

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.03.002

## Nrf2/ARE 通路与 PI3K/AKT 通路相互作用对胰岛细胞半胱天冬酶-3 表达的影响\*

李程<sup>1,2</sup>, 夏纪毅<sup>3</sup>, 万沁<sup>1△</sup>

(1. 西南医科大学附属医院内分泌科, 四川泸州 646000; 2. 重庆市荣昌区人民医院内分泌科 402460; 3. 西南医科大学药物与功能性食品研究中心, 四川泸州 646000)

**[摘要]** **目的** 探讨核因子相关因子 2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)通路与磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)通路相互作用对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠胰岛细胞凋亡和半胱天冬酶-3(Caspase-3)蛋白表达的影响及其可能机制。**方法** 将 60 只雄性 Wistar 大鼠分为正常对照组(NC 组,  $n=20$ )、糖尿病模型组(DM 组,  $n=20$ )和叔丁基对苯二酚干预组(tBHQ 组,  $n=20$ )。干预 8 周后处死所有大鼠, TUNEL 检测胰岛细胞凋亡, 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清及胰腺组织中丙二醛(MDA)水平, Western blot 检测 AKT、p-AKT、总 Nrf2、核 Nrf2、血红素氧合酶 1(HO-1)、Caspase-3 在胰岛细胞中蛋白表达水平。**结果** 与 NC 组比较, DM 组胰岛细胞凋亡率显著增加( $P=0.000$ ), 而 tBHQ 组胰岛细胞凋亡率明显低于 DM 组( $P=0.000$ )。DM 组血清及胰腺组织中 MDA 水平较 NC 组明显升高( $P=0.000$ ), 而 tBHQ 组血清及胰腺组织中 MDA 水平明显低于 DM 组( $P=0.000$ )。DM 组 p-AKT、总 Nrf2、核 Nrf2 及 HO-1 蛋白的表达水平均较 NC 组显著降低( $P=0.000$ ), Caspase-3 蛋白表达水平较 NC 组明显升高( $P=0.000$ ); 与 DM 组比较, tBHQ 组 p-AKT、总 Nrf2、核 Nrf2 及 HO-1 蛋白的表达水平均明显增加( $P=0.000$ ), Caspase-3 蛋白表达水平明显降低( $P=0.017$ ); AKT 蛋白表达水平在 3 组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** Nrf2/ARE 通路与 PI3K/AKT 通路相互作用对抑制胰岛细胞 Caspase-3 的表达及延缓胰岛细胞凋亡进程产生重要的保护作用。

**[关键词]** 半胱天冬酶-3; 糖尿病, 2 型; 胰岛; 细胞凋亡; Nrf2/ARE 通路; PI3K/AKT 通路; 氧化性应激

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)03-0292-04

### Effect of interact between Nrf2/ARE and PI3K/AKT pathways on Caspase-3 expression of islet cell\*

Li Cheng<sup>1,2</sup>, Xia Jiyi<sup>3</sup>, Wan Qin<sup>1△</sup>

(1. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Endocrinology, The Rongchang District People's Hospital, Chongqing 402460, China; 3. Research Center for Drug and Functional Food, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect and possible mechanisms of the interact between Nrf2/ARE and PI3K/AKT pathways on the islet cell apoptosis and Caspase-3 protein expression of type 2 diabetic rats. **Methods** Sixty male Wistar rats were randomly divided into the normal control group(NC group,  $n=20$ ), diabetic model group(DM group,  $n=20$ ) and tertiary-butylhydroquinone intervention group(tBHQ group,  $n=20$ ). All rats were killed after eight weeks of intervention. TUNEL was used to determine islet cell apoptosis. ELISA was used to determine MDA levels in serum and pancreatic tissues, and Western blot was used to detect the protein expression levels of AKT, p-AKT, total Nrf2, nuclear Nrf2, HO-1, Caspase-3 in pancreatic tissues. **Results** Compared with the NC group, the apoptosis rate of islet cells in the DM group was significantly increased( $P=0.000$ ). The apoptosis rate of islet cells in the tBHQ group was significantly lower than that in the DM group( $P=0.000$ ). Compared with the NC group, the MDA levels in serum and pancreatic tissue in the DM group were significantly increased( $P=0.000$ ), while the serum and pancreatic tissue levels of MDA in the tBHQ group were significantly lower than those in the DM group. The protein expression levels of p-AKT, total Nrf2, nuclear Nrf2 and HO-1 in the DM group were significantly lower than those in the NC group( $P=0.000$ ), while the protein expression level of Caspase-3 was significantly higher than that in the NC group( $P=0.000$ ). The tBHQ group had significantly higher protein expressions of p-AKT, total Nrf2, nuclear Nrf2 and HO-1 than the DM group( $P=0.000$ ), while the protein expression level of Caspase-3 was significantly decreased( $P=0.017$ ). AKT protein expression level had no statistically significant difference among the three groups( $P>0.05$ ). **Conclusion** The interact between Nrf2/ARE and PI3K/AKT pathways generates an important protective effect on inhibiting the expression of Caspase-3 in islet cell and delaying the process of islet cell apoptosis.

**[Key words]** Caspase-3; diabetes mellitus, type 2; islets of langerhans islet; apoptosis; Nrf2/ARE pathway; PI3K/AKT pathway; oxidative stress

磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(serine/threonine protein kinase, AKT)通路已被证明在调控胰岛细胞凋亡方面发挥着重要作用。Li 等<sup>[1]</sup>研究发

现, 人胰岛淀粉样多肽(human islet amyloid polypeptide, hIAPP)聚集可导致 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)胰岛 B 细胞损伤、凋亡, 这与氧化应激对 PI3K/AKT

\* 基金项目: 四川省教育厅科研计划资助项目(15ZB0153)。 作者简介: 李程(1986—), 主治医师, 硕士, 主要从事糖尿病及其并发症方面研究。 △ 通信作者, E-mail: wanqin3@163.com。

通路的抑制作用不断增强,进而激活重组人半胱天冬酶-3、8、9 (Caspase-3,8,9)有关。PI3K/AKT 通路调控的其中一个下游信号蛋白为核因子相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2),通过激活 Nrf2,使 Nrf2/抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)通路诱导血红素氧合酶 1(hemeoxygenase-1, HO-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等抗氧化酶的表达,发挥抗氧化应激作用,而应用 PI3K/AKT 通路特异性抑制剂处理后,则可抑制 Nrf2 活性<sup>[2-3]</sup>。本研究通过激活 Nrf2/ARE 通路,观察对 T2DM 大鼠 PI3K/AKT 通路、Caspase-3 蛋白表达及胰岛细胞凋亡的影响,以探讨 Nrf2/ARE 通路与 PI3K/AKT 通路相互作用对 T2DM 大鼠胰岛细胞的保护作用及可能机制。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 健康 8 周龄雄性 Wistar 大鼠,体质量 180~200 g,由重庆腾鑫比实验动物销售公司提供。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国 Sigma 公司;叔丁基对苯二酚(tert-butylhydroquinone, tBHQ)购自比利时 Acros 公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 Omega 公司;TUNEL 试剂盒购自德国 Roche 公司;总蛋白、核蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗大鼠 Nrf2 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗大鼠 AKT 单克隆抗体购自美国 CST 公司;兔抗大鼠 p-AKT(Ser473)多克隆抗体购自美国 CST 公司;兔抗大鼠 HO-1 多克隆抗体购自美国 Bioworld 公司;兔抗大鼠 Caspase-3 单克隆抗体购自美国 CST 公司;兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体购自美国 CST 公司,辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)购自上海碧云天生物技术有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 糖尿病大鼠模型的建立及分组** 取 60 只雄性 Wistar 大鼠予以高糖、高脂饲料喂养,高糖、高脂饲料配方为普通饲料 66.5%,蔗糖 20.0%,猪油 10.0%,胆固醇 2.5%,胆酸盐 1.0%<sup>[4]</sup>。喂养 4 周后,空腹 8 h,一次性腹腔注射 STZ 30 mg/kg BW(用前以 pH 4.3 的 0.1 mmol/L 枸橼酸盐缓冲液配成 1.0%的浓度),高糖、高脂饲料继续喂养 72 h 后,空腹测尾静脉血糖大于或等于 16.7 mmol/L 为 T2DM 模型建立成功,共 43 只大鼠造模成功,采用随机数字表法将其分为两组:糖尿病模型组(DM 组)20 只,不用药物干预,在高糖、高脂饲料中添加 1.0%面粉;tBHQ 干预组(tBHQ 组)20 只,参照文献<sup>[5]</sup>的方法,在高糖、高脂饲料中添加 1.0% tBHQ,余下的 3 只 T2DM 大鼠剔除。同时,另取 20 只 Wistar 大鼠作为正常对照

组(NC 组),不用药物干预,在普通饲料中添加 1.0%面粉。3 组大鼠连续干预 8 周后处死,穿刺心脏收集全血并离心,取血清放入-20℃冰箱冻存待测,收集胰腺组织,放入-80℃冰箱冻存备检。

**1.2.2 胰岛细胞凋亡观察及细胞凋亡率计算** 各组胰腺组织切片采用 TUNEL 法检测,操作严格按照 TUNEL 试剂盒说明书进行。在 200 倍光镜下观察凋亡细胞核(棕黄色)和未发生凋亡的细胞核(蓝色)。每张切片至少选取 3~5 个胰岛在高倍视野( $\times 400$ )下计算胰岛细胞凋亡率,凋亡率=凋亡细胞核数/总细胞核数 $\times 100\%$ 。

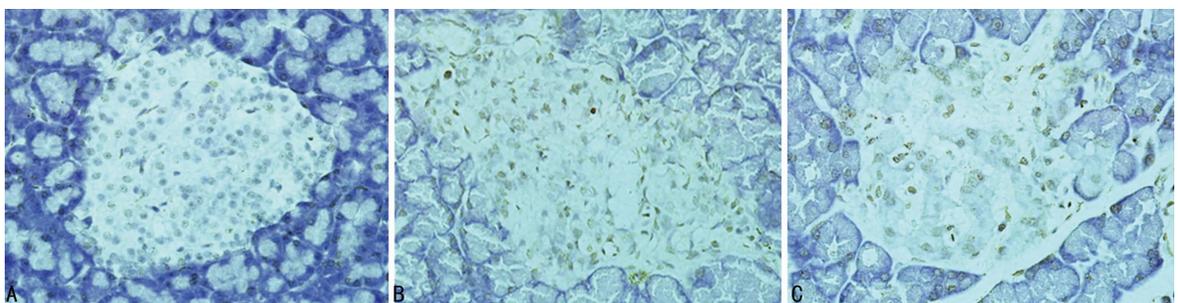
**1.2.3 MDA 检测** 采用 ELISA 法检测血清及胰腺组织中 MDA 水平,测定方法按照 MDA ELISA 试剂盒使用说明,取大鼠胰岛数目含量最多的胰尾组织约 100 mg,加入 RIPA 裂解缓冲液,12 000 r/min 低温离心 10 min,在酶标包被板上分别设标准品孔、空白对照孔、待测样品孔。将 50  $\mu$ L 标准品加入标准品孔中,先后将 10  $\mu$ L 和 40  $\mu$ L 待测样品稀释液加到待测样品孔中,空白对照孔不加任何液体。然后加入抗体工作液和酶标抗体工作液继续反应,最后加入底物工作液反应后在 450 nm 波长处对每孔的光密度(OD)值进行测量,根据标准品的浓度和 OD 值算出 MDA 浓度。

**1.2.4 Western blot 检测目的蛋白** 取大鼠胰岛数目含量最多的胰尾组织约 100 mg,加入 RIPA 裂解缓冲液,12 000 r/min 低温离心 10 min,取上清液即得胰腺组织总蛋白,胰腺组织核蛋白的提取严格按照凯基生物核蛋白提取试剂盒说明书操作。用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度,取等量蛋白电泳并转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温下封闭后,滴加 AKT (1:1 000)、p-AKT (1:1 000)、Nrf2 (1:800)、HO-1 (1:500)、Caspase-3(1:1 000)一抗溶液,以及标准内参 GAPDH(1:1 000),4℃孵育过夜后加入 HRP-山羊抗兔 IgG 二抗溶液,室温孵育 1 h,电化学发光(ECL)显色,Bio-Rad 凝胶成像系统成像,Quantity-One 测灰度值并分析。实验重复 4 次,取平均值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行分析,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用 ANOVA 分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠胰岛细胞凋亡率的比较** 凋亡细胞缩小,细胞核染色质浓缩、碎裂。DM 组胰岛细胞凋亡率[(26.42 $\pm$ 6.93)%]较 NC 组[(7.05 $\pm$ 2.81)%]显著增加( $P=0.000$ ),tBHQ 组胰岛细胞凋亡率[(13.62 $\pm$ 3.77)%]较 DM 组明显减少( $P=0.000$ ),见图 1。



A:NC 组;B:DM 组;C:tBHQ 组。

图 1 各组大鼠胰岛细胞凋亡观察(TUNEL, $\times 200$ )

**2.2 各组大鼠血清及胰腺组织中 MDA 水平的比较** DM 组血清及胰腺组织中 MDA 水平较 NC 组明显升高 ( $P=0.000$ ), tBHQ 组血清及胰腺组织中 MDA 水平较 DM 组明显降低 ( $P=0.000$ ), 见表 1。

表 1 各组大鼠血清及胰腺组织中 MDA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ , nmol/L)

组别	n	血清 MDA 水平	胰腺 MDA 水平
NC 组	20	5.69 ± 1.34	15.52 ± 2.63
DM 组	20	18.71 ± 2.55 <sup>a</sup>	38.12 ± 5.85 <sup>a</sup>
tBHQ 组	20	9.97 ± 2.06 <sup>b</sup>	25.94 ± 4.24 <sup>b</sup>
F		293.647	215.211
P		0.000	0.000

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 NC 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与 DM 组比较。

**2.3 各组大鼠胰腺组织 AKT、p-AKT、总 Nrf2、核 Nrf2、HO-1 和 Caspase-3 蛋白表达的比较** Western blot 结果显示: DM 组 p-AKT、总 Nrf2、核 Nrf2 及 HO-1 蛋白的表达水平均较 NC 组显著降低 ( $P=0.000$ ), Caspase-3 蛋白表达水平较 NC 组明显升高 ( $P=0.000$ ); 与 DM 组比较, tBHQ 组 p-AKT、总 Nrf2、

核 Nrf2 及 HO-1 蛋白的表达水平均明显增加 ( $P=0.000$ ), Caspase-3 蛋白表达水平明显降低 ( $P=0.017$ ); AKT 蛋白表达水平在 3 组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 2、表 2。

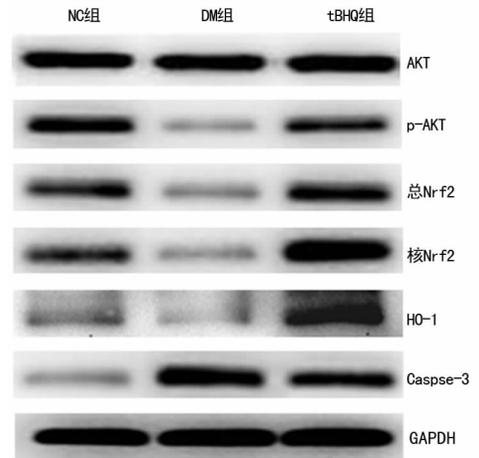


图 2 各组大鼠胰腺组织 AKT、p-AKT、总 Nrf2、核 Nrf2、HO-1、Caspase-3 蛋白表达

表 2 各组大鼠胰腺组织各蛋白表达的相对强度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AKT	p-AKT	总 Nrf2	核 Nrf2	HO-1	Caspase-3
NC 组	4	0.99 ± 0.08	1.36 ± 0.22	1.12 ± 0.14	1.01 ± 0.09	0.89 ± 0.07	0.54 ± 0.04
DM 组	4	0.99 ± 0.09	0.50 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.32 ± 0.21 <sup>a</sup>
tBHQ 组	4	1.02 ± 0.13	1.03 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.52 ± 0.25 <sup>b</sup>	1.54 ± 0.27 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.15 <sup>b</sup>
F		1.239	42.858	36.409	51.416	59.634	48.195
P		0.335	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 NC 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与 DM 组比较。

### 3 讨论

PI3K/AKT 通路及 Nrf2/ARE 通路形成的 PI3K/AKT-Nrf2/ARE 通路在调节机体氧化应激方面发挥着重要作用<sup>[6-7]</sup>。PI3K/AKT 通路在机体各组织与细胞中广泛存在, 通过抑制 Caspase 家族活性来调控细胞凋亡周期<sup>[8]</sup>。Caspase 家族是细胞凋亡环节中的主要参与者, Caspase-3 在该环节中扮演着主要角色, Caspase-3 激活与过度表达均可引起细胞凋亡信号转导级联反应的进一步放大, 最终使细胞发生凋亡<sup>[9]</sup>。

Tie 等<sup>[10]</sup>通过研究氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL) 对内皮祖细胞 (EPCs) PI3K 的亚基 p85 及 AKT 的影响发现, oxLDL 可使 p85 亚硝基化, 并显著降低 p-AKT/AKT 比值, 进而诱导 EPCs 凋亡, 这一改变可通过离体抗氧化治疗逆转, 提示氧化应激反应可干扰 PI3K/AKT 通路信号转导, 导致 EPCs 凋亡。根据 PI3K/AKT 信号转导通路特点, PI3K 与 AKT 结合后, 先后将 AKT 的两个位点 (Thr308 和 Ser473) 磷酸化, 从而使 AKT 完全活化<sup>[11-12]</sup>, 在本研究中, DM 组 p-AKT 蛋白低表达提示其未被激活或未完全活化。同时, DM 组 Caspase-3 蛋白表达水平上调, 胰岛细胞凋亡率显著增加, 说明 PI3K/AKT 通路失活后对 Caspase-3 的抑制作用减弱, 从而促使胰岛细胞凋亡。由于 PI3K/AKT 通路可诱导下游靶基因 Nrf2 的转录, 进而使其磷酸化入细胞核与 ARE 结合, 并上调抗氧化酶 HO-1 蛋白的表达, 发挥细胞保护功能, 而未磷酸化入细胞核的 Nrf2 在细胞质中被泛素化降解<sup>[13]</sup>。因此, 本研究通过检测 Nrf2、HO-1、MDA 指标来反映抗氧化应激能力和胰岛细胞氧化应激

水平。结果显示, DM 组抗氧化应激能力明显减弱, 胰岛细胞处于高氧化应激状态, 证明氧化应激可阻碍 PI3K/AKT 通路信号转导, 而 PI3K/AKT 通路活性降低可导致 Nrf2 激活障碍、入核减少, 并促进其被泛素化降解, 从而引起 Nrf2 总蛋白、核蛋白表达水平均降低。由此, 笔者推测, Nrf2/ARE 通路活性降低或激活障碍, 可下调 HO-1 蛋白的表达水平, 导致 PI3K/AKT 通路更容易受到氧化应激的攻击损伤, 使 Caspase-3 活性逐渐增强, 如此循环往复, 最终加速了胰岛细胞凋亡进程。

由于 DM 组 Nrf2/ARE 通路处于活性降低或失活状态, 据此, 本研究选用 Nrf2/ARE 通路特异性激活剂 tBHQ 对 T2DM 大鼠进行为期 8 周的干预和观察<sup>[14]</sup>。结果发现, tBHQ 组抗氧化应激能力明显增强, 胰岛细胞氧化应激水平明显降低, 提示 Nrf2/ARE 通路被激活后, 可抑制 Nrf2 在细胞质中被泛素化降解, 增加其磷酸化入核率, 进而上调抗氧化酶表达, 降低胰岛细胞氧化应激水平<sup>[15]</sup>。同时, tBHQ 组 AKT 磷酸化水平增强, 并伴随着 Caspase-3 蛋白表达水平下调, 胰岛细胞凋亡率明显降低, 由此说明激活 Nrf2/ARE 通路可减轻氧化应激对 PI3K/AKT 通路的影响, 进而抑制 Caspase-3 蛋白活性, 使胰岛细胞凋亡明显减少。

综上所述, Nrf2/ARE 通路通过抗氧化应激作用, 保护 PI3K/AKT 通路的正常信号转导, 而 PI3K/AKT 通路可介导 Nrf2 蛋白表达, 发挥 Nrf2/ARE 通路抗氧化应激活性。两者相互作用、相互渗透, 对抑制胰岛细胞 Caspase-3 的表达及延缓胰岛细胞凋亡进程起着重要的保护作用。

## 参考文献

- [1] Li XL, Wong YS, Xu G, et al. Selenium-enriched Spirulina protects INS-1E pancreatic beta cells from human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis through suppression of ROS-mediated mitochondrial dysfunction and PI3/AKT pathway[J]. *Eur J Nutr*, 2015, 54(4): 509-522.
- [2] Min KJ, Lee JT, Joe EH, et al. An I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation inhibitor induces heme oxygenase-1 (HO-1) expression through the activation of reactive Oxygen species(ROS)-Nrf2-ARE signaling and ROS-PI3K/Akt signaling in an NF- $\kappa$ B-independent mechanism[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(9): 1505-1513.
- [3] Zou W, Chen C, Zhong Y, et al. PI3K/Akt pathway mediates Nrf2/ARE activation in human L02 hepatocytes exposed to low-concentration HBCDs[J]. *Environ Sci Technol*, 2013, 47(21): 12434-12440.
- [4] Chun L, Junlin Z, Aimin W, et al. Inhibition of ceramide synthesis reverses endothelial dysfunction and atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 93(1): 77-85.
- [5] Nouhi F, Tusi SK, Abdi A, et al. Dietary supplementation with tBHQ, an Nrf2 stabilizer molecule, confers neuroprotection against apoptosis in amyloid  $\beta$ -injected rat[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(5): 870-878.
- [6] Wang L, Wang R, Jin M, et al. Carvedilol attenuates 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells: involvement of Akt and Nrf2/ARE pathways[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(9): 1733-1740.
- [7] Li L, Dong H, Song E, et al. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling[J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 25(209): 56-67.
- [8] Liu C, Yang J, Fu W, et al. Coactivation of the PI3K/Akt and ERK signaling pathways in PCB153-induced NF- $\kappa$ B activation and caspase inhibition[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 277(3): 270-278.
- [9] Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors[J]. *Cell*, 2000, 102(1): 1-4.
- [10] Tie G, Yan J, Yang Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis in endothelial progenitor cells by inactivating the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway[J]. *J Vasc Res*, 2010, 47(6): 519-530.
- [11] Tsuchiya A, Kanno T, Nishizaki T. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway[J]. *J Endocrinol*, 2013, 28(1): 49-59.
- [12] Risso G, Blaustein M, Pozzi B, et al. Akt/PKB: one kinase, many modifications[J]. *Biochem J*, 2015, 468(2): 203-214.
- [13] Li L, Dong H, Song E, et al. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling[J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 209(25): 56-67.
- [14] Zagorski JW, Turley AE, Dover HE, et al. The Nrf2 activator, tBHQ, differentially affects early events following stimulation of Jurkat cells[J]. *Toxicol Sci*, 2013, 136(1): 63-71.
- [15] Giudice A, Arra C, Turco MC. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents[J]. *Methods Mol Biol*, 2010(647): 37-74.
- (收稿日期: 2016-07-18 修回日期: 2016-10-16)
- 
- (上接第 291 页)
- [13] Heitkemper MM, Jarrett M. Gender differences and hormonal modulation in visceral pain[J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2001, 5(1): 35-43.
- [14] Wu JC, Cheung CM, Wong VW, et al. Distinct clinical characteristics between patients with nonerosive reflux disease and those with reflux esophagitis[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007, 5(6): 690-695.
- [15] Kessing BF, Bredenoord AJ, Velosa M, et al. Supragastric belches are the main determinants of troublesome belching symptoms in patients with gastro-oesophageal reflux disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 35(9): 1073-1079.
- [16] Koukias N, Woodland P, Yazaki E, et al. Supragastric belching: prevalence and association with gastroesophageal reflux disease and esophageal hypomotility[J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2015, 21(3): 398-403.
- [17] Fornari F, Blondeau K, Mertens V, et al. Nocturnal gastroesophageal reflux revisited by Impedance-pH monitoring[J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2011, 17(2): 148-157.
- [18] 张绍芬, 郁琦. 围绝经期的治疗策略[J]. *现代妇产科进展*, 2010, 19(3): 5-8.
- [19] Infantino M. The prevalence and pattern of gastroesophageal reflux symptoms in perimenopausal and menopausal women[J]. *J Am Acad Nurse Pract*, 2008, 20(5): 266-272.
- [20] 李华, 汪晖. 围绝经期妇女的绝经症状及其影响因素调查分析[J]. *护理研究*, 2015, 29(4): 415-419.
- [21] Lacy BE, Weiser K, Chertoff J, et al. The diagnosis of gastroesophageal reflux disease[J]. *Am J Med*, 2010, 123(7): 583-592.
- [22] Malfertheiner P, Nocon M, Vieth M, et al. Evolution of gastro-oesophageal reflux disease over 5 years under routine medical care—the ProGERD study[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 35(1): 154-164.
- (收稿日期: 2016-07-21 修回日期: 2016-10-09)