

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Caveolin-1 及 ABCA1 蛋白在高密度脂蛋白調控膽固醇外送  
時的結構關係及功能探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2311-B-029-005-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：東海大學生命科學系

計畫主持人：鄭葳

計畫參與人員：鄭葳，林玉俊

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 30 日



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：Caveolin-1 及 ABCA1 蛋白在高密度脂蛋白調控膽固醇外送時的結構關係及功能探討

計畫編號：NSC 94-2311-B-029-005

執行期限：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

主持人：鄭葳 執行機構及單位名稱：東海大學生命科學系

共同主持人： 執行機構及單位名稱：

計畫參與人員：林玉俊 執行機構及單位名稱：東海大學生命科學系

## 一、中文摘要

高密度脂蛋白可藉由膽固醇逆運送的方式來防止動脈硬化的形成，然而對高密度脂蛋白如何將周邊細胞多餘膽固醇攜出的機制尚不清楚。Caveolae 是細胞表面上稱為“膜小囊”的凹陷構造，被認為是細胞內膽固醇釋出的出口。而 Caveolin-1 是 caveolae 的主要結構蛋白，推測和細胞內的膽固醇運送有關，但 caveolin-1 與 caveolae 在膽固醇釋出中扮演的角色還有很多爭議。最近有報導指出與膽固醇釋出有關的另一種膜蛋白“ABCA1”蛋白，具有將細胞膜上膽固醇轉移至 apoA-1 的能力。因此，對於 caveolin-1 與 ABCA1 在高密度脂蛋白移除細胞膽固醇的過程中所扮演的角色及相互關係有待進一步確認。本實驗室最近利用免疫螢光染色發現在含有高膽固醇的內皮細胞中，caveolin-1、ABCA1 及高密度脂蛋白有共同分佈的現象。利用化學聯結法、免疫沉澱法證實 HDL 與 ABCA1 直接連結，ABCA1 與 caveolin-1 直接連結，但 caveolin-1 卻與高密度脂蛋白未直接連結。故我們推測 ABCA1 極可能位於 caveolae 上，擔任由高密度脂蛋白所調控的膽固醇外送時中間媒介的角色。為了更進一步探討 ABCA1 及 caveolin-1 在結構功能上的關係，本計畫將以基因轉殖及 RNAi 技術分別增加及降低內皮細胞內 caveolin-1 的表現，探討 caveolae 的結構消長及對 ABCA1 的分佈、表現及膽固醇外送的影響。

關鍵詞：高密度脂蛋白、caveolin-1、ABCA1、膽固醇外送

## 英文摘要

It has been recognized that the high-density lipoprotein (HDL) plays an important role in the prevention of atherogenic plaque formation. However, there is still considerable debate about the mechanisms by which HDL removes excess cholesterol from peripheral cells. Caveolin-1, the main structural protein of caveolae is involved in the transport of excess cholesterol to HDL at the cell surface. However, the roles of caveolin-1 in cholesterol efflux is still controversial. The ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), a transmembrane protein, is also reported to mediate the efflux of excess cellular cholesterol to apoA1 and HDL. However, the interactions among ABCA1, caveolin-1 and HDL are not fully understood. In our previous studies, immunofluorescence confocal microscopy showed that the HDL appeared to colocalize with ABCA1 and caveolin-1 on the cell surface. The chemical cross-linking and immunoprecipitation analysis revealed that ABCA1 binds directly to both HDL and caveolin-1, whereas HDL does not bind directly to caveolin-1. These studies provide evidence for a direct interaction between HDL and ABCA1, ABCA1 and caveolin-1, but not HDL and caveolin-1, indicating that ABCA1 may act as an intermediate substrate between HDL and caveolin-1 on the cell surface during cellular cholesterol efflux. In order to investigate the functional relationships between ABCA1 and caveolin-1 on the HDL-mediated cholesterol efflux, the caveolin-1 will be either over-expressed by transfection of pcDNA-CAV vector or down-regulated by

RNA interference in the cholesterol-loaded endothelial cells. The distribution and expression of caveolin-1 and ABCA1 in the cells will be evaluated by western blot, confocal and electron microscopy. The cholesterol efflux will be determined.

Key words: HDL, Caveolin-1, ABCA1, cholesterol efflux

## 二、緣由與目的

冠狀動脈疾病 (coronary artery disease) 和動脈硬化 (atherosclerosis)——一直是先進國家的主要死因之一。在過去的流行病學研究中已證實血漿中高濃度的低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 是造成動脈粥瘤形成的一個主要原因，而另外一種重要血漿脂蛋白——高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) ——卻與動脈硬化的產生呈負相關 (1,2)。血漿中高密度脂蛋白能將周邊細胞中多餘的膽固醇攜出帶回肝臟代謝，這個過程稱為膽固醇逆運送 (reverse cholesterol transport) (3,4)，故高密度脂蛋白一直被認為可防止動脈粥瘤的形成 (5,6)。然而有關高密度脂蛋白如何自周邊細胞將多餘的膽固醇帶出的方式，仍爭議甚多，而這個問題在防止動脈粥瘤形成的機轉上尤顯重要。

高密度脂蛋白將膽固醇從細胞帶出的方式目前有兩個假說，第一種為入塢方式 (docking pathway)：即高密度脂蛋白會與細胞上特定接受器作用，接著引發細胞信號傳遞作用將細胞內之膽固醇轉移至位於細胞膜上之高密度脂蛋白，在這個過程中高密度脂蛋白完全不進入細胞中 (7-10)。第二種方式為反內胞飲作用 (retroendocytosis)；即在這個過程中高密度脂蛋白藉由內胞飲作用進入細胞當中，接著在細胞內與膽固醇結合後，再以外胞飲作用將高密度脂蛋白釋放至細胞外 (11-15)。我們過去的實驗利用螢光接合高密度脂蛋白與餵食膽固醇之動脈內皮細胞培養，實驗結果發現高密度脂蛋白位於細胞膜小囊中。我們進一步利用膠體金粒子與高密度脂蛋白複合物與細胞作用，並於電子顯微鏡下觀察，發現高密度脂蛋白在送出膽固醇時與細胞膜小囊的消長有關係

(16)。利用西方點墨法的分析發現當高密度脂蛋白與餵食高膽固醇的細胞在 4°C 下作用 2 小時後，高密度脂蛋白位於細胞膜上，然而當細胞回溫至 37°C 作用 15 分鐘，以胰蛋白酶處理後，則偵測不到高密度脂蛋白的訊號，顯示高密度脂蛋白並未進入細胞。由共軛焦顯微鏡的 3D 結構影像亦顯示高密度脂蛋白位於細胞膜表面或凹陷的細胞膜上，且與 caveolin-1 有共同分佈的現象，而並未出現在細胞質內 (17)，因此我們認為高密度脂蛋白是在細胞表面調控膽固醇的輸出的假說是正確的 (1,7-10)。

細胞膜凹陷的小囊結構在最初發現時被稱為“caveolae”，有小洞穴之意，在內皮細胞中具有 transcytosis 功能 (18)，而之後的研究更發現 caveolae 在細胞移行、訊息傳送、腫瘤抑制及細胞內膽固醇的平衡扮演相當重要的角色 (19-21)。許多重要訊息分子均在 caveolae 結構上進行上述多種重要生理作用。Caveolae 為一錐狀細胞膜凹陷結構，半徑約為 60-80nm，其結構富含 glycolipids、sphingolipids、膽固醇及主要結構蛋白 caveolin-1 (22-23)。在哺乳類細胞共有三種 caveolin 蛋白：caveolin-1, 2, 3。Caveolin-1 因 N 端之不同又分為  $\alpha$  及  $\beta$  型。Caveolin-1 及 caveolin-2 多分佈於上皮細胞、內皮細胞、纖維母細胞及巨噬細胞上，而 caveolin-3 則多分佈在肌肉細胞上。Caveolae 結構之存在必須有 caveolin-1，換言之，caveolin-1 基因剔除的小鼠其細胞沒有 caveolae 之結構 (24)。最近發現 caveolae 及 caveolin-1 在細胞膽固醇及膽固醇酯的釋出扮演重要的角色。在 Fielding 的研究中發現以膽固醇培養之纖維母細胞與高密度脂蛋白作用後，caveolae 上膽固醇含量明顯降低，因此認為高密度脂蛋白是透過 caveolae 來調節細胞內膽固醇的釋出 (3, 25, 26)。本實驗室發現高密度脂蛋白與 caveolin-1 共同分佈於餵食膽固醇的內皮細胞的細胞膜上或是細胞膜的凹陷結構中，因此認為 caveolae 結構是膽固醇外運送的主要區域 (17)。

在高密度脂蛋白所調控的膽固醇釋出過程中，先前認為 SR-BI (scavenger receptor

type B class 1) 為高密度脂蛋白的接受器，當高密度脂蛋白與 SR-B1 作用後將訊息傳到細胞內，促進膽固醇的釋出 (27-29)，但目前亦發現另一種細胞膜接受器 ATP-binding cassette A1 (ABCA1) 扮演更重要的角色 (30)。ABCA-1 基因如果發生突變會造成體染色體隱性遺傳疾病—Tangier disease。這種病人主要代謝特徵是雖然 apolipoprotein-A1 結構及合成正常，但細胞無法將胞內膽固醇由突變的 ABCA1 送至 HDL 上，故造成 apolipoprotein-A1 的代謝速率極快，而導致血漿 HDL 含量降低，巨噬細胞中有大量的膽固醇堆積，而容易產生動脈硬化 (31)。研究亦證實 ABCA1 與 apoA-1 有極高的親和力，換言之，ABCA1 極可能為 ApoA1 的接受器，在高密度脂蛋白調節膽固醇逆運送的過程中具有將細胞內膽固醇釋出的能力 (32-34)，但 ABCA1 是否位在 caveolae 的結構上進行膽固醇的釋出作用目前仍無答案 (35, 36)。本實驗室在過去一年中已經藉由免疫螢光染色實驗發現在高含量膽固醇的細胞中，caveolin-1 和 ABCA1 在細胞膜上有 colocalize 的情形，而利用化學聯結法及免疫沉澱法更證實了 HDL、ABCA1 及 caveolin-1 之間的交互關係，即 HDL 會和 ABCA1 連結，ABCA1 會和 caveolin-1 連結，但 HDL 並沒有跟 caveolin-1 連結，我們初步推測 caveolin-1 運送胞內的膽固醇至細胞膜的 caveolae 上，再經由上面的 ABCA1 蛋白將膽固醇傳送給 HDL 帶離細胞 (37)。界定了三者之間的相互位置及連結關係，本計畫將進一步探討 caveolin-1 及 ABCA1 在膽固醇外送中所扮演的角色。我們將轉殖含 caveolin-1 DNA 的表現質體：pcDNA3.1 vector 進內皮細胞來大量表現 caveolin-1 蛋白，另一方面用 RNAi 技術 (38) 抑制內皮細胞表現 caveolin-1，進而探討其對膽固醇釋出的影響以及對 ABCA1 分佈及表現量的影響，同時也將以電子顯微鏡及共軛焦顯微鏡觀察 caveolae 的結構消長及在細胞中的分佈變化。此外，我們也將進行一個 pilot study 即利用一個會抑制 ABCA1 所調控的膽固醇釋出的抑制劑：probuco1 (39, 40) 處理大量表現 caveolin-1 的內

皮細胞，觀察 probuco1 對膽固醇釋出的變化情形，便有助於瞭解 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出是否跟 ABCA1 所調控的膽固醇釋出有關。這些實驗結果有助於瞭解 caveolin-1 和 ABCA1 如何參與高密度脂蛋白所調控的膽固醇釋出作用，對動脈粥瘤形成及抑制的研究領域將有相當的貢獻

### 三、結果

#### 膽固醇在大量表現 caveolin-1 細胞中的釋出情形

首先將含 caveolin-1 的表現質體轉殖進入內皮細胞，以大量表現 caveolin-1 蛋白。利用共軛焦顯微鏡來觀察細胞表現外生型 caveolin-1 蛋白 (圖一A)，由於外生型 caveolin-1 蛋白的 C 端接合 myc 報導蛋白，所以可以利用抗 myc 抗體去偵測外生型的 caveolin-1 蛋白，抗 caveolin-1 抗體則可同時偵測內生型及外生型 caveolin-1 蛋白，而疊合圖可以看到 myc 蛋白和 caveolin-1 蛋白共同分佈的情形，驗證抗 myc 抗體所偵測到的外生型蛋白是 caveolin-1 蛋白 (圖一A)。同時比較 pCav-cDNA 轉殖細胞及控制組細胞中，發現用 c-myc 可以染到許多外生性的 caveolin-1 蛋白在 pCav-cDNA 轉殖細胞，而在控制組中沒有訊號 (圖一B)。接著利用西方點墨法分析 caveolin-1 蛋白在轉殖 pCav-cDNA 質體細胞中的表現 (圖二A)，由於外生型 caveolin-1 蛋白有接合 myc 報導蛋白，大小由原本 22 kD 增加為 29 kD，利用抗 caveolin-1 抗體可以同時偵測到在轉殖 pCav-cDNA 質體 24 小時及 48 小時的細胞內有 22 kD 的內生型 caveolin-1 蛋白及 29 kD 的外生型 caveolin-1 蛋白表現，利用抗 myc 抗體也可以偵測到 29 kD 的外生型 caveolin-1 蛋白，而在控制組細胞內只能偵測到 22 kD 的內生性 caveolin-1 蛋白。我們將轉殖含 caveolin-1 cDNA 重組質體 (pCav-cDNA)、不含 caveolin-1 cDNA 重組質體 (pcDNA) 的兩種細胞餵食 [ $H^3$ ] 膽固醇 24 小時，再處理高密度脂蛋白 24 小時後，收集培養液並測量其釋出 [ $H^3$ ] 膽固醇量。結果顯示大量表現 caveolin-1 蛋白的 pCav-cDNA 轉殖細胞，其膽固醇釋出量增加了約 37%，並且顯著高於 pcDNA 轉殖細胞 (圖二B)。根據這些結果，我們認為大量表現 caveolin-1 會增加細

胞膽固醇釋出。

### 膽固醇在降低表現 caveolin-1 細胞中的釋出情形

利用 RNA 干擾技術轉殖 siRNA 進內皮細胞以抑制 caveolin-1 表現。先利用共軛焦顯微鏡觀察內皮細胞抑制 caveolin-1 表現的情形(圖三)，在轉殖 siRNA 的內皮細胞中，caveolin-1 的表現降低，但不會影響 actin 的表現。由西方點墨法分析 siRNA 轉殖細胞中 caveolin-1 的表現(圖四 A)，發現 caveolin-1 蛋白在 siRNA 轉殖細胞中表現量降低。此外，比較 siRNA 轉殖細胞與控制組細胞的膽固醇釋出情形(圖四 B)，降低 caveolin-1 表現之 siRNA 轉殖細胞的 $[H^3]$ 膽固醇釋出較控制組細胞減少約 60%，且顯著低於控制組的細胞。根據上述實驗結果，減少 caveolin-1 蛋白表現會降低膽固醇釋出，故 caveolin-1 在大鼠動脈內皮細胞中是一個正向調節膽固醇釋出的重要因子。

### Caveolin-1 的表現與 caveolae 的關聯

利用穿透式電子顯微鏡觀察大量表達 caveolin-1 的內皮細胞(pCav-cDNA)及控制組細胞(pcDNA)中的caveolae分佈情形，初步結果顯示在控制組細胞中，細胞膜較為平坦且只有較少的caveolae；在大量表現 caveolin-1 的內皮細胞中，可以看到很多 caveolae(圖五)在細胞膜上，由此可知大量表現caveolin-1蛋白會幫助大鼠動脈內皮細胞形成caveolae結構。由於caveolae是細胞釋出膽固醇的出口(1)，所以我們認為 caveolin-1 會藉由形成caveolae的結構來幫助膽固醇釋出。

### 大量表現及降低表現 caveolin-1 蛋白之內皮細胞中 ABCA1 的表現

首先利用半定量 RT-PCR 觀察大量表現 caveolin-1 的內皮細胞及降低表現 caveolin-1 的內皮細胞中 ABCA1 mRNA 的表現量(圖六 A)。可以看到隨著轉殖 pCav-cDNA 質體的增加，caveolin-1 的

mRNA 量會隨之增加，且 ABCA1 的 mRNA 量也會隨之增加；另一方面，隨著轉殖 caveolin-1 siRNA 的量增加，caveolin-1 在 50 nM 的 siRNA 即開始減少表現，而 ABCA1 在轉殖 100 nM 的 caveolin-1 siRNA 中會減少表現。由半定量 RT-PCR 的結果知道 caveolin-1 會正向調控 ABCA1 mRNA 的表現量。利用西方點墨法分析大量表現 caveolin-1 蛋白之內皮細胞的 ABCA1 蛋白表現，增加 caveolin-1 表現之 pCav-cDNA 轉殖細胞，其 ABCA1 表現量也增加(圖六 B)。而降低表現 caveolin-1 的細胞中，ABCA1 蛋白表現也降低。根據這些結果，可知在大鼠動脈內皮細胞中，caveolin-1 會正向調控 ABCA1 蛋白的表現。由於 ABCA1 是一個已知會幫助細胞膽固醇釋出的膜蛋白(41)，所以我們推測 caveolin-1 會藉由調控 ABCA1 的表現量來幫助膽固醇釋出。

### Caveolin-1 調控膽固醇是出路徑與 ABCA1 調控膽固醇釋出路徑的關係

Probucol 是一個已知會抑制 ABCA1 所調控膽固醇釋出的抑制劑(Favari et al., 2004)。內皮細胞經大量表現 caveolin-1 後，膽固醇釋出增加約 37%。未大量表現 caveolin-1 的細胞處理 probucol 後，膽固醇釋出被抑制約 40%，而大量表現 caveolin-1 細胞處理 probucol 後，膽固醇釋出被抑制成與未大量表現 caveolin-1 細胞並處理 probucol 同樣程度，其指出外生性 caveolin-1 所增加的膽固醇釋出可被 ABCA1 的抑制劑：probucol 所抑制(圖七)。此外，利用共軛焦顯微鏡觀察處理 probucol 後的內皮細胞，高密度脂蛋白、ABCA1 及膽固醇的分佈情形。發現在控制組細胞中，高密度脂蛋白與 ABCA1 共同分佈且集中在核周圍，而在處理 probucol 的內皮細胞中，高密度脂蛋白跟 ABCA1 雖然共同分佈但卻變為分散於細胞質中(圖八)，且相較於控制組細胞，在處理 probucol 細胞中的膽固醇累積較多，此染色結果符合我處理 probucol 後膽固醇釋出的實驗結果(圖

七)。根據上述實驗，我們知道 ABCA1 調控膽固醇釋出的抑制劑：probuco1，同樣可以抑制 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出。因此 ABCA1 也會參與 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出路徑。

#### 四、討論

近年來許多研究指出細胞膜上的 caveolae 結構是幫助細胞內多餘膽固醇釋出給高密度脂蛋白的主要區域(1)。Caveolin-1 蛋白，是 caveolae 的主要結構蛋白，對於其如何調控膽固醇釋出留有很多爭議(42)，在此研究中，藉由測量大量表現 caveolin-1 蛋白及降低表現 caveolin-1 蛋白之內皮細胞的膽固醇釋放量，了解 caveolin-1 蛋白是幫助膽固醇釋出的正向調控因子，為了更進一步了解 caveolin-1 幫助膽固醇釋出的機制，我們探討了另一個已知會幫助膽固醇釋出的 ABCA1 蛋白(41)和 caveolin-1 蛋白之間的關係。在實驗室之前的研究發現，將內皮細胞餵食膽固醇後，ABCA1 蛋白跟 caveolin-1 蛋白表現量會增加(37)，在此研究則發現大量表現 caveolin-1 會增加 ABCA1 蛋白表現量，降低 caveolin-1 表現會降低 ABCA1 蛋白表現量(圖六)，根據這些結果知道兩者表現量都會受細胞內膽固醇含量影響，並且 caveolin-1 還會調控幫助膽固醇釋出的 ABCA1 蛋白表現量，因此，我們推測大量表現 caveolin-1 的內皮細胞可能藉由調控增加 ABCA1 蛋白表現而增加膽固醇釋出，降低表現 caveolin-1 的內皮細胞則藉由調控降低 ABCA1 蛋白表現而降低膽固醇釋出。本實驗室之前還藉由免疫螢光染色實驗發現在高含量膽固醇的細胞中，caveolin-1 和 ABCA1 在細胞膜上有共同分佈的情形，而利用化學聯結法及免疫沉澱法更證實了 HDL、ABCA1 及 caveolin-1 之間的交互關係(37)，即 HDL 會和 ABCA1 連結，ABCA1 會和 caveolin-1 連結。先前的研究知道高密度脂蛋白不會進入細胞，而只是在細胞膜的 caveolae 結構上幫助膽固醇釋出(1)，另一方面，caveolin-1 也被驗證出

雖然是 caveolae 內的膜蛋白，但是只有嵌入細胞膜，並沒有穿過膜到細胞表面(43)，再綜合實驗室先前化學聯結法及免疫沉澱的結果，推測 ABCA1 可能是高密度脂蛋白及 caveolin-1 蛋白的中間媒介。先前的研究說明 caveolin-1 蛋白會運送細胞內過多的膽固醇至細胞膜上的 caveolae 結構(1)，因此，我們更進一步提出模式圖：細胞內過多的膽固醇會先被 caveolin-1 蛋白運送到細胞膜的 caveolae 結構上，再經由上面的 ABCA1 蛋白將膽固醇傳送給高密度脂蛋白帶離細胞(圖九)。在此研究中，利用一個可以抑制 ABCA1 所調控膽固醇釋出的抑制劑：Probuco1 去處理大量表現 caveolin-1 內皮細胞，發現也可以抑制由 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出(圖七)，根據這些結果推測 caveolin-1 跟 ABCA1 所調控的膽固醇釋出路徑可能相同，也進一步驗證我們先前所提出的模式圖(圖九)。

#### 五、計畫成果自評

Caveolin-1 蛋白如何參與高密度脂蛋白所調控細胞膽固醇外送，目前尚無定論，而本實驗結果證實在大鼠內皮細胞中，caveolin-1 蛋白是幫助膽固醇釋出的正向調節因子，並且進一步探討其作用機制。實驗結果推測其可能藉由增加形成 caveolae 來幫助膽固醇釋出，也會調控 ABCA1 蛋白表現量來幫助膽固醇釋出，並利用 probuco1 抑制劑的實驗驗證了 caveolin-1 所調控膽固醇釋出路徑和 ABCA1 所調控的膽固醇釋出路徑相同。實驗室內先前藉由 caveolin-1 蛋白、高密度脂蛋白、ABCA1 蛋白的分佈位置及交互作用關係提出的膽固醇釋出模式圖(圖九)，這些實驗結果有助於瞭解 caveolin-1 和 ABCA1 如何參與高密度脂蛋白所調控的膽固醇釋出作用，對動脈粥瘤形成及抑制的研究領域將有相當的貢獻。

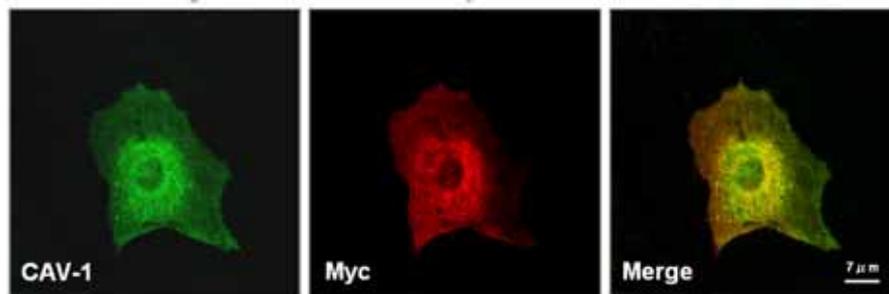
#### 六、參考文獻

1. Assmann G, Funke H (1990) HDL metabolism and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* **16**(suppl. 9): 15-20.

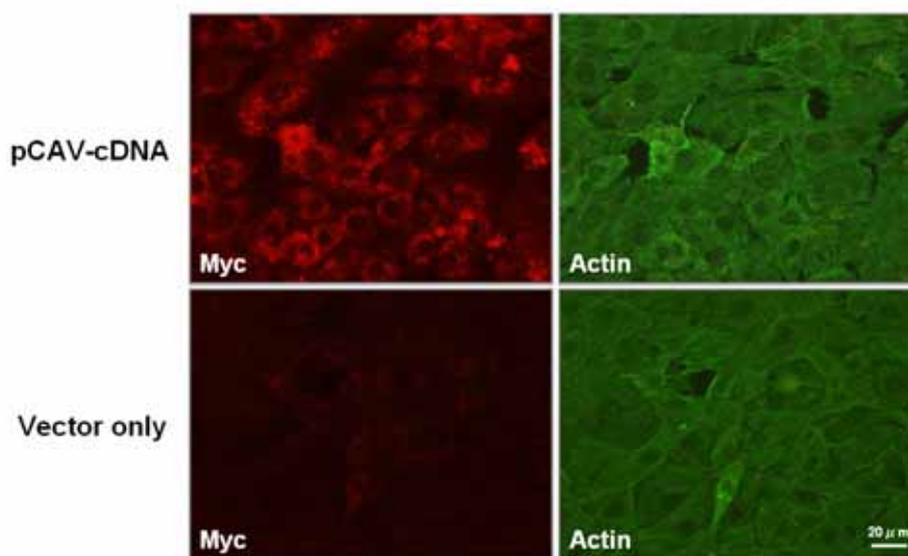
2. Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A (1991) High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* **11**: 174-182.
3. Fielding CJ, Fielding PE (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* **36**: 211-228.
4. Tall AR (1998) An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* **19**: A31-35.
5. Kwiterovich PO (2000) The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: A current review. *AM J Cardiol* **86**: 5L-10L.
6. Stein O, Stein Y (1999) Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* **144**: 285-301.
7. Oram JF, Johnson CJ, Brown TA (1987) Interaction of high density lipoprotein with its receptor on cultured fibroblasts and macrophages. *J Bio Chem* **262**: 2405-2410.
8. Oram JF, Mendez Aj, Slotte P, Johnson TF (1991) High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts. *Arterioscler Thromb* **11**: 403-414.
9. Mendez AJ, Oram JF, Bierman EL (1991) Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J Biol Chem* **266**: 10104-10111.
10. Slott JP, Oram JF, Bierman EL (1987) Binding of high density lipoproteins to cell receptors promote translocation of cholesterol from intracellular membranes to the cell surface. *J Biol Chem* **262**: 12904-12907.
11. Alam R, Yatsu FM, Tsui L, Alam S (1989) Receptor-mediated uptake and retroendocytosis of high-density lipoproteins by cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages: possible role in enhancing reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* **1004**: 292-299.
12. Delamatre JG, Sarphie TG, Archibold RG, Hornick CA (1990) Metabolism of apoE-free high density lipoproteins in rat hepatoma cells: evidence for a retroendocytic pathway. *J Lipid Res* **31**: 191-202.
13. Nion S, Briand O, Lestavel S, Torpier G, Nazih F, Delbart C, Fruchart JC, Clavey V (1997) High-density-lipoprotein subfraction 3 interaction with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochem J* **328**: 415-423.
14. Rogler G, Herolig G, Fahr C, Fahr M, Rogler D, Reimann FM, Stange EF (1992) High-density lipoprotein3 retroendocytosis: A new lipoprotein pathway in the enterocyte. *Gastroenterology* **103**: 467-480.
15. Takamashi Y, Smith JD (1999) Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 11358-11363.
16. Chao WT, Fan SS, Yang VC (2002) Visualization of the uptake of high-density lipoprotein by rat aortic endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. *The Histochem J* **34**: 233-239.
17. Chao WT, Fan SS, Chen JK, Yang VC (2003) Visualizing Caveolin-1 and HDL in cholesterol-loaded aortic endothelial cells. *J Lipid Res* **44**: 1094-1099.
18. Palade GE (1953) Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* **24**: 1424.
19. Fielding CJ, Fielding PE (2000) Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta* **1529**: 210-222.
20. Frank PG, Galbiati F, Volonte D, Razani B, Cohen DE, Marcel YL, Lisanti MP (2001) Influence of Caveolin-1 on cellular cholesterol efflux mediated by high-density lipoproteins. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: C1204-1214.
21. Galbiati F, Razani B, Lisanti MP (2001) Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* **106**: 403-411.
22. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8655-8659.

23. Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**: 199-225.
24. Marx J (2001) Caveolae: a once-elusive structure gets some respect. *Science* **294**: 1862-1865.
25. Chang WJ, Rothberg KG, Kamen BA, Anderson RGW (1992) Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *J cell Biol* **118**: 63-69.
26. Fielding CJ, Fielding PE (1997) Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* **38**: 1503-1521.
27. Yeh YC, Hwang GY, Liu IP, Yang VC (2002) Identification and expression of scavenger receptor SR-BI in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* **161**: 95-103.
28. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR (1997) Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* **272**: 20982-20985.
29. Peng V, Akmentin W, Connelly MA, Lund-Katz S, Phillips MC, Williams DL (2004) Scavenger receptor B1 (SR-B1) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domains is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 384-396.
30. Oram JF (2002) ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* **13**: 373-381.
31. Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**: 1007-1017.
32. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG (1999) The Tangier disease gene product ABCA1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* **104**: R25-31.
33. Oram JF, Vaughan AM (2000) ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* **11**: 253-260.
34. Chroni A, Liu T, Michael L, Fitzgerald, Mason W, Freeman, Vassilis I (2004) Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-1 mutants suggest direct association between apoA-1 helices and ABCA1. *Biochemistry* **43**: 2126-2139.
35. Kurzchalia TV, Parton RG (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 424-431.
36. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC (1999) Cellular cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res* **40**: 781-796.
37. Chao, W. T., Tai, S. H., Lin, Y. C., Lin, W. W., and Yang, V. C. (2005) Cellular localization and interaction of ABCA1 and caveolin-1 in aortic endothelial cells after HDL incubation. *Biochem Biophys Res Commun* **332**: 743-749
38. Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* **418**: 244-251
39. Favari E, Zanotti I, Zimetti F, Ronda N, Bernini N, Rothblat GH. (2004) Probuco Inhibits ABCA1-Mediated Cellular Lipid Efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**: 1-6.
40. Cheng AW, Tsujita M, Hayashi M, Yokoyama S. (2004) Probuco inactivates ABCA1 in the plasma membrane with respect to its mediation of apolipoprotein binding and high density lipoprotein assembly and to its proteolytic degradation. *J. Biol. Chem.* **279**: 30168-30174.
41. Liao H, Langmann T, Schmitz G, and Zhu Y (2002) Native LDL Upregulation of ATP-Binding Cassette Transporter-1 in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **22**:127-132.
42. Fu Y., Hoang A., Escher G., Parton R. G. Krozowski Z., and Sviridov D. (2004) Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *JBC* **279**(14): 14140-14146.
43. Fielding CJ, and Fielding PE. (2001) Caveolae and intracellular trafficking of

cholesterol. Advacedd Drug delivery  
reviews 49:251-264

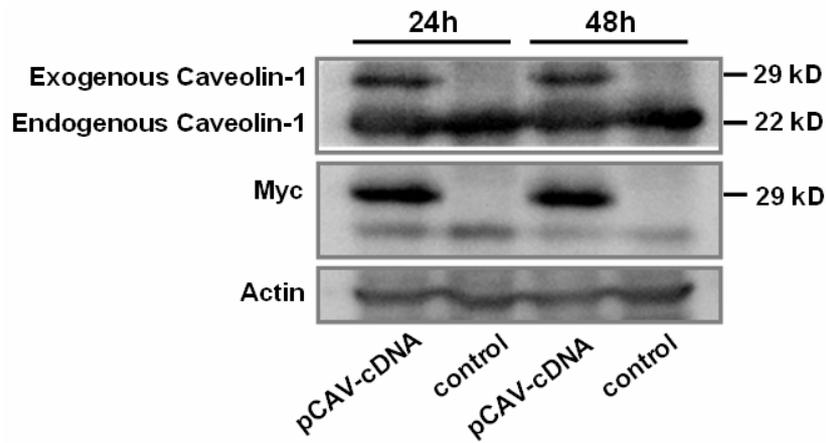


**A**

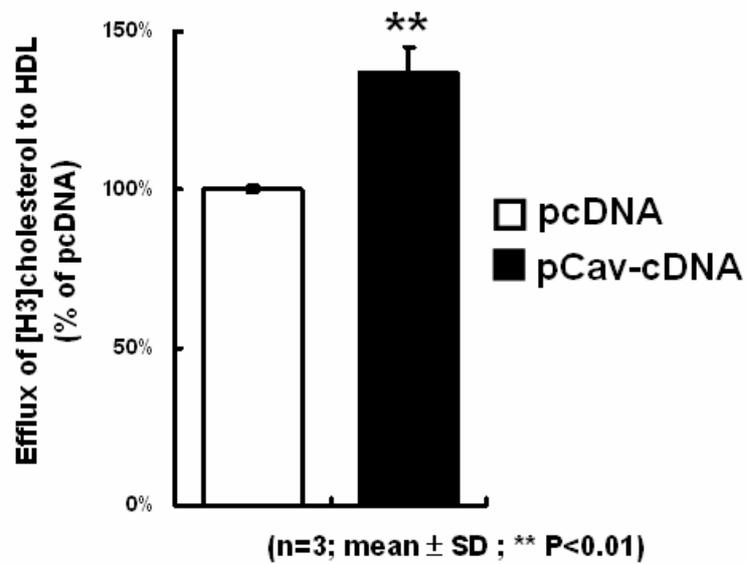


**B**

圖一、(A)轉殖 pCav-cDNA 的細胞的 caveolin-1 及 myc 免疫螢光染色圖。(B)轉殖 pCav-cDNA 的細胞與控制組細胞的 myc 及 actin 免疫螢光染色圖。

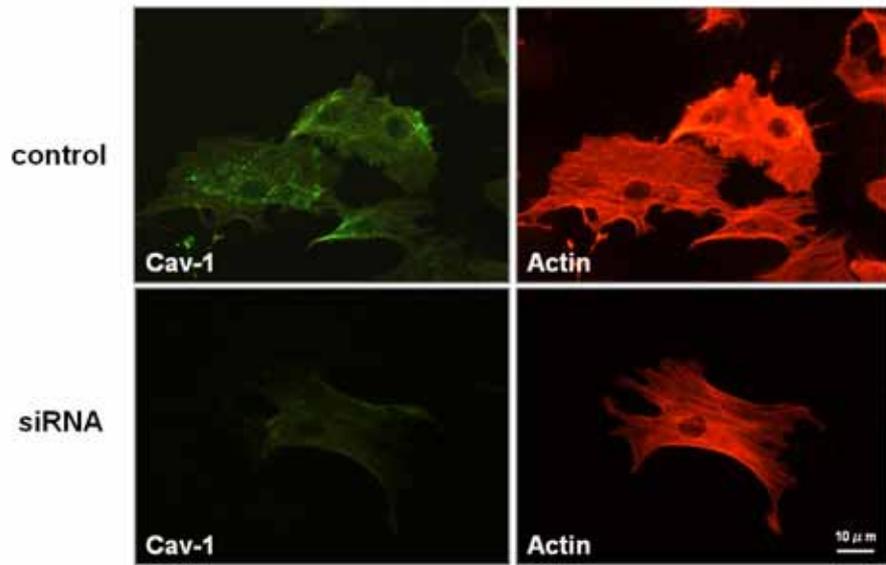


A

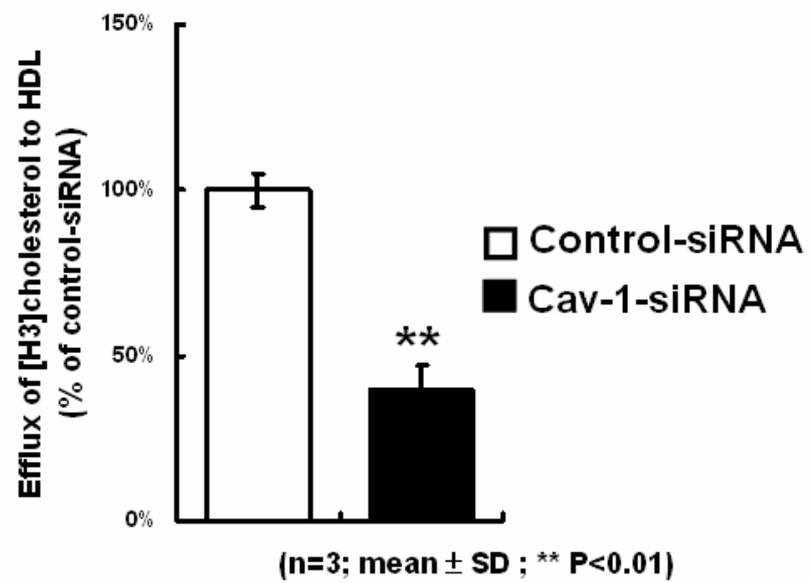
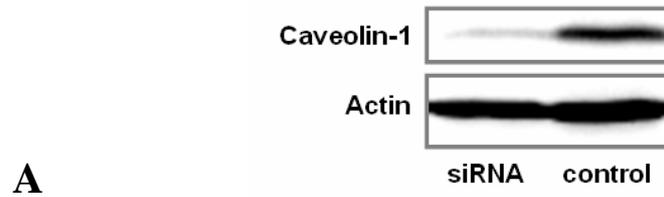


B

圖二、(A)轉殖 pCav-cDNA 24 小時、48 小時與控制組細胞的西方點墨法圖。(B)轉殖 pCav-cDNA 細胞、轉殖 pcDNA 細胞的膽固醇釋出比例(轉殖 pcDNA 細胞的膽固醇釋出量定為 100%)。



圖三、轉殖 siRNA 的細胞及控制組細胞的 caveolin-1 及 actin 的免疫  
螢光染色圖。

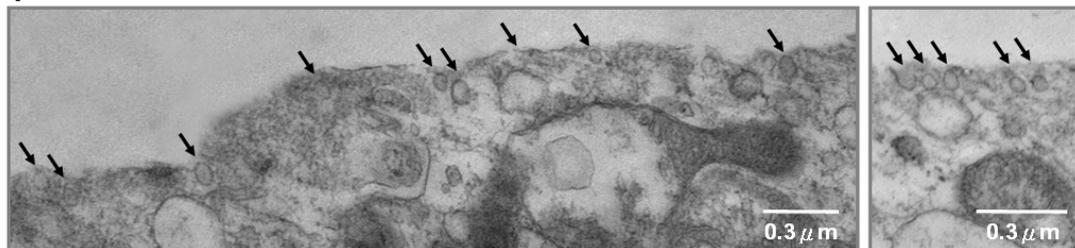


圖四、(A)轉殖 siRNA 的細胞及控制組細胞的西方點墨法圖。(B)轉殖 siRNA 的細胞與控制組細胞的膽固醇釋出比例(控制組細胞的膽固醇釋出定為 100%)

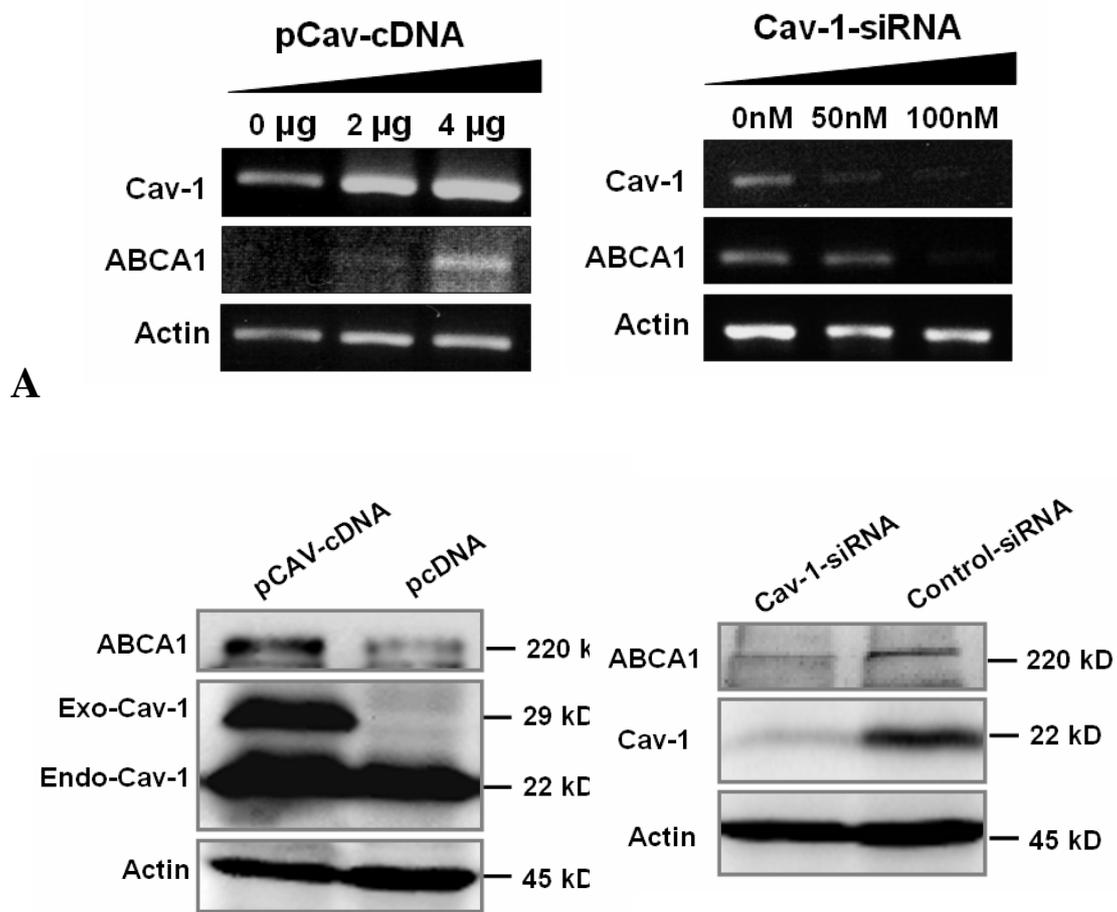
pcDNA



pCav-cDNA

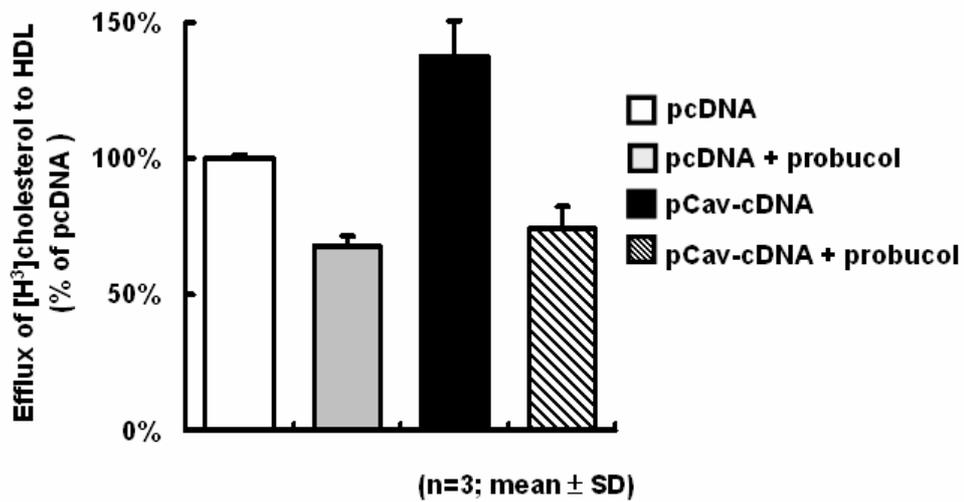


圖五、轉殖 pcDNA 細胞及轉殖 pCav-cDNA 細胞的穿透式電子顯微鏡圖。

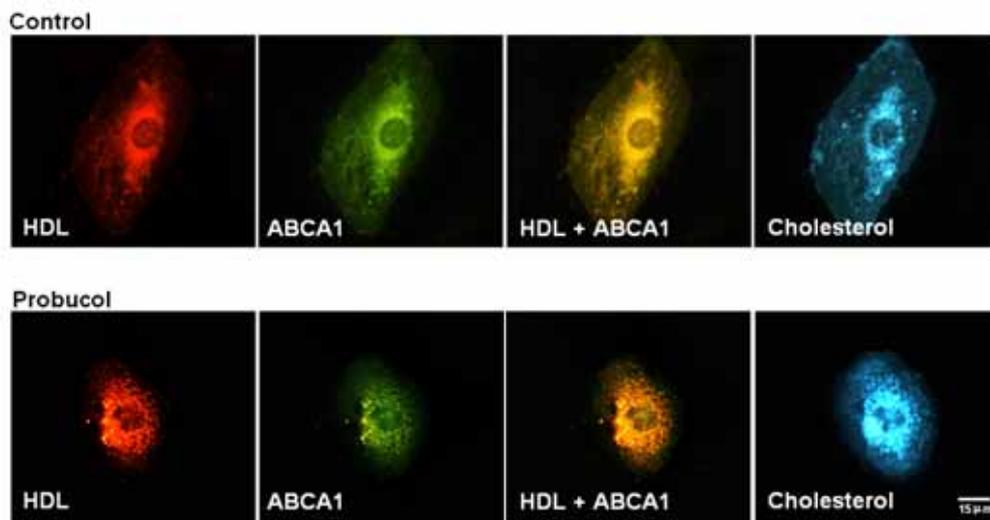


**B**

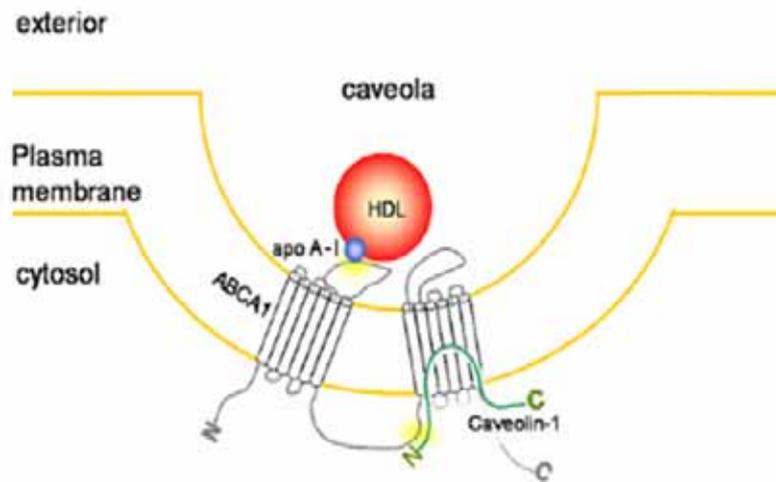
圖六、(A)利用半定量 RT-PCR 在增加表現 caveolin-1 細胞中及降低 caveolin-1 細胞中 caveolin-1、ABCA1、actin 的 mRNA 表現圖。(B) 轉殖 pCav-cDNA 細胞、轉殖 pcDNA 細胞及轉殖 siRNA 細胞、控制組細胞的 caveolin-1、ABCA1 的西方點墨法圖。



圖七、大量表現 caveolin-1 細胞、大量表現 caveolin-1 並處理 probucol 細胞、處理 vector only 細胞、處理 lipofectamine only 細胞的膽固醇釋出量(處理 vector only 細胞的膽固醇釋出量為 100%)



圖八、處理 probuconol 細胞與控制組細胞的高密度脂蛋白、ABCA1 及膽固醇的免疫螢光染色圖。



圖九、高密度脂蛋白、ABCA1 及 cavoelin-1 在 caveolae 結構中參與  
膽固醇釋出的模式圖