

脂联素对小鼠氧诱导视网膜病变的保护作用

朱巧平^{1,2}, 谢安明¹, 郝艳芳^{1,2}

作者单位:¹(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学第一附属医院眼科;²(719000)中国陕西省榆林市第一医院眼科
作者简介:朱巧平,在读硕士研究生,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:谢安明,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼底病. xie9102@163.com

收稿日期:2015-06-11 修回日期:2015-09-14

Protection of adiponectin to oxygen - induced retinopathy in mice

Qiao - Ping Zhu^{1,2}, An - Ming Xie¹, Yan - Fang Hao^{1,2}

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China;²Department of Ophthalmology, the First Hospital of Yulin, Yulin 719000, Shaanxi Province, China

Correspondence to: An-Ming Xie. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. xie9102@163.com

Received:2015-06-11 Accepted:2015-09-14

Abstract

• AIM: To investigate the role of adiponectin (APN) in C57BL/6J mice model of oxygen - induced retinopathy (OIR).

• METHODS: Neonatal C57BL/6J mice were divided randomly into three groups: normoxic control group, physiological saline injection of OIR group and adiponectin injection of OIR group. The mice of the latter two groups were exposed to 75% ± 2% oxygen from 7d (P7) ~ P12 to induced OIR. Recombinant APN (rAPN) was injected intraperitoneally (i. p., 3.0 μg/g) in a mice model of OIR from P7 ~ P15. Another set of mice model of OIR were received a similar treatment with physiological saline. All eyes were collected at P17. The right eyes were whole mounted and stained with Lectin to observe central retinal avascular area and the growth of pathological neovascularization; The left eyes were performed histopathological cross sections stained with HE to analyzed the histopathological changes in the retina. The eyes were enucleated to assess the levels of reactive oxygen species (ROS) and NO. The protein expression of iNOS, nNOS, eNOS were detected by Western-blot.

• RESULTS: The central retinal avascular area, neovascular area were markedly decreased after the APN injection compared with physiological saline injection of OIR group ($t = 7.304, P < 0.01$; $t = 2.654, P < 0.01$). Compared with physiological saline injection of OIR

group, the levels of ROS were lower ($t = 13.349, P < 0.01$), the levels of NO were higher ($t = 3.023, P < 0.01$), the expression of iNOS were decreased ($t = 5.112, P < 0.01$), the expression of eNOS were decreased ($t = 7.421, P < 0.01$). nNOS expression had no significant difference ($t = 1.074, P > 0.01$).

• CONCLUSION: The results demonstrate that APN can promote physiological NO by acting endogenous eNOS, while suppress ROS/RNS generation and play a protective role in retinal vessels in OIR process.

• KEYWORDS: adiponectin; oxygen-induced retinopathy; oxidative stress; endothelial nitric oxide synthase; nitric oxide

Citation: Zhu QP, Xie AM, Hao YF. Protection of adiponectin to oxygen-induced retinopathy in mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(10):1695-1699

摘要

目的:观察脂联素对 C57BL/6J 小鼠氧诱导视网膜病变的影响。

方法:将新生 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组,分别为常氧对照组、生理盐水注射氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 组和脂联素注射 OIR 组。将两组小鼠于生后第 7d (P7) 至 P12 置于体积分数 75% ± 2% 高氧氧箱中以诱导 OIR 模型。脂联素注射 OIR 模型组在 P7 ~ P15 每天接受腹腔注射重组鼠脂联素蛋白 (3.0 μg/g),生理盐水注射 OIR 组则于上述相同时间点注射同等剂量的生理盐水。三组小鼠均于 P17 时取右眼行视网膜铺片和 Lectin 染色,观察视网膜中央无血管区及病理性新生血管的情况;取左眼行视网膜切片和 HE 染色,观察视网膜组织病理学变化;应用 Western-blot 测定左眼视网膜组织中 iNOS、nNOS、eNOS 的表达;取右眼视网膜组织定量检测 ROS/RNS 含量以及 NO 水平。

结果:脂联素注射 OIR 组小鼠视网膜中央无血管区面积较生理盐水注射 OIR 组明显减少 ($t = 7.304, P < 0.01$),病理性新生血管数目明显减少 ($t = 2.654, P < 0.01$);脂联素注射 OIR 组小鼠视网膜组织 ROS 含量较生理盐水注射组明显降低 ($t = 13.349, P < 0.01$);脂联素注射 OIR 组小鼠视网膜组织 NO 含量明显高于生理盐水注射组 ($t = 3.023, P < 0.01$),iNOS 表达明显低于生理盐水注射组 ($t = 5.112, P < 0.01$),eNOS 表达明显高于生理盐水注射组 ($t = 7.421, P < 0.01$),nNOS 的表达无统计学差异 ($t = 1.074, P > 0.01$)。

结论:脂联素可以通过激活内源性 eNOS 促进生理性 NO 生成,同时又能抑制 ROS/RNS 的产生,在 OIR 进程中发挥视网膜血管的保护作用。

关键词:脂联素;氧诱导视网膜病变;氧化应激;内皮型一

氧化氮合酶;一氧化氮

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.10.05

引用:朱巧平,谢安明,郝艳芳.脂联素对小鼠氧诱导视网膜病变的保护作用.国际眼科杂志 2015;15(10):1695-1699

0 引言

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)是一种增生性视网膜病变,与高氧诱导未发育成熟视网膜血管的收缩和闭塞形成无灌注区,视网膜组织相对低氧,从而引起一系列血管生长因子大量分泌,促使病理性新生血管大量生成有着密切关系。在ROP病理改变中,视网膜暴露于不断波动的氧分压中,导致视网膜缺血缺氧,引发过量的自由基产生^[1]。自由基可触发一系列信号通路,引起细胞凋亡和血管发生^[2]。已有的研究证实,过量的ROS/RNS生成引起的细胞凋亡可能是导致视网膜血管消退形成无血管区的主要原因^[3-4]。

脂联素(Adiponectin, APN)是1995年在小鼠3T3-L前脂肪细胞系的分化过程中分离克隆发现的主要由脂肪细胞分泌的一种内源性生物活性蛋白质^[5]。目前的研究表明,脂联素具有改善胰岛素抵抗、调节脂质代谢、重塑受损血管和抑制动脉粥样硬化保护心血管系统、抗氧化应激及抗炎等多种生理功能^[6-9]。临床研究显示,早产儿在出生时血清脂联素水平明显低于足月儿,且与早产儿出生后的生长发育明显相关^[10]。氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)模型研究结果显示,脂联素可下调炎症因子TNF- α ,减少视网膜病理性新生血管的形成^[11]。本实验根据脂联素抗氧化应激作用的机制,探讨脂联素对小鼠氧诱导视网膜病变的保护作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 新生C57BL/6J小鼠12窝,每窝6只,共72只144眼,随机取8窝共48只为氧诱导视网膜病变(OIR)组,另4窝为常氧对照组共24只。每窝小鼠与母鼠同笼饲养,饲养温度为25 \pm 1 $^{\circ}$ C,湿度为59%~61%,每天光照与黑暗时间各12h,专人管理。动物饲养与使用均遵照视觉与眼科研究协会制定的科研动物使用规范。OIR组8窝48只新生小鼠再随机分为脂联素注射OIR组和生理盐水OIR组,每组各24只。鼠脂联素蛋白(美国Sigma公司),Lectin(美国Vector公司),iNOS、nNOS、eNOS抗体(武汉博士德公司),GENMED(武汉博士德公司),Triton X-100(西安国安公司),牛血清白蛋白(美国Amresco公司),微量注射器(美国Sigma公司),荧光显微镜(日本Olympus株式会社),体视显微镜(德国Zeiss公司),荧光分光光度计(德国Zeiss公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠OIR模型的建立 OIR组8窝新生C57BL/6J小鼠于生后第7d(P7)至P12与母鼠共同置于体积分数75% \pm 2%高氧氧箱中饲养,于P12返回正常空气中。常氧对照组小鼠则始终置于正常空气中饲养。

1.2.2 给药方式与剂量 脂联素(APN)注射OIR组:OIR小鼠于P7~P15每天接受腹腔注射重组鼠脂联素蛋白(3.0 μ g/g);生理盐水(0.9% NaCl)注射OIR组:于P7~P15每天接受腹腔注射同等剂量的生理盐水。常氧对照组小鼠不做任何处理。

1.2.3 小鼠视网膜铺片Lectin染色及图像分析 在P17,随机抽取3组幼鼠,戊巴比妥钠(30mg/kg,腹腔注射)过量麻醉处死,取右眼用4%多聚甲醛4 $^{\circ}$ C固定。去除角膜、晶状体及玻璃体,分离视网膜,行Isolectin B4染色。视网膜组织于4%多聚甲醛溶液固定3h,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS, 0.01mol/L, pH=7.4)漂洗5min,用1%牛血清白蛋白+0.5% Triton+0.01mol/L PBS在室温中封闭2.5h,加入抗体1% Isolectin B4过夜,4 $^{\circ}$ C,用PBS漂洗5min \times 3次后行视网膜铺片、封片。观察视网膜中央无血管区及病理性新生血管的情况。

1.2.4 小鼠视网膜组织切片和HE染色观察视网膜组织病理学变化 在P17,随机抽取3组幼鼠,戊巴比妥钠麻醉后用生理盐水和4%多聚甲醛对幼鼠进行体循环灌注、固定及摘取左侧眼球,常规固定、脱水、包埋,以视盘为原点,沿着上下垂直方向5 μ m切片,行HE染色,采用显微镜及图像采集系统观察并拍照,观察突破视网膜内界膜的新生血管。

1.2.5 视网膜组织氧化应激活性氧高质荧光测定 随机抽取3组幼鼠,戊巴比妥钠过量麻醉处死。取右眼分离视网膜后用预冷的GENMED清理液漂洗2~3次;视网膜组织加入100 μ L GENMED稀释液,漩涡混合器充分震荡充分混匀后移取50 μ L组织匀浆物或50 μ L GENMED稀释液(背景对照)到96孔平板上,加入950 μ L GENMED染色液和GENMED稀释液的染色工作液,充分混匀后放37 $^{\circ}$ C恒温水孵育20min,避免光照。随后使用避荧光定量分光光度计(M5)检测:激发波长490nm,散发波520nm。以OIR模型组氧化应激活性氧(ROS)荧光度/常氧对照组ROS荧光强度值为对比指标。

1.2.6 视网膜组织NO水平测定 方法同上,分离视网膜后匀浆,参照文献[12]方法,将NO转化为NO²⁻,测定NO的稳定代谢产物亚硝酸盐/硝酸盐的含量,用分光光度法测定,间接反应3组小鼠视网膜组织NO的含量。

1.2.7 Western-blot测定左眼视网膜组织中iNOS、nNOS、eNOS的表达 分离小鼠视网膜组织后置于细胞裂解液(1% Triton X-100, 50mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, 0.1% SDS, 1% 脱氧胆酸钠)中匀浆。BCA法测定蛋白浓度,取等量蛋白样品,10% SDS-PAGE电泳、转膜。加入一抗,室温孵育12h,HRP标记的二抗室温孵育2h。ECL显影后,半定量分析iNOS、nNOS和eNOS的光密度值。

统计学分析:采用Photoshop CS3软件对所拍摄的视网膜局部荧光图像进行融合、重建,得到完整的视网膜铺片图。根据Connor等^[13]所发表的方案,统计每张完整视网膜铺片图的无血管区、新生血管区及整个视网膜像素值,计算百分比进行分析。采用SPSS 17.0统计学软件进行数据统计分析,以均数 \pm 标准差描述计量资料,计量资料比较采用单因素方差分析及LSD-*t*检验, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂联素对OIR小鼠视网膜无血管区面积及病理性新生血管数目的影响 在P17时,视网膜铺片Lectin染色高倍镜下观察到,常氧对照组小鼠视网膜血管走行清晰、形态正常;NaCl注射OIR组小鼠视网膜中央出现大片无血管区和呈团簇状的病理性新生血管,且血管走行迂曲;APN注射OIR组小鼠视网膜中央出现的无血管区面积

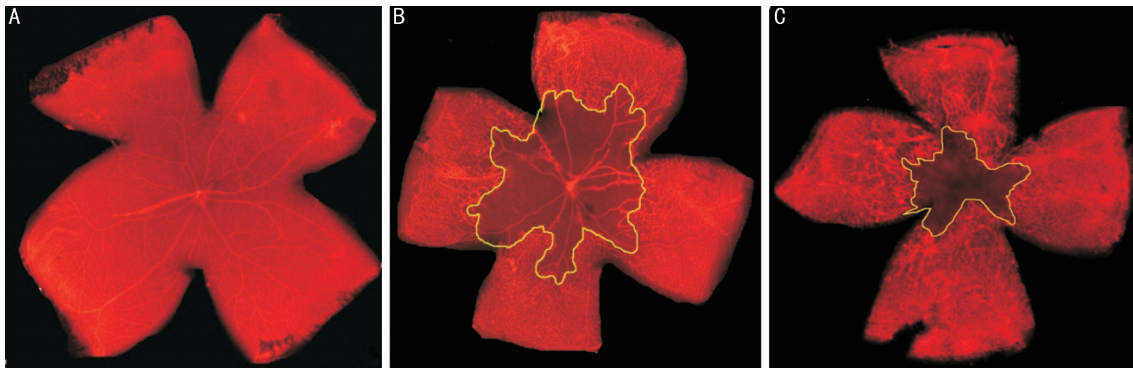


图1 三组小鼠视网膜铺片图($\times 400$) A:常氧对照组;B:NaCl注射OIR模型组;C:APN注射OIR模型组;黄色标记区域为视网膜中央无血管区。

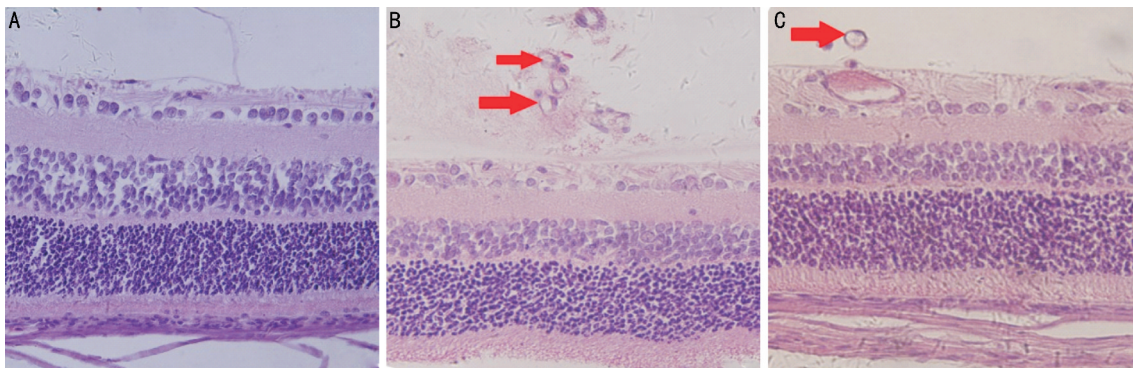


图2 三组小鼠视网膜组织切片 HE 染色($\times 400$) A:常氧对照组;B:NaCl注射OIR模型组;C:APN注射OIR模型组;红色箭头为视网膜病理性新生血管。

较小,但仍存在呈团簇状、走行迂曲的病理性新生血管(图1),统计分析显示,APN注射OIR组小鼠视网膜中央无血管区面积显著明显减少($t=7.304, P<0.01$),病理性新生血管数目减少($t=2.407, P<0.01$,表1)。视网膜组织切片 HE 染色显示,APN注射OIR组小鼠视网膜病理性新生血管数量明显减少(图2)。

2.2 视网膜组织氧化应激活性氧高质荧光测定结果 在P17时,两组OIR模型组小鼠视网膜组织 ROS 含量均升高,但 APN 注射组小鼠视网膜组织氧化应激活性氧(ROS)含量较 NaCl 注射组明显降低,差异有统计学意义($t=13.349, P<0.01$,图3)。

2.3 视网膜组织 NO 的表达 OIR 模型组小鼠视网膜 NO 水平平均升高,APN 注射组小鼠视网膜 NO 水平较 NaCl 注射组明显升高,差异有统计学意义($t=3.023, P<0.01$,表2)。

2.4 视网膜组织 iNOS、nNOS、eNOS 的表达 OIR 模型组小鼠视网膜组织 iNOS 和 eNOS 表达明显升高,APN 注射后小鼠视网膜组织 iNOS 表达明显低于 NaCl 注射组,差异有统计学意义($t=5.112, P<0.01$,图3),eNOS 表达明显高于 NaCl 注射组,差异有统计学意义($t=7.421, P<0.01$,图3)。nNOS 的表达无统计学差异($t=1.074, P>0.01$)。

3 讨论

ROP 是一种双相性疾病,在病变的第一阶段,在正常宫腔内进行的正常视网膜血管的发育减慢或者停止,这主要与出生后暴露在高氧环境中有关。研究表明,当视网膜处于不断波动的氧分压中,会引起视网膜缺血缺氧,引发过量的 ROS/RNS 产生,触发链式反应进一步生成更多的自由基,ROS/RNS 的过量生成与清除失衡可导致氧化/硝化应激损伤^[14-15]。在正常情况下,ROS 的产生与抗氧化剂的清除二者之间的平衡保护机体内细胞的活性。很多

表1 OIR 模型小鼠视网膜无血管区像素百分比 ($\bar{x}\pm s, \%$)

分组	眼数	无血管区	新生血管
NaCl 注射 OIR 组	6	18.21 \pm 0.62	5.1 \pm 0.21
APN 注射 OIR 组	6	10.32 \pm 0.32 ^b	2.6 \pm 0.19 ^b

注:^b $P<0.01$ vs NaCl 注射 OIR 组。

表2 三组小鼠视网膜 NO 含量 ($\bar{x}\pm s, \text{mol/L}$)

分组	眼数	NO ²⁻ /NO ³⁻
常氧对照组	6	6.23 \pm 0.91
NaCl 注射 OIR 组	6	19.09 \pm 2.17
APN 注射 OIR 组	6	38.45 \pm 3.02 ^b

注:^b $P<0.01$ vs NaCl 注射 OIR 组。

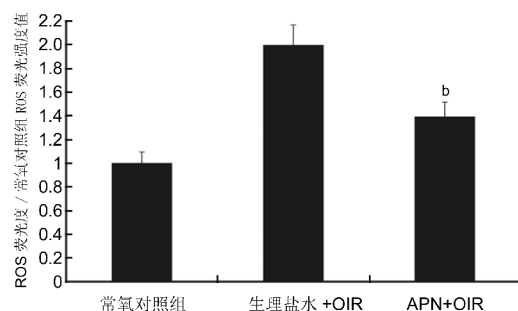


图3 三组小鼠视网膜组织 ROS 荧光强度相对值 ^b $P<0.01$ vs NaCl 注射 OIR 组。

影响早产儿的情况如高氧、缺血/再灌注和炎症等均可引起体内产生过多的 ROS/RNS。由于早产儿出生时体内抗氧化剂,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶等、以及与

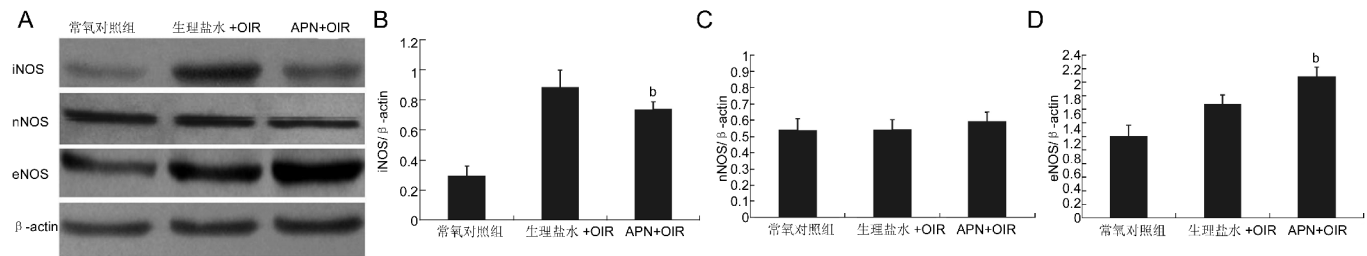


图4 三组小鼠视网膜组织 iNOS、nNOS、eNOS 蛋白表达水平的免疫印迹结果 A: Western-bolt 电泳图; B: iNOS/ β -actin; C: nNOS/ β -actin; D: eNOS/ β -actin; ^b $P < 0.01$ vs NaCl 注射 OIR 组。

生长发育相关的因子,如 IGF-1、脂联素等水平较低,更易受到氧化应激的损伤^[16-19]。因此,氧化应激是 ROP 的发生发展中的重要因素。进一步研究证实 ROS/RNS 引起的细胞凋亡可能是导致视网膜血管消退形成无灌注区以及继发性新生血管的主要原因^[20-21]。

脂联素是脂肪细胞分泌的一种脂肪细胞因子,其主要作用于胰岛 B 细胞、血管内皮细胞、肝细胞、心肌细胞、脂肪细胞及免疫细胞等靶细胞^[22],发挥调节代谢、抗炎、抗氧化应激、保护血管内皮及心肌等多种作用^[23-24]。脂联素在眼部组织,如脉络膜、角膜、巩膜和睫状体均呈低水平表达^[25-27]。研究显示脂联素具有明显的心血管保护效应,通过保护血管内皮细胞、抗炎、抗氧化应激来促进受损的血管内皮细胞的修复^[28-29]。

在实验中观察到,与常氧对照组和生理盐水注射 OIR 模型组相比,脂联素注射的 OIR 组小鼠视网膜中央无血管区和新生血管数量显著减少、异常血管形态减轻,表明脂联素注射后小鼠视网膜病变减轻,提示脂联素注射可减轻高氧波动对正在生长发育的视网膜血管的损伤。视网膜组织 ROS/RNS 检测结果表明,脂联素可明显抑制高氧波动状态下视网膜 ROS/RNS 的产生,减轻氧化应激对视网膜血管的损伤。在激光诱导脉络膜新生血管(CNV)的早期,脂联素的表达上调,可明显抑制病理性新生血管的生成^[30]。

NO 主要依赖于—氧化氮合酶(NOS)催化生成。目前已知 NOS 有三种亚型,内皮型(eNOS)、神经型(nNOS)和诱导型(iNOS)。eNOS 和 nNOS 的活性受到多种信号通路的严密调控,并生成具有保护作用的生理性 NO^[31]。而 iNOS 可以在多种病理刺激下产生,其产生 NO 的量比 eNOS 和 nNOS 高出数个数量级,且其活性不受正常信号通路调控,也称病理性 NO,损伤血管内皮细胞^[32]。生理性的 NO 是非常重要的血管扩张剂,在眼部具有保护和促进血管生成的作用,可减少细胞凋亡维持内皮细胞屏障的完整性^[33]。体外研究显示,脂联素可促进血管内皮细胞 eNOS 的产生,增加生理性 NO 的生成,促进受损的血管内皮细胞修复^[34-35]。本实验发现脂联素不仅可明显抑制 ROS/RNS 的产生,减轻具有细胞毒性的继发产物,如过氧亚硝基阴离子等的产生,保护血管免受损伤。OIR 组小鼠高氧波动干预后小鼠视网膜组织 iNOS 表达显著增加,病理性 NO 生成明显增加。而外源性补充脂联素后可显著抑制 iNOS 表达,eNOS 磷酸化水平增加,病理性 NO 减少,生理性 NO 的生成增强,减轻了高氧对视网膜血管的氧化应激损伤,发挥视网膜血管保护作用。

综上所述,本实验结果表明,脂联素可以通过激活内源性 eNOS 促进生理性 NO 生成,保护血管内皮以及促进损伤血管内皮的修复,同时又能抑制 ROS/RNS 的产生,在 OIR 视网膜病变进程中发挥视网膜血管的保护作用。

参考文献

- Li SY1, Fu ZJ, Lo AC. Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2012;17(12):10-13
- Katz ML, Robison WG Jr. Autoxidative damage to the retina: potential role in retinopathy of prematurity. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1988;21(1):237-248
- Saito Y, Geisen P, Uppal A, et al. Inhibition of NAD(P)H oxidase reduces apoptosis and avascular retina in an animal model of retinopathy of prematurity. *Mol Vis* 2007; 12(13):840-853
- Gu X, El-Reme AB, Brooks SE, et al. Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 23(3):546-554
- Selcuk H, Selcuk MT, Temizhan A, et al. Decreased plasma concentrations of adiponectin in patients with slow coronary flow. *Heart Vessels* 2009; 71(1):1-7
- Shibata R, Sato K, Pimentel DR, et al. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* 2005; 12(11):1096-1103
- Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 2002;34(277):25863-25866
- Sharma K, Ramach S, Qiu G, et al. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 2008;24(118):1645-1656
- Shibata R, Ouchi N, Kihara S, et al. Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2004; 31(279):28670-28674
- Tania S, Helen M, GPeter P, et al. Circulating levels of adiponectin in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Ned* 2007;30(92):286-290
- Akiko H, Koji O, Shinji K, et al. Adiponectin suppresses pathological microvessel formation in retina through modulation of tumor necrosis factor- α expression. *Circ Res* 2009;20(9):1058-1065
- Tim TL, Andrew SA, Mark OM. Apoptosis and aspages after ischemia reperfusion injury in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;11(5):967-971
- Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, et al. Quantification of oxygen induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc* 2009; 32(11):1565-1573
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;19(39):44-84
- Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS, et al. Cellular and vascular

- changes in the retina of neonatal rats after an acute exposure to hypoxia. *Invest Ophthalmology Vis Sci* 2009;35 (50) :5364–5374
- 16 Frank L, Groseclose E. Preparation for birth into an O₂ – rich environment; the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. *Pediatric Research* 1984;22 (18) :240–244
- 17 Qanungo S, Mukherjea M. Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem* 2000;7(215) :11–19
- 18 Nassi N, Ponziani V, Becatti M, *et al* . Anti-oxidant enzymes and related elements in term and preterm newborns. *Pediatr Int* 2009;13 (2) :183–187
- 19 Ates O, Alp HH, Caner I, *et al* . Oxidative DNA damage in retinopathy of prematurity. *Eur J Ophthalmol* 2009;19(1) :80–85
- 20 Penn JS, Tolman BL, Low LA. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;5(34) :576–585
- 21 Saito Y, Geisen P, Uppal A, *et al* . Inhibition of NAD(P)H oxidase reduces apoptosis and avascular retina in an animal model of retinopathy of prematurity. *Mol Vis* 2007;9(13) :840–853
- 22 Brochu GK, Rehfeldt C, Blouin R, *et al* . Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* 2010;4(1) :11–32
- 23 Selcuk H, Selcuk MT, Temizhan A, *et al* . Decreased plasma concentrations of adiponectin in patients with slow coronary flow. *Heart Vessels* 2009;4 (1) :1–7
- 24 Takeuchi S, Wada K, Nawashiro H, *et al* . Decrease in plasma adiponectin level and increase in adiponectin immunoreactivity in cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Turk Neurosurg* 2013;9(3) :349–354
- 25 Bora PS, Kaliappan S, Cruz JC, *et al* . Choroidal neovascular complex size enhanced by chronic alcohol feeding in rat Model of laser induced choroidal–Neovascularization. *FEBSJ* 2006;14 (12) :1403–1414
- 26 Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, *et al* . Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* 2004;35(4) :842–849
- 27 Ehling A, Schaffler A, Herfarth H, *et al* . The potential of adiponectin in driving arthritis. *J Immunol* 2006;27(176) :4468–4478
- 28 Youn JC, Kim C, Park S, *et al* . Adiponectin and progression of arterial stiffness in hypertensive patients. *Int J Cardiol* 2013;163(3) :316–319
- 29 Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, *et al* . Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *CircRes* 2004;7(4) :27–31
- 30 Puran S, Sankar K, Valeriy V, *et al* . Expression of adiponectin in choroidal tissue and inhibition of induced choroidal neovascularization by adiponectin. *FEBS Letters* 2007;6 (581) :1977–1982
- 31 Motoshima H, Wu X, Mahadev K, *et al* . Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;11(2) :264–271
- 32 Li R, Xu M, Wang X, *et al* . Reduced vascular responsiveness to adiponectin in hyperlipidemic rats—mechanisms and significance. *J Mol Cell Cardiol* 2010;8(3) :508–515
- 33 Beauchamp MH, Sennlaub F, Speranza G, *et al* . Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen – induced retinopathy. *Free Radic Biol Med* 2004;9 (11) :1885–1894
- 34 Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium* 2002;10(4) :231–238
- 35 Yuan F, Li YN, Liu YH, *et al* . Adiponectin inhibits the generation of reactive oxygen species induced by high glucose and promotes endothelial NO synthase formation in human mesangial cells. *Mol Med Report* 2012;6 (2) :449–453