

干扰 RNA 的非靶免疫副作用及其 siRNA 序列设计与化学修饰*

韩秋菊¹⁾ 张彩¹⁾ 张建¹⁾ 田志刚^{1,2)**}

¹⁾山东大学药学院免疫药理与免疫治疗研究所, 济南 250012; ²⁾中国科学技术大学免疫学研究所, 合肥 230027)

摘要 siRNA 介导的 RNA 干扰技术已经成为基因功能研究和开展疾病治疗的有用工具. 近年发现, siRNA 在哺乳动物体内可激活天然免疫系统, 诱导干扰素等炎症因子的分泌, 并且可非特异性抑制某些非靶基因的表达, 有可能极大限制 RNA 干扰技术的应用. 进行高效特异性 siRNA 的设计和修饰, 以保持或者增强 siRNA 的特异性靶基因沉默作用, 又消除 siRNA 对机体的非靶免疫副作用, 成为使 siRNA 安全有效应用于临床治疗的关键.

关键词 RNA 干扰, siRNA, TLR, 非靶效应

学科分类号 Q503

RNA 干扰 (RNA interference) 研究, 在 2001 年和 2002 年连续两年被美国《Science》杂志评选为年度 10 大突破技术. 美国科学家 Fire 和 Mello 因为发现 RNA 干扰机制而获得 2006 年诺贝尔生理学或医学奖. RNAi 引起的基因沉默效应为多步骤、多因素参与过程, siRNA (small interfering RNA, 21~23 nt) 和 miRNA (microRNA, 18~25 nt) 2 种类型的小 RNA 发挥了核心功能作用^[1,2]. miRNA 和 siRNA 是序列特异性的转录后基因表达调控因子, 两者在结构特征、作用机制等方面有相似之处, 亦有所不同. miRNA 是内源性的非编码 RNA, 按其作用模式可分为 3 种: a. 与靶基因完全互补结合, 作用方式和功能与 siRNA 非常类似; b. 与靶基因不完全互补结合, 进而抑制翻译而不影响 mRNA 的稳定性; c. 具有以上两种作用模式: 当与靶基因完全互补结合时, 直接靶向切割 mRNA, 当与靶基因不完全互补结合时, 起调节基因表达的作用. siRNA 是 RNAi 途径的主要作用物, 通常是外源的, 与互补的靶 mRNA 完全结合, 降解 mRNA 后从而抑制蛋白质翻译^[3].

RNAi 技术代替传统反义核酸进行转录后基因沉默, 已经迅速而广泛地应用到基因功能、基因表达调控机制和基因治疗研究等热门领域, 并为病毒感染、遗传性疾病、肿瘤等疾病的基因治疗开辟了

新的途径. 近两年来, 该领域的科学论文及报道成爆炸性增长, 几乎每天都有新的结果涌现, 为人类重大疾病的基因治疗带来革命性变化. 针对呼吸道合胞病毒在肺部扩增的关键蛋白 NS1 的 siRNA 装入壳聚糖纳米颗粒, 以鼻喷方式给药, 取得了理想的抗病毒治疗效果, 目前已进入 I 期临床治疗^[4]. 以 SV40 为载体介导的 siRNA 亦用于白血病的临床治疗^[5].

随着 RNAi 技术的广泛研究和推广应用, 合成的 siRNA 在哺乳动物体内所引起的非靶(off-target) 效应(尤其是免疫副作用)引起极大关注, 人们认为 siRNA 非靶效应有可能成为限制 siRNA 基因治疗的主要因素. siRNA 的非靶(off-target) 免疫副效应主要是激活天然免疫系统, 诱导炎症因子(如 IFN- α 、IFN- β 、TNF- α 、IL-6 等)的产生, 同时可引起某些非靶基因的非特异性沉默或表达上调, 引起细胞的生长抑制等非靶向副作用和毒性作用^[6~9]. siRNA 的这种脱靶效应和免疫刺激毒性极大地影响着它的体内应用, 为 siRNA 走向临床带来了新的挑战. 如何既避免 siRNA 对机体免疫系统的非靶副

* 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2004CB518807 和 2006CB504300).

** 通讯联系人. Tel: 0531-88381980, E-mail: tzzg@ustc.edu.cn

收稿日期: 2007-02-05, 接受日期: 2007-02-07

作用又保持 siRNA 的特异性靶基因沉默作用, 成为 siRNA 设计的关键。

1 siRNA 非靶 (off-target) 免疫副作用

合成的 siRNA 在哺乳动物体内能够激活天然免疫系统, 诱导干扰素(IFN- α 、IFN- β)和炎性因子(TNF- α 、IL-6 等)的产生, 引起淋巴细胞减少和血小板减少, 导致动物体重明显减少^[6-8]。机体天然免疫系统主要通过 TLRs (Toll-like receptor)、PKR (dsRNA-dependent protein kinase)、RIG- I (retinoic acid inducible gene)等介导 siRNA 的识别, 其中 TLRs 的活化尤为关键。目前报道的哺乳动物免疫细胞 TLRs 家族有 11 个成员, 可以识别病原相关分子模式(PAMP), 包括未甲基化的 CpG DNA 和病毒 dsRNA, 其中 TLR3、TLR7、TLR8 以及 TLR9 与核苷酸的识别有关^[9]。TLR7、TLR8、TLR9 存在于细胞内体, 可以识别 dsRNA 并依赖衔接蛋白 MyD88, 活化 NF- κ B (nuclear factor kappa B)、MAPK (mitogen-activated protein kinase)、IRF-7 (interferon regulatory factor)等信号通路, 刺激干扰素及炎性因子的分泌。而 TLR3 分布于胞膜和内体中, 其对核苷酸的识别依赖于 TRIF 衔接蛋白, 进而活化 IRF-3, 导致干扰素的产生。另外, 胞浆中 dsRNA 可直接激活 RIG- I 和 PKR, 导致干扰素和促炎症因子的产生^[9, 10]。

作者在从事天然免疫识别(NK、NKT 细胞)和肝脏天然免疫学研究中观察到, 人工合成的病毒双链 RNA 的模拟物 Poly (I : C) 可作为 TLR3 的配体, 在体内外明显刺激 NK 细胞的活化和诱导 TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子的产生。例如, 小鼠体内注射 Poly(I : C)后 NK 细胞可在肝脏大量募集并高度活化、导致血清转氨酶升高和轻度的肝损伤, 细胞清除实验显示这种肝损伤是 NK 细胞依赖的^[11]。另外, PolyI : C 可作用于肝脏枯否氏细胞(Kupffer cell)的 TLR3 受体, 降低同一细胞上 TLR4 的表达, 进而使细菌脂多糖失去作用的靶点, 引起免疫应答的变化^[12], PolyI : C 对 TLR-3 的活化还可以通过激发小肠上皮细胞和淋巴细胞之间的分子识别而诱发自身免疫性肠炎^[13]。由于 siRNA 的结构与 PolyI : C 具相似性, 提示 siRNA 可能通过活化 TLR3, 激活天然免疫系统。目前已有 siRNA 活化 TLR3 的证据^[14, 15], 发现 siRNA 激活免疫系统是序列依赖性的, 并且正义链和反义链都能诱导炎症因子的分泌, 而 TLR3 既不能识别 ssRNA 也不需要序列特

异性, 因此有人认为, TLR3 通路在 siRNA 激活天然免疫的过程中并不代表着主要的机制^[9]。存在于内体的 TLRs (尤其是 TLR7 和 TLR8) 在 siRNA 的识别中被认为发挥着更为主要的作用。研究表明, siRNA 能够刺激浆细胞样 DC(pDC), 产生高水平 I 型干扰素, 此作用是 TLR7 依赖性的, 在 TLR7 缺陷的小鼠中, siRNA 的免疫刺激作用丧失^[7, 9, 11, 16, 17]。人单核细胞不表达 TLR3 和 TLR9, 但表达高水平的 TLR8, 对 ssRNA、dsRNA 及合成的鸟嘌呤类似物 R-848 (可作为 TLR8 的配体)均有应答^[9, 16]。因此, 近期的一系列研究均提示, siRNA 能够激活多种免疫细胞 (包括 NK 细胞、T 细胞、B 细胞、树突状细胞、巨噬细胞和单核细胞等), 其中 pDC 通过内体的 TLR7 和 TLR9 识别 siRNA 后, 分泌大量 IFN- α , 可促进 pDC 和髓样 DC(mDC)的成熟和存活, 并上调共刺激分子的表达。未成熟的 mDC 也可通过 TLR3、TLR7、TLR8 识别 RNA 而活化, 产生 IL-12 和促炎症因子, 进而促进 naïve T 细胞的成熟。此外, 单核细胞在被 RNA 激活后, 可向巨噬细胞或者树突状细胞分化^[10, 16]。

2 siRNA 其他非靶 (off-target) 副作用

2.1 siRNA 非特异性基因沉默作用 (nonspecific gene silencing)

siRNA 用于“沉默”某个特异靶基因时也可能引起一些非靶基因的非特异性沉默或表达上调。Jackson 等^[18]采用基因芯片技术最早发现, siRNA 与序列相似的靶点有交叉反应, 非靶转录物 (off-target transcripts)与 siRNA 共有部分互补序列时, siRNA 可以直接介导相当数目的非特异基因的沉默。近年来的一些研究也对 RNAi 的特异性提出了质疑, Scacheri 等^[19]检测了 10 种针对 MEN1 (multiple endocrine neoplasia)的 siRNA 在 HeLa 等细胞中的沉默作用, 发现与 MEN1 功能无关、而与细胞生长状态密切相关的 p53 和 p21 蛋白表达明显降低。另外, Lin 等^[20]在鉴别 HIF-1(heterodimeric transcription factor) 信号通路中的一种新调节因子的研究中, 也发现了广泛的非特异性沉默效应。

多种机制参与 siRNA 介导的非靶作用, 包括干扰素系统的诱导、部分互补序列介导的 mRNA 降解以及 miRNA 样翻译抑制。siRNA 通过 TLR3 激活免疫细胞, 导致干扰素及炎症因子的产生, 与其介导的序列非依赖性的基因沉默有关^[14, 18-20]。较高频率的 siRNA 非特异性沉默作用, 极大地影响了

RNAi 的特异性, 限制了 siRNA 在基因组研究和临床治疗中的应用.

2.2 siRNA 的非靶毒副作用 (side effects and toxicities)

一些研究表明, siRNA 能够不依赖靶 mRNA 对细胞活力产生很大影响, 可导致细胞的凋亡或者生长抑制, 高浓度的 siRNA 还能引起系统基因的改变^[19,21]. siRNA 的大小影响其毒性, 17 nt 的 siRNA 增加 2 nt 后, 其对细胞活力的影响随之增大. siRNA 的细胞毒作用依赖于完整的 RNAi 通路, 介导 RNAi 的蛋白结构能协同增强非靶基因的调控, 引起细胞表型的改变. siRNA 产生毒副作用是序列和浓度依赖性的, 进入 RISC 的 siRNA 反义链上的四碱基 UGGC 和 RNAi 中的关键组件 eIF2C 与 siRNA 的毒性作用有密切关系. 不同研究提示, 有多种机制介导了 siRNA 引起的细胞毒性, 也可能由于单个基因的敲除使细胞的内环境总体失衡. 微点阵研究表明, 序列特异性的细胞毒性与 TLRs 激活无关^[19,21].

目前关于 siRNA 的非靶向效应对于细胞生理学性质影响的研究还很少, 进入细胞质的 siRNA 能否全部形成 RNA 诱导沉默复合物(RISC)或者迅速发生降解, 能否与一些非相关蛋白结合、进而影响其他的细胞活动, 均有待于进一步研究. 总之, 某些 siRNA 能够诱导与表型有关的非靶副作用, 这在 RNAi 用于基因组研究中会造成一些假阳性结果, 也会大大限制 RNAi 的应用.

3 应用序列设计与化学修饰防止 siRNA 非靶免疫副作用的可能途径

3.1 siRNA 序列分析

研究发现, 并非所有的 siRNA 都能激活 TLR7 和 TLR8, siRNAs 能否刺激机体的免疫应答与 siRNA 的序列组成、大小及结构相关. 5' UGUGU 3' 和 5' GUCCUCAA 3' 或者富含 UG 基序的 siRNA 能够诱导强烈的免疫刺激, 分泌大量 IFN- α 和 IFN- β , 而被称为免疫刺激性基序. 因此, 在 siRNA 的设计中应该考虑避免出现较多的 GU 序列, GU 的比例、位置及侧翼序列组成、siRNA 的大小均影响着 siRNA 诱导的免疫应答^[6,7,12]. siRNA 正义链和反义链均可诱导细胞因子产生, 而 ssRNA(single-stranded small interfering RNA)的免疫刺激作用比 dsRNA 更为强烈^[22]. 另外, 有研究发现, 3'端 2 个核苷酸悬突是胞内 Dicer 酶降解产物

的标志, 是进行 siRNA 序列设计必需考虑的, 因为平端 siRNA 更容易被 RIG-I 识别, 引起非靶免疫刺激作用, 并且诱导敏感基因 P56 的表达^[23].

研究还发现, mRNA3' 端非翻译区(UTR)与 siRNA 反义链的关键序列 (seed region, 2~8 nt) 完全匹配时, 可通过 miRNA 样基因沉默机制介导非特异基因的下调, 此作用依赖于互补区域的拷贝数、互补区在 mRNA 上的位置及其周围的序列. 因此在进行 siRNA 序列设计时, 应尽量使 siRNA 序列最小程度上与 mRNA 的 3' UTR 互补, 同时提高与靶基因的匹配程度, 以提高 siRNA 的特异性^[19,20].

各种模式生物基因测序的完成和生物信息学的发展, 为设计高效、特异 siRNA 提供了精密和系统的分析方法. 科学家们设计了多种算法和模型, 应用现代化的计算机技术分析庞大复杂的基因组信息. 藉此可以对所有已知基因的非靶可能性以及影响 RNAi 特异性的因素 (包括 siRNA 的长度, dsRNA 的长度、靶基因的序列等) 进行分析. 目前, 在线软件 dsCheck 可以迅速准确评价长的 dsRNA 引起的非靶效应, 能够模拟 RNAi 过程, 随后列举一些可能的非靶基因, 极大增加了 RNAi 设计的效率和灵敏度, 使 siRNA 的非靶效应最小化^[24].

3.2 siRNA 的修饰及其他技术改造

仅仅依靠 siRNA 的序列分析还不足以完全消除 siRNA 的非靶副作用. 目前, 此领域已引起国际上许多科学家的关注, 并致力于寻找有效的 siRNA 修饰方式. 尽管具体的机理和有效的方法尚无明显进展, 但期望既保持或者增强 siRNA 的特异性靶基因沉默作用, 又消除 siRNA 对机体的非靶免疫副作用的相关技术已陆续建立. 通常有两种途径来解决 siRNA 面临的障碍, 其中之一是改变导入系统而使 siRNA 不在体内滞留. 将胆固醇连接 siRNA 后导入体内, 在一些动物模型中得到了良好的效果^[25]. Song 等^[26]在靶向沉默 HIV-Gag 的研究中证实, 采用鱼精蛋白-抗体融合蛋白导入化学合成的 siRNA 不会诱导免疫刺激作用. 其二是进行化学修饰, 包括磷酸骨架修饰、核糖修饰和碱基修饰. 例如, 2'-F-RNA、2'-H-2'-F- β -D-RNA (FANA)、2'-OMe-RNA、2'-烯丙基-RNA、锁核酸 (locked-nucleic-acid, LNA) 修饰等, 在不改变基因沉默效果的同时, 能够大大提高 siRNA 的特异性, 降低非靶向抑制效应, 且不诱导炎症因子的产生^[8,27].

Morrissey 等^[8]将靶向 HBV RNA (HBV263M) 的

siRNA大部分核苷酸糖基(>90%)的 2'-OH 用 2'F、2'O-Me 或者 2'H 取代后,再用脂质体进行胶囊化,形成稳定的核酸脂肪微滴(stable nucleic acid lipid particles, SNALP),发现这种修饰的 siRNA 在体内有更好的抗 HBV 能力,并且能消除免疫刺激作用和降低肝损伤,提示化学修饰和导入系统的联合改进大大提高了 siRNA 的特异性.另外,对靶向内源性载脂蛋白 B (apo B) siRNA 中的 GU 基序或者 2xG、3xU 进行有选择性地 2'-OMe 修饰后,体内外实验均表明这些 siRNA 能够避免天然免疫系统的识别,完全消除免疫刺激作用^[28].而 Sioud^[22]将 siRNA 分子中尿嘧啶(U)2 位的羟基用 2'F、2'-OMe、2'-H 进行取代以后发现,免疫刺激作用完全消除,修饰后 siRNA 的基因沉默能力并没有受到明显影响,这也进一步证实 siRNA 的设计上尽量避免富含 G、U 序列的策略是正确的.最近的一项研究表明,siRNA 至少含有 4 个与 PKR 相结合的位点,在这些位置上引入 N²-苄基-2'-脱氧鸟苷后,可抑制 RNA-PKR 的形成,阻断 PKR 的激活,从而有效降低免疫刺激作用^[29],提示,在 siRNA 的特殊位置进行合理的修饰,可以防止 siRNA 与胞内 dsRNA 识别通路中某些成分的相互作用.

锁核酸(LNA)技术被认为是目前最有前景的 siRNA 化学修饰技术.该技术是对核糖分子的 2'氧和 4'碳进行亚甲基连接,形成刚性的缩合结构,其最大的优势是能提高 siRNA 的热力学稳定性和生物学稳定性,增强靶基因的特异性沉默能力.首先,LNA 能够通过有选择性地增加 siRNA 正义链闭合碱基对的亲和力而改变其偏倚,其次,LNA 可能掺入到正义链的 RISC 结合位置,破坏其参与基因裂解的能力.已发现,正义链 3'端修饰的 LNA-siRNA 能够有效抑制 IFN- α 的分泌^[6].Elmen 等^[30]采用 LNA 技术修饰针对 SARS 病毒序列的 siRNA,可明显增加 siRNA 在血清中的稳定性,延长 siRNA 的半衰期,同时降低序列相关的非靶副作用.与未修饰的 siRNA 相比,LNA-siRNA 能更有效地靶向抑制 SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus)的表达,保护 Vero 细胞(非洲绿猴肾异倍体细胞)免受 SARS 病毒诱导的细胞凋亡.

4 结 语

尽管 siRNA 的非靶免疫副作用为其临床应用

带来了新的挑战,但 RNAi 技术的迅速发展和优势有目共睹.通过高效特异的 siRNA 序列设计和化学修饰,达到既保持或增强靶基因的特异性沉默效果,又避免 siRNA 诱导的免疫刺激和非靶副作用,将为 siRNA 更加安全有效地应用于临床开辟更广阔的前景,亦将为高通量功能基因组学、蛋白质组学、基因图谱分析及药物靶点筛选等研究提供可靠的研究手段.

参 考 文 献

- 1 Kalavrizioti D, Vourekas A, Stamatopoulou V, *et al.* RNA-mediated therapeutics: from gene inactivation to clinical application. *Curr Top Med Chem*, 2006, **6** (16): 1737~1758
- 2 Mello C C, Conte D J. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 2004, **431**: 338~342
- 3 Sontheimer E J, Carthew R W. Silence from within: Endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*, 2005, **122**: 9~12
- 4 Barik S, Bitko V. Prospects of RNA interference therapy in respiratory viral diseases: update 2006. *Expert Opin Biol Ther*, 2006, **6** (11): 1151~1160
- 5 Pai SI, Lin Y Y, Macaes B, *et al.* Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther*, 2006, **13** (6): 464~477
- 6 Sledz C A, Holko M, Veer M J, *et al.* Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 2003, **5** (9): 834~839
- 7 Hornung V, Guenther M, Bourquin C, *et al.* Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med*, 2005, **11** (3): 263~270
- 8 Morrissey D V, Lockridge J A, Shaw L, *et al.* Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (8): 1002~1007
- 9 Marques J, Williams B. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (11): 1399~1405
- 10 Sioud M. Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine*, 2006, **12** (4): 167~176
- 11 Dong Z, Wei H, Tian Z. *et al.* Involvement of natural killer cells in PolyI:C-induced liver injury. *J Hepatol*, 2004, **41** (6): 966~973
- 12 Jiang W, Sun R, Wei H, *et al.* Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (47): 17077~17082
- 13 Zhou R, Wei H, Sun R, *et al.* Recognition of double-stranded RNA by Toll-like receptor 3 induces severe small intestinal injury in mice. *J Immunol*, 2007, **178** (7): 4548~4556
- 14 Kariko K, Bhuyan P, Capodici J, *et al.* Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through Toll-like receptor 3. *J Immunol*, 2004, **172**: 6545~6549
- 15 Alexopoulou L, Holt A, Medzhitov R, *et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001, **413** (6857): 732~738

- 16 Heil F, Hemmi H, Bauer S, *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA *via* Toll-like receptor7 and 8. *Science*, 2004, **303**: 1526~1529
- 17 Judge A D, Sood V, Shaw J R, *et al.* Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (4): 457~462
- 18 Jackson A L, Bartz S R, Schelter J, *et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 2003, **21** (6): 635~637
- 19 Scacheri P C, Rosen O R, Caplen N J, *et al.* Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (7): 1892~1897
- 20 Lin X, Ruan X, Anderson M G, *et al.* siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33** (14): 4527~4535
- 21 Fedorov Y, Anderson E M, Birmingham A A, *et al.* Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*, 2006, **12** (7): 1188~1196
- 22 Sioud M. Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: A central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses. *Eur J Immunol*, 2006, **36**: 1222~1230
- 23 Marques J T, Devosse T, Williams B, *et al.* A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2006, **24** (5): 559~565
- 24 Naito Y, Yamada T, Matsumiya T, *et al.* dsCheck: highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**: 589~591
- 25 Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004, **432** (11): 173~178
- 26 Song E, Zhu P, Lee S K, *et al.* Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (6): 709~717
- 27 Dowler T, Bergeron D, Tedeschi A L, *et al.* Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinonucleic acid (FANA). *Nucleic Acids Research*, 2006, **34** (6): 1669~1675
- 28 Judge A D, Bola G, Lee A H, *et al.* Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing *in vivo*. *Molecular Therapy*, 2006, **13** (3): 494~505
- 29 Puthenveetil S, Whitby L, Ren J, *et al.* Controlling activation of the RNA-dependent protein kinase by siRNAs using site-specific chemical modification. *Nucleic Acids Research*, 2006, **34** (17): 4900~4911
- 30 Elmen J, Thonberg H, Ljungberg, K, *et al.* Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33** (1): 439~447

Off-target Effects of RNAi and Design of Highly Effective Modified siRNAs*

HAN Qiu-Ju¹⁾, ZHANG Cai¹⁾, ZHANG Jian¹⁾, TIAN Zhi-Gang^{1,2)**}

¹⁾*Institute of Immunopharmacology and Immunotherapy, Shandong University, Jinan 250012, China;*

²⁾*Institute of Immunology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China*

Abstract RNA interference mediated by short interfering RNA is widely used to study functional genes and also being developed for therapeutic applications. However, recent study demonstrated that siRNA might activate innate immune system and induce huge production of inflammatory cytokines in mammals, and also randomly inhibit expression of undesired genes. Designing highly effective siRNAs or modifying the siRNA to retain or enhance the silence efficiency and meanwhile abolish the off-target effects associated with immunostimulation then become the key techniques in application of siRNAs as safe and effective therapeutic agents.

Key words RNAi, siRNA, TLR, off-target effect

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2004CB518807 and 2006CB504300).

**Corresponding author . Tel: 86-531-88381980, E-mail: tzg@ustc.edu.cn

Received: February 5, 2007 Accepted: February 7, 2007