

内皮衍生超级化因子对脑缺血损伤大鼠脑血管的影响

童晓琴¹, 周方杰¹, 蔡圣年¹, 陈 硕², 陈志武¹, 郭 岩¹

摘要 目的 探讨内皮衍生超极化因子(EDHF)对局灶性脑缺血再灌注(I/R)损伤大鼠大脑中动脉(MCA)的血管舒张作用以及对血管平滑肌细胞(VSMC)超极化反应的影响。方法 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血(MCAO)再灌注损伤模型,按照Longa法对实验动物进行神经功能缺陷评分;采用全自动酶标仪检测大鼠脑组织硫化氢(H₂S)含量的变化;取局灶性I/R损伤大鼠MCA,显微镜下测量MCA的血管直径;用微电极记录MCA的VSMC的膜电位;RT-PCR法测定I/R大鼠MCA内皮细胞胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)mRNA表达。结果 I/R大鼠脑组织中的H₂S含量较正常大鼠明显增加;在离体I/R大鼠MCA,用 3×10^{-5} mol/L的L-NAME(NO合酶抑制剂)和 1×10^{-5} mol/L的Indo(PGI₂合成酶抑制剂)预灌30 min后,乙酰胆碱(ACh)($10^{-7} \sim 10^{-4.5}$ mol/L)可显著舒张血管,即EDHF介导的舒张反应明显增强;I/R大鼠MCA平滑肌细胞膜电位检测实验中,L-NAME和Indo存在的条件下,ACh($10^{-7} \sim 10^{-4.5}$ mol/L)随着浓度增大,产生浓度依赖性的超极化作用,并且与正常大鼠MCA相比,超极化作用有明显的增强;I/R大鼠MCA内皮细胞中CSE mRNA表达上调。结论 EDHF明显增强I/R大鼠MCA的血管舒张反应和平滑肌细胞超极化反应,表明内源性EDHF(H₂S)对局灶性I/R损伤有保护作用。

关键词 内皮衍生超极化因子;硫化氢;局灶性脑缺血;大脑中动脉;血管舒张;超极化反应

中图分类号 R 965; R 962.1; R 743.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1233-05

内皮源性超极化因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF)是一种内皮源性的血管舒张因子,是除一氧化氮(nitric oxide, NO)和前列环素(prostacyclin, PGI₂)外的第3种舒张血管的自体活性物质。乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、缓激肽等可诱发多种血管内皮释放EDHF,引起血管非NO、非PGI₂舒张反应^[1]。研究^[2]表明,脑血管ED-

HF可能是H₂S,是半胱氨酸(L-Cysteine)在胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)催化作用下产生的,并且CSE在脑血管平滑肌细胞和内皮细胞中皆有表达。在大鼠大脑中动脉和脑基底动脉上,内源性H₂S对血管平滑肌细胞具有超极化作用和血管舒张作用,并且具有明显的内皮依赖性^[2],提示脑血管内皮可通过释放H₂S(EDHF)舒张脑血管。在脑缺血再灌注过程中,EDHF是否能起到缓解脑损伤的保护作用,以及与正常生理条件下的EDHF反应是否有差异,到目前为止还未证实。该实验从EDHF介导的局灶性脑缺血再灌注(ischemic/reperfusion, I/R)损伤大鼠MCA超极化和血管舒张反应入手,研究内源性EDHF对I/R损伤大鼠的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 左旋硝基精氨酸甲酯(N-nitro-L-arginine-methyl-ester, L-NAME)、吲哚美辛(indomethacin, Indo)、ACh等均购自美国Sigma公司;RT-PCR试剂盒产自大连宝生物工程有限公司;TRIzol RNA提取试剂购自美国Invitrogen公司;PCR-Marker购自加拿大Fermentas公司;CSE引物和 β -actin引物均由上海生工生物工程有限公司负责合成。

1.1.2 动物 SD大鼠,清洁级,雌雄各半,购自安徽医科大学实验动物中心,200~300 g,实验动物合格证号为scxk(皖)2011-002,实验室饲养温度在约25℃。

1.2 方法

1.2.1 大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型制备 MCAO模型根据Longa法^[3]制作。按照0.3 ml/100 g的剂量腹腔注射10%水合氯醛对大鼠进行麻醉,麻醉期间维持肛温在约37℃;将大鼠仰卧位固定,分离右侧颈总动脉和颈外动脉及颈内动脉,用动脉夹在已分离的右侧颈总动脉近心端阻断血流;位于远心端剪一小段切口,并于切口处缓慢插入直径为0.24 cm尼龙线;于颈内外动脉分叉处慢推入颈内动脉中,并插入深度约18.5 cm,此方法为线栓制作MCAO模型,并用手术线结扎和固定尼龙线;经过2 h缺血后,轻抽出尼

2015-03-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173596);安徽省自然科学基金(编号:1408085MH171)

作者单位:¹安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

²辽宁中医药大学杏林学院,沈阳 110167

作者简介:童晓琴,女,硕士研究生;

郭岩,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: guoyanxz@126.com

龙线,缝合好肌肉和皮肤,再灌注 22 h。模型制备成功的标志表现为大鼠苏醒后出现手术侧 Horner 征和对侧肢体运动障碍。

1.2.2 I/R 大鼠神经功能缺损评分 实验动物神经功能缺陷评判标准按照 Longa 法^[3],分别是 0 分(0 级):没有神经病学征象;1 分(I 级):提尾时病灶对侧,左前肢不能完全伸直;2 分(II 级):向瘫痪侧旋转;3 分(III 级):向病灶对侧倾倒;4 分(IV 级):无自发活动,意识丧失。成功模型是 I、II、III 级模型。

1.2.3 I/R 大鼠脑组织中 H₂S 的含测^[3] 将模型成功大鼠断头取脑,脑组织表面血液用预先配好的 PSS 缓冲液洗去;然后分离出右后脑皮质,用预冷的磷酸钾缓冲液制备匀浆,按照文献^[4]的方法步骤依次操作;最后选用 670 nm 的波长在全自动酶标仪上先测定 H₂S 标准液吸光度;再推算出待测溶液中 H₂S 含量,单位按 nmol/g 计算。PSS 配方如下:NaCl 119、NaHCO₃ 24、KCl 4.7、MgSO₄ 1.17、KH₂PO₄ 1.18、CaCl₂ 1.6、EDTA 0.026、glucose 5.5 (mmol/L) pH7.4。

1.2.4 I/R 大鼠 MCA 舒张反应的测定^[5] 取局灶性 I/R 造模成功大鼠 MCA 血管环,分离干净,制成 5 mm 长的血管环后将其置入血管灌流槽中;再将两个经过拉制的微量玻璃管套入 MCA 血管环的两端,用 10-0 尼龙线将血管环结扎固定在微量玻璃管上,并结扎血管分支防止渗漏。然后用通入 37 °C 含有 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体的 PSS 液,加压灌注血管环内腔。同时在血管灌流槽中通入含相同混合气体成分 37 °C 的 PSS 灌流,待血管环平衡 1 h,用 37 °C 的 PSS 液(含 3 × 10⁻⁵ mol/L L-NAME、1 × 10⁻⁵ mol/L Indo) 预灌流血管内腔 0.5 h;再用 30 mmol/L 的 KCl 溶液预收缩 MCA,待 MCA 稳定收缩,用含 ACh 的 PSS 液持续灌流血管;观察浓度梯度为 10⁻⁷ ~ 10^{-4.5} mol/L 的 ACh 对 MCA 的舒张作用,同样方法做正常组大鼠 MCA 血管环舒张作用,此外用不含 ACh 的 PSS 灌流 KCl 溶液预收缩 MCA 血管环,观察溶媒组血管环直径的变化。记录血管灌流槽中 MCA 的血管直径,通过血管的直径变化来研究所给药物的舒张或收缩血管作用。血管舒张率(%) = (D_x - D_{min}) / (D_{max} - D_{min}) × 100%。D_{max}:血管平衡 1 h 时的直径,D_{min}:加入收缩剂后血管收缩稳定时的直径,D_x:加入各浓度药物后的血管直径。

1.2.5 I/R 大鼠 MCA 平滑肌细胞超极化反应的测定^[4] 迅速取出局灶性 I/R 大鼠脑组织,在 4 °C 冰

浴 PSS 液中分离出 MCA;纵向剖开 MCA 血管环,并固定在底面铺有琼脂的 37 °C 水槽中;灌流通入 37 °C PSS 液(预先灌充 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体),待灌流 60 min,血管达到平衡;借助微操纵器将玻璃电极尖端(充以 3 mol/L KCl 溶液,电阻在 30 ~ 50 MΩ 范围内)推进血管表面,用步进式微电极推进器进一步穿刺细胞。获得的生物电信号经过相应放大器放大后,被传输到计算机信号采集分析系统,从而获得平滑肌细胞膜电位的值。待 MCA 血管环灌流平衡 30 min,用 37 °C PSS 液(含 3 × 10⁻⁵ mol/L L-NAME 及 1 × 10⁻⁵ mol/L Indo) 再灌流 30 min,测量浓度梯度为 10⁻⁷ ~ 10^{-4.5} mol/L ACh 对 I/R 大鼠 MCA 平滑肌细胞膜电位的改变。同样方法测量正常组大鼠 MCA 平滑肌细胞膜电位及不含 ACh 的溶媒组细胞膜电位的改变。

1.2.6 RT-PCR 方法测 I/R 大鼠 MCA 内皮细胞中 CSE mRNA 表达 分别取正常组和 I/R 大鼠 MCA,用免疫磁珠法分离获得内皮细胞^[6-7]。提取 MCA 内皮细胞总 RNA,在试管中配制如下反应混合液:总 RNA(计算出的体积)、dNTP Mixture(1 μl)、Oligo dT Primer(1 μl)、灭菌双蒸水(补至 10 μl)。混合液在 PCR 仪器上变性,反应条件:65 °C 5 min。随后 4 °C 冷却 3 000 r/min 离心 10 min。变性后的样本按照说明书步骤添加反应试剂,最后样本在 PCR 仪上按规定条件进行反转录反应。

配置 PCR 反应液,成分如下:上游引物 0.5 μl、下游引物 0.5 μl、DNA 聚合酶(5 U/μl) 0.5 μl、上述反转录反应液 5 μl、10 × PCR 缓冲液 5 μl、dNTPs (10 mmol/L) 2 μl、灭菌双蒸水添加至 50 μl。完成配置后按如下反应条件及步骤进行:94 °C 变性 0.5 min,50 °C/53 °C 退火 0.5 min,72 °C 延伸 45 s,循环 35 次。最后进行电泳,观察条带。RT-PCR 方法见文献^[8]。CSE 及 β-actin 上下游引物由上海生物工程公司合成。β-actin 引物序列为:上游:5'-CT-GTCCCTGTATGCCTCTG-3',下游:5'-ATGTCACG-CACGATTTCC-3',扩增片段大小 236 bp。CSE 引物序列为:上游:5'-CCACCACAACGATTACCCA-3',下游:5'-TCAGCACCCAGAGCCAAAG-3',扩增片段大小 334 bp^[6]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 I/R 大鼠脑神经功能缺损评分 结果表明,线

栓制法造局灶性 I/R 模型后,再灌注 22 h, I/R 大鼠神经功能缺陷评分高于正常组大鼠 (2.0 ± 0.6 vs 0.0 ± 0.0), 差异有统计学意义 ($t = 8.16, P < 0.01$)。

2.2 I/R 对大鼠脑组织中 H₂S 含量的影响 与正常组相比, I/R 大鼠脑组织中 H₂S 含量有显著提高, 差异有统计学意义 ($t = -4.54, P < 0.01$)。见图 1。

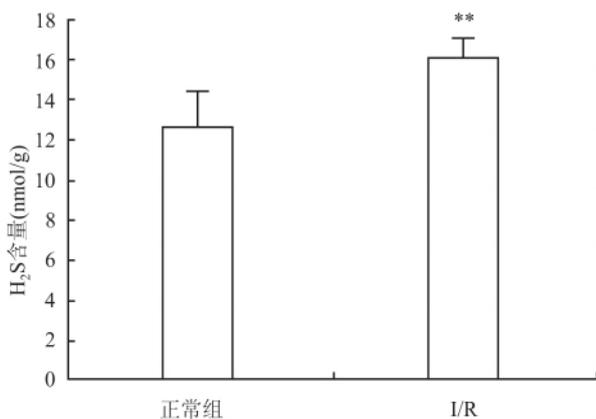


图1 I/R 对大鼠大脑组织中 H₂S 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) 与正常大鼠比较: ** $P < 0.01$

2.3 EDHF 对 I/R 大鼠 MCA 舒张反应的影响

ACh 可显著舒张用 L-NAME 和 Indo 预灌 30 min 后的局灶性 I/R 损伤大鼠 MCA 血管, I/R 组 EDHF 引起的扩血管作用与溶媒组比较, 差异有统计学意义 ($F = 115.8, P < 0.01$), 与正常组比较血管舒张率显著提升, 差异有统计意义 ($P < 0.05$), 结果显示 EDHF 能增强 I/R 大鼠 MCA 的舒张反应。见图 2。

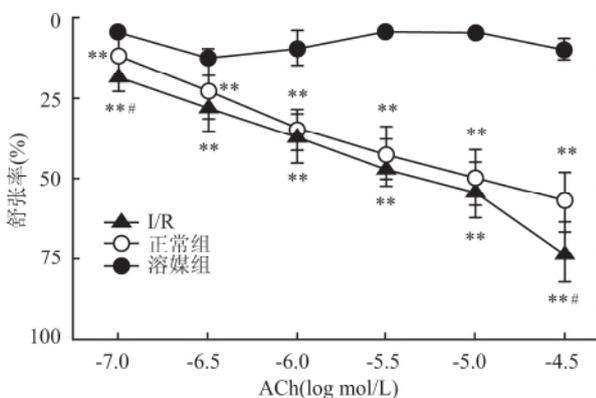


图2 EDHF 对 I/R 大鼠 MCA 舒张反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) 与溶媒组比较: ** $P < 0.01$; 与正常组比较: # $P < 0.05$

2.4 EDHF 对 I/R 大鼠 MCA 平滑肌细胞超极化反应的影响 用含 L-NAME 和 Indo 的 PSS 预灌流后, 测得溶媒 + L-NAME + Indo/正常组 MCA 的平

滑肌细胞静息电位是 (-43.8 ± 0.6) mV, ACh + L-NAME + Indo/I/R 组 MCA 平滑肌细胞膜电位绝对值随着 ACh 给药浓度在一定范围内的梯度加大而上升, 最大值可达 (-60.17 ± 3.9) mV, 即产生超极化作用, 与溶媒 + L-NAME + Indo /I/R 组相比差异有统计学意义 ($F = 106.7, P < 0.01$); 与 ACh + L-NAME + Indo/正常组比较可得, EDHF 引起 MCA 平滑肌细胞的超极化作用显著增强, 膜电位差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 3。

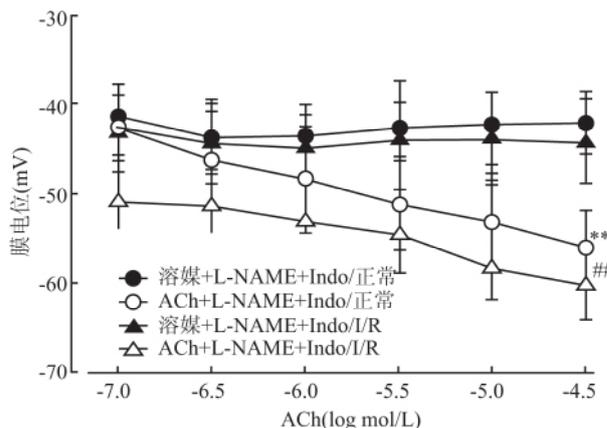


图3 ACh 诱导的正常大鼠和 I/R 大鼠 MCA 平滑肌细胞 EDHF 超极化作用 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

与溶媒 + L-NAME + Indo/I/R 组比较: ** $P < 0.01$; 与 ACh + L-NAME + Indo/正常组比较: ## $P < 0.01$

2.5 I/R 大鼠 MCA 内皮细胞中 CSE mRNA 表达的改变 与正常大鼠相比 I/R 大鼠 MCA 内皮细胞 CSE mRNA 条带明显增强。半定量结果显示, I/R 大鼠 MCA 内皮细胞 CSE mRNA 表达与正常大鼠相比有所增强, 差异有统计学差异 ($t = 16.09, P < 0.01$) 此差异趋势与结果 2.3 是一致的。见图 4。

3 讨论

EDHF 是一种内皮细胞合成释放, 引起血管平滑肌细胞超极化和血管舒张的非 NO 和非 PGI₂ 类物质。EDHF 的本质人们提出了很多意见, 如过氧化氢、花生四烯酸的细胞色素 P450 的代谢产物、内源性钾离子以及环氧化二十碳三稀酸等, 在外周血管中已被证明有 EDHF 样作用^[8-10], 但脑血管中 EDHF 作用与外周血管中 EDHF 反应有着较大的差异。研究^[10]表明 ACh 对大鼠脑血管诱导的非 NO、非 PGI₂ 介导的舒张可为 K⁺ 通道非选择性阻断剂四乙胺所抑制, 表明 ACh 可诱导大鼠脑血管产生 EDHF 介导的舒张。ACh 诱导的大鼠脑血管的 EDHF

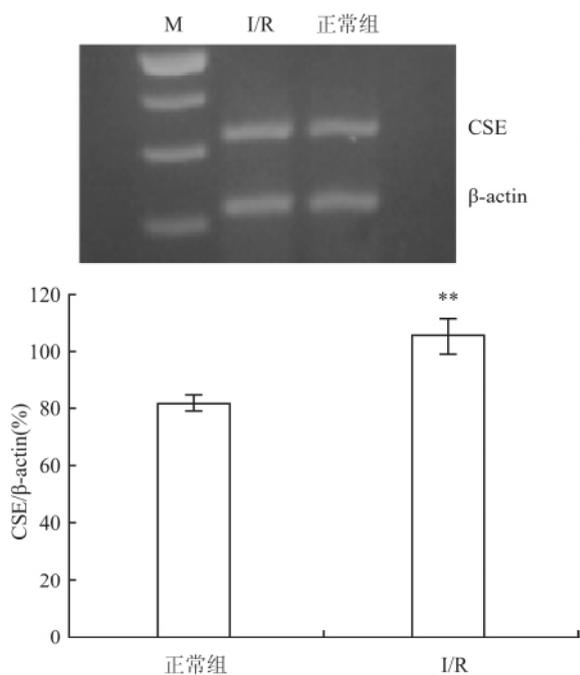


图4 RT-PCR法分别检测I/R、正常大鼠MCA内皮细胞CSE mRNA的表达($\bar{x} \pm s, n=12$)与正常组比较: ** $P < 0.01$

介导的舒张反应也可为内源性 H_2S 合成酶的抑制剂 PPG 所取消,并且发现外源性 H_2S 有直接舒张大鼠脑血管作用,明确了大鼠脑血管的 EDHF 是 H_2S 。既然 EDHF 有舒张脑血管作用,那么机体通过增加血管中 EDHF 合成或释放可以增加脑血流量,从而发挥抗脑缺血损伤作用。提示在体内能通过增加内源性 EDHF (H_2S) 的产生,促进 EDHF 血管舒张反应,发挥抗 I/R 损伤作用。

目前研究^[11] EDHF 对血管功能调节作用的影响,主要应用 L-NAME 和 Indo 排除 NO 和 PGI_2 的作用,观察血管活性物质诱导血管及平滑肌的反应。本实验在 I/R 大鼠离体的 MCA 上,用 3×10^{-5} mol/L 的 L-NAME 和 1×10^{-5} mol/L 的 Indo 预处理排除 NO 和 PGI_2 作用,发现 ACh 对局灶性 I/R 模型组大鼠 MCA 产生的血管舒张作用均较正常组明显增强,差异有统计学意义,表明 EDHF 促进了 I/R 脑血管的舒张。

EDHF 是通过对血管平滑肌细胞产生超极化作用,最终使血管松弛,并且其作用与钙激活性钾通道 (KCa) 开放相关。研究^[4]显示 ACh 介导的大鼠 MCA 平滑肌细胞非 NO、非 PGI_2 超极化作用可为 1×10^{-3} mol/L 四乙胺明显地抑制,符合 KCa 通道阻断剂阻滞 EDHF 反应的特点,表明 ACh 诱导的 EDHF 反应导致大鼠 MCA 平滑肌细胞超极化。本实验

在研究 EDHF 对 I/R 对大鼠 MCA 平滑肌细胞超极化反应的影响中,发现 ACh 在 $10^{-7} \sim 10^{-4.5}$ mol/L 范围内能明显使 I/R 大鼠 MCA 平滑肌细胞产生非 NO、非 PGI_2 超极化作用,即 EDHF 反应。并且与非 I/R 大鼠组比较,这种大鼠 MCA 平滑肌细胞超极化反应有明显的增强。

本实验研究结果显示,与正常组比较, I/R 大鼠脑组织 H_2S 含量显著增加,脑血管内皮细胞 CSE mRNA 表达明显增强。这表明 I/R 损伤促进脑血管内皮 H_2S 的合成,即促进 EDHF 的合成及释放,从而缓解 I/R 损伤。综上所述,本研究表明内源性 EDHF (H_2S) 对局灶性 I/R 损伤有保护作用。

参考文献

- [1] Berhane Y, Bailey S R, Putignano C, et al. Characterization of agonist-induced endothelium-dependent vasodilatory responses in the vascular bed of the equine digit [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2008, 31(1): 1-8.
- [2] Han J, Chen Z W, He G W. Acetylcholine-and sodium hydrosulfide-induced endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in cerebral vessels of global cerebral ischemia-reperfusion rat [J]. J Pharmacol Sci, 2013, 121(4): 318-26.
- [3] 周方杰, 陈志武. 硫化氢介导的大脑中动脉的舒张反应及其在脑缺血再灌注过程中的变化[D]. 中国硕士学位论文全文数据库, 2011.
- [4] 蔡圣年, 范一菲, 陈志武. H_2S 对大鼠大脑中动脉平滑肌细胞膜电位的超极化作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(2): 155-9.
- [5] 周方杰, 陈志武. 硫化氢介导的大脑中动脉的内皮源性超极化因子反应[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(8): 768-71.
- [6] 任彩丽, 李东亮, 赵红岗, 等. 全脑缺血-再灌注大鼠脑组织内源性硫化氢的动态变化[J]. 中国脑血管病杂志, 2008, 5(4): 177-81.
- [7] Ng V L, Alonso M, Bezerra J A. Hepatocyte transplantation. Advancing biology and treating children[J]. Clin Liver Dis, 2000, 4(4): 929-45.
- [8] Campbell W B, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses [J]. Pflugers Arch, 2010, 459(6): 881-95.
- [9] 曾靖, 刘丽华, 黄玉珊. H_2O_2 对 EDHF 介导的舒血管反应的影响[J]. 赣南医学院学报, 2008, 28(4): 474-6.
- [10] 蒋会慧, 胡东华, 陈志武. 非 NO、非 PGI_2 介导大鼠大脑中动脉舒张反应与硫化氢的关系[J]. 安徽医药, 2012, 16(10): 1406-8.
- [11] 焦传安, 宋标, 陈志武. 外源性血管内皮衍生超极化因子对脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(6): 648-53.

选择性 Bcl-2 抑制剂 ABT-199 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的放疗增敏作用

钱振珏¹, 牛 伶², 鲍扬漪², 刘 柳³, 童斯浩², 龚 理², 胡长路¹

摘要 目的 研究 ABT-199 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的放疗增敏作用,并探讨其作用机制。方法 取对数期生长的 MDA-MB-231 细胞分成对照组、药物组、照射组及联合组(照射+ABT-199)。四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测不同剂量单纯照射和 ABT-199 分别作用不同时间对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响并计算 20% 抑制浓度(IC₂₀);流式细胞术检测 ABT-199 对 MDA-MB-231 细胞周期和凋亡的影响;

Caspase 活性试剂盒检测细胞 Caspase-3 活性变化;Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Bcl-xl 的表达。结果 ABT-199 对 MDA-MB-231 细胞有增殖抑制作用且有时间和浓度依赖性,随着 ABT-199 浓度的升高,MDA-MB-231 细胞发生不同程度的 G₀/G₁ 期阻滞。联合组较照射组细胞凋亡率明显增高(16.9% vs 84.5%),Bcl-2 表达水平明显下调(P<0.05),Bcl-xl 变化不明显,同时 Bax 水平和胞内 Caspase-3 活性增高(P<0.05)。结论 选择性 Bcl-2 抑制剂 ABT-199 可有效抑制人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 增殖,诱导细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞及凋亡。IC₂₀ 浓度的 ABT-199 可明显提高 MDA-MB-231 细胞对放疗的敏感性。

关键词 MDA-MB-231; ABT-199; Bcl-2 抑制剂; 放疗; 协同效应

中图分类号 R 73-35

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1237-06

2015-06-03 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:12010402123)

作者单位:¹安徽医科大学附属省立医院肿瘤科,合肥 230001

²安徽医科大学第三附属医院肿瘤科,合肥 230061

³合肥市滨湖医院院士工作站,合肥 230061

作者简介:钱振珏,女,硕士研究生;

胡长路,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:13955116061@139.com

The effect of endothelium-derived hyperpolarizing factor on rat cerebral artery subjected to cerebral ischemia/reperfusion

Tong Xiaoqin, Zhou Fangjie, Cai Shengnian, et al

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the dilation and hyperpolarization induced by endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in middle cerebral artery of rats subjected to cerebral ischemia/reperfusion (I/R). **Methods**

The model of focal cerebral I/R injury in rat was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO). Hydrogen sulphide (H₂S) level in the cerebrum was detected, and the dilation and resting membrane potential of VSMC induced by EDHF in MCA subjected to cerebral I/R were observed. RT-PCR method was used to detect the expression of cystathionine-γ-lyase (CSE) mRNA in the endothelial cells of rat MCA. **Results** Compared with the control group, the contents of H₂S increased in the cerebrum of rat subjected to cerebral I/R. After 30 minutes perfusion with PSS containing L-NAME (3 × 10⁻⁵ mol/L) and Indo (1 × 10⁻⁵ mol/L), the relaxant effects of ACh (10⁻⁷ ~ 10^{-4.5} mol/L) on isolated rat MCAs subjected to cerebral I/R were more obvious by vasomotoricity experiment *in vitro*, namely, the vasodilatation induced by EDHF in cerebral I/R MCAs increased. In the presence of L-NAME (3 × 10⁻⁵ mol/L) and Indo (1 × 10⁻⁵ mol/L), ACh (10⁻⁷ ~ 10^{-4.5} mol/L) had stronger concentration dependent hyperpolarizing effect on the resting membrane potential of VSMC of cerebral I/R MCAs than the normal group. During cerebral I/R, the expression of CSE mRNA in rat MCAs endothelial cells was upregulated. **Conclusion** EDHF enhances dilation and hyperpolarization of VSMC in rat MCA subjected to cerebral I/R injury.

Key words endothelium-derived hyperpolarizing factor; H₂S; focal cerebral ischemia; MCA; vasodilation; hyperpolarization