

## 大鼠 PAX6 基因真核表达载体构建及鉴定\*

严会文\*\*, 苏敏, 高杰, 廖文萍, 闫丽丽, 黄悦\*\*\*

(贵州医科大学 组织学与胚胎学教研室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 构建携带绿色荧光蛋白(GFP)报告基因及 PAX6 基因的重组真核表达载体, 观察其在人胚肾细胞(293FT)细胞中的表达。方法: 采用聚合酶链式反应(PCR)从大鼠脑组织中获取 PAX6 基因, 经连接 T 载体测序验证正确后, 与真核表达载体 pEF1 $\alpha$ -IRES-AcGFP 经 *SalI*/*BamHI* 双酶切后; 经 T4 DNA 连接酶连接, 获得重组质粒 pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP, 用菌液 PCR、*SalI*/*BamHI* 双酶切及测序鉴定正确后, 用脂质体法转染 293FT 细胞, 采用倒置荧光显微镜观察 GFP 的表达、蛋白印迹(Western blot)法检测 PAX6 蛋白表达。结果: 重组质粒 pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP 经 RT-PCR 和双酶切均得到大小为 1 269 bp 的目的条带, 测序鉴定该序列与 GenBank 中 PAX6 基因序列的同源性达 100%, 插入基因的大小和方向正确; 重组质粒转染 293FT 细胞后可见 GFP 绿色荧光, Western blot 显示 PAX6 蛋白表达。结论: 成功构建了 PAX6 真核表达重组质粒 pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP, 能在 293FT 细胞中表达 PAX6 蛋白。

**[关键词]** 绿色荧光蛋白; PAX6 基因; 表达载体, 真核; 脂质体; 转染

**[中图分类号]** R329.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)03-0288-06

### Construction and Authenticate of Eukaryotic Expression Vector with Rat PAX6

YAN Huiwen, SU Min, GAO Jie, LIAO Wenping, YAN Lili, HUANG Yue

(Department of Histology and Embryology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, 550004)

**[Abstract]** **Objective:** To construct a green fluorescence protein report gene (GFP) and an eukaryotic expression vector of rat PAX6 gene and, observe its expression in 293FT cells. **Methods:** The rat PAX6 gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). After verified correctness of sequencing by connection with T vector, the recombinant products of the pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP were gained by T4 ligase connecting pUCm-T-PAX6 and eukaryotic expression vector pEF1 $\alpha$ -IRES-AcGFP with restriction enzymes *SalI*/*BamHI*. After identified by colony PCR and sequencing, pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP was transfected into 293FT cells with Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 assay. The expression of PAX6 protein and GFP were detected by western blot and fluorescence microscope. **Results:** A specific band of 1269bp was detected from recombinant plasmid pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP by digestion of *SalI* and *BamHI* and RT-PCR. Sequencing and identification showed that homology between this sequence and the rat PAX6 gene sequence from GenBank was 100%, and the size and the direction of the inserted gene were right. After transfection, 293FT cells showed green fluorescence under fluorescence microscope. A band of PAX6 protein from cells was detected by western blot assay. **Conclusion:** The eukaryotic expression vector of PAX6 is constructed successfully and can obtain high PAX6 protein expression in 293FT cells.

**[Key words]** green fluorescence protein; PAX6 gene; expression vector, eukaryotic; lipofectamine; transfection

\*[基金项目] 贵州省科技厅基金[黔科合 J 字(2015)2011 号]; 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目[黔省专合字(2012)41 号]

\*\* 贵州医科大学 2013 级硕士研究生

\*\*\* 通信作者 E-mail: huranggaigaiyu@sina.com

网络出版时间: 2016-03-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160317.1106.058.html>

角膜盲是最重要的致盲眼病之一,全球约有超过 1 000 万的角膜盲患者,我国现有角膜盲患者约 300 多万,每年新发的感染性角膜病致盲患者约 10 万人<sup>[1]</sup>。然而,角膜供体的极度匮乏,是造成角膜盲得不到及时治疗的主要原因之一。位于角膜缘交界处的角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)是角膜上皮细胞自我更新、修复及再生的基础,能够修复并替代衰老死亡的角膜上皮细胞,在角膜上皮的更新和角膜疾病的治疗中起着不可替代的作用<sup>[1-2]</sup>。有学者发现人类与啮齿类动物的 PAX6 基因整个编码区域相似性为 100%, WNT7A 和 PAX6 是 LSCs 分化的关键因子,p63 和 PAX6 协同作用可促进角膜缘干细胞的定向分化<sup>[3]</sup>。为 LSCs 移植应用于治疗角膜盲等角膜疾病提供了研究方向。本课题通过构建真核表达载体 pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP 的方法,观察 PAX6 在人胚肾细胞 293FT 中的表达,为 PAX6 在诱导鼠胚胎干细胞分化的作用机制奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、试剂与仪器

体质量 100 ~ 120 g 的健康清洁级 SD 大鼠(贵州医科大学实验动物中心提供)。人胚肾细胞 293FT 细胞(贵州医科大学干细胞中心细胞库)、真核表达载体 pEF1 $\alpha$ -IRES-AcGFP(美国康涅狄格大学 Lai Laijun 教授惠赠), pUCm-T Vector(上海生工生物工程有限公司);Trizol<sup>®</sup> Reagent、脂质体 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000(Invitrogen 公司,美国);限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam* H I(New England Biolabs 公司,美国),割胶回收试剂盒、质粒小抽试剂盒(天根生化科技有限公司,中国北京), T4 DNA Ligase(Takala,日本),氨苄霉素、卡那霉素、SDS-PAGE 试剂盒、BCA 法蛋白定量试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,中国北京),高效感受态细胞制备试剂盒、内参  $\beta$ -actin(上海生工生物工程有限公司,中国上海),DMEM 培养液、0.25% 胰蛋白酶(Hyclone,美国),胎牛血清(杭州四季青生物制品有限公司,中国杭州),兔多克隆 PAX6 抗体、驴抗兔二抗(abcam,美国);其他试剂为国产分析纯。CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo Fisher,美国),高速冷冻离心机、全自动数码凝胶成像分析系统、电泳仪(Eppendorf,德国),PCR 仪(ABI,美国);荧光倒置相差显微镜(Nikon,日本)。

### 1.2 方法

**1.2.1 PAX6 基因的扩增和验证** 根据 GenBank 提供的已知序列(GeneID:18508),对 PAX6 基因全 CDS 区序列设计引物:上游引物 5'-ATCAGAGTTCGACATGCAGAACAGTCACAGCGGAG-3',下游引物 5'-ATCTGAGGATCCTTACTGTAATCGAGGCCAGTACTG-3',引物由上海生工生物工程有限公司合成。取健康清洁级 SD 大鼠 5 只,无菌条件下由枕骨或第 1 颈椎处入路,用止血钳将颅顶向上撬开,暴露脑组织,将脑组织冰上匀浆,参照 Trizol Total RNA 说明书,采用一步法提取 SD 大鼠脑组织中的总 RNA 后再逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,进行 PAX6 基因 PCR 扩增。扩增体系为:2  $\times$  Master Mix 10  $\mu$ L,上游引物 1  $\mu$ L,下游引物 1  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L,补双蒸馏水(ddH<sub>2</sub>O)至 20  $\mu$ L。循环条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,64  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min(35 个循环),最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。反应结束后取 PCR 产物,采用 0.7% 琼脂凝胶电泳进行鉴定,并割胶回收目的片段。参照 T 载体试剂盒说明,将回收纯化的 PCR 产物连接于 pUCm-T Vector 中,取 5  $\mu$ L 连接反应液转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌,将转化的菌液涂在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上培养 16 h。待 LB 平板长出菌落,挑取单菌落接种到 5 mL LB 的液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 振荡培养约 12 h 至对数生长期,用质粒小量回收试剂盒抽提质粒 DNA,经菌液 PCR 鉴定和限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam* H I 进行双酶切鉴定正确后,将正确的细菌阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序并验证。

**1.2.2 真核表达质粒 pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP 的构建** 将连有 PAX6 基因并测序正确的 pUCm-PAX6-T Vector 和真核质粒 pEF1 $\alpha$ -IRES-AcGFP 分别用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam* H I 对其进行双酶切,回收 1 269 bp 的纯化基因片段和酶切后线性化 pEF1 $\alpha$ -IRES-AcGFP 质粒 DNA,用 T4 DNA 连接酶将目的基因片段 PAX6 定向插入带绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的哺乳动物真核表达载体 pEF1 $\alpha$ -IRES-AcGFP 中。将 5  $\mu$ L 连接产物转化至自制大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,冰上放置 30 min,42  $^{\circ}$ C 热冲击 90 s,冰上放置 5 min,加入 200  $\mu$ L 无抗性 LB 液体培养基,37  $^{\circ}$ C,250 r/min 振荡培养 45 min,取菌液 200  $\mu$ L 涂布于含 50 mg/L 的卡那霉素的 LB 固体培养基中,37  $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。菌液 PCR 筛选阳性克隆,限制性内切酶 *Sal* I / *Bam* H I 双酶

切鉴定,将初步筛选的阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

**1.2.3 293FT 细胞培养和重组质粒 pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP 转染** 293FT 细胞于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下,用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养,细胞长满传代,转染前 24 h,以  $5 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种于 6 孔板;待细胞融合 >95% 时,按 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 说明书要求进行转染,设立未转染组和转染空质粒 pEF1 $\alpha$ -IRES-AcGFP 的 293FT 细胞做阴性对照。转染 4 h 后更换普通培养基,常规培养 24 h 后于倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白(GFP)表达(绿色荧光)并拍照。以上实验重复 3 次。

**1.2.4 PAX6 蛋白表达** 采用 Western blot 法,收集转染后 24 h 的各组 293FT 细胞,提取细胞蛋白并用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量;取蛋白 20  $\mu$ g,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,采用转移电泳装置,于 500 mA 恒流条件下电转 60 min,将蛋白转移到 PVDF 膜上;用封闭液(含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液)封闭 PVDF 膜 4 ℃ 过夜,TBST 洗膜 3 次,10 min/次;用封闭液稀释的兔多克隆抗体 PAX6(1:1 000)与封闭好的 PVDF 膜室温孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次,10 min/次。室温下用封闭液稀释的二抗抗体(1:5 000)与封闭好的 PVDF 膜室温孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次,10 min/次,用 ECL 试剂盒曝光获得显示条带的胶片,扫描图像保存,用  $\beta$ -actin(1:8 000)作内参照验证蛋白含量。以上实验重复 3 次。

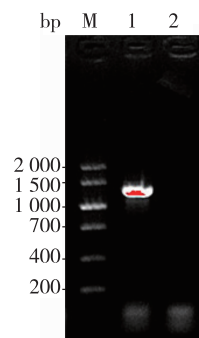
## 2 结果

### 2.1 大鼠 PAX6 基因 cDNA 的克隆

大鼠 PAX6 基因扩增产物经琼脂糖凝胶电泳在 1 269 bp 处可见特异性条带,结果见图 1。目的片段克隆入 pUCm-T Vector 和测序结果经 NCBI/BLAST 进行序列比对,符合率为 100% (见图 2)。

### 2.2 重组质粒 pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP 的鉴定

重组质粒 pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP 克隆后的菌液 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳成像结果显示在 1 269 bp 处见目的条带(图 3);提取纯化质粒,用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam* H I 对其进行双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳成像结果显示在 1 269 bp 和 6 000 bp 处见目的条带和载体条带(图 4)。



注:M 为 DNA Marker V,泳道 1 为 PAX6 基因片段,泳道 2 为阴性对照

图 1 大鼠 PAX6 基因扩增产物

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis detection of PCR products of PAX6 gene

### 2.3 重组质粒 pEF1 $\alpha$ - PAX6-IRES-AcGFP 转染 293FT 细胞

将转染 24 h 后的 293FT 细胞置于荧光显微镜下观察,细胞呈上皮样成片生长,贴壁疏松,转染前后细胞形态学无明显变化,转染空质粒 pEF1 $\alpha$ -IRES-AcGFP 和重组质粒 pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP 组的 293FT 细胞胞质内可见明显的特异性绿色荧光,细胞未转染组未见绿色荧光表达(图 5)。Western blot 蛋白结果显示,未转染组和转染空质粒组均未见 PAX6 表达,转染重组质粒组在 50.6 kDa 处有特异性条带(图 6)。

## 3 讨论

外源蛋白在哺乳动物细胞中的表达量一般是由载体在染色体上的整合位置、启动子的强度、转录产物的稳定性、mRNA 的翻译效率、目的蛋白的折叠效率以及目的蛋白的稳定性等因素决定,其中前 4 个因素均与表达载体的选择有关<sup>[13]</sup>。所以表达载体的选择是决定外源蛋白在哺乳动物细胞中表达量的关键,而启动子的强度对于基因的表达起着决定性的作用。常用的启动子有巨细胞病毒即早期启动子(P<sub>CMV-IE</sub>)、人延伸因子 1 $\alpha$  亚基启动子(PEF1 $\alpha$ )和 Rous 肉瘤长末端重复序列等。本实验选用含有人延伸因子 1 $\alpha$  亚基启动子(PEF1 $\alpha$ )的哺乳动物表达载体 pEF1 $\alpha$ - IRES-AcGFP 用于目的基因 PAX6 的表达。启动子 PEF1 $\alpha$  具有不受细胞周期影响,启动子强度高优点,可使 PEF1 $\alpha$  启动子下游的蛋白实现高表达,也适用于难转的细胞,有利于转染和外源蛋白的大量扩

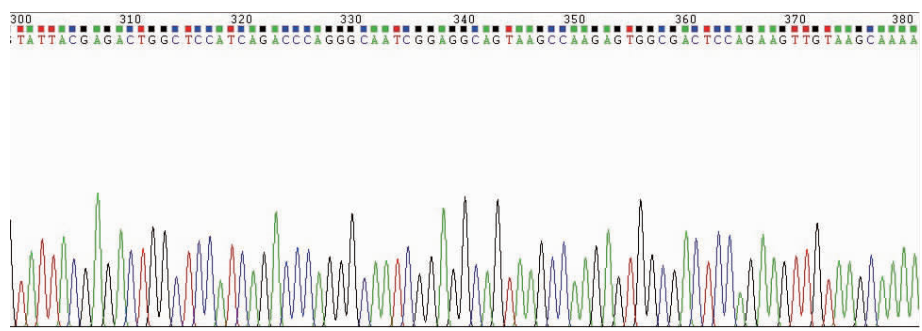
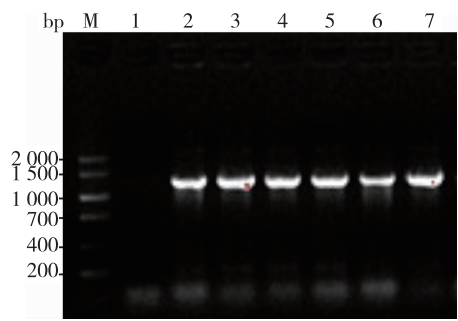
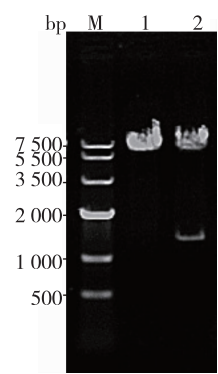


图 2  质粒 pEF1α-PAX6-IRES-AcGFP 部分测序结果  
Fig. 2  A part of sequencing map of pEF1α-PAX6-IRES-AcGFP plasmid



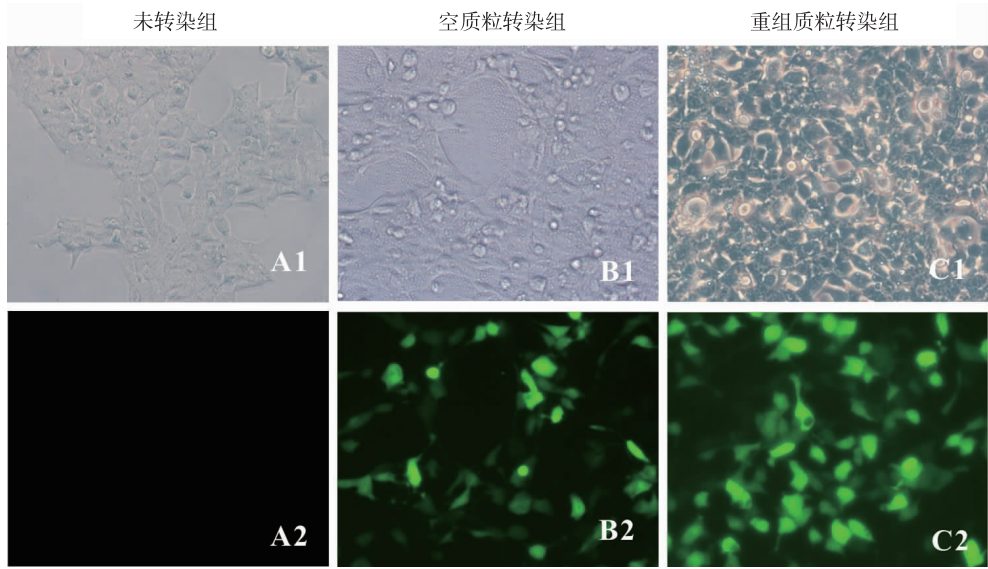
注:M 为 DNA Marker V,泳道 1 为阴性对照,  
泳道 2~7 为 PAX6 基因片段  
图 3  菌液 PCR 鉴定重组质粒 pEF1α-PAX6-IRES-AcGFP

Fig. 3  The electrophoresis of bacterial colony PCR product of plasmid pEF1α-PAX6-IRES-AcGFP



注:泳道 M 为 DNA marker IV,泳道 1 为 pEF1α-IRES-AcGFP 双酶切结果,泳道 2 为重组质粒 pEF1α-PAX6-IRES-AcGFP 双酶切  
图 4  SalI/BamHI 双酶切鉴定真核质粒 pEF1α-PAX6-IRES-AcGFP

Fig. 4  The electrophoresis of plasmid pEF1α-IRES-PAX6-AcGFP digested product by SalI and BamHI



注:A1、B1 和 C1 为显微镜(×200)明场下的 293FT 细胞;A2、B2 和 C2 为显微镜(×200)488 nm 波长激发光下的 293FT 细胞  
图 5  真核质粒 pEF1α-PAX6-IRES-AcGFP 转染 293FT 细胞 24 h 后镜下观察(200×)  
Fig. 5  Transfected ppEF1α-PAX6-IRES-AcGFP into 293FT cells



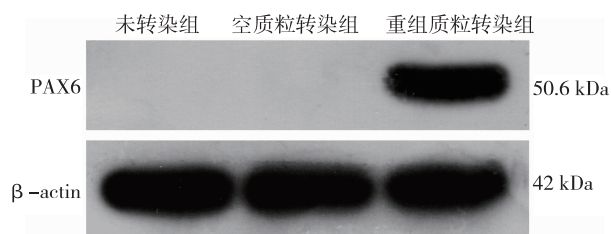


图6 转染后293FT细胞中PAX6蛋白表达

Fig. 6 The protein expression after PAX6 transfection in 293FT cell by western blotting analysis

增<sup>[12]</sup>。且该载体的多克隆位点中有一个 IRES 元件,可在 PEF1 $\alpha$  启动子驱动下转录为双顺反子,实现目的基因与绿色荧光报告基因(AcGFP)独立翻译<sup>[13]</sup>。此外,该载体能够在流式细胞仪中高效稳定检测或瞬时转染哺乳动物细胞表达目的基因与 AcGFP,且可以用 G418 筛选稳定转染细胞株,有利于后续转染胚胎干细胞。

在克隆目的基因 PAX6 时,本研究先将 PAX6 连接于 T 载体,测序正确后,再经酶切定向插入到真核载体。T 载体是 TA 克隆载体的简称,是一种能够直接克隆 PCR 产物的工具,本研究采用的 pUCm-T 载体是一种已经线性化的载体,载体每条链的 3' 端带有一个突出的 T(脱氧胸苷),载体的两端可以和 PCR 产物的两端进行正确的 AT 配对,在连接酶的催化下,可以把 PCR 产物连接到 pUCm-T 载体中,形成含有目的片断的重组载体,能够满足基因保存和测序的需要<sup>[14-15]</sup>,且能克服常规方法中载体自连、过程复杂、克隆效率低等不足,提高了连接效率和阳性率。293FT 细胞是一种改装过的人胚肾细胞,由 293 细胞派生,FT 的含义就是带有能复制(F)的 SV40 大 T 抗原,含有 SV40 复制起始点与启动子区的质粒可以复制,比较容易转染,被广泛应用于瞬时转染以过表达各种目标蛋白。脂质体转染法是利用脂质体脂质双分子层的融合及内吞作用使外源基因 PAX6 进入 293FT 细胞。

PAX6 基因是 PAX 基因家族成员,是控制着眼球形态发生的一个重要调节基因<sup>[4-6]</sup>,在眼、神经系统、鼻、胰腺和内分泌等组织器官的发育中起着重要作用,广泛参与细胞增殖迁移分化和黏附等生命活动<sup>[7-8]</sup>。在眼睛发育过程中,PAX6 从胚胎第 8 天表达,时间早于任何形态学分化<sup>[9]</sup>,表面外胚层中,PAX6 表达于眼睛发育最原始的阶段,基板

形成前 PAX6 就已经表达,一直持续表达达到晶状体分化,最终存在于成人晶状体和角膜上皮,是眼发育的主控基因<sup>[3, 11]</sup>。Ouyang<sup>[3]</sup> 的研究发现,将 PAX6 转到皮肤上皮干细胞(Skin epithelial stem cells, SECs)中时,发现其可以充分地将 SECs 转变为表达 K5/K14 的样细胞,再将此细胞移植应用于角膜上皮缺损的兔子模型中发现,移植的细胞最初位于角膜缘的地区,然后逐步向中央角膜与相应的区域移动,3 个月后,成功修复缺损的角膜并维持正常的角膜透明度。而将敲除 PAX6 基因的兔 LSCs 移植到此模型并不能修复角膜损伤,提示 PAX6 在修复角膜损伤中起到决定性的作用。由于 LSCs 获得的局限性,本课题构建携带眼发育关键基因 PAX6 的真核表达载体,初步探究其在真核细胞的表达,再进一步探讨 PAX6 转染胚胎干细胞并进一步诱导胚胎干细胞定向分化为 LSCs,以期建立稳定细胞株,为角膜损伤提供种子细胞。

本课题成功构建重组真核表达载体 pEF1 $\alpha$ -PAX6-IRES-AcGFP,并通过脂质体转染法将重组载体转入 293FT 细胞,转染 24 h 后荧光显微镜下观察到绿色荧光,Western blot 结果显示转染重组质粒组 PAX6 蛋白高表达,未转染组和转染空质粒组没有 PAX6 蛋白表达,证明过表达质粒成功转染了 293FT 细胞并建立了 PAX6 过表达的 293FT 细胞瞬时转染模型,为后续研究中 PAX6 在真核细胞中的调节作用及 PAX6 转染胚胎干细胞诱导分化为角膜缘干细胞实验奠定了基础。

## 4 参考文献

- [1] Ordonez P, Girolamo ND. Limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment[J]. Stem cells, 2012 (2):100-107.
- [2] Yoon JJ, Ismail S, Sherwin T. Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis [J]. World journal of stem cells, 2014(4):391.
- [3] Ouyang H, Yuanchao X, Ying L, et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis[J]. Nature, 2014(2):358-361.
- [4] Shaham O, Menuchin Y, Farhy C, et al. Pax6: A multi-level regulator of ocular development [J]. Progress in Retinal and Eye Research, 2012(5):351-376.
- [5] Ashery-Padan R, Gruss P. Pax6 lights-up the way for eye development[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2001 (6):706-714.

- [6] Xu S, Sunferland ME, Coles BLK, et al. The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6[J]. *Developmental Biology*, 2007(2):713–721.
- [7] Noll M. Evolution and role of Pax genes[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1993(4):595–605.
- [8] Paixão-Côrtes VR, Salzano FM, Bortolini MC. Origins and evolvability of the PAX family[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015(44):64–74.
- [9] Yao JG, Weasner BM, Wang LH, et al. Differential requirements for the Pax6(5a) genes eyegone and twin of eyegone during eye development in *Drosophila*[J]. *Developmental Biology*, 2008(2):535–551.
- [10] Gehring WJ, Ikeo K. Pax6: mastering eye morphogenesis and eye evolution[J]. *Trends in Genetics*, 1999(9):371–377.
- [11] Kozmik Z. The role of Pax genes in eye evolution[J]. *Brain Research Bulletin*, 2008(2–4):335–339.
- [12] Novosylina O, Jurewicz E, Pydiura N, et al. Translation elongation factor eEF1A1 is a novel partner of a multifunctional protein Sgt1[J]. *Biochimie*, 2015(119):137–145.
- [13] Abdul Mutalib NE, Matlsa N, Alitheen NB, et al. IRES-incorporated lactococcal bicistronic vector for target gene expression in a eukaryotic system[J]. *Plasmid*, 2014(73):26–33.
- [14] Peng RH, Xiong AS, Liu J, et al. Adenosine added on the primer 5' end improved TA cloning efficiency of polymerase chain reaction products[J]. *Analytical Biochemistry*, 2007(1):163–165.
- [15] Adachi Y, Fukuhara C. TA strategy for rapid and efficient site-directed mutagenesis[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012(1):66–68.
- (2015-12-05 收稿, 2016-02-22 修回)  
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华
- 
- (上接第 279 页)
- [5] Ren TT, Huang C, Cheng ML. Dietary blueberry and bifidobacteria attenuate nonalcoholic fatty liver disease in rats by affecting SIRT1-mediated signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014(2014):469059.
- [6] 刘欢. “浆果之王”蓝莓的营养保健作用研究[J]. *中国新技术新产品*, 2009(19):228–229.
- [7] 陈介甫, 李亚东, 徐哲. 蓝莓的主要化学成分及生物活性[J]. *药学报*, 2010(4):422–429.
- [8] Medina J, Femadez-Salazar Li, Gareia B, et al. Approach to the Pathogenesis and treatment of non alcoholics teato-hepatitis[J]. *Diabetes Care*, 2004(27):2057–2059.
- [9] Liu YL, Wang D, Zhang D, et al. Inhibitory effect of blueberry polyphenolic compounds on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro[J]. *J Agric Food Chem*, 2011(22):12254–12263.
- [10] 黄超, 任婷婷, 王豫萍, 等. 蓝莓对非酒精性脂肪性肝病小鼠肝细胞核因子相关因子 2 表达的影响[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2015(1):39–41.
- [11] Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, et al. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes[J]. *Toxicol Sci*, 2001(1):169–177.
- [12] Keum YS, Choi BY. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway[J]. *Molecules*, 2014(7):10074–10089.
- [13] Saw CL, Guo Y, Yang AY, et al. The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014(72):303–311.
- [14] Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997(2):313–322.
- [15] Wang YP, Cheng ML, Zhang BF, et al. Effect of blueberry on hepatic and immunological functions in mice[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010(9):164–168.
- [16] MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airway disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2001(1):195–207.
- (2015-12-05 收稿, 2016-02-10 修回)  
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华