Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2024; Vol. 48; No. 1

Investigating the Effect of miR-302/367 Cluster Overexpression on the Expression of mTOR Signaling Pathway Genes in Human Adipose Tissue- Derived Stem Cells

Maryam Khani[1,2], Arash Javeri[1], Arezoo Bazargani[1], Gilda Karimi[2], Masoumeh Fakhr Taha[1*]

1. Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, Institute for Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
2. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Received: August 23, 2023; Accepted: December 10, 2023

Abstract

Background and Aim: The miR-302/367 cluster plays a critical role in reprogramming of somatic cells into pluripotent stem cells and maintaining pluripotency. While, several studies have been conducted on the mechanism of miR-302/367 cluster in reprogramming, little research has been done specifically on the effect of this cluster on mTOR signaling pathway. The mTOR pathway not only controls various cellular processes, such as proliferation, differentiation and autophagy, but also plays a significant role in the reprogramming process. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of miR-302/367 cluster on the mTOR pathway in adipose tissue- derived stem cells (ADSCs).

Methods: In this experimental study, the third to fifth- passaged ADSCs were transfected with TDH101PA- GP vector expressing mir-302/367 cluster and the mock vector using a Neon Transfection Kit and Neon Transfection System. One week after transfection, the expression of some mTOR signaling molecules in the ADSCs was assessed by comparative Real- Time PCR. Relative gene expression between the miR-302/367 and mock groups (4 replicates) was calculated by REST 2009 software based on Pair Wise Reallocation Randomization Test. Also, the expression of some mTOR pathway proteins was assessed by western blot analysis.

Results: The overexpression of miR-302/367 cluster significantly reduced the expression of *AKT*, *MTOR*, *RAPTOR*, and *RICTOR* genes; the expression of these genes in the miR-302/367 transfection group compared to the mock group decreased to 0.44, 0.51, 0.56 and 0.6, respectively ($P< 0.05$). The expression of genes in the mock group was assumed as one. Also, as revealed by western blot analysis, the expression of phosphorylated AKT and phosphorylated MTOR proteins decreased in the ADSCs transfected with miR- 302/367 cluster compared to the mock group.

Conclusion: Overexpression of the miR-302/367 cluster appears to inhibit the activity of the mTOR signaling pathway in ADSCs affecting the cell reprogramming through this mechanism.

Keywords: miR-302/367 cluster; Transfection; mTOR pathway; ADSC; *AKT* gene; *MTOR* gene; *RICTOR* gene; *RAPTOR* gene; Phosphorylated AKT; Phosphorylated MTOR

Please cite this article as: Khani M, Javeri A, Bazargani A, Karimi G, Fakhr Taha M. Investigating the Effect of miR-302/367 Cluster Overexpression on the Expression of mTOR Signaling Pathway Genes in Human Adipose Tissue- Derived Stem Cells. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(1):28-37.

[*]**Corresponding Author:** Masoumeh Fakhr Taha; **Email:** mftaha@nigeb.ac.ir

Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, Institute for Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۸، شماره ۱، سال ۱۴۰۳ شمسی، صفحات ۲۸ تا ۳۷

بررسی تأثیر بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 بر بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسان mTOR در سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی

مریم خانی[۱،۲]، آرش جاوری[۱]، آرزو بازرگانی[۱]، گیلدا کریمی[۲]، معصومه فخرطه[۱*]

۱- گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران.
۲- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: کلاستر miR-302/367 نقش مهمی در بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک به سلول‌های بنیادی پرتوان و حفظ پرتوانی ایفا می‌کند. تا به حال، مطالعه‌های متعددی در زمینه مکانیسم عمل کلاستر miR-302/367 در بازبرنامه‌ریزی انجام شده، اما یافته چندانی درباره تأثیر اختصاصی این کلاستر بر مسیر پیام‌رسان mTOR وجود ندارد. مسیر mTOR علاوه بر کنترل روندهای سلولی مختلف، نظیر تکثیر، تمایز و اتوفاژی، نقش مهمی را در فرآیند بازبرنامه‌ریزی برعهده دارد. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف شناسایی تأثیر کلاستر miR-302/367 روی مسیر mTOR در سلول‌های بنیادی بافت چربی طراحی شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ سوم تا پنجم با استفاده از کیت و سیستم ترنسفکشن نئون با وکتور TDH101PA-GPبیان‌کننده کلاستر mir-302/367 و وکتور Mock ترنسفکت شدند. یک هفته پس از ترنسفکشن، بیان برخی از ژن‌های مسیر پیام‌رسان mTOR در سلول‌های بنیادی بافت چربی با روش Real-Time PCR مقایسه‌ای بررسی شد. نسبت بیان ژن‌ها در گروه‌های miR-302/367 و Mock (۴ تکرار) با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 و آزمون Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test بین دو گروه مقایسه شد. همچنین، بیان برخی از پروتئین‌های مسیر mTOR با روش وسترن بلات ارزیابی شد.

یافته‌ها: بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 سبب کاهش معنادار در بیان ژن‌های *AKT*، *MTOR*، *RAPTOR* و *RICTOR* شد، به طوری که بیان این ژن‌ها در گروه miR-302/367 نسبت به گروه Mock به ترتیب به ۰/۴۴، ۰/۵۱، ۰/۵۶ و ۰/۶ کاهش یافت ($P<0.05$). بیان ژن‌ها در گروه Mock یک در نظر گرفته شد. همچنین، طبق بررسی وسترن بلات بیان پروتئین‌های AKT فسفریله و MTOR فسفریله در سلول‌های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با کلاستر miR-302/367 کمتر از گروه Mock بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که بیش بیان خوشه miR-302/367 می‌تواند فعالیت مسیر پیام‌رسان mTOR را در سلول‌های بنیادی بافت چربی مهار کند و با این مکانیسم بازبرنامه‌ریزی سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد.

واژگان کلیدی: کلاستر miR-302/367، ترنسفکشن؛ مسیر mTOR؛ سلول‌های بنیادی بافت چربی؛ ژن *AKT*؛ ژن *MTOR*؛ ژن *RAPTOR*؛ ژن *RICTOR*؛ AKT فسفریله؛ MTOR فسفریله

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Khani M, Javeri A, Bazargani A, Karimi G, Fakhr Taha M. Investigating the Effect of miR-302/367 Cluster Overexpression on the Expression of mTOR Signaling Pathway Genes in Human Adipose Tissue- Derived Stem Cells. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(1):28-37.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات: معصومه فخرطه؛ **آدرس پست الکترونیکی:** mftaha@nigeb.ac.ir
گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، بلوار پژوهش، تهران، ایران.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

مقدمه

MicroRNAها (miRNAs) یک گروه ازRNA های غیر کدکننده (ncRNAs) با طول حدود ۱۸-۲۲ نوکلئوتید هستند که به عنوان تنظیم‌کننده اصلی بیان ژن در سطح پس از رونویسی عمل می‌کنند (۱). miRNAها به ناحیه 3'UTR منطقه کدکننده mRNA هدف متصل می‌شوند و سبب مهار ترجمه یا تخریب mRNA می‌شوند (۲). microRNAها در فرآیندهای زیست‌شناختی مختلف، ازجمله بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک و تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده، نقش دارند. مطالعه‌های پیشین نشان داده است که چندین گروه از miRNAها، از جمله کلاسترهای miR-302/367 و miR-371، به طور اختصاصی در سلول‌های بنیادی پرتوان بیان می‌شوند و بیان آنها با تمایز کاهش می‌یابد و در بافت‌های بالغ خاموش می‌شود (۳). این miRNAها کارایی بازبرنامه‌ریزی توسط فاکتورهای یاماناکا (OCT4، SOX2، KLF4 و C-MYC) را افزایش می‌دهند یا می‌توانند جایگزین یک یا چند فاکتور نسخه برداری ضروری برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده شوند (۴).

کلاستر miR-302/367 شامل پنج عضو miR-302a، miR-302b، miR-302c، miR-302d و miR-367 است. این کلاستر در یک اینترون از ژن LARP7 روی کروموزوم ۴ انسانی قرار دارد. کلاستر miR-302/367 در سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی پرتوان القاشده (iPSC) بیان بالایی دارد و بیان آن در طول تمایز کاهش می‌یابد (۵). مطالعه‌های پیشین نشان داده است که بیان کلاستر miR-302/367 توسط فاکتورهای نسخه‌برداری خاص پرتوانی القا می‌شود (۶) و به حفظ پرتوانی در سلول‌های بنیادی جنینی کمک می‌کند (۹-۷). همچنین، کلاستر miR-302/367 نقش مهمی در بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک به سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) ایفا می‌کند (۱۲-۱۰). طبق یافته‌های موجود، بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی را با مهار انتقال اپیتلیال به مزانشیمی (EMT)، القای تکثیر، تغییرهای اپی ژنتیک و هدف قرار دادن مسیرهای مختلف مانند مسیرTGF-β تسهیل می‌کند (۱۱، ۱۲). همچنین، miR-302 سبب مهار مرگ سلولی ناشی از اکسیدان در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی می‌شود (۱۳).

با وجود مطالعه‌های متعددی که پیشتر به بررسی مکانیسم عمل کلاستر miR-302/367 در القای بازبرنامه‌ریزی و تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القاشده پرداخته است (۱۱، ۱۲، ۱۴)، یافته چندانی در زمینه تأثیر اختصاصی این کلاستر بر مسیر پیام‌رسان mTOR در طی بازبرنامه‌ریزی وجود ندارد.

پروتئین هدف راپامایسین MTOR یک سرین ترئونین کیناز داخل سلولی با وزن مولکولی ۲۸۹ کیلو دالتون است که در سال ۱۹۹۴ در طی مطالعه مکانیسم اثر آن کشف شد. MTOR بخشی از دو مجموعه مجزا به نام mTORC1 (شامل mTOR، Raptor، mLST8 و PRAS40) و mTORC2 (شامل mTOR، Rictor، mLST8 و mSIN1) است و در کل عملکردهای متعددی را در سلول‌ها کنترل می‌کند که بیان ژن‌ها، ترجمه پروتئین، بیوژنز ریبوزم، رشد سلولی، تکثیر، پیری، متابولیسم سلولی، بقا و انواع مرگ سلولی، شامل آپوپتوز، اتوفاژی و نکروپتوز، از آن جمله‌اند (۱۵). اختلال در تنظیم مسیر پیام‌رسان mTOR با بیماری‌های مختلف، از جمله سرطان، مرتبط است. به علاوه، مسیر mTOR با مکانیسم های مختلف، ازجمله تنظیم اتوفاژی، پیری، تبدیل مزانشیمی به اپیتلیال (MET) و تکثیر، نقش مهمی در فرآیند بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک به سلول‌های بنیادی پرتوان القایی ایفا می‌کند (۲۰-۱۵).

در مطالعه‌های پیشین، AKT1 به عنوان یک هدف مستقیم miR-302 شناسایی شده (۲۱) و بیش از ۱۰۰ سوبسترای احتمالی برای AKT گزارش شده است (۳۰). یکی از سوبستراهای مهم AKT مجموعه پروتئینی TSC1/TSC2 است که در بالادست mTORC1 عمل می‌کند (۲۲) و نقش احتمالی کلاستر miR-302/367 را در تنظیم مسیر پیام‌رسانی mTOR در طی بازبرنامه‌ریزی مطرح می‌کند. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف تعین تأثیر کلاستر miR-302/367 بر بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسان mTOR در سلول‌های بنیادی بافت چربی طراحی شد. این پژوهش درسال ۱۴۰۱ در آزمایشگاه گروه

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری انجام شد.

روش کار

سلول‌های بنیادی بافت چربی مورد استفاده در این پژوهش تجربی پیشتر با استفاده از آنزیم کلاژناز از بافت چربی شکمی چهار خانم ۴۰ تا ۵۰ ساله، که در بیمارستان عرفان تهران تحت عمل جراحی ابدومینوپلاستی انتخابی قرار گرفتند، جداسازی و شناسایی شده بود (۲۳، ۲۴). مطالعه فوق توسط کمیته اخلاق پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (IR.NIGEB.EC.1400.2.26.B) تأیید شد.

سلول‌های بنیادی بافت چربی در ظروف کشت حاوی محیط کشت DMEM (DMEM, Gibco, Life Technologies, USA) با ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS, Gibco) کشت شدند. سلول‌ها پس از رسیدن به تراکم ۹۰-۸۰ درصد با استفاده از Trypsin-EDTA (۰/۲۵ درصد، شرکت GIBCO) پاساژداده شدند. سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ ۳ تا ۵ برای ترنسفکشن با وکتور TDH101PA-GP بیان کننده کلاستر miR-302/367 و وکتور Mock استفاده شدند. میزان تراکم سلول‌ها در روز ترنسفکشن حدود ۸۰-۷۰ درصد بود. ترنسفکشن با استفاده از Neon Transfection kit (شرکت Invitrogen) و طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده با استفاده از دستگاه Neon transfection system (شرکت Invitrogen) انجام گرفت. کارایی ترنسفکشن با میکروسکوپ فلوورسنت بررسی شد. با توجه به اینکه وکتور TDH101PA-GP دارای ژن مقاومت به پورومایسین است، برای حذف سلول‌هایی که وکتور را دریافت نکرده بودند، ۴۸ ساعت پس از الکتروپوریشن، محیط سلول‌ها تعویض و آنتی بیوتیک پوروماسین (Puromycin dihydrochloride , Bio Basic) با غلظت 1 µg /ml به محیط کشت اضافه شد.

بررسی بیان ژن‌ها در سلول‌های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با miR-302/367 با روش Real-time PCR

استخراج RNA از سلول‌های ترنسفکت شده با استفاده از کیت RNX Plus شرکت سیناکلون و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از استخراج RNA و تعیین غلظت آن با دستگاه نانودراپ، مقادیر مساوی RNA از گروه‌های ترنسفکشن با وکتور حاوی خوشه miR-302/367 و وکتورMock (۴ تکرار بیولوژیک) به وسیله کیت Sinaclon First Strand cDNA Synthesis Kit شرکت سیناکلون به cDNA تبدیل شد. برای بررسی کمی بیان ژن‌ها از Quantitative real-time PCR و آنالیز داده‌ها بر مبنای روش مقایسه‌ای استفاده شد. واکنش به وسیله کیت SYBR Green qPCR Master Mix از شرکت Ampliqon و با استفاده از cDNA سنتز شده و پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد بررسی (جدول ۱) انجام شد. از ژن‌های GAPDH و B2M به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. واکنش با دستگاه Rotor Gene-6000 Real-Time analyzer (Corbett Research, Australia) انجام شد. درنهایت، میزان بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار (Relative Expression Software Tool, Qiagen) REST 2009 محاسبه و با آزمون ®Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test بین گروه‌ها مقایسه شد (۲۵). نمودار نهایی با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel رسم شد .

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن‌ها با Real- time PCR.

Target	Accession	Forward	Reverse	Size
B2M	NM_004048	5’-TCCAGCGTACTCCAAAGATTCA-3'	5’-GTCAACTTCAATGTCGGATGGAT-3'	113
GAPDH	NM_002046	5’-TCACCATCTTCCAGGAGCGA-3'	5’-CAAATGAGCCCCAGCCTTCT-3'	116
RPTOR	NM_020761	5’-ATGAAGGATCGGATGAAGACAG-3'	5’-CTTTCTGAGGACCCATCGAC-3'	142
MTOR	NM_004958	5’-GAAATTTGATCAGGTGTGCCAG-3'	5’-ATACTGGGTATCTGTGAAGGCA-3'	133
AKT	NM_005163.2	5’-ACAAACGAGGGGAGTACATCAA-3’	5’-TCTTCATCAGCTGGCACTGC-3’	156
RICTOR	NM_152756	5’-ACTAGCACTTCAGAATCCAGAG-3'	5’-TCTACATCAGCTCGCACATACT-3'	168

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

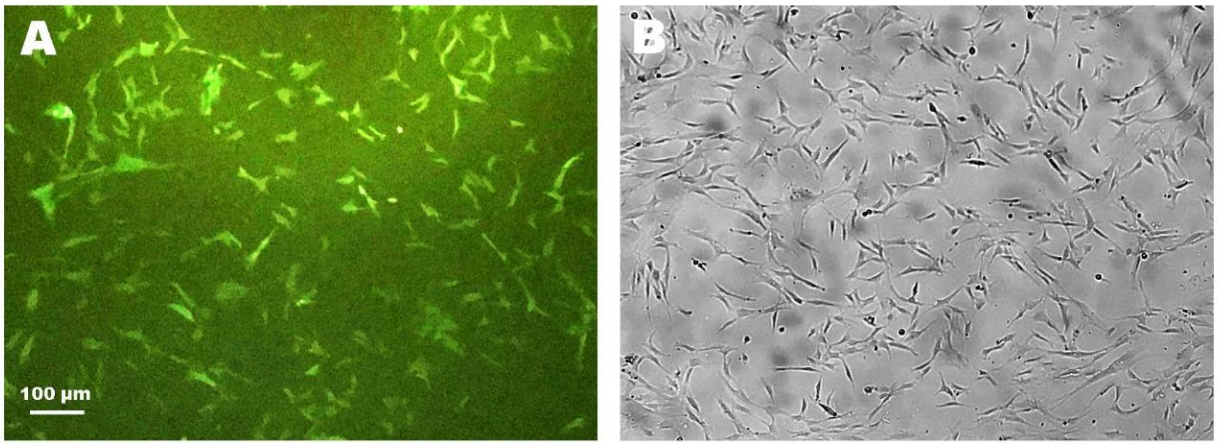
بررسی بیان پروتئین‌ها با وسترن بلات

در این مطالعه بررسی بیان پروتئین‌های MTOR، AKT، AKT-P و MTOR-P با وسترن بلات انجام شد. پروتئین سلول‌های تمایز یافته با استفاده از بافر RIPA حاوی مهار کننده‌های پروتئاز (Sigma) استخراج شد. غلظت پروتئین‌ها با روش Bradford اندازه‌گیری شد. از BSA به عنوان پروتئین استاندارد برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌ها استفاده شد. ۵۰ میکروگرم پروتئین از هر گروه روی ژل پلی اکریلامید ۱۰ درصد الکتروفورز شد. انتقال پروتئین از ژل به غشای PVDF با استفاده از سیستم ترنسفر BIO- RAD انجام شد. بلوکه کردن پروتئین‌های غیر اختصاصی با Skim milk ۵ درصد به مدت یک ساعت انجام گرفت. رنگ‌آمیزی با آنتی بادی‌های اولیه AKT (Elabscience; E-AB-30471)، mTOR (SantaCruz Biotechnology; sc-47778) و آنتی بادی ثانویه mouse anti-rabbit IgG-HRP (SantaCruz Biotechnology; sc-2357) انجام گرفت. برای مشاهده باندها از ECL Western Blotting kit شرکت سیتو متین ژن و فیلم رادیولوژی استفاده شد.

یافته‌ها

کشت و ترنسفکشن سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی (hADSCs)

سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ سوم تا پنجم با وکتور بیان‌کننده کلاستر miR-302/367 و وکتور Mock ترنسفکت شدند. شکل ۱، بیان GFP را در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور حاوی کلاستر miR-302/367 یک هفته پس از ترنسفکشن و انتخاب با آنتی بیوتیک پورومایسین نشان می‌دهد.



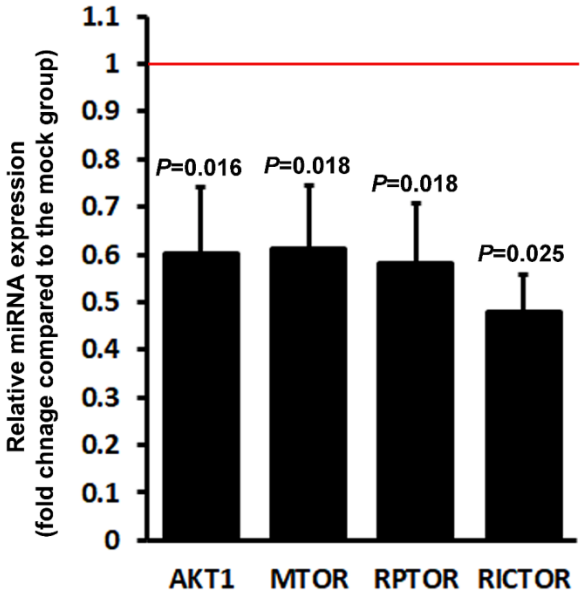
شکل ۱- بیان پروتئین GFP در سلول‌های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با وکتور بیان‌کننده خوشه miR-302/367 (A) و تصویر فازکنترست آن (B)، یک هفته پس از ترنسفکشن و انتخاب با آنتی‌بیوتیک پورومایسین.

مقایسه بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسان mTOR در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور حاوی miR-302/367 و وکتور Mock

تأثیر بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 بر بیان ژن‌های مسیر mTOR در سلول‌های بنیادی بافت چربی با Real- time PCR بررسی شد. طبق یافته‌های به دست آمده، در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور بیان‌کننده کلاستر miR-302/367 نسبت به گروه Mock، بیان ژن *AKT1* به ۰/۱۴ ± ۰/۶، بیان ژن *MTOR* به ۰/۱۳ ± ۰/۶۱، بیان ژن *RPTOR* به ۰/۱۲ ± ۰/۵۸ و بیان ژن *RICTOR* به ۰/۰۸ ± ۰/۴۸ کاهش یافت

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

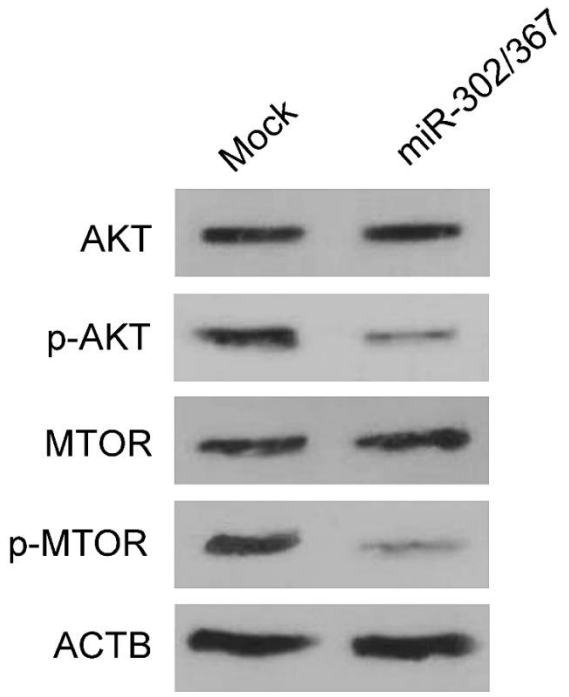
(*P*-value<0.05). بیان ژن‌ها در گروه کنترل ۱ در نظر گرفته شد (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه کمی بیان ژن‌های درگیر در مسیر پیام‌رسان mTOR در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور حاوی کلاستر miR-302/367 و وکتور Mock با روش qPCR یک هفته پس از ترنسفکشن. بیان ژن‌ها در گروه کنترل ۱ در نظر گرفته شده و با خط قرمز نشان داده شده است. بیان ژن‌ها در گروه miR-302/367 با Mean + SD و سطوح معناداری با *P*-value نشان داده شده است. مقادیر *P*-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار است.

بررسی بیان پروتئین‌های مسیر پیام‌رسان mTOR در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور حاوی miR-302/367 و وکتور Mock

بررسی بیان پروتئین‌های مسیر پیام‌رسان mTOR با وسترن بلات نشان داد که بیان AKT و MTOR در سلول‌های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با miR-302 نسبت به گروه Mock تغییر مشخصی ندارد، در حالی‌که بیان AKT فسفریله و MTOR فسفریله نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد (شکل ۲).



شکل ۲- بررسی بیان پروتئین‌های مسیر پیام‌رسان mTOR در سلول‌های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با وکتور حاوی کلاستر miR-302/367 و وکتور Mock با روش وسترن بلات، یک هفته پس از ترنسفکشن.

بحث

در مطالعه حاضر، بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 باعث کاهش بیان برخی از ژن‌های مسیر پیام‌رسانی mTOR، شامل *AKT*، *MTOR*، *RPTOR* و *RICTOR* و نیز کاهش پروتئین‌های AKT فسفریله و MTOR فسفریله در سلول‌های بنیادی بافت چربی شد. این تغییرها نشان‌دهنده نقش قابل توجه کلاستر miR-302/367 در تنظیم مسیر پیام‌رسانی mTOR است و اهمیت مسیر mTOR را به عنوان یکی از مکانیسم‌های عمل کلاستر miR-302/367 در بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک به سلول‌های بنیادی پرتوان مطرح می‌کند.

مطالعه‌های پیشین AKT1 را به عنوان یک هدف مستقیم miR-302 شناسایی کرده است. بیان بالای miR-302 در سلول‌های بنیادی پرتوان با هدف قرار دادن مستقیم 3'UTR

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

رونوشت AKT1 این ژن را سرکوب می‌کند و متعاقباً فاکتور پرتوانی OCT4 را در سطح بالایی حفظ می‌کند (۲۱). AKT یک سرین ترئونین کیناز مهم در پایین دست PIP3 است. AKT از طریق اتصال قلمرو PH خود به PIP3 به غشاء جذب می‌شود و به دنبال فسفریله شدن توسط PDK1 (کیناز وابسته به phosphoinositide-۳)، کمپلکس راپامایسین حساس به mTOR (mTORC2) یا کینازهای دیگر فعال می‌شود. در این مطالعه ژن AKT1 در نتیجه بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 کاهش یافت که منطبق بر مطالعه‌های پیشین است (۲۱). به علاوه، اگرچه به نظر می‌رسد که بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 تأثیری بر بیان پروتئین AKT غیر فسفریله نداشت، پروتئین AKT فسفریله را به میزان مشخصی کاهش داد. بنابراین، به نظر می‌رسد که کلاستر miR-302/367 از فسفریله و فعال شدن پروتئین AKT جلوگیری می‌کند (۲۲).

FOXO و TSC2 (کمپلکس توبروس اسکلروزیس ۲) دو هدف اصلی AKT هستند. TSC1 (هامارتین) و TSC2 (توبرین) مجموعه‌ای را تشکیل می‌دهند که فعالیت پروتئین G کوچک RHEB را مهار می‌کند (۲۲). در سال ۲۰۰۵، Long و همکارانش نشان دادند که TOR complex 1 هدف مستقیم RHEB-GTP است که اتصال آن سبب فعال شدن TOR کیناز می‌شود. در واقع، RHEB از طریق میانکنش با هر دوی قلمرو کاتالیتیک mTOR و LST8 به مجموعه TOR متصل می‌شود. اتصال Rheb-GTP به mTOR سبب فعال شدن فعالیت کینازی mTOR می‌شود (۲۶). علاوه بر این، AKT پروتئین PRAS40 را فسفریله می‌کند و در نتیجه اثر بازدارندگی PRAS40 را روی mTOR و کمپلکس mTORC1 کاهش می‌دهد (۲۶). با توجه به کاهش AKT در سلول‌های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با وکتور بیان‌کننده کلاستر miR-302/367، به نظر می‌رسد که کاهش رونوشت‌های *MTOR* و نیز کاهش فرم فسفریله پروتئین MTOR در مطالعه ما قابل توجیه است.

mTOR بخشی از دو مجموعه مجزا به نام mTORC1 (شامل mTOR، Raptor، mLST8 و PRAS40) و mTORC2 (شامل mTOR، Rictor، mLST8 و mSIN1) را تشکیل می‌دهد. mTORC1 به راپامایسین حساس است و سنتز و ترجمه پروتئین را حداقل تا حدی از طریق تأثیر بر دو جزء مهم ماشین سنتز پروتئین، شامل 4E-BP1 و p70S6 کیناز، افزایش می‌دهد (۱۵). این فرایند در نهایت mTORC1 را قادر می‌سازد تا بر تکثیر، رشد سلولی و اتوفاژی تأثیر بگذارد (۲۷). در مطالعه حاضر، یکی از ژن‌هایی که بیان آن در نتیجه بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 کاهش یافت RAPTOR بود. RAPTOR با عمل کردن به عنوان داربستی برای فراخواندن سوبستراهای TORC1 عملکرد mTORC1 را تنظیم می‌کند (۲۸).

mTORC2 مانند mTORC1 حاوی پروتئین mLST8 است، اما به جای RAPTOR از پروتئین‌های RICTOR (همراه غیر حساس به راپامایسین mTOR) و SIN1 (پروتئین تعاملی پروتئین کیناز فعال شده با استرس) تشکیل شده است. به نظر می‌رسد که RICTOR و SIN1 از طریق اتصال یکدیگر را تثبیت می‌کنند و شالوده ساختاری mTORC2 را می‌سازند. mTORC2 کیناز انکوژنی AKT را در S473 فسفریله می‌کند، چیزی که همراه با فسفوریله شدن با واسطه PDK1 پروتئین AKT در T308 سبب فعال شدن کامل AKT می‌شود (۲۹).

تا به حال بیش از ۱۰۰ سوبسترای احتمالی برای AKT گزارش شده است، با این حال بسیاری از آنها با جزئیات بیشتر مشخص نشده‌اند (۳۰). یکی از سوبستراهای مهم AKT یعنی مجموعه پروتئینی TSC1/TSC2 در بالادست mTORC1 عمل می‌کند. همچنین نشان داده شده است که RHEB بیان mTOR را از طریق FKBP38، عضوی از خانواده پروتئین اتصال دهنده (FKBP) FK506، تنظیم می‌کند. در واقع، FKBP38 به mTOR متصل می‌شود و فعالیت آن را مهار می‌کند، درحالی‌که تعامل مستقیم RHEB با FKBP38 از ارتباط FKBP38 با mTOR جلوگیری می‌کند (۲۹، ۳۳-۳۱). این یافته‌ها می‌تواند مبین یکی دیگر از دلایل کاهش MTOR در اثر بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 در مطالعه حاضر باشد. به عبارتی، کاهش RHEB در اثر بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 سبب

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

می‌شود که ارتباط FKBP38 با MTOR افزایش یابد و در نتیجه کاهش MTOR اتفاق بیفتد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، بیش‌بیان کلاستر miR-302/367 سبب کاهش بیان یا کاهش فسفریله شدن برخی از مولکول‌های مسیر پیام‌رسان mTOR در سلول‌های بنیادی بافت چربی شد که نقش کلاستر miR-302/367 را در تنظیم این مسیر پیام‌رسانی نشان می‌دهد. از آنجاکه مسیر mTOR از یک طرف در فرایند بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک به سلول‌های بنیادی پرتوان القایی نقش دارد و از طرف دیگر، اختلال در تنظیم این مسیر با بیماری‌های مختلف، ازجمله سرطان، مرتبط است، انجام مطالعه‌های تکمیلی برای بررسی دقیق‌تر نقش کلاستر miR-302/367 در تنظیم محور AKT/mTOR و تأثیر آن بر ویژگی‌های بنیادینگی، مهاجرت، تکثیر، تمایز و توانایی ترمیمی سلول‌های بنیادی بافت چربی ضروری به نظر می‌رسد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در کمیته اخلاق پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بررسی و با کد اخلاق IR.NIGEB.EC.1400.2.26.B ثبت شده است.

تشکر و قدردانی

از مشارکت‌کنندگان محترم و تمامی بزرگوارانی که در اجرای پژوهش حاضر ما را یاری کردند، سپاسگزاریم.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

References

1. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004;431(7006):350-5.

2. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5′ UTR as in the 3′ UTR. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104(23):9667-72.

3. Lee MR, Prasain N, Chae HD, Kim YJ, Mantel C, Yoder MC, et al. Epigenetic regulation of NANOG by miR-302 cluster-MBD2 completes induced pluripotent stem cell reprogramming. Stem Cells. 2013;31(4):666-81.

4. Moradi S, Asgari S, Baharvand H. Concise review: harmonies played by microRNAs in cell fate reprogramming. Stem Cells. 2014;32(1):3-15.

5. 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(1):1-8.

6. Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells .cell. 2008;134(3):521-33.

7. Liao B, Bao X, Liu L, Feng S, Zovoilis A, Liu W, et al. MicroRNA cluster 302–367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. Journal of Biological Chemistry. 2011;286(19):17359-64.

8. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. Cell stem cell. 2011;8(6):633-8.

9. Sugawara T, Kawamoto Y, Kawasaki T, Umezawa A, Akutsu H. A single allele of the hsa-miR-302/367 cluster maintains human pluripotent stem cells. Regen Ther. 2022;21:37-45.

10. Zhao Y, Cui Y, Luan J, Wang J, Shi L, Han Z, et al. Development and identification of a induced pluripotent stem cells line (SMBCi013-A) derived from urine cells of a patient with Wilson's disease. Stem Cell Res. 2022;59:102650.

11. Lipchina I, Elkabetz Y, Hafner M, Sheridan R, Mihailovic A, Tuschl T, et al. Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response. Genes & development. 2011;25(20):2173-86.

12. Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Nature biotechnology. 2011;29(5):443-8.

13. Magenta A, Cencioni C, Fasanaro P, Zaccagnini G, Greco S, Sarra-Ferraris G, et al. miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. Cell Death & Differentiation. 2011;18(10):1628-39.

14. Guo M, Gan L, Si J, Zhang J, Liu Z, Zhao J, et al. Role of miR-302/367 cluster in human physiology and pathophysiology. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2020;52(8):791-800.

15. Brotelle T, Bay J-O. PI3K-AKT-mTOR pathway: Description, therapeutic development, resistance, predictive/prognostic biomarkers and therapeutic applications for cancer. Bulletin du cancer. 2015;103(1):18-29.

16. Menendez JA, Vellon L, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Vazquez–Martin A. mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. Cell Cycle. 2011;10(21):3658-77.

17. He J, Kang L, Wu T, Zhang J, Wang H, Gao H, et al. An elaborate regulation of Mammalian target of rapamycin activity is required for somatic cell reprogramming induced by defined transcription factors. Stem Cells Dev. 2012;21(14):2630-41.

18. Lee SJ, Kang KW, Kim JH, Lee BH, Jung JH, Park Y, et al. CXCR2 Ligands and mTOR Activation Enhance Reprogramming of Human Somatic Cells to Pluripotent Stem Cells. Stem Cells Dev. 2020;29(3):119-32.

19. Aarts M, Georgilis A, Beniazza M, Beolchi P, Banito A, Carroll T, et al. Coupling shRNA screens with single-cell RNA-seq identifies a dual role for

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

mTOR in reprogramming-induced senescence. Genes Dev. 2017;31(20):2085-98.

20. Karimi Roshan M, Soltani A, Soleimani A, Rezaie Kahkhaie K, Afshari AR, Soukhtanloo M. Role of AKT and mTOR signaling pathways in the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. Biochimie. 2019;165:229-34.

21. Li H, Wei J, Fan L, Wang S, Zhu L, Li T, et al. miR-302 regulates pluripotency, teratoma formation and differentiation in stem cells via an AKT1/OCT4-dependent manner .Cell death & disease. 2016;7(1):e2078-e.

22. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2009;4:127-50.

23. Faghih H, Javeri A, Amini H, Taha MF. Directed differentiation of human adipose tissue-derived stem cells to dopaminergic neurons in low-serum and serum-free conditions. Neuroscience letters. 2019;708:134353.

24. Soheilifar MH, Javeri A, Amini H, Taha MF. Generation of dopamine-secreting cells from human adipose tissue-derived stem cells in vitro. Rejuvenation research. 2018;21(4):360-8.

25. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 2002;30(9):e36.

26. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. Current biology. 2005;15(8):702-13.

27. Fantus D, Rogers NM, Grahammer F, Huber TB, Thomson AW. Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation. Nature Reviews Nephrology. 2016;12(10):587-609.

28. Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschläger M. The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. Mutation Research/reviews in Mutation Research. 2008;659(3):284-92.

29. Yang Q, Guan K-L. Expanding mTOR signaling. Cell research. 2007;17(8):666-81.

30. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell. 2007;129(7):1261-74.

31. Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, et al. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. Science. 2007;318(5852):977-80.

32. Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR Complex1–S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. Trends in molecular medicine. 2007;13(6):252-9.

33. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. Cancer cell. 2007;12(1):9-22.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]