

ADIPONECTIN DOWN REGULATED INDUCIBLE NITRIT OXIDE (iNOS) EXPRESSION ON HUVEC's CULTURE TREATED WITH LIPO POLYSACCHARIDE (LPS)

ADIPONEKTIN MEREGULASI TURUN EKSPRESI iNOS PADA KULTUR HUVEC's YANG DIPAPAR LIPO POLYSACCHARIDE (LPS)

Yully Endang Hernani
Laboratorium Skill Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRACT

Adiponectin is a adipocyte derivate protein involves in sensitivity of insulin, anti-inflamation, and anti-atherogenic found largely in plasma. The decrease of adiponectin in the plasma is related to obesity, cardiovascular diseases, type II diabetes, hypertension and vascular injuries in nice. In vivo research on strain balb/c mice showed that excessive Adiponectin expression inhibits atherosclerosis with Apo E deficiency. The aim of this research is to find protective mechanisms of adiponectin on vascular utilizing in-vitro Infected HUVEC's culture. There were 5 groups :(A) control negative group or normal HUVEC's, (B) control positive group or HUVEC's treated with 10 ug/ml LPS, (C) HUVEC's treated with 10 ug/ml LPS and adiponectin 0,001 ng/ml, (D) HUVEC's treated with 10 ug/ml LPS and adinopectin 0,1 ng/ml, (E) HUVEC's treated with 10 ug/ml LPS and adiponectin 1 ng/ml. This study used CISH (Chromogenic In Situ Hybridization) technique to observe mRNA iNOS expression with 27 bases sequences (5"-aaccttcaaggcagcctgtgagacgtt-3"). The control group did not show mRNA iNOS expression. The iNOS expression increased with LPS Induction, however adiponectin treatment on HUVEC's culture cells decreased of mRNA iNOS. Expression the regulation can be proof by adding antibody to iNOS protein of 24 hours adeponectin treated culture. This study describes that the injection of adiponectin down regulates the expression of iNOS endothelial that treated with LPS. This means that adiponectin may have role in regulating the decrease of iNOS expression.

Keywords : Adiponektin, HUVEC's culture cells, LPS.

PENDAHULUAN

Adiponektin adalah *adipocyte derived protein* yang berfungsi dalam sensitisasi insulin, antiinflamasi, dan antiaterogenik. Adiponektin banyak ditemukan di plasma, secara umum, penurunan adiponektin dalam plasma berhubungan dengan obesitas, penyakit kardiovaskuler, diabetes tipe 2, dan hipertensi. Level adiponektin plasma lebih rendah pada penderita penyakit koroner, menunjukkan bahwa level fisiologis adiponektin diperlukan untuk mempertahankan fenotip normal non-inflamatori dinding vaskuler (1-8)

Penurunan adiponektin pada obesitas dan resistensi insulin diketahui berhubungan dengan disfungsi endotel pada manusia. Hal tersebut sesuai dengan pengamatan yang dilakukan pada hewan coba di mana penurunan adiponektin diketahui dapat memicu perlukaan vaskuler. Penelitian *in vivo* membuktikan bahwa ekspresi berlebihan adiponektin mencegah aterosklerosis pada mencit dengan defisiensi ApoE. Bukti lain yang telah dipublikasikan menunjukkan ikatan adiponektin dengan dinding vaskuler pada perlukaan yang diinduksi kateter, meskipun akibat fungsional perlakuan tersebut belum diketahui (9,10). Data terakhir menghubungkan peran

adiponektin dengan pemeliharaan fungsi endotel. Penurunan availabilitas *Endothelial Nitrit Oxide* (eNO) pada dinding vaskuler menyebabkan disfungsi endotel, dan endotel yang mengalami disfungsi mengekspresikan fenotip proinflamatori yang ditunjukkan dengan peningkatan ekspresi molekul adhesi sel aterogenik yaitu *Cell Adhesion Molecular* (CAM) sebagai akibat hilangnya eNO. Upregulasi CAM pada permukaan sel endotel menginisiasi interaksi patologis leukosit-endotel, yang mengakibatkan paparan dinding vaskuler dan jaringan sekitarnya pada aksi pengrusakan oleh leukosit (6,11-19).

Selain mengalami upregulasi CAM, disfungsi endotel juga menyebabkan penurunan eNO. Hilangnya eNO berperan dalam hipertensi dan akibat lainnya, termasuk peningkatan ekspresi molekul adhesi endotel yang mendasari proses aterosklerosis. Aksi antiinflamasi eNO sebagian besar berdasarkan efek penghambatannya terhadap interaksi leukosit-endotel. Pada tingkat molekuler, NO menekan interaksi leukosit-endotel dengan menghambat eksositosis badan weibel-Palade dan memodulasi aktivitas NF-kB (*Nuclear Factor kappa*) Induksi selektin-E oleh sitokin terjadi pada tingkat transkripsional dan memerlukan aktivasi proteasome-dependent NF-kB. Sama halnya dengan selektin, aktivasi jalur sinyal transduksi NF-kB penting untuk ekspresi VCAM (Vasculer Cell Adhesion Molecular).

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIV, No. 3, Desember 2008 Korespondensi: Yully Endang Hernani, Laboratorium Skill Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, (0341) 569117

Adiponektin diketahui dapat menghambat aktivasi NF- κ B pada sel endotel. Pada penelitian ini, akan diamati pengaruh pemberian adiponektin pada kultur sel endotel HUVEC's yang dipapar dengan *Lipo Polysaccharide* (LPS) dosis akut terhadap regulasi *Inducible Nitric Oxide* (Inos).

METODE PENELITIAN

Sampel dan Cara Pemilihan sampel

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental in vitro pada kultur HUVEC's. Sampel HUVEC's dibagi menjadi 5 kelompok yaitu : (A) Kelompok kontrol negatif yaitu HUVEC's normal, (B) Kelompok kontrol positif yaitu HUVEC's dipapar LPS 10 ug/ml, (C) HUVEC's dipapar LPS 10 ug/ml dan adiponektin 0,001 ng/ml, (D) HUVEC's dipapar LPS 10 ug/ml dan adiponektin 0,1 ng/ml, (E) HUVEC's dipapar LPS 10 ug/ml dan adiponektin 1 ng/ml. Sampel penelitian ini adalah sebagian umbilikus (tali pusat) yang diambil dari wanita yang partus di rumah sakit yang sesuai dengan kriteria inklusi, yaitu kehamilan fisiologis dan eksklusif, yaitu kehamilan dengan pre-eklampsia/eklampsia, hipertensi, *post date*, *premature rupture membrane*, *grande multipara*, *gestasional diabetes*.

Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel endotel (HUVECs)

Umbilikus dibersihkan dari darah yang ada dengan kertas tisu yang disemprot dengan alkohol 70 % dan masing-masing ujung umbilikus dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan satu vena. Vena akan terlihat mempunyai dinding yang lebih tebal, lebih besar dan elastis. *Cannule* dimasukkan pada salah satu ujung vena (± 1 cm), kemudian diikat erat dengan benang. Vena dibersihkan / dibilas dengan 10 ml larutan PBSA melalui *cannule* yang telah terpasang dengan spuit 10 cc. Setelah bersih, ujung umbilikus yang lain diikat yang kuat (atau diklem). Larutan *Collagenase* 0,15ng/ml dimasukkan seperti cara 4 dan spuit dibiarkan menancap pada *cannule*. Selanjutnya umbilikus dihangatkan dengan cara didekap dengan kedua belah tangan dan didekatkan dengan Bunsen (agar mencapai suhu ~ 37 °C) selama 7 menit. *Collagenase* (yang telah mengandung endotel) dikeluarkan dari umbilikus dengan cara menyedot melalui spuit yang masih terpasang pada ujung *cannule*. Kemudian larutan *Collagenase* tersebut dimasukkan pada tabung sentrifuge steril 15 cc. Umbilikus dibilas dengan 8 cc larutan PBS A seperti cara 5 untuk membilas sel endotel yang masih tersisa. Kemudian larutan disedot kembali dengan seperti cara 6 dan ditambahkan ke dalam tabung sentrifuge. Larutan yang telah mengandung sel endotel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 4 ml medium kultur pada pellet dan diresuspensi dengan cara pipetting sehingga sel-sel endotel terpisah.

Larutan dipindahkan ke dalam well plate diameter 35 cm² yang sebelumnya telah dilapisi dengan larutan gelatin 0,2%, ditambahkan medium sampai 2ml/medium kemudian dimasukkan pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 20 menit. Well plate diambil dan sel endotel diamati dengan mikroskop *inverted* perbesaran 400x. Jika sel sudah menempel pada dasar well, medium kultur diambil dan sel dibilas dengan larutan serum free 3 ml melalui filter 0,2 μ m. *Serum free* diambil dengan spuit steril dan digantikan dengan medium kultur 4 ml melalui filter 0,2 μ m. Well plate dimasukkan ke dalam inkubator sampai monolayer kurang lebih 3-4 hari dan medium diganti setiap 2 hari sekali. Sel endotel ditandai dengan gambaran sel berbentuk heksagonal atau *cobblestone* dengan inti eksentrik.

Eksresi protein iNOS dengan teknik imunositokimia

Biakan dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan dilakukan fiksasi menggunakan methanol selama 10 menit. Dibilas dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Bloking endogenous peroksida menggunakan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Bloking unspezifis protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan rabbit poliklonal anti iNOS, selama 60 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan *anti rabbit HRP conjugated* selama 40 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*) dan diinkubasi selama 10 menit. Dicuci menggunakan dH₂O, selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit dan dicuci menggunakan *tap water*. Dibilas menggunakan dH₂O dan dikering anginkan. Mounting menggunakan entelan dan ditutup dengan *cover glass*. Amati pada mikroskop cahaya.

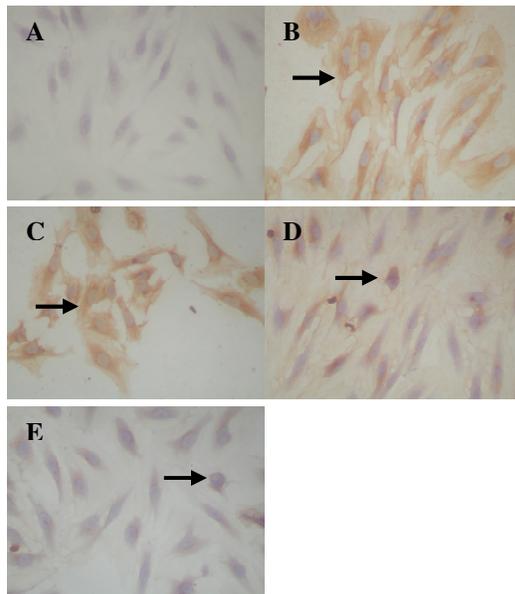
CISH (*Cromogenic in-situ Hybridization*) mRNA iNOS

Biakan sel dicuci dengan HEPES buffer dan dikeringkan, ditambahkan DNase dalam 2x SSC buffer dan diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Dicuci dengan dH₂O steril dan dibilas dengan 2X SSC buffer selama 10 menit. Refiksasi dengan 4% paraformaldehide 10 menit pada suhu ruang, selanjutnya dibilas dengan dH₂O steril selama 10 menit dan didehidrasi dengan alcohol berseri dari 70% sampai 100%, masing-masing selama 10 menit. Dikeringkan pada 37°C selama 10 menit. Masing-masing direaksikan dengan 10uL iNOS yang telah berlabel biotin. Slide didenaturasi pada 85°C selama 10 menit, dan diinkubasi pada 37°C semalam untuk proses hibridisasi. Dicuci slide dengan *washing solution* pada 55°C selama 45 menit dan diinkubasi pada *washing solution* selama tiga kali 60 menit.

Diinkubasi pada 2XSSC buffer 15 menit pada suhu ruang. Diinkubasi pada 0,1 x SSC buffer pada 50°C selama 15 menit dan selanjutnya diinkubasi pada buffer yang sama selama 30 menit pada suhu ruang. Didehidrasi kembali slide menggunakan etanol seri dari 30% sampai 95%, yang masing-masing mengandung 0,3M ammonium asetat, dan etanol absolut, masing-masing selama 1 menit. Dicuci dengan TNT buffer, diulangi selama tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Kemudian diblocking menggunakan TNB buffer semalam. Reaksikan dengan SA-HRP (1:500 dalam TNB buffer), selama 30 menit dalam suhu ruang. Dicuti dengan TNT buffer, tiga kali, masing-masing selama 15 menit. Kemudian diinkubasi dalam cromogen – DAB 10 menit, dan dibilas dengan TNT buffer, tiga kali, masing-masing selama 15 menit. Serap dengan kertas tissue sisa TNT buffer. *Counterstaining* dengan mayer hematoxilen selama 10 menit dan dibilas dengan *tap water*. Slide dikering-anginkan dan ditetesi entelan dan ditutup dengan *cover glass*. Amati pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

HASIL PENELITIAN

Adiponektin meregulasi turun mRNA iNOS Kultur sel Endotel yang dipapar dengan LPS

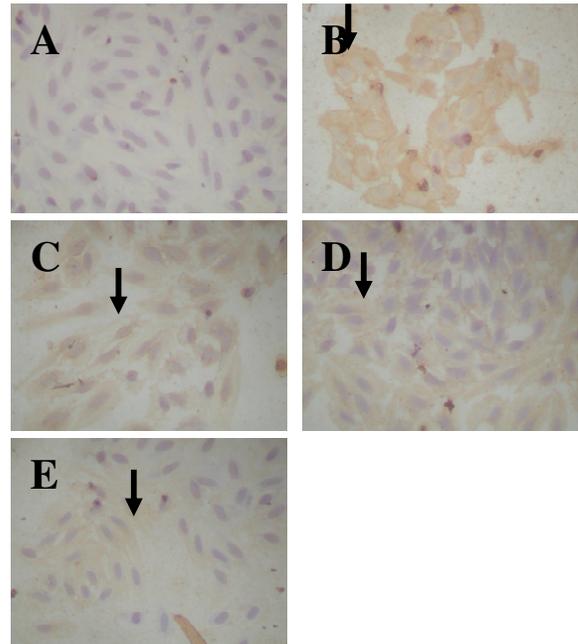


Gambar 1. Ekspresi mRNA iNOS menggunakan probe iNOS (5'-aacctcaaggcagcctgtgagacgtt-3') biotin labeled.

Keterangan:

- A : Kelompok kontrol negatif/ HUVEC's normal
- B : Kelompok kontrol positif/ HUVEC's dipapar LPS 10 ug/mL
- C : HUVEC's dipapar LPS 10 ug/ML dengan adiponektin 0,001 ug/mL
- D : HUVEC's dipapar LPS 10 ug/ML dengan adiponektin 0,1 ug/mL
- E : HUVEC's dipapar LPS 10 ug/ML dengan adiponektin 10 ug/mL

Tampak bahwa pada kelompok kontrol (A) (tanpa mendapat perlakuan) mRNA iNOS tidak terekspresi. Namun dengan perlakuan menggunakan LPS (B) tampak sekali terjadi peningkatan ekspresi mRNA iNOS. Pada kelompok yang mendapatkan paparan LPS dengan penambahan Adiponektin (C;D;E) terjadi penurunan ekspresi mRNA iNOS. Adiponektin meregulasi turun protein iNOS Kultur sel Endotel yang dipapar dengan LPS dosis 10ug/mL



Gambar 2. Ekspresi protein iNOS kultur endotel yang diperlakukan LPS 10ug/mL (B).

Keterangan:

- A : Kelompok kontrol negatif/ HUVEC's normal
- B : Kelompok kontrol positif/ HUVEC's dipapar LPS 10 ug/mL
- C : HUVEC's dipapar LPS 10 ug/ML dengan adiponektin 0,001 ug/mL
- D : HUVEC's dipapar LPS 10 ug/ML dengan adiponektin 0,1 ug/mL
- E : HUVEC's dipapar LPS 10 ug/ML dengan adiponektin 10 ug/mL

Tampak bahwa terjadi peningkatan ekspresi protein iNOS dibandingkan dengan kelompok kontrol (A). Pada kelompok yang mendapatkan LPS 10ug/mL dengan paparan Adiponektin, C dan D, tampak terjadi penurunan ekspresi protein iNOS dibandingkan kelompok induksi LPS saja (B), demikian juga pada kelompok E tampak terjadi penurunan ekspresi protein iNOS.

Dengan menggunakan teknik CISH (*Chromogenic in-situ Hybridization*) dapat diketahui ekspresi mRNA iNOS pada pengamatan menggunakan mikroskop cahaya biasa. Digunakan 27 urutan basa (5'-aacctcaaggcagcctgtgagacgtt-3') yang dilabel menggunakan biotin sebagai probe yang komplementer dengan mRNA iNOS post-transkripsi. Tampak bahwa ekspresi mRNA iNOS terdistribusi pada sitoplasma sel endotel, yang ditunjukkan dengan warna coklat sebagai hasil reaksi enzimatis HRP (*horse radis peroxidase*) dengan DAB (*diamino Benzidine*). Pada keadaan normal/kontrol, tampak

bahwa tidak terdapat ekspresi mRNA iNOS namun dengan induksi LPS 10 μ g/mL ekspresi mRNA iNOS akan meningkat (warna coklat pada sitoplasma sel endotel). Paparan adiponektin pada kultur sel HUVEC's meregulasi turun mRNA iNOS, dengan dosis 0,1ng/mL dan 1ng/mL tampak bahwa ekspresi iNOS tampak mulai tidak tampak, hampir menyamai kondisi kelompok kontrol. Kemudian dilakukan pembuktian dengan memulas ekspresi protein iNOS menggunakan antibodi terhadap iNOS protein, pada kultur 24 jam setelah paparan adiponektin. Tampak bahwa ekspresi protein iNOS mengalami peningkatan pada induksi 10 μ g/mL LPS dan akan mengalami penurunan dengan pemaparan adiponektin dosis 0,001ng/mL; 0,1ng/mL dan 1ng/mL.

DISKUSI

Penelitian ini dilaksanakan untuk mempelajari mekanisme awal disfungsi endotel dikaitkan dengan defisiensi adiponektin. Hasil ini merupakan penelitian yang pertama kali secara *in vitro* yang menggambarkan pengaruh adiponektin terhadap penurunan iNOS endotelial akibat paparan LPS. Lipopolysaccharide merupakan glikolipid utama membran luar bakteri gram negatif yang berpotensi untuk menimbulkan respon biologi seperti apoptosis dan mekanisme inflamasi pada manusia. Inflamasi merupakan reaksi kompleks pada sistem imun bawaan dalam jaringan vaskuler dengan melibatkan aktivitas dan akumulasi leukosit serta plasma pada bagian terinfeksi, atau pada sel yang mengalami jejas. Meskipun inflamasi berperan dalam mengontrol infeksi dan mengeliminasi sel, namun inflamasi juga bisa merusak jaringan dan menyebabkan penyakit (20).

Lipopolysaccharida sebagai komponen utama pada dinding sel bakteri gram negatif, akan membentuk kompleks dengan LBP (*LPS binding Protein*) pada membran. Komplek LBP-LPS akan berinteraksi dengan CD14, membentuk kompleks tersier, LPS-LBP-CD14, yang akan mentransfer LPS pada TLR4 (*toll-like receptor-4*). Proses ini akan mengawali aktivasi sinyal transduksi melalui aktivasi berbagai mekanisme seperti menstimulasi protein kinase seperti protein kinase C, protein tirosine kinase dan kemudian aktivasi NF κ B dan aktivasi protein yang termasuk golongan MAP-K (ERK, JNK/SAP dan p38). Kemudian dapat melepaskan berbagai sitokin seperti *Tumour Necrosis Factor- α* (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β). NF- κ B dapat meregulasi sejumlah gen, termasuk *growth factor* yaitu *vascular endothelial growth factor* (VEGF), sitokin-sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-1 β , RAGE, molekul adesi (VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin), dan iNOS. Berdasarkan hasil penelitian Uchikura *et al* (2004) dibuktikan bahwa pemberian LPS dengan konsentrasi 0-3 μ g/ml pada sel Kupffer meningkatkan mekanisme apoptosis. Sedangkan konsentrasi LPS

antara 3 sampai 10 μ g/ml menghasilkan NO, TNF- α dan superoxide.

Pada kejadian induksi LPS, isoform NOS yang paling berperan adalah iNOS, protein ini tidak pernah ditemukan ada secara fisiologis pada sel yang normal. Namun, gen dari enzim ini dapat secara cepat terekspresi jika terstimuli oleh zat-zat tertentu, misalnya sitokin proinflamasi dan sekali terbentuk, iNOS dapat tetap aktif selama 24-36 jam serta dapat mensintesis NO 100-1000 kali lebih banyak daripada nNOS dan eNOS. Pada sel endotel, NO yang diproduksi akan menyebabkan terjadinya vasodilatasi arterial yang lebih lanjut dapat menyebabkan terjadinya penurunan resistensi vaskuler sistemik.

Paparan dalam jangka panjang endotel vaskuler terhadap metabolit atau mediator inflamasi yang berlebihan, seperti glukosa, asam lemak bebas, LDL teroksidasi, dan sitokin, dapat menyebabkan disfungsi endotel dengan mengganggu homeostasis sel endotel. Penelitian terakhir menekankan pada peran jaringan adiposa dan fungsi sekretorik adiposit yang berubah pada obesitas sebagai penyebab utama disfungsi endotel. Disfungsi jaringan adiposa, seperti yang terjadi pada obesitas dan resistensi insulin, ditunjukkan dengan aktivasi sistemik sinyal inflamasi. Sebagian besar sinyal inflamatorik tersebut secara langsung atau tidak langsung muncul dari produk sekeretorik sel lemak putih dan secara aktif berperan dalam proses induksi disfungsi endotel. Penurunan adiponektin pada obesitas dan resistensi insulin diketahui berhubungan dengan disfungsi endotel pada manusia. Hal tersebut sesuai dengan pengamatan yang dilakukan pada hewan coba di mana penurunan adiponektin diketahui dapat memicu perlukaan vaskuler. Penelitian *in vivo* membuktikan bahwa ekspresi berlebihan adiponektin mencegah aterosklerosis pada mencit dengan defisiensi ApoE. Bukti lain yang telah dipublikasikan menunjukkan ikatan adiponektin dengan dinding vaskuler pada perlukaan yang diinduksi kateter, meskipun akibat fungsional perlakuan tersebut belum diketahui.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan adiponektin pada kultur sel endotel yang mendapatkan induksi LPS mengalami penurunan ekspresi iNOS, hal ini menunjukkan bahwa adiponektin kemungkinan mempunyai peran dalam meregulasi turunnya ekspresi iNOS.

KESIMPULAN

Paparan adiponektin pada kultur endotel yang mendapatkan LPS mengalami penurunan ekspresi iNOS, hal ini menunjukkan bahwa adiponektin mempunyai peran dalam meregulasi turunnya ekspresi iNOS.

Ucapan terimakasih

Kepada kepala Laboratorium BIOMEDIK atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melakukan penelitian ini. Dr. dr. Waskita, SpKC (K)

atas sumbangan cDNA iNOS dan LPS (First Base Inc.). Wibi Riawan Ssi yang telah banyak membantu dalam melakukan penelitian ini.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Goldstein, B.J., and Scalia, R. *Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004;89:2563–2568.
2. Scherer, P.E. *Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ*. Diabetes. 2006;55:1537–1545.
3. Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N, et al. *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999;257:79–83.
4. Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y, et al. *Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000;20:1595–1599.
5. Iwashima, Y., Katsuya, T., Ishikawa, K, et al. *Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension*. Hypertension. 2004;43:1318–1323.
6. Ouchi, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T, et al. *Adiponectin, an adipocytederived plasma protein, inhibits endothelial NFkappaB signaling through a cAMP dependent pathway*. Circulation. 2000;102:1296–1301.
7. Kubota, N. *Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation*. J. Biol. Chem. 2002;277:25863–25866.
8. Matsuda, M., Shimomura L., Sata, M, et al. *Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis*. J. Biol. Chem. 2002;277:37487–37491.
9. Lefer, A.M., and Scalia, R. *Nitric oxide in inflammation*. In Physiology of inflammation. K. Ley, editor. Oxford University Press. New York, New York, USA. 2001;447–472.
10. De Caterina, R., Libby, P., Peng, HB, et al. *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J. Clin. Invest. 1995;96:60–68.
11. Chen, H., Montagnani, M., Funahashi, T., Shimomura, I., and Quon, M.J. *Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells*. J. Biol. Chem. 2003;278:45021–45026.
12. Motoshima, H., Wu, X., Mahadev, K., and Goldstein, B.J. *Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004;315:264–271.
13. Ouedraogo, R., Wu, X., Xu, S, et al. *Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway*. Diabetes. 2006; 55:1840–1846.
14. Valerio, A., Cardile, A., Cozzi V., et al. *TNF- α downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents*. J. Clin. Invest. 2006; 116:2791–2798. doi:10.1172/JCI28570.
15. Neumann, P., Gertzberg, N., and Johnson, A. *TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity*. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2004;286:L452–L459.
16. Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N, et al. *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999;257:79–83.
17. Shimabukuro, M., Higa, N., Asahi T, et al. *Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003;88:3236–3240.
18. Okamoto, Y., Kihara, S., Ouchi, N, et al. *Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation. 2002;106:2767–2770.
19. Nakashima, Y., Raines, E.W., Plump, A.S., Breslow, J.L., and Ross, R. *Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998;18:842–851.
20. Collins, T., Read, MA., Neish, AS., Whitley, MZ., Thanos, D and Maniatis, T. *Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers*. FASEB J. 1998;9:899–909.