

## مطالعه تاثیر بیش بیان ژن OCT4 و مهار همزمان ژن P53 بر بیان ژن‌های پرتوانی در سلول‌های بنیادی بافت چربی انسان

نویسندگان: عاطفه رشیدی پور<sup>۱،۲</sup>، آرش جاوری<sup>۱</sup>، معصومه فخر طه<sup>۱\*</sup>

۱. گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

E-mail: mftaha@nigeb.ac.ir

\* نویسنده مسئول: معصومه فخر طه

### چکیده

مقدمه و هدف: *OCT4* مهمترین فاکتورهای رونویسی درگیر در حفظ پرتوانی و بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک است. از طرفی، مطالعات اخیر نشان داده است که فقدان یا جهش در ژن *P53* بازبرنامه‌ریزی هسته را تسهیل می‌کند. مطالعه‌ی حاضر با هدف بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی با استفاده از بیش بیان *OCT4* و کاهش بیان *P53* طراحی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی بافت چربی با استفاده از آنزیم کلاژناز از نمونه‌های چربی شکمی بیماران تحت عمل زیبایی ابدومینوپلاستی جداسازی شد. برای شناسایی سلول‌های بنیادی بافت چربی، بیان مارکرهای مزانشیمی با روش فلوسیتومتری بررسی شد و سلول‌ها به رده‌های استخوانی و چربی تمایز داده شدند. سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله‌ی پاساژ سوم با پلاسمید بیانی حامل ژن *OCT4* و *shRNA* مهارکننده *P53* (وکتور *pCXLE-hOCT4/shp53*) ترنسفکت شدند. یک هفته پس از ترنسفکشن، بیان ژن‌های پرتوانی با روش *qPCR* بررسی شد.

نتایج: سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ سوم مورفولوژی فیبروبلاست مانند نشان دادند. نشانگرهای مزانشیمی *CD90*، *CD73* و *CD105* به ترتیب در ۹۴٪، ۸۰٪ و ۸۱٪ درصد از سلول‌ها بیان شد. به علاوه، سلول‌های بنیادی بافت چربی به سلول‌های چربی و استخوانی تمایز یافتند. طبق نتایج *qPCR*، بیان ژن‌های *OCT4*، *SOX2*، *LIN28*، *REX1*، *CCND1* و *C-MYC* در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور حامل ژن *OCT4* و *shRNA* مهارکننده *P53* نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد.

نتیجه‌گیری: بیش بیان ژن *OCT4* و مهار بیان *P53* به بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بنیادی بافت چربی به سمت حالت پرتوانی کمک می‌کند. این روش ممکن است توان تمایزی سلول‌های بنیادی بافت چربی را برای کاربردهای درمانی افزایش دهد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی بافت چربی، پرتوانی، *OCT4*، *shRNA*، مهار *P53*.

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست و پنجم-شماره ۱۳۳  
اسفند ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۴  
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷  
پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۴

## مقدمه

بافت چربی یکی از منابع مهم و غنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی است که در زمینه پزشکی ترمیمی مورد توجه فراوان قرار گرفته است. سلول‌های بنیادی بافت چربی به راحتی جداسازی می‌شوند و بدون سطوح قابل توجهی از پیر شدن در محیط کشت تکثیر می‌یابند (۱). چند توان بودن این سلول‌ها از نظر تمایزی پیش‌تر توسط محققین مختلف اثبات شده است (۱-۴). همچنین چندین مطالعه نشان داده است که سلول‌های بنیادی بافت چربی ژن‌های پرتوانی متعدد، مانند OCT4، SOX2، NANOG، UTF1 و NODAL را بیان می‌کنند که مبین یک ارتباط نزدیک بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های بنیادی جنینی است (۵-۹). در هر حال، بیان ژن‌های پرتوانی با کشت و پاساژ این سلول‌ها به سرعت کاهش می‌یابد که انحراف فنوتیپ سلول‌ها را به سمت حالت تمایز یافته در محیط کشت نشان می‌دهد (۸). ناگفته پیداست که این روند از قدرت تمایز سلول‌های استرومایی بافت چربی به سلول‌های تخصص یافته مختلف می‌کاهد. به علاوه، ممکن است بیان این ژن‌ها در بافت چربی افراد مسن به مراتب کمتر از افراد جوان باشد.

محققین روش‌های مختلفی را برای بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک و افزایش پرتوانی آنها مطرح کرده‌اند. انتقال هسته سلول سوماتیک (۱۰، ۱۱)، همجوشی سلولی (۱۲، ۱۳)، بازبرنامه‌ریزی به وسیله عصاره سلول‌های پرتوان (۳، ۱۴-۱۶) و انتقال فاکتورهای رونویسی (۱۷، ۱۸) نمونه‌هایی از این روش‌هاست. در سال ۲۰۰۶ تاکاهاشی و یاماناکا نشان دادند که می‌توان با استفاده از بیش‌بیان فاکتورهای رونویسی OCT4، KLF4، SOX2 و C-MYC (عوامل OSKM)، که به فاکتورهای یاماناکا معروف‌اند، سلول‌های بالغ را به سلول‌های بنیادی پرتوان بازبرنامه‌ریزی کرد و سپس سلول‌های پرتوان ایجاد شده را به انواع سلول‌های بدن تمایز داد (۱۹). از آنجایی که در بین فاکتورهای یاماناکا، دو ژن KLF4 و C-MYC

نقش سرطان‌زایی و ایجاد تومور داشتند، در مطالعات بعدی تلاش شد تا این ژن‌ها حذف و با ژن‌های دیگر یا مولکول‌های شیمیایی جایگزین شوند (۲۰).

OCT4 یکی از فاکتورهای رونویسی است که طی تحقیقات گذشته به‌عنوان مهم‌ترین ژن در مسیرهای ملکولی درگیر در پرتوانی شناخته شده است. این ژن تنها فاکتور اجباری برای بازبرنامه‌ریزی است و سایر فاکتورها نقش افزایش‌دهنده بازده برنامه‌ریزی را بر عهده دارند (۲۱). در سال ۲۰۱۱، Li و همکارانش نشان دادند که ترکیبی از چهار مولکول کوچک والپروئیک اسید، ترانیل سیرومین، CHIR99021 و VC6T (616452) می‌توان جایگزین SOX2، KLF4 و c-MYC کرد و سلول‌های بنیادی پرتوان القاشده را فقط با وارد کردن یک فاکتور رونویسی OCT4 به فیبروبلاست‌های موش تولید نمود (۲۲).

ژن P53 از ژن‌های دیگری است که در بازبرنامه‌ریزی مورد توجه قرار گرفته است. P53 یک ژن سرکوبگر تومور است که با القای توقف چرخه سلولی، پیری، ترمیم DNA و آپوپتوز مانع از شروع تشکیل تومور می‌شود. به‌تازگی نشان داده شده است که فقدان یا جهش در ژن P53 بازبرنامه‌ریزی هسته‌ای را تسهیل می‌کند، در حالی که بیان P53 بازده بازبرنامه‌ریزی را کاهش می‌دهد (۲۳). در سال ۲۰۰۸، ژائو و همکارانش نشان دادند که خاموش کردن ژن P53 همراه با بیش‌بیان UTF1 تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده را از فیبروبلاست‌های بالغ انسانی، به وسیله فاکتورهای یاماناکا و حتی در غیاب C-MYC، ۱۰۰ برابر افزایش می‌دهد (۲۴). در واقع، مسیر P53-P21 به‌عنوان سدی در برابر تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده عمل می‌کند (۲۵، ۲۶).

به طور کلی، بر اساس مطالعات پیشین بیش‌بیان فاکتور پرتوانی OCT4 و مهار بیان ژن P53 نقش مهمی را در بازبرنامه‌ریزی و پرتوان‌سازی سلول‌های سوماتیک برعهده دارند. از طرفی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی

دقیقه سانتریفوژ شد تا کسر استرومای عروقی (SVF) به دست آید. رسوب سلولی در محیط DMEM حاوی ۲۰ درصد سرم جنینی گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین معلق شد. سلول‌ها شمارش و با تراکم  $5 \times 10^4$  سلول بر میلی لیتر به فلاسک‌های کشت سلول منتقل شدند. محیط سلول‌ها هر دو روز یکبار عوض شد و سلول‌ها پس از رسیدن به تراکم  $8 \times 10^6$  تا ۹۰ درصد پاساژ داده شدند.

#### شناسایی سلول‌های بنیادی با فلوسیتومتری

سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ سوم توسط Trypsin-EDTA جداسازی و با پارافرمالدهید ۴ درصد ثابت شدند. برای رنگ‌آمیزی، ابتدا سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با آنتی‌بادی‌های اولیه علیه مارکرهای CD73، CD90، CD105، CD45 و سپس ۳۰ دقیقه با آنتی‌بادی‌های ثانویه FITC-labeled rat anti-mouse IgG یا PE-labeled goat anti-mouse IgG شدند. سلول‌هایی که فقط با آنتی‌بادی ثانویه رنگ‌آمیزی شدند، به‌عنوان کنترل منفی به کار رفتند. بررسی فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه (BD Bioscience, FACSCalibur™ (BD USA) انجام شد و نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار FlowJo vX.0.6 (Tree Star Inc. Ashland, USA) آنالیز شد.

#### تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی به سلول‌های چربی و استخوانی

سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ سوم به مدت سه هفته در محیط‌های تمایز چربی (حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱ میکرومولار دگزاتازون، ۵ میکروگرم بر میلی لیتر انسولین، ۱۰۰ میکرومولار ایندومتاسین و ۵۰۰ میکرومولار IBMX) و استخوانی (حاوی ۱۰ درصد FBS،  $10^{-8}$  مولار دگزاتازون، ۰/۰۵ گرم بر لیتر آسکوربیک اسید، ۳/۷ گرم بر لیتر بیکربنات سدیم و  $10^{-3}$  مولار بتا گلیسرول فسفات) کشت داده شدند. سپس، تمایز چربی با رنگ‌آمیزی Oil Red O و تمایز استخوانی با رنگ‌آمیزی Alizarian Red بررسی شد.

سلول‌هایی تمایز نیافته‌ای هستند که از نظر مرحله تمایزی در حد واسط سلول‌های سوماتیک بالغ و سلول‌های بنیادی جنینی قرار دارند و حتی در پاساژهای پایین ژن‌های پرتوانی، از جمله OCT4 و SOX2 را بیان می‌کنند (۲۷-۲۹)، بنابراین ممکن است نسبت به سلول‌های سوماتیک بالغ کاندید مناسب‌تری برای بازبرنامه‌ریزی توسط بیش‌بیان فاکتورهای رونویسی پرتوانی باشند. تا به حال چند مطالعه در زمینه بیش‌بیان OCT4 و SOX2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شده که افزایش تکثیر و توان تمایزی سلول‌های ترنسفکت شده را نشان می‌دهد (۲۷-۳۰). مطالعه‌ی حاضر نیز با هدف بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی با استفاده از بیش‌بیان فاکتور رونویسی OCT4 و کاهش بیان P53 طراحی شد. این روش ممکن است توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی را برای کاربردهای درمانی بهبود بخشد.

#### مواد و روش‌ها

##### جداسازی سلول‌های بنیادی بافت چربی

سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی از بافت چربی زیرجلدی ناحیه شکمی زنانی به دست آمد که برای جراحی ابدومینوپلاستی به بیمارستان شریعتی و عرفان تهران مراجعه نمودند و هیچ سابقه بیماری قبلی نداشتند. پس از جراحی و اخذ رضایت از بیمار، نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای سترون و روی یخ به آزمایشگاه کشت سلول منتقل شد. مراحل کار با نمونه توسط کمیته اخلاق پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تأیید شد (کد تأییدیه 7-8-93/NIGEB). نمونه‌های چربی چندین بار با بافر فسفات سالین (PBS) حاوی آنتی‌بیوتیک شسته و با استفاده از تیغ جراحی سترون تا حد امکان ریز شد. بافت خردشده به درون یک بطری کوچک شیشه‌ای سترون حاوی مگنت و آنزیم کلاژناز I (Invitrogen) با غلظت ۰/۲ درصد منتقل شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی استیرر قرار گرفت. به این ترتیب، سلول‌ها در طی ۱۵-۲۰ دقیقه جداسازی شدند. سوسپانسیون سلولی با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵

### بررسی بیان ژن‌ها با روش Quantitative real-time PCR

در این مطالعه بیان ژن‌های پرتوانی بین دو گروه سلول‌های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با وکتور pCXLE- hOCT4/shp53 و سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور pCXLE-EGFP (گروه Mock یا کنترل) مقایسه شد. به این منظور، ۱ هفته پس از ترنسفکشن، RNA کل سلول‌ها با استفاده از کیت High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Germany) استخراج شد. ۱ میکروگرم از RNA برای ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo Fisher Scientific, USA) به کار رفت. برای انجام qPCR، از RealQ PCR Master (Ampliqon)، پرایمرهای اختصاصی ژن‌های هدف و ژن‌های GAPDH و ACTB به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۱). واکنش‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتر، طبق برنامه توصیه شده توسط شرکت ارائه‌کننده کیت تهیه و با استفاده از دستگاه Corbett Rotor-Gene™ 6000 real-time analyzer (Research, Australia) برای ۴۵ سیکل انجام شد. برای بررسی کمی بیان ژن‌ها از ۴ تکرار مختلف استفاده شد. میزان بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST (Qiagen) (2009 محاسبه و بین گروه‌ها مقایسه شد و نمودار نهایی با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel رسم گردید.

### ترنسفکشن سلول‌های بنیادی بافت چربی

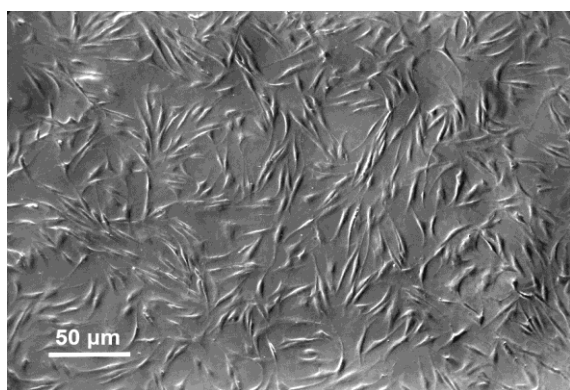
سلول‌ها در مرحله پاساژ ۳ و پس از رسیدن به تراکم ۸۰-۹۰ درصد با استفاده از آنزیم تریپسین جداسازی و در PBS فاقد کلسیم و منیزیم معلق و شمارش شدند. برای ترنسفکشن سلول‌های بنیادی بافت چربی از کیت نئون ترنسفکت (Neon Transfection; Invitrogen) و وکتور حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده P53 (pCXLE-) (shRNA; Adgene plasmid 27077) استفاده شد. همچنین، از آنجایی که وکتور فوق فاقد ژن گزارشگر بود، گروهی از سلول‌های بنیادی بافت چربی، به عنوان گروه کنترل، با وکتور بیانی حامل ژن GFP (pCXLE-) ترنسفکت شدند تا درصد سلول‌های ترنسفکت شده قابل ارزیابی و تخمین باشد. به منظور ترنسفکشن سلول‌های بنیادی بافت چربی، ۳۰۰ هزار سلول با R-Buffer موجود در کیت مخلوط و ۳ میکروگرم از پلاسמיד مورد نظر به آن اضافه شد. ترنسفکشن با استفاده از دستگاه Neon Transfection (Invitrogen) و با ولتاژ ۱۶۵۰ ولت، به مدت ۱۰ میلی ثانیه و به تعداد ۳ پالس انجام شد. ۴۸ ساعت پس از ترنسفکشن، محیط سلول‌ها تعویض شد و میزان بیان ژن GFP در سلول‌های ترنسفکت شده با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد. پس از گذشت ۷ روز، RNA سلول‌های ترنسفکت شده استخراج شد.

جدول ۱. توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای qPCR.

| Target | Forward                       | Reverse                      | Size | Accession   |
|--------|-------------------------------|------------------------------|------|-------------|
| ACTB   | 5'-CCTGGGCATGGAGTCTGT-3'      | 5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTTCG-3' | 153  | NM_001101   |
| GAPDH  | 5'-CAAATGAGCCCCAGCCTTCT-3'    | 5'-TCACCATCTTCCAGGAGCGA-3'   | 116  | NM_002046   |
| OCT4A  | 5'-GATGTGGTCCGAGTGTGGTT-3'    | 5'-AAGGGACCGAGGAGTACAGT-3'   | 202  | NM_002701   |
| SOX2   | 5'-AGAACCCCAAGATGCACAACT-3'   | 5'-TCCTTCTTCATGAGCGTCTTG-3'  | 184  | NM-003106   |
| KLF4   | 5'-ATTACCAAGAGCTCATGCCACC-3'  | 5'-GTGTGCCTTGAGATGGGAACT-3'  | 158  | NM-004235   |
| LIN28  | 5'-TTCCATGTGCAGCTTACTCT-3'    | 5'-CAGCAGTTTGCAGGTGGC-3'     | 228  | NM_024674   |
| REX1   | 5'-GAAACCCATTATCCCCAAAGAGT-3' | 5'-CCTCGTTCAGTGCCTTCTCTA-3'  | 137  | NM_020695   |
| NODAL  | 5'-TGGCTGGTGGAAAATCTCAATG-3'  | 5'-GCAGAAGATGTGGCAGTGGA-3'   | 165  | NM_018055   |
| CCND1  | 5'-AGGAGCTGCTGCAAATGGAG-3'    | 5'-GAACTTACATCTGTGGCACA-3'   | 182  | NM_053056.2 |

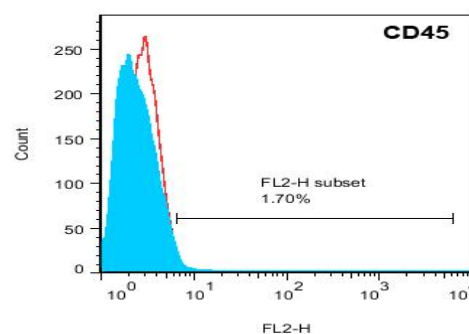
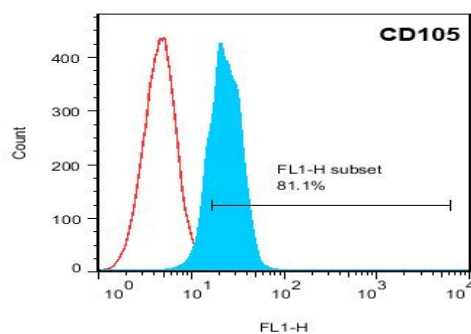
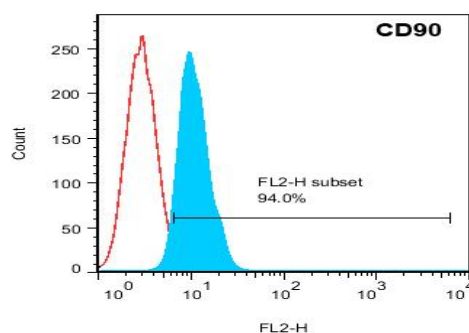
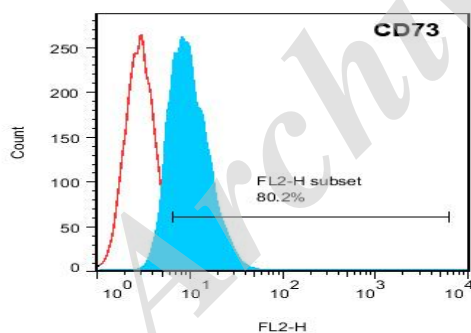
## نتایج

رنگ‌آمیزی رسوب‌های کلسیم به رنگ قرمز درآمد (شکل ۳، پانل‌های A و B). در محیط تمایز چربی، قطره‌های چربی از حدود روز ۵ تمایز ظاهر شدند. رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایز یافته با Oil red O تمایز این سلول‌ها را به سلول‌های چربی تایید کرد. با این رنگ‌آمیزی قطره‌های چربی به رنگ قرمز درآمد (شکل ۳، پانل‌های C و D).

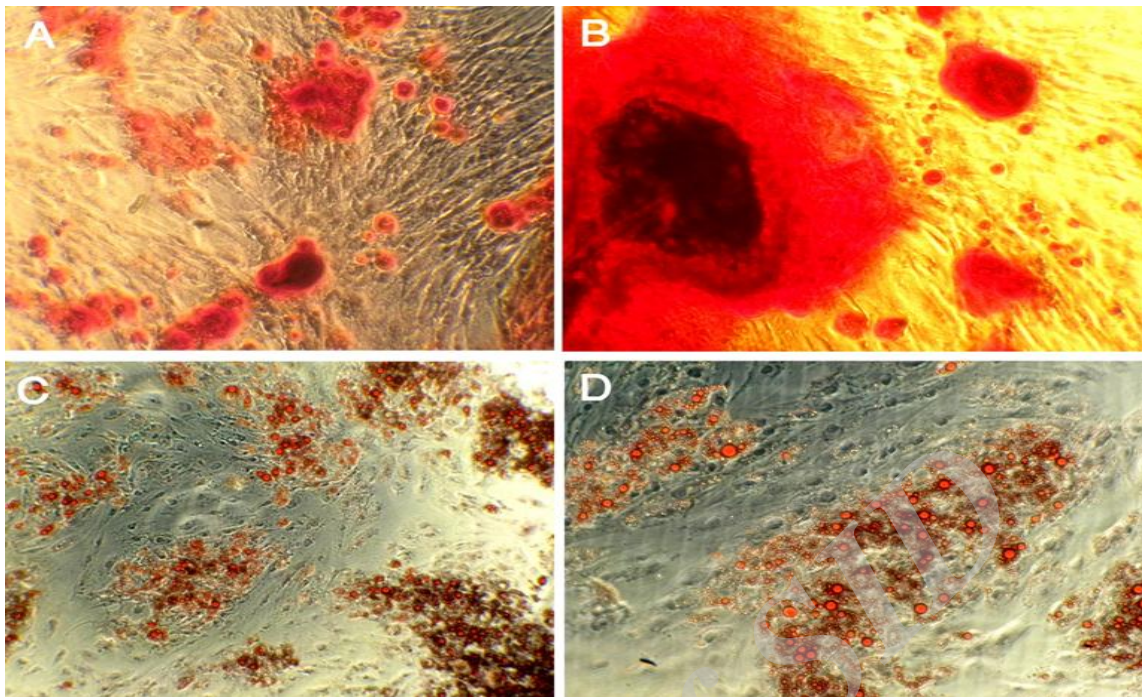


شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نوری فاز کنتراست سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ سوم.

جداسازی و شناسایی سلول‌های بنیادی بافت چربی سلول‌های بنیادی بافت چربی در طی چند ساعت پس از جداسازی به کف فلاسک‌های کشت سلول چسبیدند. این سلول‌ها در مرحله پاساژ سوم ظاهر فیرو بلاست مانند نشان دادند (شکل ۱). طبق نتایج فلوسیتومتری، ۹۴ درصد از سلول‌ها برای نشانگر CD90 مثبت بودند و نشانگرهای CD73 و CD105 به ترتیب در ۸۰/۲ و ۸۱/۱ درصد از سلول‌ها بیان شد. نشانگر CD45 فقط در ۱/۷ درصد از سلول‌ها بیان شد (شکل ۲). قابل ذکر است که پروتئین‌های CD90، CD73 و CD105 نشانگرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی و CD45 نشانگر سلول‌های بنیادی خون‌ساز هستند. برای بررسی توان تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی، این سلول‌ها در مرحله پاساژ ۳ به مدت ۳ هفته در محیط تمایز سلول‌های استخوانی (استئوسیت) و سلول‌های چربی (آدیپوسیت) کشت داده شدند. در محیط تمایز استخوانی، رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایز یافته با Alizarian red تمایز این سلول‌ها را به سلول‌های استخوانی (استئوسیت) تایید کرد. با این



شکل ۲. بررسی بیان نشانگرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CD73، CD90 و CD105) و خون‌ساز (CD45) در سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ سوم با روش فلوسیتومتری.



شکل ۳. تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی به سلول‌های استخوانی (A و B) و سلول‌های چربی (C و D) که به ترتیب با Oil Red O و Alizarian Red رنگ آمیزی شده‌اند.

کنترل) با روش qPCR مقایسه شد. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، یک هفته پس از بازبرنامه‌ریزی بیان ژن‌های پرتوانی OCT4A، SOX2 و LIN28 در سلول‌های بنیادی ترنسفکت شده با وکتور حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده P53 نسبت به گروه کنترل، به ترتیب به میزان ۷/۵۸۴ برابر ( $p=0.02$ )، ۲/۶۳۳ برابر ( $P=0.001$ ) و ۳/۰۶۲ برابر ( $P=0.006$ ) افزایش یافت. به علاوه، بیان ژن‌های REX1، CCND1 و C-MYC در سلول‌های بنیادی ترنسفکت شده با وکتور حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده P53 به ترتیب ۲/۵۸۹ برابر ( $P=0.001$ )، ۱/۶۱ برابر ( $P=0.007$ ) و ۱/۴۱۹ برابر ( $P=0.009$ ) بیشتر از گروه کنترل بود، درحالی‌که در ژن‌های KLF4 و NODAL تغییر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ( $P>0.05$ ).

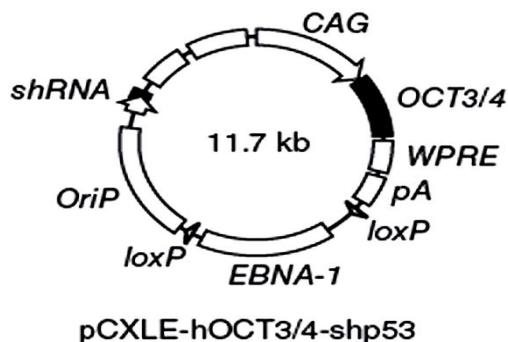
#### ترنسفکشن سلول‌های بنیادی بافت چربی با وکتور حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده P53

سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ ۳ با وکتور بیانی حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده P53 (شکل ۴، پانل A) ترنسفکت شدند. همچنین، از وکتور بیانی حامل ژن GFP به عنوان وکتور Mock (گروه کنترل) استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از ترنسفکشن، بیان پروتئین GFP با میکروسکوپ فلورسنت در ۲۵-۲۰ درصد سلول‌ها مشاهده شد (شکل ۴، پانل B).

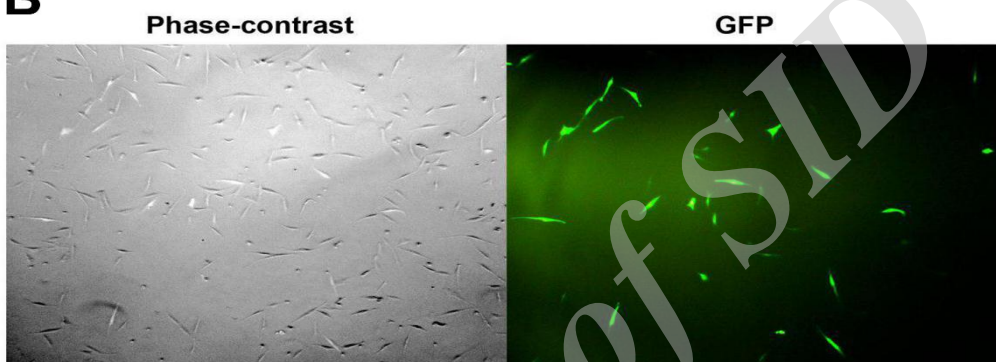
#### بررسی بیان ژن‌های پرتوانی به روش qPCR

در این مطالعه، سطح بیان ژن‌های OCT4A، SOX2، LIN28، REX1، CCND1، KLF4، NODAL و C-MYC بین سلول‌های بنیادی ترنسفکت شده با وکتور حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده P53 و سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور بیانی حامل ژن GFP (گروه

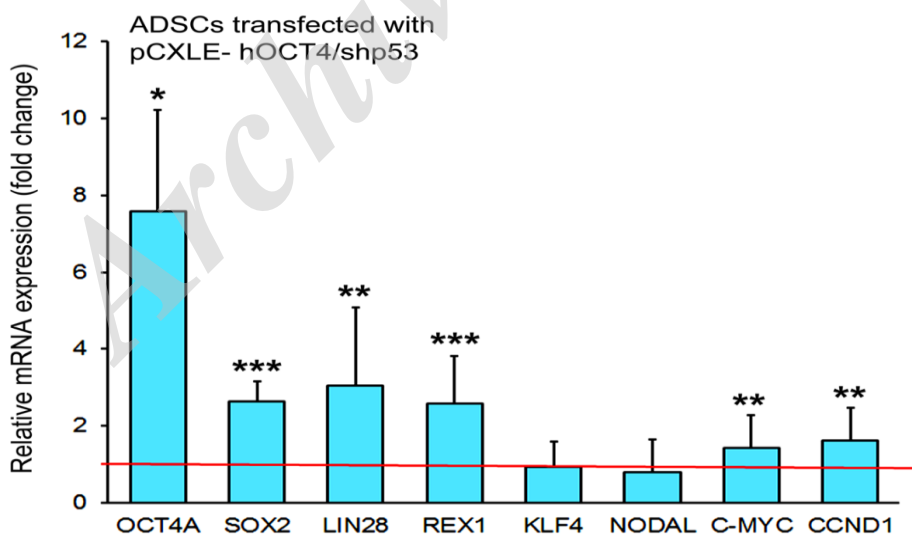
A



B



شکل ۴. (A) نقشه وکتور بیانی pCXLE- hOCT4/shp53 مورد استفاده در این مطالعه. (B) تصویر سلول‌های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با وکتور بیانی pCXLE- EGFP که بیان پروتئین EGFP را ۴۸ ساعت پس از ترنسفکشن نشان می‌دهد. سمت چپ تصویر فازکنتراست و سمت راست تصویر فلورسنت سلول‌ها را نشان می‌دهد.



شکل ۵. مقایسه کمی بیان ژن‌های OCT4A, SOX2, LIN28, REX1, KLF4, NODAL, C-MYC و CCND1 بین سلول‌های بنیادی ترنسفکت شده با وکتور حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده P53 و سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور بیانی حامل ژن GFP (گروه کنترل) به روش qPCR. سطح بیان ژن‌ها در گروه کنترل ۱ در نظر گرفته شده و با خط قرمز نشان داده شده است. مواردی که اختلاف بین دو گروه معنی‌دار است با ستاره مشخص شده است. (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  و \*\*\*  $P < 0.001$ ).

## بحث

بیشتر از روش لیپوفکشن است. همچنین در این روش درصد بالایی از سلول‌ها زنده می‌مانند و تعداد سلول کمتری مورد نیاز است. این ویژگی‌ها بزرگ‌ترین مزیت این سیستم به شمار می‌رود (۳۶).

OCT4 یکی از فاکتورهای رونویسی است که طی تحقیقات گذشته به‌عنوان مهم‌ترین ژن در مسیرهای مولکولی درگیر در پرتوانی شناخته شده است. در سال ۲۰۱۶، Zhou و همکارانش (۳۷) نشان دادند که OCT4 به تنهایی می‌تواند سلول‌های بنیادی عصبی را به سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده بازبرنامه‌ریزی نماید. در واقع، OCT4 تنها فاکتور اجباری برای بازبرنامه‌ریزی است و سایر فاکتورها نقش افزایش‌دهنده بازده بازبرنامه‌ریزی را برعهده دارند (۲۱). از طرفی، گزارش‌های پیشین نشان می‌دهد که افزایش بیان ژن P53 نقش بسزایی در سرکوب پرتوانی دارد (۲۶، ۳۸). استفاده از عوامل کاهش‌دهنده بیان ژن P53 باعث افزایش بازده بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بنیادی سوماتیک می‌شود. به‌عنوان مثال، بیان shRNA مهارکننده ژن P21 که تنظیم‌کننده ژن P53 است، کارایی بازبرنامه‌ریزی را حدود سه برابر افزایش می‌دهد (۳۸). در مطالعه ما نیز وکتور مورد استفاده برای بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بنیادی بافت چربی حامل OCT4 و یک shRNA مهارکننده بیان P53 بود. در این مطالعه فرض کردیم که بیش‌بیان ژن OCT4 از طریق شبکه ارتباطی پیچیده‌ای که با سایر ژن‌های پرتوانی تشکیل می‌دهد، بیان آنها را افزایش می‌دهد و shRNA مهارکننده بیان P53 نیز بازبرنامه‌ریزی سلول‌ها را تسهیل می‌کند؛ بنابراین، یک هفته پس از ترنسفکشن، بیان ژن OCT4 و سایر ژن‌های پرتوانی را در سلول‌های ترنسفکت شده، با روش qPCR بررسی کردیم.

طبق نتایج به دست آمده، سطح بیان ژن OCT4A در روز هفتم پس از انجام ترنسفکشن به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین بیان ژن‌های SOX2، LIN28 و C-MYC در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور حامل ژن

ویژگی‌های پرتوانی و خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی توسط یک شبکه رونویسی منحصر به فرد، شامل OCT4، SOX2، NANOG، LIN28 و KLF4، کنترل می‌شود (۳۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز فاکتورهای پرتوانی را در سطح پایین بیان می‌کنند، اما بیان فاکتورهای پرتوانی طی کشت طولانی مدت و پاساژ مکرر این سلول‌ها کاهش می‌یابد و سلول‌ها به سمت افزایش بیان فاکتورهای تمایزی تمایل پیدا می‌کنند (۶، ۹، ۳۲).

سلول‌های بنیادی بافت چربی جزء سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌اند که به‌آسانی و با تعداد زیاد جداسازی و در محیط کشت به‌راحتی تکثیر می‌شوند. استفاده از این سلول‌ها در درمان با مشکلات اخلاقی و رد پیوند مواجه نیست (۳۳). تا به حال چندین مطالعه نشان داده است که سلول‌های بنیادی بافت چربی ژن‌های پرتوانی متعدد، مانند OCT4، SOX2، NANOG، UTF1 و NODAL را بیان می‌کنند (۵-۸، ۳۴) که باعث می‌شود کاندید مناسبی برای بازبرنامه‌ریزی و تولید سلول‌های بنیادی پرتوان باشند. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی بافت چربی با بیش‌بیان فاکتور رونویسی OCT4 و کاهش بیان ژن P53 توسط shRNA مهارکننده آن بازبرنامه‌ریزی شدند. به این منظور از وکتور pCXLE-hOCT4/shp53 استفاده شد که در سال ۲۰۱۱ توسط تیم یاماناکا برای بازبرنامه‌ریزی سلول‌های فیبروبلاست و سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان انسانی به کار رفته بود (۳۵). در واقع این محققین سلول‌ها را با سه وکتور مختلف ترنسفکت کردند. وکتور اول که ما نیز در این مطالعه از آن استفاده کردیم، ژن OCT4 و یک shRNA مهارکننده ژن P53، وکتور دوم SOX2 و KLF4 و وکتور سوم C-MYC و LIN28 را بیان می‌کرد (۳۵).

در مطالعه حاضر برای ترنسفکشن سلول‌ها از روش الکتروپوریشن با دستگاه نئون ترنسفکشن (Neon Transfection) استفاده شد که بازده ترنسفکشن DNA خارجی در آن بالاتر و احتمال ادغام ژنومی ژن خارجی



می‌توان C-MYC را حذف کرد، اما کارایی و سرعت بازبرنامه‌ریزی کاهش می‌یابد (۴۵).

یکی از ژن‌های هدف OCT4 ژن REX1 (Reduced expression 1) است که طبق نتایج qPCR، در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده‌ی P53 نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد. در طی بازبرنامه‌ریزی، وجود REX1 در جلوگیری از تمایز اهمیت دارد. پروموتور REX1 یک جایگاه اتصال برای عوامل رونویسی درگیر در پرتوانی مانند OCT4، NANOG و KLF4 دارد (۴۶).

ژن CCND1 هم یکی از ژن‌هایی بود که بیان آن در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده‌ی P53 نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. این ژن در پیشرفت چرخه سلولی و ایجاد سرطان نقش دارد. بیان این ژن در ارتباط مستقیم با ژن OCT4 است. افزایش بیان ژن OCT4 باعث فعال شدن پروموتور ژن CCND1 و در نهایت باعث افزایش بیان این ژن می‌شود و به پیشرفت چرخه سلولی کمک می‌کند (۴۷).

بیان دو ژن KLF4 و NODAL تغییر معنی‌داری را در سلول‌های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با وکتور حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده‌ی P53 نسبت به گروه کنترل نشان نداد. قابل ذکر است که فاکتور رونویسی KLF4 در بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک و حفظ ویژگی‌های خودنوزایی و پرتوانی نقش دارد و از تمایز سلول‌های بنیادی جلوگیری می‌کند (۴۸). مسیر Activin/Nodal هم از آبشارهای پیام‌رسان شناخته شده در کنترل پرتوانی و تمایز سلول‌های بنیادی است (۴۹). ممکن است القای بیان ژن‌های KLF4 و NODAL به زمان بیشتری پس از ترنسفکشن نیاز داشته باشد. در هر حال، افزایش بیان برخی از ژن‌های پرتوانی، نه تمام آنها، در سلول‌های بنیادی بافت چربی بازبرنامه‌ریزی شده، نشان‌دهنده تمایزدایی نسبی این سلول‌ها به‌وسیله وکتور حامل ژن OCT4 و shRNA مهارکننده P53 است.

OCT4 و shRNA مهارکننده‌ی P53 نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد. درباره چگونگی این تغییرات باید اشاره شود که بیان ژن SOX2 با ژن OCT4 در ارتباط است. SOX2 در حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی نقش اساسی دارد. حذف SOX2 یا استفاده از RNA تداخل‌کننده و جلوگیری از بیان SOX2، پرتوانی سلول‌ها را به‌طور قابل‌توجهی دچار مشکل می‌کند. در سلول‌های بنیادی موش نشان داده شده است که SOX2 همراه با OCT4 در تنظیم رونویسی ژن‌های پرتوانی کلیدی نقش دارد (۳۹). این دو ژن به شکل یک مجموعه دوتایی عمل می‌کنند و با فعال کردن عوامل هسته‌ای دیگر باعث سرکوب ژن‌های دخیل در تمایز و فعال شدن بیان ژن‌های پرتوانی می‌شوند (۴۰). به عنوان مثال، هتروداپمر SOX2-OCT4 به پروموتور NANOG متصل و باعث فعال شدن بیان این ژن می‌شود (۴۱).

LIN28 یکی از عوامل درگیر در پرتوانی است که همراه با OCT4، SOX2 و NANOG باعث افزایش بازده بازبرنامه‌ریزی سلول‌های فیبروبلاست انسانی به سلول‌های پرتوان می‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که LIN28 تنظیم‌کننده‌ی منفی LET-7 است و بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک را به‌وسیله‌ی جلوگیری از تمایز وابسته به LET-7 تسریع می‌بخشد (۴۲). بیان بیش‌ازحد LIN28 به افزایش بیان انکوژن C-MYC در سلول‌های در حال بازبرنامه‌ریزی منجر می‌شود (۴۳).

ژن C-MYC یک پروتوانکوژن بسیار قوی است که بیان آن در بسیاری از سرطان‌ها افزایش می‌یابد. این ژن به ناحیه‌ای از DNA موسوم به E-BX (Enhancer box) متصل می‌شود و هیستون استیل ترانسفرازها را به کار می‌گیرد (۴۴). همچنین این ژن بیان تلومراز را در سلول‌های iPS انسانی افزایش می‌دهد. به‌طورکلی، به نظر می‌رسد که C-MYC و KLF4 ساختار کروماتین را تغییر می‌دهند تا OCT4 و SOX2 به ژن‌های هدف که به‌طور طبیعی با مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک خاموش شده‌اند، متصل شوند و آن‌ها را فعال کنند. برای تولید سلول‌های iPS

## نتیجه‌گیری

نظر می‌رسد که بیش بیان ژن OCT4 و مهار همزمان ژن P53 با استفاده از وکتورهای غیر الحاقی روشی ساده برای ایجاد سلول‌های کمتر تمایز یافته از سلول‌های بنیادی بافت چربی و احتمالاً سایر سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشد و ممکن است توان تمایزی این سلول‌ها را برای کاربردهای درمانی افزایش دهد.

به‌طور خلاصه، نتایج این مطالعه نشان داد که ترنسکشن سلول‌های بنیادی بافت چربی با وکتور اپی‌زومال بیان‌کننده ژن OCT4 و shRNA مهارکننده ژن P53 باعث افزایش بیان ژن‌های پرتوانی OCT4، SOX2، LIN28، REX1، CCND1 و C-MYC می‌شود که نقش مثبت این وکتور را در بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بنیادی بافت چربی به سمت حالت پرتوانی نشان می‌دهد. به

## منابع

- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7: 211-28.
- Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Engineering* 2001; 7: 729-41.
- Miyamoto K, Furusawa T, Ohnuki M, Goel S, Tokunaga T, Minami N, et al. Reprogramming events of mammalian somatic cells induced by *Xenopus laevis* egg extracts. *Molecular Reproduction and Development* 2007; 74: 1268-77.
- Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2002; 109: 199-209; discussion 10-1.
- Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; 25: 3143-54.
- Peroni D, Scambi I, Pasini A, Lisi V, Bifari F, Krampera M, et al. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Experimental Cell Research* 2008; 314: 603-15.
- Simerman AA, Dumesic DA, Chazenbalk GD. Pluripotent muse cells derived from human adipose tissue: a new perspective on regenerative medicine and cell therapy. *Clinical and Translational Medicine* 2014; 3:12.
- Taha MF, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue and Cell* 2010; 42: 211-6.
- Faghieh H, Javeri A, Taha MF. Impact of early subcultures on stemness, migration and angiogenic potential of adipose tissue-derived stem cells and their resistance to in vitro ischemic condition. *Cytotechnology* 2017; 69:885-900.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369-74.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-3.
- Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005; 309: 1369-73.
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology: CB* 2001; 11: 1553-8.
- Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 2005; 16: 5719-35.
- Mostafavi-Pour Z, Keihani S, Talaei-Khozani T, Mokaram P, Fardaei M, Rohani L, et al. Expression of a2, a5 and a6 subunits of integrin in de-differentiated NIH3T3 cells by cell-free extract of embryonic stem cells. *Molecular Biology Reports* 2012; 39: 7339-46.
- Zhan W, Liu Z, Liu Y, Ke Q, Ding Y, Lu X, et al. Modulation of rabbit corneal epithelial cells fate using embryonic stem cell extract. *Molecular Vision* 2010; 16: 1154-61.

17. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors *Cell* 2007; 131: 861-72.
18. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
19. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
20. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clinical Cancer Research* 2012; 18: 5546-53.
21. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947-56.
22. Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, et al. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Research* 2011; 21: 196-204.
23. Tapia N, Schöler HR. p53 connects tumorigenesis and reprogramming to pluripotency. *The Journal of Experimental Medicine* 2010; 207: 2045-8.
24. Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, et al. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 475-9.
25. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 2009; 460: 1132-5.
26. Ebrahimi B. Reprogramming barriers and enhancers: strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency. *Cell Regeneration* 2015; 4: 10.
27. Liu TM, Wu YN, Guo XM, Hui JH, Lee EH, Lim B. Effects of ectopic Nanog and Oct4 overexpression on mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 2009; 18: 1013-22.
28. Yoon DS, Kim YH, Jung HS, Paik S, Lee JW. Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Proliferation* 2011; 44: 428-40.
29. Han SM, Han SH, Coh YR, Jang G, Chan Ra J, Kang SK, et al. Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Experimental and Molecular Medicine* 2014; 46: e101.
30. Go MJ, Takenaka C, Ohgushi H. Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Experimental Cell Research* 2008; 314: 1147-54.
31. Marson A, Foreman R, Chevalier B, Bilodeau S, Kahn M, Young RA, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 132.
32. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-9.
33. Kitada M, Dezawa M. Parkinson's disease and mesenchymal stem cells: potential for cell-based therapy. *Parkinson's Disease* 2012; 2012: 873706.
34. Pitrone M, Pizzolanti G, Tomasello L, Coppola A, Morini L, Pantuso G, et al. NANOG Plays a Hierarchical Role in the Transcription Network Regulating the Pluripotency and Plasticity of Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18. pii: E1107.
35. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods* 2011; 8: 409-12.
36. Moore JC, Atze K, Yeung PL, Toro-Ramos AJ, Camarillo C, Thompson K, et al. Efficient, high-throughput transfection of human embryonic stem cells. *Stem Cell Research and Therapy* 2010; 1: 23.
37. Zhou S, Liu Y, Feng R, Wang C, Jiang S, Zhang X, et al. Survivin Improves Reprogramming Efficiency of Human Neural Progenitors by Single Molecule OCT4. *Stem Cells International* 2016; 2016: 4729535.
38. Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009; 460: 1140-4.
39. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* 2007; 9: 625-35.
40. Adachi K, Nikaido I, Ohta H, Ohtsuka S, Ura H, Kadota M, et al. Context-dependent wiring of Sox2 regulatory networks for self-renewal of embryonic and trophoblast stem cells. *Molecular Cell* 2013; 52: 380-92.

41. Rodda DJ, Chew J-L, Lim L-H, Loh Y-H, Wang B, Ng H-H, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 24731-7.
42. Zheng K, Wu X, Kaestner KH, Wang PJ. The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Developmental Biology* 2009; 9: 38.
43. Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009; 460: 1140-4.
44. Nair SK, Burley SK. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA: molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* 2003; 112: 193-205.
45. Welstead GG, Brambrink T, Jaenisch R. Generating iPS cells from MEFS through forced expression of Sox-2, Oct-4, c-Myc, and Klf4. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 2008 (14). pii: 734.
46. Son MY, Choi H, Han YM, Cho YS. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem Cells* 2013; 31: 2374-87.
47. Li Z, Li X, Li C, Su Y, Fang W, Zhong C, et al. Transcription factor OCT4 promotes cell cycle progression by regulating CCND1 expression in esophageal carcinoma. *Cancer Letters* 2014; 354: 77-86.
48. Zhang P, Andrianakos R, Yang Y, Liu C, Lu W. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 9180-9.
49. Chng Z, Vallier L, Pedersen R. Activin/nodal signaling and pluripotency. *Vitamins and Hormones* 2011; 85: 39-58.

## Study of the exogenous induction of *OCT4* and concomitant *P53* inhibition on the expression of pluripotency genes in human ADSCs

Atefeh Rashidipour<sup>1,2</sup>, Arash Javeri<sup>1</sup>, Masoumeh Fakhr Taha<sup>1\*</sup>

1. Department of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
2. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

\* Corresponding author e-mail: mftaha@nigeb.ac.ir

### Abstract

**Background and Objective:** *OCT4* is the most important transcription factor for reprogramming of somatic cells and maintenance of pluripotency. Moreover, it has recently been shown that loss of *P53* or its mutations improve the efficiency of reprogramming. This study was designed to reprogram human adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) by overexpression of *OCT4* and inhibition of *P53* expression.

**Materials and Methods:** The ADSCs were isolated from abdominal fat tissue of patients who underwent cosmetic abdominoplasty. For characterization of the ADSCs, the expression of some mesenchymal stem cell markers was assessed by flow cytometry and the cells were differentiated into osteogenic and adipogenic lineages. The third-passaged ADSCs were transfected with a plasmid expressing *OCT4* and a *P53*-shRNA. One week after transfection, the expression of pluripotency genes was studied by quantitative real-time PCR.

**Results:** The third-passaged ADSCs showed a fibroblast-like morphology. Meanwhile, 94%, 80.2%, and 81.1% of the ADSCs showed positive staining for CD90, CD73 and CD105 markers, respectively. Moreover, the ADSCs showed adipogenic and osteogenic differentiation. As revealed by qPCR analysis, the expression of *OCT4*, *SOX2*, *LIN28*, *REX1*, *CCND1* and *C-MYC* mRNAs were significantly upregulated after transfection of the ADSCs with hOCT4/shp53 vector compared to the control group.

**Conclusion:** Overexpression of *OCT4* and inhibition of *P53* can improve reprogramming of the ADSCs toward a pluripotent state. This method may improve the differentiation capacity of the ADSCs for clinical applications.

**Keywords:** Adipose tissue-derived stem cells, Pluripotency, *OCT4*, shRNA, *P53* inhibition