

转录因子 SOX4 对卵巢颗粒细胞增殖、迁移及凋亡的影响

范蒙蒙 李 丛 梁 雪 张婉秋 王会平 翟志敏

摘要 目的 通过构建稳定过表达 SOX4 的人卵巢颗粒细胞(KGN 细胞系)探究 SOX4 对卵巢颗粒细胞增殖、迁移及凋亡的影响。方法 利用同源重组法将 SOX4(人)基因序列构建到线性化 pLV-EF1a-GFP/Puro 载体中建立重组慢病毒质粒 pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4;将慢病毒表达载体感染人卵巢颗粒细胞(KGN 细胞系),以感染 pLV-EF1a-GFP/Puro-NC 的 KGN 细胞作为 LV-CON 组,感染 pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 的 KGN 细胞作为 LV-SOX4 组,转染后利用嘌呤霉素筛选出稳定表达 SOX4 的 KGN 细胞;RT-qPCR 和 Western blot 法检测 LV-CON 组和 LV-SOX4 组 KGN 细胞中 SOX4 mRNA 和蛋白表达水平;CCK-8 实验检测 LV-CON 组和 LV-SOX4 组细胞增殖能力;细胞划痕实验检测 LV-CON 组和 LV-SOX4 组细胞迁移能力;流式细胞凋亡检测 LV-CON 组和 LV-SOX4 组凋亡细胞比例。结果 pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 测序结果显示插入基因序列与 SOX4 的序列完全一致;LV-CON 组包装的慢病毒滴度为 7×10^8 TU/ml, LV-SOX4 组包装的慢病毒滴度为 1×10^8 TU/ml;荧光倒置显微镜下观察到重组质粒成功转染至 KGN 细胞,转染效率达 90% 以上;RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示:LV-SOX4 组 KGN 细胞中 SOX4 mRNA 和蛋白表达水平较 LV-CON 组均明显升高($t=3.10, P<0.05$; $t=14.20, P<0.05$);CCK-8 结果显示:LV-SOX4 组细胞增殖能力较 LV-CON 组增强(24 h: $t=45.92, P<0.01$; 72 h: $t=25.60, P<0.01$);细胞划痕实验结果提示:LV-SOX4 组 KGN 细胞迁移能力较 LV-CON 组增强($t=7.65, P<0.01$);流式细胞凋亡检测显示:LV-SOX4 组细胞凋亡比例较 LV-CON 组减少($t=25.84, P<0.01$)。结论 成功构建 SOX4 过表达的人卵巢颗粒细胞(KGN 细胞系),SOX4 过表达可促进卵巢颗粒细胞增殖、迁移且抑制细胞凋亡。

关键词 SOX4; 卵巢颗粒细胞; 增殖; 迁移; 凋亡
中图分类号 R 711.75

2023-05-10 接收

基金项目:安徽省博士后研究人员科研活动经费资助项目(编号:2022B592);安徽医科大学校级科研基金(编号:2021xkj038);安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金项目(编号:2022GQFY10);安徽省科技重大专项(编号:201903a07020030)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院血液内科,合肥 230601

作者简介:范蒙蒙,女,硕士研究生;

翟志敏,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: zzzm889@163.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1646-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.006

卵巢癌是女性生殖系统中最致命的肿瘤之一,其中高级别浆液性癌(high grade serous cancer, HG-SC)占有上皮性卵巢癌亚型的 70%~80%,是卵巢癌中最常见的类型之一且生存率最低^[1-2]。卵巢颗粒细胞去分化及重编程会导致间充质型 HGSC 的发展,揭示了含浆液性特征的间充质型 HGSC 新的潜在细胞来源^[1]。SOX4 属于 SOX 转录因子 C 组亚家族成员之一,在胚胎发育过程中广泛表达并起关键作用^[3-4],SOX4 蛋白由 1 个外显子基因编码,和 TCF/LEF 转录因子家族相关^[5],其编码基因定位于 6 号染色体,编码 1 个 47 ku 蛋白,包含 474 个氨基酸残基。转录因子 SOX4 在多种恶性肿瘤的发生发展中异常表达,并与不良预后密切相关,包括卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌等^[3,6]。该研究通过构建融合绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的 SOX4 慢病毒表达载体,转染获取稳定表达 SOX4 的卵巢颗粒细胞(KGN 细胞系),探究过表达 SOX4 对卵巢颗粒细胞增殖、迁移及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒 卵巢颗粒细胞(KGN 细胞)、人肾上皮细胞(HEK293T 细胞)由安徽医科大学第二附属医院血液病实验室提供。载体质粒 pLV-EF1a-GFP/Puro 及包装质粒(pGag/Pol, pRev, pVSV-G)购于上海吉玛制药技术有限公司,慢病毒载体质粒 pLV-EF1a-GFP/Puro 能表达 GFP。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM 高糖培养基、FBS、胰酶、PBS(美国 Cytiva 公司),RNA 提取试剂盒(合肥蝴蝶生物科技有限公司),反转录试剂盒(合肥麦客生物科技有限公司),BCA 蛋白定量试剂盒,CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),TB Green Fast qPCR Mix[生工生物工程(上海)股份有限公司],ECL 化学发光剂(美国 ThermoFisher 公司),Annexin V-APC/PI 双染细胞凋亡检测试

剂盒(上海贝博生物科技有限公司)。SOX4 和 GAPDH 的 PCR 引物(南京擎科生物科技有限公司), GAPDH Rabbit pAb、SOX4 Rabbit pAb(武汉爱博泰克生物科技有限公司), 山羊抗兔 IgG HRP(合肥麦客生物科技有限公司)。Light Cycler480 实时荧光定量 PCR [罗氏诊断产品(上海)有限公司], 倒置显微镜(日本 Olympus 公司), 凝胶成像仪(上海天能生命科学有限公司), 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 复苏液氮罐中冻存的 HEK293T 细胞和 KGN 细胞, PBS 缓冲后使用 DMEM 完全培养基(含 10% FBS) 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 当细胞状态及密度均良好时胰酶消化并进行传代, 及时冻存以备后续实验所需。

1.2.2 引物设计与合成 引物由 Oligo 软件设计, 在 SOX4 基因的上下游引物分别加上 pLV-EF1a-GFP/Puro 载体上 Not I: GCGGCCG 和 Bam HI: GGATCC 两侧同源序列, 用于载体的亚克隆。SOX4 基因上游引物序列: 5'-AGGGTTCCAAGCTTAAGCG-GCCGCGCCACCATGGTGCAGCAAACCAACAATG-3', 下游引物序列: 5'-ATCAGTAGAGAGTGTCTG-GATCCTCAGTAGGTGAAAACCAGGTTGGA-3', 引物由南京擎科生物科技有限公司合成。

1.2.3 pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 重组质粒的构建与鉴定 将目的基因的引物通过 PCR 扩增后得到 DNA 片段, PCR 反应体系(50.3 μl): DNA 模板 1 μl, 上游引物 1 μl, 下游引物 1 μl, 10 × Pfu Buffer(+Mg²⁺) 5 μl, dNTP 1 μl, PfuDNA polymerase 0.3 μl, 加入 DEPC 水至 50.3 μl。PCR 反应过程: 95 °C 变性 3 min; 30 个循环(94 °C、30 s, 55 °C、30 s, 72 °C、30 s); 72 °C 继续延伸 5 min。PCR 反应完成得到 SOX4 (人) 基因片段。用 Not I 和 Bam HI 对 pLV-EF1a-GFP/Puro 进行酶切, 37 °C 酶切 2 h 后进行电泳, 凝胶回收试剂盒回收载体 SOX4 (人)。利用一步法克隆试剂盒, 将扩增回收好的片段, 重组克隆到线性化的 pLV-EF1a-GFP/Puro 载体中, 16 °C 孵育 4 h 后置于冰水浴中, 冷却。将重组连接产物转化至细菌感受态 DH5α 细胞, 单克隆经过菌液 PCR 鉴定后, 阳性克隆由上海吉玛制药技术有限公司测序, 片段一致的克隆提取质粒备用。

1.2.4 pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 慢病毒制备与滴度测定 选择生长状态良好的 HEK293T 细胞, 0.25% 胰酶消化后重悬细胞接种于培养皿中, 培养

至细胞融合度至 50% ~ 60% 时开始转染。按照 1:1:1:2 的比例将 3 个包装质粒和穿梭质粒加入培养基配置成转染液, 在室温条件下共孵育 20 ~ 25 min, 弃去培养皿中的完全培养基, 加入适量无血清的 DMEM 培养液, 然后逐滴加入共孵育后的转染混合物, 轻轻前后摇晃培养皿后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 ~ 6 h。将转染液换成完全培养基(含 10% FBS 的 DMEM 培养基)后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养。培养 48 h 后收集培养基, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min, 用 0.45 μm 过滤器进行过滤并分装。利用倍数梯度稀释法来测定所获病毒的滴度, 另取生长状态良好的 HEK293T 细胞, 按 3 × 10⁴ 细胞/孔的密度接种于 96 孔板, 混合均匀后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。稀释液 DMEM + 5% ~ 10% FBS 将慢病毒原液(10 ~ 20 μl) 10 倍稀释 2 ~ 3 个梯度, 移去 96 孔板中的培养液, 加入 0.1 ml 稀释后的病毒液, 同时建立对照, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。然后第 2 天将 96 孔板中的稀释病毒液换成完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 72 h。通过荧光显微镜计数荧光细胞, 结合病毒稀释梯度来计算病毒滴度。

1.2.5 筛选与构建稳定过表达 SOX4 的 KGN 细胞 感染前按 (0.5 ~ 1.0) × 10⁶ 细胞/孔的密度将生长状态良好的 KGN 细胞接种于 6 孔板中, 每孔体积为 500 μl, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。根据病毒滴度选取合适病毒浓度感染 KGN 细胞, LV-SOX4 组加入 50 μl pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 慢病毒, LV-CON 组加入 7 μl pLV-EF1a-GFP/Puro-NC 慢病毒进行感染。12 ~ 24 h 后将含病毒的培养基更换为含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基。48 h 后换为含嘌呤霉素(1 μg/ml) 的 DMEM 完全培养基来筛选抗性细胞。48 h 后倒置荧光显微镜观察 GFP 的表达情况, 而后每隔 1 天更换为新鲜的含嘌呤霉素(1 μg/ml) 的培养基以防代谢产物影响细胞生长状态。当倒置荧光显微镜下观察到现存细胞中都有明亮的绿色荧光时, 可将含嘌呤霉素的培养基换为完全培养基。待细胞长满后将细胞转移至 10 cm 培养皿中培养, 及时消化传代并收集细胞, 以备后续实验所需。

1.2.6 RT-qPCR 法检测 KGN 细胞中 SOX4 mRNA 表达水平 收集感染成功后的 LV-CON 组和 LV-SOX4 组 KGN 细胞沉淀, 利用 TRIzol 提取总 RNA, DEPC 水校准分光光度计后测定纯度, 以该 RNA 为

模板逆转录 所得的 cDNA 用于 qPCR 扩增 ,GAPDH 作为内参 ,分别检测 LV-CON 组和 LV-SOX4 组 KGN 细胞中 SOX4 mRNA 的相对表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 SOX4 相对表达量 ,基因引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物设计序列

引物名称	序列(5'→3')
SOX4	F: TCAAGCACATGGCTGACTACCC R: CCACCGACCTTGCTCCCTTC
GAPDH	F: AGCAAGAGCACAAGAGGAAG R: GGTGAGCACAGGTTACTTT

1.2.7 Western blot 检测 KGN 细胞中 SOX4 蛋白表达水平 收集 LV-CON 组和 LV-SOX4 组 KGN 细胞沉淀置于冰上 ,预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次 ,每管样品加入 80 ~ 120 μ l 细胞裂解液(RIPA : PMSF = 100 : 1 配置) 在冰盒上裂解 30 ~ 50 min 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min ,小心吸取上清液至全新的 EP 管 ,按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度 ,加入适量 Loading buffer 100 $^{\circ}$ C 煮 10 min 使蛋白变性。以 20 μ g 的总质量上样 ,利用 SDS-PAGE 检测 ,以 80 V 恒压 30 min ,120 V 恒压 60 min 的条件进行电泳;以 300 mA 恒流 60 min 的转膜条件将蛋白湿转到 PVDF 膜上;用提前配好的含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 溶液室温摇床孵育 1 ~ 2 h 来封闭;封闭后 TBS-T 洗 3 次 ,每次 10 min。根据 Maker 裁膜后加入一抗 ,于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。然后 TBS-T 洗 3 次 ,每次 10 min ,用与一抗相同种属的二抗室温摇床孵育 1 h ,然后 TBS-T 洗 3 次。曝光显影后利用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.2.8 细胞增殖实验 取 LV-CON 组和 LV-SOX4 组细胞 ,胰酶消化后计数 ,1 500 r/min 离心 5 min 以获取细胞沉淀 ,完全培养基(含 10% FBS) 重悬为细胞悬液 ,按每孔 3 000 细胞/100 μ l 的密度接种于 96 孔板中 ,每组细胞重复设置 5 个复孔 ,分别在接种后的 0、24、48、72 h 加入 10 μ l CCK-8 溶液 ,然后置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内继续孵育 2 h 后测定 450 nm 处的吸光度值。

1.2.9 细胞划痕实验 取生长状态良好的 LV-CON 组和 LV-SOX4 组细胞悬液接种于 6 孔板中 ,待细胞汇合度达 100% 后将孔板内的完全培养基去除 ,利用 200 μ l 的无菌枪头进行划痕 ,PBS 缓冲液洗 1 ~ 2 遍以去除脱落细胞 ,加入无血清的培养基后显微镜下观察并拍照记录划痕 ,此时记为 0 h。然后在 24 h 时选取同样部位进行拍照记录 ,并用 Image J

软件进行结果分析。

1.2.10 流式细胞凋亡检测 取 LV-CON 组和 LV-SOX4 组细胞 ,胰酶消化后计数 ,每组取约 10⁴ 个细胞于流式管中 ,1 500 r/min 离心 5 min ,弃去上清 ,PBS 洗 1 ~ 2 遍。100 μ l Annexin V 结合液重悬细胞后加入 1 μ l Annexin V-APC 染液 ,轻轻混匀后避光 4 $^{\circ}$ C 孵育 ,15 min 后加入 1 μ l PI 染液 ,轻轻混匀后 4 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后上机检测。CytExpert 进行结果分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析 ,Graph Pad Prism 8.0 软件绘图 ,正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,两组间比较采取独立样本 *t* 检验 ,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 过表达慢病毒载体的建立 将目的基因 SOX4 克隆至 pLV-EF1a-GFP/Puro 载体上 ,获得 pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 慢病毒载体(图 1A) ,重组慢病毒的测序结果也与 NCBI 中 SOX4 的序列一致(图 1B) 。pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 慢病毒载体构建成功。

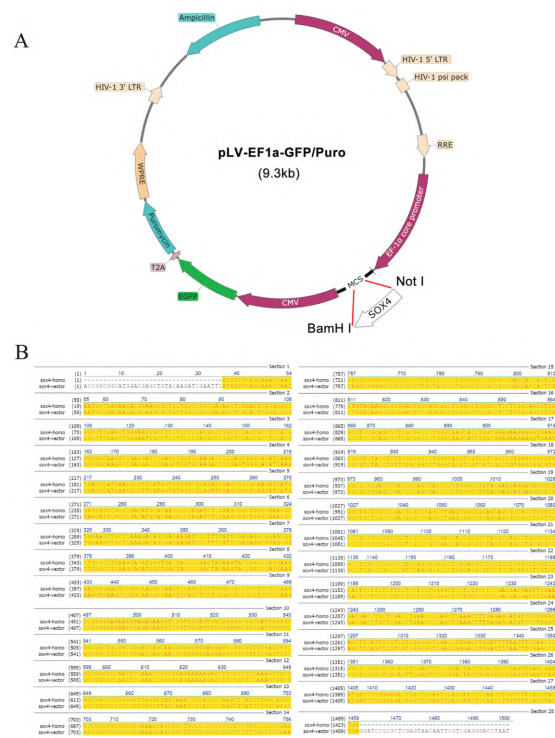


图 1 重组慢病毒载体 pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 的构建 A: 重组慢病毒载体 pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 示意图; B: 重组慢病毒载体测序结果

2.2 慢病毒滴度测定两组 KGN 细胞中 GFP 的表达 将包装好的慢病毒载体转染至 HEK293T 细胞, 共孵育 48 h 后, 收集病毒后梯度稀释 (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4}) 并检测慢病毒滴度, LV-CON 组慢病毒滴度为 7×10^8 TU/ml, LV-SOX4 组慢病毒滴度为 1×10^8 TU/ml(图 2A)。感染 48 h 后利用倒置荧光显微镜观察, LV-CON 组和 LV-SOX4 组 KGN 细胞中均表达 GFP 绿色荧光, 感染效率达 90% 以上, 表明成功构建并筛选出 pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 慢病毒稳定过表达细胞系(图 2B)。

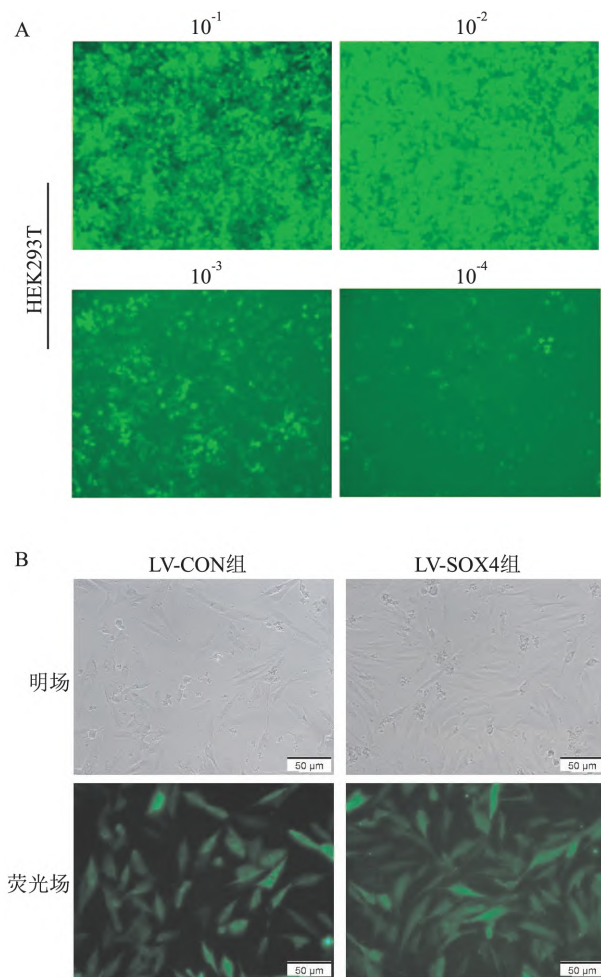


图 2 慢病毒滴度的测定

A: 慢病毒滴度检测; B: KGN 细胞的慢病毒感染效率 $\times 40$

2.3 两组 KGN 细胞中 SOX4 mRNA 及蛋白表达水平 与 LV-CON 组比较, LV-SOX4 组 KGN 细胞中 SOX4 mRNA 表达水平上升约 4 倍, 差异有统计学意义 ($t = 3.10$, $P < 0.05$, 图 3A)。LV-SOX4 组 KGN 细胞中 SOX4 蛋白表达水平较 LV-CON 组升高, 差异有统计学意义 ($t = 14.20$, $P < 0.05$, 图 3B、C)。

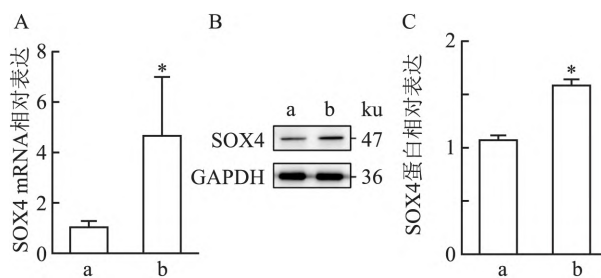


图 3 SOX4 mRNA 及蛋白表达水平的检测

A: SOX4 mRNA 表达检测; B: SOX4 蛋白表达检测; C: SOX4 蛋白相对表达分析; a: LV-CON 组; b: LV-SOX4 组; 与 LV-CON 组比较: * $P < 0.05$

2.4 SOX4 过表达对卵巢颗粒细胞 KGN 增殖的影响 检测接种后 0、24、48、72 h 两组细胞的吸光度值, 与 LV-CON 组比较, LV-SOX4 组在 24、72 h 处的细胞吸光度值增大 ($t = 45.92$ 、 25.60 , 均 $P < 0.01$), 提示 SOX4 基因的表达上调可提高卵巢颗粒细胞的增殖能力(图 4)。

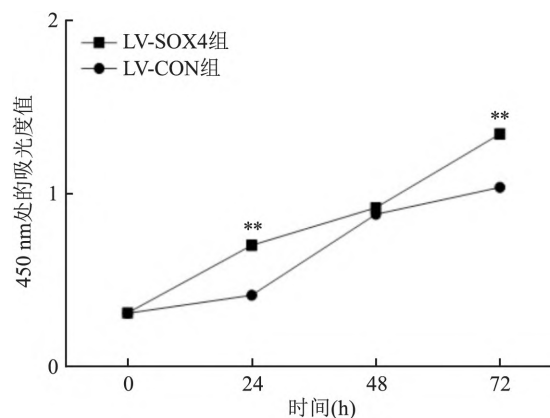


图 4 SOX4 过表达 KGN 细胞的增殖

与 LV-CON 组比较: ** $P < 0.01$

2.5 SOX4 过表达对 KGN 细胞迁移能力的影响 细胞划痕实验结果显示: LV-SOX4 组 KGN 细胞相对迁移率较 LV-CON 组增强 ($t = 7.65$, $P < 0.01$), 提示 SOX4 基因表达上调可增强卵巢颗粒细胞的迁移能力(图 5)。

2.6 SOX4 过表达对卵巢颗粒细胞 KGN 凋亡的影响 流式凋亡检测实验结果显示: LV-SOX4 组凋亡细胞比例较 LV-CON 组减少 ($t = 25.84$, $P < 0.01$), 提示 SOX4 基因的表达上调可降低卵巢颗粒细胞的凋亡比例(图 6)。

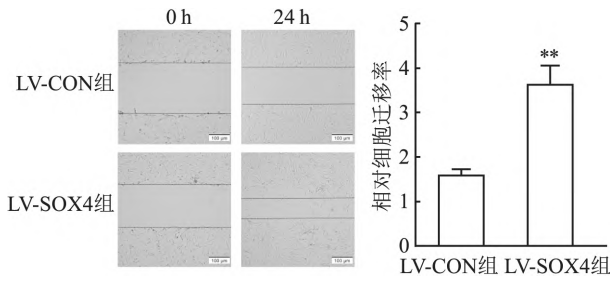


图5 SOX4 过表达 KGN 细胞的迁移 ×20

A: KGN 细胞 0、24 h 的迁移; B: KGN 细胞相对迁移效率; 与 LV-CON 组比较: ** $P < 0.01$

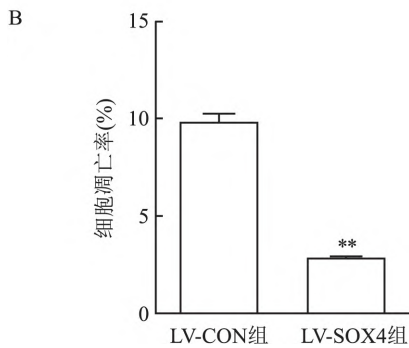
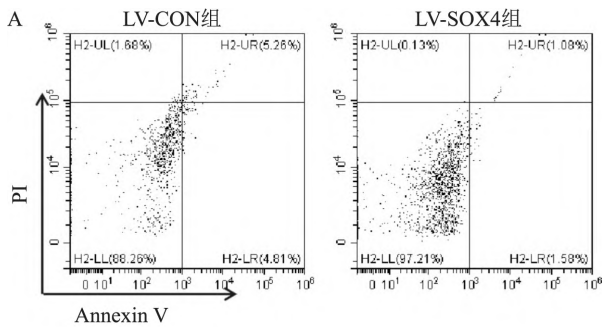


图6 SOX4 过表达 KGN 细胞的凋亡检测

A: 流式细胞术检测 SOX4 过表达 KGN 细胞的凋亡; B: SOX4 过表达 KGN 细胞的凋亡比例; 与 LV-CON 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

SOX 转录因子家族由 20 多个成员组成,通过高度保守的高迁移率组盒结构域可与 DNA 结合,参与各种细胞发育,并在肿瘤进展中发挥重要作用,包括肿瘤发生、微环境变化及转移^[4]。SOX4 是一个具有多种生物学功能的转录调控因子,其正常功能是促进早期分化扩增,同时抑制终末分化,而这些功能与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关^[7]。SOX4 在各种实体瘤中表达升高^[3],由于基因作用的多样性致使对不同肿瘤发挥相似的作用,其异常过表达可能是肿瘤患者预后差的标记基因。SOX4 蛋白中富含甘氨酸和丝氨酸的区域,能够参与细胞凋亡反

应^[8],并有研究^[9]证实 SOX4 具有促进肿瘤细胞增殖的作用。

卵巢颗粒细胞在一定程度上依赖 TGF- β 通路来促进增殖和抑制凋亡^[6],而多项研究表明 SOX4 的表达通过 TGF- β 信号通路的激活来调节^[10-12]。另外卵巢颗粒细胞可以通过过度激活 YAP1 转化诱导细胞去分化和重编程,导致具有间充质型的 HG-SC 的发展^[1]。卵巢颗粒细胞的生长增殖过程及其生物学行为受到激素、炎症因子等多种因素影响,且作为 HGSC 的潜在细胞来源,相关的机制探究尤为必要。而先前对 SOX4 的研究主要集中在肿瘤进展及转移,关于卵巢颗粒细胞相关疾病的功能研究较少。在本研究中,为了探究 SOX4 在卵巢颗粒细胞中的作用,以卵巢颗粒细胞 KGN 作为研究对象,构建了 SOX4 慢病毒载体,感染卵巢颗粒细胞并经荧光观察、qRT-PCR 和 Western blot 验证了稳转细胞系的成功构建。而后探讨了 SOX4 对卵巢颗粒细胞的影响,其中 CCK-8 实验结果显示过表达 SOX4 后的卵巢颗粒细胞的增殖能力增强;细胞划痕实验结果显示过表达 SOX4 后卵巢颗粒细胞迁移能力也同步增强;此外,本研究通过流式细胞凋亡检测观察到 SOX4 过表达后,卵巢颗粒细胞的凋亡比例降低。以上实验结果在一定程度上证实了转录因子 SOX4 在卵巢颗粒细胞生长增殖、迁移及凋亡过程中扮演重要作用,并提示 SOX4 可能通过影响卵巢颗粒细胞增殖、迁移及凋亡来参与细胞功能调控,进而向卵巢恶性肿瘤转变并促进肿瘤转移。

综上所述,靶向 SOX4 可能是治疗卵巢颗粒细胞相关恶性肿瘤的有效途径,上调 SOX4 具有促进卵巢颗粒细胞增殖,促进细胞迁移,抑制细胞凋亡的能力,这揭示了 SOX4 在卵巢颗粒细胞相关疾病的病理过程中具有关键作用,并为研究 SOX4 在卵巢颗粒细胞相关恶性肿瘤发生发展中的作用机制奠定了基础,但其具体的分子机制及调控模式仍需进一步探索。

参考文献

[1] Lv X, He C, Huang C, et al. Reprogramming of ovarian granulosa cells by YAP1 leads to development of high-grade cancer with mesenchymal lineage and serous features[J]. *Sci Bull* 2020 65(15): 1281-96.

[2] Jayson G C, Kohn E C, Kitchener H C, et al. Ovarian cancer[J]. *Lancet* 2014 384(9951): 1376-88.

[3] Vervoort S J, Van Boxtel R, Coffey P J. The role of SRY-related HMG box transcription factor 4 (SOX4) in tumorigenesis and me-

- tastasis: friend or foe? [J]. *Oncogene* ,2013 ,32 (29) : 3397 – 409.
- [4] Grimm D ,Bauer J ,Wise P ,et al. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis [J]. *Semin Cancer Biol* ,2020 ,67: 122 – 53.
- [5] Moreno C S. SOX4: the unappreciated oncogene [J]. *Semin Cancer Biol* ,2020 ,67: 57 – 64.
- [6] Lourenco A R ,Coffer P J. SOX4: joining the master regulators of epithelial-to-mesenchymal transition? [J]. *Trends Cancer* ,2017 ,3 (8) : 571 – 82.
- [7] 董欣欣 ,刘 巍 ,谭文华. SOX4 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *中国临床研究* ,2021 ,34(12) : 1711 – 3.
- [8] Collins S C ,Do H W ,Hastoy B ,et al. Increased expression of the diabetes gene SOX4 reduces insulin secretion by impaired fusion pore expansion [J]. *Diabetes* ,2016 ,65(7) : 1952 – 61.
- [9] 过一清 ,郑 华 ,蒋子龙. 慢病毒介导 SOX4 表达下调对乳腺癌细胞生长及迁移能力的影响 [J]. *中国老年学杂志* ,2019 ,39 (12) : 3040 – 4.
- [10] Kuwahara M ,Yamashita M ,Shinoda K ,et al. The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- β and suppresses TH2 differentiation [J]. *Nat Immunol* ,2012 , 13(8) : 778 – 86.
- [11] Vervoort S J ,Lourenco A R ,Van Boxtel R ,et al. SOX4 mediates TGF- β -induced expression of mesenchymal markers during mammary cell epithelial to mesenchymal transition [J]. *PLoS One* , 2013 ,8(1) : e53238.
- [12] Wang L ,Li Y ,Yang X ,et al. ERG-SOX4 interaction promotes epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells [J]. *Prostate* ,2014 ,74(6) : 647 – 58.

Effect of the transcription factor SOX4 on the proliferation , migration and apoptosis of ovarian granulosa cells

Fan Mengmeng ,Li Cong ,Liang Xue ,Zhang Wanqiu ,Wang Huiping ,Zhai Zhimin

(*Dept of Hematology ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230601*)

Abstract Objective To investigate the impact of SOX4 on ovarian granulosa cells ,stable overexpression of SOX4 was achieved in human KGN cell line ,followed by analysis of its effects on proliferation ,migration and apoptosis.

Methods The recombinant lentiviral plasmid pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 was generated through homologous recombination with linearized pLV-EF1a-GFP/Puro vector. Human ovarian granulosa cells (KGN cell line) were transduced with Lentiviral expression vectors. KGN cells infected with pLV-EF1a-GFP/Puro-NC were served as the LV-CON group ,while those infected with pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 were designated as the LV-SOX4 group. Following transfection ,puromycin selection was employed to establish stable SOX4-expressing KGN cells. The expression levels of SOX4 mRNA and protein in KGN cells from the LV-CON and LV-SOX4 groups were assessed using RT-qPCR and Western blot analysis. Cell proliferation was assessed using the CCK-8 assay in both LV-CON and LV-SOX4 groups. Cell migration ability was evaluated by means of a cell scratch test in these two groups. The proportion of apoptotic cells was determined via flow cytometry analysis in both LV-CON and LV-SOX4 groups. **Results**

The sequencing results of pLV-EF1a-GFP/Puro-SOX4 indicated a complete match between the inserted gene sequence and the SOX4 mRNA sequence. The lentiviral titers were 7×10^8 TU/ml in the LV-CON group and 1×10^8 TU/ml in the LV-SOX4 group. The recombinant plasmid was successfully transfected into KGN cells with a transfection efficiency of over 90% under fluorescence inverted microscopy. The results of RT-qPCR and Western blot tests demonstrated a significant increase in the expression level of SOX4 in KGN cells of LV-SOX4 group compared to that of LV-CON group ($t = 3.10$, $P < 0.05$; $t = 14.20$, $P < 0.05$) . The CCK-8 assay results demonstrated that the LV-SOX4 group exhibited a significant increase in cell proliferation (24 h: $t = 45.92$, $P < 0.01$; 72 h: $t = 25.60$, $P < 0.01$) compared to the LV-CON group. The cell scratch assay indicated that the migratory capacity of KGN cells in the LV-SOX4 group was significantly enhanced ($t = 7.65$, $P < 0.01$) compared to that in the LV-CON group. The LV-SOX4 group exhibited a significant reduction in apoptosis ratio ($t = 25.84$, $P < 0.01$) compared to the LV-CON group. **Conclusion** SOX4-overexpressing KGN cell line was successfully established ,and the overexpression of SOX4 facilitated proliferation and migration while inhibiting apoptosis in human ovarian granulosa cells.

Key words SOX4; ovary granulosa cells; proliferation; migration; apoptosis