

## δ阿片受体激活对过氧化氢损伤的心肌细胞的保护作用

李炯<sup>1\*</sup>, 王忠彦<sup>2</sup>, 于敏<sup>3</sup>

(滨州医学院 1. 卫生管理学院, 2. 新闻中心, 3. 药学院, 山东烟台 264003)

**摘要:** 目的 研究 δ 阿片受体激活剂 *D*-丙(2)-*D*-亮(5)-脑啡肽(DADLE)对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)损伤的心肌细胞的保护作用及其机制。方法 分离乳大鼠心肌细胞,培养 48 h 后分为正常对照、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μmol·L<sup>-1</sup>)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE (1 μmol·L<sup>-1</sup>)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE + 纳曲啉哌 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE + U0126 (10 nmol·L<sup>-1</sup>) 组,继续培养 48 h。用 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入法检测心肌细胞增殖反应,流式细胞仪检测心肌细胞凋亡百分率,乳酸脱氢酶(LDH)活性测定试剂盒测定培养上清 LDH 活性,硫代巴比妥酸显色法测定细胞内丙二醛(MDA)含量,黄嘌呤氧化酶法测定细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性,Western 蛋白印迹法检测细胞外信号调节激酶磷酸化(p-ERK)水平。结果 ①与正常对照组比较,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组心肌细胞 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入值明显降低,细胞凋亡率升高;培养上清 LDH 活性和 MDA 含量明显增加,SOD 活性和 A<sub>p-ERK</sub>/A<sub>ERK</sub> 的比值降低。②与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较,DADLE 可使心肌细胞 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入值升高,细胞凋亡率下降;培养上清 LDH 活性和 MDA 含量降低,SOD 活性和 A<sub>p-ERK</sub>/A<sub>ERK</sub> 的比值升高。③分别加入 δ 阿片受体拮抗剂纳曲啉哌和 ERK 拮抗剂 U0126,DADLE 对上述指标的逆转作用被抑制。结论 δ 阿片受体激活对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的心肌细胞具有保护作用,其机制可能与其增强心肌细胞的抗氧化功能及促进 ERK 磷酸化有关。

**关键词:** 受体,阿片样,δ; 肌细胞,心脏; 过氧化氢; 细胞外信号调节 MAP 激酶类; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R962

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2009)06-0431-05

收稿日期: 2008-12-01 接受日期: 2009-03-25

作者简介: 李炯(1978-),男,山东省烟台人,临床医学学士,主要从事心血管医学和医学信息研究。

\* 联系作者。 E-mail: muyifengyu@163.com Tel: 13465352249

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2009.06.003

心肌梗死等心肌缺血缺氧性心脏疾病严重危害人们健康,是导致死亡的主要疾病之一<sup>[1]</sup>。在缺血损伤因素的作用下,细胞内氧化代谢产物增加或细胞抗氧化保护机制低下时,活性氧产生堆积并对细胞产生毒性。过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)是体内氧化代谢的中间产物,在缺血缺氧造成心肌细胞的氧化应激状态下很容易穿透细胞膜而在细胞内积累并带来严重后果。心肌细胞本身可产生和释放阿片肽<sup>[2-3]</sup>,δ阿片受体激活剂 *D*-丙(2)-*D*-亮(5)-脑啡肽([*D*-Ala<sup>2</sup>,*D*-Leu<sup>5</sup>]-enkephalin, DADLE)具有抗氧化作用,被认为是自由基的清道夫,而且阿片受体的激活对培养的细胞具有明显抗凋亡作用<sup>[4]</sup>。采用体外培养的乳大鼠心肌细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型,观察 δ 阿片受体激活剂 DADLE 对心肌细胞的保护作用,并探讨其可能的作用机制。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 动物、药品和试剂

出生 2~3 d 的 SD 乳大鼠,雌雄兼用,动物许可证号:SCXK11-00-0005。DADLE、δ阿片受体拮抗剂纳曲啉哌(naltrindole)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)拮抗剂 U0126、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和低糖培养基 DMEM 均购自美国 Sigma 公司;小牛血清为杭州四季青生物材料研究所产品;兔抗鼠 ERK 和磷酸化 ERK (phosphorylated-ERK, p-ERK)的单抗(一抗)购自美国 Sigma 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 多抗(二抗)购自北京中山金桥生物有限公司,显色剂购自沈阳基因公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,其他试剂均为分析纯。

## 1.2 乳大鼠心肌细胞培养、分组及给药

在无菌条件下,开胸取出心脏,用 Hank 液洗涤 3 次后,剪成  $1 \text{ mm}^3$  小块,加入胰蛋白酶  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  消化,将消化完毕的细胞置入含有 10% 小牛血清及 90% DMEM 培养基的 100 mL 培养瓶中,置于 5%  $\text{CO}_2$  孵育箱中。因非心肌细胞(主要为成纤维细胞)贴壁速度较快,心肌细胞贴壁速度较慢,因此  $37^\circ\text{C}$  静置培养 1.5 ~ 2.0 h 后,将细胞悬液吸出,即获得心肌细胞。将细胞密度调至  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 0.4% 台盼蓝染色,活细胞  $> 90\%$ , 接种于底面积  $25 \text{ cm}^2$  的培养瓶中,每瓶 5 mL, 或者密度  $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$  接种于 24 孔板中,每孔 1 mL, 置  $\text{CO}_2$  孵育箱中培养。培养 48 ~ 72 h 后,更换含 0.4% 小牛血清的培养基,以减少血清成分对实验结果的影响。再培养 48 h 后分为正常对照、 $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DADLE}$  ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DADLE} + \text{纳曲吡啶}$  ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DADLE} + \text{U0126}$  ( $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组,继续培养 48 h 后进行各项指标的测定。

## 1.3 [ $^3\text{H}$ ] TdR 掺入法测定细胞增殖

每孔加细胞 1 mL (含  $5 \times 10^5$  细胞) 于 24 孔培养板,同时加入相应浓度药物和 [ $^3\text{H}$ ] TdR  $37 \text{ TBq} \cdot \text{L}^{-1}$ , 总体积约 1 mL。培养 48 h 后弃去上清,用冷 Hank 液快速冲洗 3 遍,每孔加 SDS  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1 mL 溶解细胞,用 20% 三氯醋酸 1 mL 沉淀蛋白,应用 49 型玻璃纤维滤膜过滤,再用 Hank 液冲洗 3 遍,烘干滤膜,用液闪仪(Paclar, Tricard 2200 CA, 美国)测量放射活性(cpm)。每组设 3 个复孔。

## 1.4 流式细胞术测定细胞凋亡率<sup>[5]</sup>

将心肌细胞培养 48 h 后用胰蛋白酶  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  消化, PBS 洗涤 2 次, 并调整细胞密度为  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 制成单细胞悬液。取 1 mL 细胞, 加 PBS 离心清洗 2 次, 加入 annexin V-FITC  $10 \mu\text{L}$  和碘化丙啶  $5 \mu\text{L}$ , 轻轻摇匀, 在 1 h 内用流式细胞仪

(FACSCALIBUR, 美国 BD 公司) 进行测定。所得数据经 Bioconsort 专用软件处理, 分析细胞凋亡率。

## 1.5 细胞培养上清 LDH 活性、细胞内 SOD 活性和 MDA 含量的测定

细胞培养上清 LDH 活性、细胞内 SOD 活性和 MDA 含量测定分别按照试剂盒说明书进行。

## 1.6 Western 蛋白印迹法测定心肌细胞 ERK 表达及磷酸化水平

细胞培养 48 h 后,用刮刀刮下细胞,用 PBS 冲洗,离心  $90 \text{ g}$ ,  $15 \text{ min}$ , 弃上清,把细胞沉淀置于  $-70^\circ\text{C}$  冰箱备用。测定指标时,取出样品,每份样品取样  $50 \mu\text{g}$  蛋白,变性 SDS-聚丙烯酰胺凝胶恒压电泳,电压积压胶  $80 \text{ V}$ , 分离胶  $120 \text{ V}$ 。电泳结束后用半干法将蛋白转移至硝酸纤维素膜,恒压电泳  $95 \text{ V}$ , 室温  $1 \text{ h}$ 。将硝酸纤维素膜  $4^\circ\text{C}$  封闭过夜,封闭液为 5% 的脱脂奶粉,按  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-2}$  膜面积加入 1:2000 稀释的一抗(兔抗鼠 ERK, p-ERK 和  $\beta$ -肌动蛋白单抗)孵育 2 h, 封闭液漂洗后按  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-2}$  膜面积加入 1:2000 稀释的二抗(辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG 抗体), 室温下摇床孵育 1 h, 漂洗后加显色剂显色 5 min。显影条带经 1200 Pro 型图像扫描仪扫描, CAMIAS-008 图像分析系统测定各条带积分吸光度(A)值。用  $A_{\text{ERK}}/A_{\beta\text{-肌动蛋白}}$  和  $A_{\text{p-ERK}}/A_{\beta\text{-肌动蛋白}}$  比值反映 ERK 和 p-ERK 蛋白表达水平,  $A_{\text{p-ERK}}/A_{\text{ERK}}$  比值反映 ERK 磷酸化水平。实验重复 3 次。

## 1.7 统计学分析

实验结果数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用单因素方差分析及 LSD 法进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 DADLE 对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤的心肌细胞增殖反应和细胞凋亡率的影响

由图1和表1可见, 与对照组相比,  $\text{H}_2\text{O}_2$  组心

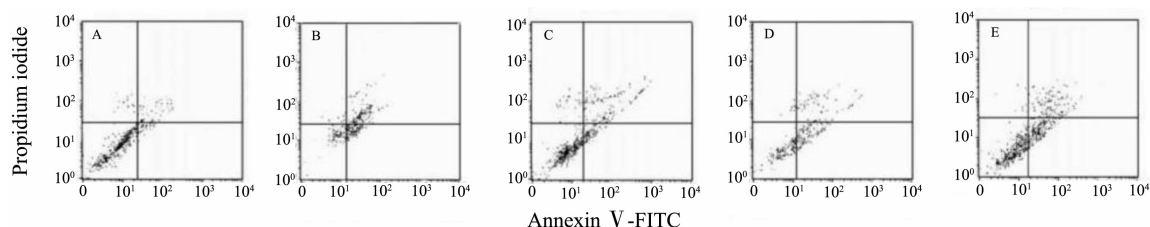


Fig 1. Effect of DADLE on apoptosis of rat myocardial cells injured by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . See Tab 1 for the cell treatments. A: control; B:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; C:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DADLE}$ ; D:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DADLE} + \text{naltrindole}$ ; E:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DADLE} + \text{U0126}$ .

**Tab 1. Effect of [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]-enkephalin (DADLE) on proliferation and apoptosis rate of rat myocardial cells injured by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Group	[ <sup>3</sup> H]TdR incorporation/ cpm	Apoptosis rate/%
Control	2567 ± 171	9.8 ± 0.2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1024 ± 66 <sup>**</sup>	45.3 ± 2.8 <sup>**</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DADLE	2039 ± 76 <sup>##</sup>	16.1 ± 3.0 <sup>##</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DADLE + naltrindole	1224 ± 109 <sup>△△</sup>	41.4 ± 0.9 <sup>△△</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DADLE + U0126	1175 ± 59 <sup>△△</sup>	30.3 ± 1.9 <sup>△△</sup>

Myocardial cells were isolated from neonatal rats and cultured for 48 h. Then the cells were cultured with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μmol·L<sup>-1</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE (1 μmol·L<sup>-1</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE + naltrindole (10 μmol·L<sup>-1</sup>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE + U0126 (10 nmol·L<sup>-1</sup>), respectively, for another 48 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with control group; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group; <sup>△△</sup> $P < 0.01$ , compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE group.

肌细胞 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入值降低 60.1%, 细胞凋亡率升高 362.2%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE 组与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, [<sup>3</sup>H]TdR 掺入值升高 99.1%, 细胞凋亡率下降

64.5%, 表明 DADLE 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的细胞具有保护作用; 分别加入纳曲啶哌和 U0126 可拮抗 DADLE 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞的保护作用。

**2.2 DADLE 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤心肌细胞 LDH 释放、SOD 活性和 MDA 含量的影响**

由表 2 可见, 与对照组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组心肌细胞 LDH 释放量增加, 细胞内 SOD 活性下降, MDA 含量增加; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE 组与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 相比, LDH 释放量下降, 细胞内 SOD 活性增加, MDA 含量下降; 加入纳曲啶哌和 U0126, DADLE 对上述指标的影响被抑制。

**2.3 DADLE 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤心肌细胞 ERK 表达和磷酸化水平的影响**

Western 蛋白印迹法检测 ERK 和 p-ERK 蛋白表达水平 (表 3, 图 2)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组与对照组比较, ERK 蛋白表达无明显变化, p-ERK 蛋白表达降低, A<sub>p-ERK</sub>/A<sub>ERK</sub> 比值降低, 表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 ERK 磷酸化水平降低; 加入 DADLE 对 ERK 蛋白表达无明显影响, p-ERK 蛋白表达水平升高, ERK 磷酸化水平升高; 分别加入纳曲啶哌和 U0126 可拮抗 DADLE 增加 ERK 磷酸化水平的作用。

**Tab 2. Effect of DADLE on lactate dehydrogenase (LDH) release, superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in rat myocardial cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

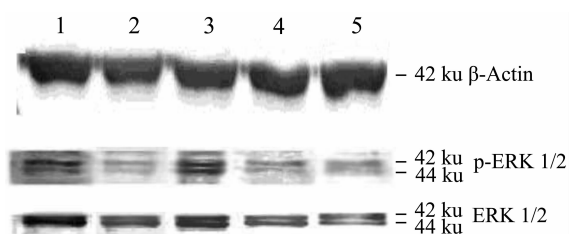
Group	LDH/U·L <sup>-1</sup>	SOD/U·L <sup>-1</sup>	MDA/nmol·L <sup>-1</sup>
Control	119 ± 29	293 ± 20	0.75 ± 0.33
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	328 ± 36 <sup>**</sup>	170 ± 14 <sup>**</sup>	3.27 ± 0.72 <sup>**</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DADLE	167 ± 27 <sup>##</sup>	271 ± 14 <sup>##</sup>	1.28 ± 0.27 <sup>##</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DADLE + naltrindole	320 ± 46 <sup>△△</sup>	160 ± 31 <sup>△△</sup>	3.19 ± 0.24 <sup>△△</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DADLE + U0126	318 ± 29 <sup>△△</sup>	158 ± 28 <sup>△△</sup>	3.10 ± 0.19 <sup>△△</sup>

See Tab 1 for the cell treatments.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with control group; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group; <sup>△△</sup> $P < 0.01$ , compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE group.

**Tab 3. Effect of DADLE on extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphorylated ERK (p-ERK) expressions in rat myocardial cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Group	A <sub>ERK</sub> :A <sub>β-Actin</sub>	A <sub>p-ERK</sub> :A <sub>β-Actin</sub>	A <sub>p-ERK</sub> :A <sub>ERK</sub>
Control	0.0751 ± 0.0002	0.060 ± 0.002	0.804 ± 0.005
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.0775 ± 0.0001 <sup>**</sup>	0.028 ± 0.001 <sup>**</sup>	0.361 ± 0.002 <sup>**</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DADLE	0.0796 ± 0.0003 <sup>##</sup>	0.053 ± 0.003 <sup>##</sup>	0.661 ± 0.001 <sup>##</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DADLE + naltrindole	0.0747 ± 0.0002 <sup>△△</sup>	0.026 ± 0.001 <sup>△△</sup>	0.554 ± 0.004 <sup>△△</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DADLE + U0126	0.0684 ± 0.0002 <sup>△△</sup>	0.025 ± 0.001 <sup>△△</sup>	0.362 ± 0.001 <sup>△△</sup>

See Tab 1 for the cell treatments.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with control group; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group; <sup>△△</sup> $P < 0.01$ , compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE group.



**Fig 2. Effect of DADLE on ERK expression and its phosphorylation in rat myocardial cells injured by  $H_2O_2$ .** See Tab 1 for the cell treatments. Lane 1: control; lane 2:  $H_2O_2$ ; lane 3:  $H_2O_2$  + DADLE; lane 4:  $H_2O_2$  + DADLE + naltrindole; lane 5:  $H_2O_2$  + DADLE + U0126.

### 3 讨论

本研究结果表明,  $\delta$  阿片受体激活剂 DADLE 可逆转  $H_2O_2$  导致的心肌细胞增殖反应降低和细胞凋亡率升高, 提示 DADLE 对  $H_2O_2$  损伤的心肌细胞具有保护作用。  $\delta$  阿片受体拮抗剂纳曲啶酮和 ERK 拮抗剂 U0126 可拮抗 DADLE 对  $H_2O_2$  损伤心肌细胞的保护作用。

心肌细胞凋亡被认为是心肌缺血性疾病的重要病理生理机制, 氧自由基与细胞凋亡的关系越来越受到重视。活性氧自由基可通过损伤 DNA<sup>[6]</sup>、影响信号传导途径<sup>[7-8]</sup> 及参与基因表达调控<sup>[9]</sup> 等途径介导细胞凋亡。为此, 本研究进一步观察了 DADLE 对心肌细胞 LDH 释放、SOD 活性和 MDA 含量的影响。结果表明, DADLE 可降低 LDH 释放, 增加细胞内 SOD 活性, 降低 MDA 含量, 提示 DADLE 对  $H_2O_2$  损伤心肌细胞的保护作用可能与其增强心肌细胞的抗氧化功能有关。

据报道, 阿片受体和其他 G 蛋白耦联受体可激活 ERK<sup>[10]</sup>, ERK 包含 ERK1 (42 ku) 和 ERK2 (44 ku)<sup>[11-12]</sup>, 因此电泳时可出现双条带。ERK 作为分裂原激活蛋白激酶家族中的一员参与抗凋亡<sup>[13]</sup>。近年来研究发现, ERK 磷酸化激活是心肌细胞增殖和凋亡信号通路的汇聚点<sup>[14]</sup>。本研究 Western 蛋白印迹法结果表明,  $H_2O_2$  对 ERK 蛋白表达无明显影响, 降低 p-ERK 蛋白表达水平; DADLE 可增加 p-ERK 蛋白表达, 升高 ERK 磷酸化水平; 纳曲啶酮和 U0126 可拮抗 DADLE 增加 ERK 磷酸化水平的作用。

综合上述研究提示,  $\delta$  阿片受体激活对  $H_2O_2$  损伤的心肌细胞具有保护作用, 其机制可能与其增强

心肌细胞的抗氧化功能及促进 ERK 磷酸化有关。  $\delta$  阿片受体激活后如何调控 ERK 信号传导途径尚不清楚, 有待进一步探讨。

### 4 参考文献:

- [1] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium [J]. *Circ Res*, 1996, **79** (5): 949 - 956.
- [2] Caffrey JL, Boluyt MO, Younes A, Barron BA, O'Neill L, Crow MT, et al. Aging, cardiac proenkephalin mRNA and enkephalin peptides in the Fisher 344 rat [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1994, **26** (6): 701 - 711.
- [3] Springhorn JP, Claycomb WC. Translation of heart preproenkephalin mRNA and secretion of enkephalin peptides from cultured cardiac myocytes [J]. *Am J Physiol*, 1992, **263** (5 Pt 2): H1560 - H1566.
- [4] Hayashi T, Tsao LI, Su TP. Antiapoptotic and cytotoxic properties of delta opioid peptide [*D*-Ala<sup>2</sup>, *D*-Leu<sup>5</sup>]enkephalin in PC12 cells [J]. *Synapse*, 2002, **43** (1): 86 - 94.
- [5] Zheng JN, Xie SL, Chen JC, Huang J. Comparison of three methods for measuring apoptosis by flow cytometry [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1999, **15** (10): 467 - 469.
- [6] Yu RA, He LF, Chen XM. Effects of cadmium on hepatocellular DNA damage, proto-oncogene expression and apoptosis in rats [J]. *Biomed Environ Sci* (生物医学与环境科学: 英文版), 2007, **20** (2): 146 - 153.
- [7] Van Laethem A, Nys K, Van Kelst S, Claerhout S, Ichijo H, Vandenneede JR, et al. Apoptosis signal regulating kinase-1 connects reactive oxygen species to p38 MAPK-induced mitochondrial apoptosis in UVB-irradiated human keratinocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, **41** (9): 1361 - 1371.
- [8] Zhang S, Sun Z, Liu L, Hasichaonu. Carvedilol attenuates CPB-induced apoptosis in dog heart: regulation of Fas/FasL and caspase-3 pathway [J]. *Chin Med J: Engl* (中华医学杂志: 英文版), 2003, **116** (5): 761 - 766.
- [9] Hu H, Luo ML, Du XL, Feng YB, Zhang Y, Shen XM, et al. Up-regulated manganese superoxide dismutase expression increases apoptosis resistance in human esophageal squamous cell carcinomas [J]. *Chin Med J: Engl* (中华医学杂志: 英文版), 2007, **120** (23): 2092 - 2098.
- [10] Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R. Linkage of G protein-coupled receptors to

- the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma [J]. *Science*, 1997, **275**(5298):394-397.
- [11] Ila R, Solem M. Chronic-alcohol exposure alters IGF1 signaling in H9c2 cells via changes in PKC delta [J]. *Alcohol*, 2006, **39**(3):169-178.
- [12] Burt AR, Carr IC, Mullaney I, Anderson NG, Milligan G. Agonist activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases following expression of the mouse delta opioid receptor in Rat-1 fibroblasts: effects of receptor expression levels and comparisons with G-protein activation[J]. *Biochem J*, 1996, **320**( Pt 1):227-235.
- [13] Lépiciér P, Bibeau-Poirier A, Lagneux C, Servant MJ, Lamontagne D. Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, **102**(2):155-166.
- [14] Liu YS, Guo JH. Correlation of cardiac AT<sub>1</sub> receptor and β<sub>1</sub> receptor with PKC/MAPKs signal transduction pathway in myocardial remodeling[J]. *Chin J Pract Intern Med*(中国实用内科杂志), 2003, **23**(8):462-464.

## Protection of δ-opioid receptor stimulation against injured myocardial cells by hydrogen peroxide

LI Jiong<sup>1\*</sup>, WANG Zhong-Yan<sup>2</sup>, YU Min<sup>3</sup>

(1. College of Health Management, 2. Information Center, 3. College of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China)

**Abstract: AIM** To study protective effect of [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]-enkephalin (DADLE) against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced myocardial cell injury and its possible mechanisms. **METHODS** Myocardial cells were isolated from neonatal rats and cultured for 48 h. Then the cells were randomly assigned into normal control, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μmol·L<sup>-1</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE (1 μmol·L<sup>-1</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE + naltrindole (10 μmol·L<sup>-1</sup>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE + U0126 (10 nmol·L<sup>-1</sup>) groups and cultured for another 48 h. [<sup>3</sup>H]TdR incorporation assay and flow cytometry were used to measure the cell proliferation and apoptosis rate. The lactate dehydrogenase (LDH) activities in culture supernatant measured by using LDH activity kit. The superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in cells were measured with xanthine oxidase method and color reaction of thiobarbituric acid, respectively. The expressions of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphorylated-ERK (p-ERK) were observed with Western blot. **RESULTS** ① Compared with normal control group, the incorporation of [<sup>3</sup>H]TdR in myocardial cells of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group

was significantly lower, apoptosis rate was higher, LDH activity and MDA content in cells were higher, while SOD activity in cells was lower. In addition, the ratio of A<sub>p-ERK</sub>/A<sub>ERK</sub> was decreased. ② Compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, the incorporation of [<sup>3</sup>H]TdR in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DADLE group was significantly higher, apoptosis rate was lower, LDH activity and MDA content in cells decreased, while SOD activity increased significantly. The ratio of A<sub>p-ERK</sub>/A<sub>ERK</sub> was increased. ③ δ-Opioid receptor antagonist naltrindole and ERK antagonist U0126 inhibited this effect of DADLE on the above index changes induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **CONCLUSION** The δ-opioid receptor has protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced myocardial cell injury, and its possible mechanism may be related to its promotion of antioxidant capacity and ERK phosphorylation.

**Key words:** receptors, opioid, δ; myocytes, cardiac; hydrogen, peroxides; extracellular signal-regulated MAP kinases; superoxide dismutase

\* Corresponding author.