

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Caveolin-1 與 ABCA1 兩種蛋白在高密度脂蛋白調控細胞膽
固醇外送所扮演的角色

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2311-B-029-005-

執行期間：93年08月01日至94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

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 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細胞膽固醇外送時所扮演的角色

計畫編號：NSC 93-2311-B-029-005

執行期限：93 年 8 月 1 日至 94 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：XXXXXX 執行機構及單位名稱

計畫參與人員：XXXXXX 執行機構及單位名稱

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中多餘膽固醇攜出的機轉尚不清楚。我們的研究中發現由高密度脂蛋白所調控的膽固醇攜出與細胞膜上特殊結構膜小囊(caveolae)及其結構蛋白caveolin-1 有密切關連，但是其機轉尚未有答案。最近有報導指出與膽固醇釋出的另一種膜蛋白ABCA1 蛋白，是高密度脂蛋白的主體蛋白apoA-1 的接受器，ABCA1 具有將細胞膜上膽固醇轉移至 Apo-A1 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。本計畫將以含有高膽固醇的細胞與高密度脂蛋白培養後，以共軛焦顯微鏡及電子顯微鏡觀察高密度脂蛋白，caveolin-1 及 ABCA1 在細胞中的分佈，以西方點墨法偵測細胞中caveolin-1 及 ABCA1 的表現。進一步以化學連結法、免疫沉澱法分析caveolin-1, ABCA1 與高密度脂蛋白的相互關係。此外，以RNA 干擾技術 (RNA interference, RNAi) 抑制caveolin-1 mRNA產生來探討ABCA1 的分佈及與膽固醇外送的情形。

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 cells. The non-coated vesicular invaginations structure "caveolae" was recognized as flask-shaped indentations of the cell membrane. Our previous study demonstrated that caveolae are the major membrane domains facilitating the transport of excess cholesterol to HDL in the cell surface of aortic endothelial cells. The underlying mechanisms are still unknown. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) was recognized as apoA-I receptor from studies of Tangier disease. Immunoprecipitation analysis provided evidence that apoA-I binds directly to ABCA-1. However, the cellular distribution and the interaction between ABCA1, caveolin-1 and HDL in the cholesterol-loaded endothelial cells need further investigation. This proposed project was emphasized on the distribution and the expression of caveolin-1 and ABCA1 in the cholesterol-loaded cells after HDL incubation by confocal and electron microscopy and by Western blot. The interactions between caveolin-1, ABCA1 and HDL was analyzed by chemical cross-linking and immunoprecipitation analysis. Furthermore, RNA interference (RNAi) was used to suppress caveolin-1 mRNA expression and to investigate the distribution of ABCA1 protein in the cholesterol-loaded endothelial cells after HDL incubation. The cholesterol efflux in the caveolin-1 RNA interference cells was also studied.

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 (8-9)。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) (10-11)，故高密度脂蛋白一直被認為可防止動脈粥瘤的形成 (12-13)。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種假說，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 (14-17)。第二種方式為反內胞飲作用 (retroendocytosis)；在這個過程中高密度脂蛋白藉由接受器調節的內胞飲作用 (receptor-mediated endocytosis) 進入細胞當中，接著在細胞內與膽固醇作用後，細胞再以外胞飲作用將高密度脂蛋白釋放至細胞外 (18-22)。在我們過去的實驗中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 (6)。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結構圖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colocalization現象，而並未出現在細胞質內 (7)。因此我們認為高密度脂蛋白可能在細胞表面調控膽固醇的輸出。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 (23)，而之後的研究更發現caveolae在細胞移行、細胞訊息傳遞、腫瘤抑制及細胞內膽固醇的平衡扮演相當重要的角色 (24-26)，許多重要訊息分子均在caveolae結構上以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，其膜上富含glycolipids、sphingolipids、膽固醇及主要結構蛋白caveolin (27-28)。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 α 及 β 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 (29)。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上的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 (10, 30-31)。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，我們認為caveolae結構是膽固醇外運送的主要區域 (7)，當膽固醇運送時，caveolin-1表現量升高，而caveolae則大量出現並集中於膜上，而當細胞內膽固醇下降時，caveolin-1蛋白降低而caveolae結構消失，但高密度脂蛋白與caveolin-1是否直接發生交互作用或有其他蛋白的參與，是本計畫擬定探討的目標之一。高密度脂蛋白所調控的膽固醇釋出過程中，先前認為SR-BI為高密度脂蛋白的接受器，當高密

度脂蛋白與SR-BI 作用後將訊息傳至胞內，促進膽固醇的釋出 (32)，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 (33)。ABCA1 基因如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apolipoprotein A-I 結構及合成正常，但它的代謝速率極快，而導致血漿HDL含量降低，但在巨噬細胞中卻有大量的膽固醇堆積，因此這種病人血漿中的LDL 含量雖然很低，但卻容易產生動脈硬化 (34)。有研究亦證實ABCA1與apoA-1 有極高的親合力，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 (35-36)，但ABCA1是否亦位在caveolae 的結構上進行膽固醇的釋出作用目前仍無定案。雖然有研究指出高密度脂蛋白在透過ABCA1 接受器將膽固醇釋出時，必須在富含脂質的特殊結構如caveolae 上進行 (37)，但是亦有其他報導指出caveolae 結構與ABCA1 接受器的功能無正相關 (38)。本計畫將針對caveolin-1 及ABCA1在高密度脂蛋白調節細胞內膽固醇釋出時的表現及分佈做一探討，同時我們將利用cross-linking 及immunoprecipitation 技術探討三者之間的交互關係。此外將以RNAi 技術抑制細胞產生caveolin-1，進而探討ABCA1 在高密度脂蛋白調控的膽固醇釋出作用中的分佈及功能。這些實驗結果有助於瞭解高密度脂蛋白如何將過多膽固醇自細胞中帶出的機轉，對粥瘤形成及抑制的研究領域有相當之貢獻。

三、結果

含高膽固醇之動脈內皮細胞在高密度脂蛋白作用下，ABCA1、caveolin-1 蛋白在細胞的表現及分佈

我們利用西方點墨法分析含高膽固醇之動脈內皮細胞在高密度之蛋白作用下，ABCA1、caveolin-1 蛋白的表現量 (Fig. 1)。將細胞餵食膽固醇48小時後，ABCA1及caveolin-1 蛋白表現量明顯增加，接著再處理高密度脂蛋白，ABCA1蛋白表現量在處理3小時內依舊很多，直到6小時才開始降低；caveolin-1蛋白表現量在

處理1小時內依舊高，直到處理3小時後開始降低。我們再利用共軛焦免疫螢光染色法觀察含高膽固醇內皮細胞在高密度脂蛋白作用下，ABCA1、caveolin-1蛋白的分佈位置 (Fig. 2)。可以看到高密度脂蛋白、ABCA1、caveolin-1蛋白分佈相似的位置 (Fig. 2A-C)，而高密度脂蛋白和ABCA1蛋白共同分佈 (Fig. 2D)，也和caveolin-1蛋白共同分佈 (Fig. 2E)，而ABCA1蛋白也跟caveolin-1蛋白共同分佈 (Fig. 2F)，三者的疊合圖中可以看到三者共同分佈情形 (Fig. 2G)。而共軛焦立體影像中可以看到高密度脂蛋白和ABCA1蛋白跟caveolin-1蛋白共同分佈於細胞膜上 (Fig. 2H, 2I)。

高密度脂蛋白與 ABCA1、caveolin-1 三者之間的交互作用關係

我們利用化學聯結法跟免疫沉澱法去探討高密度脂蛋白、caveolin-1、ABCA1三者之間的直接作用關係 (Fig. 3)。結果指出 ABCA1 可以和高密度脂蛋白跟caveolin-1 共同沉澱；相反的，caveolin-1 跟高密度脂蛋白無法共同沉澱，驗證了ABCA1 直接跟高密度脂蛋白跟caveolin-1 蛋白直接作用，但是caveolin-1 蛋白沒有跟高密度脂蛋白直接作用。

在缺少 caveolin-1 細胞中，ABCA1 的表現、分佈及膽固醇外送情形

我們利用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 (Fig. 4)，可以看到在轉殖siRNA的內皮細胞中，caveolin-1的表現降低 (Fig. 4C)，但不會影響actin的表現 (Fig. 4D)。並利用西方點墨法觀察siRNA轉殖細胞中caveolin-1的表現 (Fig. 5A)，可以看到caveolin-1蛋白在siRNA轉殖細胞中表現量降低，再利用軟體定量caveolin-1蛋白的表現量 (Fig. 5B)，在siRNA轉殖細胞中的caveolin-1表現量相較於無轉殖細胞，降低了約九成，達成降低caveolin-1表現。

我們並利用西方點墨法發現在降低caveolin-1 表現的 siRNA 轉殖細胞中，

ABCA1 表現量也變低(Fig. 6)，根據這個結果，推測降低 caveolin-1 表現會調控降低 ABCA1 的表現。另外，我們將轉殖 siRNA 跟沒有轉殖 siRNA 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 $[H^3]$ 膽固醇的比例(培養液 $[H^3]$ 膽固醇量/培養液 $[H^3]$ 膽固醇量 + 細胞溶解液 $[H^3]$ 膽固醇量)。比較 siRNA 轉殖細胞跟無 siRNA 轉殖細胞的膽固醇釋出情形(Fig. 7)，可以看到降低 caveolin-1 表現之 siRNA 轉殖細胞的 $[H^3]$ 膽固醇顯著低於無轉殖 siRNA 的細胞。根據這些結果，推測降低 caveolin-1 表現會藉由調控降低 ABCA1 表現而減少膽固醇釋出。

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(24)。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(43)，在此研究中，藉由測量降低表現 caveolin-1 蛋白之內皮細胞的膽固醇釋放量減少(Fig. 7)，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(33)和 caveolin-1 蛋白之間的關係。我們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(Fig. 1)，並且降低 caveolin-1 表現會降 ABCA1 蛋白表現量(Fig. 6)，根據這些結果推測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，我們推測降低表現 caveolin-1 的內皮細胞會藉由調控降低 ABCA1 蛋白表現而降低膽固醇釋出。另外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(Fig. 2)，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(Fig. 3)，即 HDL 會和

ABCA1 連結，ABCA1 會和 caveolin-1 連結。實驗室內先前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(7)，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(24)，再綜合化學聯結法及免疫沉澱的結果(Fig. 3)，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(31)，因此，我們更進一步提出模式圖(Fig. 8)：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。

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調控 ABCA1 蛋白表現量來調控膽固醇釋出，並利用免疫螢光染色圖及免疫沉澱法瞭解了 caveolin-1、ABCA1 跟高密度脂蛋白的分佈位置及交互作用關係而提出的膽固醇釋出模式圖(Fig. 8)，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. Kao CH, Chen JK, Yang VC (1994) Ultrastructure and permeability of endothelial cells in branched regions of rat arteries. *Atherosclerosis* **105**:97-114.
2. Lee WC, Chao WT, Yang VC (2001) Effects of high-cholesterol diet on the interendothelial clefts and the associated junctional complexes in rat aorta. *Atherosclerosis* **155**: 307-312.
3. Kao CH, Chen JK, Kuo JS, Yang VC (1995) Visualization of the transport pathways of low density lipoproteins

- across the endothelial cells in the branched regions of rat. *Atherosclerosis* **116**: 27-41.
4. Yang VC, Lee TY, Hwang GY, Kao CH, Chen JK (1999) Immunolocalization of high-density lipoproteins in arterial walls of rats. *Atherosclerosis* **142**:269-277.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. Assmann G, Funke H (1990) HDL metabolism and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* **16** (suppl. 9): S15-20.
 9. Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A (1991) High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* **11**: 174-182.
 10. Fielding CJ, Fielding PE (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* **36**: 211-228.
 11. Tall AR (1998) An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* **19**: A31-35.
 12. Kwiterovich PO (2000) The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: A current review. *Am J Cardiol* **86** (suppl): 5L-10L.
 13. Stein O, Stein Y (1999) Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* **144**: 285-301.
 14. Oram JF, Johnson CJ, Brown, TA (1987) Interaction of high density lipoprotein with its receptor on cultured fibroblasts and macrophages. *J Biol Chem* **262**: 2405-2410.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. DeLamatre JG, Sarphe 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.
 20. 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.
 21. Rogler G, Herolg G, Fahr C, Fahr M, Rogler D, Reimann FM, Stange EF (1992) High-density lipoprotein 3 retroendocytosis: A new lipoprotein pathway in the enterocyte. *Gastroenterology* **103**: 467-480.
 22. 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.
 23. Palade GE (1953) Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* **24**: 1424.
 24. Fielding CJ, Fielding PE (2000) Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta* **1529**: 210-222.
 25. 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.
 26. Galbiati F, Razani B, Lisanti MP (2001) Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* **106**: 403-411.
 27. 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.
28. Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**: 199-225.
 29. Marx J (2001) Caveolae: a once-elusive structure gets some respect. *Science* **294**: 1862-1865.
 30. 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.
 31. Fielding CJ, Fielding PE (1997) Intracellular cholesterol transport. *J Lipid R*
 32. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, de la Llera-Moya M, Philips 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
 33. Oram JF (2002) ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 373-81.
 34. Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **42**, 1007-17.
 35. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG (1999) The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* **104**: R25-31.
 36. Oram JF, Vaughan AM (2000) ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* **11**: 253-260.
 37. Kurzchalia TV, Parton RG (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 424-431.
 38. Mendez AJ, Lin G, Wade DP (2001) membrane lipid domains distinct from cholesterol / sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway. *J Biol Chem* **276**: 3158-3161.
 39. Diglio CA, Grammas P, Giacomelli F, Wiener J (1989) Angiogenesis in rat aorta ring explant culture. *Lab Invest* **60**: 523-531.
 40. Oram JF, Brinton EA, Bierman EL (1983) Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* **72**: 1611-1621.
 41. Handley DA, Arbeeney CM, Witte LD, Chien S (1981) Colloidal gold-low density lipoprotein conjugates as membrane receptor probes. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 368-371.
 42. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Philips MC (1999) Cellular cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res* **40**: 781-796.
 43. Fu, Y., Hoanga, A., Eschera, G., Partonb, R. G., Krozowska, Z., and Sviridov, D. (2004) Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J Biol Chem* **279**: 14140-14146.

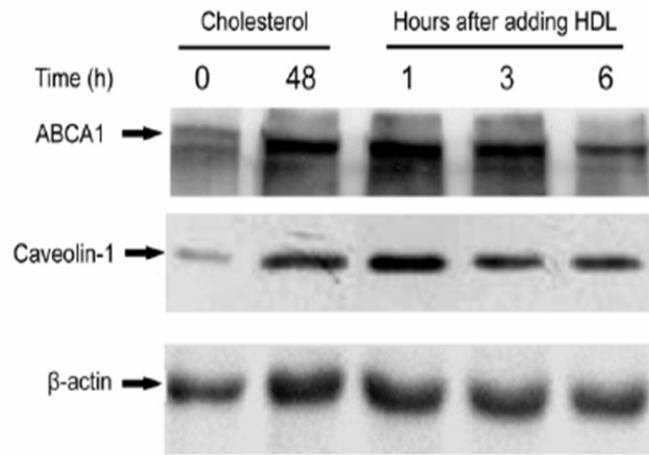


Fig. 1. 餵食內皮細胞膽固醇 48 小時，及處理高密度脂蛋白 1 小時、3 小時、6 小時，ABCA1 及 caveolin-1 蛋白的表現量。

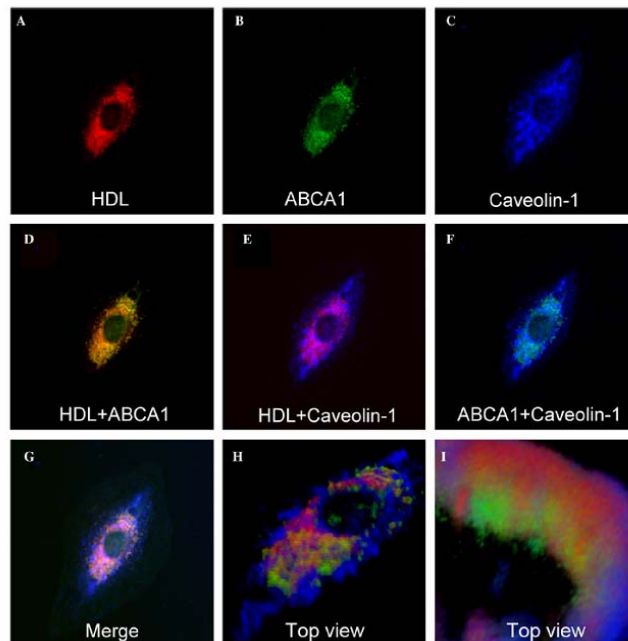


Fig. 2. 餵食膽固醇之內皮細胞的高密度脂蛋白、ABCA1 及 caveolin-1 的免疫螢光染色圖

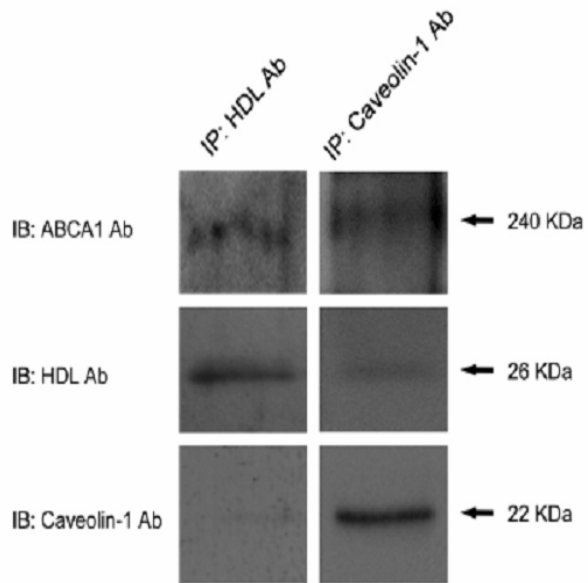


Fig. 3. 餵食膽固醇再處理高密度脂蛋白後的內皮細胞，高密度脂蛋白、ABCA1 及 caveolin-1 的共同免疫沉澱分析。

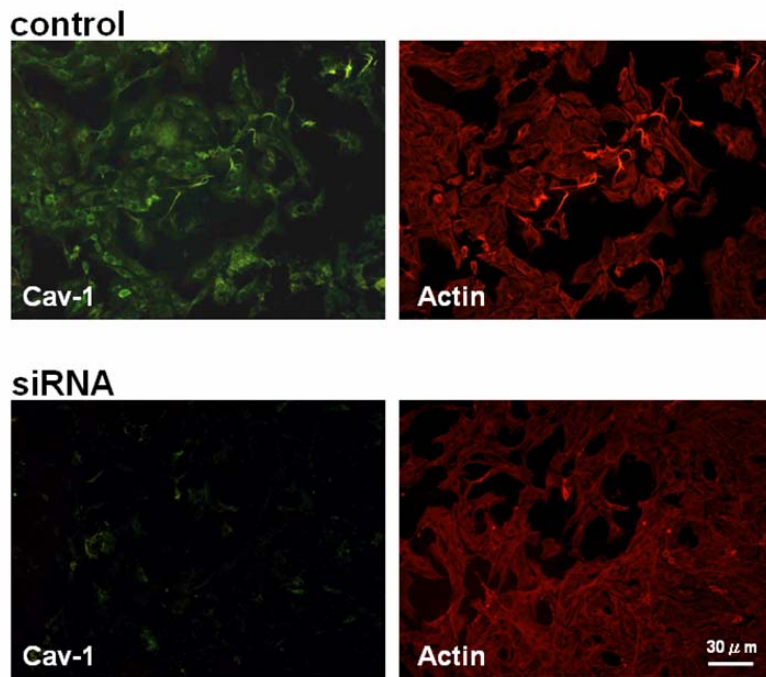


Fig. 4. 利用 RNA 干擾技術轉殖 siRNA 細胞跟沒有轉殖 siRNA 細胞的 caveolin-1 及 actin 的免疫螢光染色圖

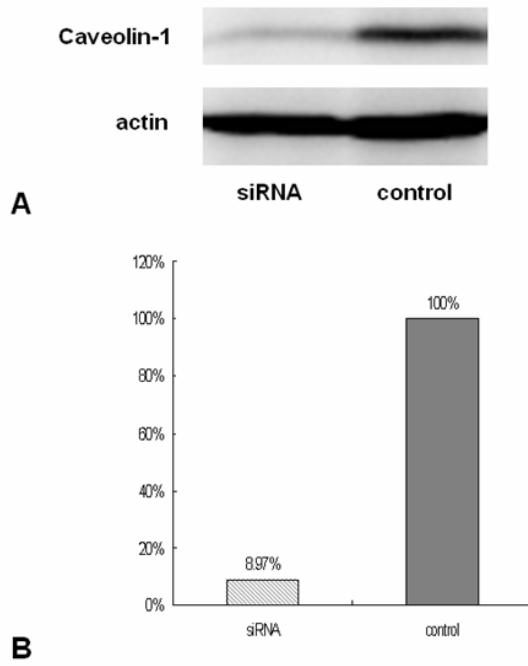


Fig. 5. (A)轉殖 siRNA 細胞跟沒有轉殖 siRNA 細胞的 caveolin-1 表現量
 (B)利用軟體定量轉殖 siRNA 細胞跟沒有轉殖 siRNA 細胞的 caveolin-1 表現量

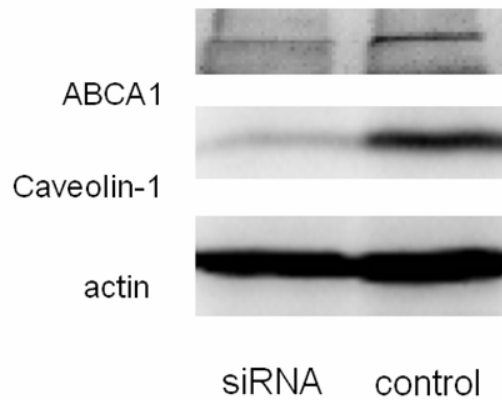


Fig. 6. 轉殖 siRNA 細胞跟沒有轉殖 siRNA 細胞的 ABCA1 表現量

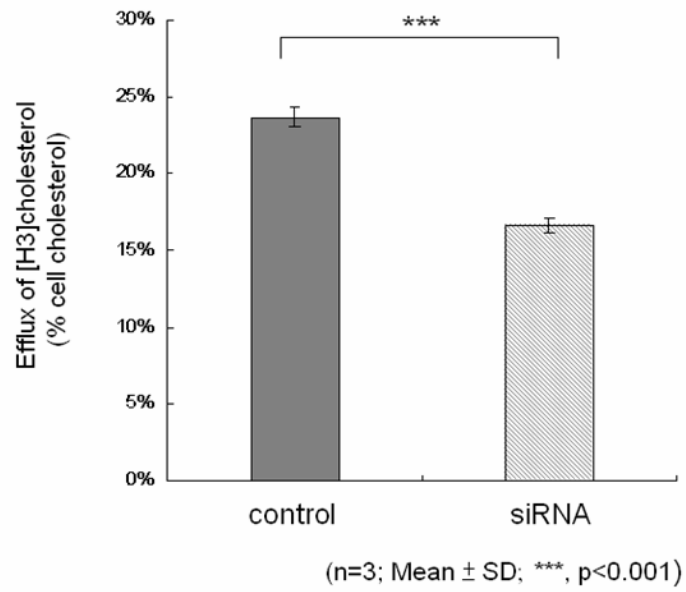


Fig. 7. 轉殖 siRNA 細胞跟沒有轉殖 siRNA 細胞的膽固醇釋出比例。

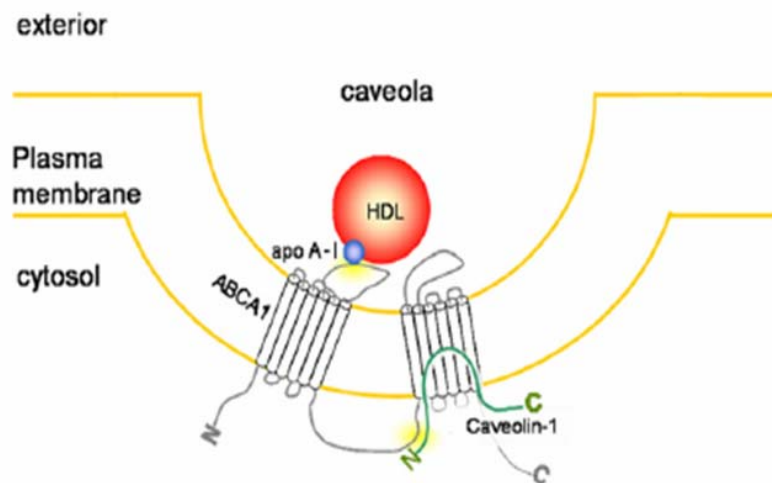


Fig. 8. 高密度脂蛋白、ABCA1 及 cavoelin-1 在 caveolae 結構中參與膽固醇釋出的模式圖