

## 基础研究

## · 论著 ·

GDF11 对 ApoE<sup>-/-</sup> 糖尿病小鼠内皮依赖性血管舒张功能的作用

梅稳 向光大 卢俊颜 李欢 向林 董靖

**【摘要】 目的** 研究生长分化因子 11 (GDF11) 对载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE<sup>-/-</sup>) 糖尿病小鼠胸主动脉内皮依赖性血管舒张功能的影响, 探讨其可能的机制。**方法** 40 只 4 周龄健康雄性 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠按随机数字法选择 10 只作为正常对照组 (NC 组), 以正常饲料喂养, 其余 30 只以高脂饲料喂养 4 周后, 连续 5 d 腹腔注射链脲佐菌素 (50 mg/kg) 制备 2 型糖尿病模型。将造模成功小鼠共 20 只按随机数字法分为 GDF11 组 (0.1 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 腹腔注射,  $n=10$ ) 和糖尿病对照组 (T2DM 组, 等量磷酸盐缓冲液腹腔注射,  $n=10$ )。干预 4 周后, 检测各组空腹血糖、空腹胰岛素、HbA1c、GDF11 浓度, 并计算稳态模型评估-胰岛素敏感性指数 (HOMA-ISI); 测定各组小鼠离体胸主动脉条的张力反应及主动脉一氧化氮含量, Western 印迹检测主动脉内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、磷酸化 eNOS (P-eNOS)、Smad2/3、磷酸化 Smad2/3 (P-Smad2/3) 水平。**结果** 与 NC 组相比, T2DM 组空腹血糖、空腹胰岛素、HbA1c 水平升高, GDF11 浓度及 HOMA-ISI 降低, 乙酰胆碱引起的内皮依赖性舒张反应降低; 与 T2DM 组相比, GDF11 组上述指标均有改善 ( $F=70.923 \sim 675.430$ ,  $P$  均  $<0.01$ )。而硝普钠诱导的内皮非依赖性舒张反应各组间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与 NC 组相比, T2DM 组血管中一氧化氮含量、P-eNOS 水平、磷酸化 Smad2/3 水平下降, GDF11 组上述指标均有显著升高 ( $F=40.120 \sim 148.060$ ,  $P$  均  $<0.01$ )。**结论** GDF11 通过促进一氧化氮生成, 激活 Smad2/3 信号通路, 改善 ApoE<sup>-/-</sup> 糖尿病小鼠内皮依赖性血管舒张功能。

**【关键词】** 生长分化因子 11; 2 型糖尿病; 内皮依赖性血管舒张; 一氧化氮

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81370896)

Effects of GDF11 on endothelium-dependent vasodilation function of aorta in ApoE<sup>-/-</sup> diabetic mice

Mei Wen\*, Xiang Guangda, Lu Junyan, Li Huan, Xiang Lin, Dong Jing. \*Wuhan Clinical Institute Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: Xiang Guangda, Email: Guangda64@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of growth differentiation factor 11 (GDF11) on endothelium-dependent vasodilation function of aorta in apolipoprotein E-Null (ApoE<sup>-/-</sup>) diabetic mice and to investigate the mechanisms. **Methods** Ten of the 40 healthy male ApoE<sup>-/-</sup> mice at 4-week age were selected as normal control group according to random number method and received basic diet, whereas the other 30 mice were fed with high-fat diet for 4 weeks and then treated with streptozotocin intraperitoneal injection (50 mg/kg) for 5 days to induce type 2 diabetes mellitus (T2DM). Diabetes was successfully induced in twenty mice which were then randomly divided into GDF11 group (0.1 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> intraperitoneal injection,  $n=10$ ) and T2DM control group (T2DM group, equivalent phosphate buffered saline,  $n=10$ ) according to random number method. After 4 weeks of intervention, fasting plasma glucose, fasting plasma insulin, HbA1c and serum GDF11 were measured respectively. Homeostasis model assessment-insulin sensitive index (HOMA-ISI) was calculated. The relaxation response and nitric oxide levels were detected in isolated aorta of mice. Acetylcholine (ACh)-induced endothelium-dependent vasodilation and sodium nitropruside (SNP)-induced endothelium-independent vasodilation were measured in aortas for estimating endothelial function. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS), phosphorylated eNOS (P-eNOS) and Smad2/3, phosphorylated Smad2/3 (P-Smad2/3) were measured by Western blotting in isolated aorta of mice. **Results** Compared with NC group, fasting plasma glucose, fasting plasma insulin, and HbA1c were signifi-

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2016.02.007

作者单位: 510515 广州, 南方医科大学附属武汉临床学院 (梅稳, 向光大, 卢俊颜, 李欢); 430070 武汉, 广州军区武汉总医院内分泌科 (向光大, 向林, 董靖)

通信作者: 向光大, Email: Guangda64@hotmail.com

cantly increased, meanwhile HOMA-ISI, serum GDF11 concentration and Ach-dependent relaxation response were significantly reduced in T2DM group; compared with T2DM group, all markers mentioned above were improved in GDF11 group ( $F = 70.923-675.430$ , all  $P < 0.01$ ); whereas the SNP-independent relaxation were not different among three groups ( $P > 0.05$ ). Compared with NC group, nitric oxide, P-eNOS, P-Smad2/3 were significantly decreased in T2DM group, but indexes mentioned above were all increased in GDF11 group ( $F = 40.120-148.060$ , all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** GDF11 improves endothelium-dependent vasodilation function in ApoE<sup>-/-</sup> diabetic mice by enhancing nitric oxide synthesis and Smad2/3 signaling pathways.

**【Key words】** Growth differentiation factor 11; Type 2 diabetes mellitus; Endothelium-dependent vasodilation; Nitric oxide

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81370896)

2 型糖尿病 (T2DM) 与动脉粥样硬化 (AS) 关系密切, 表现在患者出现 AS 的时间早、程度重、预后差。糖尿病能引起内皮功能紊乱, 而内皮依赖性舒张功能紊乱是发生 AS 的一个早期标志, 也是糖尿病多种血管并发症的病理基础<sup>[1]</sup>。生长分化因子 11 (GDF11), 又名骨形态发生蛋白 11, 属于转化生长因子- $\beta$  超家族成员之一。GDF11 是一种在早期胚胎发育过程中起重要作用的蛋白, 对多种器官发育起调控作用<sup>[2-4]</sup>。最近的研究发现, GDF11 可以恢复衰老小鼠的神经干细胞再生和分化潜能, 增加老年小鼠脑血管腔体积和血流量, 这种作用是通过直接促进内皮细胞增殖实现的<sup>[5]</sup>。本研究使用高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素 (STZ) 腹腔注射诱导 T2DM 小鼠模型, 并用 GDF11 进行干预, 观察其对小鼠血管内皮依赖性舒张功能、一氧化氮浓度的影响, 探讨 GDF11 的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料与试剂** 高脂饲料购于北京华阜康公司。重组人 GDF11 (Pepro Tech 公司)、STZ 及去甲肾上腺素 (Sigma 公司)、血糖仪及试纸 (强生公司)、胰岛素放射免疫检测试剂盒、HbA1c、GDF11 ELISA 检测试剂盒 (伊莱瑞特生物科技有限公司)、一氧化氮检测试剂盒 (南京凯基)、氯化乙酰胆碱 (上海阿拉丁公司)、一抗 [单克隆兔抗人内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、磷酸化 eNOS (P-eNOS)、Smad2/3、磷酸化 Smad2/3 (P-Smad2/3) 抗体]、二抗 [单克隆山羊抗兔抗体 (辣根过氧化物酶标记), 美国 CST 公司]、BL-420S 生物信号采集系统、JH-2 型张力换能器及 HV-4 恒温灌流系统均购买于成都泰盟公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 T2DM 小鼠模型的建立** 40 只 4 周龄的 SPF 级雄性载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE<sup>-/-</sup>) 小鼠 [批号为 SCXK (京) 2014-0004], 按照随机数字法选择 10 只作为正常对照组 (NC 组), 予以普通饲料喂养。其余 30 只准备造模, 予以高脂饲料喂养。4 周后准备造模小鼠禁食 12 h, 连续 5 d 腹腔注射 STZ (50 mg/kg) 进行 T2DM 造模, NC 组仅腹腔注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。注射 1 周后测腹腔葡萄糖耐量试验, 以空腹血糖  $\geq 7.0$  mmol/L 和 (或) 餐后 2 h 血糖  $\geq 11.1$  mmol/L 为 T2DM 小鼠成模标准, 共造模成功 20 只。

**1.2.2 动物分组及干预** 将造模成功的 20 只小鼠按照随机数字法分为糖尿病对照组 (T2DM 组,  $n = 10$ ) 和 GDF11 组 ( $n = 10$ ), GDF11 组根据小鼠体重每天给予  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的 GDF11, 连续 4 周腹腔注射<sup>[5]</sup>。NC 组和 T2DM 组每天予以等量的磷酸盐缓冲液腹腔注射。

**1.2.3 各组小鼠体重、空腹血糖、空腹胰岛素、HbA1c 和 GDF11 浓度的测定** 记录各组小鼠第 4、10、14 周时的体重。14 周实验结束时, 尾部取血测血糖, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 60 mg/kg 麻醉小鼠, 皮肤消毒后开腹, 下腔静脉采血, 离心后取血清, ELISA 检测胰岛素、HbA1c 和 GDF11 浓度。计算稳态模型评估-胰岛素敏感性指数 ( $\text{HOMA-ISI} = 1/(\text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素})$ )。

**1.2.4 离体胸主动脉内皮舒张功能测定** 每组取其中 5 只采过血的小鼠, 迅速开胸, 剪除肺脏组织, 在体式显微镜下移除主动脉血管鞘及周围结缔组织, 每只小鼠取出 4 段胸主动脉环, 每段长约 4 mm, 将血管环悬于挂钩, 置于 37℃ 持续通 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 混合气体的 Krebs 液中。在含 Krebs 液的恒温

灌流槽中,下方以钢钩固定于槽底,上方通过 JH-2 张力换能器连接 BL-420S 生物信号采集系统记录张力变化。调整基础静息张力 0.5 g,平衡 1 h。血管环张力平衡后,向浴槽中加入终浓度为  $10^{-6}$  mol/L 的苯肾上腺素收缩主动脉环,待其收缩张力达到平顶后,依次加入终浓度分别为  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 的乙酰胆碱诱导血管舒张,同步记录每一浓度下主动脉环张力的变化,取 4 个环的平均张力,各浓度的内皮依赖性舒张反应为  $[(\text{最大张力} - \text{各浓度点张力}) / (\text{最大张力} - \text{基础值})] \times 100\%$ 。冲洗血管重新平衡至基础张力,换用浓度为  $10^{-9} \sim 10^{-4}$  mol/L 的硝普钠测定血管内皮非依赖性舒张功能。

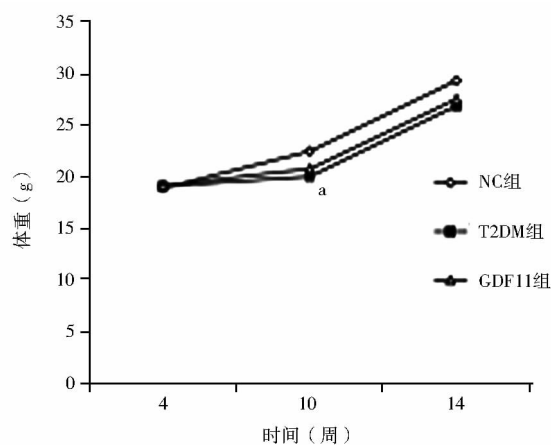
**1.2.5 主动脉一氧化氮含量、eNOS、P-eNOS、Smad2/3、P-Smad2/3 表达水平检测** 每组剩余 5 只采过血的小鼠,取其主动脉的一半,加入 1:10 冷生理盐水,匀浆后离心,取上清液,按一氧化氮检测试剂盒步骤测定。另外一半主动脉于液氮中冻存备测 Western 印迹。测定时,主动脉匀浆,测蛋白浓度后,各样本取 50  $\mu\text{g}$  蛋白上样于 12% 的 PAGE 胶电泳,电泳后转膜于 0.2  $\mu\text{m}$  的硝酸纤维素膜,室温摇床封闭 2 h,然后用相应特异性一抗[抗 eNOS、P-eNOS(Ser1177)、Smad2/3、P-Smad2/3 抗体]和辣根过氧化物酶标记的二抗处理,最后用增强的化学发光剂染色、显影。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS21.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,若资料符合正态性、方差齐,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用 LSD 检验;方差不齐时多组间比较采用近似  $F$  检验的 Welch 法,组间比较采用非参数检验的 Tamhane's  $T^2$  法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组体重、空腹血糖、空腹胰岛素和 HbA1c 的

比较 10 周时, T2DM 组体重低于 NC 组 ( $F = 4.635$ ,  $P < 0.05$ ); 14 周时 T2DM 组和 GDF11 组体重低于 NC 组,但各组体重差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 NC 组相比, GDF11 组、T2DM 组空腹血糖、空腹胰岛素、HbA1c 均显著升高, HOMA-ISI 显著下降 ( $P$  均  $< 0.01$ )。与 T2DM 组相比, GDF11 组空腹血糖、空腹胰岛素、HbA1c 均降低, HOMA-ISI 上升 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 见图 1, 表 1。



注: NC 组: 对照组; T2DM 组: 糖尿病对照组; GDF11 组: GDF11 干预组; GDF11: 生长分化因子 11; 与 NC 组相比,  $^a P < 0.01$

图 1 3 组小鼠不同时间点体重的比较

**2.2 各组 GDF11 浓度的比较** T2DM 组血清 GDF11 浓度低于 NC 组, GDF11 组血清 GDF11 浓度高于 T2DM 组, 但仍低于 NC 组 [NC 组:  $(220.71 \pm 6.83)$  ng/L; T2DM 组:  $(147.46 \pm 4.92)$  ng/L; GDF11 组:  $(206.47 \pm 7.03)$  ng/L,  $F = 675.430$ ,  $P < 0.01$ ]。

**2.3 GDF11 对乙酰胆碱诱导的主动脉内皮依赖性舒张功能的影响** 与 NC 组相比, T2DM 组小鼠胸主动脉对乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张反应显著下降 [ $(92.32 \pm 2.17)\%$  vs.  $60.03 \pm 3.07\%$ ], 乙酰胆碱:  $10^{-4}$  mmol/L,  $F = 590.380$ ,  $P < 0.01$ ], 而对硝普钠诱导的内皮非依赖性舒张功能, 差异无统计学意义;

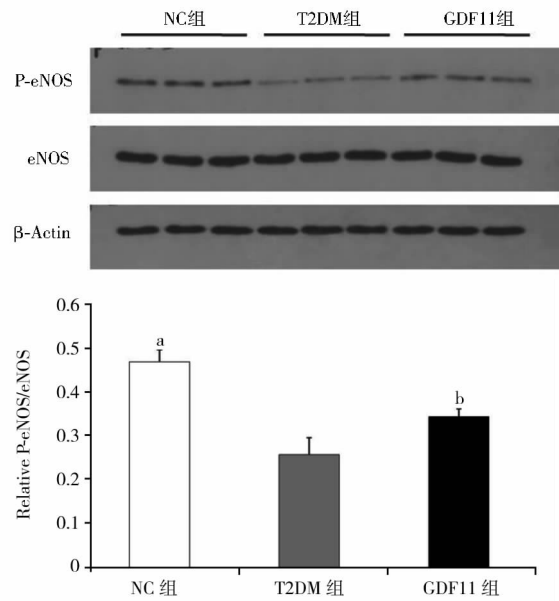
表 1 3 组小鼠 14 周时空腹血糖、空腹胰岛素、HbA1c 和 HOMA-ISI 的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	FPG (mmol/L)	FINS (mIU/L)	HbA1c (%)	HOMA-ISI ( $\times 10^{-3}$ )
NC 组	10	$5.92 \pm 0.68$	$13.54 \pm 1.78$	$5.94 \pm 0.52$	$12.66 \pm 2.31$
T2DM 组	10	$18.76 \pm 1.21^a$	$28.31 \pm 2.81^a$	$9.22 \pm 0.50^a$	$1.95 \pm 0.54^a$
GDF11 组	10	$13.54 \pm 1.95^{ab}$	$18.43 \pm 2.13^{ab}$	$7.82 \pm 0.57^{ab}$	$5.07 \pm 1.12^{ab}$
$F$ 值		229.080	70.923	76.965	132.671
$P$ 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: NC 组: 对照组; T2DM 组: 糖尿病对照组; GDF11 组: GDF11 干预组; GDF11: 生长分化因子 11; 与 NC 组相比,  $^a P < 0.01$ , 与 T2DM 组相比,  $^b P < 0.01$ ; FPG: 空腹血糖; FINS: 空腹胰岛素; HOMA-ISI: 稳态模型评估-胰岛素敏感性指数

与 T2DM 组相比, GDF11 组上述指标得到改善 [  $(80.85 \pm 3.26)\%$  vs.  $(60.03 \pm 3.07)\%$ , 乙酰胆碱:  $10^{-4}$  mmol/L,  $F = 179.240$ ,  $P < 0.01$  ], 对硝普钠诱导的舒张反应差异仍无统计学意义 [  $(93.31 \pm 4.13)\%$  vs.  $(89.23 \pm 3.83)\%$  vs.  $(90.59 \pm 3.27)\%$ , 硝普钠:  $10^{-4}$  mmol/L,  $F = 1.365$ ,  $P > 0.05$  ], 见图 2。

2.4 各组小鼠主动脉一氧化氮含量和 Western 印迹结果 与 NC 组相比, T2DM 组、GDF11 组离体主动脉一氧化氮含量显著下降 [ NC 组:  $(118.31 \pm 7.21)$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ; T2DM 组:  $(68.31 \pm 5.17)$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ; GDF11 组:  $(95.07 \pm 4.02)$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ,  $P < 0.01$  ]; 与 T2DM 组相比, GDF11 组一氧化氮含量显著升高 ( $F = 148.060$ ,  $P < 0.01$ )。Western 印迹结果显示, 与 NC 组相比, T2DM 组 P-eNOS/eNOS 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而 GDF11 组 P-eNOS/eNOS 水平显著高于 T2DM 组, 但低于 NC 组 ( $F = 40.123$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 3。与 NC 组和 T2DM 组相比, GDF11 组 P-Smad2/Smad2、P-Smad3/Smad3 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 T2DM 组 P-Smad2/Smad2、P-Smad3/



注: NC 组: 对照组; T2DM 组: 糖尿病对照组; GDF11 组: GDF11 干预组; GDF11: 生长分化因子 11; eNOS: 内皮型一氧化氮合酶; P-eNOS: 磷酸化内皮型一氧化氮合酶; 与 T2DM 组、GDF11 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 T2DM 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.01$

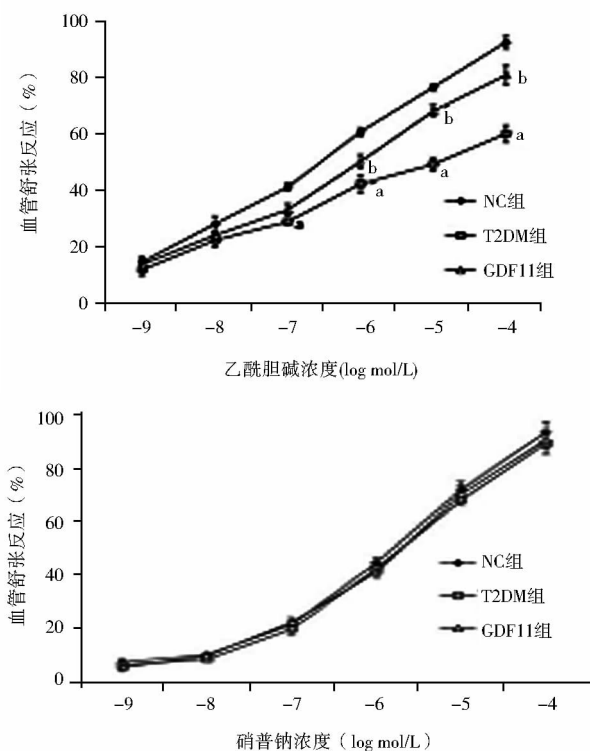
图 3 GDF11 对主动脉 eNOS 蛋白表达的影响

Smad3 水平又显著低于 NC 组 ( $F = 48.472, 50.957$ ,  $P$  均  $< 0.01$ ), 见图 4。

### 3 讨论

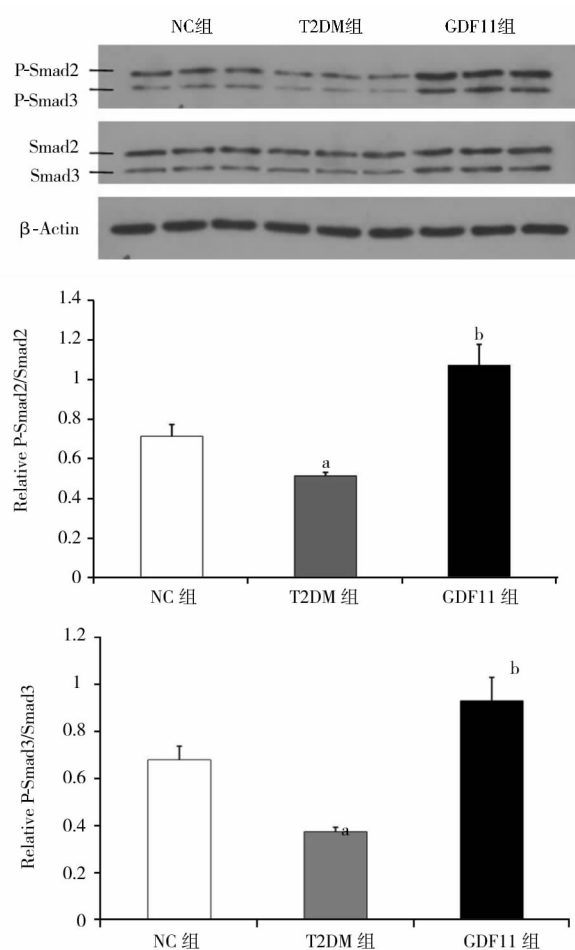
本研究提示, 通过高脂饮食联合小剂量 STZ 进行 T2DM 造模, 可以观察到 T2DM 组空腹血糖、空腹胰岛素和 HbA1c 水平较 NC 组明显上升, HOMA-ISI 明显下降, 提示胰岛素抵抗明显。胰岛素抵抗是糖尿病患者发生 AS 的独立危险因素。胰岛素抵抗可引起“糖毒性”、“脂毒性”及血管内皮功能障碍, 加速 AS 进展<sup>[6]</sup>。研究观察到 GDF11 干预 ApoE<sup>-/-</sup> 糖尿病小鼠后, 不仅空腹血糖、胰岛素和 HbA1c 较 T2DM 组有不同程度的下降, HOMA-ISI 也有所改善, 显示 GDF11 可以改善 T2DM 小鼠糖代谢水平, 减轻胰岛素抵抗。因此, 减轻胰岛素抵抗可能是 GDF11 改善血管内皮功能障碍的机制之一。

血管内皮功能障碍是包括 AS 在内的多种心血管疾病的早期病理生理改变<sup>[7]</sup>。通过测定以内皮依赖性舒张功能为代表的内皮功能, 可早期预测疾病发生的风险及预后。同时它也可以用来评估药物是否具有心血管保护作用。本研究中, 各组间非内皮依赖性舒张功能无明显区别, 说明血管对乙酰胆



注: NC 组: 对照组; T2DM 组: 糖尿病对照组; GDF11 组: GDF11 干预组; GDF11: 生长分化因子 11; Ach: 乙酰胆碱; SNP: 硝普钠; 与 NC 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 T2DM 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 3 组小鼠主动脉对不同浓度 Ach 和 SNP 介导的血管舒张反应



注: NC 组: 对照组; T2DM 组: 糖尿病对照组; GDF11 组: GDF11 干预组; GDF11: 生长分化因子 11; 与 NC 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 NC 组和 T2DM 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 4 GDF11 对主动脉 Smad2/3 蛋白表达的影响

碱引起舒张反应的差异是由内皮功能不同引起的。T2DM 组内皮依赖性舒张功能下降, GDF11 组内皮依赖性舒张功能得到改善, 说明 GDF11 保护了血管内皮, 即具有潜在的心血管保护作用。

在体内, 调节内皮依赖性舒张功能的重要介质是一氧化氮, 它是以左旋精氨酸为底物, 由 eNOS 催化合成的<sup>[8]</sup>。eNOS 主要在动、静脉内皮细胞表达, 多种化学物质和病理生理刺激如乙酰胆碱、血管内皮生长因子、血糖、血脂等, 参与调节 eNOS 的活性, 从而影响一氧化氮的产生。一氧化氮对血管的正常功能起重要作用, 调节内皮细胞的舒张、增殖、衰老和凋亡, 还具有防止 AS 的作用<sup>[9-10]</sup>。本研究, T2DM 组的主动脉 P-eNOS/eNOS 下降, 一氧化氮含量降低是导致其内皮功能障碍的主要原因。体内给予重组 GDF11 蛋白后, 上调了 eNOS 的活性、增加了

一氧化氮的产生, 进一步证实了 GDF11 对糖尿病血管并发症的保护作用。

GDF11 实现多种生物学功能的基础是先与胞膜上活动素 II A 和 II B 型受体结合, 再磷酸化 I 型受体 ALK5, 形成配体受体复合物作用于胞浆内的 Smad2/3 蛋白, 活化的 Smad2/3 蛋白与通用型 Smad4 结合形成复合物, 转移至细胞核, 调节基因的转录、翻译和表达<sup>[11-12]</sup>。最近的研究指出, 衰老小鼠血清 GDF11 水平下降, 它能增加小鼠大脑血管体积和分支数, 体外实验发现 GDF11 能够促进大脑毛细血管内皮细胞增殖, 并且这种作用是通过磷酸化 Smad2/3 通路实现的<sup>[5, 13]</sup>。此外, 一个 8.9 年的随访研究发现, 在稳定性冠心病患者中, 血清 GDF11 水平低的患者发生心血管事件(如心肌梗死、卒中、心力衰竭入院、死亡)的风险高, 说明 GDF11 对冠心病患者具有一定的保护作用<sup>[14-15]</sup>。本研究采用高脂饮食联合 STZ 制备 T2DM 模型, 发现造模后, 血清 GDF11 水平下降。T2DM 小鼠外源性补充 GDF11 后, 主动脉磷酸化 Smad2、磷酸化 Smad3 水平升高, 说明激活了血管内皮的 Smad2/3 通路, Smad2/3 蛋白与 Smad4 蛋白结合转移至细胞核, 调节多种基因包括 eNOS 基因的表达, 从而保护了血管内皮。

综上所述, 本研究证实 GDF11 可改善 ApoE<sup>-/-</sup>糖尿病小鼠的内皮依赖性舒张功能, 其机制是减轻胰岛素抵抗、上调 eNOS 活性、增加一氧化氮浓度和激活 Smad 通路。但 GDF11 蛋白对多种心血管疾病的具体作用和相关机制还需进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Molnar J, Yu S, Mzhavia N, et al. Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice [J]. Circ Res, 2005, 96 (11): 1178-1184.
- [2] Nakashima M, Toyono T, Akamine A, et al. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis [J]. Mech Dev, 1999, 80 (2): 185-189.
- [3] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11 [J]. Nat Genet, 1999, 22 (3): 260-264.
- [4] Esquela AF, Lee SJ. Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11 [J]. Dev Biol, 2003, 257 (2): 356-370.

- [5] Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors [J]. Science, 2014, 344 ( 6184 ) : 630-634. DOI: 10.1126/science.1251141.
- [6] Bansilal S, Farkouh ME, Fuster V. Role of insulin resistance and hyperglycemia in the development of atherosclerosis [J]. Am J Cardiol, 2007, 99 ( 4A ) : 6B-14B.
- [7] Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease [J]. Circulation, 2003, 108 ( 17 ) : 2054-2059.
- [8] Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine [J]. Nature, 1988, 333 ( 6174 ) : 664-666.
- [9] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology [J]. Pharmacol Rev, 1991, 43 ( 2 ) : 109-142.
- [10] Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, et al. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis [J]. Circulation, 1998, 97 ( 25 ) : 2494-2498.
- [11] Oh SP, Yeo CY, Lee Y, et al. Activin type II A and II B receptors mediate Gdf11 signaling in axial vertebral patterning [J]. Genes Dev, 2002, 16 ( 21 ) : 2749-2754.
- [12] Andersson O, Reissmann E, Ibáñez CF. Growth differentiation factor 11 signals through the transforming growth factor-beta receptor ALK5 to regionalize the anterior-posterior axis [J]. EMBO Rep, 2006, 7 ( 8 ) : 831-837.
- [13] Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy [J]. Cell, 2013, 153 ( 4 ) : 828-839. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.015.
- [14] Heidecker B, Olson K, Beatty A. Low levels of growth differentiation factor 11 and high levels of its inhibitor follistatin-like 3 are associated with adverse cardiovascular outcomes in humans [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65 ( 10S ) : A999.
- [15] Olson KA, Beatty AL, Heidecker B, et al. Association of growth differentiation factor 11/8, putative anti-ageing factor, with cardiovascular outcomes and overall mortality in humans: analysis of the Heart and Soul and HUNT3 cohorts [J]. Eur Heart J, 2015, 36 ( 48 ) : 3426-3434. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv385.
- ( 收稿日期: 2016-08-22 )

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《国际内分泌代谢杂志》对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号: 按 GB/T 3558.1-2009《统计学词汇及符号》的有关规定, 统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计: 应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究), 实验设计(应告知具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等), 临床试验设计(应告知属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等); 主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明, 尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述: 用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料, 用  $M(Q_R)$  表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20, 要注意区分百分率与百分比。

4. 统计学分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选择合适的统计学分析方法, 不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的, 选用合适的统计学分析方法, 不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析; 对具有重复实验数据检验回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达: 应写明所用统计学方法的具体名称(如: 成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等), 统计量的具体值(如  $t = 3.45$ ,  $\chi^2 = 4.68$ ,  $F = 6.79$  等); 在用不等式表示  $P$  值的情况下, 一般情况下选用  $P > 0.05$ ,  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  三种表达方式, 无须再细分为  $P < 0.001$  或  $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 应再给出 95% 可信区间。

本刊编辑部