

网络出版时间:2024-03-21 17:39:52 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.001

◇基础医学研究◇

转录因子 SOX3 对卵巢颗粒细胞增殖和雌二醇分泌的影响

蔡睿,张浩,刘壮,陈远华,谢芬芬,洪强

摘要 目的 研究性别决定区 Y 框蛋白 3 (SOX3) 对人卵巢颗粒细胞 (KGN) 增殖和雌二醇分泌的影响。方法 在 NCBI 数据库 Gene-Bank 中搜索人 SOX3 (NM_005634.3) 的基因序列,用 PCR 方法扩增目的基因 SOX3,将其克隆到慢病毒载体 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro 上,获得过表达慢病毒重组质粒 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3;将测序正确的过表达慢病毒重组质粒以及包装质粒 (pGag/Pol、pRev、pVSV-G) 共同转染到人胚肾细胞系 (HEK 293T) 细胞中 (pLV-SOX3 组),将 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro 及包装质粒 (pGag/Pol、pRev、pVSV-G) 共同转染到 HEK 293T 细胞中 (pLV-NC 组),转染 48 h 后收集两组慢病毒颗粒并测定病毒的滴度,将两组慢病毒感染 KGN 细胞,经嘌呤霉素筛选 2 周后,获得稳定表达的细胞系;采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blot 法检测两组中 SOX3 的 mRNA 和蛋白水平;CCK-8 法检测两组细胞增殖能力;ELISA 测定两组雌二醇的浓度。结果 PCR 产物的鉴定和测序结果表明 SOX3 基因片段扩增成功,酶切和测序结果表明过表达慢病毒重组质粒构建完成;慢病毒感染 HEK 293T 细胞后可检测到绿色荧光,表明慢病毒包装成功;慢病毒感染 KGN 细胞后经嘌呤霉素筛选,荧光显微镜下观察细胞表达绿色荧光;RT-qPCR 和 Western blot 检测结果均表明 pLV-SOX3 组中 SOX3 表达水平高于 pLV-NC 组 ($P < 0.05$)。CCK-8 检测结果表明,pLV-SOX3 组较 pLV-NC 组细胞增殖能力明显增强 ($P < 0.01$)。ELISA 结果显示,pLV-SOX3 组雌二醇浓度较 pLV-NC 组升高 ($P < 0.05$)。结论 过表达转录因子 SOX3 能够促进 KGN 的增殖和雌二醇分泌。

关键词 SOX3;卵巢颗粒细胞;慢病毒载体;增殖;雌二醇;绿色荧光蛋白

中图分类号 R 711.7

2024-01-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82201804);安徽省自然科学基金(编号:2208085QH235);安徽高校科学研究项目(编号:KJ2021A0217);安徽医科大学校科研基金(编号:2021xkj007);安徽医科大学“早期接触科研”训练计划项目(编号:2021-ZQKY-149,2022-ZQKY-219)

作者单位:安徽医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,合肥 230032

作者简介:蔡睿,男,硕士研究生;
洪强,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:
hongqiang@ahmu.edu.cn

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)03-0371-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.001

卵泡作为脊椎动物卵巢的结构和功能单位,主要由卵母细胞、颗粒细胞和卵泡膜细胞组成^[1]。卵母细胞可通过分泌一些旁分泌因子来调节颗粒细胞的发育,而颗粒细胞分泌类固醇激素并产生促进卵母细胞发育的生长激素,为卵母细胞的生长发育提供能量和物质需求^[2]。因此,颗粒细胞的功能正常对卵泡正常发育和卵子发生至关重要。研究^[3]表明颗粒细胞的增殖和凋亡失衡以及雌激素合成紊乱是导致卵泡闭锁和卵巢早衰的主要原因。

性别决定区 Y 框蛋白 3 (sex determining region Y-box3, SOX3) 作为性别决定区 Y 框蛋白 B1 (sex determining region Y-box B1, SOXB1) 亚家族一员,参与调控骨肉瘤、卵巢癌细胞的增殖活化,促进肿瘤发生^[4-6]。前期研究^[7]发现,斑马鱼中 SOX3 的缺失下调性腺型芳香化酶 (*Cyp19a1a*) 基因,导致卵巢中雌二醇合成能力下降,卵泡发育阻滞,生殖能力下降。该研究通过构建 SOX3 过表达慢病毒载体,感染并筛选获得 SOX3 稳定过表达的人卵巢颗粒细胞 (human ovarian granulosa cells, KGN) 细胞系,探讨 SOX3 对 KGN 的增殖活化和雌激素分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒 人胚肾细胞系 (HEK 293T) 为本实验室保藏;人卵巢颗粒细胞 (KGN) 细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司;慢病毒荧光标签载体 (pLV-EF1a-GFP-2A-Puro) 以及包装质粒 (pGag/Pol、pRev、pVSV-G) 购于上海吉玛制药技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 转染试剂 RNAi-Mate (上海吉玛制药技术有限公司,货号:G04001);嘌呤霉素 (上海碧云天生物技术有限公司,货号:ST551);NotI、BamHI 限制性内切酶 (上海玉博生物科技有限公司,货号:Fermentas FD0594、Fermentas FD0054);DNA 聚合酶 (上海生工生物股份有限公司,货号:B600001-

0001); ClonExpress[®] Entry One Step Cloning Kit(南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 货号: C112-01); 质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司, 货号: DP103-02、DP204-02); RNA 提取试剂盒(山东思科捷生物技术有限公司, 货号: AC0205-A); 反转录试剂盒(湖南艾科瑞生物技术有限公司, 货号: AG11711); TB Green[®] Fast qPCR Mix(大连宝生物工程技术有限公司, 货号: RR430S); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(上海碧云天生物技术有限公司, 货号: P0012、P0013B、P0015、A0208); DMEM/F12 培养基、胰酶、胎牛血清(美国 Gibco 公司, 货号: 12634028、15090046、12484028); SOX3 抗体(成都正能生物技术有限责任公司, 货号: 862515); GAPDH 抗体(武汉爱博泰克生物技术有限公司, 货号: AC001); 山羊抗兔 IgG 二抗(武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: SA000001-2); ECL 化学发光剂(美国 ThermoFisher, 货号: 34580); CCK-8 试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司, 货号: BS350A); ELISA 雌二醇检测试剂盒(武汉酶免生物技术有限公司, 货号: MM-12505H1); PCR 引物合成和目的基因测序(北京擎科生物科技股份有限公司), 大肠埃希菌 DH5a(德国 merck 公司, 货号: CMC0007)。

1.1.3 主要仪器 PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司, 型号: 4484075); 荧光显微镜(日本尼康公司, 型号: EVOS M7000); 实时荧光定量 PCR 仪(美国 SYGENE 公司, 型号: CFX Connect); 化学发光检测仪(上海天能公司, 型号: Tanon 2500); 酶标仪(美国 BioTek Epoch 公司, 型号: AMG-2201-020)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增获得 SOX3 基因 在 NCBI 数据库 Gene-Bank 中搜索人 SOX3(NM_005634.3) 基因的序列, 根据数据库中搜索到的人 SOX3 基因序列来设计并合成 PCR 引物(表 1), 依据克隆需要, 在正向引物和反向引物中分别加上慢病毒载体 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro 的 Not I 和 Bam HI 限制酶两侧同源序列(表 1 下划线部分)。以 KGN 细胞的 cDNA 为模板, 按照试剂操作说明进行 PCR 扩增, 反应

体系为 50 μ l, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 反应完成后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收 SOX3 基因。

1.2.2 SOX3 过表达慢病毒载体的构建 取 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro 慢病毒载体 2 μ g, 用 Not I 和 Bam HI 限制酶对其进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 当酶切产物电泳到适当的位置, 用刀片将目的条带区域切下, DNA 凝胶回收试剂盒回收线性化载体。按照 ClonExpress[®] Entry One Step Cloning Kit 的操作说明, 将回收的 SOX3 片段同源重组克隆到线性化的载体中, 将重组产物转化到大肠埃希菌 DH5a 涂抹在氨苄青霉素抗性的平板上, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养过夜, 从平板上挑取单个菌落置于 10 ml 的溶菌肉汤液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养过夜, 随后进行质粒提取, 用 Not I 和 Bam HI 进行双酶切鉴定, 将双酶切正确的质粒进行测序。挑选测序完全正确的质粒用于后续实验。

1.2.3 慢病毒转染和滴度测定 慢病毒转染: 选取长势良好的 HEK 293T 细胞接种到 10 cm 的培养皿中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养至细胞密度达到 70% ~ 80% 时进行转染。设置 pLV-NC 组(转染 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro、pGag/Pol、pRev、pVSV-G) 和 pLV-SOX3 组(转染 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3、pGag/Pol、pRev、pVSV-G), 按照 RNAi-Mate 转染试剂的说明, 转染到 HEK 293T 细胞, 转染 6 h 后更换为新的完全培养基, 继续培养 48 h 后收集含有慢病毒颗粒的细胞上清液, 1 200 r/min 离心 30 min 过滤收集慢病毒浓缩液, 分装后冻于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。滴度测定: 将收集到的慢病毒原液, 按 10¹、10²、10³、10⁴ 进行梯度稀释后接种到 KGN 细胞中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 通过荧光显微镜计数绿色荧光细胞的数量, 结合稀释倍数计算病毒的滴度。

1.2.4 筛选和建立稳定过表达 SOX3 的 KGN 细胞系 KGN 细胞按照 1.0 \times 10⁵ 细胞/孔接种于 24 孔板, 待细胞密度达到 70% ~ 80% 时, 根据感染复数分别加入 pLV-NC 组和 pLV-SOX3 组的慢病毒和嘌呤霉素(5 μ g/ml), 培养 12 h 后更换为新的完全培养

表 1 SOX3 基因 PCR 扩增引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
SOX3	F: <u>AGGGTTCCAAGCTTAAGCGGCCGCCACCATGCGACCTGTTTCGAGAGAACTCATCAG</u> R: <u>ATCAGTAGAGAGTGTCCGATCCTCAGATGTGGTTCAGCGGCCCGTTCCGTT</u>

基,继续培养 48 ~ 72 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光的表达情况。由于慢病毒载体带有嘌呤霉素抗性基因,故将培养基更换为含有嘌呤霉素(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的培养基进行筛选,筛选 2 周后,带有绿色荧光的细胞即为稳定转染的细胞,将含有嘌呤霉素的培养基更换为新的不含嘌呤霉素的培养基,扩大培养直至获得稳定转染的细胞系。

1.2.5 RT-qPCR 检测细胞中 SOX3 mRNA 的表达

收集 pLV-NC 组和 pLV-SOX3 组的细胞置于冰上,用 RNA 提取试剂盒提取细胞的总 RNA,反转录为 cDNA,以该 cDNA 为模板,进行 RT-qPCR 扩增,检测各组细胞中 SOX3 mRNA 的表达情况,以 $\beta\text{-actin}$ 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 SOX3 mRNA 表达水平,引物序列见表 2。

表 2 RT-qPCR 引物序列表

引物名称	引物序列(5'-3')
SOX3	F:GGGAGGCGCAGGCAAGAGTA R:GTCGGTCAGCAGTTCCAGTCG
$\beta\text{-actin}$	F:GGAATCGTGCCTGACATT R:GAAGGAAGGCTGGAAGACTG

1.2.6 Western blot 法检测细胞中 SOX3 蛋白表达水平

收集 pLV-NC 组和 pLV-SOX3 组的细胞,PBS 缓冲液洗涤 2 次,冰上用 RIPA 裂解液裂解 60 min,期间每隔 10 min 颠倒混匀 1 次,离心收集上清液,加入 $5 \times$ Loading buffer 后于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。随后进行 12% SDS-PAGE 电泳,半干法转移至 PVDF 膜上。采用封闭液(5% 脱脂奶粉)室温封闭 2 h 后,分别加入 SOX3 一抗(1 : 5 000)和 GAPDH 一抗(1 : 7 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 10 000),室温摇床孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,将 ECL 化学发光试剂盒中的显影液覆盖至 PVDF 膜上,凝胶成像系统显影成像。用 ImageJ 软件对图像进行灰度扫描,进行统计学分析。

1.2.7 CCK-8 法检测细胞增殖能力 胰酶消化并收集 pLV-NC 组和 pLV-SOX3 组的细胞,进行计数。按照每孔体积 100 μl ,细胞密度为 3 000 细胞/孔接种到 96 孔板中,后置于细胞培养箱中培养,每组细胞设置 6 个复孔。在细胞接种后的 24、48、72、96 h,向每孔滴加 10 μl 的 CCK-8 试剂,继续置于细胞培养箱中孵育 1 h,随后用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值,记录并统计分析。

1.2.8 ELISA 测定雌二醇浓度

胰酶消化并收集 pLV-NC 组和 pLV-SOX3 组的细胞,进行计数。按照每孔 1 ml 体积,细胞密度为 1×10^5 细胞/孔接种到 12 孔板中,后置于细胞培养箱中培养,每组细胞设置 6 个复孔。细胞贴壁后,将培养基更换为含有雄烯二酮(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的培养基,继续置于细胞培养箱中培养 24 h,随后收集上清液按照说明书进行雌二醇浓度的测定,同时将对应的两组细胞提取蛋白,按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行测定,用测定的细胞蛋白浓度将雌二醇浓度均一化,记录并统计分析。

1.3 统计学处理 所有的实验数据采用平均数 \pm 标准差表示。多组间的比较采用方差分析,两组间的比较采用 t 检验。采用线性回归分析绘制标准曲线。所有的图表均用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SOX3 的扩增及重组慢病毒表达载体的构建和鉴定

SOX3 基因的编码序列全长为 1 341 bp,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示有明显的目的条带,且大小与预期结果一致(图 1A),表明 SOX3 基因扩增成功。将 SOX3 基因克隆至 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro 载体上,获得了慢病毒表达载体 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3(图 1B)。随后用 NotI 和 BamHI 双酶切鉴定 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3 慢病毒载体,结果显示,酶切条带与预期一致(图 1C),基因测序结果显示上述慢病毒载体中 SOX3 的序列与 NCBI 数据库中 SOX3 序列一致(图 1D)。以上结果表明 SOX3 过表达慢病毒载体 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3 构建成功。

2.2 慢病毒转染和稳转细胞系建立的情况 将已成功构建的慢病毒表达质粒和包装质粒(pGag/Pol、pRev、pVSV-G)(图 2A)共同转染到 HEK 293T 细胞,荧光显微镜下观察转染的 HEK 293T 细胞,结果显示 HEK 293T 细胞 GFP 高表达,即慢病毒成功包装(图 2B)。病毒滴度测定结果表明 pLV-SOX3 实验组病毒滴度为 1×10^8 TU/ml,pLV-NC 对照组病毒滴度为 7×10^8 TU/ml。随后用慢病毒感染 KGN 细胞,获得稳定表达的细胞系(图 2C)。

2.3 RT-qPCR 和 Western blot 检测的 SOX3 mRNA 和蛋白表达水平

RT-qPCR 检测结果表明 pLV-SOX3 组的 SOX3 mRNA 水平较 pLV-NC 组上调($t = 3.10, P < 0.05$)(图 3A)。Western blot 检测结果与 pLV-NC 组(0.40 ± 0.01)相比,pLV-

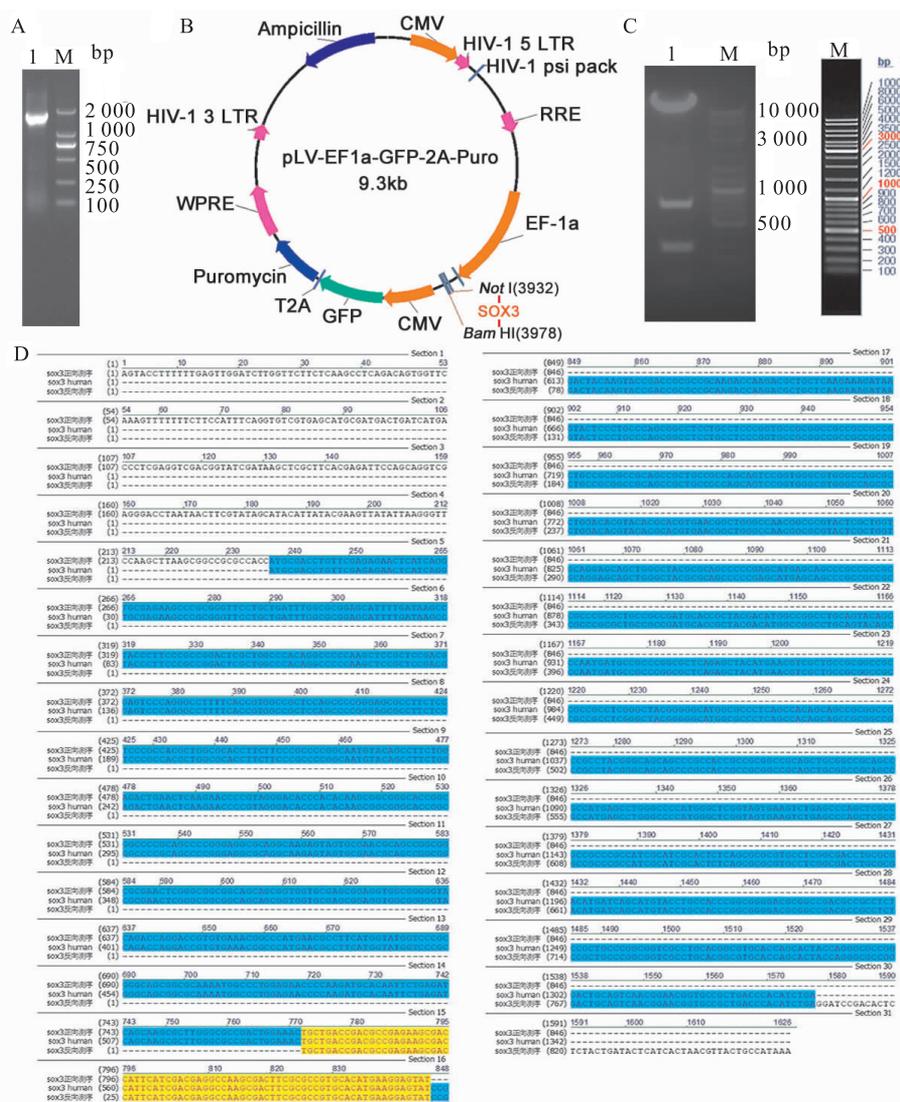


图1 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3 慢病毒载体的构建和鉴定

A: PCR 扩增 *SOX3* 基因的凝胶电泳图; B: pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3 慢病毒载体图谱; C: 慢病毒表达载体 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3 双酶切鉴定图; D: pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3 慢病毒载体测序比对结果

SOX3 组 *SOX3* 蛋白水平增加 ($t = 7.88, P < 0.05$) (图 3B、C)。以上结果表明 KGN 细胞经 pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3 慢病毒感染后, *SOX3* 的 mRNA 和蛋白水平升高。

2.4 过表达 *SOX3* 对 KGN 细胞增殖能力的影响

CCK-8 法检测结果显示, 与 pLV-NC 组相比, pLV-*SOX3* 组在 72 h 和 96 h 时细胞的增殖能力明显上升 ($t = 8.82, 23.76$, 均 $P < 0.01$)。见图 4。

2.5 过表达 *SOX3* 基因对 KGN 细胞雌二醇分泌的影响

ELISA 检测结果显示, 与 pLV-NC 组相比, pLV-*SOX3* 组细胞培养液中雌二醇浓度升高 ($t = 3.33, P < 0.05$) (图 5), 表明过表达 *SOX3* 促进了 KGN 细胞雌二醇的分泌。

3 讨论

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 作为一种内分泌代谢紊乱性疾病, 主要表现为卵巢功能衰竭, 以雌激素缺乏和卵泡闭锁为主要特征。POF 不但可以导致不孕症, 同时还可能增加患骨质疏松症、冠状动脉粥样硬化性心脏病和神经退行性疾病等慢性疾病发生的风险^[8], 给妇女造成心理创伤。研究^[9]表明卵泡发育与颗粒细胞的增殖和类固醇激素生成密切相关, 颗粒细胞能够分泌雌二醇、黄体酮和胰岛素样生长因子, 促进卵母细胞生长, 为卵母细胞的发育提供能量和营养物质, 从而维持雌性动物的生殖功能; 颗粒细胞功能紊乱会导致卵泡发育异常和卵泡闭

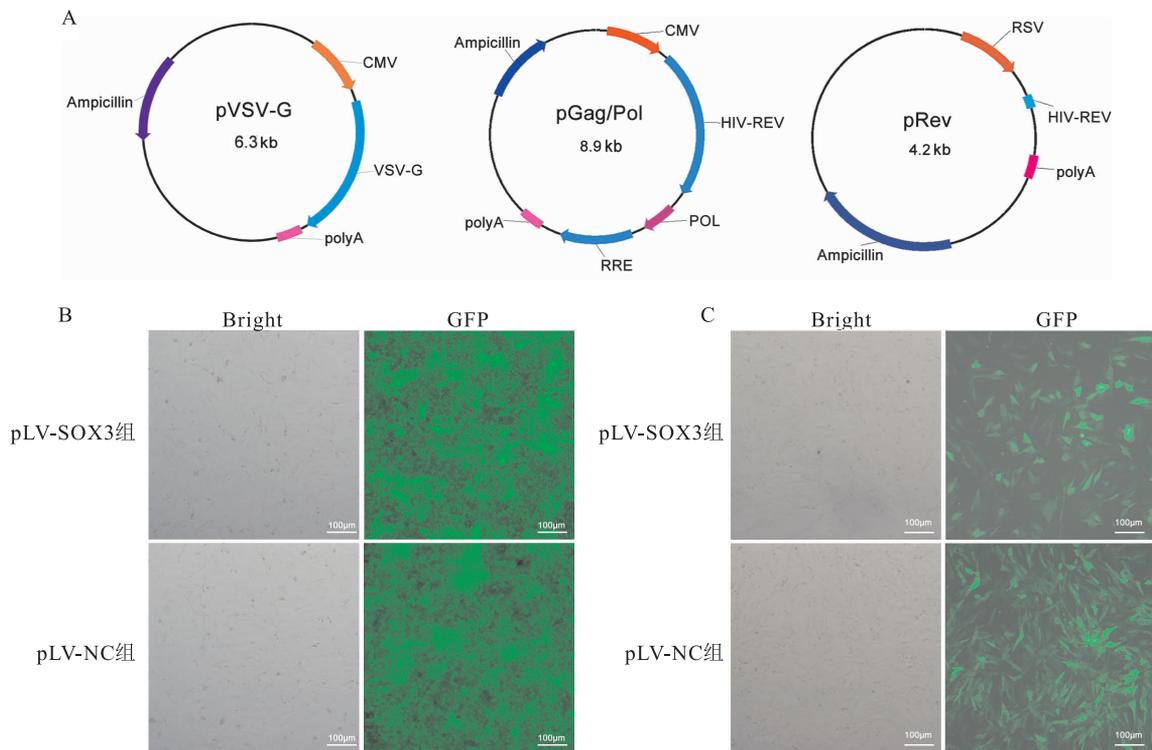


图2 慢病毒转染和SOX3稳定过表达KGN细胞系的建立

A: 3个包装质粒载体图谱; B: 慢病毒感染HEK 293T细胞后的显微成像; C: SOX3稳定过表达KGN细胞系显微成像

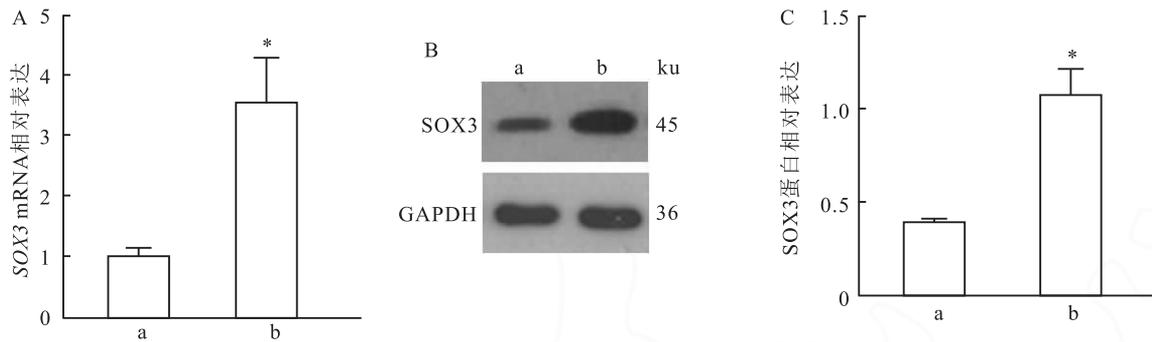


图3 SOX3 mRNA和蛋白表达水平的比较

A: RT-qPCR检测SOX3 mRNA表达水平; B: Western blot检测SOX3蛋白表达水平; C: 两组SOX3蛋白表达的比较; a: pLV-NC组; b: pLV-SOX3组; 与pLV-NC组比较: * $P < 0.05$

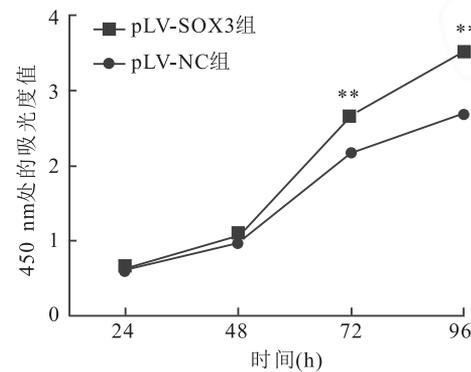


图4 CCK-8检测SOX3过表达后不同时间KGN细胞的增殖能力
与pLV-NC组比较: ** $P < 0.01$

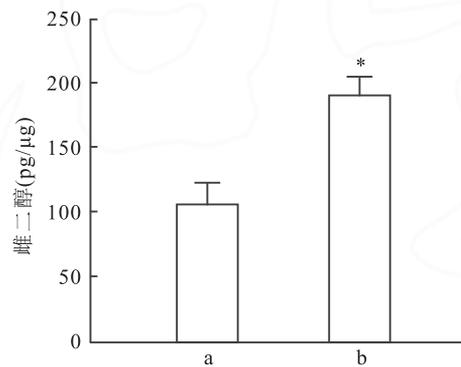


图5 ELISA检测的各组KGN细胞雌二醇浓度的比较
a: pLV-NC组; b: pLV-SOX3组; 与pLV-NC组比较: * $P < 0.05$

锁,进而促进卵巢早衰的发生。

SOX3 基因家族的 HMG 盒是由 79 个氨基酸组成的 DNA 结合结构域,目前已经鉴定出 30 多个成员,主要参与维持个体内环境稳定、器官发生等过程^[10]。研究^[11-13]表明 SOX3 基因调控区发生基因组重排或染色体插入易位将导致人类 XX 男性性逆转。SOX3 在小鼠的性腺体细胞中表达,SOX3 缺失会导致雌性小鼠卵泡发生闭锁、畸形的卵母细胞增多以及生殖力下降^[14]。在罗非鱼中 SOX3 的缺失会导致卵子发生和卵母细胞生长过程被抑制^[15]。因此,SOX3 对卵泡发育有着重要作用。本研究构建 SOX3 过表达慢病毒载体,通过转染筛选后建立稳定过表达 SOX3 的人 KGN 细胞系,并从 mRNA 和蛋白水平证明其可稳定过表达 SOX3。CCK-8 检测结果表明过表达 SOX3 促进了人 KGN 的增殖能力,ELISA 检测结果显示过表达 SOX3 促进了卵巢颗粒细胞雌二醇的分泌能力。以上的结果均表明 SOX3 对卵巢颗粒细胞的增殖活化和雌二醇分泌有着重要的促进作用。

综上所述,SOX3 作为一个重要的转录调控因子,参与维持卵巢颗粒细胞的功能,在卵泡发育和卵巢早衰过程中具有关键的调节作用。靶向过表达 SOX3 可能是治疗卵巢早衰的有效途径。本研究为 POF 的临床治疗提供了新的方向,为后续继续对于 SOX3 在卵泡闭锁和卵巢早衰中作用机制的研究奠定了基础,但其中具体的调控机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Jones A S K, Shikanov A. Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid[J]. *J Biol Eng*, 2019, 13:2.
- [2] Hu J, Jin J, Qu Y, et al. ERO1 α inhibits cell apoptosis and regulates steroidogenesis in mouse granulosa cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 511:110842.
- [3] Gallegos E, Ascona M, Monroy J, et al. p-Chloroamphetamine decreases serotonin and induces apoptosis in granulosa cells and follicular atresia in prepubertal female rats[J]. *Reprod Toxicol*, 2022, 110:150-60.
- [4] Guo Y, Yin J, Tang M, et al. Downregulation of SOX3 leads to the inhibition of the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(4):1277-84.
- [5] Marjanovic Vicentic J, Drakulic D, Garcia I, et al. SOX3 can promote the malignant behavior of glioblastoma cells[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2019, 42(1):41-54.
- [6] Yan Q, Wang F, Miao Y, et al. Sex-determining region Y-box3 (SOX3) functions as an oncogene in promoting epithelial ovarian cancer by targeting Src kinase[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9):12263-71.
- [7] Hong Q, Li C, Ying R, et al. Loss-of-function of SOX3 causes follicle development retardation and reduces fecundity in zebrafish[J]. *Protein Cell*, 2019, 10(5):347-64.
- [8] Yuan S, Wen J, Cheng J, et al. Age-associated up-regulation of EGR1 promotes granulosa cell apoptosis during follicle atresia in mice through the NF- κ B pathway[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(21):2895-905.
- [9] 杜悠雯,石海涛,韩帅龙,等. MS12 对 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖凋亡失衡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(3):464-70.
- [10] Yin C. Molecular mechanisms of Sox transcription factors during the development of liver, bile duct, and pancreas[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 63:68-78.
- [11] Haines B, Hughes J, Corbett M, et al. Interchromosomal insertion-translocation at Xq26.3 alters SOX3 expression in an individual with XX male sex reversal[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(5):E815-20.
- [12] Sutton E, Hughes J, White S, et al. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1):328-41.
- [13] Moalem S, Babul-Hirji R, Stavropoulos D J, et al. XX male sex reversal with genital abnormalities associated with a de novo SOX3 gene duplication[J]. *Am J Med Genet A*, 2012, 158A(7):1759-64.
- [14] Weiss J, Meeks J J, Hurley L, et al. Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(22):8084-91.
- [15] Li Y, Tang Y, Wang L, et al. Transcription factor Sox3 is required for oogenesis in the teleost fish Nile tilapia[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 222(Pt B):2639-47.

Effect of the transcription factor SOX3 on ovarian granulosa cell proliferation and estradiol secretion

Cai Rui, Zhang Hao, Liu Zhuang, Chen Yuanhua, Xie Fenfen, Hong Qiang

(Dept of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effect of sex-determining region Y-frame protein 3 (SOX3) on proliferation and (下转第 383 页)

mediated by the PI3K/AKT/mTOR signaling axis is the cause of KOA progression. **Methods** The synovial fluid of KOA KL-II and KL-III patients and normal individuals was collected, and the percentage of M1 macrophages (CD80, CD86) and M2 macrophages (CD163, CD206) in the synovial fluid (M1/M2 ratio) was measured to evaluate the polarization of macrophage cytokines such as IL-1, IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor (TNF)- α , transforming growth factor (TGF)- β Expression in KOA synovial fluid, and detect and analyze of key molecules PI3K/AKT/mTOR signaling axis PI3K, AKT3, mTORC1, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in KOA synovial fluid. **Results** Compared with the synovial fluid of normal individuals, the percentage of M1 macrophages (CD80, CD86) in KOA patients increased ($P < 0.01$), and the M1/M2 ratio increased ($P < 0.001$); The expression of IL-1, IL-6, and TNF- α in the synovial fluid of the KOA group was also higher than that of the control group ($P < 0.01$), while the expression of IL-10 and TGF- β in the KOA group was significantly reduced ($P < 0.01$); The key proteins PI3K, AKT3, mTORC1, and downstream inflammatory factor iNOS in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in the synovial fluid of the KOA group were higher than those in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** In KOA synovial fluid, M1 macrophage polarization plays a dominant role, and the inflammatory response mediated by M1 macrophage polarization may be the cause of synovitis. At the same time, the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway may mediate the polarization of M1 macrophages involved in KOA inflammatory response.

Key words knee osteoarthritis; macrophage polarization; M1/M2; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; synovial fluid; inflammation

(上接第 376 页)

estradiol secretion in human ovarian granulosa cells (KGN cell line). **Methods** The gene sequence of human SOX3 (NM_005634.3) was searched in Gene-Bank, an NCBI database, and the target gene SOX3 was amplified by PCR, which was cloned into lentiviral vector pLV-EF1a-GFP-2A-Puro to obtain the overexpression lentiviral recombinant plasmid pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3; the correctly sequenced overexpressed lentiviral recombinant plasmid as well as packaging plasmids (pGag/Pol, pRev, pVSV-G) were co-transfected into human embryonic kidney cell line (HEK 293T) cells (pLV-SOX3 group), and pLV-EF1a-GFP-2A-Puro and packaging plasmids (pGag/Pol, pRev, pVSV-G) were co-transfected into HEK 293T cells (pLV-NC group), the lentiviral particles of both groups were collected and the titers of the viruses were measured after 48 h of transfection, the lentiviruses of the two groups were infected into KGN cells, and the stably expressed cell lines were obtained after puromycin screening for 2 weeks; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the SOX3 mRNA and protein levels in the two groups; CCK-8 assay was used to detect the proliferative ability of the cells in the two groups; ELISA was used to determine the concentration of estradiol in the two groups. **Results**

The identification of PCR products and sequencing results showed that the SOX3 gene fragment was amplified successfully, and the enzyme digestion and sequencing results indicated that the construction of overexpression lentiviral recombinant plasmid was completed; green fluorescence could be detected after lentiviral infection of HEK 293T cells, which indicated that lentiviral packaging was successful; the lentivirus was screened by puromycin after lentiviral infection of KGN cells, and the cells were observed to express green fluorescence under the fluorescence microscope; RT-qPCR and Western blot assays both showed that the expression level of SOX3 in the pLV-SOX3 group was significantly higher than that in the pLV-NC group ($P < 0.05$). CCK-8 assay results showed that the proliferation ability of the cells in the pLV-SOX3 group significantly increased compared with that in the pLV-NC group ($P < 0.01$). ELISA results showed that estradiol concentration was elevated in the pLV-SOX3 group compared with the pLV-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of the transcription factor SOX3 can promote the proliferation and estradiol secretion of human ovarian granulosa cells KGN.

Key words SOX3; ovarian granulosa cell; lentiviral vector; proliferation; estradiol; green fluorescent protein