

MSI2 对 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖凋亡失衡的影响

杜悠雯¹, 石海涛¹, 韩帅龙¹, 张淑敏¹, 管超奇¹, 王田娟², 潘林鑫¹

摘要 目的 探究 Musashi-2 (MSI2) 过表达对二氢睾酮 (DHT) 诱导的人卵巢颗粒细胞系 (KGN) 细胞增殖和凋亡失衡的影响。方法 对人卵巢颗粒细胞 (GCs) 原代培养进程中的基因表达谱进行统计分析, 筛选其中的差异表达基因。构建 pcDNA3.1-MSI2 真核表达质粒, 瞬时转染至 KGN 细胞中, 并利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blot 技术检测 MSI2 的过表达效果。在 DHT 诱导的 KGN 细胞中过表达 MSI2 后, 然后分别利用四唑盐 (MTT) 比色法和 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 染色法检测各组细胞的增殖情况, 并进一步利用流式细胞术 (FCM) 检测各组细胞的凋亡情况。结果 MSI2 的 mRNA 表达水平在人卵巢 GCs 原代培养过程中逐渐下降。成功构建 pcDNA3.1-MSI2 真核表达质粒, 转染至 KGN 细胞中能够提高 MSI2 的 mRNA 和蛋白表达水平。MTT、EdU 和 FCM 结果显示与空白组相比, DHT 诱导能够明显降低 KGN 细胞的增殖率, 同时提高其凋亡率 ($P < 0.05$), 而在 MSI2 过表达后, KGN 细胞增殖率又有所提高, 且凋亡率也有所降低 ($P < 0.05$), 均接近于空白组。结论

MSI2 过表达能够有效缓解 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖凋亡失衡现象, 表明其在 GCs 生长和卵泡发育过程中发挥着重要作用。

关键词 二氢睾酮; 颗粒细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号 R 34; Q 28

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)03-0464-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.019

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是一种生殖功能障碍与代谢异常并存的内分泌紊乱综合征, 是导致女性不孕不育的重要原因^[1-2], 卵巢颗粒细胞 (granulosa cells, GCs) 的增殖凋亡功能异常是 PCOS 的重要发病机制^[3]。此外, 雄激素过多是导致 PCOS 的主要原因, 因此二氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT) 广泛用于诱导大鼠 PCOS 动物模型和 GCs 模型^[4-5]。该研究首先对基因芯片 GSE129919 进行了分析, 显示 Musashi-2 (MSI2) 在人卵巢 GCs 的体外培养过程中表达降低, 提示其很可能在 GCs 的生长过程中扮演着重要角色。MSI2 作为 MSI 家族的重要成员, 是一类进化保守的 RNA 结合蛋白, 在造血系统发育、细胞增殖分化以及干细胞功能维持等过程中发挥着关键作用^[6-7], 但其对 GCs 增殖和凋亡功能的影响尚未见报道。该文旨在研究 MSI2 过表达对 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖和凋亡失衡的影响, 为进一步探索其

2022-08-08 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 2008085QH365、2108085QH309)

作者单位: ¹安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖医学中心, 合肥 230022

作者简介: 杜悠雯, 女, 助理实验师;

王田娟, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: wangtj6@126.com;

潘林鑫, 男, 实验师, 责任作者, E-mail: panlinxin@126.com

autophagy was detected by immunofluorescence staining, Western blot detected the expression of autophagy-related protein Beclin-1 and the ratio of LC3-II/LC3-I. **Results** The isolated and cultured cells were in a long spindle shape, and Vimentin was positively expressed, indicating that fibroblasts were successfully isolated; Compared with the ANE group, the fluorescence expression of α -SMA protein in ANE low dose Ang(1-7) group and ANE + high dose Ang(1-7) group significantly decreased, the contents of Collagen I and Collagen III in the culture supernatant were reduced ($P < 0.05$), cell proliferation activity decreased ($P < 0.05$), and cell apoptosis rate increased ($P < 0.05$), the cell culture supernatants of the two groups inhibited the angiogenesis of HUVEC ($P < 0.05$), endophagosomes were reduced ($P < 0.05$), Beclin-1 protein expression was reduced ($P < 0.05$), and the ratio of LC3-II/LC3-I was down-regulated ($P < 0.05$); in addition, the effect of ANE + high-dose Ang(1-7) group was stronger than that of ANE + low-dose Ang(1-7) group ($P < 0.05$). **Conclusion** Ang(1-7) can inhibit the activation of fibroblasts induced by ANE, promote cell apoptosis, and reduce the angiogenesis of HUVEC, this mechanism may be related to the regulation of cell autophagy.

Key words soral submucosal fibrosis; fibroblasts; angiotensin (1-7); apoptosis; autophagy; angiogenesis

生物功能奠定了细胞学基础,也为将来 PCOS 的基因治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞 pcDNA 3.1 载体、DH5 α 感受态菌株、KGN 细胞系由安徽医科大学实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器 DMEM / Ham's F-12 (1 : 1) 无酚红培养基 (E600013) 购于上海生工生物公司; 特级胎牛血清 (FB25015) 购于美国 CLARK 公司; Lipo8000TM 转染试剂 (C0533)、Western 及 IP 细胞裂解液 (P0013)、Western 一抗稀释液 (P0023A) 蛋白酶抑制剂混合物 (P1005)、PMSF (ST506)、RNAeasyTM Plus 动物 RNA 抽提试剂盒 (R0032)、MTT (ST316)、BeyoClickTM EdU-555 细胞增殖检测试剂盒 (C0075S) 均购自上海碧云天公司; 质粒抽提试剂盒 (D6943-02) 购自美国 Omega 公司; 细胞凋亡试剂盒 (559763) 购自于美国 BD 公司; MSI2 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。AL600RGB 凝胶成像系统购于美国 GE 公司、Axio Observer 3 倒置荧光显微镜购于德国蔡司公司、MoFlo XDP 超速流式细胞分选仪购于美国贝克曼公司、5200 全自动化学发光分析仪购于上海天能科技有限公司, 仪器均由安徽医科大学科研实验中心提供。实验均通过安徽医科大学伦理委员会审核 (批号: LISC20201078)。

1.3 方法

1.3.1 芯片分析 芯片编号: GSE129919, 即人卵巢颗粒细胞长期体外培养过程中的基因表达谱, 来源于 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库, 由波兰波兹南医科大学组织学和胚胎学院的 Kranc W、Brazert M、Celichowski P 等研究者于 2019 年 4 月 17 日公开分享的, 总体设计如下: 从 18 ~ 40 岁诊断为不孕症的患者中获得人卵巢颗粒细胞, 在培养开始后 1、7、15 和 30 d 收获细胞, 并进行 RNA 分离和微阵列分析。

1.3.2 质粒构建 设计并合成引物序列, F: 5'-CGGGATCCCGCCACCATGGAGGCAAATGG-3'; R: 5'-GGAATTCCTCAATGGTATCCATT-3', 利用 PCR 技术从人 cDNA 文库中扩增出 MSI2 的 CDS 片段, 并利用胶回收试剂盒对扩增产物进行纯化, 然后利用限制性内切酶 (BamH I 和 EcoR I) 对 MSI2 纯化产物进行双酶切 (同时酶切 pcDNA 3.1 空载体), 进一步利用 DNA 连接酶将二者的酶切产物进行连接, 并利用大肠杆菌感受态细胞 (DH5 α) 将连接产物进行

转化, 将菌液涂布于 LB 固体培养基 (氨苄抗性) 后倒置于 37 °C 温箱中培养至单克隆生成, 挑取数个单克隆扩大培养后进行质粒抽提, 并对各质粒进行双酶切鉴定 (BamH I 和 EcoR I), 最后选择含有目的片段的阳性克隆送公司测序。

1.3.3 细胞培养 复苏人卵巢颗粒细胞 KGN, 加入适量完全培养基 (10% FBS + 90% DMEM/Ham's F-12 无酚红培养基 + 青链霉素), 放置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱进行培养, 及时观察细胞并根据细胞生长状态更换完全培养基, 待细胞密度达到 90% 以上时即可用胰酶消化法进行细胞传代。

1.3.4 质粒转染 转染前 18 ~ 24 h 按照每孔约 5×10^5 KGN 细胞接种到 6 孔板内进行培养, 次日当细胞密度达到约 70% 时进行脂质体 (Lipo8000) 法转染, 具体步骤如下: 首先弃去待转染 KGN 细胞的旧培养基, 更换为新鲜的完全培养基。然后将 pcDNA 3.1-MSI2 或 pcDNA 3.1 (2.5 μ g)、Lipo 8000 (4 μ l) 依次加到 125 μ l Opti-MEM 转染液, 充分混匀后将溶液加入待转染细胞中, 继续培养 24 ~ 48 h, 用于后续实验。

1.3.5 RT-qPCR 检测 设计并合成以下引物序列, MSI2-S1m: 5'-GCCCCACCATGAGT TAGATTCC-AAG-3', A1m: 5'-GTGTTTCGAGATAACCCGCCTAC-3'; β -Actin-S1m: 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTCCT-3', A1m: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'。然后收集实验处理后的各组细胞, 用 TRIzol 法提取细胞的总 RNA, 逆转录得到 cDNA, 按一定比例配制 PCR 反应液 (包括 SYBR[®] Green supermix 核酸染料、cDNA 模板、引物、ROX 校正染料和无 RNase 水), 并利用两步法在 RT-PCR 仪中进行扩增。

1.3.6 Western blot 检测 收集实验处理后的各组细胞进行裂解, 提取总蛋白后加入适量 SDS 上样缓冲液, 金属浴后取适量蛋白样本先后进行 SDS-PAGE 垂直电泳 (100 V 2 h) 和恒流电转 (200 mA, 1 h), 取出 PVDF 膜室温封闭 1 h, TBST 溶液洗膜后加入一抗 (1 : 500) 进行孵育 (4 °C 过夜), TBST 洗膜后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1 : 5 000) 进行孵育 (室温 1 h), TBST 溶液洗膜后用 ECL 化学发光液进行显色, 在全自动化学发光分析仪上进行拍摄。

1.3.7 MTT 法检测细胞增殖情况 转染约 24 h 后弃去各组细胞的培养基, 更换为无血清培养液, 然后每孔加入 20 μ l 的 MTT 5 mg/ml, 37 °C 继续孵育 4 h 后, 弃上清液并每孔加 150 μ l DMSO 溶解细胞内结晶, 室温振荡溶解 10 min 后于 492 nm 波长处测吸

光度(OD值)。

1.3.8 EdU 细胞增殖 转染约 24 h 后加入 EdU 工作液至终浓度为 1×10^{-5} mol/L 37 °C 继续孵育 4 h 后去除培养液 并加入 4% 的多聚甲醛室温固定 15 min 洗涤液洗涤细胞 3 次后加入含 0.3% Triton X-100 的 PBS 进行室温透化 15 min 洗涤液洗涤细胞 3 次后加入 Click 反应液室温避光孵育 30 min 然后在荧光显微镜下进行观察 红色荧光即表示增殖中的细胞。

1.3.9 细胞凋亡 收集实验处理后的各组细胞 用预冷的 PBS 洗涤细胞两次后加入 $1 \times$ 结合缓冲液 以 1×10^6 个/ml 的浓度重新悬浮细胞 转移 100 μ l 细胞悬液至 5 ml 离心管中 依次加入 5 μ l Annexin V-PE 和 5 μ l 7-AAD(同时做好 Annexin V-PE 和 7-AAD) 轻轻混悬细胞后在 RT(25 °C) 下避光孵育 15 min 然后每管加入 400 μ l $1 \times$ 结合缓冲液 在 1 h 内进行流式细胞仪分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示 组间比较采用 *t* 检验 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSI2 在人卵巢 GCs 体外培养过程中表达降低 根据 GEO 数据库中 GSE129919 基因芯片提供的信息 本课题组对人卵巢 GCs 体外培养 1、7、15、30 天的基因表达谱进行了统计分析 结果如图 1A 所示 两组 GCs 之间存在 236 个显著表达差异基因 (FDR < 0.001, |logFC| > 1) 然后分别又对两组 GCs 的基因表达谱进行了 Volcano plot 和 Meandiff plot 分析 结果如图 1B 所示 与体外培养 1 d 相比, GCs 在培养 30 d 后有 109 个基因表达升高 而有 127 个基因表达降低 其中就包括 MSI2 基因。进一步观察了 GCs 体外培养不同时间后 MSI2 的表达变化情况 结果如图 1C 所示 随着体外培养时间的延

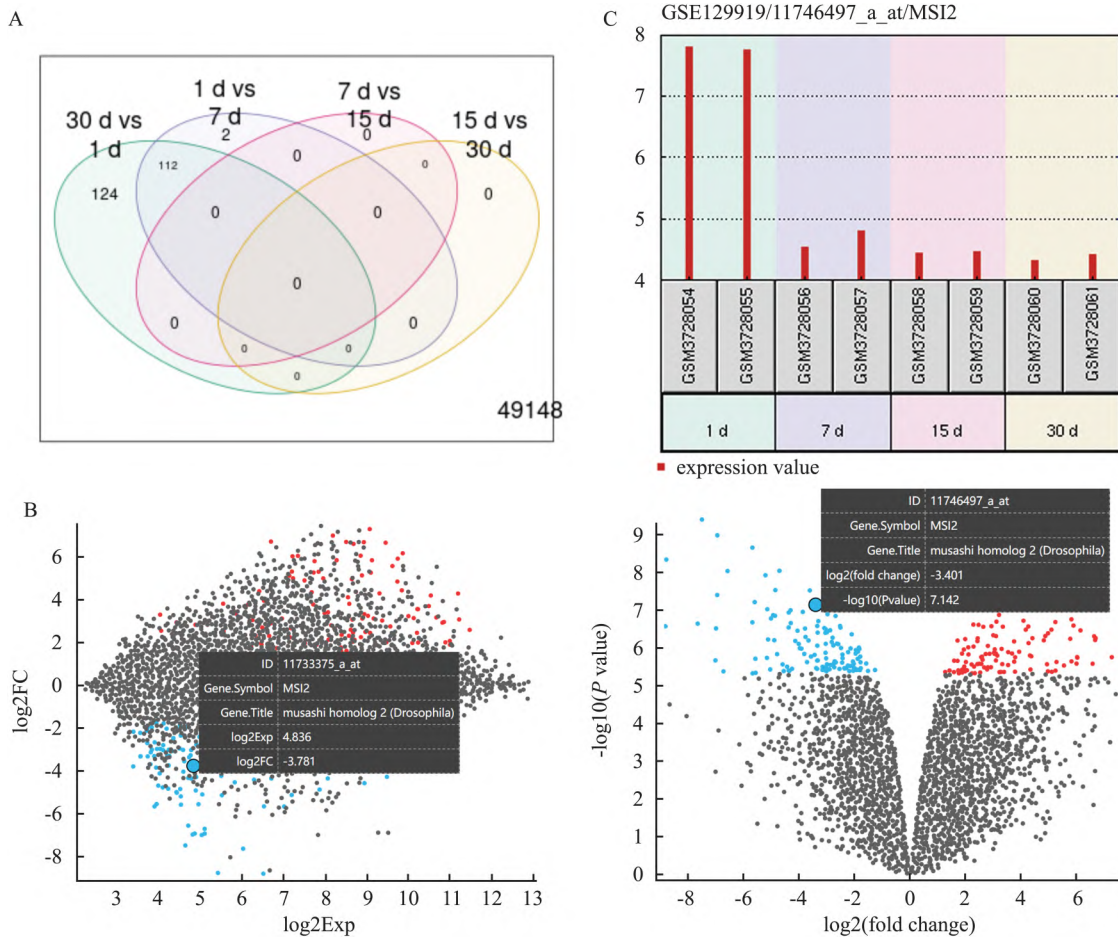


图 1 MSI2 在人卵巢 GCs 体外培养过程中表达降低

A: GSE129919 基因芯片的 Venn Diagram 分析; B: GSE129919 基因芯片的 Volcano plot 和 Meandiff plot 分析; C: MSI2 在 GCs 体外培养过程中的表达变化情况

长,人卵巢 GCs 中 MSI2 的 mRNA 表达水平有下调的趋势,至 30 d 时达到最低值。综上,提示 MSI2 在人卵巢 GCs 的生长发育中可能发挥着重要作用。

2.2 pcDNA3.1-MSI2 真核表达载体的酶切鉴定与表达 对 pcDNA3.1-MSI2 的连接产物进行 DH5 α 感受态转化,并均匀涂布至带氨苄抗性的 LB 固体平板上,37 °C 温箱倒置培养 12 ~ 16 h 后,结果如图 2A 所示,平板上生长出许多单克隆产物,表明质粒转化十分成功。然后随机挑取 6 个单克隆产物扩大培养后进行质粒抽提,并进行双酶切(BamH I 和 EcoR I) 鉴定,且对酶切产物进行琼脂糖电泳,结果如图 2B 所示,只有第 4 泳道的质粒酶切后出现了两条亮带,与 DNA Marker 和横向比较后发现,其中一条即为载体,另一条大小均在 1 000 bp 左右,与 MSI2 的 cDNA 片段(987 bp) 大小基本一致,表明重组质粒连接成功,将阳性克隆产物送生物公司进行测序,测序正确后即表明 pcDNA3.1-MSI2 成功构建。将 pcDNA3.1-MSI2(pcDNA3.1 空载体为对照) 瞬时转染至 KGN 细胞中,约 48 h 后收集并裂解细胞,分别提取总 RNA 和总蛋白后进行 RT-qPCR 和 Western blot 检测,结果如图 2C、D 所示,与对照组相

比,pcDNA3.1-MSI2 转染组细胞中 MSI2 的 mRNA 和蛋白水平均有提高。表明 pcDNA3.1-MSI2 真核表达载体成功构建并表达。

2.3 MSI2 过表达对 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖抑制的影响 在待转染的 KGN 细胞中加入 DHT (终浓度为 2.5×10^{-8} mol/L) 进行诱导,约 6 h 后将等量的 pcDNA3.1-MSI2 和 pcDNA3.1 分别瞬时转染至 KGN 细胞中,持续诱导约 24 h 后分别利用 MTT 比色法和 EdU 染色法检测各组细胞的增殖情况,MTT 检测结果如图 3A 所示,DHT 诱导组细胞的生长抑制率(IR) (%) 为 0.367 ± 0.041 ,要高于空白组的(0.152 ± 0.016 , $t = 8.461$, $P = 0.001$),而 DHT 诱导 + pcDNA3.1-MSI2 组细胞的 IR 为(0.194 ± 0.019)%,与 DHT 诱导组相比有所降低($t = 6.631$, $P = 0.003$),且接近于空白组,但 DHT 诱导 + pcDNA3.1 组(0.398 ± 0.031)% 与 DHT 诱导组无差异($t = 1.045$, $P = 0.355$)。EdU 染色结果如图 3B、C 所示,DHT 诱导组的细胞增殖率为 0.261 ± 0.045 ,要低于空白组的(0.573 ± 0.087)% ($t = 5.517$, $P = 0.005$),而 DHT 诱导 + pcDNA3.1-MSI2 组的细胞增殖率为(0.458 ± 0.072)%,与 DHT 诱导组相比有所

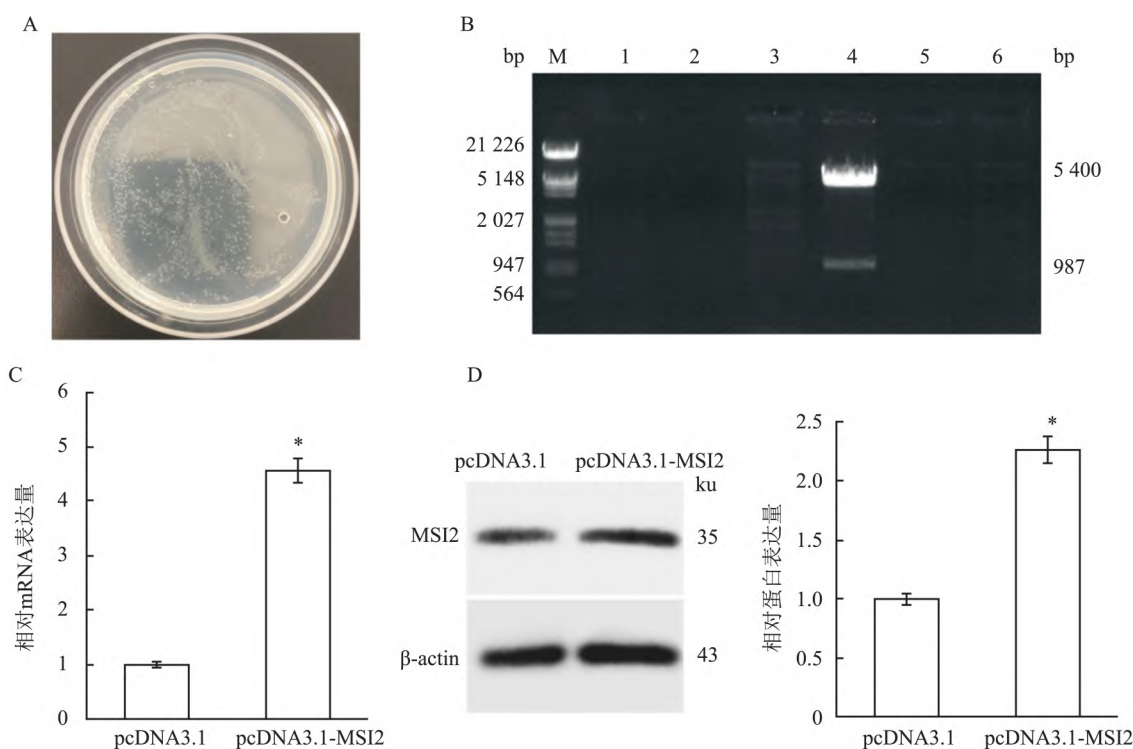


图2 pcDNA3.1-MSI2 重组质粒的酶切鉴定与表达

A: pcDNA3.1-MSI2 连接产物转化后的 LB 固体平板图; B: pcDNA3.1-MSI2 重组质粒的酶切鉴定, M: DNA Marker; 1-6: pcDNA3.1-MSI2 连接产物的酶切产物; C: RT-qPCR 检测 MSI2 的 mRNA 表达水平; D: Western blot 检测 MSI2 的蛋白表达水平; 与 pcDNA3.1 空载体组比较: * $P < 0.05$

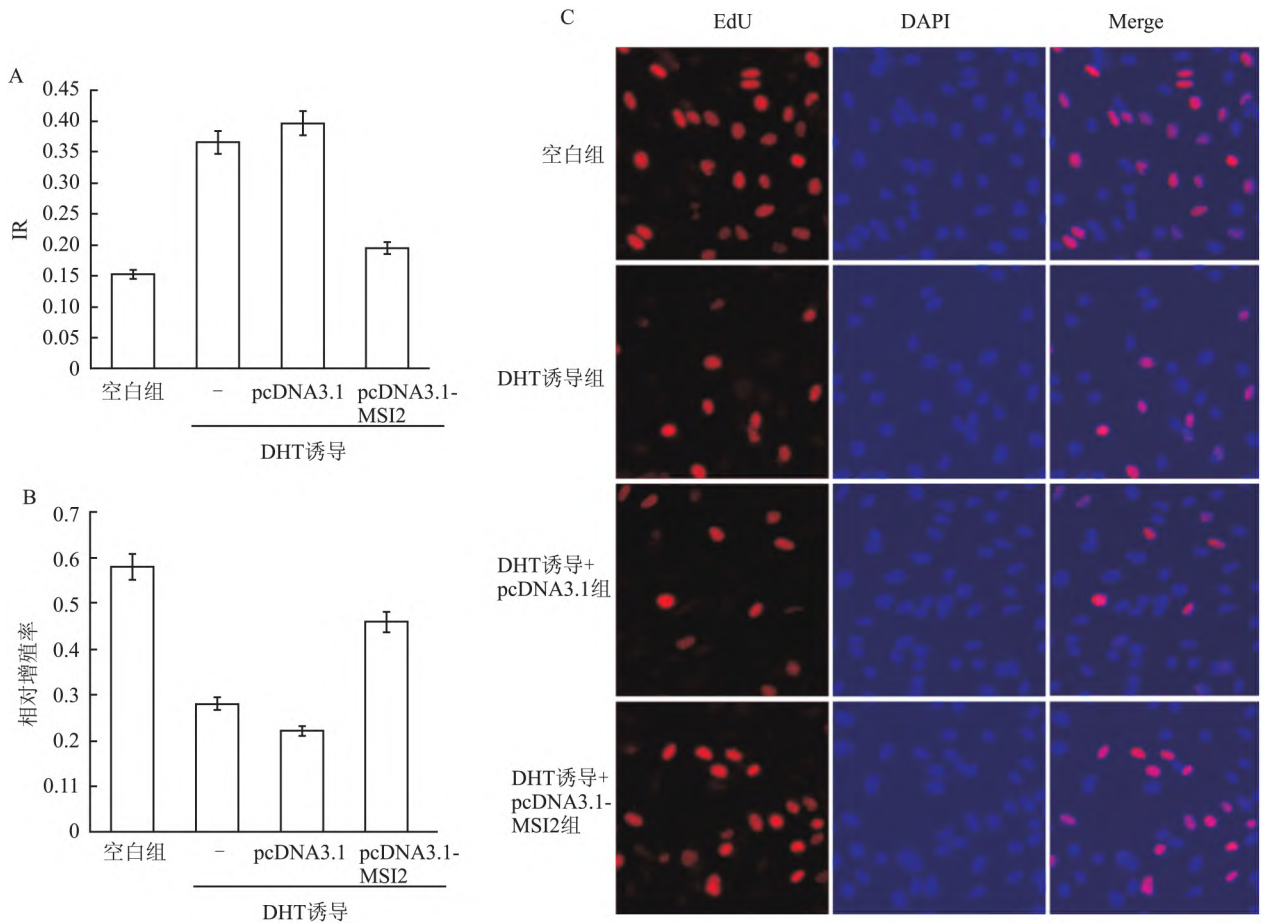


图3 MSI2 过表达对 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖抑制的影响

A: MTT 法检测细胞增殖; B: EdU 染色法检测细胞增殖; C: EdU 染色代表图 ×100 红色荧光: 增殖细胞; DAPI: 细胞核; MERGE: 二者的重叠; 与空白组比较: #P < 0.05; 与 DHT 诱导组比较: * P < 0.05

提高($t = 4.019, P = 0.016$),且接近于空白组,但 DHT 诱导 + pcDNA3.1 组(0.238 ± 0.051)% 与 DHT 诱导组无差异($t = 0.586, P = 0.589$)。表明 DHT 刺激能够抑制 KGN 细胞的正常增殖,而 MSI2 过表达能够有效缓解 DHT 引起的增殖抑制。

2.4 MSI2 过表达对 DHT 诱导的 KGN 细胞凋亡的影响 在待转染的 KGN 细胞中加入 DHT(终浓度为 2.5×10^{-8} mol/L) 进行诱导,约 6 h 后将等量的 pcDNA3.1-MSI2 和 pcDNA3.1 分别瞬时转染至 KGN 细胞中,持续诱导约 24 h 后利用 FCM 法检测各组细胞的凋亡情况,结果如图 4 所示,DHT 诱导组的细胞凋亡率为 13.91 ± 1.87 ,要高于空白组的(5.86 ± 0.83)%($t = 6.815, P = 0.002$),而 DHT 诱导 + pcDNA 3.1-MSI2 组的细胞凋亡率为(6.75 ± 0.92)% ,与 DHT 诱导组相比有所降低($t = 5.951, P = 0.004$),且接近于空白组,但 DHT 诱导 + pcDNA3.1 组(15.32 ± 2.14)% 与 DHT 诱导组无差异(t

$= 0.469, P = 0.664$)。综上所述,DHT 刺激能够促进 KGN 细胞的异常凋亡,而 MSI2 过表达能够缓解 DHT 引起的促凋亡作用。

3 讨论

卵泡发育异常是 PCOS 的最为重要病理改变,而 GCs 在卵泡的发育过程中起决定性的作用。在 PCOS 患者体内存在“FSH-颗粒细胞轴”功能低下现象,GCs 细胞增殖和凋亡功能失衡,引起芳香化酶功能缺陷,无法将卵泡内膜细胞合成的雄激素转化为雌二醇,致体内雄激素积聚过多,最终导致卵泡发育功能障碍,引发 PCOS^[3-8]。人 MSI2 基因位于染色体 17q22 上,由 20 个外显子组成,其编码蛋白由 328 个氨基酸组成,相对分子质量为 35 200。近些年来,MSI2 在肿瘤中的作用日益凸显,具有癌基因的特性,它与肺癌、乳腺癌、卵巢癌等众多肿瘤细胞的增殖密切相关^[9-11],且有研究^[12]表明 MSI2 基因

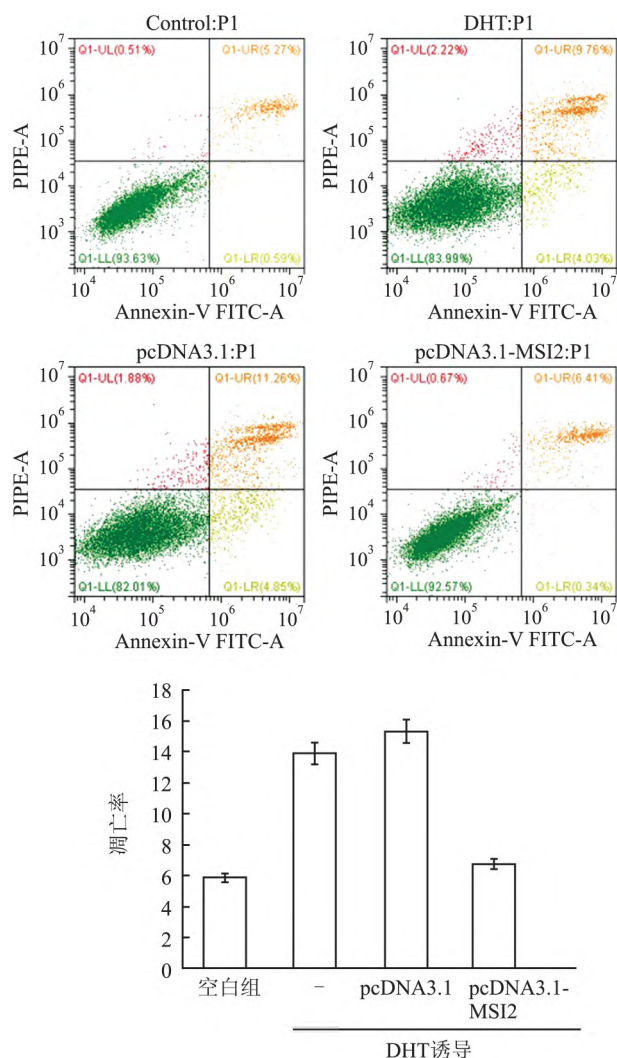


图4 MSI2 过表达对 DHT 诱导的 KGN 细胞凋亡的影响
与空白组比较: # $P < 0.05$; 与 DHT 诱导组比较: * $P < 0.05$

的敲除能够破坏小鼠卵巢中窦前卵泡的正常发育,但其对 GCs 增殖和凋亡功能的影响目前国内外尚无研究。

GCs 的增殖和凋亡异常是 PCOS 发生的重要病理机制,本研究旨在探索 MSI2 对 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖凋亡失衡的影响。KGN 细胞具有类似于人类 GCs 性激素生成的模式,可模拟正常 GCs 凋亡的生理调节,是了解人 GCs 功能非常有价值的细胞模型^[13],而 DHT 常用于诱导大鼠 PCOS 动物模型,能够表现出与 PCOS 患者相似的生殖和内分泌代谢特征。在本课题组的前期研究中,一系列浓度梯度和时间梯度相关实验显示在 2.5×10^{-8} mol/L DHT 预处理 24 h 后,PCOS 患者原代颗粒细胞和 KGN 细胞中 AR、FSHR 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著上调,同时细胞增殖减少,细胞凋亡增加^[14]。这一结

果验证了 DHT 预处理的 KGN 细胞能够模拟类似 P-COS 的病理生理状态。另外,之前基因芯片的分析结果显示,MSI2 在人卵巢 GCs 原代培养过程中表达量逐渐减少,随后,本课题组将构建成功的 pcDNA3.1-MSI2 瞬时转染至 KGN 细胞中,结果表明其能够显著提高细胞中 MSI2 的 mRNA 和蛋白表达水平。

在功能上,首先研究了 MSI2 过表达对 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖的影响,结果表明 MSI2 过表达能够有效缓解 DHT 诱导的 KGN 细胞增殖抑制。本研究在检测细胞增殖的方法上,首先采用的是 MTT 比色法,该法是检测细胞存活和生长的经典方法,有灵敏度高、操作方便和费用经济等特点,但由于 MTT 经还原所产生的甲瓩产物不溶于水,需被充分溶解后才能检测,这样对实验结果的准确性会产生影响,因此通过了增加复孔和实验次数最大限度的提高了结果的准确性。另外,本研究还采用了 EdU 染色法,该法基于 Apollo[®] 荧光染料与 EdU 的特异性反应即可直接并准确地检测出 DNA 复制活性,能够更准确更直观的观察细胞增殖,大大提高了本研究实验结果的可靠性。最后,本课题组又研究了 MSI2 过表达对 DHT 诱导的 KGN 细胞凋亡的影响,结果和预期的一致,即 MSI2 过表达能够有效改善 DHT 对 KGN 细胞的促凋亡作用。综上所述,MSI2 能够缓解雄激素过量诱发的 GCs 细胞增殖和凋亡的失衡,预示着其在 GCs 生长和卵泡发育过程中发挥着重要作用。本研究具有一定的创新性,同时也具有一定的临床价值和实际意义,当然,也存在着一些不足,仅仅研究 MSI2 对 GCs 细胞增殖和凋亡的影响还是不够的,所以在接下来的研究中,本课题组将进一步探索 MSI2 过表达对 DHT 诱导的 PCOS 细胞模型中激素代谢水平及卵泡发育功能的影响,并在 PCOS 动物模型中进行进一步验证。

参考文献

- [1] Wang W, Zhou W, Wu S, et al. Risk of infertility index in women with polycystic ovarian syndrome [J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2020, 30(11): 1188-92.
- [2] 王芳芳,李君,李彩华,等. PCOS 患者冷冻胚胎移植后双胎妊娠结局分析[J]. 安徽医科大学学报 2020, 55(8): 1237-40.
- [3] 张馨怡,谭季春. 多囊卵巢综合征中卵巢颗粒细胞的研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志 2019, 35(1): 134-6.
- [4] Gao Z, Ma X, Liu J, et al. Troxerutin protects against DHT-in-

- duced polycystic ovary syndrome in rats [J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 106.
- [5] Ji R, Jia F Y, Chen X, et al. Salidroside alleviates oxidative stress and apoptosis via AMPK/Nrf2 pathway in DHT-induced human granulosa cell line KGN [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2022, 715: 109094.
- [6] 王小刚, 刘静, 郭庚, 等. MSI2 生物学特性的研究进展 [J]. *国际遗传学杂志* 2017 40(4): 228-32.
- [7] Rentas S, Holzapfel N, Belew M S, et al. Musashi-2 attenuates AHR signalling to expand human haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2016, 532(7600): 508-11.
- [8] 李慧蓉, 魏兆莲. 多囊卵巢综合征卵巢颗粒细胞凋亡研究进展 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志* 2009 28(5): 331-4.
- [9] Topchu I, Karnaukhov N, Mazitova A, et al. Musashi 2 (MSI2) expression as an independent prognostic biomarker in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *J Thorac Dis*, 2021, 13(3): 1370-9.
- [10] Li M, Li A Q, Zhou S L, et al. RNA-binding protein MSI2 isoforms expression and regulation in progression of triple-negative breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 92.
- [11] Lee J, An S, Choi Y M, et al. Musashi-2 is a novel regulator of paclitaxel sensitivity in ovarian cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(5): 1945-52.
- [12] Sutherland J M, Sobinoff A P, Gunter K M, et al. Knockout of RNA binding protein MSI2 impairs follicle development in the mouse ovary: characterization of MSI1 and MSI2 during folliculogenesis [J]. *Biomolecules*, 2015, 5(3): 1228-44.
- [13] Nishi Y, Yanase T, Mu Y, et al. Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(1): 437-45.
- [14] Wang T, Liu Y, Lv M, et al. miR-323-3p regulates the steroidogenesis and cell apoptosis in polycystic ovary syndrome (PCOS) by targeting IGF-1 [J]. *Gene*, 2019, 683: 87-100.

Effect of MSI2 on proliferation and apoptosis imbalance of KGN cells induced by DHT

Du Youwen¹, Shi Haitao¹, Han Shuailong¹, Zhang Shumin¹, Guan Chaoqi¹, Wang Tianjuan², Pan Linxin¹

(¹School of Life Science, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Reproductive Medicine Centre, Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the effect of Musashi-2 (MSI2) overexpression on the imbalance of proliferation and apoptosis of human ovarian granulosa cell line (KGN) induced by dihydrotestosterone (DHT). **Methods** The gene expression profiles of human ovarian granulosa cells (GCs) in primary culture were statistically analyzed to screen the differentially expressed genes. pcDNA3.1-MSI2 eukaryotic expression plasmid was constructed and transiently transfected into the KGN cells, and the overexpression effect of MSI2 was detected by Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR) and Western blot. After overexpressing MSI2 in DHT induced KGN cells, MTT colorimetry and Edu staining were used to detect the proliferation of cells in each group, and flow cytometry (FCM) was further used to detect the apoptosis of cells in each group. **Results** The mRNA expression level of MSI2 gradually decreased during the primary culture of human ovarian GCs. And pcDNA3.1-MSI2 was successfully constructed and transfected into KGN cells to improve the mRNA and protein expression levels of MSI2. Then MTT, EdU and FCM results showed that compared with the blank group, DHT induction could significantly reduce the proliferation rate and increase the apoptosis rate of KGN cells ($P < 0.05$). However, after MSI2 overexpression, the proliferation rate of KGN cells increased and the apoptosis rate decreased ($P < 0.05$), which were close to the blank group. **Conclusion** Overexpression of MSI2 can effectively alleviate the imbalance of proliferation and apoptosis of KGN cells induced by DHT, indicating that MSI2 plays an important role in GCs growth and follicle development.

Key words DHT; granulosa cells; cell proliferation; apoptosis