Original Article

In Silico design and in vitro validation for siRNA targeting PTX3 gene in glioma cell line

Ahmadi-Beni R[1], Shahbazi Sh[1*], Khoshnevisan AR[2], Behroozi J[3,4]

1- Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of Neurosurgery, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
3- Research Center for Cancer Screening and Epidemiology, AJA University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
4- Department of Genetics and Advanced Medical Technology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2021/12/8 | Accepted: 2022/02/13

Abstract:

Background: Identification of underlying mechanisms of gliomas pathogenesis is of particular importance. The overexpression of PTX3 gene is profoundly implicated in glioma development. The RNA interference (RNAi)-based knockdown of target gene by means of double-stranded RNA molecules including siRNA can be harvested as a therapeutic tool for oncogene silencing. The present study aimed to induce apoptosis in U-87 glioma cell line by knockdown of PTX3 gene.
Materials and Methods: A variety of in silico methods were applied for siRNA design to silence PTX3 gene. Scoring of candidate siRNAs was performed according to design rules. The best siRNA against the PTX3 gene as well as scrambled siRNA were selected. The efficacy of PTX3 silencing in the U-87 cells was evaluated by Real-time PCR assay. To assess the effect of PTX3 knock down on cellular apoptosis, the mortality rate of transfected cells was compared with control groups by flow cytometry.
Results: Designed PTX3-siRNAs (*n*=53) were assessed and scored from different aspects and the best one was suggested in PTX3 gene expression knockdown assay. The 72-hour treatment of U-87 cells with designed PTX3-siRNA in 100 nM concentration affected the gene expression by decreasing to 69%. Flowcytometry results indicated the induction of apoptosis in 65% of the cells.
Conclusion: The efficiency of designed siRNA was approved in vitro, with significant effect on the downregulation of PTX3 gene and induction of apoptosis in U-87 glioma cells. Based on our finding, targeting PTX3 via siRNA can be considered as an anti-cancer strategy.

Keywords: PTX3, Glioma, siRNA, Apoptosis, U-87

***Corresponding Author**
Email: sh.shahbazi@modares.ac.ir
Tel: 0098 218 288 4556
Fax: 0098 218 288 4555

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2022; Vol. 26, No 1, Pages 9-21

Please cite this article as: Ahmadi-Beni R, Shahbazi Sh, Khoshnevisan AR, Behroozi J. In Silico design and in vitro validation for siRNA targeting PTX3 gene in glioma cell line. ***Feyz*** 2022; 26(1): 9-21.

طراحی in silico و تأیید in vitro برای siRNA هدف گیرنده ژن PTX3 در رده سلولی گلیوما

رضا احمدی‌بنی[۱]، شیرین شهبازی[۱*]، علیرضا خوشنویسان[۲]، جواد بهروزی[۳،۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: شناسایی مکانیسم‌های زمینه‌ای پاتوژنز گلیوما از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بیان بیش از حدّ ژن PTX3 عمیقاً در پاتوژنز گلیوما نقش دارد. سرکوب بیان ژن هدف بر پایه تداخل RNA (RNAi) ازطریق مولکول‌های RNA دورشته‌ای ازجمله siRNA می‌تواند به‌عنوان یک ابزار درمانی برای خاموشی انکوژن استفاده شود. هدف مطالعه حاضر، القای آپوپتوز در رده سلولی گلیومای U-87 با سرکوب ژن PTX3 است.

مواد و روش‌ها: انواع روش‌های in silico برای طراحی siRNA در برابر ژن PTX3 استفاده شد، سپس امتیازبندی طبق قوانین طراحی صورت گرفت. بهترین مولکول siRNA علیه ژن PTX3 انتخاب و همچنین siRNA درهم‌ریخته آن نیز طراحی و کارایی خاموش‌کردن PTX3 در سلول‌های U-87 توسط Real-time PCR ارزیابی شد. همچنین میزان مرگ سلول‌های ترنسفکت‌شده با گروه‌های کنترل توسط فلوسایتومتری مقایسه شد تا اثر کاهش بیان PTX3 بر آپوپتوز سلولی بررسی شود.

نتایج: ۵۳ مولکول PTX3-siRNA طراحی‌شده از جهات گوناگون، بررسی و امتیازدهی و بهترین موارد جهت استفاده در تحقیقات سرکوب بیان ژن PTX3 پیشنهاد شدند. تیمار ۷۲ ساعته سلول‌های U-87 با PTX3-siRNA طراحی‌شده در غلظت ۱۰۰ نانومولار قادر به کاهش بیان PTX3 به میزان ۶۹ درصد بود. نتایج فلوسایتومتری نیز نشانگر القای آپوپتوز در ۶۵ درصد سلول‌ها بود.

نتیجه‌گیری: کارآیی siRNA طراحی‌شده با روش in vitro تأیید شد که بر کاهش بیان ژن PTX3 و القای آپوپتوز در سلول‌های گلیوما U-87 تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای داشت.

واژگان کلیدی: PTX3، گلیوما، siRNA، آپوپتوز، U-87

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و ششم، شماره ۱، فروردین - اردیبهشت ۱۴۰۱، صفحات ۲۱-۹

مقدمه

گلیوما، شایع‌ترین و تهاجمی‌ترین نوع تومورهای مغزی است، ازجمله گلیوبلاستوما مولتی‌فورم (Glioblastoma Multiform) (GBM) که درمان‌های تهاجمی بقای کلی ۱۴ماهه را به همراه دارد [۱]. دلایل این پیش‌آگهی ضعیف، شامل ماهیت نفوذی (Infiltrative nature) گلیوما است که مانع از درمان بیماری حتی در صورت برداشتن فوق حداکثری می‌شود و نیز مقاومت ذاتی آن در برابر پرتودرمانی و شیمی‌درمانی می‌باشد [۲]. به‌نظر می‌رسد این مقاومت با تغییرات پیچیده بیوشیمیایی و مسیرهای سیگنالینگ ناشی از عوامل تعیین‌کننده ژنتیکی در سلول‌های توموری هتروژن و ریزمحیط آن‌ها مرتبط باشد [۴،۳]. بیولوژی مولکولی گلیوما یک زمینه بسیار پیچیده و با رشد سریع است، به‌طوری‌که تحقیقات پایه در تلاشند تا بتوانند انتظارات بالینی را برای افزایش اثربخشی درمان‌های ضدگلیوما و بقای بیمار برآورده سازند [۵]. Pentraxin 3 (PTX3) با شماره دسترسی NG_051000.1 در بانک ژنی، عضوی از خانواده پروتئین‌های فاز حادّ التهاب است [۶]. PTX3 روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۳ [3q25.32] قرار دارد و دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون می‌باشد [۷]. PTX3 عمدتاً در پاسخ‌های ایمنی و التهابی نقش دارد. همچنین نقش‌های آن در حیطه سرطان، ازجمله در چرخه سلولی، رگ‌زایی، متاستاز و بی‌ثباتی ژنومی در حال آشکار شدن هستند [۹-۷]. بیان غیرعادی PTX3 در سرطان‌های مختلفی دیده شده است که با تشخیص زودهنگام و پیش‌آگهی و درمان در ارتباط است. ازجمله: گلیوما [۱۲-۱۰]، دهان [۱۳]، پانکراس [۱۵،۱۴]، معده [۱۷،۱۶]، ریه [۱۹،۱۸]، دهانه رحم [۲۱،۲۰]، پستان [۲۲-۲۴]، تخمدان [۲۵]، پروستات [۲۸-۲۶]، کلیه [۲۹]، کولورکتال [۳۰]، کبد [۳۳-۳۱] و ملانوما [۳۴]. همچنین یافته‌های اخیر نشان

۱. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. گروه جراحی مغز و اعصاب، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات اپیدمیولوژی و پایش سرطان، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران
۴. گروه فناوری‌های نوین و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**
گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، بزرگراه جلال آل‌احمد، تهران

تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۵۶ **دورنویس:** ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۵۵

پست الکترونیک: sh.shahbazi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۱۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۴۰۰/۱۱/۲۴

می‌دهد که PTX3 می‌تواند آپوپتوز سلولی را مهار کند [۳۸-۳۵]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که PTX3 به‌عنوان القاکننده پروتئین ضدآپوپتوز گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal Growth Factor Receptor) (EGFR) عمل می‌کند [۳۹]. همچنین PTX3با مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT/mTOR برای القای تکثیر سلولی تومور، مهار آپوپتوز و القای متاستاز در سرطان ریه [۴۰]، کارسینومای سلول سنگفرشی سر و گردن [۴۱] و سرطان پستان [۴۲] تعامل دارد. از این‌رو استراتژی‌های مهار PTX3 می‌توانند به‌عنوان کاندیدا در درمان سرطان‌ها استفاده شوند [۱۹-۱۷،۲۲]. RNA کوچک مداخله‌گر (Small Interfering RNA (siRNA)، که برخی مواقع به RNA کوتاه مداخله‌گر (Short Interfering RNA) یا RNA خاموش‌کننده (Silencing RNA) نیز معروف است، دسته‌ای از مولکول‌های RNA دورشته‌ای (dsRNA) و غیر کدکننده (ncRNA) است که اغلب همچون ریز RNA (microRNA یا miRNA) دارای طول ۲۷-۲۰ جفت بازی بوده، در مسیر بیوشیمیایی تداخل RNA (RNAi) عمل می‌کند. این مولکول‌ها با تجزیه mRNA پس از رونویسی، در بیان ژن‌های خاصّی دخیل بوده، مانع از ترجمه می‌شوند [۴۳]. در سیتوپلاسم سلول، کمپلکس دایسر (Dicer complex)، RNA دورشته‌ای را به siRNA هایی به طول ۲۷-۲۰ نوکلئوتید پردازش می‌کند که در انتهای '۳ خود به‌عنوان کلاهک، دو نوکلئوتید آویزان دارند و در انتهای '۵ فسفریله‌اند، سپس آن‌ها را به کمپلکس خاموش‌کننده القاشده توسط RNA (RNA-induced silencing complex) (RISC) انتقال می‌دهد. siRNA در کمپلکس RISC به یک توالی خاصّ mRNA، ازطریق باز مکمل متصل شده، بدنه فسفات RNA بریده می‌شود. siRNAها برخلاف miRNAها که باعث سرکوب ترجمه می‌شوند، به توالی کامل یا تقریباً کامل اتصال می‌یابند و با برش mRNA هدف، مانع شروع ترجمه می‌شوند [۴۴]. با توجه به کارایی بالای siRNA در خاموش‌کردن ژن‌های هدف و نقش کلیدی PTX3 در پیش‌گیری از آپوپتوز سلول‌های مختلف و بیان بالای آن در سلول‌های توموری گلیوما، هدف مطالعه حاضر، طراحی و استفاده از siRNA سرکوب‌کننده بیان ژن PTX3 در رده سلولی گلیوما U-87 جهت بررسی القای آپوپتوز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس در مورخ ۱۳۹۹/۰۹/۰۸ با کد IR.MODARES.REC.1399.135 به تصویب رسیده است.

انتخاب رونوشت PTX3-mRNA

توالی کامل الیگونوکلئوتیدی ژن کدکننده PTX3 از پایگاه داده بانک ژنی NCBI (NCBI GenBank database) دریافت گردید. به‌منظور شناسایی نواحی حفاظت‌شده در بین ژن PTX3، CDS کامل PTX3 بررسی شد. براساس دستورالعمل‌ها، دقت شد که مولکول siRNA طراحی‌شده متعلق به مناطق مورد توافق (Consensus) همه رونوشت‌ها باشد. پس از بررسی‌ها، تنها یک رونوشت شناسایی شد که نیاز به هم‌طرازی رونوشت‌ها را مرتفع می‌نمود. از آن‌جایی که ۱۳۰ نوکلئوتید اگزون اوّل ژن PTX از کلّ ۲۱۴ نوکلئوتید، در فریم خوانش باز (Open Reading Frame) (ORF) قرار گرفته است، طراحی از نوکلئوتید ۵۰ از ابتدای ORF (یا ۸۵ از ابتدای اگزون) صورت گرفت و ۸۰ نوکلئوتید پایانی اگزون را شامل شد. این ناحیه از نظر پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism) (SNP) نیز بررسی شد.

طراحی مولکول siRNA علیه ژن PTX3

تنها توالی شناخته‌شده رونوشت ژن مذکور در بانک اطلاعاتی NCBI (Accession Number NM_002852) در سه سایت طراحی siRNA شامل siRNA Wizard به آدرس (invivogen.com/sirnawizard/design.php)، WI siRNA Selection Program به آدرس (sirna.wi.mit.edu) و BLOCK-iTRNAi Designer به آدرس (rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress) بررسی شد. گفتنی است که هریک از این سایت‌ها مزیت‌های خاصّ خود را دارا هستند. مزیت سایت WI siRNA Selection Program در مقایسه با سایر سایت‌های طراحی، تعیین‌کردن مقدار اثرات خارج از هدف siRNAهای پیشنهادی برطبق مکمل‌بودن با ناحیه seed ژن‌های در ارتباط است (به بیان دیگر امکان دارد siRNA طراحی‌شده با ورود به سلول به‌عنوان یک miRNA عمل نموده، باعث تخریب ژن‌های دیگر گردد). سایت BLOCK-iTRNAi Designer نیز می‌تواند siRNAهای پیشنهادی را طبق توانایی سرکوبشان مرتب کند، همچنین سایت www.invivogen.com/sirna-wizard نیز بعد از طراحی، siRNAهایی با بهترین ویژگی و مطابق با الگوریتم‌های طراحی را ارائه می‌نماید. کلیه siRNAهای پیشنهادی توسط این سایت‌ها با توالی کامل کدکننده (Coding Sequense) (CDS) ژن PTX3 هم‌طراز شد تا مولکول‌های نامناسب شناسایی شوند. پس از طراحی، هر دو مورد توالی و قوانین ساختاری باید موردتوجه قرار گیرند، با این‌وجود طبق شواهدی که وجود دارد، مهم‌ترین عامل

تعیین‌کننده محرک خاموشی، توالی است [۴۵]. به‌طور مختصر تعدادی از قوانین توالی به این شرح است: ناحیه هدف بایستی ۵۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید بعد از شروع کدون AUG یا قبل از کدون خاتمه باشد. دنباله‌های 5'UTR، 3'UTR، نواحی اینترونی، پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (Single Nnucleotide Polymorphism) (SNP) و اتصال اگزون - اگزون (Exon-Exon Junction) مناسب نیستند. توالی هدف بایستی محتوای CG بین ۶۰-۳۰٪ داشته باشد تا پایداری حیاتی را به siRNA بدهد؛ زیرا محتوای CG بالا از جای‌گیری siRNA در مجموعه RISC ممانعت می‌کند، همچنین محتوای CG پایین نیز اتصال siRNA با mRNA هدف را تضعیف می‌کند [۴۶]. در کل siRNA مناسب برای knockdown بایستی ۵۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید بعد از شروع کدون AUG باشد و نواحی اتصالات اگزون - اگزونی (exon-exon junction) مناسب نیست. تعداد زیادی از قوانین توالی که اختصاص به ترجیح یا منع استفاده از نوکلئوتیدی خاص در جایگاهی اختصاصی، متعلق به یکی از رشته‌های سنس یا آنتی‌سنس از siRNA دارند، گزارش شده‌اند [۴۷]. قوانین ساختاری نیز ویژگی‌های ترمودینامیکی را از نظر ساختارهای ثانویه و قابلیت دسترسی siRNA آنتی‌سنس به ناحیه هدف نشان می‌دهند [۴۸]. علاوه‌بر استفاده از سایت‌های طراحی، همه siRNAهای پیشنهادی برطبق شاخصه‌های طراحی بهینه ارائه‌شده توسط Tom Tuschl [۴۷]، Mcintyre و همکاران [۴۹]، Bofill-De Ros و همکاران [۵۰] و فخر و همکاران [۵۱] بررسی شدند. پیش‌بینی ساختار ثانویه PTX3-mRNA: در ادامه از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench برای پیش‌بینی ساختار ثانویه مولکول mRNA و هم‌طرازی آن با مولکول‌های siRNA پیشنهادی استفاده گردید تا توالی‌هایی انتخاب شوند که در ناحیه لوپ ساختار ثانویه mRNA قرار گرفته باشند و siRNAهایی که در نواحی ساقه و شلوغ قرار داشتند، حذف شدند. انتخاب siRNA با بهترین امتیاز: به این‌ترتیب در میان siRNAهای باقی‌مانده یک امتیازبندی کلی از نظر پایین‌بودن درصد CG و اثرات خارج از هدف توالی که با سایت WI siRNA Selection Program مشخص شده بودند، صورت گرفت تا درنهایت مولکول PTX3-siRNA-1 با بیشترین نمره (Score) انتخاب شود. درمورد Scrambled-siRNA نیز توالی PTX3-siRNA-1 انتخاب‌شده در سایت (genscript.com/tools/create-scrambled-sequence) وارد گردید و توالی به‌هم‌ریخته آن که با هیچ توالی mRNA ژنوم انسان مطابقت نداشت، به‌دست آمد. سپس مولکول‌های siRNA به شرکت ژن فن‌آوران (Teran, Iran) جهت ساخت، سفارش داده شدند. طراحی پرایمر: توالی پرایمرهای ژن موردبررسی PTX3 و ژن مرجع EIF2B1 توسط بخش پرایمربلاست سایت NCBI به آدرس (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) به‌دست آمد. دمای ذوب (Tm) پرایمرها ۶۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد و پس از طراحی به شرکت سیناکلون (Tehran, Iran) جهت ساخت، سفارش داده شدند. توالی پرایمرهای رفت‌وبرگشت ژن هدف PTX3 به‌صورت 5'-TGCATCTCCTTGCGATTCTGT-3' رفت و 5'-AGCTTGTCCCATTCCGAGTG-3' برگشت با طول محصول ۱۷۵ جفت باز بود. توالی پرایمرهای ژن مرجع EIF2B1 به‌صورت 5'-CGGACGTTGCTGGAGTTCTT-3' رفت و 5'-AGGCAAGACTGATGAAGCGG-3' برگشت با طول محصول ۱۵۷ جفت باز بود.

ترنسفکشن siRNA

سلول‌های U-87 از انستیتو پاستور ایران (بانک سلولی ایران) تهیه شدند. جهت بررسی آپوپتوز، سلول‌ها در پلیت ۱۲ خانه، شامل ۶ خانه کنترل و ۶ خانه ترنسفکشن با حجم ۱ میلی‌لیتر کشت شدند. ترنسفکشن siRNA ازطریق لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen, USA) و طبق پروتکل آن صورت گرفت. سلول‌ها در غلظت ۴×۱۰^{۵} برای هر چاهک پلیت ۱۲ خانه حاوی محیط (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (DMEM) به همراه درصد سرم جنینی گاوی (Fetal Bovine Serum) (FBS) کشت شدند تا به تراکم (Confluency) حدود ۸۰ درصد برسند. ابتدا محیط کشت تمام چاهک‌ها دور ریخته شد، سپس DMEM بدون FBS و پنیسیلین و استرپتومایسین (Pen-Strep) (PS) اضافه شدند و پلیت درون انکوباتور به‌مدت حداقل ۵ دقیقه انکوبه شد. در ۶ میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری مقدار ۹۶ میکرولیتر محیط کشت DMEM بدون FBS و PS ریخته شد و سپس به هرکدام مقدار ۴ میکرولیتر PTX3-siRNA با غلظت ۵۰ نانومولار اضافه گردید (کلیه مراحل درمورد غلظت ۱۰۰ نانومولار نیز تکرار شد). در ۶ میکروتیوب دیگر مقدار ۱,۵ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ریخته شد و سپس به هرکدام ۹۸/۵ میکرولیتر DMEM بدون FBS و PS اضافه شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، میکروتیوب‌های siRNA و لیپوفکتامین با هم ترکیب شدند تا به ۶ حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتری برسند. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شده، درنهایت به ۶ چاهک از پلیت ۱۲ خانه اضافه شدند. همین روند به‌طور همزمان برای گروه کنترل منفی (Scrambled-

siRNA) در ۶ چاهک دیگر انجام شد. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از ترنسفکشن، سلول‌ها برای آنالیز Real Time PCR و تست آپوپتوز استفاده شدند. آنالیز Real Time PCR: پس از ترنسفکشن، RNA کل طبق پروتکل کیت All-In-One (Bio Basic, Canada) استخراج و cDNA طبق پروتکل کیت Easy cDNA Synthesis Kit (Parstous, Iran) ساخته شد و آزمایشات Real Time PCR به‌صورت دوتایی برای ژن PTX3 و ژن کنترل EIF2B1 طبق پروتکل مستر میکس RealQ Plus Master Mix Green high ROX (Ampliqon, Denmark) و دستگاه ترموسایکلر StepOne (ABI, USA) انجام شد و تست‌ها به‌صورت سه آزمون مستقل تکرار شدند.

آنالیز فلوسایتومتری آپوپتوز

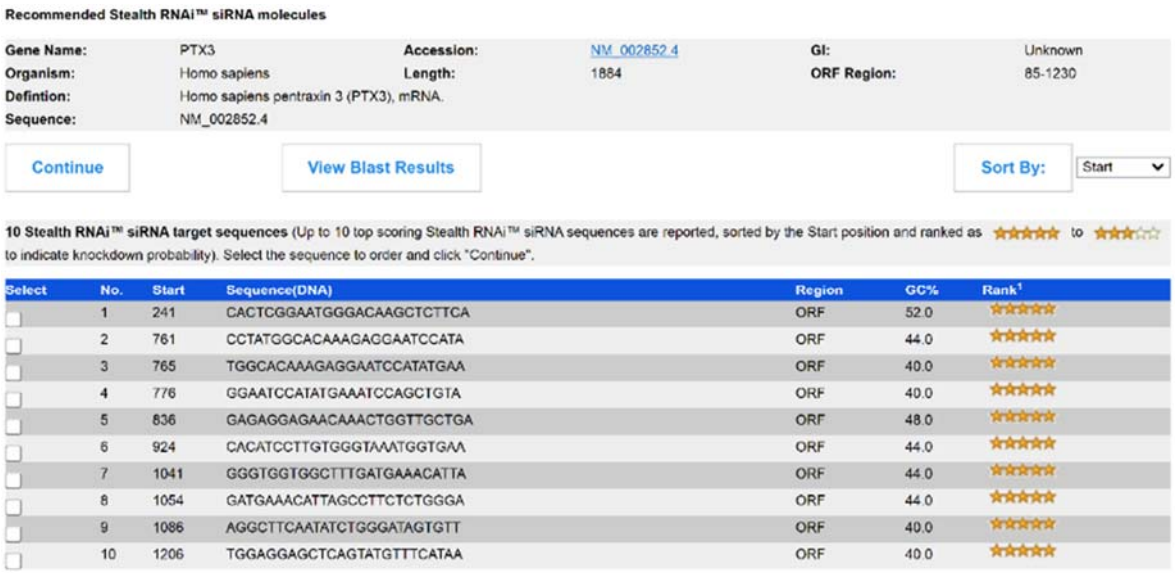
برای آنالیز مرگ سلولی شامل آپوپتوز دیررس و آپوپتوز زودرس و نکروز، سلول‌ها پس از تیمار ۷۲ ساعته با غلظت ۱۰۰ نانومولار siRNA، تریپسینه و شسته شدند و سپس رنگ‌آمیزی با کیت Phosphatidyl Serine Detection Kit (IQ Products, Netherlands) انجام شد. به این‌ترتیب که رسوب سلول‌ها در ۱۰ میکرولیتر محلول انکسین وی (Annexin V) به‌طور کامل حل شد و پس از ۲۰ دقیقه به میزان ۱۰ میکرولیتر محلول پروپودیوم یدید (Propidium Iodide) (PI) اضافه شد. سلول‌ها سپس در محلی تاریک به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه و به دستگاه فلوسایتومتری منتقل شدند. از سلول‌های ترنسفکت‌نشده به‌عنوان کنترل استفاده شد. همچنین برای بررسی اثر محلول ترنسفکشن بدون PTX3-siRNA، گروهی به نام mock در نظر گرفته شد تا اثرات آپوپتوتیک آن با اثرات گروه موردآزمایش مقایسه شود. درنهایت نمونه‌ها با کمک دستگاه فلوسایتومتری BD FACSCalibur (BD Biosciences, USA) بررسی و داده‌ها با نرم‌افزار دستگاه آنالیز شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های Real time PCR به کمک نرم‌افزار REST به روش ΔΔCt آنالیز شدند. عدد نهایی ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) حاصل به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism8 (GraphPad Software, USA) آنالیز آماری شد. جهت بررسی بیان mRNA و میزان مرگ سلولی بین گروه ترنسفکت‌شده و گروه ترنسفکت‌نشده از آماره t-test استفاده شد. ارزش p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. داده‌ها با میانگین ± خطای استاندارد (Mean ± SEM) گزارش شدند.

نتایج

در مجموع ۵۳ مولکول siRNA توسط BLOCK-iTRNAi Designer (۱۰ مورد)، WI siRNA Selection Program (۴۰ مورد) و siRNA Wizard (۳ مورد) مطابق الگوریتم‌های مختلف معرفی شدند. این نتایج به‌ترتیب در شکل‌های شماره‌های ۱، ۲ و ۳ آمده‌اند. سپس با قابلیت BLAST سایت NCBI (National Center for Biochemistry Information) صحت توالی‌ها تأیید شد.



Recommended Stealth RNAi™ siRNA molecules

Gene Name:	PTX3	Accession:	NM_002852.4	GI:	Unknown
Organism:	Homo sapiens	Length:	1884	ORF Region:	85-1230
Defintion:	Homo sapiens pentraxin 3 (PTX3), mRNA.				
Sequence:	NM_002852.4				

Continue | View Blast Results | Sort By: Start

10 Stealth RNAi™ siRNA target sequences (Up to 10 top scoring Stealth RNAi™ siRNA sequences are reported, sorted by the Start position and ranked as ★★★★★ to ★★★☆☆ to indicate knockdown probability). Select the sequence to order and click "Continue".

Select	No.	Start	Sequence(DNA)	Region	GC%	Rank[1]
☐	1	241	CACTCGGAATGGGACAAGCTCTTCA	ORF	52.0	★★★★★
☐	2	761	CCTATGGCACAAAGAGGAATCCATA	ORF	44.0	★★★★★
☐	3	765	TGGCACAAAGAGGAATCCATATGAA	ORF	40.0	★★★★★
☐	4	776	GGAATCCATATGAAATCCAGCTGTA	ORF	40.0	★★★★★
☐	5	836	GAGAGGAGAACAAACTGGTTGCTGA	ORF	48.0	★★★★★
☐	6	924	CACATCCTTGTGGGTAAATGGTGAA	ORF	44.0	★★★★★
☐	7	1041	GGGTGGTGGCTTTGATGAAACATTA	ORF	44.0	★★★★★
☐	8	1054	GATGAAACATTAGCCTTCTCTGGGA	ORF	44.0	★★★★★
☐	9	1086	AGGCTTCAATATCTGGGATAGTGTT	ORF	40.0	★★★★★
☐	10	1206	TGGAGGAGCTCAGTATGTTTCATAA	ORF	40.0	★★★★★

شکل شماره ۱- توالی siRNAهای پیشنهادی BLOCK-iTRNAi Designer

Choose siRNA Candidate(s)

siRNA candidates after filtering the base_run, gc%, and base_variation: (The more oligos you choose, the longer time for you to get results.)
Oligo patterns: *A–AAN19TT; B–NAN19NN; C–N2[CG]N8[AU]N8[AU]N2; F–Custom*
check all oligos | uncheck all oligos

		Position	Sequence	Patterns	GC%	Thermodynamic Values	SNPs	miRNA targets
☐	1	1124-1146	S 5': GGAGCUCAGUAUGUUUCAU UU mRNA: GA GGAGCTCAGTATGTTTCAT AA AS 3': UU CCUCGAGUCAUACAAAGUA	B,C	42	-5.7 (-12.3, -6.6)	NA	266[86]
☐	2	165-187	S 5': GGGACAAGCUCUUCAUCAU UU mRNA: AT GGGACAAGCTCTTCATCAT GC AS 3': UU CCCUGUUCGAGAAGUAGUA	C	47	-5.5 (-12.3, -6.8)	NA	131[59]
☐	3	956-978	S 5': GGUGGUGGCUUUGAUGAAA UU mRNA: TG GGTGGTGGCTTTGATGAAA CA AS 3': UU CCACCACCGAAACUACUUU	C	47	-5.2 (-12.1, -6.9)	NA	154[66]
☐	4	747-769	S 5': GUGGAGAGGAGAACAAACU UU mRNA: GG GTGGAGAGGAGAACAAACT GG AS 3': UU CACCUCUCCUCUUGUUUGA	C	47	-4.9 (-11.2, -6.3)	NA	159[68]
☐	5	88-110	S 5': GGACAACGAAAUAGACAAU UU mRNA: TT GGACAACGAAATAGACAAT GG AS 3': UU CCUGUUGCUUUAUCUGUUA	C	37	-4.7 (-11.2, -6.5)	NA	216[80]
☐	6	991-1013	S 5': GAGACUCACAGGCUUCAAU UU mRNA: GG GAGACTCACAGGCTTCAAT AT AS 3': UU CUCUGAGUGUCCGAAGUUA	C	47	-3.6 (-10.2, -6.6)	NA	213[80]
☐	7	642-664	S 5': CCACAGAUGUAUUAAACAA UU mRNA: AG CCACAGATGTATTAAACAA AA AS 3': UU GGUGUCUACAUAAUUUGUU	C	32	-3.5 (-10.3, -6.8)	NA	349[91]
☐	8	680-702	S 5': GGCACAAAGAGGAAUCCAU UU mRNA: AT GGCACAAAGAGGAATCCAT AT AS 3': UU CCGUGUUUCUCCUUAGGUA	C	47	-3.3 (-12.2, -8.9)	NA	128[58]
☐	9	754-776	S 5': GGAGAACAAACUGGUUGCU UU mRNA: GA GGAGAACAAACTGGTTGCT GA AS 3': UU CCUCUUGUUUGACCAACGA	B,C	47	-2.6 (-11.2, -8.6)	NA	105[49]
☐	10	995-1017	S 5': CUCACAGGCUUCAAUAUCU UU mRNA: GA CTCACAGGCTTCAATATCT GG AS 3': UU GAGUGUCCGAAGUUAUAGA	B,C	42	-2.4 (-9.4, -7.0)	NA	116[53]

شکل شماره ۲- توالی siRNAهای پیشنهادی WI siRNA Selection Program

PTX3

Sequence size: **1146 bp**
BLAST done against Human mRNA database.
BLAST done against Human miRNA SEED database.

sds3 siRNA candidate target sequences of 21 nt found

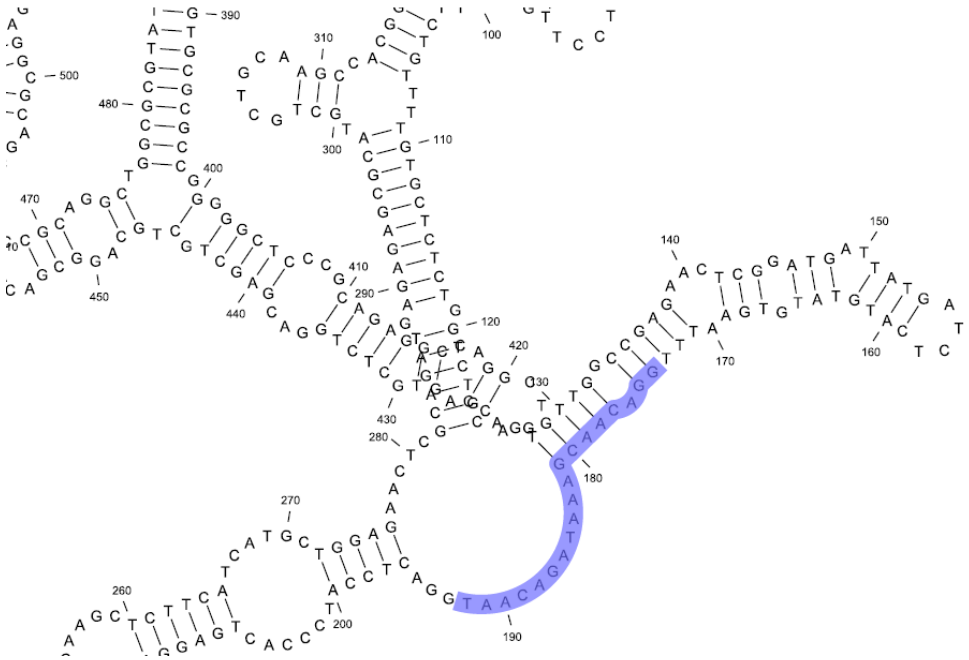
If you don't have enough results click here to check the list of homolog genes to each putative siRNA : Show

You could choose siRNA corresponding to your needs.

Sequence	Start	GC%	Design	Scrambled
GCATCTCCTTGCGATTCTGTT	3	47.62	☐	☐
GGGTCAAAGCCACAGATGTAT	635	47.62	☐	☐
GGAGACTCACAGGCTTCAATA	992	47.62	☐	☐

شکل شماره ۳- توالی siRNAهای پیشنهادی siRNA Wizard

از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (QIAGEN, Germany) برای پیش‌بینی ساختار ثانویه mRNA و برهم‌کنش بین siRNA و mRNA استفاده شد. سپس به‌منظور یافتن siRNAهای منطبق‌بر نواحی لوپ RNA، مولکول‌های siRNA پیشنهادی با ساختار ثانویه مولکول RNA هم‌طراز و بلاست (Blast) شدند. نتیجه هم‌طرازی siRNA منتخب در شکل شماره ۴ آمده است.



شکل شماره ۴- هم‌طرازی توالی PTX3-siRNA با ساختار ثانویه PTX3-mRNA (ناحیه اتصال با رنگ آبی مشخص شده است).

کلیه siRNAهایی که خارج از اگزون اوّل (۲۱۴ نوکلئوتید اوّل mRNA) و همچنین ۸۴ نوکلئوتید ناحیه ترجمه‌نشونده '۳ (untranslated region (3' UTR) قبل از کدون شروع AUG (موقعیت نوکلئوتیدهای ۸۵ الی ۸۷) بودند یا به‌عبارتی در ناحیه ORF نبودند، حذف شدند و باقی‌مانده به‌جهت طراحی قدرتمندترین مولکول‌ها به‌صورت دستی و با استفاده از سیستم امتیازدهی بررسی شدند. در این سیستم امتیازدهی، کسب امتیاز بالاتر به احتمال سرکوب بیان ژن می‌افزاید که معیارهای آن در جدول شماره ۱ آمده‌اند. ازجمله این معیارها بیشترین میزان اتصال به لوپ را در یک ناحیه خلوت دارابودن، میزان اثرات off target باتوجه به سایت WI siRNA Selection Program، وجودداشتن نوکلئوتید U در جایگاه دهم رشته آنتی‌سنس (رشته مسافر) (Passenger strand)، درصد GC پایین (به میزان ۳۷ درصد الی ۵۲ درصد) رشته آنتی‌سنس (رشته راهنما) (Guide strand) و اتصال آن به ناحیه از mRNA ژن که به‌طور کامل در اگزون اوّل و ۵۰ الی ۱۰۰ نوکلئوتید بعد از کدون AUG می‌باشند. همان‌گونه که در جدول شماره ۱ مشخص است، توالی ۲ کمترین امتیاز را کسب کرده است، درنتیجه کنار گذاشته شد و سه توالی باقی‌مانده وارد مرحله جایابی روی ساختار سه‌بعدی mRNA شدند. هر سه توالی در موقعیتی خلوت از ساختار ثانویه mRNA قرار دارند، با این‌حال توالی‌های ۱ و ۴ به ساختار لوپ تک‌رشته‌ای mRNA با قابلیت برقراری اتصال (به‌ترتیب با ۱۱ و ۱۴ نوکلئوتید) متصل می‌شوند، اما توالی ۳ برای اتصال باید با پیوندهای ساختار ساقه رقابت کند که موجب افت عملکرد آن می‌شود.

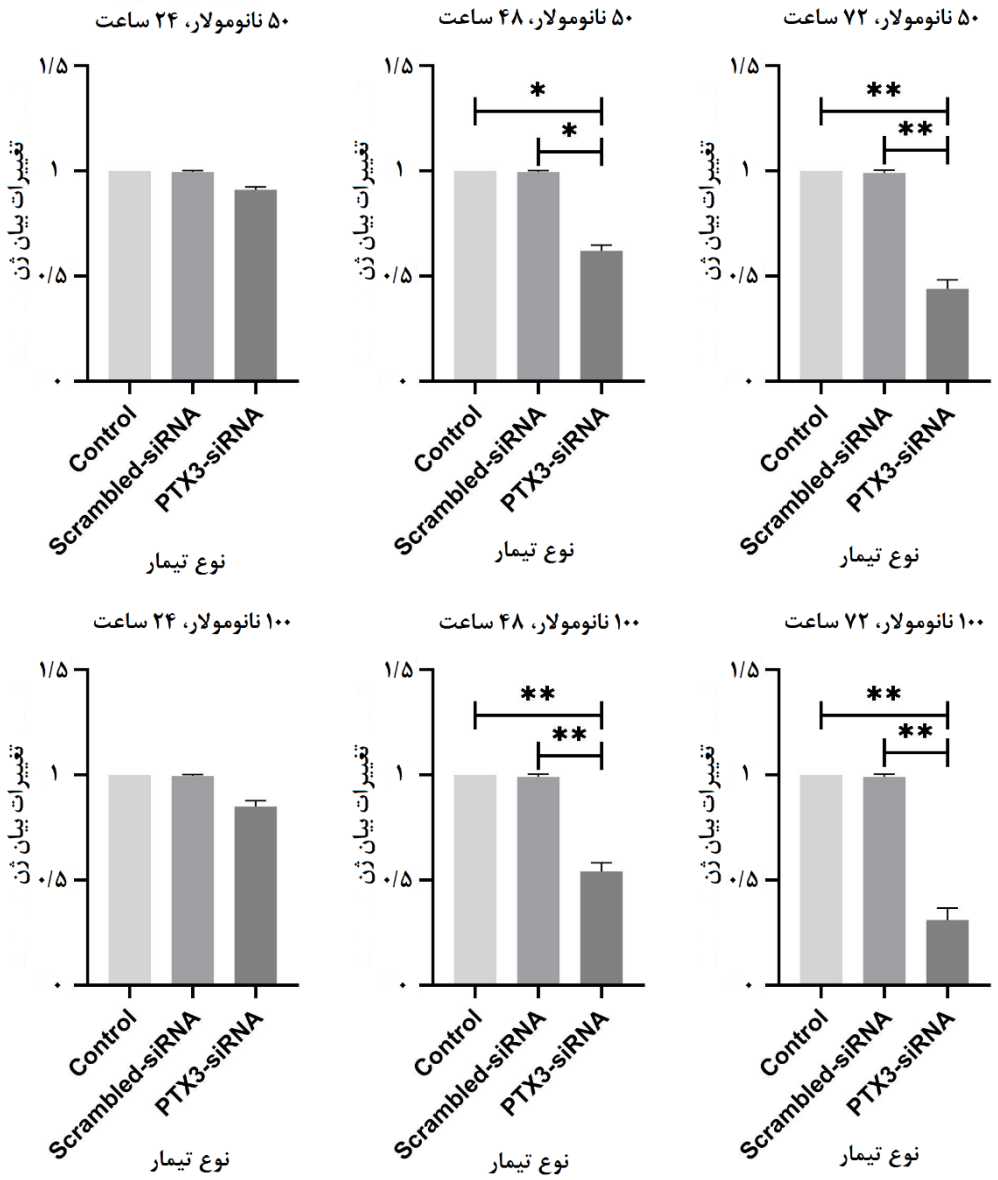
جدول شماره ۱- معیارهای امتیازدهی طراحی siRNA

توالی	توالی (رشته Sense)	موقعیت در ORF	٪ GC	تفاضل ناپایداری ترمودینامیکی انتهای '۵ رشته‌ها (Sense, Antisense)	Off target genes	حداقل A/U ۳ در جایگاه ۱۵-۱۹ (رشته Sense)	A در جایگاه ۳ (رشته Sense)	U در جایگاه ۱۰ (رشته Sense)	نبود G در جایگاه ۱۳ (رشته Sense)	A در جایگاه ۱۹ (رشته Sense)	موقعیت ۵۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید بعد از کدون شروع	موقعیت خلوت در ساختار ثانویه mRNA	موقعیت تک‌رشته‌ای در ساختار ثانویه mRNA
1	GGACAACGAAATAGACAAT	88-110	%37	-4.7 (-11.2, -6.5)	216	++++	+	-	+	-	+	+	+
2	CGGATGATTATGATCTCAT	57-79	%37	-2 (-9.7, -7.7)	116	+++	-	-	+	-	+	+	-
3	GAACTCGGATGATTATGAT	52-74	%37	-2 (-8.8, -6.8)	349	++++	+	+	+	-	+	+	-
4	CAACGAAATAGACAATGGA	91-113	%37	1.2 (-8.2, -9.4)	89	+++	+	-	+	+	+	+	+

درنهایت توالی‌های ۱ و ۴ از نظر اختلاف ترمودینامیکی انتهای '۵ رشته‌ها بررسی شدند که هرچه عدد منفی‌تری باشد، با احتمال بیشتری رشته آنتی‌سنس به کمپلکس RISC متصل می‌شود. در توالی ۱، رشته آنتی‌سنس عدد منفی کمتری دارد که نشانگر پایداری بهتر آن نسبت به رشته سنس است و باعث می‌شود که به‌عنوان رشته متصل‌شونده به هدف انتخاب شود؛ درنتیجه این توالی به‌عنوان PTX3-siRNA-1، مناسب‌ترین گزینه برای سرکوب بیان تشخیص داده شد. درمورد توالی درهم‌ریخته (Scrambled) که به‌عنوان کنترل منفی استفاده می‌شود نیز توالی رشته سنس از PTX3-siRNA-1 انتخاب شده، وارد سایت (genscript.com/tools/create-scrambled-sequence) گردید و توالی به‌هم‌ریخته آن که با هیچ توالی از ژنوم انسان مطابقت نداشت، به‌دست آمد. همچنین توالی دو نوکلئوتیدی UU به انتهای '۳ همه رشته‌ها به‌عنوان دنباله آویزان (Overhang) متصل شد و به جهت ردیابی siRNA درون سلول رنگ فلورسنت fam به انتهای '۵ رشته‌های Sense اضافه گردید. باتوجه به این‌که اگزون اوّل ژن PTX3 به طول ۲۱۴ نوکلئوتید می‌باشد، رشته آنتی‌سنس (۲۱ نوکلئوتیدی) siRNA منتخب به ناحیه‌ای از mRNA متصل می‌شود که به‌طور کامل در اگزون اوّل قرار دارد و جایگاه اتصال آن در ORF، نوکلئوتیدهای ۸۸ الی ۱۰۸ است. نوکلئوتیدهای ۹۰ الی ۱۱۰ نیز جایگاه اتصال رشته سنس (۲۱ نوکلئوتیدی) می‌باشند. مشخصات توالی‌ها در جدول شماره ۲ آمده است. در ارزیابی کمّی بیان ژن با Real time PCR، همان‌طور که داده‌ها در نمودار شماره ۱ نشان می‌دهند PTX3-siRNA طراحی‌شده، بیان ژن PTX3 را کاهش می‌دهد که بیشترین میزان آن پس از تیمار ۷۲ ساعته در غلظت ۱۰۰ نانومولار به میزان ۶۹ درصد بود ($P<۰/۰۱$).

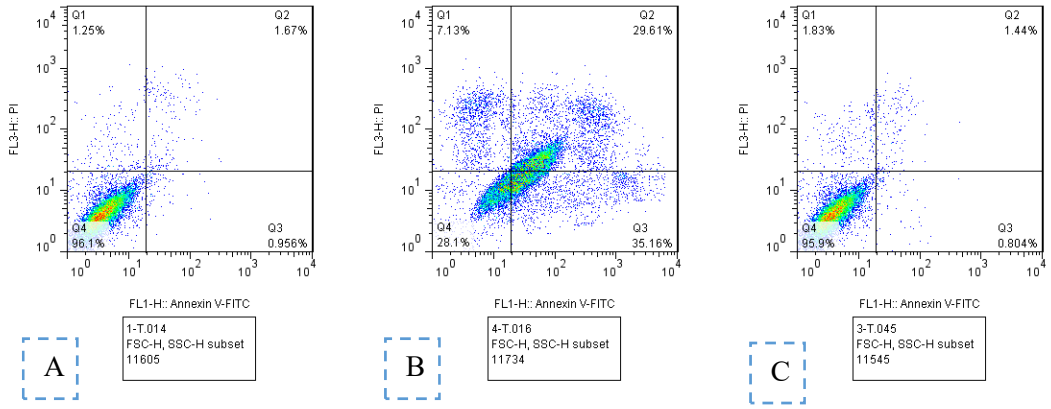
جدول شماره ۲- توالی‌های siRNA منتخب

نام توالی	توالی	رشته
PTX3-siRNA-1	5' fam-GGACAACGAAAUAGACAAUUU 3'	Sense
	5' AUUGUCUAUUUCGUUGUCCUU 3'	Antisense
Scrambled-siRNA-1	5' fam-AUAACGAACGAAUAGACAGUU 3'	Sense
	5' CUGUCUAUUCGUUCGUUAUUU 3'	Antisense



نمودار شماره ۱- بیان PTX3، پس از تیمار PTX3-siRNA با غلظت ۵۰ یا ۱۰۰ نانومولار و در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته. نتایج با سه تکرار به‌صورت $\bar{X} \pm SEM$ گزارش شده‌اند. نتایج از نظر معنی‌داری در قیاس با گروه کنترل و Scrambled-siRNA به‌صورت $*P<۰/۰۵$ و $**P<۰/۰۱$ معنی‌دار است.

نمودار شماره ۲ نشان می‌دهد که در کل ۶۴/۷۷ درصد از سلول‌های ترنسفکت‌شده با PTX3-siRNA وارد فرآیندهای آپوپتوز شده‌اند که باتوجه به میزان ۲/۶۲۶ درصدی در سلول‌های کنترل ترنسفکت‌نشده و ۲/۲۴۴ درصدی در سلول‌های کنترل Mock این مقدار رخداد آپوپتوز قابل‌توجه بود و توانایی PTX3-siRNA طراحی‌شده برای القای آپوپتوز در سلول‌های U-87 را نشان داد.



نمودار شماره ۲- نتایج تست فلوسایتومتری، القای قابل‌توجه آپوپتوز در سلول‌های ترنسفکت‌شده با PTX3-siRNA را نشان داد. A: کنترل بدون ترنسفکشن، B: سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت ترنسفکشن با PTX3-siRNA با غلظت ۱۰۰ نانومولار و C: سلول‌های کنترل Mock می‌باشد. Q1: Necrosis, Q2: Late Apoptosis, Q3: Early Apoptosis, Q4: Live Cells

بحث

هدف این مطالعه، القای آپوپتوز در سلول‌های گلیوما با سرکوب PTX3 بود. در روند کار با سرکوب بیان PTX3 ازطریق PTX3-siRNA تأثیرات کاهش بیان ژن بر آپوپتوز در سلول‌های ترنسفکت‌شده درمقابل گروه‌های کنترل بررسی گردید. ابتدا طراحی مولکول‌های siRNA با کمک سایت‌ها و نرم‌افزار مربوطه انجام و siRNA با بهترین ویژگی طراحی انتخاب شد. سپس برای بررسی میزان اثر siRNA بر کاهش بیان PTX3، از تست Real Time PCR استفاده شد. نتایج حاکی از توانایی siRNA طراحی‌شده برای سرکوب ژن به میزان ۶۹ درصد بود. برای بررسی اثر این کاهش بیان روی آپوپتوز از تکنیک رنگ‌آمیزی انکسین وی - پروپودیوم یدید استفاده شد و با روش فلوسایتومتری میزان آپوپتوز مشاهده‌شده با گروه‌های کنترل مقایسه گردید. نتایج نشان داد که ۶۵ درصد سلول‌های ترنسفکت‌شده دچار مرگ سلولی آپوپتوز شده‌اند. در مطالعه Tung و همکاران نیز با غیرفعال‌سازی in vitro ژن PTX3، مهاجرت و تهاجم سلول‌های GBM به‌طور قابل‌توجهی حذف شد و همچنین سلول‌های ترنسفکت‌شده در محیط in vivo قادر به رشد نبودند [۵۲]. اختلال در تنظیم PTX3 با رویداد اوّلیه در سرطان‌زایی همراه می‌باشد و ممکن است به‌عنوان یک فاکتور شروع‌کننده عمل کند. Liu و همکاران نشان دادند که بیان افزایش‌یافته PTX3 موجب افزایش تکثیر و متاستاز سلول‌های گلیوما می‌شود. آن‌ها همچنین تفاوت بیان PTX3 در گرید پایین و بالای گلیوما را گزارش نمودند [۵۳]. Ke و همکاران با روش ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) (IHC) میزان پروتئین PTX3 را در گریدهای مختلف گلیوما بررسی کردند و نشان دادند که نه‌تنها افزایش بیان PTX3 با افزایش گرید همبستگی دارد، بلکه با پیش‌آگهی ضعیف بیمار نیز همراهی دارد [۵۴]. آن‌ها بررسی PTX3 را ابزار مفیدی در جهت پیش‌بینی عود بیماری و رفتار تهاجمی در گلیوما معرفی نموده، عنوان کردند که بیان PTX3 می‌تواند به پاتولوژیست‌ها در تشخیص دقیق‌تر مرز تومور کمک کند، زیرا بیان PTX3 بین بافت نرمال مغز و تومور گلیوما متفاوت است [۵۴]. مطالعات زیادی به نقش PTX3 در مهار آپوپتوز در سلول‌های مختلف اشاره داشته‌اند [۳۸-۳۵] که نشان می‌دهند PTX3 در تقویت مسیرهای ضدآپوپتوزی سلول نقش دارد و مسیرهای محرک مرگ سلول را غیرفعال می‌کند. Li و همکاران افزایش بیان PTX3 در سرم بیماران و همچنین رده‌های سلولی ریه (Non-Small Cell Lung Cancer) (NSCLC) را گزارش کردند و دریافتند که سطح پایین PTX3 با بقای طولانی‌تر بیماران همراه است. آن‌ها همچنین با سرکوب بیان PTX3 باعث مهار تکثیر و القای آپوپتوز در سلول‌های NSCLC شدند و از این‌طریق انواع مقاوم به Cisplatin را نسبت به این داروی شیمی‌درمانی حساس کردند [۵۵]. Guo و همکاران با siRNA بیان PTX3 را در فیبروبلاست‌های (Conjunctivochalasis Fibroblasts) (CCh) سرکوب کردند و موجب رخداد مرگ سلولی ازطریق آپوپتوز و نکروز شدند، به بیان دیگر PTX3 با التهاب و آپوپتوز مقابله می‌کند تا از ایجاد این بیماری پوستی جلوگیری نماید [۳۵]. Lee و همکاران دریافتند که PTX3 پتانسیل غشای میتوکندری را تثبیت و آپوپتوز را سرکوب کرده، درنتیجه از سلول‌های لوله‌ای کلیوی در برابر آسیب ایسکمیک

محافظت می‌کند [۳۶]. Lian و همکاران دریافتند که PTX3 به‌عنوان یکی از پروتئین‌های ترشح‌شده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با منع آپوپتوز نورون‌های ترشح‌کننده دوپامین (Dopaminergic Neurons) موجب ترمیم آن‌ها در مدل موشی بیماری پارکینسون می‌شود [۳۷]. He و همکاران نیز در مطالعه خود بر روی سلول‌های کاردیومیوسیت H9c2 نشان دادند که افزایش بیان PTX3 در این سلول‌ها پاسخ التهابی را کاهش و بقای سلول‌ها را افزایش داده، موجب مهار آپوپتوز می‌شود [۳۸]. چندین مطالعه انجام‌شده با سلول‌های بیش از حد بیان‌کننده PTX3 نشان می‌دهد که این مولکول با القای مهاجرت و تهاجم سلول‌های تومور (تومورهای سر و گردن، سرطان دهانه رحم) یا تکثیر (گلیوما)، همچنین انتقال اپیتلیالی - مزانشیمی (کارسینوم کبدی) و کموتاکسی ماکروفاژها، نقش تقویت‌کننده تومور را ایفا می‌کند [۹]. بنابراین هدف قراردادن PTX3 ازطریق siRNA را می‌توان به‌عنوان یک راهبرد ضدّ سرطان مورد توجه قرار داد [۲۰،۱۷]. به‌ویژه این‌که می‌توان از روش‌های دارویی مهارکننده PTX3 نیز به‌طور همزمان استفاده نمود [۲۲،۲۱،۱۹]. برای سرکوب هرچه بیشتر بیان ژن می‌توان هم‌زمان چند توالی siRNA با بیشترین امتیاز طراحی را انتخاب کرد و استفاده نمود. همچنین پیشنهاد می‌شود که این پژوهش روی رده‌های سلولی دیگر و در ترکیب با داروهای دیگر و درنهایت به‌صورت in vivo اجرا شود.

نتیجه‌گیری

باتوجه به این‌که هدف از این مطالعه کاهش‌دادن بیان PTX3 و بررسی القای آپوپتوز در سلول‌های گلیوما بوده است، نتایج نشان داد که siRNA طراحی‌شده با کاهش بیان ژن PTX3 تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر القای آپوپتوز دارد. این نتایج می‌تواند دانش ما را درمورد مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی گلیوما افزایش دهد و به اهداف درمانی جدید منجر شود. در انتها باید عنوان نمود با وجود این‌که در مطالعه حاضر افزایش آپوپتوز با استفاده از روش siRNA در سیستم in vitro انجام شد، کاربرد این روش در شرایط in vivo نیازمند پژوهش بیشتر برای تحویل siRNA به سلول‌های تومور در مغز و بررسی اثرات آن است. این پژوهش زمینه ورود به مطالعات بالینی درمان گلیوما در حیطه siRNA را فراهم می‌کند، تا در آینده بتوان از آن به‌عنوان بخشی از یک واکسن یا دارو در جلوگیری از پیشرفت گلیوما بهره‌برداری نمود و درنهایت به پیشبرد درمان این سرطان کمک کرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پایان‌نامه دکتری آقای رضا احمدی‌بنی بود که توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس مورد حمایت مالی قرار گرفت.

References:

[1] Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. ***Clin Transl Oncol*** 2016; 18(11): 1062-71.
[2] Pessina F, Navarria P, Cozzi L, Ascolese AM, Simonelli M, Santoro A, et al. Maximize surgical resection beyond contrast-enhancing boundaries in newly diagnosed glioblastoma multiforme: is it useful and safe? A single institution retrospective experience. ***J Neurooncol*** 2017; 135(1): 129-39.
[3] Ahmadi-Beni R, Khoshnevisan A. An overview of crucial genes involved in stemness of glioblastoma multiforme. ***Neurochem J*** 2017; 11(4): 259-65.
[4] Ahmadi-Beni R, Najafi A, Savar SM, Mohebbi N, Khoshnevisan A. Role of dimethyl fumarate in the treatment of glioblastoma multiforme: A review article. ***Iran J Neurol*** 2019;18(3):127.
[5] Noori-Daloii M-R, Ahmadi-beni R. Glioblastoma gene therapy and related delivery systems. ***Med Sci*** 2017; 27(3): 149-63. [in Persian]
[6] Garlanda C, Bottazzi B, Magrini E, Inforzato A, Mantovani A. PTX3, a humoral pattern recognition molecule, in innate immunity, tissue repair, and cancer. ***Physiol Rev*** 2018; 98(2): 623-39.
[7] Wang Z, Wang X, Zou H, Dai Z, Feng S, Zhang M, et al. The Basic Characteristics of the Pentraxin Family and Their Functions in Tumor Progression. ***Front Immunol*** 2020; 11: 1757.
[8] Giacomini A, Ghedini GC, Presta M, Ronca R. Long pentraxin 3: A novel multifaceted player in cancer. ***Biochim Biophys Acta Rev Cancer*** 2018; 1869(1): 53-63.
[9] Doni A, Stravalaci M, Inforzato A, Magrini E, Mantovani A, Garlanda C, et al. The long pentraxin PTX3 as a link between innate immunity, tissue remodeling, and cancer. ***Front Immunol*** 2019; 10: 712.
[10] Wang Z, Wang X, Zhang N, Zhang H, Dai Z, Zhang M, et al. Pentraxin 3 promotes glioblastoma progression by negative regulating cells autophagy. ***Front Cell Dev Biol*** 2020; 8: 795.
[11] Petterson SA, Sørensen MD, Kristensen BW. Expression profiling of primary and recurrent glioblastomas reveals a reduced level of pentraxin 3 in recurrent glioblastomas. ***J Neuropathol Exp Neurol*** 2020; 79(9): 975-85.
[12] Locatelli M, Ferrero S, Boneschi FM, Boiocchi L, Zavanone M, Gaini SM, et al. The long pentraxin PTX3 as a correlate of cancer-related inflammation

and prognosis of malignancy in gliomas. ***J Neuroimmunol*** 2013; 260(1-2): 99-106.
[13] Yeh CM, Lin CW, Chuang CY, Liu YF, Chou CH, Yang SF, et al. Functional genetic variant of long PENTRAXIN 3 gene is associated With clinical aspects of oral cancer in male patients. ***Front Oncol*** 2019; 9: 581.
[14] Gluszek S, Matykiewicz J, Grabowska U, Chrapek M, Nawacki L, Wawrzycka I, et al. Clinical usefulness of pentraxin 3 (PTX3) as a biomarker of acute pancreatitis and pancreatic cancer. ***Stud Med*** 2020; 36(1): 6-13.
[15] Goulart MR, Watt J, Siddiqui I, Lawlor RT, Imrali A, Hughes C, et al. Pentraxin 3 is a stromally-derived biomarker for detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. ***NPJ Precis Oncol*** 2021; 5(1): 1-10.
[16] Choi B, Lee E-J, Shin M-K, Park YS, Ryu M-H, Kim S-M, et al. Upregulation of brain-derived neurotrophic factor in advanced gastric cancer contributes to bone metastatic osteolysis by inducing long pentraxin 3. ***Oncotarget*** 2016; 7(34): 55506.
[17] Choi B, Lee EJ, Park YS, Kim S-M, Kim EY, Song Y, et al. Pentraxin-3 silencing suppresses gastric cancer-related inflammation by inhibiting chemotactic migration of macrophages. ***Anticancer Res*** 2015; 35(5): 2663-8.
[18] Hu T, Qiao L, Li H, Ren H, Ning Q, Zhou H, et al. Pentraxin 3 (PTX-3) Levels in Bronchoalveolar Lavage Fluid as a Lung Cancer Biomarker. ***Dis Markers*** 2020; 2020.
[19] Ahmmed B, Kampo S, Khan M, Faqeer A, Kumar SP, Yulin L, et al. Rg3 inhibits gemcitabine-induced lung cancer cell invasiveness through ROS-dependent, NF-κB-and HIF-1α-mediated downregulation of PTX3. ***J Cell Physiol*** 2019; 234(7): 10680-97.
[20] Ying TH, Lee CH, Chiou HL, Yang SF, Lin CL, Hung CH, et al. Knockdown of Pentraxin 3 suppresses tumorigenicity and metastasis of human cervical cancer cells. ***Sci Rep*** 2016; 6(1): 1-12.
[21] Yu LM, Wang WW, Qi R, Leng TG, Zhang XL. MicroRNA-224 inhibition prevents progression of cervical carcinoma by targeting PTX3. ***J Cell Biochem*** 2018; 119(12): 10278-90.
[22] Kampo S, Ahmmed B, Zhou T, Owusu L, Anabah TW, Doudou NR, et al. Scorpion venom analgesic peptide, BmK AGAP inhibits stemness, and epithelial-mesenchymal transition by down-regulating PTX3 in breast cancer. ***Front Oncol*** 2019; 9: 21.
[23] Zhang P, Liu Y, Lian C, Cao X, Wang Y, Li X, et al. SH3RF3 promotes breast cancer stem-like properties via JNK activation and PTX3 upregulation. ***Nat Commun*** 2020;11(1):1-13.
[24] Wills CA, Liu X, Chen L, Zhao Y, Dower CM, Sundstrom J, et al. Chemotherapy-induced upregulation of small extracellular vesicle-associated PTX3 accelerates breast cancer metastasis. ***Cancer Res*** 2021;81(2):452-63.
[25] Chang X, Li D, Liu C, Zhang Z, Wang T. Pentraxin 3 is a diagnostic and prognostic marker for ovarian epithelial cancer patients based on comprehensive bioinformatics and experiments. ***Cancer Cell Int*** 2021; 21(1): 1-13.
[26] Stallone G, Netti GS, Cormio L, Castellano G, Infante B, Pontrelli P, et al. Modulation of complement activation by pentraxin-3 in prostate cancer. ***Sci Rep*** 2020; 10(1): 1-11.
[27] Güzel Ö, Kösem A, Aslan Y, Asfuroglu A, Balci M, Senel C, et al. The Role of Pentraxin-3, Fetuin-A and Sirtuin-7 in the Diagnosis of Prostate Cancer. ***Urol J*** 2021: 6626.
[28] Falagario UG, Busetto GM, Netti GS, Sanguedolce F, Selvaggio O, Infante B, et al. Prospective Validation of Pentraxin-3 as a Novel Serum Biomarker to Predict the Risk of Prostate Cancer in Patients Scheduled for Prostate Biopsy. ***Cancers (Basel)*** 2021; 13(7): 1611.
[29] Netti GS, Lucarelli G, Spadaccino F, Castellano G, Gigante M, Divella C, et al. PTX3 modulates the immunoflogosis in tumor microenvironment and is a prognostic factor for patients with clear cell renal cell carcinoma. ***Aging (Albany NY)*** 2020; 12(8): 7585.
[30] Liu B, Zhao Y, Guo L. Increased serum pentraxin-3 level predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer after curative surgery, a cohort study. ***Medicine (Baltimore)*** 2018;97(40).
[31] Deng H, Fan X, Wang X, Zeng L, Zhang K, Zhang X, et al. Serum pentraxin 3 as a biomarker of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection. ***Sci Rep*** 2020;10(1):1-10.
[32] Cabiati M, Gaggini M, De Simone P, Del Ry S. Do pentraxin 3 and neural pentraxin 2 have different facet function in hepatocellular carcinoma? ***Clin Exp Med*** 2021:1-8.
[33] Carmo RF, Aroucha D, Vasconcelos LRS, Pereira L, Moura P, Cavalcanti MSM. Genetic variation in PTX 3 and plasma levels associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV. ***J Viral Hepat*** 2016;23(2):116-22.
[34] Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Jouira RB, Garcia E, et al. Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-κB signaling pathway. ***Oncogene*** 2019; 38(30): 5873-89.
[35] Guo P, Zhang SZ, He H, Zhu Y-T, Tseng SCG. PTX3 controls activation of matrix metalloproteinase 1 and apoptosis in conjunctivochalasis fibroblasts. ***Invest Ophthalmol Vis Sci*** 2012; 53(7): 3414-23.
[36] Lee HH, Kim SY, Na JC, Yoon YE, Han WK. Exogenous pentraxin-3 inhibits the reactive oxygen species-mitochondrial and apoptosis pathway in acute kidney injury. ***PloS One*** 2018; 13(4): e0195758.

[37] Lian C, Huang Q, Zhong X, He Z, Liu B, Zeng H, et al. Pentraxin 3 secreted by human adipose-derived stem cells promotes dopaminergic neuron repair in Parkinson's disease via the inhibition of apoptosis. ***FASEB J*** 2021;35(7):e21748.
[38] He D, Yan L. MiR-29b-3p aggravates cardiac hypoxia/reoxygenation injury via targeting PTX3. ***Cytotechnology*** 2021; 1-10.
[39] Chang WC, Wu SL, Huang WC, Hsu JY, Chan SH, Wang JM, et al. PTX3 gene activation in EGF-induced head and neck cancer cell metastasis. ***Oncotarget*** 2015; 6(10): 7741.
[40] Ahmmed B, Khan MN, Nisar MA, Kampo S, Zheng Q, Li Y, et al. Tunicamycin enhances the suppressive effects of cisplatin on lung cancer growth through PTX3 glycosylation via AKT/NF-κB signaling pathway. ***Int J Oncol*** 2019; 54(2): 431-42.
[41] Chan SH, Tsai JP, Shen CJ, Liao YH, Chen BK. Oleate-induced PTX3 promotes head and neck squamous cell carcinoma metastasis through the up-regulation of vimentin. ***Oncotarget*** 2017; 8(25): 41364.
[42] Thomas C, Henry W, Cuiffo BG, Collmann AY, Marangoni E, Benhamo V, et al. Pentraxin-3 is a PI3K signaling target that promotes stem cell–like traits in basal-like breast cancers. ***Sci Signal*** 2017; 10(467).
[43] O'Keefe EP. siRNAs and shRNAs: Tools for protein knockdown by gene silencing. ***Mater Methods*** 2013; 3: 197.
[44] Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. ***Nature*** 2009; 457(7228): 405-12.
[45] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. ***Genes Dev*** 2002; 16(8): 948-58.
[46] Malekshahi SS, Arefian E, Salimi V, Azad TM, Yavarian J. Potential siRNA molecules for nucleoprotein and M2/L overlapping region of respiratory syncytial virus: In silico design. ***Jundishapur J Microbiol*** 2016; 9(4).
[47] Tuschl T. Tom Tuschl's motif siRNA design rules and siRNA rational design. ***Protocol Online*** 2009.
Available at: http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Rules-of-siRNA-design-for-RNA-interference--RNAi--3210.html
[48] Baghban-Kohnehrouz B, Nayeri S. Design, simplified cloning, and in-silico analysis of multisite small interfering RNA-targeting cassettes. ***Mol Biol Res Commun*** 2016; 5(1): 31.
[49] McIntyre GJ, Yu YH, Lomas M, Fanning GC. The effects of stem length and core placement on shRNA activity. ***BMC Mol Biol*** 2011; 12(1): 1-12.
[50] Bofill-De Ros X, Gu S. Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. ***Methods*** 2016; 103: 157-66.
[51] Fakhr E, Zare F, Teimoori-Toolabi L. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. ***Cancer Gene Ther*** 2016; 23(4): 73-82.
[52] Tung JN, Ko CP, Yang SF, Cheng CW, Chen P-N, Chang CY, et al. Inhibition of pentraxin 3 in glioma cells impairs proliferation and invasion in vitro and in vivo. ***J Neurooncol*** 2016;129(2):201-9.
[53] Liu Q, Wang XY, Qin YY, Yan XL, Chen HM, Huang QD, et al. SPOCD1 promotes the proliferation and metastasis of glioma cells by up-regulating PTX3. ***Am J Cancer Res*** 2018;8(4):624.
[54] Ke HH, Hueng DY, Tsai WC. Low expression of pentraxin 3 and nuclear factor-like 2 implying a relatively longer overall survival time in gliomas. ***Chin J Physiol*** 2019; 62(1): 35.
[55] Li Y, Song X, Niu J, Ren M, Tang G, Sun Z, et al. Pentraxin 3 acts as a functional effector of Akt/NF-κB signaling to modulate the progression and cisplatin-resistance in non-small cell lung cancer. ***Arch Biochem Biophys*** 2021; 701: 108818.