

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.010

· 临床研究 ·

RBM15通过TMBIM6/TGF- β /Smad轴促进宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭

郑柯,赵芳,黄海伟,张琳(苏州大学附属张家港医院 妇产科,江苏 张家港 215600)

[摘要] **目的:**探讨RNA结合基序蛋白15(RBM15)是否通过含跨膜Bax抑制基序蛋白6(TMBIM6)/TGF- β /Smad轴促进宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭。**方法:**收集2023年1月至2025年1月在苏州大学附属张家港医院接受手术治疗的82例宫颈癌患者的肿瘤组织与癌旁组织。应用R语言分析癌症基因组图谱(TCGA)数据库中RBM15、TMBIM6 mRNA的表达;采用免疫组织化学法和Western blotting法检测RBM15、TMBIM6蛋白表达;采用Kaplan-Meier曲线分析RBM15、TMBIM6 mRNA表达与宫颈癌患者预后的关系;采用CCK-8法、划痕实验及Transwell侵袭实验检测RBM15、TMBIM6对宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响;利用基于序列的RNA腺苷甲基化位点预测工具(SRAMP)预测TMBIM6 mRNA的N⁶-甲基腺苷(m⁶A)修饰位点;采用RNA免疫共沉淀(RIP)实验、RNA衰变和挽救实验鉴定RBM15与TMBIM6 mRNA的相互作用;采用甲基化RNA免疫共沉淀定量PCR(MeRIP-qPCR)检测TMBIM6 mRNA的m⁶A富集;采用Western blotting法检测RBM15通过TMBIM6对宫颈癌细胞TGF- β /Smad通路相关蛋白表达的影响。**结果:**宫颈癌组织中RBM15 mRNA、TMBIM6 mRNA表达均高于癌旁组织(均 $P < 0.05$)。癌组织RBM15、TMBIM6阳性率均高于癌旁组织(均 $P < 0.001$)。宫颈癌细胞系HeLa、MS-751、SiHa中RBM15、TMBIM6蛋白表达均高于正常宫颈上皮细胞系Ect1/E6E7(均 $P < 0.05$)。国际妇产科联盟(FIGO)分期I B2~II B期宫颈癌组织中RBM15、TMBIM6蛋白阳性率高于I A~I B1期($P < 0.05$)。RBM15 mRNA高表达组、TMBIM6 mRNA高表达组5年无进展生存率分别低于各自的低表达组(均 $P < 0.05$)。宫颈癌组织中RBM15 mRNA与TMBIM6 mRNA表达呈正相关($P < 0.05$)。SRAMP预测结果显示,TMBIM6 mRNA序列的960、24876、25203位点为高可信度m⁶A修饰位点。在HeLa、SiHa细胞中过表达RBM15后,TMBIM6 mRNA和蛋白表达升高($P < 0.05$);敲低RBM15后,TMBIM6 mRNA和蛋白表达降低($P < 0.05$)。与IgG组相比,RBM15抗体免疫沉淀物中TMBIM6 mRNA显著富集。MeRIP-qPCR结果显示,TMBIM6 mRNA的960、24876、25203位点均存在明显的m⁶A富集。敲低RBM15可缩短TMBIM6 mRNA半衰期并降低其稳定性。敲低RBM15可抑制宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭,过表达TMBIM6可逆转上述影响。在HeLa、SiHa细胞中过表达TMBIM6后,TGF- β 1、Smad2、Smad3蛋白表达升高;敲低RBM15后,上述蛋白表达降低,过表达TMBIM6可逆转该影响。**结论:**RBM15可能通过m⁶A修饰提高TMBIM6 mRNA稳定性并激活TGF- β /Smad通路,从而促进宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭。

[关键词] 宫颈癌;RNA结合基序蛋白15;含跨膜Bax抑制基序蛋白6;TGF- β /Smad通路

[中图分类号] R733.33;R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)08-0899-10

RBM15 promotes proliferation, migration, and invasion of cervical cancer cells *via* the TMBIM6/TGF- β /Smad axis

Jia Ke, Zhao Fang, Huang Haiwei, Zhang Lin (Department of Obstetrics and Gynecology, Zhangjiagang Hospital Affiliated to Soochow University, Zhangjiagang 215600, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether RNA binding motif protein 15 (RBM15) promotes cervical cancer cell proliferation, migration, and invasion through the transmembrane Bax inhibitor motif-containing 6 (TMBIM6)/TGF- β /Smad axis. **Methods:** Tumor tissues and adjacent tissues were collected from 82 cervical cancer patients who underwent surgical treatment at the Affiliated Zhangjiagang Hospital of Soochow University from January 2023 to January 2025. R was used to analyze RBM15 and TMBIM6 mRNA expression in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. Immunohistochemistry and Western blotting assays were used to detect RBM15 and TMBIM6 protein expression. Kaplan-Meier curves were used to analyze the associations of RBM15 and TMBIM6 mRNA expression with the prognosis of patients with cervical cancer. Cell Counting Kit-8 (CCK-8), scratch, and Transwell invasion assays were used to evaluate the effects of RBM15 and TMBIM6 on cervical cancer cell proliferation, migration, and invasion. The sequence-based RNA adenosine methylation site predictor (SRAMP) was used to predict N⁶-methyladenosine (m⁶A) modification sites

[基金项目] 江苏省妇幼健康科研项目(F202167)

[作者简介] 郑柯(1990—),男,硕士,主治医师

[通信作者] 张琳(扫码获取作者通信方式)



in TMBIM6 mRNA. RNA immunoprecipitation (RIP), RNA decay, and rescue assays were performed to investigate the interaction between RBM15 and TMBIM6 mRNA. Methylated RNA immunoprecipitation quantitative PCR (MeRIP-qPCR) was used to detect m⁶A enrichment in TMBIM6 mRNA. Western blotting assays were used to assess the effects of RBM15 and TMBIM6 on TGF- β /Smad pathway-related protein expression. **Results:** RBM15 and TMBIM6 mRNA expression levels in cervical cancer tissues were higher than those in adjacent noncancerous tissues (both $P < 0.05$), and the positivity rates of RBM15 and TMBIM6 were higher in cancer tissues than in adjacent noncancerous tissues (both $P < 0.001$). RBM15 and TMBIM6 protein expression levels in HeLa, MS-751, and SiHa cells were higher than those in Ect1/E6E7 cells (all $P < 0.05$). The positivity rates of RBM15 and TMBIM6 in cervical cancer tissues at FIGO stages IB2-IIIB were higher than those at stages IA-IB1 (both $P < 0.05$). The 5-year progression-free survival rates in the RBM15 and TMBIM6 high-expression groups were lower than those in their respective low-expression groups (both $P < 0.05$). RBM15 mRNA expression was positively correlated with TMBIM6 mRNA expression in cervical cancer tissues ($P < 0.05$). SRAMP predicted high-confidence m⁶A modification sites at positions 960, 24876, and 25203 in TMBIM6 mRNA. RBM15 overexpression increased, whereas RBM15 knockdown decreased, TMBIM6 mRNA and protein expression in HeLa and SiHa cells ($P < 0.05$). TMBIM6 mRNA was significantly enriched in RBM15 immunoprecipitates compared with the IgG group. MeRIP-qPCR showed significant m⁶A enrichment at positions 960, 24876, and 25203 of TMBIM6 mRNA. RBM15 knockdown shortened the half-life and reduced the stability of TMBIM6 mRNA. RBM15 knockdown inhibited cervical cancer cell proliferation, migration, and invasion, whereas TMBIM6 overexpression reversed these effects. TMBIM6 overexpression increased TGF- β 1, Smad2, and Smad3 protein expression, whereas RBM15 knockdown decreased their expression; TMBIM6 overexpression reversed the effects of RBM15 knockdown. **Conclusion:** The results suggest that RBM15 may increase TMBIM6 mRNA stability through m⁶A modification and activate the TGF- β /Smad pathway, thereby promoting cervical cancer cell proliferation, migration, and invasion.

[Key words] cervical cancer; RNA binding motif protein 15 (RBM15); transmembrane Bax inhibitor motif-containing 6 (TMBIM6); TGF- β /Smad pathway

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(8): 899-908. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.010]

宫颈癌是全球女性常见的恶性肿瘤,全球每年新发57万例、死亡31.1万例^[1]。尽管近年来宫颈癌筛查和治疗取得了一定进展,但晚期患者预后仍不理想^[2]。转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)/Smad信号通路在宫颈癌进展中发挥重要作用,其异常激活与宫颈癌细胞增殖、侵袭和转移等恶性生物学行为密切相关^[3]。RNA结合基序蛋白15(RNA binding motif protein 15, RBM15)是RNA结合蛋白家族成员,在RNA剪接、转录调控及表观遗传修饰中发挥重要作用^[4]。研究^[5]发现,肺癌中RBM15高表达,可通过N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)修饰乳酸脱氢酶A mRNA,促进肿瘤代谢重编程,进而推动肿瘤进展。含跨膜Bax抑制基序蛋白6(transmembrane Bax inhibitor motif-containing 6, TMBIM6),又称Bax抑制蛋白1(Bax inhibitor-1, BI-1),是一种主要定位于内质网的应激调节蛋白,参与细胞存活、应激反应及钙稳态调控^[6]。既往研究^[6-7]表明,TMBIM6可参与多种恶性肿瘤的发生发展;RBM15介导的m⁶A修饰还可提高TMBIM6 mRNA稳定性并促进肿瘤细胞恶性表型。本研究通过临床样本分析和体外细胞功能实验,探讨RBM15是否通过调控TMBIM6影响TGF- β /Smad信号通路,进而调节宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭,为宫颈癌靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌患者及组织样本纳入与临床病理资料收集

收集2023年1月至2025年1月在苏州大学附属张家港医院接受手术治疗的82例宫颈癌患者的肿瘤组织与癌旁组织。纳入标准:(1)经组织病理学确诊为宫颈癌;(2)初治,未接受过手术及放化疗;(3)病历资料完整;(4)自愿参与研究。排除标准:(1)合并宫颈癌以外的其他恶性肿瘤;(2)合并严重心、肝、肾功能不全等疾病;(3)妊娠期或哺乳期;(4)接受过抗肿瘤治疗或不愿参与本研究。患者年龄33~79岁,平均(58.56 $\pm$ 8.27)岁;鳞癌50例、腺癌32例;肿瘤最大径<4 cm者46例、 $\geq$ 4 cm者36例;浸润深度<1/2全层者49例、 $\geq$ 1/2全层者33例;高、中分化47例,低分化35例;国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期I A~I B1期46例、I B2~II B期36例;淋巴结转移26例。所有患者均签署书面知情同意书。本研究经医院伦理委员会审核批准(批号:20230142)。

1.2 细胞及主要试剂、仪器

人宫颈癌细胞HeLa、MS-751、SiHa及正常宫颈上皮细胞系Ect1/E6E7均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。3495型Transwell小室购自美国Corning公司, MEM、DMEM培养基及胎牛血清购自杭州四季青公司, Lipofectamine 3000(货号L3000015)购自美国赛默飞公司, PV-9000型免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥公司, 逆转录试剂盒(货号RR047A)和实时荧光定量PCR(RT-qPCR)

试剂盒(货号RR820A)购自日本 TaKaRa 公司, RBM15 抗体(货号 ab96544)、TGF-β1 抗体(货号 ab215715)、GAPDH 抗体(货号 ab181602)、Smad2 抗体(货号 ab40855)和 Smad3 抗体(货号 ab84177)购自美国 Abcam 公司, TMBIM6 抗体(货号 HPA017378)购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 引物序列采用 Primer3.0 软件设计并由上海华大公司合成, 阴性对照短发夹 RNA(short hairpin negative control, shNC)、shRBM15 和 shTMBIM6 病毒液, 以及 RBM15 和 TMBIM6 过表达病毒液购自上海吉玛生物科技公司。Varioskan LUX 型多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司, Tanon 4600 型全自动化学发光图像分析系统购自上海 Tanon 公司, PowerPac Basic 型电泳仪和 12003154 型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司, Applied Biosystems QuantStudio 6 型实时荧光定量

PCR 仪购自美国 ABI 公司, IX73 型倒置荧光显微镜购自德国 Olympus 公司。

1.3 RNA 提取、逆转录及 RT-qPCR 检测 RBM15 和 TMBIM6 mRNA 表达

将各组细胞消化、离心并计数, 加入 TRIzol 试剂吹打混匀, 裂解细胞。采用氯仿-异丙醇法提取细胞总 RNA, 使用 NanoDrop 测定 RNA 浓度, 以 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.8~2.0 判定样本合格。按照 PrimeScript 逆转录试剂盒说明书进行逆转录, 所得 cDNA 于 -20 °C 保存。每个样本设 3 个复孔。RT-qPCR 反应体系: TB Green Premix Ex Taq II(2×) 10 μL, 上游引物(10 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物(10 μmol/L) 0.8 μL, cDNA 模板 2 μL, RNase-free 水 6.4 μL。qPCR 程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 34 s, 循环 40 次。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因相对表达量。引物序列见表 1。

表1 引物序列

引物	上游(5'→3')	下游(5'→3')
RBM15	CATATAACCCCGTCAACGCAG	GCAGCCGCCACAAACATAC
TMBIM6	TCAGCGCCTTTGTGAGGAG	CAGGCAAGGATCAGGTAGGTG
TMBIM6-960	ACCAAACCAAAGCCGTCATCA	GGAGCCAGTAAACGTATTGGAAG
TMBIM6-24876	TCGAGGACGACTTCAACTATGG	ACAGCAAAATTAAGGCAGGACTC
TMBIM6-25203	GTTTGCCCTCGGATCTCTGG	GCTTCCAACAGCGTAAATCCAA
GAPDH	ATGACACACACTCACTGATGC	GCTTCCAGAAACCGTAACAGGT

1.4 RNA 免疫共沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)法检测 RBM15 与 TMBIM6 mRNA 的结合

将宫颈癌细胞 HeLa、SiHa 培养至约 80% 汇合度, 使用预冷磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤 2 次, 加入含 1% Nonidet P-40(NP-40)的 RIP 缓冲液, 冰上裂解 15 min, 4 °C、14 000 × g 离心 10 min, 收集上清液。取 50 μL Protein A/G 磁珠, 用 PBS 洗涤 3 次。实验组加入 5 μg 抗 RBM15 抗体, 阴性对照组加入 5 μg 同种 IgG 抗体, 4 °C 旋转反应 2 h, 使抗体与磁珠结合。用 RIP 缓冲液洗涤 3 次以去除未结合抗体, 再洗涤 4 次以去除非特异性结合。加入 100 μL RIP 缓冲液和 10 μL 蛋白酶 K(Proteinase K)解离 RNA, 55 °C 反应 30 min。将前述细胞裂解上清液加入抗体-磁珠复合物并进行免疫沉淀孵育。加入 1 mL TRIzol LS, 按 TRIzol 法提取 RNA, 随后进行逆转录及 qPCR 反应(步骤同前)。富集倍数 = RBM15 组 TMBIM6 mRNA 水平/IgG 组 TMBIM6 mRNA 水平。

1.5 甲基化 RNA 免疫共沉淀定量 PCR(methylated RNA immunoprecipitation quantitative PCR, MeRIP-qPCR)法检测 TMBIM6 mRNA 的 m⁶A 富集

将宫颈癌细胞 HeLa、SiHa 培养至 80% 汇合度, PBS 洗涤后, 采用 TRIzol 法提取总 RNA。取 10 μg 总 RNA, 加入 RNA 片段化缓冲液, 94 °C 反应 5 min, 将 RNA 片段化至 200~500 nt, 并采用乙醇沉淀法回收 RNA。取 50 μL Protein A/G 磁珠, PBS 洗涤 3 次, 加入 5 μg 抗 m⁶A 抗体(或 IgG 对照), 4 °C 旋转反应 2 h。将片段化 RNA 与抗体-磁珠复合物混合, 4 °C 旋转孵育过夜。用含 0.1% SDS 的高盐 RIP 缓冲液洗涤 4 次, 去除非特异性结合。加入 100 μL 含蛋白酶 K 的洗脱缓冲液, 55 °C 反应 30 min。采用 TRIzol 法提取 RNA, 进行定量逆转录 PCR(quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)检测, 计算 m⁶A 富集倍数。

1.6 放线菌素 D 处理后 RT-qPCR 检测 RBM15 敲低对 TMBIM6 mRNA 稳定性的影响

将宫颈癌细胞 HeLa、SiHa 分为 shNC 组和 shRBM15 敲低组。细胞培养至 80% 汇合度时, 加入 5 μg/mL 放线菌素 D 阻断转录, 分别于 0、2、4、6 h 收集细胞, 每组设 3 个复孔。采用 TRIzol 法提取 RNA 并进行逆转录, 随后采用 RT-qPCR 检测 TMBIM6 mRNA 水平, 计算 mRNA 半衰期, 绘制 mRNA 衰变曲线, 比较不同时间点两组 TMBIM6 mRNA 水平的

差异。

1.7 免疫组织化学法检测宫颈癌组织 RBM15 和 TMBIM6 表达

将宫颈癌组织和癌旁组织石蜡切片置于 60 °C 烘箱中 30 min, 二甲苯 I、II 各浸泡 10 min, 再经梯度乙醇水化。将切片置于煮沸的柠檬酸钠缓冲液 (pH = 6.0) 中进行抗原修复, 自然冷却至室温。PBS 冲洗 3 次, 加入 3% H₂O₂, 室温反应 10 min, 再用 PBS 冲洗 3 次。滴加 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), 室温封闭 30 min; 滴加 RBM15、TMBIM6 一抗 (1:1 000), 4 °C 湿盒反应过夜; 以同种型 IgG 替代一抗作为阴性对照。滴加辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记二抗, 室温反应 30 min; 采用二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色 3 min, 苏木精染核 1 min, 流水返蓝 10 min。经脱水、透明后, 用中性树胶封片, 在显微镜下观察并判读。评分标准: 染色强度评分为 0 (无色)、1 (浅黄)、2 (棕黄)、3 (棕褐); 阳性细胞比例评分为 0 (< 5%)、1 (5%~25%)、2 (26%~50%)、3 (51%~75%)、4 (> 75%)。综合评分 = 染色强度评分 × 阳性细胞比例评分, 0~1 分为阴性, 2~12 分为阳性。

1.8 RBM15 敲低、TMBIM6 过表达及联合挽救细胞模型的构建与验证

将人宫颈癌细胞 HeLa、SiHa 分为 4 组: 阴性对照组 (NC, 感染 shNC 阴性对照病毒)、RBM15 敲低组 (shRBM15, 感染 shRBM15 短发夹 RNA 病毒)、TMBIM6 过表达组 (oeTMBIM6, 感染 TMBIM6 过表达病毒)、联合挽救组 (shRBM15+oeTMBIM6, 先后感染 shRBM15 敲低病毒与 TMBIM6 过表达病毒)。敲低实验: 将宫颈癌细胞 HeLa、SiHa 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 培养至 60% 汇合时, 将 shNC 或 shRBM15 病毒液加入细胞中, 37 °C 孵育 48~72 h 后收集细胞; 采用 2 μg/mL 嘌呤霉素筛选 3~4 d 后, 进行蛋白和 mRNA 检测。过表达实验: 将 HeLa、SiHa 细胞培养至 80%~85% 汇合度时进行病毒感染, 分为对照组、RBM15 过表达组和 TMBIM6 过表达组; 经嘌呤霉素筛选 3~4 d 后, 提取蛋白和 mRNA 进行检测。shRBM15 + oeTMBIM6 组感染顺序、剂量与筛选条件: 细胞汇合度达 60% 时, 先加入 shRBM15 病毒液 (MOI = 20), 37 °C 孵育 48 h; 嘌呤霉素 (2 μg/mL) 筛选 2 d, 获得稳定敲低 RBM15 的细胞; 弃筛选培养基, 加入 TMBIM6 过表达病毒液 (MOI = 20), 37 °C 继续孵育 48 h; 再次使用 2 μg/mL 嘌呤霉素连续筛选 3 d, 获得同时稳定敲低 RBM15、过表达 TMBIM6 的双感染细胞株; 所有 4 组细胞同步传代、扩增后用于后续实验。

1.9 Western blotting 法检测 RBM15、TMBIM6 及 TGF-β/Smad 通路相关蛋白表达

收集感染后的细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入放射免疫沉淀分析 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液, 冰上裂解 30 min。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度; 加入 5× SDS 上样缓冲液, 95 °C 变性 5 min。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 每孔上样 50 μg 蛋白, 分别以 80 V (浓缩胶) 和 120 V (分离胶) 电泳, 直至溴酚蓝迁移至凝胶底部。将聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜用甲醇浸泡 1 min 活化, 采用湿转法以 200 mA 恒流转膜 2 h 并验证转膜效率。用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 分别加入 RBM15、TMBIM6、TGF-β1、Smad2、Smad3 及 GAPDH 一抗 (稀释比例均为 1:1 000) 4 °C 摇动孵育过夜; 加入 HRP 标记二抗, 室温摇动孵育 1 h。采用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。采用增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 法显色, 按 1:1 混合 ECL A/B 液, 滴加至膜上并成像。使用 ImageJ 软件量化条带, 计算目标蛋白与内参蛋白的比值。

1.10 CCK-8 法检测 RBM15 敲低及 TMBIM6 过表达对 HeLa、SiHa 细胞增殖的影响

消化对数生长期 HeLa、SiHa 细胞, 调整密度至 5×10^4 个/mL, 按 100 μL/孔 (约 5 000 个细胞/孔) 接种于 96 孔板, 边缘孔加入 PBS 以减少蒸发干扰。实验设置 4 组: NC 组、shRBM15 组、oeTMBIM6 组、shRBM15 + oeTMBIM6 联合挽救组, 每组设置 6 个生物学复孔; 另设空白对照组 (仅添加完全培养基, 无细胞)。于 0、12、24、36、48 h 各时间点, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 轻轻振荡混匀。37 °C 避光反应 1 h 后, 使用酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度 (D) 值。

1.11 划痕及 Transwell 侵袭实验检测 RBM15 敲低及 TMBIM6 过表达对 HeLa、SiHa 细胞迁移、侵袭的影响

划痕实验: 将各组 HeLa、SiHa 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 培养至 90% 汇合度后, 用无菌枪头垂直划痕并保持划痕宽度一致; PBS 洗涤 3 次, 去除脱落细胞, 更换无血清 DMEM 培养基 (HeLa 细胞) 或无血清 MEM 培养基 (SiHa 细胞) 进行培养, 消除细胞增殖对迁移结果的干扰。分别于 0、24 h 采用倒置荧光显微镜配套 CCD 数字成像系统在同一位置拍照, 统一放大倍数为 ×200; 为保证同一视野前后可比, 拍照前在 6 孔板底部外侧用记号笔标记 3 处固定定位点, 每次拍照严格对齐标记位点, 每组细胞随机选取 5 个标记视野留存图像。使用 ImageJ 软件测量划痕

宽度。Transwell 侵袭实验:使用 50 μL Matrigel(1:8 稀释)包被 Transwell 小室膜,37 °C 固化 4 h。消化各组 HeLa、SiHa 细胞,以无血清培养基重悬并调整密度至 2×10^5 个/mL;上室加入 500 μL 细胞悬液,下室加入 600 μL 含 10% 胎牛血清的培养基。培养 24 h 后,用棉签擦去上室未侵袭细胞,采用 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 20 min;显微镜下随机选取 5 个视野($\times 200$)拍照并计数穿膜细胞。

1.12 统计学处理

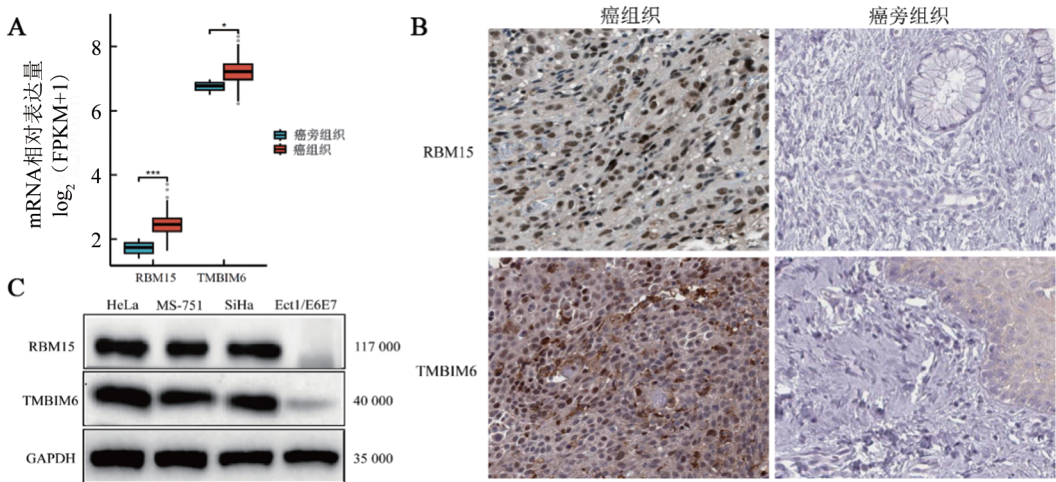
采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,并使用 R (4.2.1)分析 The Cancer Genome Atlas(TCGA)宫颈癌数据,用 ggplot2 (3.4.4)包绘图。采用 Kolmogorov-Smirnov 检验评估计量资料的正态性;符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。多组间整体差异采用单因素方差分析;若整体检验 $P < 0.05$,则采用 Tukey 法进行事后两两多重比较。对于 CCK-8 实验的多时间点、4 组重复测量数据,采用两因素重复测量方差分析,检验主效应与交互效应。主效应 1 为分组处理效应(4 组细胞增殖整体差异),主效应 2 为时间效应(随培养时间延长细胞增殖整体变化趋势),交互效应为分组 $\times$ 时间交互效应(不同处理组细胞增殖随时间变化的趋势是否存在差异)。若交互效应有统计学意义($P < 0.05$),则按时间点进行分层分析,各时间点内采用单因素方差分析(one-way ANOVA)并进行 Tukey 事后多重比较。采用 Pearson

相关分析评估变量间的相关性。基于 TCGA 数据库中宫颈癌样本 RBM15、TMBIM6 mRNA 表达量,采用 X-tile 软件计算最优临界值,并据此将全部样本划分为 RBM15 高表达组、RBM15 低表达组、TMBIM6 高表达组和 TMBIM6 低表达组。采用 Kaplan-Meier 法绘制总生存(OS)率和 5 年无进展生存(PFS)率曲线,并用 log-rank 检验比较组间生存差异。以 $P < 0.05$ 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、TMBIM6 表达升高

TCGA 数据库分析显示,宫颈癌组织中 RBM15 mRNA、TMBIM6 mRNA 表达均高于癌旁组织,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$,图 1A)。免疫组织化学染色结果显示,RBM15 定位于癌组织细胞核和细胞质,TMBIM6 定位于癌组织细胞质(图 1B)。癌组织中 RBM15、TMBIM6 阳性率分别为 73.17%(60/82)、75.61%(62/82),高于癌旁组织的 6.10%(5/82)、7.32%(6/82),差异有统计学意义($\chi^2 = 77.094$ 、78.784,均 $P < 0.001$)。宫颈癌细胞 HeLa、MS-751、SiHa 中 RBM15 蛋白相对表达量分别为(1.14 ± 0.22)、(0.97 ± 0.20)、(1.20 ± 0.18),正常宫颈上皮细胞 Ect1/E6E7 中为(0.19 ± 0.06);TMBIM6 蛋白相对表达量分别为(1.20 ± 0.27)、(1.11 ± 0.23)、(0.96 ± 0.18),Ect1/E6E7 细胞中为(0.21 ± 0.07)。宫颈癌细胞中 RBM15、TMBIM6 蛋白表达均高于 Ect1/E6E7 细胞,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$,图 1C)。



A: TCGA 数据库中 RBM15 mRNA、TMBIM6 mRNA 表达;B: 宫颈癌组织中 RBM15、TMBIM6 蛋白表达(免疫组织化学, $\times 200$); C: 宫颈癌细胞中 RBM15、TMBIM6 蛋白表达。

图1 宫颈癌组织和细胞中 RBM15、TMBIM6 的表达

2.2 RBM15、TMBIM6 高表达与宫颈癌较晚 FIGO 分期及较低 PFS 率相关

FIGO 分期 I B2~II B 期宫颈癌组织中 RBM15、TMBIM6 蛋白阳性率高于 I A~I B1 期,差异有统

计学意义(均 $P < 0.05$, 表 2)。TCGA 数据库生存分析显示, RBM15 mRNA 高表达组、TMBIM6 mRNA 高表达组的 5 年 PFS 分别低于各自的低表达组, 差异有统计学意义($HR = 1.920, 95\% CI = 1.190 \sim 3.110, P = 0.008; HR = 1.711, 95\% CI = 1.062 \sim 2.750,$

$P = 0.027$, 图 2)。RBM15 mRNA、TMBIM6 mRNA 高表达组与各自低表达组的 5 年 OS 率比较, 差异均无统计学意义($HR = 1.430, 95\% CI = 0.900 \sim 2.290, P = 0.134; HR = 1.440, 95\% CI = 0.904 \sim 2.310, P = 0.125$, 图 2)。

表 2 宫颈癌组织中 RBM15、TMBIM6 表达与临床病理参数的关系

参数	例数	RBM15 阳性[n(%)]	χ^2	P	TMBIM6 阳性[n(%)]	χ^2	P
年龄/岁			1.855	0.173		3.734	0.053
< 60	42	28(66.67)			28(66.67)		
≥ 60	40	32(80.00)			34(85.00)		
病理类型			1.522	0.217		1.339	0.247
鳞癌	50	39(78.00)			40(80.00)		
腺癌	32	21(65.63)			22(68.75)		
肿瘤最长径/cm			3.376	0.066		2.076	0.150
< 4	46	30(65.22)			32(69.57)		
≥ 4	36	30(83.33)			30(83.33)		
浸润深度			0.188	0.664		1.154	0.283
< 1/2 全层	49	35(71.43)			35(71.43)		
≥ 1/2 全层	33	25(75.76)			27(81.82)		
分化程度			2.919	0.088		3.381	0.066
高、中分化	47	31(65.96)			32(68.09)		
低分化	35	29(82.86)			30(85.71)		
FIGO 分期			5.474	0.019		6.136	0.013
I A~I B1	46	29(63.04)			30(65.22)		
I B2~II B	36	31(86.11)			32(88.89)		
淋巴结转移			2.540	0.111		3.410	0.065
有	26	22(84.62)			23(88.46)		
无	56	38(67.86)			39(69.64)		

2.3 RBM15 增强 TMBIM6 mRNA 的 m⁶A 富集并提高其表达及稳定性

宫颈癌组织中 RBM15 mRNA 与 TMBIM6 mRNA 表达呈正相关($r = 0.574, P < 0.001$, 图 3A)。利用基于序列的 RNA 腺苷甲基化位点预测工具(sequence-based RNA adenosine methylation site predictor, SRAMP)预测 TMBIM6 mRNA 序列的 m⁶A 修饰位点, 结果显示 960、24876、25203 位点为高可信度 m⁶A 修饰位点(图 3B)。体外实验显示, 在 HeLa、SiHa 细胞中过表达 RBM15 后, TMBIM6 mRNA 表达升高; 敲低 RBM15 后, 其 mRNA 表达降低(均 $P < 0.05$), TMBIM6 蛋白表达变化趋势与 mRNA 一致(图 3C、D)。RIP-qPCR 结果显示, 与 IgG 组相比, RBM15 抗体免疫沉淀物中 TMBIM6 mRNA 显著富集($P < 0.05$), 提示 RBM15 可能与 TMBIM6 mRNA

结合(图 3E)。MeRIP-qPCR 结果显示, TMBIM6 mRNA 的 960、24876、25203 位点 m⁶A 富集均高于 IgG 组(均 $P < 0.05$, 图 3F)。RNA 衰变实验显示, 敲低 RBM15 后 2、4、6 h 的 TMBIM6 mRNA 相对水平均低于 shNC 组(均 $P < 0.05$), 其 mRNA 半衰期缩短、稳定性降低(图 3G)。

2.4 RBM15 敲低抑制宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭, TMBIM6 过表达逆转该效应

CCK-8、划痕及 Transwell 侵袭实验结果显示, RBM15 敲低及 TMBIM6 过表达处理后各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。总体上, 敲低 RBM15 可抑制宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭, 过表达 TMBIM6 可逆转上述影响(图 4A~C)。

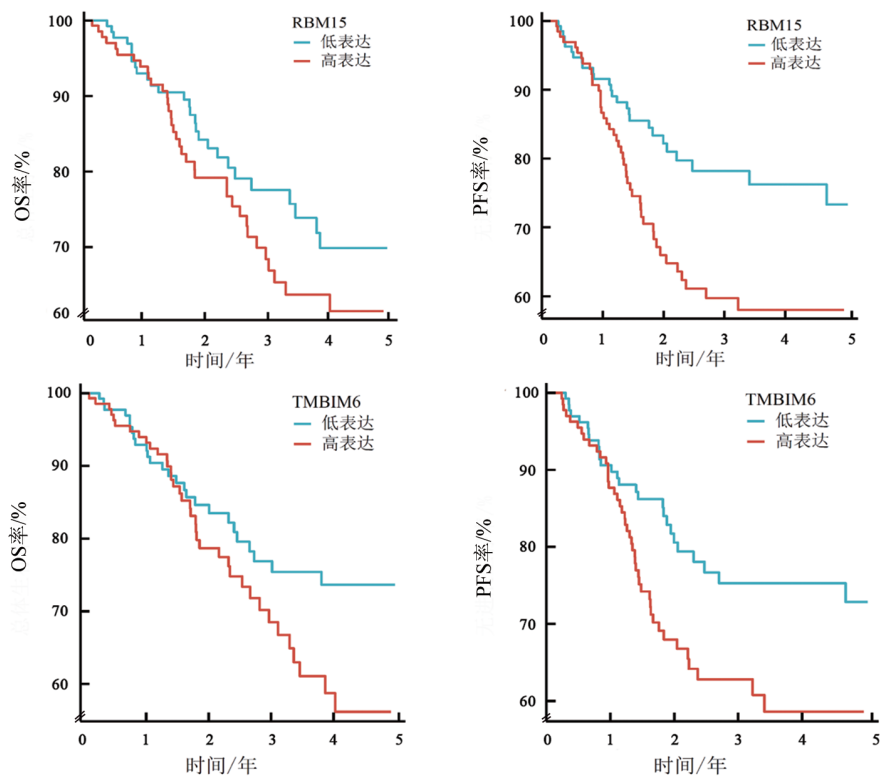
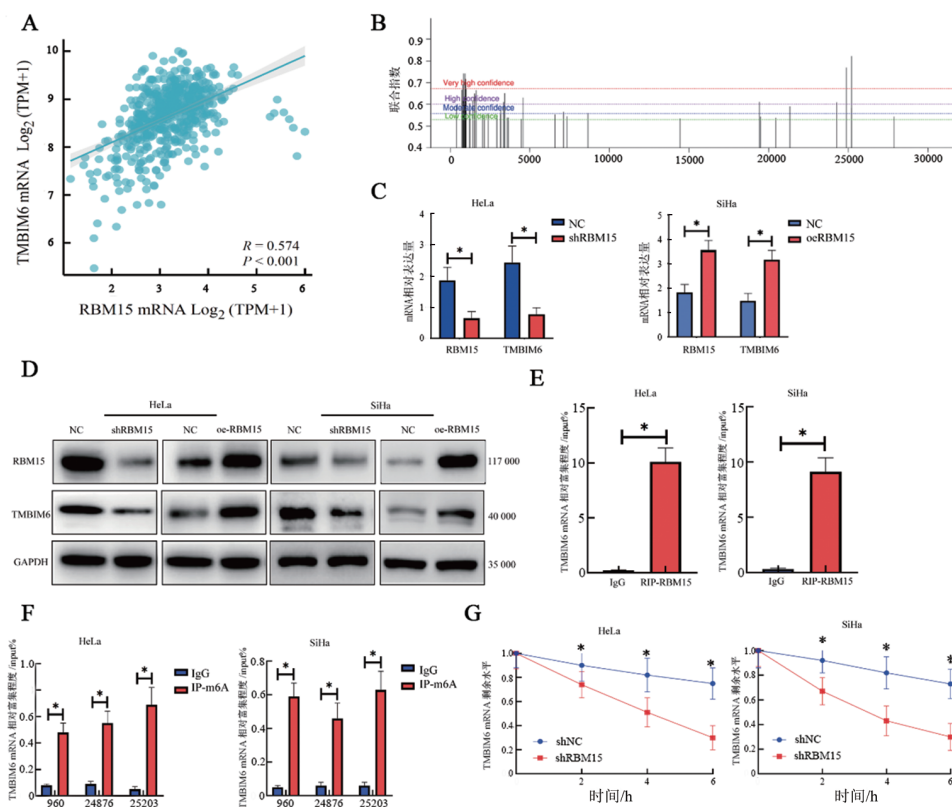


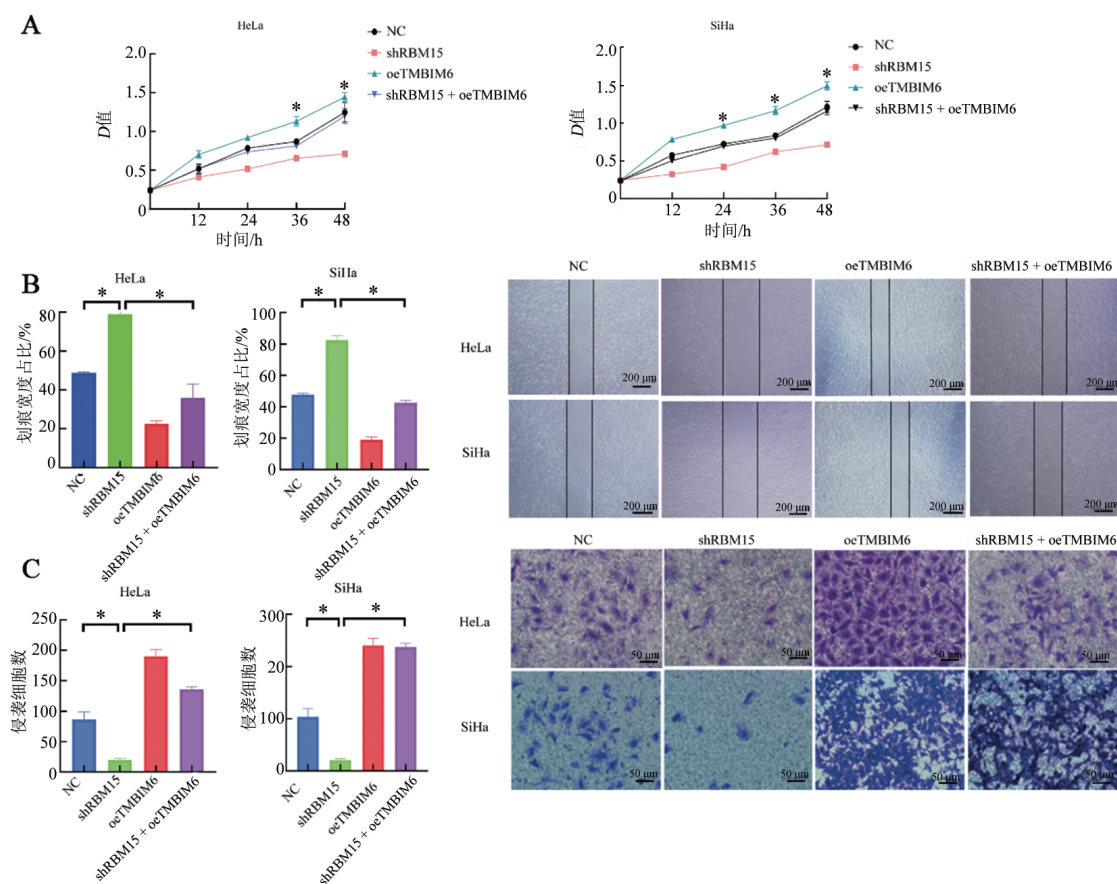
图2 RBM15、TMBIM6 mRNA表达与宫颈癌患者OS和PFS的关系



* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。

A:TCGA数据库中宫颈癌组织RBM15 mRNA与TMBIM6 mRNA的相关性;B:SRAMP在线工具预测TMBIM6 mRNA可能的m⁶A修饰位点及可信度;C:qPCR实验分析敲低或过表达RBM15对TMBIM6 mRNA表达的影响;D:Western blotting实验检测敲低或过表达RBM15对TMBIM6蛋白表达的影响;E:RIP-qPCR实验分析TMBIM6 mRNA的富集倍数;F:MeRIP-qPCR实验检测TMBIM6 mRNA片段的m⁶A富集倍数;G:RNA衰变实验检测TMBIM6 mRNA半衰期。

图3 RBM15增强TMBIM6 mRNA的m⁶A富集并提高其表达及稳定性

* $P < 0.05$.

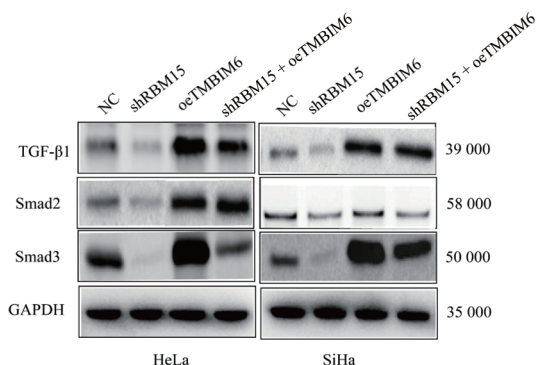
A: CCK-8法检测各组HeLa、SiHa细胞的增殖能力; B: 细胞划痕实验检测各组HeLa、SiHa细胞的迁移能力;

C: Transwell侵袭实验检测各组HeLa、SiHa细胞的侵袭能力。

图4 RBM15敲低及TMBIM6过表达对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

2.5 RBM15敲低降低宫颈癌细胞TGF- β /Smad通路相关蛋白表达, TMBIM6过表达逆转该效应

Western blotting结果显示, 在HeLa、SiHa细胞中过表达TMBIM6后, TGF- β 1、Smad2、Smad3蛋白条带信号增强; 敲低RBM15后, 上述蛋白条带信号减弱; 过表达TMBIM6可逆转RBM15敲低所致的变化(图5)。

图5 RBM15敲低降低宫颈癌细胞TGF- β /Smad通路相关蛋白表达, TMBIM6过表达逆转该效应

3 讨论

宫颈癌是全球女性第四大常见恶性肿瘤。尽管近年来诊疗技术取得显著进展, 但复发或转移性宫颈癌的治疗仍面临诸多挑战^[8]。目前, 宫颈癌的治疗包括手术、放疗、化疗、靶向治疗及免疫治疗等^[9]。宫颈癌的发生发展与多种信号通路异常激活密切相关, 其中TGF- β /Smad信号通路在肿瘤进展中发挥重要作用, 参与肿瘤细胞增殖、转移和免疫逃逸等过程^[10]。因此, 有必要进一步阐明宫颈癌发病机制并寻找新的治疗靶点。

RBM15属于RNA结合蛋白家族, 包含N端RNA识别基序和C端SPOC结构域。RBM15作为m⁶A修饰相关蛋白, 可调控靶mRNA的稳定性、剪接和翻译, 参与胚胎发育与造血过程^[4]。研究^[11]表明, RBM15能够结合并促进丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶1 mRNA的m⁶A修饰, 增强其稳定性, 导致丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 过度激活, 促进细胞恶性转化。TCGA数据库分析显示, 宫颈癌中RBM15 mRNA表达上调; 蛋

白水平检测亦证实RBM15表达升高。既往研究^[12]显示, E1 泛素激活酶 UBA1 (ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1, UBA1)表达下调可增加RBM15蛋白稳定性; RBM15通过m⁶A修饰TPM1 mRNA, 抑制mRNA降解, 增强肿瘤细胞干性并促进肿瘤增殖和转移。本研究发现, FIGO分期I B2~II B期宫颈癌组织中RBM15蛋白阳性率升高, 提示RBM15阳性表达可能与宫颈癌进展及不良预后相关。体外细胞实验显示, 敲低RBM15可抑制宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭。既往研究报道, RBM15通过m⁶A修饰上调circFGFR3表达并激活Janus激酶/信号转导和转录激活因子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)通路, 促进卵巢癌细胞免疫逃逸^[13]; RBM15还可促进Zeste同源物增强子2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2)mRNA的m⁶A修饰, 上调纤维连接蛋白(fibronectin)表达, 诱导宫颈癌细胞发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 增强细胞侵袭和转移能力^[14]。

本研究结果显示, 敲低HeLa、SiHa细胞中的RBM15表达可降低TGF- β 1、Smad2、Smad3蛋白表达; 过表达TMBIM6可逆转该影响。已有研究^[15]表明, RBM15敲低可通过TGF- β /Smad2通路促进铁死亡并抑制肺癌细胞生长。因此, 上述结果提示RBM15可能通过激活宫颈癌细胞TGF- β /Smad信号通路, 促进细胞增殖、迁移及侵袭。RBM15高表达患者的预后较差, 提示RBM15表达可能有助于评估宫颈癌患者预后。另有研究^[16-17]发现, RBM15可促进多药耐药基因1(ATP-binding cassette subfamily B member 1, ABCB1)mRNA的m⁶A修饰, 增强肿瘤细胞对紫杉醇等药物的耐药性; 靶向RBM15可能为克服化疗耐药提供新的策略。

RBM15通过N端RNA识别基序(RNA recognition motif, RRM)结构域识别并结合RNA, 其C端Spen旁系同源物C端结构域(Spen paralog and ortholog C-terminal domain, SPOC)可招募m⁶A甲基化复合物, 动态调控靶mRNA命运, 并在肿瘤代谢调节和肿瘤细胞增殖中发挥重要作用^[18]。近期宫颈癌研究^[19]进一步显示, RBM15敲低可通过调控decorin(DCN)mRNA的m⁶A修饰抑制宫颈癌细胞恶性表型及移植瘤生长。2025年发表的综述进一步总结了m⁶A修饰在宫颈癌发生发展、预后评估及潜在靶向治疗中的作用^[20]。SRAMP预测结果显示, TMBIM6 mRNA序列存在多个高可信度m⁶A修饰位点; 进一步采用RIP和MeRIP-qPCR分别验证结合关系和m⁶A富集位点。结果显示, TMBIM6 mRNA的960、24876、25203位点存在m⁶A富集, RBM15可能与

TMBIM6 mRNA结合并提高其稳定性, 从而上调TMBIM6表达。挽救实验显示, 敲低RBM15可抑制宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭, 过表达TMBIM6可逆转上述影响。因此, RBM15可能通过m⁶A修饰提高TMBIM6 mRNA稳定性, 进而激活TGF- β /Smad信号通路并促进宫颈癌细胞恶性表型。此外, TMBIM6可能是RBM15的关键下游蛋白, 除参与细胞在缺氧、营养匮乏等应激状态下的防御反应外, 还可能作为TGF- β /Smad通路的上游调节因子。联合抑制RBM15和TMBIM6可能产生协同抑制肿瘤进展的作用, 更有效地阻断TMBIM6下游TGF- β /Smad通路驱动的恶性表型。

综上, 本研究发现宫颈癌组织中RBM15表达上调与FIGO分期相关, 可能成为评估宫颈癌预后的新标志物。RBM15可能通过m⁶A修饰提高TMBIM6 mRNA稳定性, 激活TGF- β /Smad信号通路, 从而增强宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭能力; 靶向抑制RBM15可能有助于抑制宫颈癌进展。但本研究仍存在一定局限。首先, 临床样本来源于单中心且样本量仅82例, 可能存在选择偏倚, 未来需开展多中心、大样本研究进行验证。其次, RBM15对TMBIM6的调控是否依赖其他m⁶A调控因子(如METTL14、IGF2BP1)尚不明确, 可通过动物实验进一步验证。再次, 本研究阐明了RBM15转录后调控TMBIM6并促进宫颈癌进展的可能机制, 但其临床转化仍面临靶向性、毒性和肿瘤异质性等挑战, 未来需结合单细胞测序、类器官模型等技术和跨学科研究, 推动该调控轴精准干预策略的发展。

[参考文献]

- [1] Kobayashi O, Kamata S, Okuma Y, et al. Carcinogenesis and epidemiology of cervical cancer: the hallmark of human papillomavirus-associated cancer[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2024, 50(Suppl 1): 25-30. DOI:10.1111/jog.15997.
- [2] Jha A K, Mithun S, Sherkhane U B, et al. Systematic review and meta-analysis of prediction models used in cervical cancer[J]. Artif Intell Med, 2023, 139: 102549. DOI:10.1016/j.artmed.2023.102549.
- [3] Yang S Y, Sun Y J, Jiang D B, et al. MiR-362 suppresses cervical cancer progression via directly targeting BAP31 and activating TGF β /Smad pathway[J]. Cancer Med, 2021, 10(1): 305-316. DOI: 10.1002/cam4.3601.
- [4] Jiang X L, Liu B Y, Nie Z, et al. The role of m⁶A modification in the biological functions and diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 74. DOI:10.1038/s41392-020-00450-x.
- [5] Shi S, Wang C, Cai Q D, et al. RBM15 drives the progression of lung adenocarcinoma by regulating N⁶-methyladenosine-mediated LDHA mRNA stability[J]. Life Sci, 2024, 358: 123146. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.123146.

- [6] Robinson K S, Sennhenn P, Yuan D S, et al. TMBIM6/BI-1 is an intracellular environmental regulator that induces paraptosis in cancer *via* ROS and calcium-activated ERAD II pathways[J]. *Oncogene*, 2025, 44: 494-512. DOI:10.1038/s41388-024-03222-x.
- [7] Wang X, Tian L, Li Y, et al. RBM15 facilitates laryngeal squamous cell carcinoma progression by regulating TMBIM6 stability through IGF2BP3 dependent[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40: 80. DOI: 10.1186/s13046-021-01871-4.
- [8] Caruso G, Wagar M K, Hsu H C, et al. Cervical cancer: a new era[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2024, 34(12): 1946-1970. DOI: 10.1136/ijgc-2024-005579.
- [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]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1135657. DOI:10.3389/fimmu.2023.1135657.
- [10] Yu G, Chen L Z, Hu Y H, et al. Antitumor effects of baicalein and its mechanism *via* TGF β pathway in cervical cancer HeLa cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5527190. DOI: 10.1155/2021/5527190.
- [11] Jiang A M, Zhang S W, Wang X Y, et al. RBM15 condensates modulate m⁶A modification of STYK1 to promote tumorigenesis[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 4825-4836. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.08.068.
- [12] Wang H, Liu J, Zhu X J, et al. AZGP1P2/UBA1/RBM15 cascade mediates the fate determinations of prostate cancer stem cells and promotes therapeutic effect of docetaxel in castration-resistant prostate cancer *via* TPM1 m⁶A modification[J]. *Research (Wash D C)*, 2023, 6: 0252. DOI:10.34133/research.0252.
- [13] Zhang C J, Feng T T, Wang H, et al. Mechanism of RBM15 in regulating PD-L1-mediated immune escape in ovarian cancer through the JAK2/STAT3/STAT5 pathway[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2026, 74(1): 20260009. DOI:10.2478/aite-2026-0009.
- [14] Wang R X, Tan W H. RBM15-mediated N⁶-methyl adenosine (m⁶A) 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] Feng J, Li Y L, He F, et al. RBM15 silencing promotes ferroptosis by regulating the TGF- β /Smad2 pathway in lung cancer[J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(4): 950-961. DOI:10.1002/tox.23741.
- [16] Yuan J, Guan W C, Li X, et al. RBM15-mediating MDR1 mRNA m⁶A methylation regulated by the TGF- β signaling pathway in paclitaxel-resistant ovarian cancer[J]. *Int J Oncol*, 2023, 63(4): 112. DOI:10.3892/ijo.2023.5560.
- [17] Hu J, Wang S Z, Li X T. A comprehensive review of m⁶A research in cervical cancer[J]. *Epigenomics*, 2024, 16(10): 753-773. DOI: 10.2217/epi-2024-0002.
- [18] Park S H, Ju J S, Woo H, et al. The m⁶A 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.
- [19] Wang H, Li C, Wei Q, et al. RBM15 knockdown impairs the malignancy of cervical cancer by mediating m⁶A modification of decorin[J]. *Biochem Genet*, 2025, 63(1): 225-238. DOI: 10.1007/s10528-024-10757-x.
- [20] Liu X, Zhang L, Chen J, et al. Decoding intricate interactions between m⁶A modification with mRNAs and non-coding RNAs in cervical cancer: molecular mechanisms and clinical implications[J]. *Cell Signal*, 2025, 131: 111745. DOI:10.1016/j.cellsig.2025.111745.

[收稿日期] 2026-02-11

[修回日期] 2026-08-10

[本文编辑] 黄静怡