

# 腺相关病毒感染 GDF11 对 2 型糖尿病大鼠血管损伤的保护作用

王玉琴<sup>1,2</sup>, 曹少清<sup>1,2</sup>, 王张羽<sup>1,2</sup>, 李成思<sup>1,2</sup>, 叶江平<sup>1,2</sup>, 宗刚军<sup>1,2,3</sup>

**摘要** 目的 探讨腺相关病毒感染上调体内生长和分化因子 11(GDF11)表达水平对 2 型糖尿病大鼠(T2DM)主动脉损伤的影响。方法 随机选取 9 周龄雄性 SD 大鼠,采用高糖高脂饲料加小剂量链脲佐菌素(STZ)联合诱导,建立 T2DM 模型。正常大鼠和糖尿病模型大鼠随机分为 5 组:空白对照组(Control 组)、阴性病毒对照组(NC 组)、GDF11 腺相关病毒组(GDF11 组)、糖尿病组(DM 组)、糖尿病 + GDF11 腺相关病毒组(DM + GDF11 组)。喂养 8 周后,检测大鼠血清中胰岛素(INS)、晚期糖基化终末产物(AGES)、重组生长转化因子 11(GDF11)、总胆固醇(T-CHO)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)、不对称二甲基精氨酸(ADMA)、丙二醛(MDA)浓度;采用过碘酸雪夫氏染色(PAS 染色)观察糖原沉积部位,苏木精-伊红染色(HE)观察血管损伤情况,扫描电镜观察血管内皮细胞和血管弹性纤维损伤情况,蛋白印迹和免疫组化检测血管损伤相关蛋白的表达水平。结果 在动物实验中与 Control 组相比,生化指标提示:DM 组大鼠血清中 AGES、T-CHO、TG、LDL-C 和 MDA 浓度升高( $P < 0.05$ ),INS、GDF11、HDL-C、ADMA 显著低于 Control 组( $P < 0.05$ ),DM + GDF11 组 AGES 和 HDL-C 与 DM 组无明显差异,T-CHO、TG、LDL-C 和 MDA 相比较 DM 组降低( $P < 0.05$ ),INS、GDF11 和 ADMA 相比较 DM 组升高( $P < 0.05$ )。病理染色提示:DM 组 PAS 染色提示糖原颗粒在主动脉内皮及内皮下沉积,HE 染色观察到主动脉中膜增厚,内皮细胞及弹性纤维断裂走行不规则,电镜观察到 DM 组血管内皮损伤,弹性纤维断裂,DM + GDF11 组这些变化有所减轻。蛋白印迹和免疫组化表示内皮细胞相关蛋白在 DM 组中表达下降( $P < 0.05$ ),间充质标志物在 DM 组中表达升高( $P < 0.05$ ),DM + GDF11 组中这些蛋白有所回调,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结

论 提高体内 GDF11 表达水平可以改善糖尿病导致的主动脉血管损伤,推断可能与其抑制内皮间充质转化保护血管内皮细胞的功能从而改善血管损伤有关。

**关键词** 糖尿病;腺相关病毒;重组生长转化因子 11;血管内皮细胞损伤;糖原沉积;链脲佐菌素

**中图分类号** R 543.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0826-08

**doi**:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.013

全国进行的多次糖尿病流行病学调查显示,老年( $\geq 60$ 岁)糖尿病患病率明显升高,2020 年全国老年糖尿病患者为 7 813 万,其中糖尿病前期患者占比 45%~47%,这类患者糖尿病知晓率、诊断率、治疗率较低,血糖控制水平低,常见因糖尿病并发症或缺血性心脑血管病就诊时确认糖尿病<sup>[1]</sup>。糖尿病最严重的后果之一是糖尿病血管病变的发展,其临床特征是缺血性心脏病、卒中、周围血管病变和微血管病变等<sup>[2]</sup>,中国糖尿病患者的主要死亡原因是心脑血管病。心脑血管疾病预防包括生活方式干预,控制高血压、高血脂、高血糖和高尿酸,抗血小板聚集治疗<sup>[1]</sup>,尽管目前有大量的药物干预措施,但糖尿病血管病变仍然是糖尿病死亡的主要原因,因此,迫切需要针对糖尿病导致的血管损伤寻找更理想干预方式。

生长和分化因子 11(the growth and differential factor 11,GDF11)是最近发现的转化生长因子  $\beta$  超家族的代表,在肌肉中表达较高,与脂质代谢、炎症过程和衰老有关<sup>[3]</sup>。有研究<sup>[4-6]</sup>表明 GDF11 同与年龄相关的心肌功能障碍等密切相关。该课题组对 GDF11 血管钙化方面研究取得了一些进展<sup>[7]</sup>,研究推断 GDF11 对糖尿病血管损伤有一定保护作用,通过建立大鼠糖尿病模型进行相关研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 50 只 4 周龄雄性 SD 大鼠,140~160 g,购自南京青龙山动物繁殖场。动物分笼饲

2024-01-19 接收

基金项目:江苏省卫生健康委科研项目(编号:ZD2021020);无锡市科技发展基金项目(编号:Y20212011)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学无锡临床学院心血管内科,无锡 214000

<sup>2</sup>安徽医科大学第五临床医学院心血管内科,合肥 230000

<sup>3</sup>中国人民解放军联勤保障部队第 904 医院心血管内科,无锡 214000

作者简介:王玉琴,女,硕士研究生;

宗刚军,男,博士,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:zonggj@163.com

养,自由摄食和饮水,室温控制在 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,湿度 $< 60\%$ ,光照时间为8:00—20:00。实验前禁食12 h,不禁水。动物实验均按照国家标准进行,且已获得动物伦理委员会批准(审批号:20240306)。

**1.1.2 仪器与试剂** 动物解剖器材、离心机、琼脂凝胶电泳系统、分光光度仪、病理包埋机及切片、大鼠源 r-GDF11 腺相关病毒(上海和元生物技术公司,克隆号:H28155);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(上海麦克林生化科技有限公司),GDF11、 $\beta$ -actin 抗体及其他相关抗体 A-SMA、N-cadherin、VE-cadherin 和 CD31(100  $\mu\text{l}$ ,上海艾博抗贸易有限公司);山羊抗小鼠 HRP 标记二抗、山羊抗兔 HRP 标记二抗(200  $\mu\text{l}$ ,杭州科联生物科技有限公司),生理盐水、无水乙醇、组织标本包埋盒(武汉伊艾博科技有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 模型制备** 4 周龄 SD 大鼠共 30 只,适应性饲养 1 周后,换成高糖高脂饲料(糖 10%,猪油 10%,蛋黄粉 5%,胆固醇 0.5%,料 74.5%)饲养 4 周,按照 60 mg/kg 的剂量一次性腹腔注射枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液稀释 STZ 构建 2 型糖尿病大鼠(type 2 diabetes mellitus, T2DM)大鼠模型,注射后尾静脉取血血糖仪测随机血糖,血糖连续 3 d 均超过 16.7 mmol/L 则视为造模成功。

**1.2.2 实验动物的分组** 将造模成功的大鼠随机分成 2 组,一组(DM 组)不作处理,一组(DM + GDF11 组)待血糖稳定后尾静脉注射 GDF11 腺相关病毒,另外未造模的大鼠,用普通饲料饲养,随机分为 3 组,Control 组不作任何处理,NC 组尾静脉注射空载腺相关病毒,GDF11 组尾静脉注射 GDF11 腺相关病毒。所有鼠每周测一次体质量和血糖值,直到 8 周后每组大鼠腹腔注射 10 ml/kg 剂量的水合氯醛麻醉,心脏采血获取大鼠血液。取血后备皮剖开腹腔胸腔,分离心脏、升主动脉至腹主动脉分叉处。

**1.2.3 大鼠血清成分的检测** 每只鼠心脏采血放入抗凝管中,3 000 r/min 离心 2 次 10 min/次,离心后取上清液按照顺序加入检测试剂盒中,采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清中 GDF11、胰岛素等分子的水平,具体步骤按试剂盒说明书进行。

**1.2.4 主动脉组织学形态观察** 取每组鼠主动脉,在生理盐水中去除附着的结缔组织、周围脂肪及管腔内的残余血液。用滤纸吸干后取主动脉弓部行横切,将切好的组织放入病理组织包埋盒,常规脱水、

包蜡。使用石蜡切片机将动脉蜡块切成 4  $\mu\text{m}$  薄片,毛笔蘸至温水中轻展,载玻片捞出,烘烤载玻片至石蜡溶解,依次进行 PAS 糖原染色和 HE 染色,具体操作步骤按照试剂盒说明进行,光学显微镜下观察各组动脉损伤程度。病理学检测步骤中蜡块切片、脱蜡、水化、抗原修复、阻断、封闭、洗涤孵育过夜,复染、脱水、透明封片(抗体稀释度分别为:GDF11, 1 : 50, A-SMA, 1 : 50, N-cadherin, 1 : 50, VE-cadherin, 1 : 50, CD31, 1 : 50, 标记二抗 1 : 50, 山羊抗小鼠 HRP 标记二抗 1 : 50)。光学显微镜 100 倍下观察目的蛋白的表达。

**1.2.5 大鼠主动脉电镜超微结构观察** 取每组鼠分离好的主动脉,将主动脉弓部横切,1 ~ 3 min 内取样,13 mm 薄,4  $^\circ\text{C}$  预冷电镜固定液内修整大小,避免细胞器损伤;取材时避免镊子挤压等机械损伤,组织取下后立即投入电镜固定液内,室温避光固定 2 h,4  $^\circ\text{C}$  保存。依次后固定、脱水、渗透、包埋、切片、染色、电镜下观察并拍照。

**1.2.6 蛋白印迹分析** 取每组鼠主动脉分别放入 EP 管中,在碎冰中使用眼科剪将组织剪成泥状,低温提取主动脉总蛋白,检测 GDF11 (一抗 1 : 1 000)、A-SMA (一抗 1 : 1 000)、N-cadherin (一抗 1 : 1 000)、VE-cadherin (一抗 1 : 1 000)、CD31 (一抗 1 : 1 000) 及内参蛋白  $\beta$ -actin (一抗 1 : 5 000)。于 80 V 恒压电泳 40 min 左右待 Marker 分开后,调至 120 V 恒压电泳至上样缓冲液脱落,350 mA 恒流转膜 90 min,5% BSA 封闭 2 h,孵育一抗 4  $^\circ\text{C}$  过夜, TBST 洗膜 5 min 3 次,二抗 (1 : 5 000) 室温摇床孵育 2 h,洗膜 5 min 3 次,滴加 ECL 曝光液进行显影,采用 Image J 软件分析条带灰度,以目的蛋白与  $\beta$ -actin 的比值表示相应蛋白表达水平。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计学分析,Shapiro-Wilk 检验( $n < 50$ )检验数据的正态性,符合正态分布的数据使用独立样本  $t$  检验,用  $\bar{x} \pm s$  表述,多组均数的比较用单因素方差分析,多组之间两两比较采用 SNK- $q$  检验的方法。所有统计均采用双尾检验, $P < 0.05$  时差异有统计学意义。大鼠 ELISA 实验分析软件为 ELISA 分析软件(ELISACalc V. 0. 1)和 Excel。

## 2 结果

**2.1 模型建立情况** 用 30 只大鼠进行糖尿病造模,造模成功共 22 只,成功率 73%。DM 组和 DM +

GDF11 组每组各 11 只,直到实验结束前 DM 组和 DM + GDF11 组各死亡 1 只鼠。

**2.2 一般观察** Control 组大鼠生长状态良好,活跃,毛发光顺,体质量稳定增加,DM 大鼠实验进程中逐渐出现毛色发黄蓬松,光泽度降低,少动,明显的多饮多食多尿,体质量增加缓慢。DM + GDF11 组的大鼠上述表现减轻。实验前 DM 组和 DM + GDF11 组体质量、血糖差异无统计学意义,DM 组和 DM + GDF11 组血糖显著高于 Control 组,自实验开始,DM 大鼠体质量逐渐增加,但增加速度小于 Control 组,一直持续到实验结束(鼠龄 18 月龄),平均体质量为 5 组中最低。DM + GDF11 组与 DM 组比较,体质量明显得到改善( $P < 0.05$ )。自实验开始后 DM + GDF11 组与 DM 组血糖一直处于 20 ~ 30 mmol/L 波动,两组之间差异无统计学意义。如图 1A 所示,Control 组、NC 组、GDF11 组大鼠体质量稳定上升,且三组差异不明显,DM 组体质量增加缓慢并在实验结束时为 5 组中最低,DM + GDF11 组体质量明显高于 DM 组。如图 1B 所示,DM 组和 DM + GDF11 组血糖一直维持在较高水平,且两组差异无统计学意义,其他 3 组血糖在正常范围内波动。

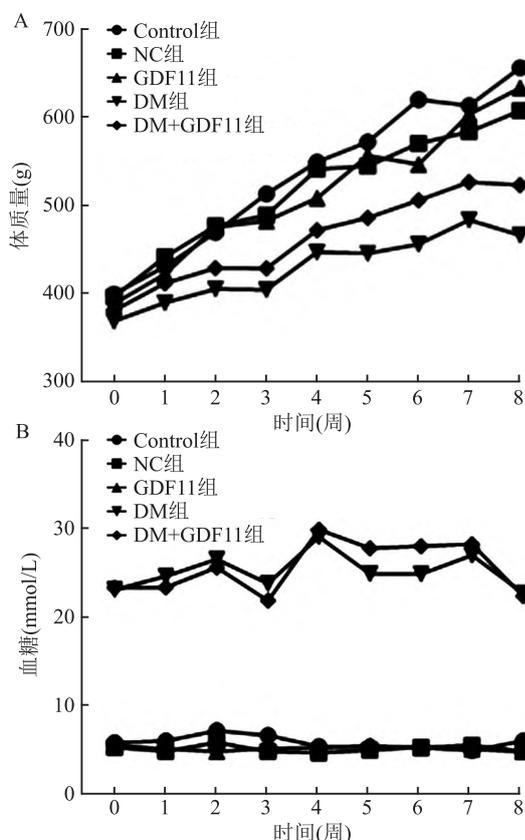


图 1 5 组大鼠实验开始后体质量及血糖变化情况

A:注射 GDF11 后各组大鼠体质量变化情况;B:注射 GDF11 后各组大鼠的血糖变化情况

**2.3 大鼠血清成分的检测** DM 组的 GDF11 的水平对比 Control 组明显下降( $P < 0.05$ ),DM + GDF11 组与 DM 组比较中,GDF11 的表达有所增加( $P < 0.05$ ),总胆固醇(total cholesterol, T-CHO)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)血清中的含量 DM 组相较于 Control 组明显升高( $P < 0.05$ ),在 DM + GDF11 组中的表达相较于 DM 组下降( $P < 0.05$ ),胰岛素(insulin, INS)和不对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)DM 组的表达水平显著低于 Control 组( $P < 0.05$ ),在 DM + GDF11 组中的表达相较于 DM 组升高( $P < 0.05$ ),晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGES)和高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL-C)血清含量在 DM 组与 Control 组中差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而在 DM + GDF11 组中的表达相较于 DM 组差异无统计学意义。见图 2。

**2.4 大鼠主动脉组织学形态观察**

**2.4.1 病理学检测** PAS 糖原染色:光镜下 DM 组主动脉内膜明显可以看到主动脉内皮及内皮下平滑肌中有糖原颗粒沉积,DM + GDF11 组糖原沉积明显减少,Control 组、对照病毒组和 GDF11 腺相关病毒组几乎看不到糖原颗粒。HE 染色:光镜下 Control 组主动脉内膜光滑,内皮细胞形态规则、排列整齐,中膜主要由同心排列的弹性纤维组成,无增厚;DM 组主动脉壁层次不清,内皮细胞损伤、突起、形态不规则、连续性中断,中膜明显增厚,平滑肌细胞增生。DM + GDF11 组内皮细胞损伤减轻,中膜增厚明显减轻,平滑肌细胞和弹性纤维排列较规则。见图 3。

**2.4.2 免疫组化检测** 免疫组化法检测到在 5 组鼠中 DM 组大鼠血管组织 GDF11 水平表达与 Control 组相比下降, GDF11 组表达升高,DM + GDF11 组表达介于 DM 组 GDF11 组之间,内皮标志蛋白 VE-cadherin 和 CD31 在 DM 组中表达较 Control 组明显下降,间充质标志物 A-SMA 和 N-cadherin 在 DM 组中表达较 Control 组明显升高, DM + GDF11 组经过上调 GDF11 水平使这些蛋白表达有所回调。见图 4。

**2.5 大鼠主动脉电镜超微结构观察** 电镜下空白对照组、对照病毒组和 GDF11 腺相关病毒组主动脉内皮细胞形态正常,弹性纤维表面光滑,走行规整,形态正常。DM 组内皮细胞损伤,细胞皱缩变小,

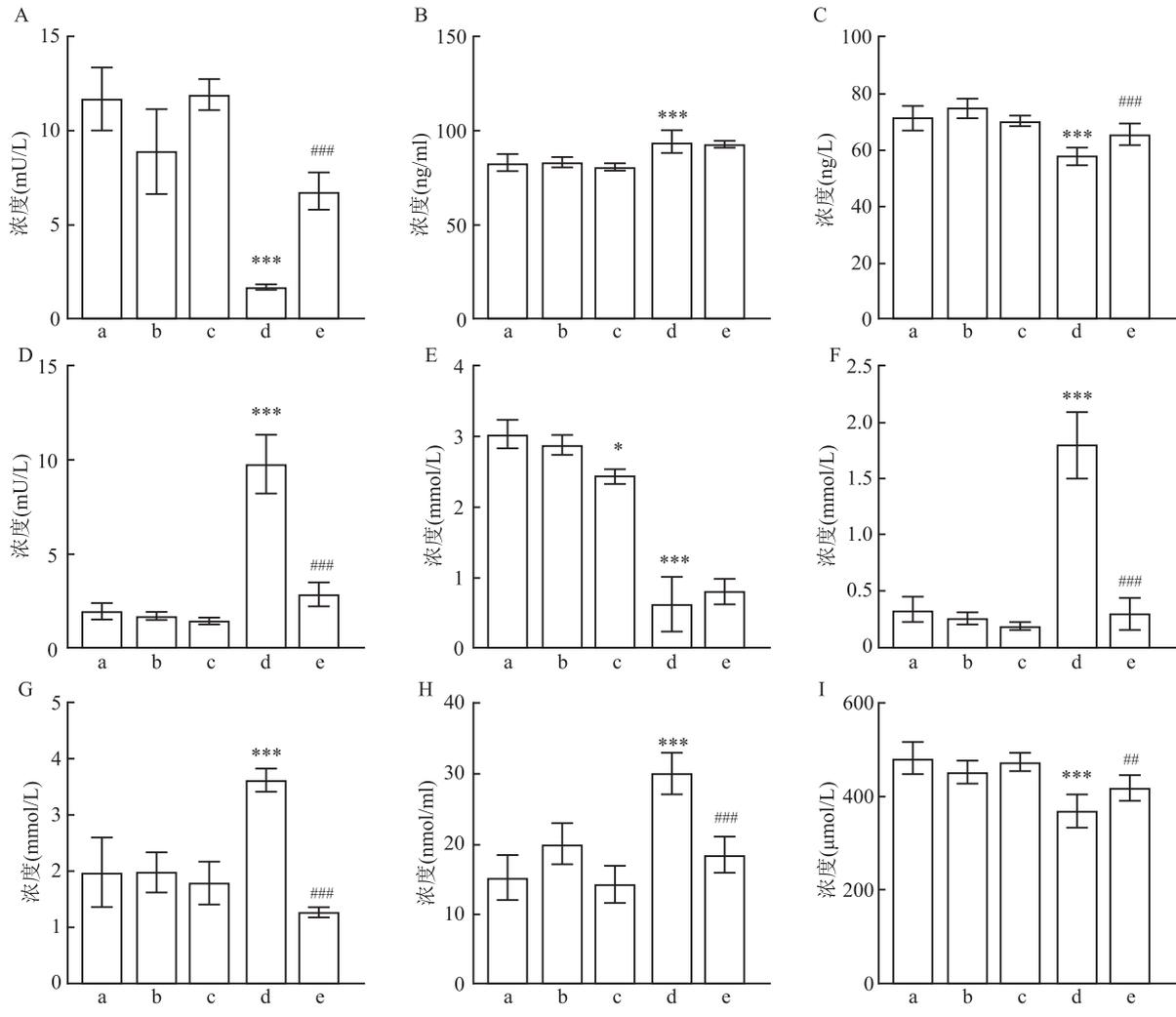


图2 5组大鼠血清中各成分的含量

A-I: 血清指标 INS、AGES、GDF11、T-CHO、HDL-C、LDL-C、TG、MDA 和 ADMA; a-e: Control 组、NC 组、GDF11 组、DM 组和 DM+GDF11 组;与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ ;与 DM 组比较: #  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$

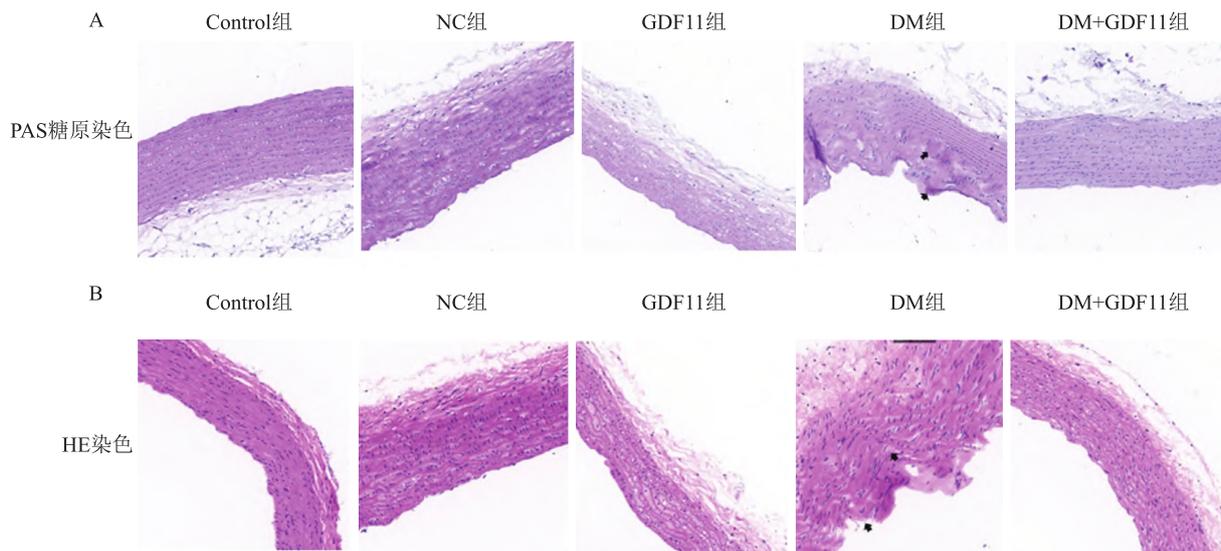


图3 5组大鼠主动脉切片 ×100

A: PAS 糖原染色;黑色箭头: PAS 糖原染色中在组织中沉积的糖原显示出紫红色深染,胞质中显示紫色颗粒为阳性;B: HE 染色;黑色箭头: 主动脉中不规则排列且连续性中断的内皮细胞和弹性纤维

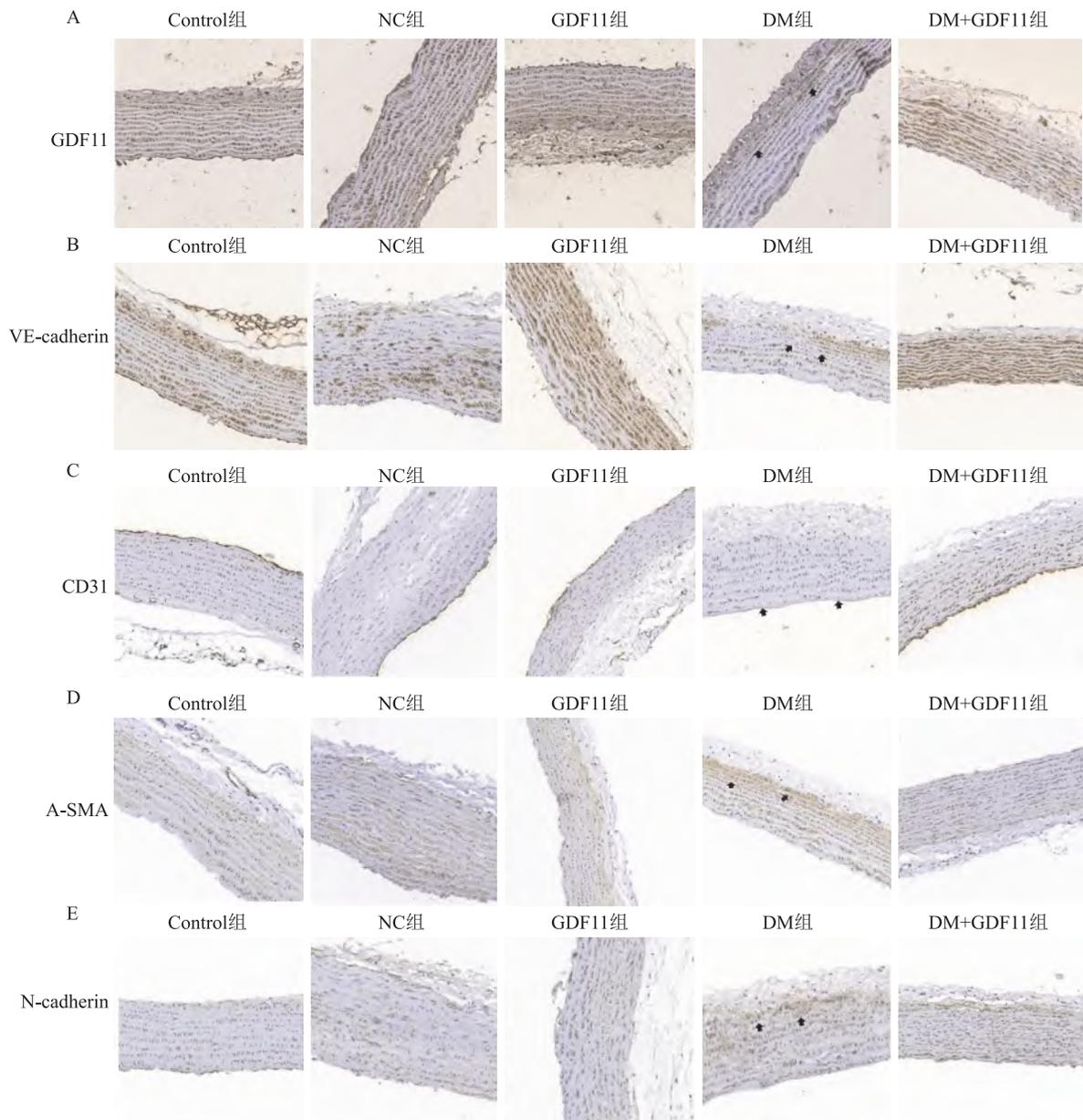


图4 5组大鼠免疫组化结果 ×100

A:5组大鼠 GDF11 免疫组化结果,黑色箭头处可见血管中层部位的棕色阳性反应较少;B:5组大鼠 VE-cadherin 免疫组化结果,箭头处可见血管中层部位的棕色阳性反应较少;C:5组大鼠 CD31 免疫组化结果,箭头处可见内皮细胞部位的棕色阳性反应较少甚至消失;D:5组大鼠 A-SMA 免疫组化结果, A-SMA 标志物存在于间充质中,箭头处可见主动脉中膜区域有大范围阳性反应;E:5组大鼠 N-cadherin 免疫组化结果,箭头处可见棕色深染的区域范围为阳性反应

可见大量虫蚀结构;弹性纤维走形不规则,连续性中断,表面粗糙。DM + GDF11 组内皮结构正常,弹性纤维与 DM 组相比有所改善,弹性纤维完整。见图 5。

**2.6 内皮细胞损伤相关蛋白表达** 为验证血管损伤相关蛋白在主动脉组织的表达,应用 Western blot 方法检测其中差异蛋白如 GDF11、A-SMA、N-cadherin、VE-cadherin 和 CD31 在各组大鼠主动脉组织中的表达。结果显示,感染 GDF11 的大鼠体内

GDF11 的水平较 Control 组明显升高,在糖尿病鼠体内感染 GDF11 后,GDF11 水平相较于 DM 组有明显升高 ( $P < 0.05$ ),与 Control 组大鼠比较, A-SMA 和 N-cadherin 在 DM 大鼠中表达明显增高 ( $P < 0.05$ ),应用腺相关病毒上调 GDF11 水平后,表达增高的蛋白有所下调 ( $P < 0.05$ )。另外,VE-cadherin 和 CD31 在 DM 大鼠中表达中与正常对照组比较表达后明显降低 ( $P < 0.05$ ),经过上调 GDF11 水平后该蛋白表达回调 ( $P < 0.05$ )。见图 6 ~ 8。

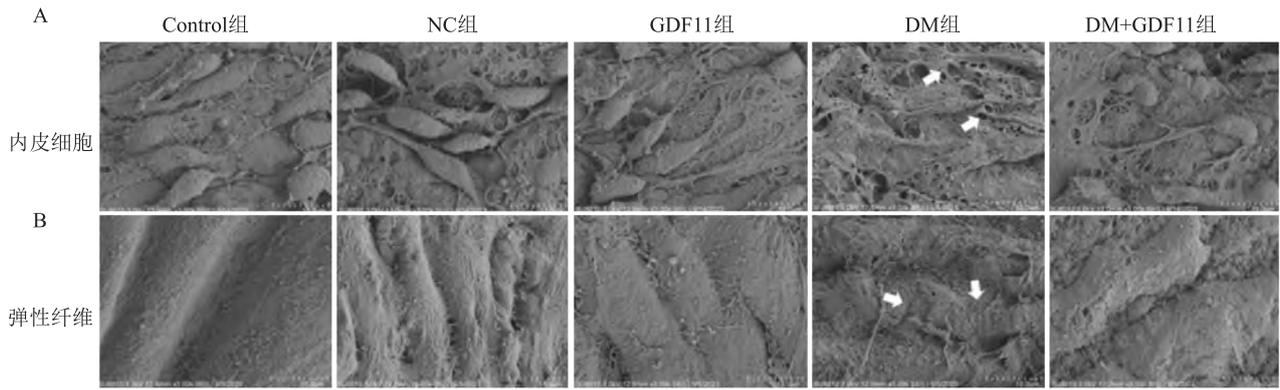


图5 5组大鼠主动脉内皮细胞和弹性纤维电镜扫描图

A:5组大鼠主动脉内皮细胞电镜扫描图;B:5组大鼠主动脉弹性纤维电镜扫描图;scale bar = 10 μm

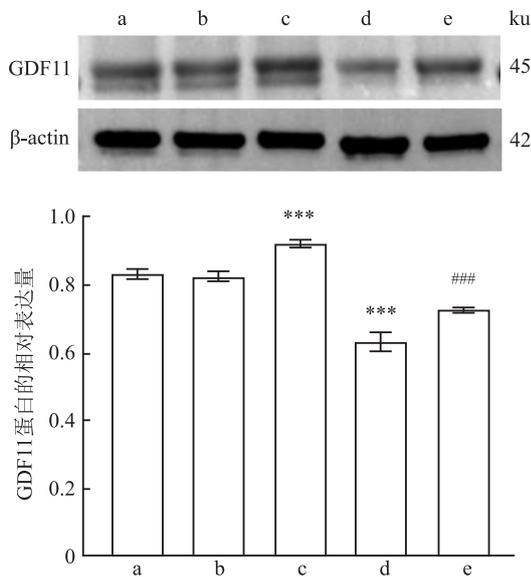


图6 5组大鼠主动脉 GDF11 蛋白相对表达量

a - e: Control 组、NC 组、GDF11 组、DM 组和 DM + GDF11 组蛋白的相对表达量;与 Control 组比较:\*\*\*  $P < 0.001$ ;与 DM 组比较:###  $P < 0.001$

### 3 讨论

糖尿病血管病影响着全球数亿患者,糖尿病可导致早亡,在中国心脑血管疾病、恶性肿瘤、肺部感染、肾功能衰竭是糖尿病几大主要死亡原因,患者可导致失明、残疾、智能障碍等多种并发症,生活质量大大下降,糖尿病的血管损伤危害更大,合并有糖代谢紊乱、高血压、腹型肥胖、高胆固醇血症的患者心脑血管死亡风险增加3倍。该研究表明腺相关病毒感染 GDF11 可以抑制血管内皮细胞向间充质转化,保护内皮细胞发生损伤,进而抑制内皮功能障碍引起的血管损伤。

STZ 被广泛用于诱导各种动物的糖尿病<sup>[8]</sup>,该研究采用课题组以往实验中常用 SD 大鼠的 2 型糖尿病的诱导方法并成功使大鼠血糖稳定升高。利用 GDF11 腺相关病毒感染 GDF11 并成功在大鼠血清和组织中发现 GDF11 表达增加,并且差异有统计学

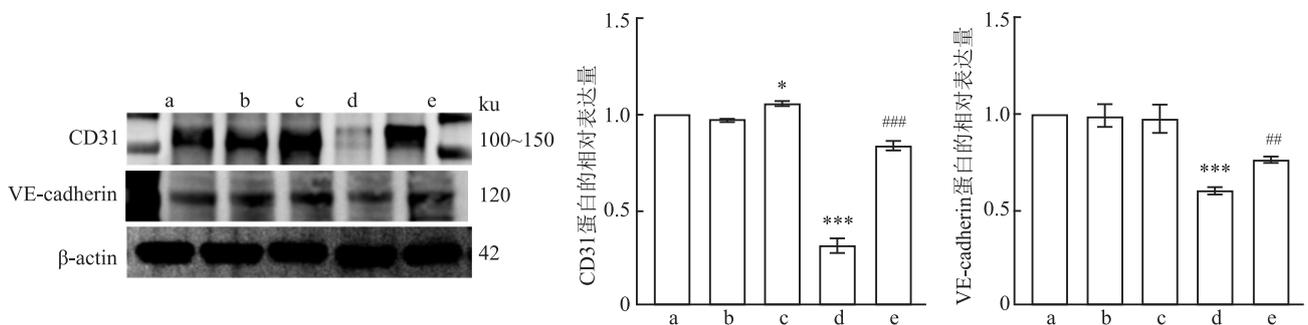


图7 5组大鼠主动脉内皮细胞标志物蛋白相对表达量

a - e: Control 组、NC 组、GDF11 组、DM 组和 DM + GDF11 组蛋白相对表达量;与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与 DM 组比较:##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$

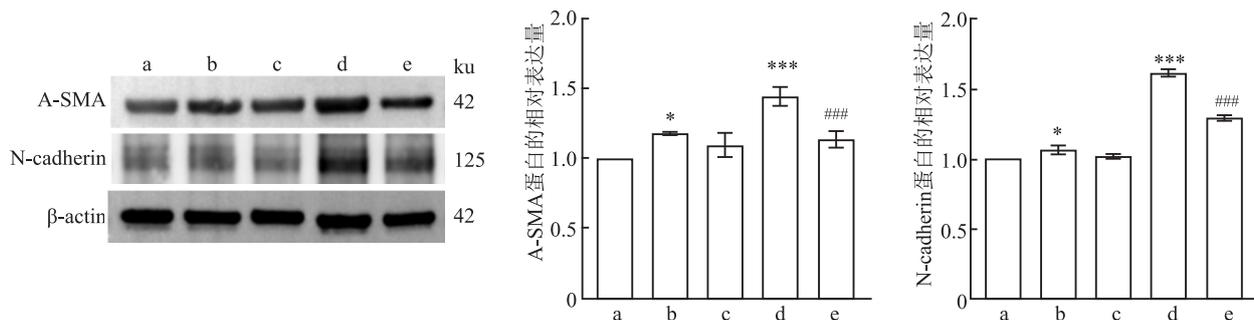


图8 5组大鼠主动脉间充质蛋白相对表达量

a - e: Control 组、NC 组、GDF11 组、DM 组和 DM + GDF11 组蛋白相对表达量;与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与 DM 组比较: ###  $P < 0.001$

意义,说明感染成功。感染成功后,没有引起血糖发生改变(组间差异  $P > 0.05$ ),故排除 GDF11 对血糖的影响导致体质量发生变化以及后续实验过程中的差异。

从前三组的实验结果可以看到,无论是空载腺相关病毒还是增加体内 GDF11 表达的腺相关病毒都没有使大鼠的一般情况、血清成分以及主动脉发生较为明显的变化(组间差异  $P > 0.05$ ),因此,该实验可以排除空载腺相关病毒对大鼠的影响并得出结论:单纯提高健康大鼠体内 GDF11 的表达不会引起大鼠血清成分变化和主动脉病变。从糖尿病造模组看, GDF11 感染后的大鼠内皮细胞和弹性纤维的损伤都得到了改善,胆固醇、三酰甘油和低密度脂蛋白的水平有所下降( $P < 0.05$ ),在蛋白表达上,内皮标志物以及间充质标志物的表达都有所改善( $P < 0.05$ )。该研究表明腺相关病毒感染给 GDF11 可以干扰早期糖尿病血管损伤,并可以为糖尿病的血管损伤提供持续的保护作用。

该研究表明糖尿病导致血管损伤,可能建立在糖代谢紊乱导致血管的内皮细胞以及弹性纤维的病变上,有研究<sup>[9]</sup>表明糖代谢紊乱会损害内皮细胞的功能,这与该研究结果一致,有研究表明糖代谢紊乱同时也会干扰内皮细胞和周细胞之间的交流。但是内皮细胞和(或)周细胞的功能障碍如何导致糖尿病血管病变在很大程度上仍然未知。该研究在蛋白水平上表明,血管内皮细胞发生了去分化,间充质标志物升高,推断内皮细胞可能发生了内皮间充质转化。由于电镜图片显示,该研究推测血管的损伤起源于血管内皮细胞的损伤导致其保护血管的能力下降,从而引起内皮下组织尤其是弹性纤维发生病理变化,最终导致血管发生粥样硬化等,这为糖尿病性心血管疾病的进程提供了有力的证据。

GDF11 目前在衰老、心血管等领域已经有多项研究,在心血管领域主要涉及到对干细胞新生血管生成方面的研究,但是没有涉及到糖尿病导致血管损伤相关的动物及细胞实验,该实验探究了通过提高体内 GDF11 表达对糖尿病导致血管损伤的作用,验证了 GDF11 可以通过腺相关病毒在大鼠血清中稳定表达,并在高糖的持续刺激下通过保护血管内皮细胞,减少内皮细胞向间充质转化,保护内皮下组织免受损伤,最终达到保护血管损伤的目的,为预防和治疗糖尿病导致血管损伤提供了一个新的研究方向。由于该实验仅探究了 GDF11 在糖尿病导致血管损伤相关疾病方面的体内实验,在相关的体外实验及分子机制领域未曾涉及,因此,如果想把 GDF11 作为预防和治疗的的手段还需要更进一步的分子机制的研究。

参考文献

[1] 中国老年2型糖尿病防治临床指南(2022年版)[J]. 中国糖尿病杂志,2022,30(1):2-51.  
 [2] Chen A, Wang H, Su Y, et al. Exosomes: Biomarkers and therapeutic targets of diabetic vascular complications[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 720466.  
 [3] Król W, Machelak W, Zielińska M. GDF11 as a friend or an enemy in the cancer biology? [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(5): 188944.  
 [4] Sinha M, Jang Y C, Oh J, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle[J]. Science, 2014, 344(6184): 649-52.  
 [5] McNally e M. Questions and answers about myostatin, GDF11, and the aging heart[J]. Circ Res, 2016, 118(1): 6-8.  
 [6] Piantadosi P T, Holmes A. GDF11 reverses mood and memory declines in aging[J]. Nat Aging, 2023, 3(2): 148-50.  
 [7] Sheng Y, Zhang C, Liu Y, et al. GDF11 is a novel protective factor against vascular calcification [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2022, 80(6): 852-60.

- [8] Goyal S N, Reddy N M, Patil K R, et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes-A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics[J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 244: 49 - 63.
- [9] Wimmer R A, Leopoldi A, Aichinger M, et al. Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy[J]. *Nature*, 2019, 565(7740): 505 - 10.

## Protective effect of *adeno-associated virus* sense transfection of GDF11 on vascular injury in type 2 diabetic rats

Wang Yuqin<sup>1,2</sup>, Cao Shaoqing<sup>1,2</sup>, Wang Zhangyu<sup>1,2</sup>, Li Chengsi<sup>1,2</sup>, Ye Jiangping<sup>1,2</sup>, Zong Gangjun<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Dept of Cardiovascular Medicine, Wuxi Clinical College, Anhui Medical University, Wuxi 214000;*

<sup>2</sup>*Dept of Cardiovascular Medicine, The Fifth Clinical College, Anhui Medical University, Hefei 230000;*

<sup>3</sup>*Dept of Cardiovascular Medicine, The 904 Hospital of The PLA Joint Logistic Support Force, Wuxi 214000)*

**Abstract Objective** To explore the effect of *adeno-associated virus* sense transfection up-regulating the expression level of the growth and differential factor 11 (GDF11) *in vivo* on aortic injury in type 2 diabetic mellitus rats (T2DM). **Methods** Nine-week-old male SD rats were randomly selected to establish a T2DM model by using high-sugar and high-fat chow plus small-dose streptozotocin (STZ) combined induction. Both normal rats and diabetic model rats were randomly divided into five groups: blank control group (Control group), negative virus control group (NC group), GDF11 *adeno-associated virus* group (GDF11 group), diabetic group (DM group), and diabetic + GDF11 *adeno-associated virus* group (DM + GDF11 group). After 8 weeks of feeding, the serum concentrations of insulin (INS), advanced glycosylation end products (AGES), recombinant growth transforming factor 11 (GDF11), total cholesterol (T-CHO), triglycerides (TG), low-density lipoproteins (LDL-C), high-density lipoproteins (HDL-C), asymmetric dimethylarginine (ADMA), and malondialdehyde (MDA) were assayed in the rats; periodic acid-schiff stain (PAS stain) was used to observe the sites of glycogen deposition, and hematoxylin-eosin staining (HE) was used to observe vascular damage. Scanning electron microscopy was used to observe the damage of vascular endothelial cells and vascular elastic fibers, and protein blotting and immunohistochemistry were used to detect the expression levels of vascular injury-related proteins. Protein blotting and immunohistochemistry were used to detect the expression levels of vascular injury-related proteins. **Results** The biochemical indexes showed that the serum concentrations of AGES, T-CHO, TG, LDL-C and MDA were higher in the DM group than those in the Control group ( $P < 0.05$ ), the concentrations of INS, GDF11, HDL-C and ADMA were significantly lower than those in the Control group ( $P < 0.05$ ), and the concentrations of AGES and HDL-C were not significantly lower in the DM + GDF11 group compared with the DM group ( $P < 0.05$ ). HDL-C was not significantly different from the DM group, and several other data were improved ( $P < 0.05$ ). Pathological staining suggested that PAS staining in the DM group suggested that glycogen particles deposited in the endothelium and subendothelium of the aorta, HE staining observed thickening of the aortic mesentery, endothelial cells and elastic fibers broke off in an irregular alignment, and electron microscopy observed endothelial damage in the vasculature and elastic fibers broke off in the DM group, and these changes attenuated in the DM + GDF11 group. Protein blotting and immunohistochemistry indicated that the expression of endothelial cell-associated proteins decreased in the DM group ( $P < 0.05$ ), and mesenchymal markers elevated in the DM group ( $P < 0.05$ ), these proteins were regressed in the DM + GDF11 group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Increasing the expression level of GDF11 *in vivo* can improve aortic vascular injury caused by diabetes mellitus, which is inferred that it may be related to the inhibition of endothelial mesenchymal transition to protect the function of vascular endothelial cells and thus improve vascular injury.

**Key words** diabetes mellitus; *adeno-associated virus*; recombinant growth transforming factor 11; vascular endothelial cell injury; glycogen deposition; streptozotocin