

東海大學生命科學系  
博士論文

**Caveolin-1 蛋白與粥瘤形成的關係並可能成為早期動脈硬化的生物指標分子**

指導教授：鄭 葳 教授  
Vie Cheng Ph.D.  
陳穎從 教授  
Ying-Tsung Chen

Caveolin-1 is Associated with Plaque  
Formation and Could Be as a Potential  
Biomarker for Early Atherosclerosis

研究生：林維文  
Wei-Wen Lin

中華民國九十六年十二月



東海大學生命科學系博士論文

**Caveolin-1 蛋白與粥瘤形成的關係並可能成為早期動脈硬化的生物指標分子**

Caveolin-1 is Associated with Plaque Formation and Could Be as a Potential Biomarker for Early Atherosclerosis

研究生：林維文

Wei-Wen Lin

指導教授：鄭 葳 教授

Vie Cheng Ph.D.

陳穎從 教授

Ying-Tsung Chen

中華民國九十六年十二月

東海大學生命科學系  
博士論文學位考試審定書

生命科學系博士班研究生 林維文 君所撰寫之論文

(中文)

Caveolin-1 蛋白與粥瘤形成的關係並可能成為早期粥瘤硬化的生物指標分子

(英文)

Caveolin-1 is associated with plaque formation and could be as a potential biomarker for early atherosclerosis

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

吳光裕 (簽名)

委員

杜善美

丁紀台

張明那

陳秋廷

鄭晟

中華民國 96 年 11 月 27 日

# 東海大學生命科學系博士論文

## Caveolin-1 蛋白與粥瘤形成的關係並可能成為早期動脈硬化的生物指標分子

Caveolin-1 is Associated with Plaque  
Formation and Could Be as a Potential  
Biomarker for Early Atherosclerosis

研究生：林維文

指導老師：鄭 葳 教授  
陳穎從 教授

口試委員：鄭 葳 教授 (東海大學生命科學系)  
陳穎從 教授 (台中榮民總醫院 副院長)  
黃光裕 教授 (東海大學生命科學系)  
謝明麗 教授 (東海大學生命科學系)  
林幸榮 教授 (陽明大學臨床醫學研究所)  
丁紀台 副教授 (台中榮民總醫院 心臟血管中心主任)

中華民國九十六年十二月

# 目 錄

|                                   | 頁數 |
|-----------------------------------|----|
| 中文摘要                              | 4  |
| 英文摘要                              | 6  |
| 1.前言                              |    |
| 1.1. 動脈粥瘤的產生                      | 8  |
| 1.2. 膽固醇在細胞內的代謝機制                 | 9  |
| 1.3. Caveolae 與 caveolin 的基因與蛋白特性 | 14 |
| 1.4. Caveolin-1 與 eNOS 的功能        | 16 |
| 1.5. Caveolin-1 與機械力量的傳導          | 17 |
| 1.6. Caveolin-1 與訊號傳遞             | 18 |
| 1.7. Caveolin-1 與細胞內膽固醇的平衡        | 19 |
| 1.8. 動脈粥瘤的生物指標分                   | 20 |
| 1.9. AP-Cav-1 蛋白及其應用              | 21 |
| 1.10. 論文研究方向                      | 22 |
| 2.材料與方法                           |    |
| 2.1. 動物動脈粥瘤的引發                    | 23 |
| 2.2. 組織化學染色法                      | 24 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3. 免疫組織化學染色法                               | 24 |
| 2.4. Apoptosis 細胞凋亡的測試                       | 25 |
| 2.5. 蛋白質萃取                                   | 26 |
| 2.6. 西方點墨法分析                                 | 26 |
| 2.7. 亞硝酸鹽的測量                                 | 28 |
| 2.8. 血清 caveolin-1 之分析                       | 28 |
| 2.9. AP-Cav-1 的動物實驗                          | 29 |
| <br>   |    |
| 3.結果   |    |
| 3.1. Caveolin-1 在高血脂白兔動脈血管內皮細胞<br>的分佈及表現     | 30 |
| 3.1.1. 白兔體重與血清膽固醇濃度之變化                       | 30 |
| 3.1.2. Caveolin-1 在動脈壁的分佈                    | 30 |
| 3.1.3. Caveolin-1 免疫組織染色                     | 30 |
| 3.1.4. 動脈壁的亞硝酸鹽的變化                           | 32 |
| 3.2 評估血漿中 caveolin-1 濃度可否作為動脈粥<br>瘤硬化的生物指標分子 | 32 |
| 3.2.1. 在粥瘤硬化初期，白兔血清中 caveolin-1<br>之變化       | 32 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 3.2.2.冠狀動脈硬化患者與正常人血液中           |    |
| caveolin-1 之變化                  | 32 |
| 3.3 AP-Cav-1 對粥瘤形成的影響           | 33 |
| 3.3.1. 以靜脈注射 AP-Cav-1 蛋白對白兔動脈粥瘤 |    |
| 之影響                             | 33 |
| 4.討論                            | 33 |
| 5.參考文獻                          | 41 |
| 6.圖表                            | 50 |
| 7.附圖                            | 60 |

## 摘要：

Caveolin-1 為燒杯狀膜小囊 caveolae 的主體蛋白，與細胞膽固醇的代謝和運出及動物動脈硬化有密切的關係。我們使用食物誘發粥瘤形成的白兔作為實驗模式，以免疫螢光及西方點墨法探討 caveolin-1 在內皮細胞的表現與分佈，使用白兔多源抗體製造合成型 Elisa 檢驗，來偵測白兔血液 caveolin-1 濃度，使用 caveolin-1 蛋白注射高血酯白兔，觀察是否可以影響粥瘤之形成。結果顯示紐西蘭白兔在餵食膽固醇飼料後，粥瘤在第五至六週出現而至第八週更加增厚，利用免疫螢光染色及西方點墨法可以觀察到動脈血管內皮細胞的 caveolin-1 在初期有逐漸增加的趨勢，在第五週粥瘤病變將開始出現時到達最高，而當持續餵食膽固醇飼料至第八週，粥瘤持續增厚，caveolin-1 之表現則顯著降低。平滑肌在前五週增生較少，但是在第八至十二週則顯著增加。由於 caveolin-1 可由內皮細胞排出至血液中，因此我們嘗試把 caveolin-1 血中濃度當成一個初期動脈硬化的指標，利用 ELISA test 測量白兔血液中 caveolin-1 濃度，觀察是否能在粥狀硬化的初期，即內皮細胞功能異常時，就可以偵測出在血液中之變化。我們測量 6-8 隻動脈硬化白兔血液中，我們發現餵食高膽固醇飼料後，caveolin-1 濃度立即上昇，第二週達到  $14.2 \pm 3.79$  ng/ml，至第四至五週到達最高  $62.4 \pm 6.12$  ng/ml，在第六週後內皮-中層增厚開始，內皮



細胞 caveolin-1 表現減少，血中濃度亦隨之減少，而在第八週顯著下降  $8.5 \pm 1.90$  ng/ml，餵食一般飼料白兔血中 caveolin-1 濃度變化不大，平均為  $2.7 \pm 0.71$  ng/ml (0.0-11.8 ng/ml)；由此初步結果顯示，caveolin-1 血中濃度變化是與內皮細胞上 caveolin-1 表現一致，我們可能可以藉由 caveolin-1 血中濃度得知動脈血管粥狀硬化的程度。在觀察到此一現象後，我們利用合成之 AP-Caveolin-1 蛋白，當白兔血液中 caveolin-1 濃度下降，內皮-中層開始增厚時，將 AP-Caveolin-1 經由靜脈注入動物體內，初步結果顯示 AP-Caveolin-1 可以降低粥瘤的形成。這些結果將可提供在臨床提早診斷與治療動脈硬化患者的重要參考。

**Abstract :**

Caveolin-1, the major component of “flask-shaped” indentations of cell membrane “caveolae”, is present in several cell types known to play a role in the development of atherosclerosis. In this study, we established an experimental hypercholesterolemic rabbit model to analyze the distribution and expression of caveolin-1 in the arterial walls. Using rabbit polyclonal antibodies with specificity for caveolin-1, we developed a direct sandwich immunoassay for the determination of caveolin-1 in rabbit serum. We also investigated whether in vivo delivery of caveolin-1 peptide could affect the development of atherosclerotic plaque. The fatty streak started to appear at 5-6 weeks and became more severe after 8 weeks of high cholesterol treatment. Immunohistochemical results indicated that the staining intensity of caveolin-1 reached a high level in the arterial intima at 5 weeks and decreased to a very low level at 8 weeks after high-cholesterol-diet treatment. Western blot analysis showed that in rabbits fed a high-cholesterol diet for 5 weeks, the expression of caveolin-1 reached its highest level then decreased from 8 to 12 weeks. The proliferation of smooth muscle cells decreased to the lowest level at 5 weeks and then increased at 8 and 12 weeks. Caveolin-1 levels were measured in the sera of 6-8 rabbits at different intervals after high-cholesterol diet treatment. In rabbits fed a high-cholesterol diet for 2 weeks, the mean serum level was  $14.2 \pm 3.79$  ng/ml. This value increased to the highest level ( $62.4 \pm 16.12$  ng/ml) at 4-5 weeks and then decreased to  $8.5 \pm 1.90$  ng/ml at 6 weeks. Median caveolin-1 level in the controls was  $2.7 \pm 0.71$  ng/ml (range, 0.0-11.8 ng/ml). These results indicated that the serum caveolin-1 level closely related to the severity of atherosclerosis and might be used as a biomarker in detecting the early atherosclerosis. In order to investigate whether in vivo administration of caveolin-1 could

regress the plaque formation, the chimeric peptide, antennapedia (AP)-caveolin-1 peptide, was used for intra-venous injection in the hypercholesterolemic rabbits after cholesterol-diet treatment. The preliminary data indicated that the AP-Caveolin-1 could reduce the formation of atherogenic plaques. These results provide the important information for the early detection and clinical treatment of atherosclerosis.

## 1. 前言

動脈血管粥狀硬化 ( atherosclerosis ) 會引起血管的狹窄及阻塞，進而造成腦中風、心肌梗塞及週邊血管疾病；這三大類的疾病，又常合併發生於同一位患者身上，動脈硬化造成的死亡率約佔人類總死亡率的 40%，約與癌症造成的死亡率相當。在過去的 20 年間心血管疾病的治療有很大的進步；在藥物方面，不同種類的降血脂藥物與降血壓藥物不斷推出，在侵入性治療方面，由於心導管檢查與氣球擴張術的快速發展、血管支架及塗藥支架的進步、溶血栓及抗血小板藥物的上市，心臟科醫師雖然已經成功的把急性心肌梗塞患者的死亡率降低 70%，但是對於動脈硬化所造成的慢性心肌缺氧及心絞痛患者長期存活幫助不大。因此有些心臟科學者提出，在未來如果醫師想要再降低動脈硬化患者之死亡率，需要有了新的治療方向。

### 1.1. 動脈粥狀的產生

動脈血管粥狀硬化是一種慢性發炎性反應(Lusis, 2000 ; Christopher and Joseph, 2001 ; Libby, 2002)，動脈硬化的發生主要是血管內皮細胞受到損傷及功能失常，致使血管內皮的通透性改變，使低密度脂蛋白膽固醇 ( LDL-C ) 進入內皮細胞內的下層，因 LDL-C 離開血液後便無抗氧化物質的保護，又經局部的氧化自由基及酵素作

用，產生氧化低密度脂蛋白膽固醇(ox-LDL-C)。而 ox-LDL-C 會刺激內皮細胞產生化學趨性物質，如 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)，吸引血液中的單核球 ( monocyte ) 及淋巴球進入內皮細胞下層。在此單核球吞噬這些具有細胞毒性及發炎性的 oxLDL 轉成巨噬細胞(macrophage )，產生局部發炎反應，並分泌細胞激素(cytokines) 如 interlukin-1、 interlukin-6、干擾素- (interferon- )，腫瘤壞死因子(tumor necrotic factor, TNF)，進而激發內皮細胞上的黏著分子(adhesion molecules)的產生 (Lusis et al., 2004, Armstrong et al., 2006)。這些黏著分子 ( vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1 ) 會吸引更多的單核球進入內皮下層，此作用形成惡性循環，反覆吞噬 oxLDL 的巨噬細胞，終至變成泡沫細胞 ( foam cell ) 沉積在內皮層(intima layer) 而中皮層(medial layer)內的平滑肌細胞受上述細胞所分泌的生長因子所影響而開始分裂並移至內皮層，形成泡沫細胞。巨噬細胞與平滑肌細胞形成的泡沫細胞再加上結締組織增生與修補，造成早期的動脈硬化斑塊(fatty streak )，若硬化斑塊繼續惡化，則形成動脈粥瘤。(Glass and Witztum, 2001 ; Libby, 2002 ; Hansson, 2005)

## 1.2. 膽固醇在細胞內的代謝機制

人體內膽固醇的來源有二種方式；一是由食物攝取(外生性來源)

，另一是靠細胞合成(內生性來源)。

#### 1.2.1. 外生性來源

每日飲食所攝食的脂肪，經由腸胃道消化吸收而形成乳糜微粒(chylomicrons)，這些脂蛋白顆粒較大且含有豐富三酸甘油酯，經由淋巴系統進入血液循環運送；脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)存在於肌肉及脂肪組織，在這些部位的 LPL 可水解乳糜微粒所含的三酸甘油酯，而三酸甘油酯被分解為游離型脂肪酸(free fatty acid)及甘油(glycerol)，游離型脂肪酸可以提供給肌肉細胞當作能量來運用，亦可在脂肪組織以三酸甘油酯的方式來貯存；然後乳糜微粒變成乳糜微粒殘留物(chylomicron remnant)，乳糜微粒殘留物在水解過程中會喪失 apo CII，並且獲取 apo E，apo E 可和肝臟脂蛋白感受器相結合，將膽固醇運送給肝細胞作為膽汁酸的生成及極低密度脂蛋白膽固醇(very low density lipoprotein- cholesterol, VLDL-C)的製造。(Kruit et al., 2006； Sutherland et al., 2007； Bravo and Napolitano, 2007)

#### 1.2.2. 內生性來源

VLDL 是運輸內生性甘油三酯的主要形式，在肝細胞中可利用膽固醇及三酸甘油酯，在加上 apo B-100、E 以及磷脂即形成 VLDL，其中膽固醇大部份是由 chylomicron remnant 所運送過來，而三酸甘油酯是由血液循環中游離脂肪取得或者是由葡萄糖轉化為游離脂肪酸所

取得。VLDL 進入血液循環後，VLDL 的甘油三酯在 LPL 作用下，其表面的 apo C、磷脂及膽固醇向 HDL 轉移而逐步水解，同時 HDL 的膽固醇酯也會轉移到 VLDL。VLDL 本身顆粒逐漸變小，密度逐漸增加，apo B100 及 E 的含量相對增加，轉變為中間密度脂蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL)。IDL 中膽固醇及甘油三酯含量大致相等，載脂蛋白則主要是 apo B-100 及 -E，部分 IDL 為肝細胞攝取代謝；未被肝細胞攝取的 IDL 進一步水解，最後只剩下膽固醇酯，同時其表面的脂蛋白剩下 apo B-100，轉變為低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。每個 LDL 顆粒外層附著一個輔脂蛋白 apo B-100，可和全身細胞上的 LDL receptor 結合，以提供它們所需的膽固醇，這些膽固醇為製造細胞膜的成份、腎上腺荷爾蒙、維他命 D 的前驅物；LDL 可經由其接受器返回肝臟，做為肝臟膽酸的生成或再合成為脂蛋白,再度回到血液中,而 receptor 的多寡可決定血中 LDL 的清除率(Hachem and Mooradian, 2006；Singh et al., 2007)。

### 1.2.3. 細胞內膽固醇合成

葡萄糖、脂肪酸及某些氨基酸代謝後產生的 acetyl-CoA 是膽固醇合成的原料，膽固醇合成有近 30 步反應，另外還需要 ATP 供能和 NADPH 供氫，其中 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase)是膽固醇合成的限速？。

#### 1.2.4. 激素的調節

高血糖素(glucagon)可藉 cAMP 影響蛋白激酶，加速還原 HMG-CoA reductase 磷酸化失去活性，因而抑制此酶，減少膽固醇合成；胰島素(insulin)能促進酶的去磷酸化作用，使酶活性增加，則有利於膽固醇合成，胰島素也能誘導 HMG-CoA 還原酶的合成，從而增加膽固醇合成(Boyle, 2007)。甲狀腺素亦可促進該酶的合成，使膽固醇合成增多，但同時又促進膽固醇轉變為膽汁經由腸道排出，增加膽固醇的代謝，而且排出作用大於合成，故當患者甲狀腺機能亢進時，血清膽固醇含量反而下降(Duntas, 2002)。

#### 1.2.5. 細胞內膽固醇代謝作用的調控

在體內低密度脂蛋白膽固醇(LDL-cholesterol)濃度高時，細胞靠 LDL receptor 來攝取它所需要的膽固醇，而細胞內自己合成膽固醇的能力被壓制到最低程度。當血液中膽固醇減少時，細胞表面的 LDL receptor 以及細胞內自己合成膽固醇的能力都相對地增加，而膽固醇的貯存的活力也減少，因為沒有過剩的膽固醇可以貯存。在遺傳性家族高膽固醇血症(familial hypercholesterolemia)患者體內因基因突變而嚴重缺乏 LDL 受體，因此 LDL 攜帶的膽固醇不能被攝取，從血液中清除，故血中膽固醇濃度過高，這些膽固醇則沉積在動脈內皮下被巨噬細胞吞



噬中，引起動脈粥狀硬化及狹窄。

血液中膽固醇量過高，會引起動脈粥瘤硬化，但膽固醇也是構成細胞膜很重要的成份，在哺乳動物細胞有大於85%游離膽固醇是位在細胞膜上，只有其中的5%是在外層直接與組織液相接觸，而剩下的80%則位於細胞膜的雙磷脂內層，可協助細胞膜的穩定，膽固醇對於膜上的接受器、轉運蛋白及？皆有調節功用(Schroeder, 1991)。而在細胞內的胞器上游離膽固醇的含量很少，佔總膽固醇含量15%，只有在高爾基氏體的遠端將要分出囊泡處，其游離膽固醇量細胞膜相近(Orci, 1981)。

細胞中的膽固醇以膽固醇酯的形式儲存，此外過多的膽固醇可經由擴散或由一種稱為膜囊(caveolae)的結構攜帶至細胞膜上，並由高密度脂蛋白帶回至肝臟中代謝，稱為膽固醇逆運送(reverse cholesterol transport)(Fielding and Fielding, 1997； Gratton et al., 2004)。Caveolae首先在1953年由電子顯微鏡觀察到(Palade, 1953)，但對其功能直到最近才有進一步的瞭解。

### 1.3. Caveolae 與 caveolin-1 的基因與蛋白特性

George Palade 在 1953 年以電子顯微鏡首次觀察到在膽囊表皮細胞及血管內皮細胞上有一些小的燒杯狀凹陷，直徑約 70-120nm

(Palade, 1953)。1955 年 Yamada 把這些凹陷構造命名為 caveolae，意思是指它們類似細胞膜上的小穴(Yamada, 1955)。與 clathrin-coated pits 不同處是 caveolae 外圍沒有一層電子密度較高的外膜，且 caveolae 不溶於清潔劑 (detergent-resistant)。Caveolae 上含有比週圍細胞膜更多的膽固醇、glycosphingolipid、sphingomyelin。此外 caveolae 中亦聚集了許多訊號傳遞分子 接受器 protein kinase C、G protein 及 receptor tyrosine kinase 等分子 (Smart et al., 1999； Fielding and Fielding, 2001a； Parton, 2003)。

Caveolin-1 為 caveolae 主體蛋白，含有 178 個胺基酸，其 N 端與 C 端皆朝向細胞質內(附圖一、二)，位於中間的第 102 到 134 個胺基酸殘基則為疏水性，而形成髮夾結構(hairpin structure)插入膜內(Couet et al., 1997)。每一個 caveolin-1 蛋白的 N 端第 61-101 的胺基酸可彼此互相結合，形成一個同源寡聚體(homo-oligomers) (Schlegel and Lisanti, 2000)，而第 81-101 個胺基酸則與 G-protein 相結合，第 102-134 個胺基酸則形成髮夾構造，插入細胞膜的內面，而在第 133，143 與 156 處則有 palmitoylation (Dietzen et al., 1995)。這些寡聚體又可與膜上的膽固醇相結合，形成一個穩定的結構(Murata et al., 1995)。

Caveolin-2 缺少與 caveolin-1 相似的 N 端，但此二種 caveolin 會形成穩定的異源寡聚體，多存在於血管內皮細胞、平滑肌細胞、脂肪

細胞和巨噬細胞中(Das et al., 1999)。Caveolin-3 是 caveolin 家族中最小的分子,只存在橫紋肌與平滑肌細胞中。研究發現如果在第 81-101 個胺基酸間有 3 個 codons 缺損,則會造成 caveolin-3 無法接合在細胞膜上,而造成 limb-girdle muscular dystrophy (Minetti et al., 1998)。Caveolin-1 與 caveolin-3 的單體 ( monomers ) 可各自形成許多同源寡聚體;而 caveolin-2 能形成單體或同源雙體 ( homo-dimer ) 的形式。Caveolin-1 與 caveolin-2 則可形成高分子量的異源寡聚體(hetero-dimer),而並存於 caveolae 中(附圖三)。

Caveolin-1 基因位於人類染色體 7q31.1,含有 3 個 exons。在哺乳動物細胞內的 caveolin-1 又可依 N 端的不同分成 與 型 (caveolin-1 與 caveolin-1 ),主要區別是因為在 DNA 轉錄成 mRNA 時來自不同的起點 (alternation initiation site)(Kogo and Fujimoto., 2000), Caveolin-1 為 24kDa,有 178 個胺基酸所組成, Caveolin-1 為 21kDa,有 147 個胺基酸所組成(Fujimoto et al., 2000)。

Caveolae與caveolin-1在訊號傳遞中扮演主要角色,此外亦有研究報導caveolin-1在細胞膽固醇的運送及排出所佔的角色(Fielding and Fielding, 2001b)。Caveolae常見於內皮、肌肉及脂肪細胞,在肝細胞及腸細胞則少見,在血液中的單核球、淋巴球、轉型癌化中的細胞及癌細胞則沒有caveolae。Caveolae除了主體蛋白caveolin-1,也有一些

輔助結構蛋白如flotillins及cavatelins。 Caveolin-1與-2並存於caveolae上，由16-18個caveolin-1分子形成一個單位聚集在caveolae上。Caveolae對特定物質可形成小泡，把物質攝入細胞內(Shin, 2000)。如果用caveolin DNA來轉殖細胞，則膜上caveolae的量增加，顯示caveolin對於caveolae的形成是必要條件。Caveolae上有dynamin，是一種大型的GTPase可以協助caveolae攝入胞外物質進入胞內形成小泡。在1995年caveolin-1被發現與游離膽固醇以1mole/mole互相緊密結合，並被認為與細胞內膽固醇運送與排出有關(Smart et al., 1996)。

#### 1.4. Caveolin-1 與 eNOS 的功能

Caveolin-1 會與內皮細胞一氧化氮合成酶 ( endothelial nitric oxide synthase, eNOS )相結合,而抑制 eNOS 產生一氧化氮( nitric oxide, NO ) ( Garcia-Cardena et al., 1996 )。如果提高細胞內  $Ca^{2+}$ /calmodulin 濃度,可使 eNOS 與 caveolin-1 分離而與  $Ca^{2+}$ /calmodulin 相結合而使其活化,而後將 L-arginine 轉變為 NO。如細胞中膽固醇濃度增加,則 caveolin-1 濃度增加,與 eNOS 結合增加而 NO 含量降低(Feron et al., 1999)。NO 除了可使血管平滑肌舒張外,也會抑制粥瘤的形成。一方面 NO 會抑制血管附著因子 ( vascular cell adhesion molecular-1, VCAM-1 ) 的表現,另一方面也會抑制血管平滑肌的增生(Thyberg,

2003; Frank and Lisanti, 2004) 在 caveolin-1 剔除老鼠, eNOS 表現會增加, 使血管舒張功能加強, 通透性增加, 表示 caveolin-1 在細胞 NO 調節中扮演重要角色(Frank et al., 2003)。

### 1.5. Caveolin-1 與機械力量的傳導 (Mechanotransduction)

剪力 (shear stress) 是血液在血管中流動時, 對內皮細胞產生的一個水平方向的力量, 目前認為機械性的剪力, 可以經由 caveolae 內的蛋白及受體轉換, 而影響細胞內分子訊號的傳遞(Rizzo et al., 2003; Yu et al., 2006)。一般狀況下培養的內皮細胞, caveolae 含量較少, 如果對細胞施以剪力, 則 caveolae 含量增加, 在剪力下培養的內皮細胞有較多的蛋白被磷酸化, 而這些蛋白大部分位於 caveolae 中 (Park et al., 2000; Sun et al., 2002); 如果把肺部的內皮細胞置於流動的培養液中施以剪力, 則位於 caveolae 內的 eNOS 活性會增加, 剪力也會增加 caveolae 內 tyrosine 的磷酸化及 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 的活化(Rizzo et al., 1998)。除了剪力外, 垂直於內皮細胞的力, 如應力 (stress) 形變力 (strain) 也可能是藉由 caveolae 內的蛋白作訊號傳遞, 而來調節血管的功能(Volonte et al., 2001)。

### 1.6. Caveolin-1 與訊號傳遞

Caveolin 蛋白的 N 與 C 端皆朝向細胞質, 除了 C 端與膽固醇相

結合外，另外可和多種受體或蛋白相結合，來調控這些蛋白與其下游的分子，其中包括 tyrosine kinase receptors、non-receptor tyrosine kinase 與 G-protein。Caveolin 可以調控許多膜上的訊號蛋白，它可抑制 G-protein，Src family kinase，NO synthase，epidermal growth factor receptor 及 protein kinase C 等。這些抑制作用是在 caveolin 的 N 端，靠近細胞上的 Scaffolding domain 發生的(Müller and Frick, 1999；Smart et al., 1999)。Caveolin-1 具有抑制細胞轉型(transformation)或癌化的作用，在人類乳癌細胞株中，有 26 個基因的 mRNA 會被抑制，而 caveolin-1 正是其中之一。在致癌基因(如 r-abl 與 Ha-ras)被活化的轉型細胞株中，caveolin-1 的 mRNA 及蛋白會減少，且 caveolae 亦無法形成(Song et al., 1996；Krajewska and Maslowska, 2004)。

### 1.7. Caveolin-1 與細胞內膽固醇的平衡

細胞膜上的 caveolae 有豐富膽固醇，且與 caveolin 以 1：1 相結合，如果使用藥物除去膽固醇，則 caveolin 也不存在而 caveolae 亦跟著消失 (Fielding and Fielding, 1995)。當細胞內游離膽固醇過多時可利用 Acyl Co-A：cholesterol acyltransferase (ACAT) 轉成膽固醇酯 (cholesterol ester, CE) 儲存；當細胞在缺少膽固醇的環境下，膽固醇酯利用 cholesterol esterase 來轉回成游離膽固醇。而過多的游離膽

固醇則會抑制位在 ER 上的一群核蛋白 (sterol regulatory element binding protein, SREBP) 的活性(Wang et al., 1993)。若 SREBP 被抑制, 則不會被 cystein protease 切割而形成活化的 SREBP, 進而不會進入細胞核內活化一些可以提升胞內游離膽固醇形成的基因, 如 LDL 受體蛋白與 HMG-CoA reductase 等基因(Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2007)。在另一方面, 過多的游離膽固醇則會促使核內 caveolin-1 基因被活化, 使 caveolin-1 mRNA 濃度上升, 產生較多的 caveolin-1 蛋白(Fielding and Fielding, 1997), 進而協助細胞將多餘的膽固醇藉 caveolin-1 與 cyclophilin A、cyclophilin 40 和熱休克蛋白 56(HSP56)形膽固醇轉運複合體, 由高爾基體運送到細胞膜上(Smart et al., 1996)。在 caveolae 中的膽固醇可能由 caveolin-1 或 ABCA<sub>1</sub> 轉交給膜上的 pre- $\beta$ -HDL, 由 HDL 將膽固醇帶回肝臟, 重新利用或排出體外(Smart et al., 1996; Frank et al., 2006; Truong et al., 2006); 利用這些調控, 可使細胞在胞外 LDL 增加或減少 10 倍的情況下, 仍可維持胞內遊離膽固醇在 5%以內的變化。

### 1.8. 動脈粥瘤的生物指標分子

目前的研究報告中指出動脈粥瘤硬化之發炎生物指標分子 (inflammatory biomarker)( Downing et al., 2001; Armstrong et al., 2006; Libby et al., 2002) , 有高敏感C反應蛋白 (high sensitivity

C-reactive protein, hs-CRP ) (Ridker et al., 2000)、粥瘤巨噬細胞分泌之 IL-1、IL-6等分子(Willerson and Ridker, 2004 ; Vasana, 2006)。Hs-CRP 可以誘導內皮細胞表達ICAM-1、VCAM-1和E-selectin , 並啟動外源性的凝血過程(Myers et al., 2004)。Hs-CRP是目前發現的最重要的粥樣硬化炎性標記物；此外斑塊中的巨噬細胞可產生大量的水解酶，尤其是基質金屬蛋白酶 ( matrix metalloproteinases , MMPs )。MMPs是一組含Zn<sup>2+</sup>並能降解細胞外基質的蛋白酶，在穩定斑塊變為不穩定過程中十分重要(Sundström and Vasana, 2006; Johnson, 2007)。而soluble CD40 ligand (sCD40L)為一種穿越細胞膜的表面蛋白，與表現在B 細胞、巨噬細胞、內皮細胞以及平滑肌細胞的CD40交互作用後，可以誘導發炎反應，造成動脈粥狀硬化斑的破裂，引起血管栓塞。Hs-CRP、sCD40L及MMPs皆為oxLDL進入內皮細胞下層後，引起一連串發炎反應後的產物，但均屬於粥瘤硬化過程中較晚期的指標分子(Ridker et al., 2004)，而早期粥瘤形成的指標分子則極少探討 (Lin et al., 2006 ; Schwencke et al., 2005 )。

### 1.9 AP-Cav1 蛋白及其應用

Antennapedia(AP)是果蠅體內的一種同源蛋白，其C末端有排列60個氨基酸排列成三個 $\alpha$ 螺旋，被稱為同源結構域(homeodomain, AntpHD), 其中第三個 $\alpha$ 螺旋(氨基酸43 - 58, RQPKIWFPNRRKPWKK)



含有16個胺基酸，這段胜? 鏈被發現可自由的出入細胞膜，是一段不用細胞膜上受體(receptor)也不需通道(channel)即可以直接進入細胞內之胜? 鏈，不論在4 或37 的環境中均可正常進行，因此被稱為蛋白質轉導結構(protein translation domain, PTD)，或細胞穿膜? (cell penetrating peptide, CPP)(Derossi et al., 1996)，利用它為運輸載體，以蛋白合成或化學耦合方法，可以攜帶30-50個胺基酸進入細胞(Derossi et al., 1998)。Caveolin-1之scaffolding domain (第81-100，DGIWKASFTTFTVTKYWFYR)共20個胺基酸，利用這段胜? 鏈與eNOs相結合，有抑制發炎反應之功能(Garcia-Cardena et al., 1997)，以靜脈注射合成的AP-Cav-1(共36個胺基酸，RQPKIWFNRRKPWKK-DGIWKASFTTFTVTKYWFYR-(OH))，發現可以抑制小鼠耳部由焦油所引起的局部發炎反應 (Bucci et al., 2000)；以藥物引起肺動脈高血壓的老鼠動物模式中，給予靜脈注射AP-Cav-1，可以抑制肺動脈血管平滑肌增生及肺動脈高壓的產生 (Jasmin et al., 2006)，故我們嘗試以AP-Cav-1靜脈注射觀察可能對粥瘤造成的影響。

#### 1.10. 論文研究方向

在體外細胞培養的研究中，已發現 caveolin-1 與細胞膽固醇的運送有密切的關係，但是在體內血管的研究方面目前仍沒有定論，因此本論文的主要研究目的是 (一)以高膽固醇飼料誘發粥瘤形成的紐西

蘭白兔作為實驗模式，利用免疫螢光及西方點墨法探討 caveolin-1 在粥瘤形成的過程中，在內皮細胞的分佈及表現；(二)由於 caveolin-1 可由內皮細胞排出至血液中，我們在餵食高膽固醇飼料後不同時間，以 ELISA 方法測試白兔血清中 caveolin-1 濃度，觀察是否能在粥狀硬化的初期，即內皮細胞結構開始異常及粥瘤形成時，偵測 caveolin-1 在血中之濃度變化。此外我們分析接受心導管檢查患者之血液，比較冠狀動脈硬化患者與正常人血液中 caveolin-1 濃度，評估 caveolin-1 是否可以作為診斷早期動脈粥瘤硬化之指標(Tahir et al., 2003)；(三)在白兔組織及血液中 caveolin-1 開始減少而粥瘤出現時，給予靜脈注射外生性的 AP-Cav-1 蛋白，觀察是否可減少或抑制粥瘤的發生。我們由動脈硬化的基礎醫學研究，希望從分子生物學角度出發，來找出新的解決方案，這些研究成果，希望可提供在臨床提早診斷與治療動脈硬化患者的重要參考。

## 2. 材料與方法

### 2.1. 動物動脈粥瘤的引發

我們使用紐西蘭大白兔做為引發動脈硬化的動物模式，共使用 80 隻雄性紐西蘭大白兔( New Zealand white rabbit )，重量在 3.5 至 4 公斤之間，飼養於台中榮總動物中心，且保持日夜各十二小時，溫度

為攝氏二十二度，及恆定的溼度。其中 40 隻餵食一般的兔子飼料(福壽公司 台中，台灣)；另一組 40 隻則餵食正常飼料加 2%膽固醇，共餵食十二周，所有實驗步驟皆經由台中榮總動物實驗委員會審查通過。在餵食第二週後，每週一次，由兔子耳部靜脈抽血，每次 1.5 CC，血液標本收集在 Eppendorf 試管，以 5000x g 離心 10 分鐘，總膽固醇、高密度脂蛋白膽固醇及低密度脂蛋白膽固醇的濃度分別使用 LDL-Cholesterin (Spellilng)和 Cholesterin 套組(Merck KgaA; Darmstadt, Germany)方法測量。

## 2.2. 組織化學染色法

餵食十二周後，白兔以ketamin (40毫克/公斤)及xylazine(5毫克/公斤)肌肉注射，在犧牲之後取下主動脈弓，胸主動脈和冠狀動脈，以分級酒精脫水及以二甲苯(xylene)浸潤後包埋在石蠟中，將組織塊切成5微米( $\mu\text{m}$ )薄片，將石蠟包埋之切片浸入二甲苯四次，每次5分鐘，進行脫蠟，再以不同的酒精濃度100%、100%、95%、75%、50%濃度酒精順序進行序列入水(hydration)，每次各3分鐘，最後以二次去離子水清洗切片4次，每次5分鐘，完成後將標本以hematoxylin & eosin、免疫組織化學染色及TUNEL染色。

## 2.3. 免疫組織化學染色法

切片脫蠟與系列入水步驟同於組織化學染色，之後切片標本以清水沖洗10分鐘後加入10 mM citric acid緩沖液(pH 6.0)，在微波爐中以800瓦加熱15分鐘，使抗原再現，切片先以non-immune血清作用，以除去非專一性的反應，而後於室溫下以PBS沖洗切片4次，先與初級抗體rabbit anti-human caveolin-1 antibody [1:200 (v/v); Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA]及mouse anti-human- actin antibody [1:200 (v/v); Lab Vision Corp., Fremont, CA] 在37<sup>o</sup> 作用1小時，接著加入biotinylated goat anti-rabbit IgG或 biotinylated goat anti-mouse IgG；完成作用後，標本以PBS沖洗3次，再以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-DAB與streptavidin-peroxidase (Zymed Laboratory; South San Francisco, CA)共同作用，再以hematoxylin染色、脫水、風乾後封片，使用光學顯微鏡拍照(Nikon Microphot-FXA, Tokyo, Japan)。免疫染色的專一性，以省略一級抗體的切片作為對照組。

#### **2.4. Apoptosis 細胞凋亡的測定**

脫蠟與系列水合步驟後的5微米厚之組織切片以PBS沖洗，再以proteinase K 20 μg/ml在37<sup>o</sup>C下培養15分鐘，使DNA暴露容易染色，對照組先將切片暴露於5 μg/ml DNase I 37<sup>o</sup> 60分鐘，之後依TUNEL(Promega , DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System)染色；

加equilibration buffer 於組織切片上，在室溫下作用10分鐘，以PBS清洗切片5分鐘。將配好的TdT reaction 混和液滴於切片，於37<sup>0</sup>C作用60分鐘後，以二次去離子水稀釋10倍的SSC (sodium chloride and sodium citrate)溶液滴於切片上，在室溫下靜置15分鐘，終止TdT enzyme 的反應；陽性對照組是把標本放在5 μg/ml DNase I中，以37<sup>0</sup>C作用60分鐘，以TUNEL染色後，再以DAPI(1μg/ml)複染，在室溫下作用20分鐘。完成後以Nikon Eclipse E400螢光顯微鏡觀察。

## 2.5. 蛋白質萃取

胸主動脈使用PBS清洗後放入溶解液(lysis buffer)中均質化，(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM benzamidine, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10 mg/ml phenyl methane sulfonyl fluoride)，在4<sup>0</sup> C靜置一夜，隔日在超音波震碎機下震碎細胞，之後在4<sup>0</sup> C下使用離心機在900 xg離心10分鐘，取上清液利用BCA protein assay kit (Pierce; Rockford, IL), 測量蛋白濃度，並存於-20<sup>0</sup> C以備用。

## 2.6. 西方點墨法分析

取一小塊胸主動脈切碎後，加入lysis buffer (10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1 mM benzamidine, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF)溶解細胞，並以超音波粉碎器處理30 秒4 次，將細胞打碎，最後在800 g

下離心10分鐘除去雜質，收取上清液。將含有20  $\mu$ g 細胞蛋白質的萃取液注入不連續式12 % SDS-PAGE 電泳膠中先以50 伏特電壓進行蛋白質壓縮(stacking)，待樣品通過stacking gel 後接著以70 伏特電壓繼續在12 %膠中將蛋白質分離。進行約1.5 個小時後取下 SDS-PAGE電泳膠平放在半乾濕轉漬器(Bio-Rad, USA)，將SDS-PAGE電泳膠上的蛋白質，以20 伏特的電壓進行30 分鐘將蛋白質轉移至PVDF 膜上。取出PVDF 膜放入5 % 脫脂奶粉中，在室溫下反應1小時，阻斷非專一性抗體部位。接著以TBS-0.05% Tween 20 緩衝溶液清洗2 次、每次10 分鐘，然後加入兔子抗人類caveolin-1 抗體(rabbit anti-human caveolin-1 antibody, 1:10,000 v/v; Santa Cruz Biotechnology)或mouse anti-rat proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) antibody(1:10,000 v/v; upstate, Charlottesville, VA)作用一小時，再與山羊抗兔子的IgG與HRP接合體(HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG 1:15,000 v/v; Zymed Laboratories)或山羊抗小鼠IgG與HRP(HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 1:15,000 (v/v))接合體，於室溫下反應1小時，再經TBS-0.5% Tween- 20緩衝溶液清洗3 次，每次10分鐘後，以chemiluminescence 冷光試劑顯色，並在冷光影像感應系統(Fuji, Japan)下照相。

## 2.7. 亞硝酸鹽產物的測量

由於直接測量NO值較為困難，因此我們以測量NO代謝後的產物亞硝酸鹽( $\text{NO}_2^-$ )濃度，作為測量NO的含量，取5x10毫米的胸主動脈樣本使用Griess reaction來測量亞硝酸鹽濃度(Uemura et al. 2000)，先把樣本置於37 °C的Hanks'buffered saline solution (HBSS; Hyclone, Logan, UT)中2小時，再使用Griess 試劑測量亞硝酸鹽，並以colorimetric 分析系統分析濃度。

## 2.8. 血清caveolin-1 的分析

使用白兔caveolin-1多株抗體以三明治型ELISA (sandwich ELISA) 檢測血清中caveolin-1的濃度，捕獲抗體(capture antibody)是使用合成的白兔抗人類抗caveolin-1抗體(Transduction Lab)，而偵測抗體(detection antibody)是使用HRP結合白兔抗人類抗caveolin-1抗體(Santa Cruz Biotechnology)，二種抗體皆為偵測N-端20個胺基酸的caveolin-1胜肽鏈；首先在96孔之多孔盤中加入50  $\mu\text{l}$  捕獲抗體(0.0625ug/well in coating buffer)，在4°C下靜置一夜，加入含3% w/v BSA Phosphate-buffered saline-0.05% tween 20(PBST) 與抗體作用後，以PBST清洗3次，標準曲線之建立是取合成的human caveolin-1(N-20)依序以10% FBS之PBST稀釋由0至30 ng/ml加入孔盤中，而待測樣本以100ul/well加入孔盤中，每個樣本重複三次，在室溫下靜置1.5小時後，以200  $\mu\text{l}$  PBST清洗4次，加入100  $\mu\text{l}$ (1:200)的

HRP-conjugated caveolin-1 (Santa Cruz Biotechnology), 在室溫下靜置 1.5小時, 後用200  $\mu$ l PBST清洗2次, 最後加入 100  $\mu$ l OPD reagent(ZYMED Laboratories), 避光 1小時後, 用495nm波長之分析儀分析吸收之波長。先建立由caveolin-1(N-20)濃度由0至30 ng/ml之OD值對應標準曲線, 使用3次方多項式回歸, 求出曲線之多項方程式(公式為:  $Y=aX^3+bX^2+cX+d$ , Y為濃度, a、b、c、d為回歸係數, X為O.D.值), 進而推算出樣本caveolin-1之濃度。

## 2.9. AP-Cav-1 的動物實驗

9 隻紐西蘭雄性白兔, 每隻約 3.0-3.5 公斤, 餵食 2%高膽固醇飼料 5 週, 使用商業合成(Gu-Yuan Biotech Services Corp., TW)之 AP(RQPKIWFPNRRKPWKK)及 AP-Cav-1(RQPKIWFPNRRKPWKK-DGIWKASFTTFTVTKYWFYR-(OH))作靜脈注射。實驗之白兔分成 3 組, 實驗組 3 隻白兔, 在第七週開始, 每隔二日由耳部靜脈注射 AP-Cav-1 (1mg/Kg), 共注射 2 週; 對照組 3 隻白兔, 每隔二日由耳部靜脈注射 AP(1mg/Kg), 正常控制組 3 隻白兔, 隔二日由耳部靜脈注射生理食鹽水 (1cc/Kg), 共注射 2 週; 實驗期間每週測量體重及抽血檢查血液中膽固醇及 caveolin-1 濃度。在第 9 週犧牲白兔, 取下主動脈弓和胸主動脈做蘇丹四號染色。



### 3. 結果

#### 3.1. Caveolin-1 在高血脂白兔動脈血管內皮細胞的分佈及表現

##### 3.1.1. 白兔體重與血清膽固醇濃度之變化

餵食一般飼料白兔血清中膽固醇濃度自第一週開始餵食至第12週實驗結束，皆維持在 $30\pm 5$  mg/dL，而餵食高膽固醇飼料白兔，血清中膽固醇濃度在第一週結束時即有明顯上升 $180\pm 5$  mg/dL，此後隨餵食週數增加而持續上升，在第六週到達最高 $1250\pm 5$  mg/dL，並維持此一血清濃度直到第12週。(圖一)

##### 3.1.2. Caveolin-1在動脈壁的分佈

餵食高膽固醇飼料白兔的胸主動脈，在第5週出現小斑塊，當餵食至第7週時，動脈粥狀硬化條紋可在冠狀動脈、主動脈弓、胸主動脈及頸動脈觀察到，持續餵食8至12週時，可見到大而凸起的斑塊，在顯微鏡下可見內含泡沫細胞、單核球細胞及平滑肌細胞。

##### 3.1.3. Caveolin-1免疫組織染色

在餵食正常和高膽固醇飼料白兔至第5週時，使用免疫組織染色可發現caveolin-1主要存在動脈內皮細胞(圖二 A,B,C)，只有少量的caveolin-1是存在於平滑肌細胞；在主動脈與冠狀動脈血管內皮細胞，餵食高膽固醇白兔的caveolin-1染色強度增加(圖二 B,C)，高於餵

食正常飼料白兔(圖二 A)。當粥瘤開始形成時, caveolin-1的染色強度減少(圖三 A,B), 在斑塊內也可見到許多內含 $\alpha$ -actin的平滑肌細胞(圖三 B), caveolin-1的染色強度在粥瘤處較鄰近正常血管內皮的caveolin-1的染色強度為低(圖三 C); 圖三 D為不染一級抗體的對照組。餵食至第12週時在H&E染色可見到粥瘤增生, 內含大量的泡沫細胞及彈性纖維(圖四 A), 在高倍顯微鏡下可以看到明顯泡沫細胞及細胞外基質(圖四 B), 亦有許多內含 $\alpha$ -actin的平滑肌細胞(圖四 C), 圖四 D為對照組; 在餵高膽固醇飼料8週後, 使用TUNEL染色只有極少數粥瘤細胞呈現陽性反應(圖五 A), 大部分粥瘤細胞只有在經過DNase處理過後才成陽性反應(圖五 B), 表示大部分粥瘤細胞並沒有進行細胞凋零(apoptosis), 細胞核亦清晰可見(圖五 C,D)。使用西方的點墨分析法顯示, 在對照組白兔動脈壁caveolin-1表現隨著時間逐漸增加 (圖六 A); 在高膽固醇飼料白兔動脈壁caveolin-1在第5週達最高, 然在第8到12週逐漸減少(圖六 B,C), PCNA染色主要觀察平滑肌細胞增生的情形, 在高膽固醇飼料白兔, 當動脈壁caveolin-1在前5週增加時, PCNA濃度減少, 然後在第8到12週caveolin-1 減少時, PCNA濃度則逐漸增加(圖六 B,D)。

#### 3.1.4. 動脈壁的亞硝酸鹽的變化

在開始餵食第2週時，餵食高膽固醇飼料組與一般飼料組白兔，動脈壁內亞硝酸鹽濃度沒有明顯差別；在第5週實驗組的亞硝酸鹽濃度降低，與對照組有顯著差異( $p < 0.05$ )；餵食至第8週，實驗組白兔亞硝酸鹽濃度持續減少，與對照組仍有顯著差異( $p < 0.05$ )(圖七)。

### 3.2. 評估血清中 caveolin-1 濃度可否作為動脈粥瘤硬化的生物指標分子

#### 3.2.1. 在粥瘤硬化初期，白兔血清中 caveolin-1 之變化

白兔在餵食一般飼料時，在整個實驗過程中，血清中 caveolin-1 濃度極低(0~11ng/ml)(圖八)，實驗組在開始餵食高膽固醇飼料後，自第一週至第十二週血液中膽固醇濃度為 180 至 1250 mg/dL，第一週 caveolin-1 濃度為  $3.0 \pm 2.11$  ng/ml，在第二週 caveolin-1 濃度開始上升至  $14.2 \pm 3.79$  ng/ml，在餵食第四至五週，粥瘤開始出現，而 caveolin-1 濃度上升至  $62.44 \pm 16.12$  ng/ml，在第六週時開始下降到  $8.5 \pm 1.90$  ng/ml，而粥瘤此時增厚更加明顯，此後 caveolin-1 濃度維持降低趨勢(圖八 A,B)。

#### 3.2.2 冠狀動脈硬化患者與正常人血清中 caveolin-1 之變化

我們初步收集了6位正常人與15位在台中榮總心臟血管中心接受心導管檢查之患者血液，使用 ELISA 測量血清 caveolin-1 濃度，並與

心導管檢查報告及血液中膽固醇濃度做比較，正常人血清中 caveolin-1 濃度平均介於 1.07 ng/ml 至 2.42 ng/ml 之間(表一)，而患者 caveolin-1 值成二極化分布，最低為 0.0 ng/ml，最高為 166.67 ng/ml(表二)。

### 3.3 AP-Cav-1 注射對粥瘤形成的影響

#### 3.3.1 以靜脈注射 AP-Caveolin-1 蛋白對白兔動脈粥瘤之影響

紐西蘭大白兔餵食高膽固醇7週之後，給予生理食鹽水、AP、AP-Caveolin-1每週注射三次(3 mg/次)，注射2週，而後將動物犧牲，取下主動脈做蘇丹四號染色。生理食鹽水注射組的血管粥瘤區域佔總面積的43.6%；給予AP注射組。故血管粥瘤區域佔總面積的56.7%，而經過AP-Caveolin-1注射組的血管則降低為25.6%；初步結果顯示經 AP-Caveolin-1靜脈注射的白兔動脈粥瘤的數量及面積均有減少的趨勢(圖九A、B)，而生理食鹽水注射組與AP注射組有明顯的粥瘤形成。  
( $P < 0.2$ ,  $n=2-3$ )

## 4. 討論

### (一)Caveolin-1 在高膽固醇白兔動脈內皮細胞所扮演的角色

我們使用食物誘發粥瘤形成的白兔作為實驗模式，以免疫螢光及西方點墨法探討caveolin-1在內皮細胞的表現與分佈，結果顯示紐西

蘭白兔在餵食膽固醇飼料後,粥瘤(fatty streak)在第五至六週形成而至第八週斑塊(plaque)增厚,利用免疫螢光染色及西方點墨法可以觀察到動脈血管內皮細胞的caveolin-1在初期有逐漸增加的趨勢,在第五週粥瘤病變開始出現時到達最高峰,而當持續餵食膽固醇飼料至第八週,粥瘤持續增厚,caveolin-1之表現則顯著降低。平滑肌的增生在第八至十二週則顯著增加。

在體外細胞培養研究中已經顯示,在內皮細胞內膽固醇過高時,可促使細胞caveolin-1表現增加(Fielding and Fielding, 2001b; Chao et al., 2003, 2005; Lin et al., 2007),而使膽固醇排出增加;對細胞而言是一個保護機制,可避免膽固醇過度在細胞內堆積,而另一方面游離膽固醇氧化後的產物之一oxysterols則對caveolin-1mRNA有抑制作用,進而減少膽固醇運輸至細胞表層及排出(Fielding and Fielding, 1997)。從動物實驗結果中,我們推論在動脈血管粥狀硬化初期,血液中膽固醇升高時,促使細胞內caveolin-1表現增加,進而增加膽固醇排出,但膽固醇持續增加時,caveolin-1的合成反而被抑制,其機制有待進一步探討。在粥瘤形成過程中所產生之過氧化物reactive oxygen species (ROS)會影響eNOS之磷酸化,導致內皮細胞機能失調。eNOS可以調節血管擴張、防止血小板黏著及抑制平滑肌增生,caveolin-1可與eNOS相結合,而抑制其活性,有負向調節作用(Razani

et al., 2001), 本實驗結果發現在動脈粥狀硬化初期, caveolin-1與eNOS表現皆降低, NO表現降低可能是因為過氧化陰離子(superoxide anion  $O_2^-$ )之抑制作用(Piech et al., 2002)。

Caveolin-1在平滑肌的表現方面, 由於caveolin-1在內皮細胞比在平滑肌細胞中多(Frank and Lisanti, 2004), 我們的組織免疫染色顯示caveolin-1主要表現在內皮細胞, 因此我們認為在西方點墨法分析中, caveolin-1的增加主要來自內皮細胞; caveolin-1表現增加, 可以抑制血管平滑肌增生(Peterson et al., 2003; Schwencke et al., 2005); 而在caveolin-1基因剔除小鼠, 可以發現到血管平滑肌的增生(Hassan et al., 2004;2006)。在本研究中, 我們證明在餵食高膽固醇飼料引起之白兔動脈粥狀硬化初期, caveolin-1表現增加, 血管平滑肌的增生能力下降, 但餵食晚期caveolin-1降低時, 平滑肌增生增加。由以上結果我們認為調控caveolin-1的表現, 可影響粥瘤的形成。

## (二)評估 caveolin-1 做為動脈粥狀硬化指標(biomarker)之可行性

心臟內科醫師要檢查患者是否有冠狀動脈硬化, 傳統上要靠運動心電圖、核子醫學及電腦斷層檢查。但是這些檢查都是在動脈粥狀硬化到相當嚴重的程度, 造成血管狹窄甚至下游的心肌缺氧, 才能檢查出來, 醫師是否能有更有效的工具, 可以在動脈硬化的早期, 甚至內皮細胞有變化時就可發現問題, 而達到早期預防的效果已引起了人們

很大的興趣。測量動脈血管粥狀硬化發炎性標記物是很好的方法，粥狀硬化是一種慢性發炎性反應，主要是血管內皮細胞受到損傷及功能失常，致使血管內皮的屏障和通透性改變，使低密度脂蛋白膽固醇（LDL-C）進入內皮細胞內的量增加，局部的氧化自由基及酵素作用，產生氧化低密度脂蛋白膽固醇(ox-LDL-C) (Lusis, 2000； Lusis et al. 2004)。此變性的 ox-LDL-C，會刺激產生化學趨性物質，如 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)，吸引血液中的單核球進入內皮細胞下層。在此單核球轉成巨噬細胞吞噬這些具有細胞毒性及發炎性的 oxLDL，產生局部發炎反應，而分泌細胞激素(cytokines)如 interlukin-1、interlukin-6、干擾素- (interferon- )，腫瘤壞死因子 (TNF)，進而激發內皮細胞上的黏著分子(vascular cell adhesion molecules, VCAM-1) (Armstrong et al., 2006)，而吸引更多的單核球聚集在內皮細胞上，而進入內皮層，hs-CRP 是全身炎症反應的敏感標誌物，是粥瘤中巨噬細胞分泌的 IL-1、IL-6，刺激肝臟產生。這些發炎反應過程中所放出生物標記物，可在血液中被偵測到，hs-CRP 是目前發現最重要的粥樣硬化炎性標記物。不穩定型心絞痛患者血清 hs-CRP 水準明顯高於穩定型心絞痛患者，且不穩定性心絞痛、急性心肌梗塞患者血清中的 hs-CRP >3.0 mg/L 時表示預後不良。CRP 作標記物之一，已證實是心血管疾病顯著的危險因素。(Ridker et al.,

2000,2004 ; Willerson and Ridker, 2004 ; Myers et al., 2004)

目前他人研究報告中動脈硬化之發炎生物標記物例如 CD40 ligand、hs-CRP 及 MMPs 皆是在 oxLDL 進入內皮細胞下層，引起一連串發炎反應後的產物，屬於動脈硬化的過程中較晚期的指標(Ridker, 2007, Revkin et al., 2007)，而且這些生物標記物在人體受到細菌感染發炎，或有免疫風濕疾病時也會上升，因此用於診斷動脈硬化的敏感度與特異度皆偏低。

我們的研究中發現，當白兔血液中膽固醇濃度開始上升後，動脈血管內皮上的 caveolin-1 表現即開始增加，而當內皮下層逐漸增厚，粥狀硬化出現及平滑肌開始增生時，caveolin-1 之表現量減少。

Caveolin-1 蛋白可自內皮細胞膜上脫離進入血液中而使用 ELISA 方法測得。在前人的實驗中，正常人血液濃度為 0.324 ng/ml，良性前列腺肥大(benign prostate hypertrophy, BPH)之患者為 0.172 ng/ml，在前列腺癌的患者為 0.463 ng/ml，因此 caveolin-1 是比傳統的前列腺腫瘤指數 PSA 更能分辨前列腺癌與單純之肥大(Tahir et al., 2003)。由我們的研究結果，在粥瘤開始出現時，血清中的 caveolin-1 明顯上升，因此 caveolin-1 似乎應該較其他的 biomarker 更能在早期測出動脈粥瘤硬化。在以 ELISA 檢驗餵食高膽固醇白兔血漿中 caveolin-1 濃度的研究中，我們發現 caveolin-1 在餵食正常飼料的對照組在 11 ng/ml，而餵



食高膽固醇飼料至第二週時，血清中 caveolin-1 濃度逐漸上升，此時白兔動脈內皮細胞粥瘤尚未形成，而當餵食至第四至五週時，血清中 caveolin-1 濃度上升至  $62.4 \pm 16.12$  ng/ml，組織中 caveolin-1 表現亦顯著增加(圖二、六, Lin et al. 2006)，但粥瘤剛要開始形成，由該結果顯示 caveolin-1 在血中濃度與組織中表現濃度是一致的；換言之，我們可以利用抽血得知 caveolin-1 在血清中的濃度後，來推測組織中 caveolin-1 的表現程度，進而由該結果，可推測粥瘤生長的情形。我們認為 caveolin-1 也許可以當成一個動脈硬化的生物指標，與血液中膽固醇濃度及其他發炎生物指標，如 hs-CRP、ICAM-1、MMPs 共同做為粥狀硬化的指標分子，但需要更多的實驗結果來支持這項假說。

在接受心導管檢查之患者血清中，caveolin-1濃度介於 0ng/ml至 166.67 ng/ml之間，而正常人的測量結果caveolin-1血漿濃度為  $1.73 \pm 0.60$  (1.07~2.42) ng/ml，如果以人1.73 ng/ml為切點(cut-off point)，假設血中濃度低於此一設定值之患者，即為嚴重動脈粥狀硬化，在與心導管檢查報告相比對後，可以知道敏感性(sensitivity)為 78%，而特異性(specificity)為 67%；但是與血液中膽固醇濃度之比較，由於人數過少，且受到大部分患者服用降血脂藥物之影響，目前無法比對。因此要進一步證實caveolin-1做為動脈粥狀硬化生物指標的可行性，在通過台中榮總人體試驗委員會(IRB)審核，並經由接受心導

管檢查患者同意後，預計以一年時間收集300位患者及正常人之血液，測量血中caveolin-1及其他生物指標(如hs-CRP、ICAM-1、MMPs)濃度，進一步證明caveolin-1與其他生物指標的差異性，並與患者血中膽固醇濃度及心導管檢查報告做比對，評估caveolin-1做為生物指標的可行性。

(三) 以高膽固醇血症白兔做為動物模式，使用體外注射 caveolin-1 對動脈硬化的影響。。

在臨床上，治療高膽固醇患者之降血脂藥物主要目標是減少膽固醇之製造、加速膽固醇之排除、加速血中脂蛋白之分解及抑制脂蛋白之合成，而促進週邊血管內皮細胞排出膽固醇是新的方向。有科學家利用不需受體即可穿透血管內皮細胞的Antennapedia (AP)蛋白，結合抑制eNOS之caveolin-1 scaffolding domain，以人工合成AP-Caveolin-1，以靜脈注射後可以抑制血管內皮eNOS之活性，減少內皮細胞通透性，進而抑制小鼠耳部之發炎反應(Bucci et al., 2000)；在使用藥物引起之肺動脈高壓小鼠，使用AP-Caveolin-1蛋白靜脈注射後，可以抑制肺動脈血管平滑肌的增生，有效降低肺動脈高壓(Jasmin et al., 2006)。依據本實驗，由於caveolin-1可抑制動脈血管平滑肌增生，及促進內皮細胞排出膽固醇的特性；在粥瘤形成後caveolin-1在

血液中的濃度開始降低時,我們嘗試使用AP-Caveolin-1蛋白以靜脈注射方式入白兔體內,觀察是否可以抑制粥瘤產生。在白兔餵食高膽固醇至第7週時,即血液中caveolin-1濃度下降而粥瘤將產生的初期,經由耳部靜脈將人工合成之AP蛋白(16個胺基酸)與caveolin-1之scaffolding domain (20個胺基酸)合成一段AP-Caveolin-1蛋白,打入白兔體內,連續二週隔日打藥,給藥結束後一週取下主動脈分析,初步統計結果顯示各組的粥瘤所佔面積比列為生理食鹽水注射組: 43.6%、AP注射組: 56.7%、AP-Caveolin-1注射組: 25.6%。(P < 0.2, n=2-3),初步結果顯示經AP-Caveolin-1注射的白兔其粥瘤確有減少的趨勢,雖然實驗動物的隻數仍需要再增加,以得到更具說服力的分析結果,但目前與3隻對照組與3隻注射生理食鹽水相比較,經AP-Caveolin-1注射的2隻白兔,確定較前二者之粥瘤有明顯降低的趨勢。

**References:**

- Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. (2006) Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part I: introduction and cytokines. *Circulation*. 113(6):e72-5
- Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. (2007) SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol*. 19(2):215-22.
- Boyle PJ. (2007) Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. *Am J Med*. 120(9;S2):S12-7.
- Bravo E, Napolitano M. (2007) Mechanisms involved in chylomicron remnant lipid uptake by macrophages. *Biochem Soc Trans*. 2007 (Pt 3):459-63.
- Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC. (2000) In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med*. 6(12):1362-7.
- Chao WT, Fan SS, Chen JK, Yang VC. (2003) Visualizing caveolin-1 and HDL in cholesterol-loaded aortic endothelial cells. *J Lipid Res*. 44:1094-9
- Chao WT, Tsai SH, Lin YC, Lin WW, Yang VC. (2005) Cellular localization and interaction of ABCA1 and caveolin-1 in aortic endothelial cells after HDL incubation. *Biochem Biophys Res Commun*. 8;332:743-9.
- Christopher KG, Joseph LW. (2001) Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*. 104:503-16.
- Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. *J Biol Chem*. 272:6525-33.
- Das K, Lewis RY, Scherer PE, Lisanti MP. (1999) The membrane spanning domains of caveolins-1 and -2 mediate the formation of

caveolin hetero-oligomers. *J Biol Chem.* 274:18721-8.

Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. (1995) Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. *J Biol Chem.* 270: 6838-42.

Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. (1996) Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem.* 271, 18188–93

Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A. (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 8(2):84-7.

Downing et al. NIH Biomarkers definitions working group. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 69(3):89-95.

Duntas LH. (2002) Thyroid disease and lipids. *Thyroid.* 12(4):287-93.

Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. (1999) Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 103(6):897-905.

Fielding PE, Fielding CJ. (1995) Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry.* 34: 14288-92.

Fielding CJ, Fielding PE. (1997) Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res.* 38:1503-20.

Fielding CJ, Fielding PE. (2001) Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev.* 49(3):251-64.

Fielding CJ, Fielding PE. (2001) Cellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta.* 1533(3):175-89.

Frank PG, Woodman SE, Park D, Lisanti MP. (2003) Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 3(7):1161-8.

Frank PG, Lisanti MP. (2004) Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia. *Curr Opin Lipidol* 15:523–9.

Frank PG, Cheung MW, Pavlides S, Llaverias G, Park DS, Lisanti MP. (2006) Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(2):H677-86.

Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T. (2000) Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci*. 113(19):3509-17.

Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, and Sessa WC. (1996) Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem*. 271: 27237–40.

Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem*. 272: 25437–40.

Glass CK, Witztum JL. (2001) Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*. 104:503-16.

Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC. (2004) Caveolae and Caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res*. 94:1408-17.

Hachem SB, Mooradian AD. (2006) Familial dyslipidaemias: an overview of genetics, pathophysiology and management. *Drugs*. 66(15):1949-69.

Hassan GS, Jasmin JF, Schubert W, Frank PG, Lisanti MP. (2004) Caveolin-1 deficiency stimulates neointima formation during vascular injury. *Biochemistry*. 43(26):8312-21.

Hassan GS, Williams TM, Frank PG, Lisanti MP. (2006) Caveolin-1-deficient aortic smooth muscle cells show cell autonomous abnormalities in proliferation, migration, and endothelin-based signal transduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290(6):H2393-401.

Hansson GK. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 352:1685-95.

Jasmin JF, Mercier I, Dupuis J, Tanowitz HB, Lisanti MP. (2006) Short-term administration of a cell-permeable caveolin-1 peptide prevents the development of monocrotaline- induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. *Circulation.* 114(9):912-20.

Johnson JL. (2007) Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 5(2):265-82.

Kogo H, Fujimoto T. (2000) Concentration of caveolin-1 in the cleavage furrow as revealed by time-lapse analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 268(1):82-7.

Krajewska WM, Maslowska I. (2004) Caveolins: Structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett.* 9:195-220.

Kruit JK, Groen AK, van Berkel TJ, Kuipers F. Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. (2006) *World J Gastroenterol.* 12(40):6429-39

Libby P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 420:868-74.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 105:1135-43.

Lin WW, Lin YC, Chung TY, Ho HC, Chen YT, Yang VC. (2006) Caveolin-1 expression is associated with plaque formation in hypercholesterolemic rabbits. *J Histochem Cytochem.* 54(8):897-904

Lin YC, Ma C, Hsu WC, Lo HF, Yang VC. (2007) Molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 on high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 75(3):575-83

Lusis AJ. (2000) Atherosclerosis. *Nature.* 407:233-41.

Lusis AJ, Fogelman A M, Fonarow GC. (2004) Genetic Basis of Atherosclerosis: Part I New Genes and Pathways. *Circulation*. 110:1868-73.

Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco P, Egeo A, Donati MA. (1998) Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*. 18: 365-8.

Müller G, Frick W. (1999) Signaling via caveolin: involvement in the crosstalk between phosphoinositolglycans and insulin. *Cell MolLife Sci*. 56: 945-70.

Murata M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92:10339-43.

Myers GL, Rifai N, Tracy RP, Roberts WL, Alexander RW, Biasucci LM. (2004) CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the laboratory science discussion group. *Circulation*. 110(25):e545-9.

Orci L. (1981) Heterogeneous distribution of filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci.USA*. 78: 293-7.

Palade GE. (1953) *J. Appl. Physiol.* 24: 1424–36.

Park H, Go YM, Darji R, Choi JW, Lisanti MP, Maland MC, Jo H (2000) Caveolin-1 regulates shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278(4):H1285-93.

Parton RG. (2003) Caveolae-from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nature Rev Mod Cell Bio*. 4:162-7.



Peterson TE, Guicciardi ME, Gulati R, Kleppe LS, Mueske CS, Mookadam M, Sowa G. (2003) Caveolin-1 can regulate vascular smooth muscle cell fate by switching platelet-derived growth factor signaling from a proliferative to an apoptotic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1521–7.

Piech A, Massart PE, Dessy C, Feron O, Havaux X, Morel N, Vanoverschelde JL. (2002) Decreased expression of myocardial eNOS and caveolin in dogs with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H219–31.

Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaiuso F. (2001) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276:38121–38.

Revkin JH, Shear CL, Pouleur HG, Ryder SW, Orloff DG. (2007) Biomarkers in the prevention and treatment of atherosclerosis: need, validation, and future. *Pharmacol Rev.* 59(1):40-53.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. (2000) C-Reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 342:836-43.

Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. (2004) Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* 109:(Suppl 1)IV6-19.

Ridker PM. (2007) C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus. *J Am Coll Cardiol.* 29;49(21):2129-38.

Rizzo V, Sung A, Oh P, Schnitzer JE. (1998) Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *J Biol Chem.* 273:26323–9.

Rizzo V, Morton C, DePaola N, Schnitzer JE, Davies PF. (2003)

Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285:H1720–9.

Schlegel A, Lisanti MP. (2000) A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. *J Biol Chem.* 275:21605-17.

Schroeder F. (1991) Membrane cholesterol dynamics-cholesterol domains and kinetic pools. *Proc Soc Exp Biol Med.* 196: 235-52.

Schwencke C, Schmeisser A, Walter C, Wachter R, Pannach S, Weck B, Braun-Dullaeus RC, Kasper M, Strasser RH. (2005) Decreased caveolin-1 in atheroma: loss of antiproliferative control of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 68:128-35.

Shin JS. (2000) Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science.* 289:785-8.

Singh IM, Shishehbor MH, Ansell BJ. (2007) High-density lipoprotein as a therapeutic target: a systematic review. *JAMA.* 298(7):786-98.

Smart EJ, Kng YS, Donzell WC, Anderson RGW. (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem.* 271: 29427-35.

Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T., Lisanti, M.P. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.* 19:7289-304.

Song KS, Li S, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti, MP. (1996) Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. *J Biol Chem.* 271:9690-7.

Sundström J, Vasan RS. Circulating biomarkers of extracellular matrix remodeling and risk of atherosclerotic events. *Curr Opin Lipidol.* 2006 Feb;17(1):45-53

Sun RJ, Muller S, Stoltz JF, Wang X. (2002) Shear stress induces caveolin-1 translocation in cultured endothelial cells. *Eur Biophys J.* 30(8):605-11.

Sutherland WH, de Jong SA, Walker RJ. (2007) Effect of dietary cholesterol and fat on cell cholesterol transfer to postprandial plasma in hyperlipidemic men. *Lipids.* 42(10):901-11.

Tahir SA, Ren C, Timme TL, Gdor Y, Hoogeveen R, Morrisett JD, Frolov A, Ayala G, Wheeler TM, Thompson TC. (2003) Development of an immunoassay for serum caveolin-1: a novel biomarker for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 9:3653-9.

Thyberg J. (2003) Caveolin-1 and caveolae act as regulators of mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1481-3.

Truong TQ, Aubin D, Bourgeois P, Falstra L, Brissette L. (2006) Opposite effect of caveolin-1 in the metabolism of high-density and low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 1761(1):24-36.

Uemura S, Fathman CG, Rothbard JB, Cooke JP (2000) Rapid and efficient vascular transport of arginine polymer inhibits myointimal hyperplasia. *Circulation* 102: 2629-35.

Vasan RS. (2006) Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation.* 113(19):2335-62

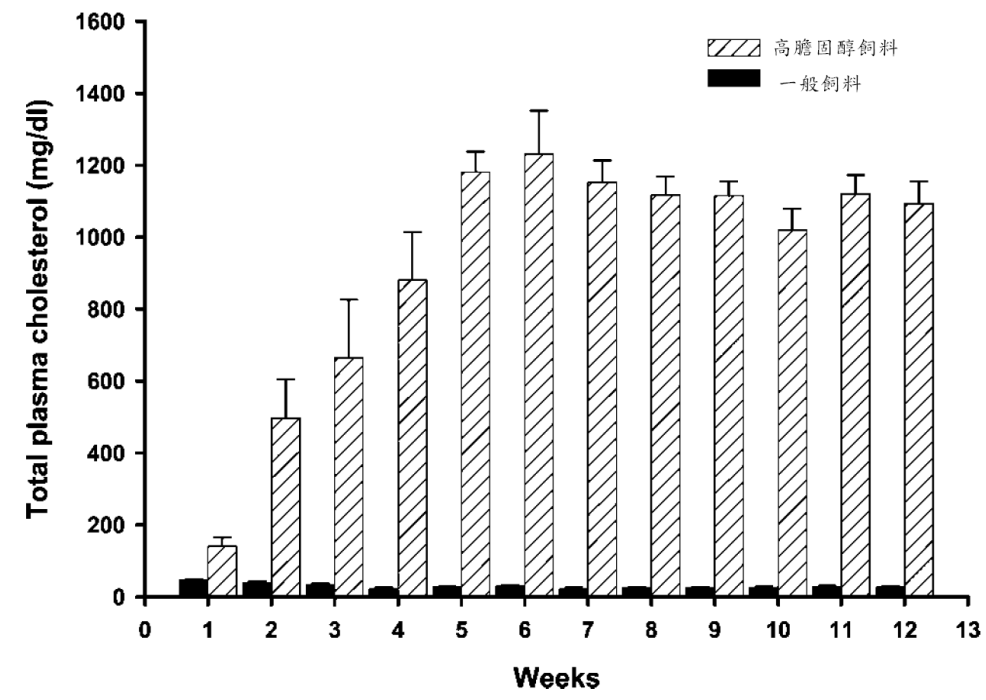
Volonte D, Galbiati F, Pestell RG, Lisanti MP. (2001) Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem.* 276(11):8094-103.

Wang X, Briggs M R, Hua X, Yokoyama C, Goldstein J L, Brown M S. (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 268:14497-504.

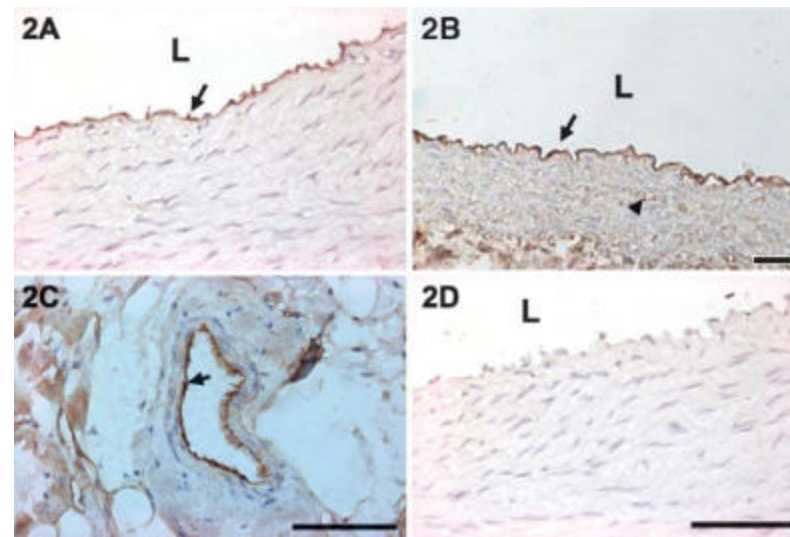
Willerson JT, Ridker PM. (2004) Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*. 109:(Sup 1)II 2-10.

Yamada E. (1955) The fine structure of the gall bladder of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*. 1:445–58.

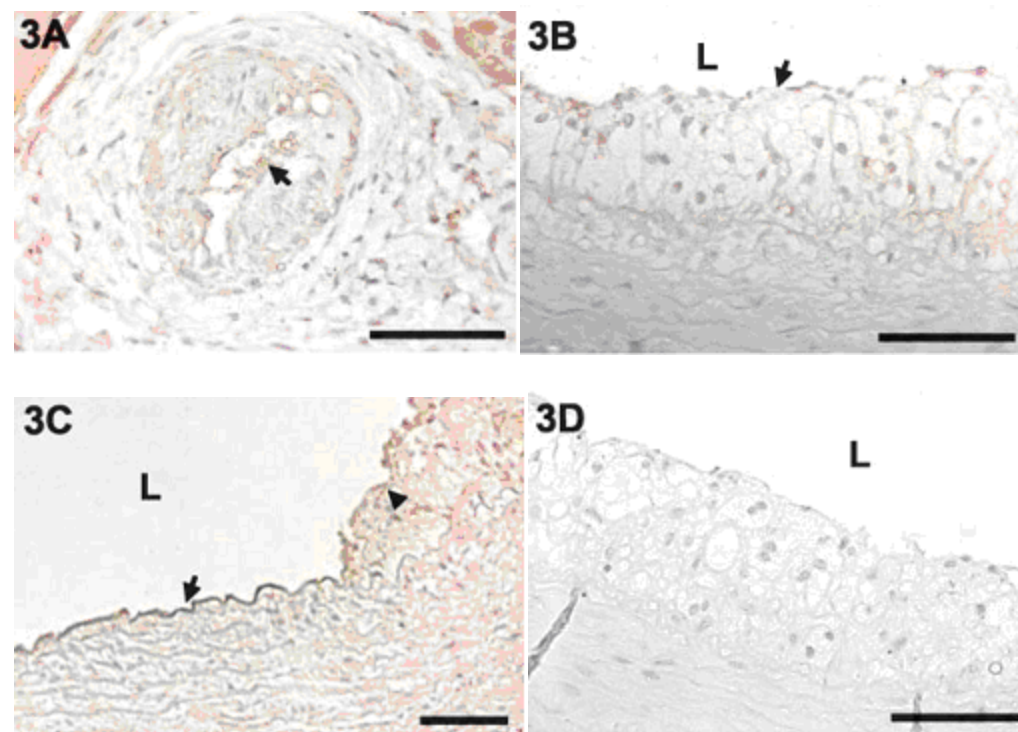
Yu J, Bergaya S, Murata T, Alp IF, Bauer MP, Lin MI, Drab M, Kurzchalia TV, Stan RV, Sessa WC. (2006) Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J Clin Invest*. 116(5):1284-91.



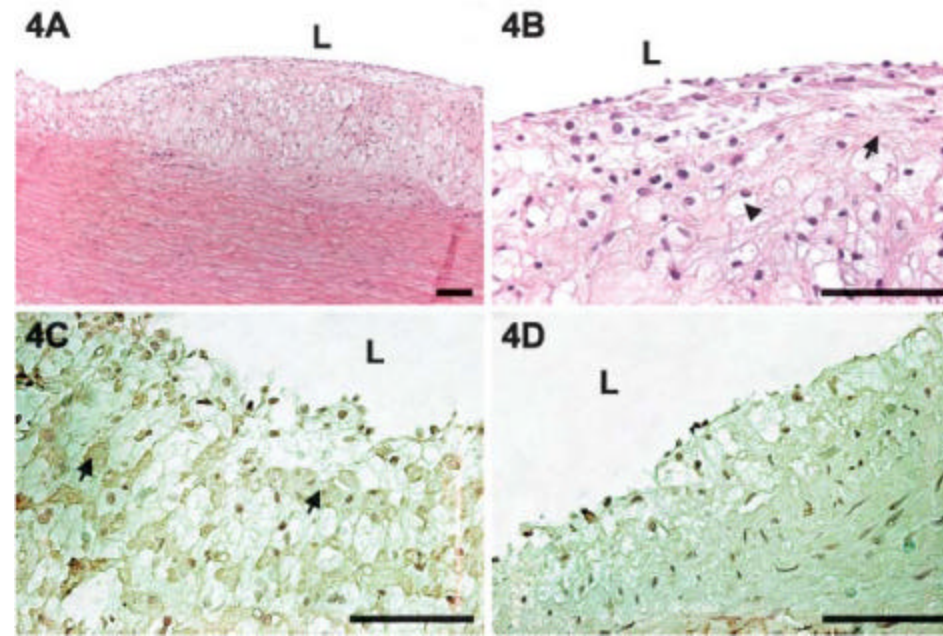
圖一 餵食一般及高膽固醇飼料白兔血漿中膽固醇量。數值表示為平均值±標準差，數目為 20 至 40 隻。



圖二 餵食一般飼料 (A)及高膽固醇飼料(B,C)五週後, caveolin-1 在動脈血管分佈, (A,B)為主動脈弓, (C)為冠狀動脈; Caveolin-1 主要表現在內皮細胞(A,B 箭號), 少數在平滑肌細胞(B 箭頭), (D)為未染一級抗體之對照組。L: 管腔, 線段: 10 奈米。

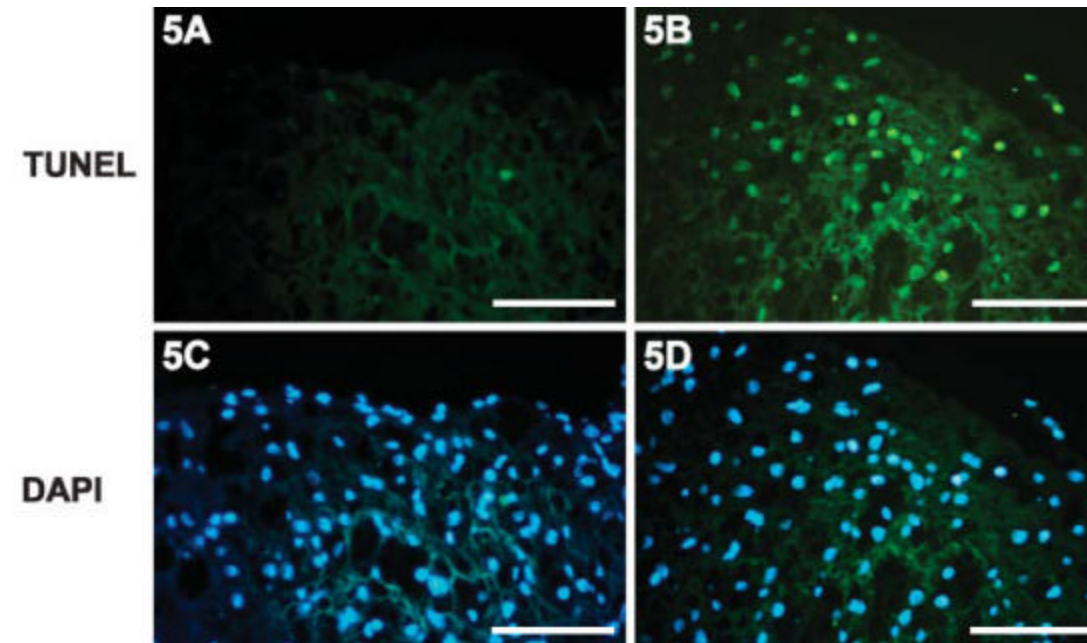


圖三 餵食高膽固醇飼料十二週後，在冠狀動脈(A)及動脈弓(B)的粥瘤處，caveolin-1 表現減少(箭號)；染色強度減少主要是在粥瘤處(C)箭頭，而正常內皮細胞表現較深(箭號)，(D)正常對照組。L：管腔，線段：5 奈米。

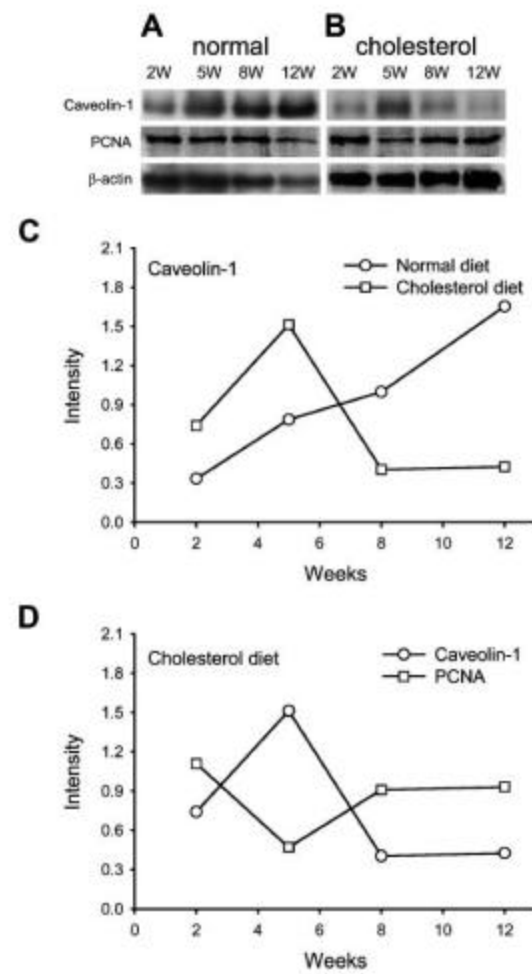


圖四 餵食高膽固醇飼料十二週後，粥瘤在胸主動脈內皮層(A)，內含泡沫細胞及彈性纖維；在高倍下(B)可見到大量泡沫細胞(箭頭)及細胞外基質蛋白(箭號)；(C)粥瘤內有含 $\alpha$ -actin 正反應之平滑肌細胞(箭號)；(D)為未染第一抗體之對照組；(A,B)為 H&E 染色；L：管腔，線段：10 奈米。

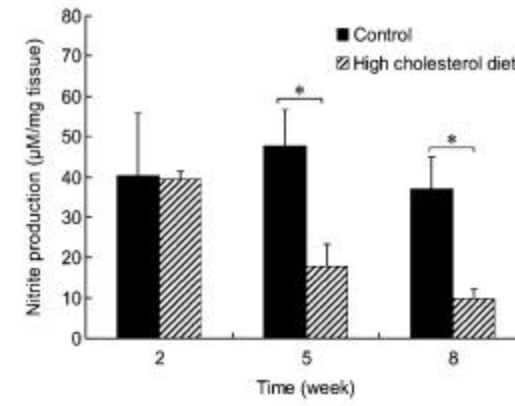




圖五 TUNEL 與 DAPI 染色；在主動脈內皮層(A)粥瘤只有極少數有 TUNEL 染色的細胞，經過 DNase 處理後可見到 TUNEL 染色細胞 (B)，DAPI 染色可見到細胞核(C,D)。線段：5 奈米。

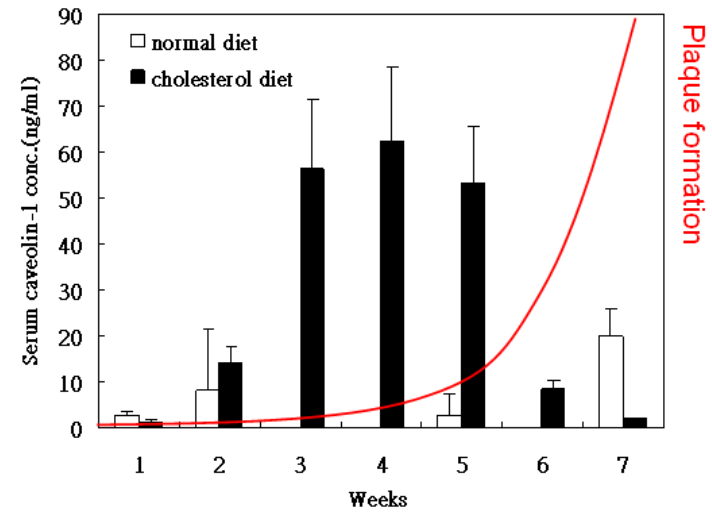
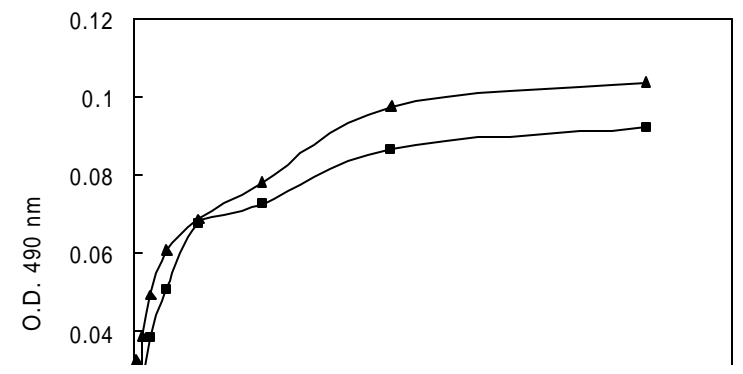


圖六 餵食一般及高膽固醇飼料二至十二週後，caveolin-1 在胸主動脈的表現量；在餵食一般飼料組，caveolin-1 表現量逐漸增加，至第十二週達最高(A,C)；在餵食高膽固醇飼料組，caveolin-1 表現量在第五週達最高，之後在第八至十二週逐漸下降(B,C)；proliferating cell nuclear antigen (PCNA)在餵食高膽固醇飼料組，第五週下降至最低，之後在第八至十二週逐漸上升(B,D)。



圖七 餵食一般及高膽固醇飼料第二至八週後，胸主動脈之亞硝酸鹽 (nitrite production) 濃度；在第5週餵食高膽固醇飼料組亞硝酸鹽濃度逐漸下降，與對照組有顯著差異( $p < 0.05$ )；餵食至第8週，實驗組白兔亞硝酸鹽濃度持續減少，與對照組仍有顯著差異( $p < 0.05$ )。平均值±標準差，\* $p < 0.05$ 。

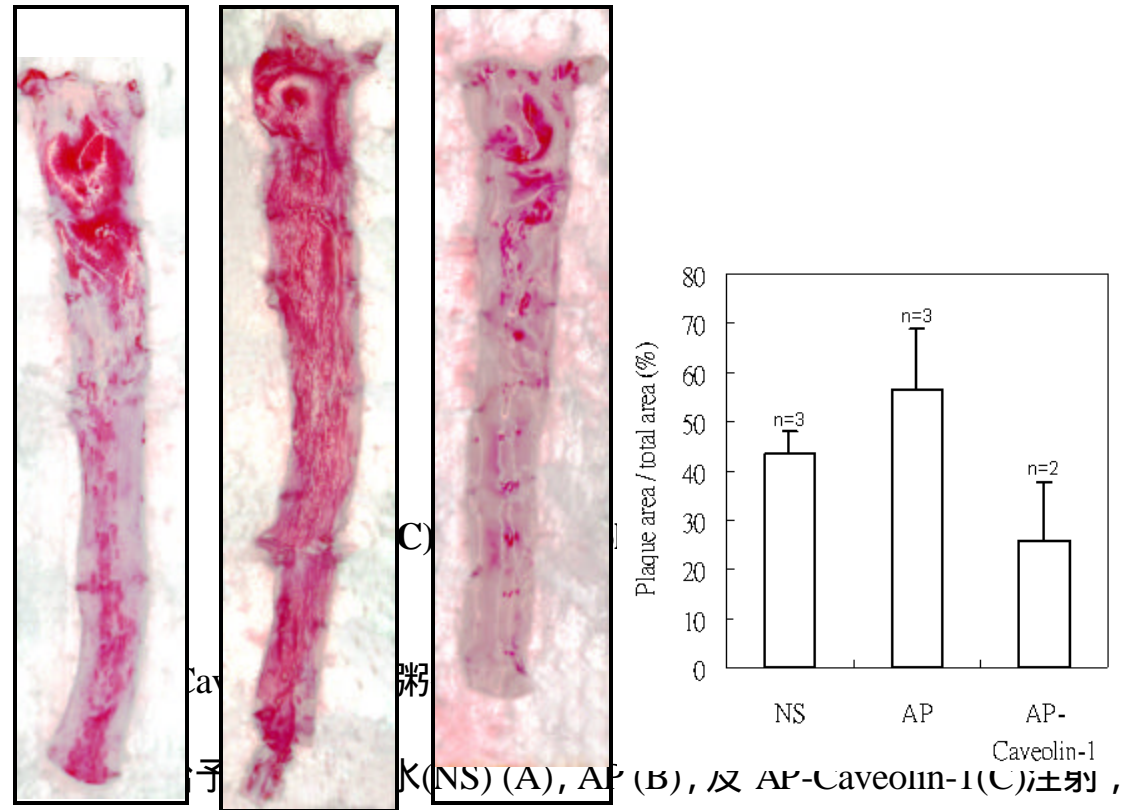




圖八(A)標準  
 飼食高膽固醇  
 caveolin-1 濃度

值。(B)  
 第一週  
 in-1 濃度

上升至  $62.44 \pm 16.12$  ng/ml, 此時粥瘤開始出現, 在第六週時 caveolin-1 濃度下降到  $8.51 \pm 1.90$  ng/ml, 而粥瘤此時增厚更加明顯。對照組濃度介於 0~11 ng/ml 之間。



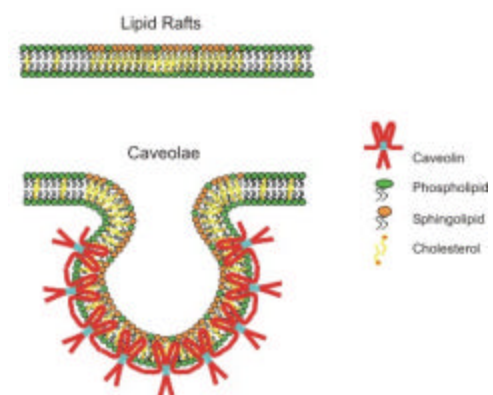
每週注射 3 次 (3 mg/次) 持續注射兩週。粥瘤為紅色部位，經過 NS 或 AP 注射的血管粥瘤區域佔總面積的 50% 及 80.9%，而經過 AP-Caveolin-1 注射的血管則降低為 13.7%。(D) 初步統計結果顯示各組的粥瘤所佔面積比列為 NS 注射組：43.6%，AP 注射組：56.7%，AP-Caveolin-1 注射組：25.6%。P < 0.2 (NS vs AP-Caveolin-1；AP vs AP-Caveolin-1)，n=2-3。斑塊以 Sudan IV 染成紅色。

| Serum caveolin-1 concentration of normal persons |      |     |     |               |
|--|------|-----|-----|---------------|
| Number   | Chol | HDL | TG  | Cav-1 (ng/ml) |
| normal 1   |      |     |     | 1.311         |
| normal 2   | 203  |     | 123 | 1.071         |
| normal 3   | 212  |     | 89  | 2.419         |
| normal 4   |      |     |     | 2.327         |
| normal 5   | 168  |     | 63  | 1.546         |

表一 5 位正常人，血清 caveolin-1 濃度。

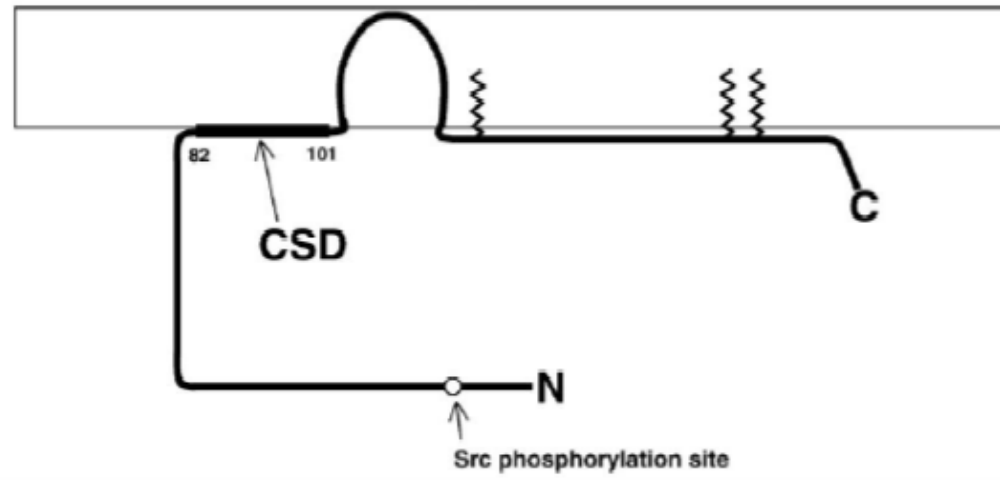
| Plasma Caveolin-1 Concentration of Patients |      |         |     |                                |               |
|---|------|---------|-----|--------------------------------|---------------|
| Number                                      | Chol | HDL     | TG  | Coronary artery                | Cav-1 (ng/ml) |
| patient 1                                   | 98   | 16      | 237 | CAD-III left main, AMI         | 0.000         |
| patient 2                                   | 291  | 85      | 74  | CAD-I, AMI                     | 0.082         |
| patient 3                                   | 172  | 45      | 76  | CAD-I                          | 0.180         |
| patient 4                                   |      |         |     | CHF, severe MR                 | 0.205         |
| patient 5                                   | 186  | LDL:132 | 60  | CAD-II left main               | 0.217         |
| patient 6                                   | 114  | 35      | 63  | CAD-III,                       | 0.565         |
| patient 7                                   | 128  | 30      | 75  | CAD-II, LAD rifice             | 0.870         |
| patient 8                                   | 147  | 40      | 121 | CAD-II                         | 0.954         |
| patient 9                                   |      |         |     | normal                         | 1.520         |
| patient 10                                  | 176  | LDL:113 | 118 | CAD-I, left main               | 2.365         |
| patient 11                                  | 50   | 14      | 33  | normal                         | 3.278         |
| patient 12                                  | 286  | LDL:207 | 259 | CAD-II left main               | 27.500        |
| patient 13                                  | 191  | 33      | 104 | normal                         | 55.833        |
| patient 14                                  |      |         |     | normal, dilated cardiomyopathy | 157.949       |
| patient 15                                  | 180  | 44      |     | CAD-II                         | 166.667       |

表二 15 位在接受心導管檢查之患者，血清 caveolin-1 濃度，與心導管檢查報告及血液中膽固醇濃度做比較。



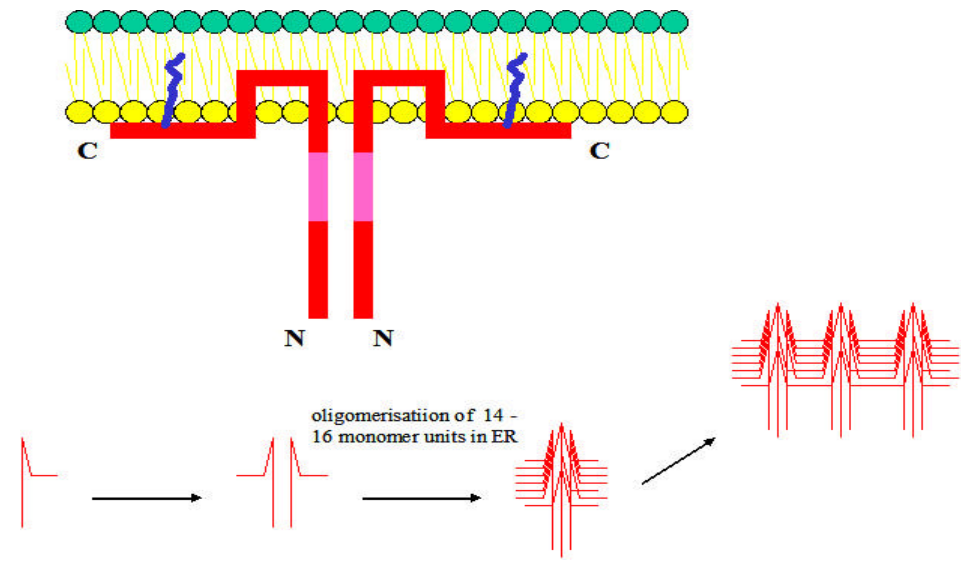
<http://home.student.uva.nl/reinier.deadelharttoerop/artherio/caveolea.htm>

(附圖一)



Krajewska WM, Maslowska I. (2004)

(附圖二)



Hnasko, R., Lisanti,MP.(2003)

(附圖三)



## Curriculum Vitae

Submitted Date: Nov 26, 2007

Name: Wei-Wen Lin 林維文

Sex: Male

Citizenship: Taiwan

### Education:

1986/07/01 ~ 1992/06/30 Medical Student Chung Shan Medical College,  
Taichung, Taiwan

1992/07/01 ~ 1994/06/30 Internship Chung Shan University H, Taichung,  
Taiwan

2002/07/01 ~ 2008/01/31 Ph.D. Department of life Science,  
Tung-Hai University, Taichung,  
Taiwan

### Employment Record:

1994/07/01 ~ 1997/06/30 Resident Internal Medicine,  
Veterans General Hospital, Taichung

1997/07/01 ~ 2001/06/30 Fellow Adult Cardiology, Cardiovascular  
Center,

2001/07/01 ~ present Attending Veterans General Hospital, Taichung  
Adult Cardiology, Cardiovascular  
Center,

Cardiologist Veterans General Hospital, Taichung

### Board Certification:

1997/12 The Society of Internal Medicine, Taiwan. (M4767)

2000/10 The Society of Emergency Medicine and Critical Care.

2000/12 The Republic of China Society of Cardiology, Adult. (S758)

### Research Interest:

1. Molecular mechanism of atherosclerosis, reverse cholesterol transport.
2. Echocardiography, non-invasive hemodynamic evaluation of heart function.
3. Cardiac catheterization, percutaneous coronary intervention.

Pulbication:

**Lin WW**, Lin YC, Chang TY, Tsai SH, Ho HC, Chen YT, Yang VC. Caveolin-1 Expression Is Associated with Plaque Formation in Hypercholesterolemic Rabbits. *J Histochem Cytochem.* 2006 54(8):897-904 (SCI)

Wang CC, Chen CH, **Lin WW**, Hwang SM, Hsieh PC, Lai PH, Yeh YC, Chang Y, Sung HW. Direct Intramyocardial Injection of Mesenchymal Stem Cell Sheet Fragments Improves Cardiac Functions after Infarction. *Cardiovasc Res.* 2007; (Epub ahead of print) (SCI)

Hsieh YC, Wu TJ, Wang KY, Liang KW, **Lin WW**, Chen YT, Ting CT. An adult with aortic arch interruption associated with sinus venosus atrial septal defect and partial anomalous pulmonary venous connection. *J Chin Med Assoc.* 2007;70(1):30-2.

Wei HJ, Chen SC, Chang Y, Hwang SM, **Lin WW**, Lai PH, Chiang HK, Hsu LF, Yang HH, Sung HW. Porous acellular bovine pericardium seeded with mesenchymal stem cells as a patch to repair a myocardial defect in a syngeneic rat model. *Biomaterials.* 2006;27(31):5409-19. (SCI)

Hsieh YC, Liu TJ, Liang KW, Her HY, **Lin WW**, Wang KY, Chen YT, Ting CT, Lee WL. Iso-osmolar contrast medium better preserves short- and long-term renal function after cardiovascular catheterizations in patients with severe baseline renal insufficiency. *Int J Cardiol.* 2006? (SCI)

Chao WT, Tsai SH, Lin YC, **Lin WW**, Yang VC. Cellular localization and interaction of ABCA1 and caveolin-1 in aortic endothelial cells after HDL incubation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332(3):743-9. (SCI)

Tsao CR, Liu TJ, Chen FC, Chu YH, Her HY, **Lin WW**, Wang KY, Chen YT, Ting CT, Lee WL. Intravenous aminophylline provides no additional renal protection in patient with severe atherosclerotic renal artery stenosis treated by delicate percutaneous renal intervention. *Int J Cardiol.* 2006 ;110(1):122-4. (SCI)

Lin MC, Fu YC, Jan SL, **Lin WW**, Chu KH, Ting CT, Chen YT, Chi CS. Transcatheter closure of secundum atrial septal defect using the Amplatzer Septal Occluder: initial results of a single medical center in Taiwan. *Acta Paediatr Taiwan.* 2005 ;46(1):17-23.

Presentations:

Cardiac image hot issue: Cardiac echo in CRT. (Oral present) Taiwan Society of Cardiology. Sep, 2006. Taipei.

Echocardiography image in cardiac resynchronized therapy.(Oral present) Taiwan Society of Medical Ultrasound. Oct, 2006. Taipei.

Tissue Doppler image, strain, strain rate, velocity vector image in cardiac resynchronized therapy. (Oral present) Taiwan Society of Echocardiography. Aug, 2006. Taipei.

利用心導管氣球術探討 pcDNA-cav1 caveolin-1 蛋白對高膽固醇血症白兔粥瘤生長之影響。(林維文、何鴻鑿、陳穎從、鄭葳 ) 台中榮總與中區各大學合作計畫聯合發表會 口頭報告組第一名 July, 2006. 靜宜大學

Immediate pulmonary venous flow change after deployment of ASD occluder device. (poster) European Society of Cardiology annular meeting 2005. Stockholm. Sweden.

Expression and Distribution of Caveolin-1 on the Atherogenic Plaques of Rabbits. (Poster) American Society of Cell Biology 2004. Washington DC. USA.

Transesophageal echocardiography guide in the deployment of ASD occluder device. (Oral present) Taiwan Society of Cardiology. 2005. Taipei.

Echocardiography evaluation in cardiac resynchronized therapy- strain and strain rate image. (Oral present) Taiwan Society of Cardiology 2004. Taipei.