ACCTGGACCACAGCGTATCT-3',下游引物为5'-GGGTTGCGACCAATCACTC-3';GAPDH上游引物为5'-TGATTGGTCGCAACCCCATTA-3',下游引物为5'-CAGTGACGTGTTAGGTCCAG-3'。qPCR反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,60℃退火及延伸60 s,共循环40次。以2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算目的基因mRNA的相对表达量。

### 1.5 RNA免疫共沉淀(RIP)检测RBM15抗体与ATAD3A mRNA的结合情况

细胞经胰酶消化后离心收集沉淀,加入RIP裂解液冰上裂解5 min,取200 μL裂解液与50 μL磁珠混合,经RIP洗脱缓冲液清洗后,加入5 μg目的蛋白抗体37℃下作用30 min,补充RIP缓冲液及细胞裂解液,4℃下反应过夜。次日加入150 μL蛋白酶K溶液,离心取上清获得RNA样品,最终使用qPCR法检测结果。

### 1.6 m<sup>6</sup>A甲基化免疫共沉淀(MeRIP)及mRNA衰减实验分析ATAD3A mRNA的m<sup>6</sup>A甲基化富集及稳定性

将各组细胞接种到6孔板(5 × 10<sup>6</sup>个/孔),培养12 h。待细胞完全贴壁后,加入终浓度为5 μg/mL的放线菌素D。分别于0、2、4和6 h收取细胞,用TRIzol法提取总RNA,经RNase消化至片段长度约为100 nt,加入抗m<sup>6</sup>A抗体进行富集,随后,进行qPCR检测。

### 1.7 免疫组化法检测宫颈癌组织中RBM15蛋白的表达水平

将32例宫颈癌组织和癌旁组织的石蜡切片,常规脱蜡、梯度乙醇水化处理,按照常规免疫组化染色步骤进行实验。高压锅中抗原热修复,自然冷却后,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>阻断内源性过氧化物酶,在RBM15一抗(稀释比为1:100)4℃下培养过夜。次日,清洗后依次在酶标二抗(稀释比为1:1 000)中处理60 min,DAB显色后,苏木精复染,乙醇脱水、中性树胶封片。采用半定量计分法,以染色强度和阳性细胞百分比两者的乘积作为判断标准:乘积 > 2分视为阳性,≤ 2分则为阴性。其中,染色强度评分:无着色0分,浅黄色1分,黄褐色2分,棕褐色3分;阳性细胞百分比评分:< 1%为0分,1% ~ < 25%为1分,≥ 25% ~ < 50%为2分,≥ 50% ~ < 75%为3分,≥ 75%为4分。

### 1.8 WB法检测宫颈癌细胞中RBM15、ATAD3A、Wnt3、β-catenin和vimentin的表达

提取各组细胞总蛋白,离心、测定蛋白浓度后,加上样缓冲液,95℃变性10 min。随后,80 V电泳30 min,120 mA 60 min分离,湿转法转膜2 h,5%脱脂奶封闭2 h。在兔抗人RBM15(1:1 000)、兔抗人ATAD3A(1:1 000)、兔抗人Wnt3(1:2 000)、兔抗人β-catenin(1:1 000)、兔抗人vimentin(1:2 000)、鼠抗人GAPDH(1:5 000)一抗中4℃下处理过夜。清洗后,在HRP标记二抗(1:5 000)中反应1 h。加入ECL发光液后,置于曝光成像仪中显影,采用ImageJ软件分析蛋白质条带的灰度值。

### 1.9 CCK-8法检测宫颈癌细胞的增殖能力

将各组对数生长期细胞用胰酶消化,PBS重悬后计数,按5 × 10<sup>3</sup>个/孔的细胞密度加入96孔板,每孔终体积为100 μL,设置3个复孔。培养0、12、24、36

和48 h时,每孔加入配制好的10  $\mu$ L CCK-8试剂,室温下避光反应2 h,随后于酶标仪波长450 nm处检测光密度(D)值。

### 1.10 划痕实验和Transwell实验检测宫颈癌细胞的迁移及侵袭能力

**划痕实验:**将各组对数生长期细胞,消化后接种到6孔板( $5 \times 10^6$ 个/孔),密度以24 h后达到90%~100%汇合为宜,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜,使细胞贴壁并形成单层,用无菌200  $\mu$ L移液器吸头在单层细胞上垂直划出直线划痕,用吸头沿直尺划过贴壁细胞,PBS清洗,更换为低血清培养基(如1% FBS),以降低细胞增殖对迁移实验的干扰,在显微镜下(4 $\times$ 物镜)拍摄划痕区域图像,将培养板放回37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱继续培养,24 h后显微镜下拍照。

**Transwell实验:**将200  $\mu$ L无血清培养基的细胞悬液( $5 \times 10^3$ 个细胞)加入预铺基质胶的Transwell小室上室中,下室中加入500  $\mu$ L含20%胎牛血清的培养基。培养24 h后,取出小室,用4%多聚甲醛固定细胞30 min,0.1%结晶紫染色液中染色20 min后,用棉签轻轻擦拭上室未穿膜细胞,在光学显微镜下观察、计数穿膜细胞数并拍照。

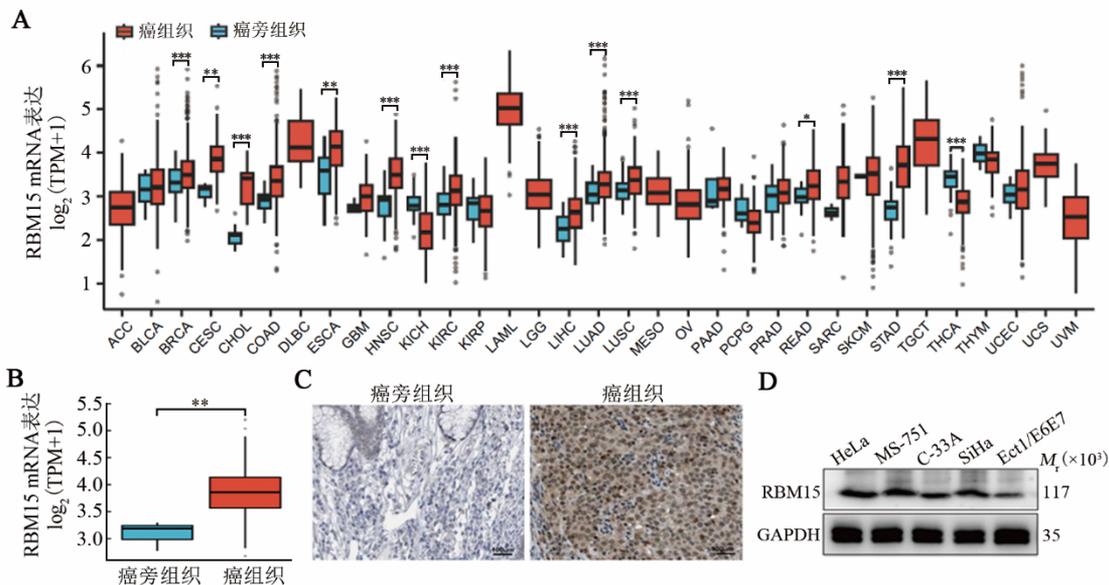
### 1.11 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。实验数据采用R 4.2.1和ggplot2 3.4.4进行统计分析绘图。变量之间相关性采用Spearman秩相关分析。两组间差异比较使用独立样本 $t$ 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 宫颈癌组织和细胞中RBM15呈高表达

TCGA数据库的泛癌分析结果(图1A、B)显示,宫颈癌组织中RBM15 mRNA表达显著高于癌旁组织(均 $P < 0.01$ )。免疫组化染色结果(图1C)显示,宫颈癌组织中RBM15蛋白主要表达于癌组织细胞核和细胞膜。癌组织中RBM15阳性率为87.50%(28/32),显著高于癌旁组织12.50%(4/32),差异有统计学意义( $\chi^2 = 36.000, P < 0.001$ )。WB法检测结果(图1D)显示,宫颈癌HeLa、MS-751、C-33A和SiHa细胞RBM15蛋白表达水平显著高于正常宫颈细胞Ect1/E6E7( $0.84 \pm 0.22, 0.77 \pm 0.20, 0.66 \pm 0.18, 0.81 \pm 0.22$  vs  $0.41 \pm 0.13, t = 4.122, 3.697, 2.758, 3.834$ ,均 $P < 0.01$ )。结果表明,RBM15在宫颈癌组织和细胞中均呈高表达状态,其可能在宫颈癌发生发展进程中起重要作用。



A:TCGA数据库分析泛癌组织中RBM15 mRNA表达(CESC:宫颈鳞癌与腺癌); B:TCGA数据库分析宫颈癌组织和癌旁组织中RBM15 mRNA表达差异; C:免疫组化法检测宫颈癌组织和癌旁组织中RBM15蛋白表达差异( $\times 200$ ); D:WB法检测宫颈癌细胞中RBM15蛋白表达。 $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ 。

图1 宫颈癌组织与细胞中RBM15 mRNA和蛋白呈高表达

### 2.2 RBM15高表达与宫颈癌不良预后有关

TCGA数据库分析结果(图2)发现,RBM15 mRNA高表达组患者5年无进展生存(PFS)率显

著低于低表达组[ $HR = 1.920, 95\% CI(1.190, 3.110), P = 0.008$ ]。RBM15 mRNA高表达组和低表达组5年总生存(OS)率比较差异无统计学意义[ $HR = 1.430,$

95% *CI* (0.900, 2.290),  $P = 0.134$ 。结果表明, RBM15可能作为预测肿瘤进展的潜在生物标志物,

但其对预后的影响仍需进一步研究。

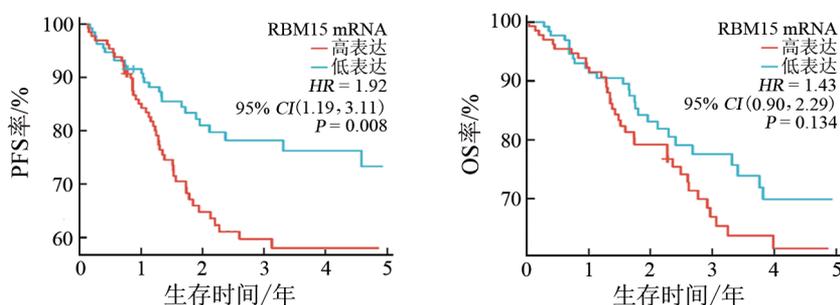


图2 Kaplan-Meier曲线分析宫颈癌中RBM mRNA表达水平与患者PFS和OS的关系

### 2.3 宫颈癌组织中RBM15通过m<sup>6</sup>A修饰上调ATAD3A的表达

TCGA数据库分析结果(图3A、B)显示,宫颈癌组织中ATAD3A mRNA表达显著高于癌旁组织( $t = 41.979, P < 0.001$ ); RBM15 mRNA与ATAD3A mRNA在宫颈癌组织中的表达水平呈正相关( $r = 0.601, P < 0.05$ )。

利用SRAMP在线数据库基于ATAD3A mRNA序列特征预测其m<sup>6</sup>A修饰位点,结果(图3C)显示,ATAD3A mRNA序列的501、5 312、12 137位点存在高可信度的m<sup>6</sup>A修饰位点。

在HeLa和SiHa细胞中过表达或敲低RBM15后,qPCR法和WB法检测结果(图3D、E)显示,在HeLa、SiHa细胞中过表达RBM15后,ATAD3A mRNA和蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.001$ );而敲低RBM15后,ATAD3A mRNA和蛋白表达降低(均 $P < 0.001$ )。

RNA免疫沉淀后,通过RT-qPCR实验检测ATAD3A mRNA的富集程度。结果(图3F)显示,与IgG组相比,RBM15抗体的免疫沉淀中ATAD3A mRNA显著富集,表明RBM15与ATAD3A mRNA可能存在直接结合( $P < 0.001$ )。针对这3个位点,设计相应的引物,通过MeRIP-qPCR实验检测结果(图3G)表明,501、5 312、12 137位点均存在明显的m<sup>6</sup>A甲基化富集( $P < 0.001$ )。使用放线菌素D进行RNA衰变实验,结果(图3H)显示,在HeLa和SiHa细胞中敲低RBM15以降低m<sup>6</sup>A修饰蛋白表达,可使ATAD3A mRNA的半衰期缩短,稳定性降低(均 $P < 0.001$ )。

以上实验结果表明,RBM15以m<sup>6</sup>A修饰方式增加ATAD3A mRNA的稳定性并上调ATAD3A表达。

### 2.4 ATAD3A过表达能够逆转敲低RBM15对宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响

CCK-8法、划痕实验和Transwell实验检测结果

(图4)显示,在HeLa、SiHa细胞中敲低RBM15的表达能抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力( $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ ),同时过表达ATAD3A则可以逆转敲低RBM15表达对细胞的增殖、迁移及侵袭的抑制作用( $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ )。实验结果表明,RBM15可能通过调控ATAD3A的表达参与宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭,提示RBM15/ATAD3A轴在宫颈癌进展中发挥重要作用,可能成为宫颈癌潜在的分子治疗靶点。

### 2.5 RBM15经ATAD3A调控宫颈癌细胞Wnt/ $\beta$ -catenin通路活性

WB法检测结果(图5)显示,敲低RBM15后,HeLa、SiHa细胞中Wnt3、 $\beta$ -catenin和vimentin的表达均显著降低(均 $P < 0.001$ );同时过表达ATAD3A则可逆转上述3种蛋白的下调。结果表明,RBM15通过ATAD3A调控宫颈癌细胞Wnt/ $\beta$ -catenin通路活性。

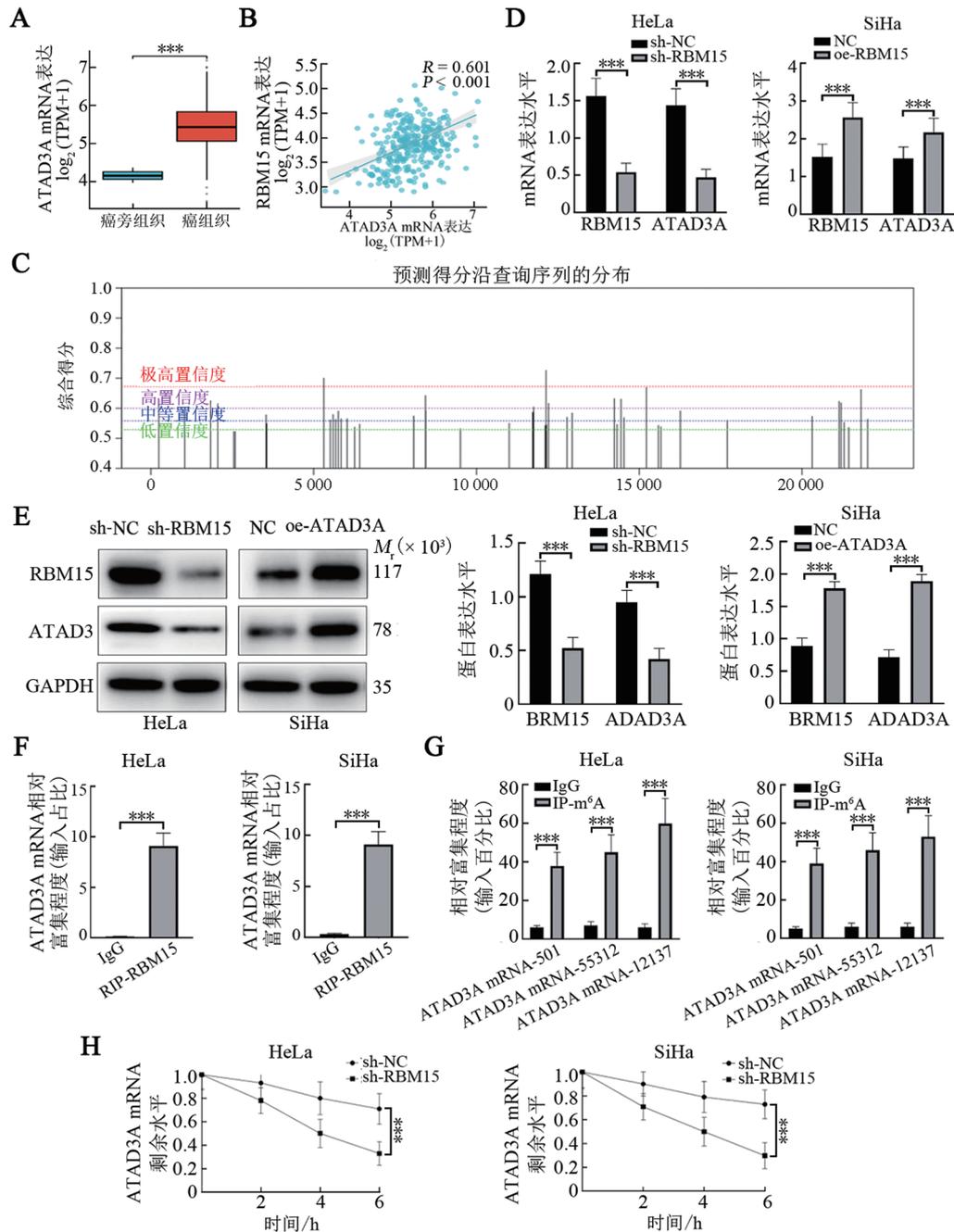
## 3 讨论

宫颈癌是世界范围内最常见的妇科恶性肿瘤,随着人口的增长和人口老龄化,宫颈癌发病率呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。目前,FIGO分期、肿瘤大小以及年龄等因素有助于评估宫颈癌患者的预后,但患者预后存在较大差异<sup>[9]</sup>。因此,阐明宫颈癌发生发展的分子机制,寻找可靠的预后评估指标及潜在的治疗靶点,对于提高宫颈癌患者的诊断与治疗具有重要意义。

RBM15是一种m<sup>6</sup>A RNA甲基化调节因子,可编码RNA结合蛋白,调控Notch信号通路,在细胞增殖、凋亡过程中发挥重要作用。据报道,RBM15可通过招募“写入蛋白”WTAP,调节甲基转移酶样因子3复合体与特定位点的结合,促进Wnt等多条肿瘤相关通路的激活,促进肿瘤转移<sup>[11]</sup>。通过TCGA数据库分析发现,宫颈癌中RBM15 mRNA表达显著上调。本研究在蛋白水平进一步证实,RBM15蛋白表达上调。

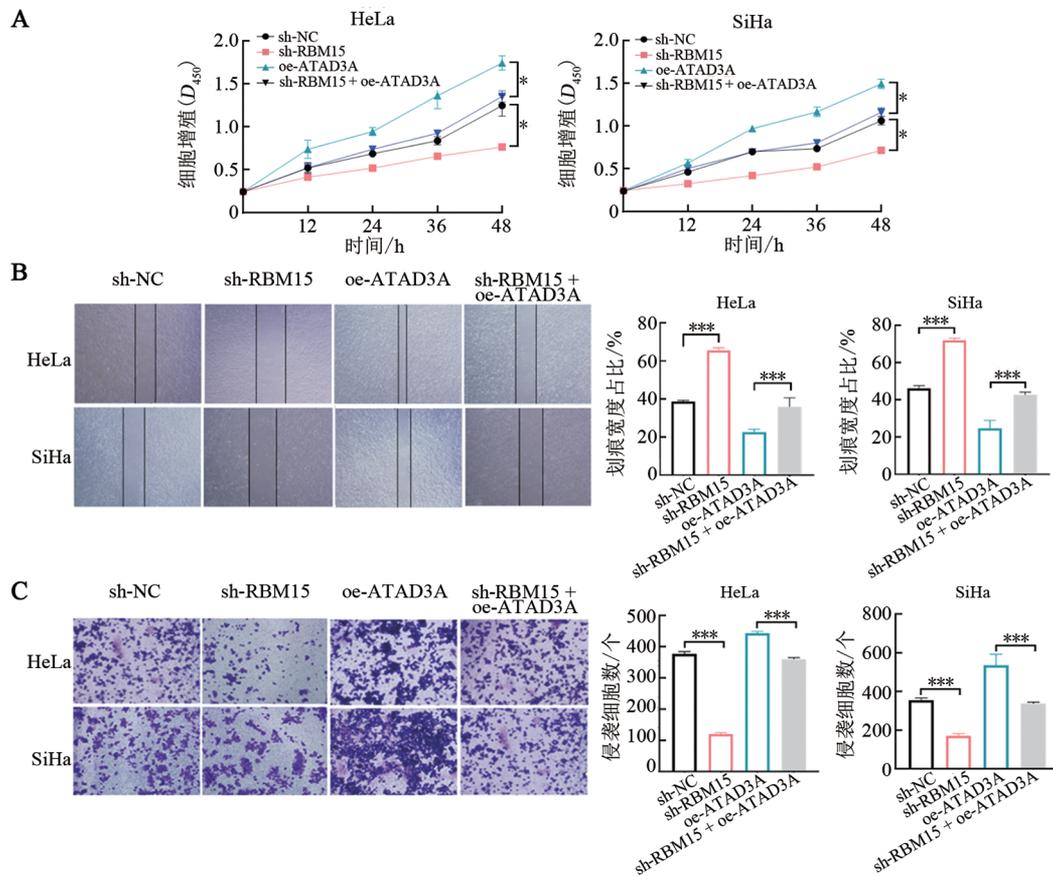
有学者<sup>[12]</sup>发现,宫颈癌中人乳头瘤病毒E6蛋白能够抑制细胞自噬及RBM15蛋白的降解,导致癌细胞中RBM15的蛋白积累,后者能促进c-Myc mRNA的m<sup>6</sup>A修饰,促进宫颈癌细胞增殖。为进一步验证RBM15的生物学功能,本研究在体外细胞实验中发现,敲低RBM15的表达能够显著抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,而过表达RBM15对宫颈癌细

胞的作用则相反。研究<sup>[13]</sup>认为,宫颈癌中RBM15能够促进核心蛋白聚糖的m<sup>6</sup>A修饰,上调癌细胞中核心蛋白聚糖的表达,促进癌细胞的恶性增殖<sup>[13]</sup>。此外,宫颈癌中RBM15能够促进Zeste同源增强子的m<sup>6</sup>A修饰,后者能促进纤维连接蛋白的表达,促进癌细胞的上皮间质转化(EMT),增强肿瘤的侵袭和转移能力<sup>[14]</sup>。



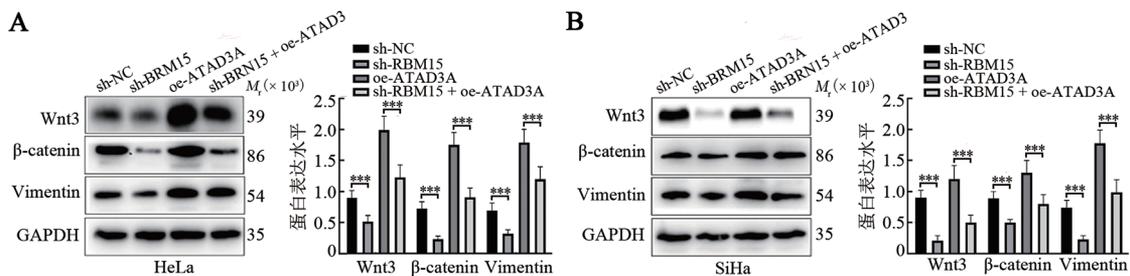
A: TCGA 数据集中宫颈癌组织和癌旁组织中 ATAD3A mRNA 表达差异; B: TCGA 数据集中宫颈癌组织中 RBM15 mRNA 与 ATAD3A mRNA 相关性分析; C: SRAMP 在线数据库预测 ATAD3A mRNA 可能的 m<sup>6</sup>A 修饰位点及可信度; D: qPCR 法检测癌细胞中 RBM15 mRNA 与 ATAD3A mRNA 表达水平; E: WB 法检测癌细胞中 RBM15、ATAD3A 蛋白表达水平; F: RIP-qPCR 实验检测 HeLa 和 SiHa 细胞中 ATAD3A mRNA 的富集水平; G: MeRIP-qPCR 实验检测 HeLa 和 SiHa 细胞中 3 个 ATAD3A mRNA 片段 m<sup>6</sup>A 富集水平; H: RT-qPCR 实验检测 HeLa 和 SiHa 细胞中 ATAD3A mRNA 的半衰期。\*\*\* $P < 0.001$ 。

图3 宫颈癌中 RBM15 以 m<sup>6</sup>A 修饰方式上调 ATAD3A 的表达



A: CCK-8 法检测细胞的增殖能力; B: 划痕实验检测细胞的迁移能力( $\times 100$ ); C: Transwell 实验检测细胞的侵袭能力( $\times 100$ )。  
\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图4 敲低RBM15或过表达ATAD3A对宫颈癌HeLa、SiHa细胞增殖、迁移及侵袭的影响



\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图5 RBM15通过ATAD3A调控宫颈癌细胞Wnt/β-catenin信号通路活性

Wnt/β-catenin 信号通路的异常激活是影响宫颈癌发生发展的重要机制,与肿瘤的增殖、侵袭和转移,以及耐药性形成密切相关<sup>[15]</sup>。本研究结果表明,敲低宫颈癌细胞中RBM15的表达可显著抑制Wnt/β-catenin 信号通路关键蛋白Wnt3、β-catenin 和vimentin 的表达,而过表达RBM15则呈现相反效应。研究者<sup>[16]</sup>在骨肉瘤细胞MG-63和U-2中证实,RBM15能够通过下调肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的表达,激活Wnt/β-catenin 信号通路,进而促进骨肉瘤细胞的侵袭和转移修饰,该修饰可以通过影响转录后调控来控制mRNA的剪接、稳定性和翻译,参

与生长和发育、病毒感染和糖尿病等各种生理和病理过程<sup>[17]</sup>。研究结果<sup>[18]</sup>表明,m<sup>6</sup>A失调在包括宫颈癌、乳腺癌在内的多种肿瘤发生发展中发挥了重要作用,与肿瘤细胞增殖、转移、代谢和治疗抵抗密切相关。RBM15作为m<sup>6</sup>A修饰的重要调节因子,是参与RNA选择性剪接的甲基转移酶复合物的关键成分,具有转录调节肿瘤代谢的生物学活性,激活丝氨酸和甘氨酸代谢,促进肿瘤细胞增殖的作用<sup>[19]</sup>。本研究发现,RBM15可能与ATAD3A mRNA直接结合,诱导m<sup>6</sup>A甲基化修饰,提高其稳定性,增加ATAD3A的蛋白表达。挽救实验结果表明,RBM15能促进宫

颈癌细胞的增殖、迁移及侵袭, 而敲低 ATAD3A 则可以逆转该表型。因此, RBM15 通过对 ATAD3A 的 mRNA 进行 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰, 上调 ATAD3A 的表达, 激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路, 从而促进宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭。

综上所述, 本研究结果表明宫颈癌组织中 RBM15 显著高表达, 其与患者不良预后密切相关。RBM15 通过表观遗传修饰 ATAD3A mRNA, 继而激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 促进宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 可作为宫颈癌潜在的诊断与预后生物标志物。本研究的局限在于尚未在动物水平验证 RBM15 的功能及下游分子机制, 后续仍需通过体内实验模型深入探明其调控网络, 评估其作为宫颈癌潜在治疗靶点的可行性。

### [参 考 文 献]

- [1] PERKINS R B, WENTZENSEN N, GUIDO R S, *et al.* Cervical cancer screening: a review[J]. *JAMA*, 2023, 330(6): 547-558. DOI: 10.1001/jama.2023.13174.
- [2] 于方媛, 刘丽. 靶向 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路治疗宫颈癌的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(9): 931-936. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.09.013.
- [3] ZHANG N, DING C H, ZUO Y X, *et al.* N<sup>6</sup>-methyladenosine and neurological diseases[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(3): 1925-1937. DOI:10.1007/s12035-022-02739-0.
- [4] CHENG H, WU J, LI L N, *et al.* RBM15 protects from myocardial infarction by stabilizing NAE1[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2024, 9(5): 631-648. DOI:10.1016/j.jacbts.2024.01.017.
- [5] FENG J, LI Y L, HE F, *et al.* RBM15 silencing promotes ferroptosis by regulating the TGF- $\beta$ /Smad2 pathway in lung cancer[J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(4): 950-961. DOI: 10.1002/tox.23741.
- [6] CHEN L T, LI Y C, ZAMBIDIS A, *et al.* ATAD3A: a key regulator of mitochondria-associated diseases[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12511[2025-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37569886/>. DOI: 10.3390/ijms241512511.
- [7] JIANG T, LI N, XU H, Sun L, *et al.* Identification of ATAD3A as a key regulator in non-small cell lung cancer by promoting STAT3-induced cell proliferation and tumor angiogenesis[J]. *Mol Carcinog*, 2024, 63(3):510-523. DOI: 10.1002/mc.23667.
- [8] ZHANG X, DONG N Z, HU X Y. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibitors [J]. *Curr Top Med Chem*, 2023, 23(10): 880-896. DOI: 10.2174/1568026623666230303101810.
- [9] YAO S J, ZHAO L Y, CHEN S M, *et al.* Cervical cancer immune infiltration microenvironment identification, construction of immune scores, assisting patient prognosis and immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1135657[2025-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36969161/>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1135657.
- [10] 何丹, 石艳宏, 王峥, 等. 非肌层浸润膀胱癌组织中核糖核酸结合蛋白 15 及泛素特异性肽酶 24 表达的临床预后意义[J]. *疑难病杂志*, 2023, 22(10): 1027-1031, 1038. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.10.004.
- [11] JIANG X L, LIU B Y, NIE Z, *et al.* The role of m<sup>6</sup>A modification in the biological functions and diseases[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 74[2025-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33611339/>. DOI: 10.1038/s41392-020-00450-x.
- [12] NIE G, TANG B, LV M F, *et al.* HPV E6 promotes cell proliferation of cervical cancer cell by accelerating accumulation of RBM15 dependently of autophagy inhibition[J]. *Cell Biol Int*, 2023, 47(8): 1327-1343. DOI: 10.1002/cbin.12020.
- [13] WANG H M, LI C, WEI Q, *et al.* RBM15 knockdown impairs the malignancy of cervical cancer by mediating m<sup>6</sup>A modification of decorin[J]. *Biochem Genet*, 2025, 63(1): 225-238. DOI: 10.1007/s10528-024-10757-x.
- [14] WANG R X, TAN W H. RBM15-mediated N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) modification of EZH2 drives the epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2024, 34(5): 15-29. DOI:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2024052205.
- [15] LIU H J, LIU Y, ZHOU Y J, *et al.* TM7SF2-induced lipid reprogramming promotes cell proliferation and migration via CPT1A/Wnt/ $\beta$ -catenin axis in cervical cancer cells[J/OL]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 207[2025-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38693136/>. DOI: 10.1038/s41420-024-01975-8.
- [16] CHANG J L, ZHAO F L, SUN X Y, *et al.* Polyphyllin I enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced inhibition of human osteosarcoma cell growth downregulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 44(2): 251-259. DOI: 10.19852/j.cnki.jtcm.2024.02.002.
- [17] AN Y Y, DUAN H. The role of m<sup>6</sup>A RNA methylation in cancer metabolism[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 14[2025-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35022030/>. DOI: 10.1186/s12943-022-01500-4.
- [18] MAO Z H, WANG B Y, ZHANG T, *et al.* The roles of m<sup>6</sup>A methylation in cervical cancer: functions, molecular mechanisms, and clinical applications[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(11): 734[2025-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37951987/>. DOI: 10.1038/s41419-023-06265-2.
- [19] PARK S H, JU J S, WOO H, *et al.* The m<sup>6</sup>A writer RBM15 drives the growth of triple-negative breast cancer cells through the stimulation of serine and Glycine metabolism[J]. *Exp Mol Med*, 2024, 56(6): 1373-1387. DOI: 10.1038/s12276-024-01235-w.

[收稿日期] 2025-03-12

[修回日期] 2025-08-14

[本文编辑] 党瑞山