

脂联素对高糖条件下视网膜血管内皮细胞增殖、迁移和管腔形成的作用

李 蓉¹, 姚国敏¹, 王小娣¹, 姚 杨²

引用:李蓉,姚国敏,王小娣,等.脂联素对高糖条件下视网膜血管内皮细胞增殖、迁移和管腔形成的作用.国际眼科杂志 2019; 19(3):363-367

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81500726);陕西省卫生健康科研基金项目(No.2018D074);西安市科技局医学研究项目[No.201805097YX5SF31(4)];2017年陕西省普通高校首批“青年杰出人才”支持计划项目

作者单位:(710077)中国陕西省西安市,西安医学院第一附属医院¹眼科;²中心实验室

作者简介:李蓉,女,毕业于第四军医大学,博士,副教授,副主任医师,眼科主任,五官科教研室主任,研究方向:视网膜疾病。

通讯作者:李蓉. rechelrong198222@163.com

收稿日期:2018-09-19 修回日期:2019-01-17

摘要

目的:观察脂联素(APN)对高糖培养条件下恒河猴脉络膜视网膜血管内皮细胞(RF/6A细胞)增殖、迁移和管腔形成的影响。

方法:将体外培养的RF/6A细胞随机分为空白对照组(正常培养基培养)、甘露醇对照组(含20mmol/L甘露醇的培养基培养)、高糖组(含25mmol/L D-葡萄糖的培养基培养)和高糖+APN组(含25mmol/L D-葡萄糖+10 μ g/mL APN的培养基培养)。分别采用CCK-8法检测细胞增殖,Transwell小室检测细胞迁移,基质胶(Matrigel)法检测细胞管腔形成能力。

结果:空白对照组与甘露醇对照组细胞增殖率(100.00% \pm 0.00% vs 99.09% \pm 0.46%)、迁移数(121.60 \pm 6.02个 vs 119.60 \pm 9.39个)及管腔形成数(12.11 \pm 0.84个 vs 12.22 \pm 0.96个)均无差异($P>0.05$)。高糖组细胞增殖率(71.42% \pm 2.29%)明显低于空白对照组和甘露醇对照组,细胞迁移数(144.20 \pm 9.65个)和管腔形成数(16.00 \pm 2.90个)均明显高于空白对照组和甘露醇对照组($P<0.05$)。高糖+APN组细胞增殖率(90.87% \pm 1.68%)明显低于空白对照组和甘露醇对照组,明显高于高糖组;细胞迁移数(73.00 \pm 6.04个)和管腔形成数(7.89 \pm 0.38个)均明显低于空白对照组、甘露醇对照组及高糖组($P<0.05$)。

结论:APN可以促进高糖条件下RF/6A细胞存活及增殖,抑制细胞迁移和管腔形成,提示APN对高糖导致的RF/6A细胞损伤具有一定的保护作用,抑制病理刺激条件下的血管生成。

关键词:脂联素;高糖;视网膜血管内皮细胞;血管生成

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.3.03

Effects of adiponectin on proliferation, migration and tube formation of retinal vascular endothelial cells under high glucose conditions

Rong Li¹, Guo - Min Yao¹, Xiao - Di Wang¹, Yang Yao²

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81500726); the Health Research Foundation of Shaanxi Province (No.2018D074); the Medical Research Project of Xi'an Science Technology Bureau [No. 201805097YX5SF31(4)]; the Outstanding Youth Talent Support Plan of Shaanxi Ordinary University

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Rong Li. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China. rechelrong198222@163.com

Received:2018-09-19 Accepted:2019-01-17

Abstract

• **AIM:** To observe the effect of adiponectin (APN) on proliferation, migration and tube formation of RF/6A (monkey choroid and retinal endothelial cell line) cells cultured in the conditions of high glucose.

• **METHODS:** Well - cultured RF/6A cells *in vitro* were randomly divided into four groups: blank control group, mannitol control group, high glucose group and high glucose + 10 μ g/mL APN group. Cell proliferation, migration and tube formation was detected by CCK - 8 assay, transwell chamber and matrigel assay, respectively.

• **RESULTS:** There was no significant difference in the cell proliferation rate (100.00% \pm 0.00% vs 99.09% \pm 0.46%), the number of cell migration (121.60 \pm 6.02 vs 119.60 \pm 9.39) and the number of tube formation (12.11 \pm 0.84 vs 12.22 \pm 0.96) between the blank control group and mannitol control group (all $P>0.05$). The cell proliferation rate of the high glucose group (71.42% \pm 2.29%) was significantly lower than that of the blank control group and the mannitol control group, and the number of cell migration (144.20 \pm 9.65) and tube formation (16.00 \pm 2.90) of the high glucose group were significantly higher than that of the blank control group and the mannitol control group (all $P<0.05$). The proliferation rate of cells in the high glucose +

APN group (90.87%±1.68%) was significantly lower than that of the blank control group and the mannitol control group, while higher than that in the high glucose group (all $P<0.05$). The number of cell migration (73.00±6.04) and tube formation (7.89±0.38) in the high glucose+APN group was significantly lower than that of the blank control group, the mannitol control group and the high glucose group (all $P<0.05$).

• **CONCLUSION:** APN can promote the survival and proliferation of RF/6A cells, and inhibit the migration and tube formation of RF/6A cells under high glucose conditions, suggesting that APN has a protective effect on the damage of RF/6A cells caused by high glucose and inhibits the angiogenesis process under pathological stimulations.

• **KEYWORDS:** adiponectin; high glucose; retinal vascular endothelial cells; angiogenesis

Citation: Li R, Yao GM, Wang XD, *et al.* Effects of adiponectin on proliferation, migration and tube formation of retinal vascular endothelial cells under high glucose conditions. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(3):363-367

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最严重且最常见的并发症之一^[1]。在DM的进展过程中,高血糖导致慢性微血管损伤,使得约1/10的患者出现增生性DR(proliferative DR, PDR)或糖尿病性黄斑水肿,严重威胁患者视力^[2]。随着生活水平的提升,DM的发病率逐年攀升^[3],但针对DR目前仍缺乏有效的治疗方法或药物。根据病程发展的不同阶段,DR分为早期的非增生性DR(non-proliferative DR, NPDR)和晚期的PDR^[4]。PDR的标志就是形成视网膜新生血管,其血管结构非常脆弱且易渗漏,最终导致不可逆的视网膜损伤和盲目^[2,5]。因此,抑制血管生成成为了近年来具有前景的DR治疗策略^[6]。

脂联素(adiponectin, APN)是由脂肪细胞分泌的一种内源性生物活性蛋白质。临床发现血清APN浓度降低与肥胖和2型DM的发生有关,APN通过直接代谢和胰岛素增敏作用在各种组织中发挥有益的抗DM作用^[7-9]。在缺血性视网膜病变的动物模型中发现,过表达APN可明显减少缺氧诱导的病理性视网膜新生血管,认为APN是视网膜病理性微血管形成的负向调控者,对视网膜血管损伤起着保护作用^[10]。然而,目前对于血清APN水平与DR的关系尚无定论^[11-13],APN对高糖诱导的视网膜新生血管形成的作用也不清楚。鉴于此,本研究利用高糖刺激条件下的RF/6A细胞观察APN对其增殖、迁移及管腔形成过程的影响,为明确APN对DR的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 恒河猴脉络膜视网膜血管内皮细胞(RF/6A细胞)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;1640培养基、0.25%胰酶均购自美国Gibco公司;胎牛血清购自美国Invitrogen公司;青霉素、链霉素购自美国Hyclong公司;APN购自金斯瑞生物科技有限公司;CCK-8细胞增殖

及细胞毒性检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Transwell小室、Matrigel基质胶均购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将RF/6A细胞置于1640培养基(含10%胎牛血清、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素)中,在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下常规培养。当细胞的密度达到80%时,用0.25%胰酶消化细胞,终止消化后收集细胞,用PBS将细胞润洗2次,1200r/min,离心3min,加入培养基吹打细胞,制成单细胞悬液,按1:3的比例传代,37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下扩大培养。将RF/6A细胞分为空白对照组、甘露醇对照组、高糖组、高糖+APN组。处理方法:空白对照组细胞采用正常培养基培养;甘露醇对照组细胞采用含20mmol/L甘露醇的培养基培养;高糖组细胞采用含25mmol/L D-葡萄糖的培养基培养;高糖+APN组细胞采用含25mmol/L D-葡萄糖+10μg/mL APN的培养基培养。

1.2.2 CCK-8法检测细胞活性 将处于对数生长期的细胞消化后,配制成 5×10^4 个/mL的单细胞悬液,每孔100μL,将细胞均匀接种至96孔板中,同时设置空白孔,周围孔加入100μL PBS,37℃、5%CO₂饱和湿度条件过夜培养。按照分组条件处理48h后,向每孔加入10μL CCK-8溶液,37℃培养4h,振荡10min,用酶标仪(美国Thermo scientific, MK3型)测定各孔在450nm处的吸光值(A)。细胞增殖率(%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.2.3 Transwell小室实验检测细胞迁移 取处于对数生长期的细胞,0.25%胰酶消化后,用1640培养基制成单细胞悬液,计数后按照每孔 5×10^5 个细胞均匀接种至6孔板中,37℃、5%CO₂饱和湿度条件过夜培养。按照分组条件处理48h,0.25%胰酶消化收集,1200r/min,离心3min,去上清,PBS润洗2次,清洗掉残余血清。无血清培养基重悬细胞,细胞计数板计数,用无血清培养基稀释细胞浓度至 2×10^5 /mL,备用。在24孔板中加入800μL含10%胎牛血清的培养基,并放入Transwell小室,在Transwell上室分别接入200μL各组细胞悬液,37℃、5%CO₂培养箱培养48h;取出Transwell用PBS清洗小室,用70%冰乙醇溶液固定细胞1h;用0.5%结晶紫染液染色,室温中放置20min,PBS清洗后用干净的棉球将上室一侧的未迁移的细胞擦干净,显微镜下观察拍照,每个小室随机选取5个视野,计数迁移的细胞。

1.2.4 Matrigel胶实验检测细胞管腔形成 于4℃过夜融化Matrigel胶,预冷24孔板和枪头,每孔200μL基质胶加至24孔板,低速无菌离心除去气泡,37℃孵育40min,取上述不同分组处理48h后的细胞,0.25%胰酶消化后,用无血清培养基制成单细胞悬液,计数后按照每孔 2×10^5 个将细胞均匀接种至预铺有基质胶的24孔板中,37℃、5%CO₂饱和湿度条件过夜培养后在显微镜下拍照。随机取3个视野(×100)照相,采用Image J图像分析软件计算完整管腔数(每3个分叉处记作1个血管腔),取平均值。

统计学分析:本研究采用SPSS 17.0软件进行分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采取方差分析和LSD-t检验进行比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

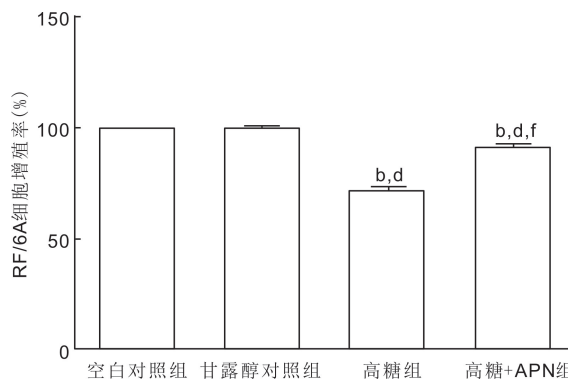


图1 各组细胞增殖率比较 ^b $P < 0.001$ vs 空白对照组; ^d $P < 0.001$ vs 甘露醇对照组; ^f $P < 0.001$ vs 高糖组。

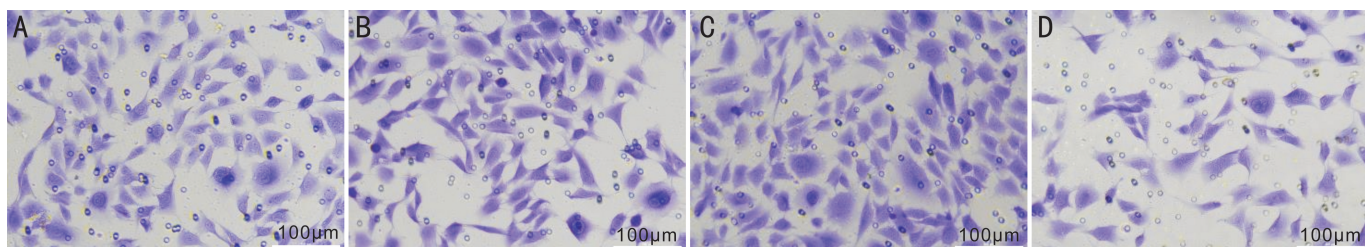


图2 各组 RF/6A 细胞迁移情况 ($\times 200$) A: 空白对照组; B: 甘露醇对照组; C: 高糖组; D: 高糖+APN 组。

2 结果

2.1 APN 促进高糖条件下的 RF/6A 细胞增殖

CCK-8 实验结果显示,空白对照组($100.00\% \pm 0.00\%$)、甘露醇对照组($99.09\% \pm 0.46\%$)、高糖组($71.42\% \pm 2.29\%$)、高糖+APN 组($90.87\% \pm 1.68\%$) 细胞增殖率比较,差异具有统计学意义($F = 254.16, P < 0.001$)。空白对照组与甘露醇对照组细胞增殖率差异无统计学意义($P > 0.05$),提示高渗透压对细胞增殖无明显影响。高糖组细胞增殖率明显低于空白对照组和甘露醇对照组(均 $P < 0.001$),提示高糖培养条件下的细胞增殖受到明显抑制。高糖+APN 组细胞增殖率明显低于空白对照组和甘露醇对照组(均 $P < 0.001$),而明显高于高糖组($P < 0.001$),提示 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ APN 处理后细胞增殖较高糖培养条件下有所增强,但仍然低于正常水平,见图 1。以上结果表明,高糖条件下细胞增殖低于对照组,APN 对细胞增殖具有保护效应。

2.2 APN 抑制高糖诱导的 RF/6A 细胞迁移

Transwell 实验结果显示,空白对照组(121.60 ± 6.02 个)、甘露醇对照组(119.60 ± 9.39 个)、高糖组(144.20 ± 9.65 个)、高糖+APN 组(73.00 ± 6.04 个) 细胞迁移数比较,差异具有统计学意义($F = 70.28, P < 0.001$)。空白对照组与甘露醇对照组细胞迁移数差异无统计学意义($P > 0.05$),提示高渗透压对细胞迁移无明显影响。高糖组细胞迁移数明显高于空白对照组和甘露醇对照组(均 $P < 0.001$),提示高糖培养条件下细胞迁移明显增强。高糖+APN 组细胞迁移数明显低于空白对照组、甘露醇对照组和高糖组(均 $P < 0.001$),提示 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ APN 处理后细胞迁移较高糖培养条件下有所减弱,且低于正常水平,见图 2、3。上述结果表明,高糖条件可以明显诱导 RF/6A 细胞发生迁移,而 APN 作用后对高糖诱导的细胞迁移具有明显的抑制作用。

2.3 APN 抑制高糖诱导的 RF/6A 细胞管腔形成

Matrigel 实验结果显示,空白对照组(12.11 ± 0.84 个)、甘露醇对照组(12.22 ± 0.96 个)、高糖组(16.00 ± 2.90

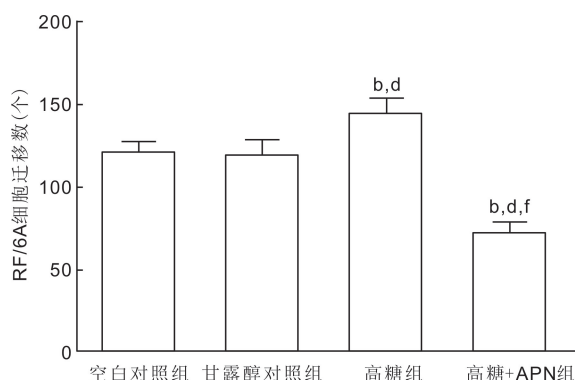


图3 各组细胞迁移数比较 ^b $P < 0.001$ vs 空白对照组; ^d $P < 0.001$ vs 甘露醇对照组; ^f $P < 0.001$ vs 高糖组。

个)、高糖+APN 组(7.89 ± 0.38 个) 细胞管腔形成数比较,差异具有统计学意义($F = 12.92, P < 0.001$)。空白对照组与甘露醇对照组细胞管腔形成数的差异无统计学意义($P > 0.05$),提示高渗透压对细胞管腔形成无明显影响。高糖组细胞管腔形成数明显高于空白对照组和甘露醇对照组(均 $P < 0.05$),提示高糖培养条件下细胞管腔形成明显增强。高糖+APN 组细胞管腔形成数明显低于空白对照组和甘露醇对照组(均 $P < 0.05$),也明显低于高糖组($P < 0.001$),提示 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ APN 处理后细胞管腔形成较高糖培养条件下有所减弱,且低于正常水平,见图 4、5。上述结果表明,高糖条件可以明显诱导 RF/6A 细胞的血管形成,而 APN 作用后对高糖诱导的血管形成具有抑制作用。

3 讨论

高血糖是 DM 最基本的病理生理状态,在 DM 血管并发症的发生发展中起着重要作用。高血糖导致的血管渗透性增加,炎症和内皮细胞损伤是 DR 发生发展的基础^[14]。本研究提示,高糖处理 48h 可以明显减少细胞增殖,导致细胞活力下降,与我们前期采用 MTT 实验获得的研究结果一致^[15]。普遍认为,CCK-8 检测的重复

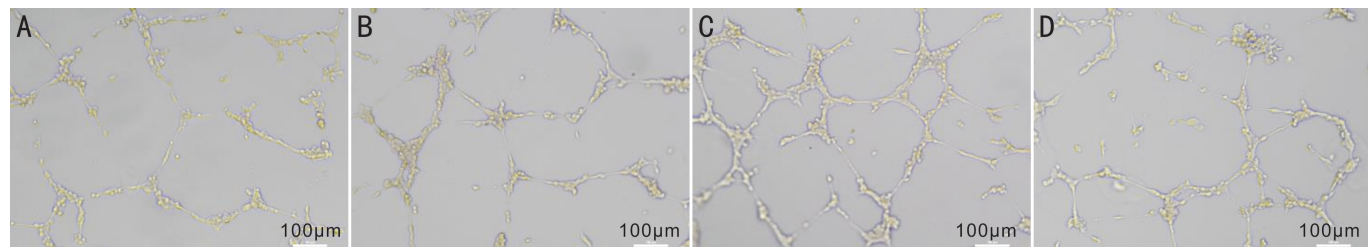


图4 各组 RF/6A 细胞管腔形成情况(×100) A:空白对照组;B:甘露醇对照组;C:高糖组;D:高糖+APN 组。

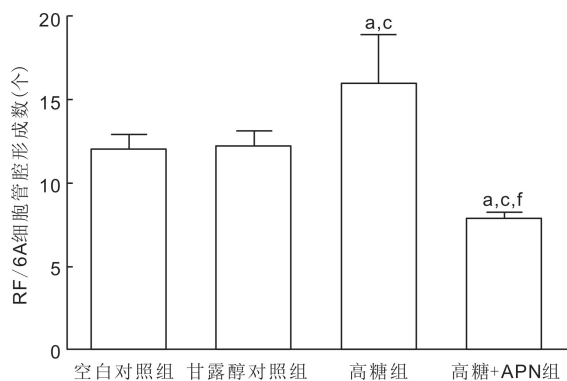


图5 各组细胞管腔形成数比较 ^a $P < 0.05$ vs 空白对照组; ^c $P < 0.05$ vs 甘露醇对照组; ^f $P < 0.001$ vs 高糖组。

性可能优于 MTT,结果变异率小,对细胞毒性小。高糖条件下培养的 RF/6A 细胞迁移和管腔形成能力明显较空白对照组及甘露醇对照组增强,提示高糖是刺激血管生成的直接因素,与文献报道一致^[15-16]。

研究表明,由脂肪细胞分泌的生物活性物质与多种代谢性疾病的发生和发展密切相关,其中 APN 已被证明与代谢综合征、DM 及心血管疾病的发生呈负相关关系^[17]。近年研究提示,APN 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、免疫细胞等靶细胞^[18],通过多种复杂信号通路发挥抗炎、抗氧化应激、改善内皮细胞功能及调节血管新生的作用,从而影响动脉粥样硬化进展、保护血管内皮和心肌、调节微循环及血管新生^[19-21]。血管新生是一个十分复杂的生物过程,涉及细胞增殖、迁移、完整的网络状血管形成等多个环节,各种血管生长因子和细胞因子参与其中。关于内皮细胞血管生成方面的研究提示,APN 对血管新生具有双向调节作用:(1)在组织缺血状态下,APN 可刺激血管新生,建立侧枝循环,改善缺血组织的血供。DM 患者常因血管内皮受损、动脉粥样硬化而影响冠状动脉及外周肢体的血液供应,导致冠心病和肢体坏疽的发生。对该类患者进行血管内皮祖细胞或骨髓单核细胞移植,诱导其在缺血组织中分化而促使血管重建是一种全新的治疗方法^[19]。关于该类细胞移植治疗的研究发现,APN 可促进骨髓单核细胞的存活和增殖,接受细胞移植治疗者必须具有较高的血清 APN 水平才能有效诱导内皮祖细胞的分化,促进血管生成^[22]。APN 可通过激活腺苷酸活化蛋白激酶-内皮型一氧化氮合酶 (AMPK-eNOS) 信号通路发挥诱导人脐静脉血管生成的作用,在小鼠基质胶塞实验和兔角膜新生血管模型中,APN 可刺激血管结构的生长^[23]。此外,APN 可以纠正 APN 基因敲除小鼠由于缺血应激诱导的血管生成受损^[24]。在大脑中动脉闭塞的小鼠模型中发现,APN 的过

度表达明显促进了缺血损伤小鼠大脑的局灶性血管生成^[25]。与上述研究结果相似,本研究结果表明,APN 可以显著促进高糖条件下的 RF/6A 细胞的存活及增殖,提示 APN 对高糖导致的 RF/6A 细胞损伤起一定的保护作用。(2) APN 可以抑制某些病理状态下新生血管的生成。研究发现,APN 可以通过抑制冠状动脉内皮细胞和肿瘤细胞的迁移和增殖发挥抗血管生成效应^[26-29]。缺氧导致的 APN 基因敲除小鼠病理性视网膜血管新生更为严重^[10]。研究显示,给予氧诱导的视网膜病变小鼠腹腔注射重组鼠 APN 蛋白,APN 可以通过激活内源性 eNOS 促进生理性一氧化氮生成,同时又能抑制活性氧簇 (ROS)/活性氮簇 (RNS) 的产生,在缺血性视网膜病变进程中发挥视网膜血管的保护作用^[29]。本研究发现,APN 可以显著抑制高糖条件下的 RF/6A 细胞迁移和管腔形成,提示 APN 对病理刺激条件下的血管生成过程起抑制作用,与上述研究结果一致。

综上,APN 在内皮细胞的血管生成过程中扮演着不同的角色,其促进或抑制效应可能与生理或病理条件、内皮细胞类型、APN 浓度等有关。本研究观察 APN 对高糖条件下 RF/6A 细胞增殖、迁移和管腔形成的作用,结果提示 APN 可以抑制高糖对视网膜血管内皮细胞的损伤,并促进其修复,同时抑制病理性血管生成,但具体机制仍需进一步研究。目前,对 DR 尤其是 PDR 还缺乏完全有效的治疗方法或药物,本研究结果提示 APN 治疗 DR 可能是一种崭新的思路,进一步深入研究 APN 的具体作用机制和信号通路很有可为治疗 PDR 提供新方法。

参考文献

- 1 Abdulsalam S, Ibrahim A, Saidu H, et al. Knowledge, attitude, and practice of diabetic retinopathy among physicians in Northwestern Nigeria. *Niger J Clin Pract* 2018;21(4):478-483
- 2 Li YY, Yang XF, Gu H, et al. The relationship between insulin resistance/ β -cell dysfunction and diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus; the Desheng Diabetic Eye Study. *Int J Ophthalmol* 2018;11(3):493-500
- 3 Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2012;35(3):556-564
- 4 Wilkinson CP, Ferris FL 3rd, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003;110(9):1677-1682
- 5 Zhang SX, Ma JX. Ocular neovascularization; implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 2007;26(1):1-37
- 6 Jeganathan VS. Anti-angiogenesis drugs in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12(3):369-372
- 7 Liu Y, Retnakaran R, Hanley A, et al. Total and high molecular weight but not trimeric or hexameric forms of adiponectin correlate with

- markers of the metabolic syndrome and liver injury in Thai subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(11):4313-4318
- 8 Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 2012;55(9):2319-2326
- 9 Yilmaz MI, Sonmez A, Acikel C, et al. Adiponectin may play a part in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol* 2004;151(1):135-140
- 10 Higuchi A, Ohashi K, Kihara S, et al. Adiponectin suppresses pathological microvessel formation in retina through modulation of tumor necrosis factor- α expression. *Circ Res* 2009;104(9):1058-1065
- 11 Matsuda M, Kawasaki F, Yamada K, et al. Impact of adiposity and plasma adipocytokines on diabetic angiopathies in Japanese Type 2 diabetic subjects. *Diabet Med* 2004;21(8):881-888
- 12 Kato K, Osawa H, Ochi M, et al. Serum total and high molecular weight adiponectin levels are correlated with the severity of diabetic retinopathy and nephropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 68(3):442-449
- 13 Kacso T, Bondor CI, Rusu CC, et al. Adiponectin is related to markers of endothelial dysfunction and neovascularization in diabetic patients. *Int Urol Nephrol* 2018;50(9):1661-1666
- 14 Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 2002;288(20):2579-2588
- 15 Du JH, Li X, Li R, et al. Role of autophagy in angiogenesis induced by high glucose condition in RF/6A cells. *Ophthalmologica* 2017;237(2):85-95
- 16 周赛君, 于珮, 于德民. 高糖对 RF/6A 细胞内 PI3K-Akt 信号通路的影响. *中华临床医师杂志(电子版)* 2012;6(4):928-931
- 17 Antoniadou C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, et al. Adiponectin: from obesity to cardiovascular disease. *Obes Rev* 2009;10(3):269-279
- 18 Brochu GK, Rehfeldt C, Blouin R, et al. Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* 2010;4(1):11-32
- 19 张凌娟, 苏青. 脂联素血管保护机制研究进展. *上海交通大学学报(医学版)* 2010;30(9):1164-1167
- 20 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
- 21 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
- 22 Eren P, Camus S, Matrone G, et al. Adiponectinemia controls proangiogenic cell therapy. *Stem Cells* 2009;27(11):2712-2721
- 23 Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, et al. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004;279(2):1304-1309
- 24 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;279(27):28670-28674
- 25 Shen L, Miao J, Yuan F, et al. Overexpression of adiponectin promotes focal angiogenesis in the mouse brain following middle cerebral artery occlusion. *Gene Ther* 2013;20(1):93-101
- 26 Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, et al. Adiponectin induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(8):2476-2481
- 27 Mahadev K, Wu X, Donnelly S, et al. Adiponectin inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration of human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2008;78(2):376-384
- 28 Man K, Ng KT, Xu A, et al. Suppression of liver tumor growth and metastasis by adiponectin in nude mice through inhibition of tumor angiogenesis and downregulation of rhokinase/IFN-inducible protein 10/matrix metalloproteinase 9 signaling. *Clin Cancer Res* 2010;16(3):967-977
- 29 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