ORIGINAL ARTICLE

Adiponectin Effects on Osteonectin Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cell Line

Sara Niknam[1],
Keihan Ghatreh Samani[2],
Seyed Asadollah Amini[3],
Effat Farokhi[3]

[1] MSc Student in Clinical Biochemistry, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[2] Asistant Professor, Department of Biochemistry, Cellular and Molecular Research Centre, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[3] Asistant Professor, Department of Biochemistry, Clinical Biochemistry Research Centre, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

(Received August 17, 2013 ; Accepted December 22, 2013)

Abstract

Background and purpose: Atherosclerosis is a major cause of death in adults in most countries. Many studies have focused on the protective role and anti-inflammatory properties of adiponectin but its role in calcification has been less studied. Studies that could determine the causes and mechanisms of calcification could be of great value. The aim of this study was to investigate the effects of adiponectin on osteonectin gene expression, a protein involved in vascular calcification.

Materials and methods: In this experimental study, vascular smooth muscle cells were obtained from Pasteur Institute of Iran and were cultured in F12K medium containing β-glycerophosphate as calcifying stimuli. The cells were treated with 5µg/ml adiponectin. At 24 and 48 hours osteonectin gene expression in these cells was studied against control cells using real time PCR.

Results: We observed that adiponectin increased osteonectin gene expression against control cells 2.17 and 3.6 fold in vascular smooth muscle cells at 24 and 48 hours, respectively.

Conclusion: Increasing the expression of osteonectin gene lead to increases in calcification, therefore, adiponectin could be considered as a risk factor for atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, vascularsmooth muscle cells, adiponectin, osteonectin.

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(109): 216-222 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۹ بهمن سال ۱۳۹۲ (۲۲۲-۲۱۶)

اثر آدیپونکتین بر بیان ژن استئونکتین در رده سلولی عضله صاف رگ

سارا نیکنام[۱]
کیهان قطره سامانی[۲]
سید اسد الله امینی[۳]
عفت فرخی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: آترواسکلروز یکی از دلایل عمده مرگ و میر در بزرگ‌سالان در اکثر جوامع است، بیش‌تر مطالعات بر نقش محافظتی آدیپونکتین و خواص ضد التهابی آن متمرکز بوده و نقش آن برکلسیفیه شدن عروق کم‌تر مورد توجه بوده است. بنابراین مطالعاتی که به مشخص کردن مکانیسم و علل کلسیفیه شدن کمک کند، می‌توانند ارزشمند باشند. هدف این مطالعه بررسی اثر هورمون آدیپونکتین بر بیان ژن استئونکتین که یکی از پروتئین‌های مؤثر در کلسیفیه شدن عروق است، می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های عضلانی صاف عروق از انستیتو پاستورایران تهیه و در محیط کشت F12K حاوی بتاگلیسروفسفات به عنوان محرک کلسیفیه شدن، کشت شدند. سلول‌ها با غلظت ۵ µg/ml آدیپونکتین تیمار گردید و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته، بیان ژن استئونکتین در این سلول‌ها در مقابل کنترل با استفاده از تکنیک Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: آدیپونکتین بیان ژن استئونکتین را در سلول‌های عضلات صاف رگ‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته نسبت به کنترل به ترتیب ۲/۱۷ و ۳/۶ بار افزایش می‌دهد.

استنتاج: آدیپونکتین با افزایش بیان ژن استئونکتین می‌تواند به عنوان یک عامل خطر در تشدید کلسیفیکاسیون در آترواسکلروز عمل کند.

واژه های کلیدی: آترواسکلروز، سلول‌های صاف دیواره رگ‌ها، آدیپونکتین، استئونکتین

مقدمه

تصلب شرایین با رسوب لیپید و مواد دیگر در دیواره داخلی برخی رگ‌ها مشخص می شود. نتیجه این فرآیند تشکیل پلاک‌های فیبری– چربی (آتروما) بوده که با افزایش سن افزایش می‌یابد(۱) و موجب تنگی رگ‌ها می‌گردد. این بیماری یکی از دلایل عمده مرگ و میر در بزرگ‌سالان است و هزینه‌های هنگفتی را به جوامع تحمیل می‌کند(۲، ۳). آترو اسکلروز از تشکیل نوارهای چربی (Fatty Streaks) در لایه اینتیمای رگ‌ها شروع و در سیر خود به پلاک فیبرو آتروما، پلاک فیبروزه و پلاک‌های عارضه دار تبدیل می‌شود(۴، ۵). فعالیت التهابی در بسیاری از سلول‌های ایمنی موجود در آتروم دیده شده است و سایتوکاین‌های بسیاری توسط

مولف مسئول: کیهان قطره سامانی– شهرکرد: رحمتیه، دانشکده پزشکی،گروه بیوشیمی E-mail:kgsamani@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. استادیار، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳. استادیار، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۵/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۶/۱ تاریخ تصویب :۱۳۹۲/۹/۳۰

این سلول‌ها تولید می‌گردد(۵).کلسیفیه شدن آتروم طبق یک فرآیند فعال و تنظیم شده در دیواره عروق از ابتدای تشکیل آتروم شروع شده و با افزایش کلسیفیه شدن، احتمال پارگی آتروم نیز بیش‌تر می‌گردد(۶، ۷). علت کلسیفیه شدن رگ‌ها، تمایز سلول‌های عروقی به‌دنبال تحریک با سایتوکاین ها، فاکتورهای التهابی و لیپوپروتئین‌های تغییر یافته در پلاک‌های آتروم، می‌باشد(۸). کلسیفیه شدن آترواسکلروتیک از نظر تمایز استئوبلاست و کندروسیت، معدنی شدن و رسوب ماتریکس استخوانی با کلسیفیه شدن و تشکیل استخوان مشابه است(۹، ۱۰).

مطالعات نشان می‌دهند عروق کلسیفیه شده و سلول‌های عروقی در محیط کشت، پروتئین‌های ماتریکس استخوان از جمله استئونکتین (ON) را بیان می‌کنند(۱۱، ۱۲).استئونکتین در همه مراحل تشکیل آتروم بیان می‌شود و به نظر می‌رسد از تنظیم کننده‌های مثبت کلسیفیه شدن عروق می باشد(۱۳، ۱۴). این گلیکو پروتئین در استخوان توسط استئوبلاست ترشح شده و باعث شروع معدنی شدن و هم‌چنین افزایش تشکیل بلور می‌گردد. این پروتئین هم‌چنین تمایل زیادی برای اتصال به کلسیم و کلاژن بافتی دارد. مشخص شده که استئونکتین در خون بیماران مبتلا به آترواسکلروز افزایش قابل توجهی نشان می‌دهد و به عنوان یک شاخص تمایز آترو ژنیک در آترو اسکلروزمطرح می‌باشد(۱۵، ۱۶).

آدیپو نکتین انسانی در شرایط طبیعی تماماً در بافت چربی بیان می‌شود(۱۷). گیرنده آدیپو نکتین در سلول‌های آئورت انسانی شناسایی شده(۱۸، ۱۹) و ثابت شده که ویژگی‌های ضد التهابی دارد، پس می‌تواند تولید آتروم در دیواره عروق را کاهش دهد. تبدیل ماکروفاژ به سلول‌های کفی (foam cell) و هم‌چنین برداشت ox LDL توسط ماکرو فاژ در حضور آدیپونکتین کاهش می‌یابد(۲۰، ۲۱). آدیپو نکتین از چسبیدن مونوسیت‌ها و بیان مولکول‌های مسئول چسبیدن لکوسیت در سلول‌های اندوتلیوم جلوگیری می‌کند(۲۲). سطح آدیپونکتین در چاقی، دیابت نوع ۲ و بیماری عروق کرونری (CAD) کاهش می‌یابد(۲۳). یک ارتباط مستقیم بین مقدار - cHDL و apo A-1 پلاسما و غلظت آدیپونکتین در انسان نشان داده شده است، هرچند مکانیسم آن هنوز مشخص نیست(۲۴). در عین حال بعضی مطالعات نشان دهنده ارتباط مثبت بین آدیپونکتین و ریسک ابتلا به بیماری عروق کرونر در افراد مسن تر است(۲۵). در مطالعه‌ای برروی مردان بریتانیایی مسن که علائم بیماری عروق کرونر را نداشتند، مشاهده شد که غلظت بالای آدیپونکتین با ریسک بالای بیماری عروق کرونر مرتبط است(۲۶، ۲۷).

علی‌رغم این‌که بیش‌تر مطالعات بر نقش محافظتی آدیپونکتین در آترو اسکلروز اشاره دارد، ولی یافته‌های متضاد با این مطلب نیز گزارش شده است. هم‌چنین بیش‌تر مطالعات بر خواص ضد التهابی متمرکز بوده و نقش آدیپونکتین برکلسیفیه شدن عروق کم‌تر مورد توجه بوده و تنها در چند مطالعه از جمله تأثیر آدیپونکتین بر تمایز استئوبلاستیک سلول‌های ماهیچه صاف، کلسیفیه شده دیواره عروق (CVSMCs) بررسی شده و ثابت شده کلسیفیکاسیون از طریق مسیر سیگنالینگ AdipoR1/p38 توسط آدیپونکتین مهار می‌گردد(۲۸).

با توجه به اهمیت کلسیفیکاسیون در فرآیند آتروژنیسیته و نقش پروتئین‌هایی مانند استئونکتین در فرایند کلسیفیه شدن، مطالعاتی مانند مطالعه حاضر که به علت‌یابی یا روند کند کردن این فرآیند کمک می‌کنند، می‌توانند بسیار ارزشمند باشند.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار سلول:

در این مطالعه تجربی، سلول‌های عضلانی صاف عروق (VSMC) که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند، در محیط کشت F12K کشت داده شد. این

محیط کشت حاوی ۰/۰۵ mg/ml اسکوربیک اسید، ۰/۰۱ mg/ml انسولین، ۰/۰۵ mg/ml ترانسفرین، ۱۰ng/ml سدیم سلنیت، ۰/۰۳mg/ml مکمل‌های رشد سلول‌های اندوتلیال (EGFS)، ۱۰ درصد FBS ، HEPES۱۰mM، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین ۱۰۰، U/ml ۱۰۰ استرپتومایسین و ۰/۰۱ درصد آمفوتریسین می‌باشد. جهت ایجاد یک محیط استئوژنیک، به محیط کشت بتاگلیسروفسفات (10 میلی مولار) اضافه گردید. سلول‌ها در فلاسک مناسب در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO2 و رطوبت مناسب کشت داده شد. کنترل روزانه سلول‌های در حال کشت از نظر شرایط رشد و تقسیم سلولی و غیره انجام شد و بر حسب نیاز پاساژ داده شدند. بعد از رشد و تکثیر سلول‌ها، از پاساژ ۴ تا ۶ برای انجام آزمایشات استفاده گردید.

سلول‌ها در پلیت ۱۲ خانه مخصوص کشت به میزان ۱۵ هزار در هر چاهک، تقسیم گردید. وقتی تراکم سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها با آدیپونکتین (Adiponectin HMW_ rich Human HEK293)تهیه شده از شرکت Bio Vendor، در برابر گروه کنترل تیمار گردید. غلظت آدیپونکتین به‌کار رفته در این آزمایشات، 5µg/ml بود(۱). پس از۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت سلول‌ها با آدیپونکتین، سلول‌های تیمار شده و سلول‌های کنترل (بدون مجاورت با آدیپونکتین)، تریپسینه و جمع‌آوری شدند، تا در مراحل بعد RNA آن‌ها استخراج گردد.

استخراج RNA و ساخت cDNA:

RNA با استفاده از کیت بیوزول (Bioflux-Malaysia) وطبق دستورالعمل مربوطه استخراج شده و غلظت و کیفیت آن به روش اسپکتروفوتومتری در مقیاس کم (نانودراپ) تعیین و تأیید گردید. سپس با استفاده از کیت و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Thermo-Canada)در حدود ۳ میکروگرم از هر نمونه RNA حاصله برای ساختن cDNA به کار رفت.

بررسی بیان ژن استئونکتین:

بیان ژن استئونکتین با روش Real Time PCR و با استفاده از سایبر گرین (Syber green) توسط دستگاه Rotor-Gene(Corbett 3000-Australia) بررسی گردید. از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده گردید و میزان بیان ژن استئونکتین در گروه‌های تیمار شده و کنترل مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. برای هر نمونه ۳ تکرار انجام گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ آورده شده است. شرایط انجام آزمایش عبارت بود از: ۵ دقیقه فعال شدن آنزیم در دمای ۹۵ درجه، ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۹ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورداستفاده و طول محصول

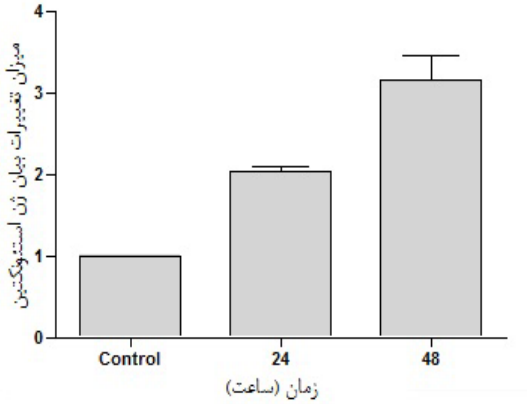
ژن	توالی پرایمر ('5-'3)	طول محصول
GAPDH	Forward: ACACCCACTCCTCCACCTTTG Reverse: TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	۱۱۲
Osteonectin	Forward: TCTTCCCTGTACACTGGCAGTTC Reverse: AGCTCGGTGTGGGAGAGGTA	۷۳

پس از انجام آزمایش، به منظور تأیید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیراختصاصی و پرایمر دایمر، نمودار منحنی ذوب (Melting Curve) برای هر ژن، مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان ژن استئونکتین با روش کمی نسبی و تعیین ΔΔCT ارزیابی گردید (تیمار نشده) ΔCT – (تیمار شده) ΔCT =]ΔΔCT. جهت بررسی میزان بازدهی واکنش، نمودار استاندارد رسم گردید. به این منظور رقت‌های مختلفی از cDNA تهیه شد و برای آن‌ها واکنش Real Time PCR انجام گردید. سپس منحنی استاندارد برحسب غلظت‌های مختلف cDNA و میزان Ct (cycle threshold) آن‌ها، توسط دستگاه Real TimePCR رسم گردید و بازدهی واکنش تعیین شد. در نهایت داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 11.5 و آزمون آماری t- test آنالیز و مقایسه شدند.

یافته ها

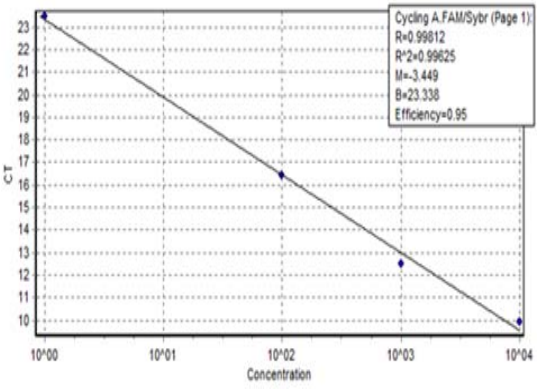
تأثیر آدیپونکتین به میزان 5µg/ml بر روی

سلول‌های VSMC نشان داد، آدیپونکتین بیان ژن استئونکتین را در سلول‌های VSMC در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲/۱۷ و۳/۶ بار افزایش داد (نمودار شماره ۱) (p< ۰/۰۵). نتایج حاصل از ۳ بار تکرار می‌باشد.



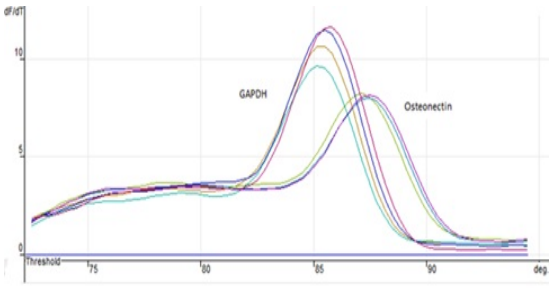
نمودار شماره ۱: تاثیر آدیپونکتین با غلظت ۵µg/ml بر بیان ژن استئونکتین در رده سلولی VSMC در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت

پس از ترسیم منحنی استاندارد برای ژن مرجع (GAPDH) و استئونکتین، شیب منحنی استاندارد به ترتیب ۳/۴۴۹- و ۳/۴۴۵- محاسبه شد و میزان بازده واکنش با استفاده از شیب منحنی استاندارد به ترتیب ۹۵ درصد و ۹۵/۱ درصد محاسبه شد. نمودار شماره ۲ منحنی استاندارد مربوط به ژن مرجع را نشان می دهد.



نمودار شماره ۲: منحنی استاندارد مربوط به ژن مرجع

نمودار حاصل از منحنی ذوب، تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر و عدم جفت شدن پرایمرها را نشان داد (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: منحنی ذوب واکنش real time مربوط به بیان ژن استئونکتین در مقابل ژن مرجع GAPDH

بحث

نتایج نشان داد که آدیپونکتین، بیان ژن استئونکتین را در سلول‌های VSMC افزایش داده است و به عنوان یک عامل افزایش دهنده کلسیفیکاسیون در شرایط آزمایشگاهی عمل می‌کند. در مطالعه‌ای که در مورد تأثیر آدیپونکتین به روی تکثیر و تمایز سلول‌های استئوبلاست صورت گرفت، مشخص شد که آدیپونکتین تکثیر سلول‌های استئوبلاست را زیاد می‌کند و باعث افزایش وابسته به دوز و زمان فعالیت آلکالن فسفاتاز و تولید پروتئین استئوکلسین و کلاژن نوع ۱ می‌شود(۲۹). حال با توجه به یافته این مطالعه در سلول‌های VSMC، افزایش بیان استئونکتین که یکی دیگر از پروتئین‌های ترشح شده توسط استئوبلاست‌ها است دور از ذهن نمی‌باشد. در مطالعه دیگری که به بررسی کلسیفیکاسیون عروقی در موش‌های با کمبود آدیپونکتین در بدن و تأثیر آدیپونکتین در سلول‌های عضلانی صاف دیواره عروق در شرایط آزمایشگاهی پرداخته بود، مشاهده شد که آدیپونکتین فعالیت آلکالن فسفاتاز، ترشح استئوکلسین، بیان پرتئین Runx2 و معدنی شدن را در سلول‌های عضلانی صاف دیواره عروق کلسیفیه شده (CVSMCs) مهار می‌کند، یعنی آدیپونکتین

در مطالعه ذکر شده به عنوان کاهش دهنده پروتئین‌های درگیر در کلسیفیکاسیون عمل کرده است(۳۰). غلظت آدیپونکتین به کار رفته در مطالعه ذکر شده ۳۰µg/ml و مدت اثر آن ۲۰ روز بوده، به علاوه در شرایط In vivo صورت گرفته است که به نظر می رسد اختلاف نتایج این مطالعه با مشاهدات ما به دلایل فوق بوده است.

مطالعه دیگری که به بررسی ارتباط بین آدیپونکتین و بیماری عروق کرونر قلبی در بزرگ‌سالان مسن پرداخته بود مشاهده شد، بین افزایش آدیپونکتین و افزایش ریسک ابتلا به بیماری عروق کرونر قلبی ارتباط مستقیم وجود دارد(۲۵). غلظت آدیپونکتین در این مطالعه ۱۲/۶µg/ml است و به آدیپونکتین نقش آتروژنیک داده شده است.

در مطالعه‌ای سطح استئونکتین در خون بیماران مبتلا به کلسینوز عروق، افزایش نشان داده و این پروتئین به‌عنوان بیومارکر تشخیصی پیشنهاد شده است و تنها نقش احتمالی برای ایجاد آترواسکلروز به استئونکتین نسبت داده شده است(۱۵). در حالی که ممکن است استئونکتین به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های محافظتی در بیماران مبتلا به کلسینوز عروق کرونر افزایش پیدا کرده باشد. از آن‌جایی‌که به نقش استئونکتین به‌عنوان عامل افزاینده ریسک آترواسکلروز به‌طور قطع اشاره نشده است، اگر این پروتئین نقش فعال‌سازی درکلسیفیه شدن نداشته باشد و به‌عنوان مهارکننده کلسیفیکاسیون عمل نماید، طبیعی است که نقش محافظتی آدیپونکتین که در مطالعات مکرری اثبات شده با یافته‌های مطالعه حاضر نیز هم‌سو خواهد بود.

به‌طور خلاصه اگر استئونکتین به عنوان عامل فعال کننده کلسیفیه شدن عروق در نظر گرفته شود، با توجه به این نکته که در این مطالعه استئونکتین تحت تأثیر آدیپونکتین افزایش یافته است، می‌توان نتیجه گرفت آدیپونکتین با تشدید فرایند کلسیفیه شدن در سلول‌های دیواره عروق می‌تواند باعث تشدید آترواسکلروز شود اما اگر استئونکتین به‌عنوان یک عامل دفاعی و جبران کننده در بیماران مبتلا به تنگی عروق درنظرگرفته شود، همان‌طورکه آدیپونکتین با ویژگی‌های ضد التهابی در کاهش آترواسکلروز نقش دارد، با افزایش استئونکتین نیز اثر محافظتی در برابر آترواسکلروز خواهد داشت.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که آدیپونکتین باعث افزایش بیان ژن استئونکتین در سلول‌های صاف عضلات عروق می‌گردد و بسته به نقش استئونکتین می‌تواند اثر تشدید کننده و یا مهارکننده در کلسیفیه شدن عروق داشته باشد.

سپاسگزاری

هزینه طرح پژوهشی مربوط به این مطالعه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تأمین گردیده است که بدین‌وسیله تشکر می‌گردد.

References

1. Ding M, Xie Y, Wagner RJ, Jin Y, Carrao AC, Liu LS, et al. Adiponectin induces vascular smooth muscle cell differentiation via repression of mammalian target of rapamycin complex 1 and FoxO4. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2011; 31(6): 1403-1410.
2. Morrison Ph. Melloni's Illustrated Medical Dictionary. 2nd ed. New York: Scientific American, Inc; 2006.
3. Topol EJ, Califf RM. Textbook of cardiovascular medicine: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
4. Bentzon JF, Falk E. Pathology of stable and acute coronary syndrome. In: Acute Coronary Syndromes; A companion to Braunwald's Heart Disease. Threroux P. 1st ed. Saunders; 2003. p. 67-79.
5. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. New England

Journal of Medicine 2005; 352: 1685-1695.
6. Janzen J, Vuong P. Arterial calcifications: morphological aspects and their pathological implications. Zeitschrift für Kardiologie 2001; 90(3): III6-III11.
7. Li JJ, Zhu CG, Yu B, Liu YX, Yu MY. The role of inflammation in coronary artery calcification. Ageing Research Reviews 2007; 6(4): 263-270.
8. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification pathobiology of a multifaceted disease. Circulation 2008; 117(22): 2938-2948.
9. Shioi A, Mori K, Jono S, Wakikawa T, Hiura Y, Koyama H, et al. Mechanism of atherosclerotic calcification. Zeitschrift für Kardiologie 2000; 89(2): S075-S079.
10. Boström K, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2000; 10(2): 151.
11. Boström K, Watson K, Horn S, Wortham C, Herman I, Demer L. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest 1993; 91(4): 1800.
12. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang H-Y, Haynes P, Aebersold R, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification upregulation of cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. Circulation Research 2001; 89(12): 1147-1154.
13. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2001; 21(12): 1998-2003.
14. Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. Medicinal Research Reviews 2001; 21(4): 274-301.
15. Ragino YI, Kashtanova E, Chernjavski A, Volkov A, Polonskaya YV, Tsimbal SY, et al. Blood Level of Osteonectin in Stenosing Atherosclerosis and Calcinosis of Coronary Arteries. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2011; 151(3): 370-373.
16. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiposeMost Abundant Gene Transcript 1). Biochem Biophys Res Commun 1996; 221(2): 286-289.
17. Ekmekci H, Ekmekci OB. The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis. Clinical and applied thrombosis/ hemostasis. 2006; 12(2): 163-168.
18. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-κB signaling through a cAMP-dependent pathway. Circulation 2000; 102(11): 1296-1301.
19. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. Blood 2000; 96(5): 1723-1732.
20. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules adipocyte-derived plasma protein adiponectin. Circulation 1999; 100(25): 2473-2476.
21. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human

monocyte-derived macrophages. Circulation 2001; 103(8): 1057-1063.

22. Yamauchi TKJ, Waki T. The fat derived hormone adiponectin reserves insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. 2000.
23. Shimada K, Miyazaki T, Daida H. Adiponectin and atherosclerotic disease. Clinica Chimica Aacta 2004; 344(1): 1-12.
24. Tsubakio-Yamamoto K, Matsuura F, Koseki M, Oku H, Sandoval JC, Inagaki M, et al. Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications 2008; 375(3): 390-394.
25. Kizer JR, Barzilay JI, Kuller LH, Gottdiener JS. Adiponectin and risk of coronary heart disease in older men and women. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2008; 93(9): 3357-3364.
26. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, et al. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. Journal of Biological Chemistry 2004; 279(2): 1304-1309.
27. Wannamethee SG, Welsh P, Whincup PH, Sawar N, Thomas MC, Gudnarsson V, et al. High adiponectin and increased risk of cardiovascular disease and mortality in asymptomatic older men: does NT-proBNP help to explain this association? Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2011; 18(1): 65-71.
28. Luo XH, Luo XH, Zhao LL, Yuan LQ, Wang M, Xie H, et al. Development of arterial calcification in adiponectin-deficient mice: adiponectin regulates arterial calcification. J Bone Miner Res 2009; 24(8): 1461-1468.
29. Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ, Xie H, Zhou HD, Wu XP, et al. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. Experimental Cell Research 2005; 309(1): 99-109.
30. Luo XH, Zhao LL, Yuan LQ, Wang M, Xie H, Liao EY. Development of Arterial Calcification in Adiponectin Deficient Mice: Adiponectin Regulates Arterial Calcification. Journal of Bone and Mineral Research 2009; 24(8): 1461-1468.