转化医学研究（电子版）2011，1（1）：80－90
Translational Medicine Research（Electronic Edition），2011，1（1）：80－90

评　论



照日格图：研究员，现任中华医学杂志英文版总编辑，中华儿科杂志副总编辑。2007 年始任美国新英格兰医学杂志（The New England Journal of Medicine）编委。感兴趣的领域：感染性疾病、儿科学、儿科感染性疾病、临床病毒学、某些分子生物学技术。

按语：在转化医学研究中，如何将基础研究成果转化为临床应用受多种因素制约。其中，安全性是不容忽视的。强调安全性无论对临床受试者（患者）还是研究者都是极其重要的。该文以 RNA 干扰（RNAi）技术为例，结合生物医学文献检索，论述了加强临床试验中 RNAi 安全性研究的必要性及相关建议，为转化医学研究提出了一个极其严肃的科学问题。

RNA 干扰技术的临床应用需要更多的安全性研究

照日格图*

《中华医学杂志》（英文版）编辑部，北京 100710

看到关于 RNA 干扰（RNAi）技术的一期和二期临床试验的文章发表，是一件令人兴奋的事。RNA 干扰是一种可以选择性地（序列特异性地）使目标基因沉默的技术。已经发表的临床试验文章是关于将该技术应用于治疗人类的少数几种疾病的，虽然有人相信该技术有被用于成千上万种疾病的潜力。对于 4 种潜在 RNAi 产品进行的 6 项临床试验的文章的发表，象征着这种迷人的基因沉默技术已经距临床应用很近了，从而很快将给临床医师提供与诸如恶性肿瘤、病毒感染、某些年龄相关性变性性疾病，以及可能许许多多与基因的突变或过度表达相关疾病的战斗中可用的崭新武器。本篇评论旨在根据国际医学期刊上发表的文献了解 RNAi 技术安全性研究方面的概况，包括在临床和动物实验研究中对安全性问题的研究情况，并对将此技术安全应用于人类作出一些建议。

安全性对于任何用于人类疾病的新的治疗而言，都是极其重要的。如果安全性未得到确定，即使是非常有效的治疗方法也不能用于临床，特别是首次对人类进行的研究，即使是规模不大的一期或二期临床试验，在试验开始之前，要进行极其慎重的考虑。临床医师需要了解一种新的治疗药物有哪些安全性方面的问题，安全性方面的问题从药物的哪些方面产生，对于安全性问题是如何进行研究的，以及在一种新的药物被用于治疗患者之前是否有了足够的证据表明该药是安全的，等等，以便使患者的安全性得到保障，不给临床试

* 通讯作者：照日格图　E－mail：zhaorig@126.com

验的参加者和可能接受新药治疗的千百万患者造成不必要的损害。

1 文献检索发现着重研究 RNAi 安全性的研究报告很少

在 PubMed 作的一项文献检索，所用的检索词是“RNAi OR siRNA AND treatment AND in vivo”，设以下限制条件：“recent 5 years”，“Enlish language”，“journal articles”，结果检出了 1739 篇文章。在上述检索词中加入“safety”并用“AND”与其连接后检索，只检出 31 篇文章。阅读这 31 篇文章每一篇的摘要后发现，其中的 18 篇为论著文章，13 篇为文献综述，并且还发现，这 18 篇论著文章中，只有 3 篇是对安全性问题作了实质性研究的，而其余的 15 篇文章中只是提到安全性这个词一到二次，安全性并不是那些研究的主要内容。这些结果明确地表明，关于 RNAi 的大部分已经发表的文章没有将这一极其重要的，可能用于治疗各种疾病的技术的安全性作为重点来研究。对 1739 篇文章中一部分摘要的阅读表明大部分文章也没有重点研究安全性，而且对于 siRNA 或其载体或递送系统的安全性，连提都没有提及。

2 可能与 RNAi 安全性相关的因素

RNAi 是一种序列特异性目标基因沉默技术，该技术应用合成的小或短干扰核糖核酸（siRNA）或某种能表达出短发卡形 RNA（shRNA）的载体，这种载体最终可被转化为 siRNA，其序列与目标基因的信息核糖核酸（mRNA）某段序列互补。如果将特异设计的 siRNA 递送到有目标基因 mRNA 的细胞内，它可与目标序列结合，并干扰 mRNA 表达，从而使相应的基因沉默。对于某些疾病的治疗，可将 siRNA 直接注射到组织内，但对许多其他疾病的治疗，则需要某种载体或递送系统来全身用药或其他途径给药，使药物到目标器官或组织或细胞并释放出 siRNA。载体或递送系统可分类为病毒性或非病毒性两类，后者包括阴离子聚合物、阴离子脂复合物及（或）脂质体、纳米微粒[1-3]以至细菌（非致病性）[4]等等。安全性问题来自 siRNA 本身和其载体或递送系统。

来自 siRNA 本身的安全性问题主要与种子序列（小 RNA 分子的一个调节目标结合的一个小区）依赖的目标外作用和固有细胞免疫反应（γ 干扰素反应）相关。前者与 siRNA 的设计相关，如果 siRNA 中能避免出现某些特定的序列，这种目标外作用是可以防止出现的。但在临床前细胞水平上的研究时，就应当对可能的细胞毒性作用或对细胞功能的影响等安全性问题给予关注[5]。

另一方面，很小量的 siRNA 可能在正常人体内就存在而并不引起严重的问题。然而，大剂量、长时间给予 siRNA，有可能激活固有免疫反应，因为免疫系统可能将其“当做”外源性 RNA。有人认为表达的 shRNA 能够防止固有免疫的激活。但是，有人指出，大量的 shRNA 表达可能有毒性，而且用 U6 启动子证实在近半数的实验小鼠中是致死性的，这是因为内源性沉默途径的饱和所致。用一种比较弱的 H1 启动子，或者在以肝脏为目标的递送中，一种 pol－Ⅱ启动子，则可防止毒性效应[5,6]。

siRNA 的载体或递送系统的分子大小、结构和其他特性与安全性问题相关。最常研究的病毒载体包括非致病性腺病毒、慢病毒等。病毒载体的优点有一定的细胞特异性，在感染细胞后表达 shRNA 的效率高，以及可长时间稳定地表达 shRNA。然而，虽然对用作载体的病毒从遗传学上进行过改良而消除了其致病性，但仍然有对其致病性的担忧。固有和获得性免疫反应是另一种主要的担忧，一旦发生这种反应，则可减低递送的效果和效率，可能有毒性，（载体病毒基因）在与宿主的基因组发生随机整合后，可诱发不应有的基因表达[7]，并且可能造成与免疫复合物相关的问题或细胞介导的免疫反应或炎症反应。

非病毒性递送系统也可造成某些安全性方面的担忧，虽然这类的载体被认为比病毒性载体安全。Akhtar 和 Hollins 提示，阴离子脂质和阴离子聚合物可直接诱导出可能对 siRNA 的活性和特异性有影响的基因表达的改变[8,9]。聚乙烯亚胺（polyethylinimine，PEI）被证实在 siRNA 中是安全而有效的[10]。然而，它的分支型在体内引起了基因的改变，并且有毒性[7,8]。全身应用脂质鱼精蛋白－DNA 纳米微粒曾被证实是 siRNA 的良好递送系统，但后来发现它使各种炎性或免疫性细胞因子，包括白介素 6 和 12 和 γ 干扰素，剂量依赖性地增多[11,12]。

3 与已发表的临床研究相关的安全性问题

在 PubMed 进行的一项对于 RNAi 临床试验的文献检索检出了 45 篇文章，但阅读所有这些文章的摘要后发现，其中只有 6 篇是在期刊上发表的报告临床

表 1　已发表的 siRNA 临床试验报告的基本信息和相关的安全性问题

编号	作者姓名和参考文献编号	人数	siRNA 的名称	siRNA 的目标基因	预期的疗效	载体	递送方法	安全性的描述	已发表的临床前安全性研究
1	Zamora MR［13］	16	ALN－RSV01	呼吸道合胞病毒（RSV）N 蛋白基因	在肺移植患者中减少或防止 RSV 感染的发生	无，是气溶胶	吸入	耐受良好，无药物相关的严重不良事件或吸入后肝功能降低	无
2	DeVincenzo J［14］	43	ALN－RSV01	呼吸道合胞病毒（RSV）N 蛋白基因	在肺移植患者中减少或防止 RSV 感染的发生	无	鼻内喷雾	耐受良好。不良事件在性质和程度上组间相似。很少量的中度 AE，无重度 AE 发生。	无
3	DeVincenzo J［15］	101	ALN－RSV01	呼吸道合胞病毒（RSV）N 蛋白基因	在肺移植患者中减少或防止 RSV 感染的发生	无	鼻内喷雾	耐受良好，安全性概况与生理盐水安慰剂组相似	无
4	Kaiser PK［16］	26	Sirna－027	VEGFR－1	改善新生血管性年龄相关黄斑变性	无	局部（玻璃体内）注射	无剂量反应或未见限制剂量的效应	无，2 项动物实验研究都未包括安全性内容
5	Leachman SA［17］	1	TD101	角蛋白 6a（K6a）N171K 突变 mRNA	硬结组织的消退	无	局部（皮内）注射	在试验期间未出现不良事件	无。能找到的 5 条参考文献中无一条是关于安全性的
6	Wyszko E［18］	46	ATN－RNA	tenascin-C，一种细胞外基质糖蛋白*	肿瘤生长延迟或无复发的症状，总体生存情况改善	无	局部（肿瘤内）注射	未提及	无

注：#本栏内所列出的数字是接受了 siRNA 的研究对象的人数。*这一糖蛋白引起肿瘤的黏附、侵入、移行和增殖。RSV 指呼吸道合胞病毒；VEGFR－1 指血管内皮生长因子受体－1；AE 指不良事件。

试验的论著文章。这些文章是对4 种潜在 siRNA 产品进行的6 项临床试验的报告，这些潜在 siRNA 产品是为通过沉默基因治疗以下 4 种疾病（表 1），即呼吸道合胞病毒（RSV）感染[13-15]、新生血管性年龄相关黄斑变性[16]、一种被称为先天性厚甲症（手指或足趾的先天性异常增厚）的遗传性疾病[17]和脑肿瘤（多形性成胶质细胞瘤）[18]。这些文章的作者应当为他们用这种全新的治疗方法治疗这些疾病取得成功而受到祝贺，尽管这些研究还只是很初步的一期和二期临床试验。这些疾病中有 2 种，即 RSV 感染和脑肿瘤，往往严重到足以危及患者的生命，而且对这两种疾病以及研究的其他 2 种疾病均无令人满意的疗法。这些研究证实，siRNA 有效而且安全，耐受良好，未引起任何严重不良事件。使目标基因成功的沉默，显著减轻或减少了症状和体征，防止或减少了某些疾病的发生并改善了患者的情况。然而，除了表 1 中的第 3 项试验之外，所有的研究似乎都没有足够地重视 siRNA 的安全性问题。有趣的是，全部 6 项试验都用了局部途径使用了 siRNA，或通过吸入，或局部通过注射途径给药，也就是说，所用的治疗药是裸 siRNA，没有一项试验用了载体或递送系统。因此，这些研究未有机会在人类研究对象中评价任何载体或递送系统的安全性和有效性。

当本文作者试图对潜在 siRNA 产品的临床前安全性研究进行回溯时发现这 6 项研究大部分都没有已经发表的无论是体内还是体外的系统性安全性研究资料。其部分原因可能是对 siRNAs 可能用过不同的名称或代码，因此在文献检索时，如果只用表 1 中列出的名称，可能会错过某些已经发表的文章。但不仅对这 4 种已经作过临床试验的潜在产品，而且对许多将来有可能应用，正在研发阶段的其他 siRNA，安全性方面的研究似乎还很有限。除了能预测到的安全性问题之外，一种新的治疗方法，即使在不同种属的动物，包括非人类灵长目动物中充分试验后，仍有可能引起绝对未预测到的严重的和危及生命的不良事件。由一种能直接激活调节性 T 细胞的单克隆抗体在一项一期临床试验中出现的“细胞因子风暴”，造成了意外的难治性休克和多器官功能衰竭[19]。这是在首次在人类进行的试验中出现的研究药物的一种令人感到震惊的意料之外的严重不良作用事例。由该试验得到的教训极其重要而且有深远的意义。在该试验药物的临床前研究中，曾经观察到出现暂时性淋巴细胞增多，但与此相反，在给 6 名健康志愿者用了该药后，却出现了严重的淋巴细胞减少。该报告的作者指出，这一情况表明，在临床前和临床研究中，有可能出现完全相反的现象，这使一种研究药物的安全性估计变得更加困难和复杂。然而，在一种与安全性相关的现象中如此惊人的差异，可能与人类和研究中所选择的动物种属之间遗传上的差异有关[19]。如果我们看一下那 4 种潜在产品和其他许多正在开发中的 siRNA 的临床前研究，绝大部分是在小动物（大鼠和小鼠）中进行的。研究者应当严肃地考虑用遗传学上与人类更接近的动物。表 2 可提供关于非人类生物与人类之间基因 DNA 序列相似程度的一些相关信息[20]。

表 2　非人类生物与人类之间 DNA 序列的相似性

非人类生物	人类 DNA 序列相同的比率	在过去的研究中使用的领域
香蕉	50%	NDA
果蝇	60%	NDA
小鼠	~85%	基因转移
猪	71%	诱发的疾病，心血管病和关节炎
狗	75%	NDA
牛	83% *	NDA
家兔	（“Y”染色体外的所有染色体 paints）	NDA
猩猩	98.8%	NDA

注：此表系根据参考文献［20］和网址 www.genome.gov 制作的。NDA 指无数据可得到。

大的哺乳动物很少被用于 siRNA 的研究，虽然 Tang 等[21]用猕猴模型树立了很好的一个范例并发现无论在较大或是较小的剂量下 siRNA 都没有显示任何由 siRNA 诱发毒性的征象。

4 对与 siRNA 或其载体或递送系统相关的安全性问题的一些建议

因为安全性问题对于任何类型的新治疗药物而言对于保护临床试验的参加者和可能接受新的药物治疗的患者，都是极其重要的，所以，对于开始首次在人类进行的临床试验应当有一些相对严格的制度和规定。这些制度和规定应当是以科学为基础的。临床前的安全性研究应当是全面的，应当有足够的透明度，而且研究的结果应当在同行专家审阅的期刊上发表。临床前的安全性研究应当包括急性、亚急性和慢性毒性试验，致癌性、致畸性、生殖毒性、免疫毒性，而且应当对不同年龄组的儿童也是安全的。对于安全性方面的动物实验研究，对动物种属应当有要求，特别是要包括对非人类灵长类动物的安全性研究。

总之，对于 RNAi 技术的临床应用，应当总是强调安全性。对于新的治疗药物，在本文中是 siRNA 或其他 RNAi 药物，严格的制度和规定一方面有可能使研究和开发的过程和被有关部门批准的速度减慢，但另一方面，却可以较好地保护临床试验参加者和千百万患者的健康和幸福。

参考文献

[1] Posadas I, Guerra FJ, Ceña V. Nonviral vectors for the delivery of small interfering RNAs to the CNS. Nanomedicine (Lond), 2010, 5 (8): 1219－1236.

[2] Hart SL. Multifunctional nanocomplexes for gene transfer and gene therapy. Cell Biol Toxicol, 2010, 26 (1): 69－81.

[3] Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. J Intern Med, 2010, 267 (1): 44－53.

[4] Xiang S, Keates AC, Fruehauf J, et al. In vitro and in vivo gene silencing by TransKingdom RNAi (tkRNAi). Methods Mol Biol, 2009, 487: 147－160.

[5] Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. Nat Rev Genet, 2007, 8 (3): 173－184.

[6] Giering JC, Grimm D, Storm TA, et al. Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic. Mol Ther, 2008, 16 (9): 1630－1636.

[7] Akhtar S, Benter IF. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. J Clin Invest, 2007, 117 (12): 3623－3632.

[8] Akhtar S, Benter I. Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: Potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59 (2－3): 164－182.

[9] Hollins AJ, Omidi Y, Benter IF, et al. Toxicogenomics of drug delivery systems: Exploiting delivery system-induced changes in target gene expression to enhance siRNA activity. J Drug Target, 2007, 15 (1): 83 - 88.

[10] Höbel S, Koburger I, John M, et al. Polyethylenimine/small interfering RNA-mediated knockdown of vascular endothelial growth factor in vivo exerts anti-tumor effects synergistically with Bevacizumab. J Gene Med, 2010, 12 (3): 287－300.

[11] Wu SY, McMillan NAJ. Lipidic systems for in vivo siRNA delivery. AAPA J, 2009, 11 (4): 639－652.

[12] Li SD, Chono S, Huang L. Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA. Mol Ther, 2008, 16 (5): 942 - 946.

[13] Zamora MR, Budev M, Rolfe M, et al. RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183 (4): 531－538.

[14] DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (19): 8800－8805.

[15] DeVincenzo J, Cehelsky JE, Alvarez R, et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). Antiviral Res, 2008, 77 (3): 225－231.

[16] Kaiser PK, Symons RC, Shah SM, et al. RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna－027. Am J Ophthalmol, 2010, 150 (1): 33－39. e2.

[17] Leachman SA, Hickerson RP, Schwartz ME, et al. First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder. Mol Ther, 2010, 18 (2): 442－446.

[18] Wyszko E, Rolle K, Nowak S, et al. A multivariate analysis of patients with brain tumors treated with ATN-RNA. Acta Pol Pharm, 2008, 65 (6): 677－684.

[19] Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. N Engl J Med, 2006, 355 (10): 1018－1028.

[20] Blagbrough IS, Zara C. Animal models for target diseases in gene therapy - using DNA and siRNA delivery strategies. Pharm Res, 2009, 26 (1): 1－18.

[21] Tang Q, Li B, Woodle M, et al. Application of siRNA against SARS in the rhesus macaque model. Methods Mol Biol, 2008, 442 (2): 139－158.