

EZH2 靶向的 shRNA 质粒的构建和有效靶序列的筛选 *

吕 佳 孙晓阳[△] 丁连沐 金孝东 卜向飞 卞爱苗 蒋 健

(南京医科大学附属淮安第一医院脑外科 江苏 淮安 223300)

摘要 目的 :构建并筛选靶向 zeste 基因增强子人类同源物 2 (Enhancer of zeste homologue 2 ,EZH2)的短发卡 RNA(short hairpin RNA ,shRNA) 的质粒表达载体。 **方法 :**设计并合成针对 EZH2 基因的带有小发夹结构的 DNA 片段并克隆至质粒 pGPU6/GFP/Neo 中 ,经酶切和测序分析后转染入胶质瘤 U251 细胞 ,分别应用实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 在 mRNA 和蛋白质水平观察其对 EZH2 基因表达的沉默效果。 **结果 :**重组质粒构建成功 ,并成功转染入胶质瘤 U251 细胞 ,转染效率大约为 70%。其中 ,以靶向 hEZH2-715 序列的质粒抑制效果最好 ,其对 U251 细胞 EZH2 mRNA 和 protein 抑制率分别为 55%和 89%。 **结论 :**成功构建了能高效抑制 EZH2 基因表达 shRNA 的重组质粒 ,为下一步探索 EZH2 在胶质瘤细胞中的生物学作用奠定了基础。

关键词 :zeste 基因增强子人类同源物 2 ;RNA 干扰 ;质粒 ;胶质瘤

中图分类号 :Q75 ,Q78 ,R739.41 **文献标识码 :**A **文章编号 :**1673-6273(2012)07-1211-04

Construction and Screening of shRNA-Expressing Plasmid Targeting to EZH2 Gene*

LV Jia, SUN Xiao-yang[△], DING Lian-shu, JIN Xiao-dong, BU Xiang-fei, BIAN Ai-miao, JIANG Jian

(Department of Nerosurgery ,Huai'an No.1 People's Hospital affiliated to Nanjing Medical University ,Huai'an ,223300 China)

ABSTRACT Objective: To construct and screen shRNA-expressing plasmid targeting with EZH2 gene. **Methods:** The DNA oligonucleotide fragments targeting to human EZH2 gene were designed and synthesized, then they were cloned into pGPU6/GFP/Neo plasmid. The recombinant plasmids were identified by restriction enzyme and sequencing analyses, then were transfected into U251 glioma cells; The transfection efficiency was observed and the EZH2 gene silencing effect was detected by quantitative RT-PCR and Western blotting. **Results:** The recombinant plasmids were constructed and transfected into U251 glioma cells successfully. The transfection rate was approximately 70%. Among them, the inhibition efficiency of the recombinant plasmid targeting to hEZH2-715 sequence was the best. It's inhibition rates were 55% and 89% in the level of EZH2 mRNA and protein in the U251 cells, respectively. **Conclusion:** The recombinant plasmid expressing EZH2-shRNA that could suppress EZH2 gene's expression effectively was constructed successfully, which laid the foundation for next step to investigate EZH2 gene's biological role in glioma cells.

Key words: EZH2; RNAi; Plasmid; Glioma

Chinese Library Classification(CLC): Q75 , Q78, R739.41 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)07-1211-04

前言

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤 ,约占所有颅内肿瘤的 30%-40%^[1] ,以高致病率和死亡率著称。尽管近年来以手术为主的综合治疗取得一定进展 ,但脑胶质瘤病人的预后仍让人失望 ,尤其是多形性胶质母细胞瘤 ,其诊断后平均生存期仅 1-1.5 年^[2]。近年来 ,研究发现 EZH2 基因在前列腺癌^[3-4]、乳腺癌^[5-6]、胃癌^[7-8]等多种恶性肿瘤组织中高表达 ,具有诱导细胞增殖 ,促进肿瘤细胞扩散的作用^[9] ,并与肿瘤的进展和预后差密切相关^[10]。有文献报道 EZH2 在胶质瘤病人标本^[11]和胶质瘤 U251 细胞株中^[12]高表达 ,但对于 EZH2 在脑胶质瘤细胞

株中的具体作用却鲜有报道 ,本研究旨在通过该实验构建和筛选出对胶质瘤 U251 细胞 EZH2 基因沉默可靠的质粒 ,为进一步探索 EZH2 在胶质瘤中的作用做准备。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和耗材

人胶质瘤 U251 细胞购自中科院上海细胞库 ,胎牛血清购自杭州四季青生物公司 ,DMEM 培养基购自 Hyclone 公司 ,0.05% Trypsin-EDTA、Opti-MEMI 无血清培养基购自 Gibco 公司。含有人 U6 启动子的 pGPU6/GFP/Neo 质粒购自于上海吉玛公司 ,克隆用大肠杆菌 DH5 α 和胶回收试剂盒购自大连宝生

* 基金项目 :江苏省医学重点人才基金 RC2007029 ;江苏省社会发展项目 BS2007037 ;

淮安市科技发展基金 HAS07025 ;南京医科大学科技发展基金重点项目 06NMUZ047

作者简介 :吕佳(1981-) ,男 ,硕士在读 ,研究方向 :胶质瘤的综合治疗。

电话 :0518-80872317 E-mail :lvjia163@yahoo.com.cn

[△]通讯作者 :孙晓阳 E-mail :sunxiaoyang2001@yahoo.com

(收稿日期 :2011-10-04 接受日期 :2011-10-30)

物公司,限制性内切酶(*Bam*HI, *Pst*I, *Bbs*I)及 T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司,核酸分子质量标准 Lambda DNA/Eco 130 购自 Fermentas 公司,质粒小量抽提试剂盒为天为时代公司产品。Lipofectamin2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司。兔抗人 EZH2 购于 CST 公司,羊抗兔二抗购自晶美生物。

1.2 shRNA 的设计与制备

根据 GenBank 中报道的 EZH2 基因转录变体 1 (序列号: NM_004456)核苷酸序列,应用 WHITEHEAD 研究所的 siRNA 设计软件并在上海吉玛制药技术有限公司协助下设计靶序列,经 BLAST 同源分析,排除和其他编码序列 EST 同源的序列后选择出 4 条 21nt 片段作为 EZH2 基因干扰片段,其起始靶位点分别为第 197、715、1109 和 2278 位,其靶序列由 5'-3' 端分别为 GGCCAGACTGGGAAGAAATCT、GGTGAATGCCCTTGGTCAATA、GCAACACCCAACACTTATAAG、GGTAAATCCAAACTGCTATGC;同时设计阴性对照序列:TTCTCCGAACGTGTCACGT。EZH2 的 shRNA 的结构设计原则为:Bbs I + 正义链 + loop + 反义链 + 终止信号 + BamHI。Loop 环结构采取 TTCAAGAGA,以避免形成终止信号,shRNA 的转录终止序列采用 T6 结构,shRNA 正义链模板的 5' 端添加 CACC,反义链模板的 5' 端添加 GATC,分别与 *Bbs*I 酶和 *Bam*HI 酶切后形成的粘端互补。所设计的 shRNA 正反义链由上海生工合成。

1.3 shRNA 表达载体的构建

5 组 shEZH2 正反义链分别经退火形成互补双链 DNA 片段后应用 T4DNA 连接酶将其与经 *Bbs*I 和 *Bam*HI 双酶切线性处理后 PU6/GFP/Neo 质粒进行连接后转化至大肠杆菌 DH5a 感受态细胞中,分别挑取菌落接种至含 50μg/mL 卡那霉素的 LB 培养液中进行培养,再使用碱裂解法抽提质粒,所得质粒分别命名 hEZH2-197、hEZH2-715、hEZH2-1109、hEZH2-2278 和 hEZH2-NC,并用 *Bam*HI, *Pst*I 分别酶切鉴定(图 2)。而酶切鉴定正确的重组质粒送上海英骏公司测序。

1.4 细胞的培养和转染

人胶质瘤 U251 细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,胰酶消化传代。取对数生长期细胞按每孔 1×10^5 个细胞接种于 6 孔培养板,细胞融合率为 80%时按照脂质体转染试剂盒 Lipofectamin2000 操作说明进行 EZH2 基因 shRNA 表达质粒转染,转染后 48h 荧光显微镜 488nm 激发光下观察转染效率。荧光显微镜下观察 10 个视野,每个视野下计数 100 个细胞中绿色荧光阳性的细胞,计算细胞转染率。

1.5 qrt-PCR 检测转染后 EZH-mRNA 表达的变化

各组细胞转染 48h 后采用 Trizol 试剂法提取总 RNA,经检测浓度和完整性后,使用 MMLV 逆转录酶经逆转录生成 cDNA。再以各组 cDNA 为模板对 EZH2 基因和内参 GAPDH 进行实时荧光定量 PCR 反应。反应条件为:95℃ 3 分钟变性;95℃ 30 秒,62℃ 40 秒,共 40 个循环。每个 PCR 反应有 3 个复孔,结果取 3 次平均。利用公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算 U251 细胞中 EZH2 的 mRNA 水平的相对变化。EZH2 基因上游引物 5'-TGATGACGATGATGATGATGGAGAC-3',下游引物为 5'-TGTGCCCTTATCTGGAAACATTGAG-3',产物大小为 160bp;内参基因 GAPDH 上游引物为 5'-CATGAGAAGTAT-

GACAACAGCCT-3',下游引物为 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3',产物大小为 113bp。

1.6 Western blot 检测转染后 EZH2 蛋白表达的变化

收集转染 72h 后各组细胞,用蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白后进行 10%SDS-PAGE 分离,采用半干式电转至 PVDF 膜上,经过封闭后依次加入一抗(1:100 的兔抗人 EZH2 单抗或兔抗人 GAPDH 单抗)、4℃ 孵育过夜、TBST 洗脱(15min*3 次)、二抗(1:5000HRP 标记的羊抗兔抗体)、室温孵育 2h、TBST 洗脱(15min*3 次)等步骤后,用 SuperSignal West Pico Chemiluminent Substrates 化学发光及 X 光片曝光。经显影定影处理,获得清晰条带。利用 image-J1.44 软件分析处理。

1.7 统计学方法

实验所得数据资料采用 SPSS13.0 统计分析,所得数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)比较各组间差异, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 酶切鉴定重组质粒

*Bam*H 酶切后仅显示一条条带,大小为 5100 bp 左右,与 PU6/GFP/Neo 质粒(图 1)的大小基本相等(图 2),而 *Pst* 酶切则显示有 2 条条带,分别代表质粒的超螺旋的 SC 构型和开环的 OC 构型(图 2),这说明所有质粒均为阳性重组载体,它们均能被 *Bam*HI 切开,而不能被 *Pst*I 切开。Marker 为 lamda/Eco130I。

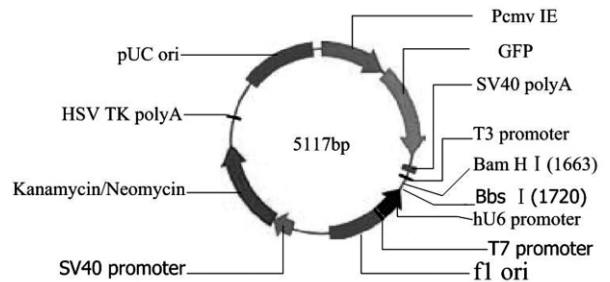


图 1 pGPU6/GFP/Neo 质粒载体结构图谱

Fig.1 Structure map of pGPU6/GFP/Neo plasmid

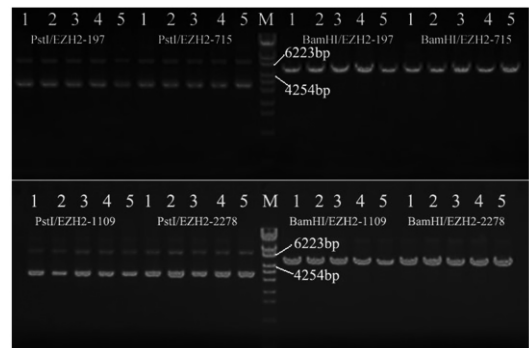


图 2 重组质粒的酶切电泳图

Fig.2 Enzyme-cutting electropherogram of recombinant plasmid

2.2 重组质粒测序鉴定

4 个重组质粒 shRNA 编码序列与设计的片段完全一致,表明载体构建正确(图 3)。

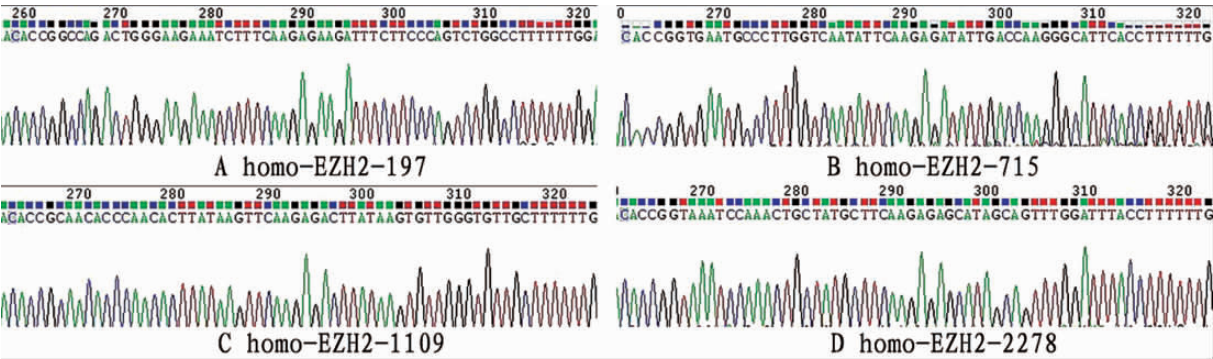


图3 重组质粒部分基因序列检测图谱

Fig.3 Parts of gene sequence map of recombinant plasmid

2.3 重组质粒稳定转染胶质瘤 U251 细胞后观察报告基因 GFP 的表达情况

在荧光显微镜下观察发现转染质粒后的 U251 细胞均携

带绿色荧光(图 4),说明重组质粒成功转入细胞内。通过荧光显微镜下观察 10 个视野,每个视野下计数 100 个细胞中绿色荧光阳性的细胞,计算细胞转染率约为 70%。

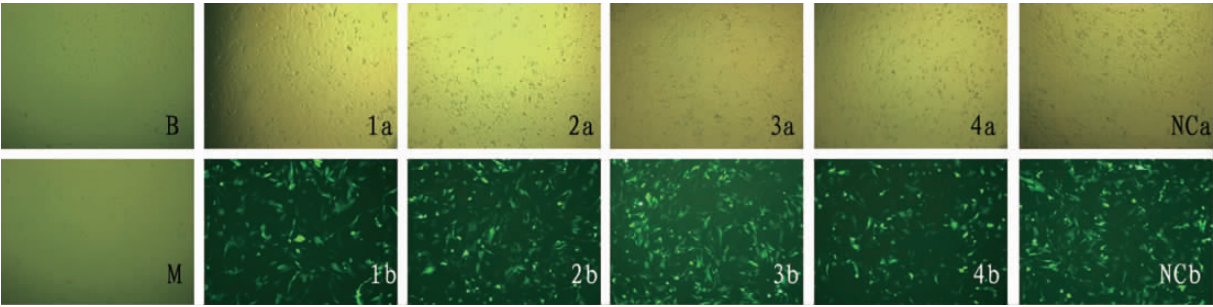


图 4 转染 48 小时后绿色荧光蛋白在胶质瘤 U251 细胞中的表达(100×) B 为 blank 组, M 为 Mock 组, 1、2、3、4、NC 组分别为转染重组质粒 shRNA-197、shRNA-715、shRNA-1109、shRNA-2278 和阴性对照组,其中 a 为普通光线, b 为荧光显微镜(相同视野)

Fig. 4 The expression of Green Fluorescent Protein in glioma cells of U251 after being transfected(100×): B, M, 1, 2, 3, 4 and NC refer to group blank, Mock, shRNA-197, shRNA-715, shRNA-1109, shRNA-2278 and negative control respectively; these photo marked by "a" were taken in normal light while "b" in fluorescent light (under the same visual field).

2.4 实时荧光定量 PCR 法检测 RNA 干扰效果

采用相对定量法,按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对数据进行分析处理,所得数据对内参 GAPDH 进行均一化处理,转染质粒 hEZH2-197、715、1109、2278、NC 及 MOCK 组相对空白组的基因表达分别为 0.63 ± 0.06 、 0.45 ± 0.06 、 0.89 ± 0.11 、 0.65 ± 0.15 、 0.86 ± 0.05 、 0.91 ± 0.09 (如图 5)。BLANK 组、MOCK 组、NC 组以及转染质粒 EZH2-1109 组的 hEZH2 基因表达水平(EZH2/GAPDH)没有显著性差异($P > 0.05$),且明显高于转染转染质粒 EZH2-197 组、转染质粒 EZH2-715 组、转染质粒 EZH2-2278 组水平($P < 0.05$)。其中 EZH2-715 质粒对 EZH2 基因表达 mRNA 抑制作用最为明显,表达抑制率约 55%。

2.5 Western blot 检测结果

转染 72 小时后,各组细胞 GAPDH 蛋白杂交条带亮度相似,但 EZH2 条带亮度有明显差异(图 6)。1-7 组 EZH2/GAPDH 灰度值比分别为 0.16 ± 0.04 、 0.10 ± 0.02 、 0.34 ± 0.06 、 0.41 ± 0.02 、 0.87 ± 0.06 、 0.58 ± 0.02 、 0.89 ± 0.05 。各重组质粒与阴性对照组、MOCK 组及空白对照组相比均存在显著性差异($P < 0.05$)。表明 4 个重组质粒均可不同程度下调 EZH2 蛋白水平,尤以质粒 EZH2-197、EZH2-715 产生的效应最强,与质粒 EZH2-1109 和 EZH2-2278 相比,有显著性差异($P < 0.05$)。质粒 EZH2-

197、EZH2-715 对 EZH2 蛋白表达的抑制率分别为 82%、89%。

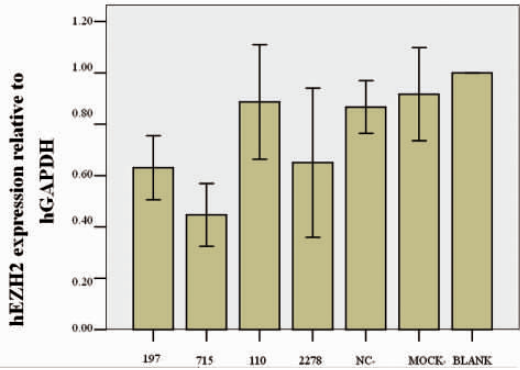


图 5 Real-time 荧光定量 PCR 检测不同转染组转染 48h 后 EZH2mRNA 的相对表达量

Fig. 5 The relative expression of EZH2 mRNA in different groups detected by real-time quantitative PCR after being transfected for 48h

3 讨论

EZH2 是人 PcG(Polycomb Group)基因家族中多梳蛋白合物 2 的催化亚基,具有靶向使 H3K27 发生三甲基化的作用,从

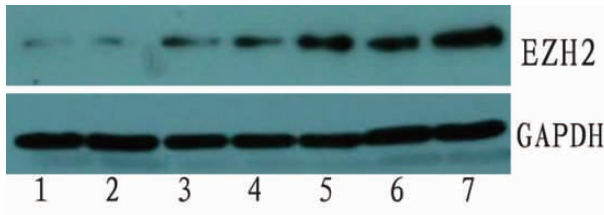


图6 重组质粒转染 72h 后 U251 细胞内 EZH2 蛋白的表达: 1:

hEZH2-197 2:hEZH2-715 3:hEZH2-1109 4:hEZH2-2278 5:hEZH2-NC 6: MOCK 7:Blank

Fig. 6 The expression of EZH2 protein in glioma U251 cells after being transfected by recombinant plasmid for 72h: 1: hEZH2-197; 2: hEZH2-715; 3: hEZH2-1109; 4: hEZH2-2278; 5: hEZH2-NC 6: MOCK; 7: Blank

而沉默与细胞分化、抑制增殖在内的基因,导致肿瘤的发生^[13];另外,它还在 X 染色体的灭活、生殖发育、干细胞多功能性的维持以及肿瘤的转移中起重要作用^[14]。近年来, EZH2 基因已经成为肿瘤研究的热点^[15],并且有望成为肿瘤基因治疗的潜在靶标^[16]。

RNAi 是一种高效的序列特异性基因敲除技术,已广泛应用于哺乳动物细胞的基因功能和人类疾病的治疗的研究^[17]。产生 RNAi 效应的方法主要有体外制备和体内表达法两类:前者是在体外制备 siRNA,然后导入细胞;后者则通过载体导入 DNA 使之在细胞内表达 siRNA^[18]。本研究采用了后者,该法与化学合成的 siRNAs 后转染的方法相比具有成本低、能持续稳定表达等优点,因此实用于长周期的实验研究。目前用来介导 RNAi 的载体主要有病毒载体和非病毒载体。非病毒载体因其具有低毒、低免疫反应、外源基因低整合几率、插入片段大小无限制,以及使用简单、制备方便、便于保存和检验等优势而受到越来越多研究者的青睐,特别是质粒 DNA 载体^[19]。我们选择的载体是质粒 pGPU6/GFP/Neo,它是一种包括了人 U6 RNA 聚合酶 III 启动子以及能表达抗性筛选标记卡那耐药基因和 GFP 蛋白基因的 RNAi 质粒载体。重组后的质粒除了可以稳定表达靶向 EZH2 的 shRNA 并诱导 EZH2 基因沉默,又可以通过耐卡那霉素进行阳性重组子的克隆筛选,还可以通过表达绿色荧光蛋白以利于在荧光显微镜或流式细胞仪下确定载体转染效率。而能否将质粒转入细胞是 RNA 干扰关键技术之一。本研究选择的是阳离子脂质体法,该方法具有操作简单、重复性好、适用细胞类型广、转染效率高优点^[20]。通过优化转染条件,使脂质体和质粒按照不同的比例进行转染,最后选择转染效率最佳的比例,使转染效率大约在 70%,但同时我们也观察到不少凋亡细胞,分析原因可能是脂质体的细胞毒性造成的,但不能排除 EZH2 基因沉默后对细胞的凋亡促进造成的。

RNAi 干扰效率的高低,干扰序列的设计也是关键之一。我们根据 GenBank 中报道的 EZH2 基因核苷酸序列,利用 WHITEHEAD 在线软件,参考 Tuschl siRNA 设计原则^[21],设计出了 4 条靶向 EZH2 基因表达的干扰序列,通过克隆至载体 pGPU6/GFP/Neo 后转染入胶质瘤 U251 细胞,观察其绿色荧光蛋白的表达量确定转染效率,同时通过实时荧光 PCR 和 western blot 分子生物技术检测不同靶序列合成的质粒对胶质瘤 U251 细胞 EZH2 基因表达的沉默作用,从而筛选出了最佳干

扰序列,为进一步研究 EZH2 基因在脑胶质瘤细胞中的生物学功能以及探索脑胶质瘤的基因治疗奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, et al. Gliomas in adults[J]. Dtsch Arztebl Int, 2010, 107(45): 799-808
- [2] Grossman SA, Ye X, Piantadosi S, et al. Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(8): 2443-2449
- [3] Li J, Fan QH, Fan XS, et al. EZH2 expression in human prostate cancer and its clinicopathologic significance [J]. Zhonghua Nan Ke Xue, 2010, 16(2): 123-138
- [4] Karanikolas BD, Figueiredo ML, Wu L, et al. Comprehensive evaluation of the role of EZH2 in the growth, invasion, and aggression of a panel of prostate cancer cell lines[J]. Prostate, 2010, 70(6): 675-688
- [5] Collett K, Eide GE, Arnes J, et al. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(4): 1168-1174
- [6] Gong Y, Huo L, Liu P, et al. Polycomb group protein EZH2 is frequently expressed in inflammatory breast cancer and is predictive of worse clinical outcome[J]. Cancer, 2011, 117(24): 5476-5478
- [7] Cai GH, Wang K, Miao Q, et al. Expression of polycomb protein EZH2 in multi-stage tissues of gastric carcinogenesis[J]. J Dig Dis, 2010, 11(2): 88-93
- [8] Matsukawa Y, Semba S, Kato H, et al. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer[J]. Cancer Sci., 2006, 97(6): 484-491
- [9] Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast[J]. Clin Oncol, 2006, 24(2): 268-273
- [10] He LR, Liu MZ, Jia WH, et al. High expression of EZH2 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma treated with definitive chemoradiotherapy[J]. Int J Cancer, 2010, 127(1): 138-147
- [11] Orzan F, Pellegatta S, Poliani PL, et al. Enhancer of Zeste 2 (EZH2) is up-regulated in malignant gliomas and in glioma stem-like cells[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2011, Jun, 37(4): 381-394
- [12] Smits M, Nilsson J, Mir SE, et al. miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis[J]. Oncotarget, 2010 Dec, 1(8): 710-720
- [13] Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics[J]. Mutat Res, 2008, 647(1-2): 21-29
- [14] Schwartz YB, Pirrotta V. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(1): 9-22
- [15] Piunti A, Pasini D. Epigenetic factors in cancer development: polycomb group proteins[J]. Future Oncology, 2011, 7(1): 57-75
- [16] Xiao Y. Enhancer of zeste homolog 2: A potential target for tumor therapy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(4): 474-477

(下转第 1250 页)

度患者的 Rt3 高于 Rt1, 此标准可初步作为判断患者的患病程度的依据。此外, 轻、中和重度 OSAS 患者与单纯打鼾者的三个子带能量比的差异均有显著统计学意义, 轻度和重度患者的子带能量比差异具有统计学意义。

由于本文数据库内鼾声样本数目限制, 中度患者与其他两个等级患者的差异不明显。今后研究中, 可通过调整子带频段范围达到更好的检测结果。本文方法为今后利用鼾声特性区分不同患病程度提供一种有效的研究思路。

参考文献(References)

- [1] Vivek N, Roland P. A Snore Extraction Method from Mixed Sound for a Mobile Snore Recorder [J]. Journal of Medical Systems, 2006, 30 (2): 91-99
- [2] Sigrid de S, Uuantha R, Craig H. A method to screen obstructive sleep apnea using multi-variable non-intrusive measurements [J]. Physiological Measurement, 2011, 32(4): 445-465
- [3] Udantha RA, Asela SK, Craig H. Higher-Order Spectra for the Estimation of Total-Airway- Response (TAR) in Snore-Based Diagnosis of Apnoea [C]. 8th International Conference on Control Automation, Robotics and Vision Kunming, China, 2004: 925-930
- [4] Keong NA, San KT, Baey E, et al. Could Formant Frequencies of Snore Signals be an Alternative Means for the Diagnosis of Obstructive Sleep Apnea?[J]. Sleep Medicine, 2008, 9(8): 894-898
- [5] 许辉杰, 余力生. OSAHS 患者与单纯打鼾者鼾声声学特性初步研究[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2009, 17(3): 235-238
Xu Hui-jie, Yu Li-sheng. A Preliminary Study of Acoustic Characteristics of Snoring Sound in Patients with Obstructive Sleep Apnea/Hypopnea Syndrome (OSAHS) and with Simple Snoring[J]. Journal of Audiology and Speech Pathology, 2009, 17(3): 235-238
- [6] Yadollahi A, Moussavi Z. Formant Analysis of Breath and Snore Sounds[C]. 31st Annual International Conference of the IEEE EMBS Minneapolis, Minnesota, USA, September 2-6, 2009: 2563-2566
- [7] Hirotsuka H, Yuji M, Hiroshi Y, et al. Acoustic Analysis of Snoring Sounds by a Multidimensional Voice Program [J]. Laryngoscope, March 2006, 116(3): 379-381
- [8] 殷善开, 易红良, 曹振宇. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2006
Yin Shan-kai, Yi Hong-liang, Cao Zhen-yu. The Obstructive Sleep Apnea Hypopnea Syndrome [M]. Beijing: Scientific and Technical Documents Publishing House, 2006
- [9] Charalampos D, Theodoros P, Ilias M. A Non-Invasive System for automated Sleep Apnea Detection utilizing Snore Sound Analysis[J]. International Federation for Medical and Biological Engineering Proceedings, 2010, 29(1): 119-123
- [10] Hsu YL, Chen MC, Chih-Ming Cheng, et al. Development of a portable device for home monitoring of snoring [C]. 2005 IEEE International Conference on Systems, Man and Cybernetics, Hilton Waikoloa Village, Hawaii, USA, October 2005: 2420-2424
- [11] Sola SJ, Jane R, Fiz JA, et al. Pitch Analysis in Snoring Signals from Simple Snore and Patients with Obstructive Sleep Apnea [C]. 24th Annual Conference and the Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society EMBS/BMES Conference, 2002: 1527-1528
- [12] Tagluk ME, Akin M, Sezgin N. Classification of sleep apnea by using wavelet transform and artificial neural networks [J]. Expert Systems with Applications, 2010, 37(2): 1600-1607
- [13] Bieger-Farhan AK, Chadha NK, Camilleri AE, et al. Portable method for the determination of snoring site by sound analysis [J]. J Laryngol Otol, 2004, 118: 135
- [14] Keong NA, San KT, Baey E. Diagnosis of Obstructive Sleep Apnea using Formant Features of Snore Signals [J]. International Federation for Medical and Biological Engineering Proceedings, 2007, 14 (8): 967-970
- [15] Emoto T, Abeyratne U R, Akutagawa M, et al. Neural networks for snore sound modeling in sleep apnea [C]. IEEE International Conference on Computational Intelligence for Measurement Systems and Applications. Giardini Naxos, Italy, July, 2005:316-321
- [16] Emoto T, Abeyratne U R, Akutagawa M, et al. Feature extraction for snore sound via neural network processing [C]. Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE/EMBS Cite Internationale, Lyon, France, August, 2007:5477-5480
- [17] Zhou J, Rossi JJ. Progress in RNAi-based antiviral therapeutics[J]. Methods Mol Biol, 2011, 721: 67-75
- [18] 廖银华, 贺修胜. RNA 干扰研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2007, 5(7): 773-776
Liao Yin-hua, He Xiu-sheng. The progress of RNA Interference[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 5(7): 773-776
- [19] 龙香娥, 龚朝辉. 哺乳动物中介导 RNA 干扰的载体研究进展[J]. 基础医学与临床, 2008, 9(28): 1004-1006
Long Xiang-e, Gong Zhao-hui. Progress in the research on the vector for mediating RNA interference in mammals [J]. Basic & Clinical Medicine, 2008, 9(28): 1004-1006
- [20] 李鹏, 尚明美, 宋海峰, 等. 非病毒基因递送技术研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 10(17): 809-814
Li Peng, Shang Ming-mei, Song Hai-feng, et al. Advancement in non-viral gene delivery techniques[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2008, 10(17): 809-814
- [21] Pei Y, Tuschl T. On the art of identifying effective and specific siRNAs[J]. Nat Methods, 2006, 3(9): 670-676

(上接第 1214 页)