

東海大學生命科學系

博士論文

指導教授：鄭葳 博士

Vie Cheng, PhD

Caveolin-1 蛋白與 ABCA1 蛋白在動脈內皮細胞膽固醇

釋出中的交互關係

The relationships between caveolin-1 and ABCA1 on cellular
cholesterol efflux in aortic endothelial cells

研究生：林玉俊

Yu-Chun Lin

中華民國九十七年五月

目錄

| | |
|---|----|
| • 目錄----- | 1 |
| • 中文摘要----- | 8 |
| • 英文摘要----- | 10 |
| • 前言----- | 12 |
| • 動脈硬化與脂蛋白質----- | 12 |
| • 動脈硬化形成的病理機制----- | 13 |
| • 高密度脂蛋白質及抗動脈硬化----- | 15 |
| • 膽固醇在細胞中的代謝與運送機制----- | 16 |
| • Caveolae 結構----- | 19 |
| • Caveolin 蛋白質家族----- | 19 |
| • Caveolin-1 蛋白質結構----- | 20 |
| • Caveolae、caveolin-1 與細胞內膽固醇的釋出----- | 22 |
| • SR-BI 蛋白質與膽固醇的釋出----- | 23 |
| • ABC transporter 家族中的 ABCA1 及 ABCG1 蛋白質----- | 24 |
| • ABCA1 與細胞的膽固醇外送----- | 25 |
| • ABCG1 與膽固醇外送----- | 27 |
| • Caveolin-1 與 ABCA1 在膽固醇釋出過程中的關係----- | 28 |
| • 研究目的----- | 31 |
| • 實驗材料----- | 37 |
| • 化學藥品----- | 37 |
| • 動物實驗----- | 37 |
| • 細胞培養藥品----- | 37 |

| | |
|--|-----------|
| • 分生藥品----- | 38 |
| • 電子顯微鏡藥品----- | 39 |
| • Primer 組合----- | 39 |
| • SiRNA----- | 40 |
| • 免疫抗體----- | 40 |
| • 藥品配方----- | 41 |
| • 實驗方法----- | 45 |
| • 細胞培養----- | 45 |
| • 膽固醇的細胞培養實驗----- | 46 |
| • Progesterone、brefeldin A、monensin 及 glyburide 抑制劑 實驗----- | 46 |
| • 萃取 total RNA 及 RT-PCR 實驗----- | 47 |
| • 建構 caveolin-1 表現質體 (pCav-cDNA 及 phCav-myc-His) ----- | 48 |
| • 轉殖 pCav-cDNA、phCav-myc-His、pABCA1-flag、 caveolin-1 siRNA 及 ABCA1 siRNA----- | 48 |
| • 西方點墨法----- | 49 |
| • 化學聯結法及免疫沉澱法----- | 51 |
| • 超高速離心分離細胞膜及細胞質部份----- | 51 |
| • 利用 anti-flag agarose 純化 ABCA1-flag 蛋白質----- | 52 |
| • 利用 Ni-NTA 親合性管柱純化 caveolin-1-myc-His 蛋白質 ----- | 53 |
| • 銀染法----- | 54 |
| • Pull down 測試法----- | 55 |
| • 免疫螢光染色法----- | 57 |
| • 免疫電子顯微鏡法----- | 57 |
| • 膽固醇釋出分析----- | 59 |
| • PKC 抑制劑實驗----- | 60 |

| | |
|--|----|
| • 統計分析----- | 60 |
| • 結果----- | 61 |
| • Caveolin-1 幫助動脈內皮細胞的膽固醇釋出----- | 61 |
| • Caveolin-1 幫助動脈內皮細胞形成 caveolae 結構----- | 62 |
| • Caveolin-1 會正向調控 ABCA1 mRNA 及蛋白質的表現量 ----- | 63 |
| • ABCA1 參與 caveolin-1 所調控膽固醇釋出路徑----- | 63 |
| • Caveolin-1 與 ABCA1 在細胞膜及細胞質中的交互作用--- | 65 |
| • 利用 anti-flag agarose 柱純化 ABCA1-flag 蛋白質----- | 66 |
| • 利用 Ni-NTA 親合性管柱純化 caveolin-1-myc-His 蛋白質 ----- | 67 |
| • 利用 pull down 測試法證實 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質 直接結合----- | 68 |
| • Caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈在細胞核周圍(perinuclear region)及細胞膜上—螢光顯微鏡觀察----- | 68 |
| • Caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞質的小胞囊及細胞 膜上 caveolae 中—電子顯微鏡觀察----- | 69 |
| • Caveolin-1、ABCA1 與膽固醇共同分佈於細胞質及細胞 膜上----- | 70 |
| • Caveolin-1 與 ABCA1 會藉由胞囊方式共同運送細胞內膽 固醇到細胞膜上而幫助高密度脂蛋白質所調控的膽固醇 釋出----- | 71 |
| • 降低 ABCA1 的表現不會改變 caveolin-1 蛋白質表現量， 但會抑制高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出 ----- | 72 |
| • 降低 ABCA1 表現會使 caveolin-1 停留在高基氏體----- | 73 |
| • ABCA1 會與 oligomer-caveolin-1 結合並且調控 caveolin-1 寡聚化----- | 74 |
| • 高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 處理會升 高 ABCA1 mRNA 表現，但都不會影響 caveolin-1 mRNA 表現----- | 76 |
| • 高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 處理能升 高 ABCA1 蛋白質表現量，幫助 caveolin-1 寡聚化，但不 會影響 caveolin-1 總表現量----- | 77 |

| | |
|---|-----|
| • 高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 可快速幫助膽固醇釋出----- | 78 |
| • 高密度脂蛋白質會增加 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作用----- | 79 |
| • 高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 能幫助 caveolin-1 從高基氏體運送到細胞膜上----- | 79 |
| • 高密度脂蛋白質會藉由增加 ABCA1 表現來幫助 caveolin-1 寡聚化及膽固醇釋出----- | 80 |
| • 結論----- | 82 |
| • 討論----- | 84 |
| • 動脈內皮細胞可能具有特殊的膽固醇釋出機制----- | 84 |
| • Caveolin-1 對膽固醇釋出的影響----- | 85 |
| • ABCA1 與 caveolae 的相對位置----- | 88 |
| • Caveolin-1 與 ABCA1 表現量的相互調控----- | 89 |
| • 兩步驟及一步驟膽固醇釋出模式----- | 90 |
| • 膽固醇運送抑制劑對 caveolin-1 與 ABCA1 間交互作用的影響----- | 90 |
| • Caveolin-1 與 ABCA1 需要彼此結合共同運送膽固醇至細胞膜上----- | 92 |
| • ABCA1 的新角色：幫助 caveolin-1 寡聚化及離開高基氏體----- | 94 |
| • ABCA1 調控 caveolin-1 寡聚化及離開高基氏體的可能機制----- | 96 |
| • 高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質能刺激內皮細胞膽固醇釋出----- | 98 |
| • 高密度脂蛋白質快速幫助膽固醇釋出的可能機制：PKC 路徑----- | 99 |
| • Caveolin-1 與 ABCA1 結合是否需有其他蛋白質的幫助--- | 100 |
| • Caveolin-1 與 ABCA1 共同幫助膽固醇釋出的重要性----- | 103 |
| • 參考文獻----- | 105 |
| • 附表----- | 136 |

| | |
|---|-----|
| • <u>附表一</u> 、人類四大種類脂蛋白質的不同組成及功能----- | 136 |
| • <u>附表二</u> 、與 caveolin-1 結合的蛋白質----- | 137 |
| • <u>附表三</u> 、與 ABCA1 結合的蛋白質----- | 138 |
| • <u>附圖</u> ----- | 139 |
| • <u>附圖一</u> 、動脈粥瘤形成機制的模式圖----- | 139 |
| • <u>附圖二</u> 、膽固醇逆運送路徑----- | 140 |
| • <u>附圖三</u> 、膽固醇在細胞中的代謝機制----- | 141 |
| • <u>附圖四</u> 、由 insig-1 及 SCAP 主導，使 SREBP 活化的膽固醇調控模式圖----- | 142 |
| • <u>附圖五</u> 、Caveolin-1 蛋白質嵌入 caveolae 結構的模式圖---- | 143 |
| • <u>附圖六</u> 、Caveolin-1 蛋白質寡聚化及運送的模式圖----- | 144 |
| • <u>附圖七</u> 、ABCA1 蛋白質的立體模式圖----- | 145 |
| • <u>附圖八</u> 、膽固醇釋出兩步驟的模式圖----- | 146 |
| • <u>圖</u> ----- | 147 |
| • <u>圖一</u> 、Caveolin-1 對內皮細胞膽固醇釋出的影響----- | 147 |
| • <u>圖二</u> 、Caveolin-1 會幫助形成 caveolae 結構----- | 148 |
| <u>圖三</u> 、Caveolin-1 正向調控 ABCA1 mRNA 及蛋白質表現量 ----- | 149 |
| • <u>圖四</u> 、ABCA1 參與 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出路徑 ----- | 150 |
| • <u>圖五</u> 、Caveolin-1 與 ABCA1 會有蛋白質間交互作用，且發生於細胞質中及細胞膜上----- | 151 |
| • <u>圖六</u> 、利用 anti-flag agarose 純化的 ABCA1-flag 蛋白質---- | 152 |
| • <u>圖七</u> 、利用 Ni-NTA 親合性管柱純化的 caveolin-1-myc-His 蛋白質----- | 153 |
| • <u>圖八</u> 、利用 pull down 測試法驗證 caveolin-1 與 ABCA1 直接結合----- | 154 |
| • <u>圖九</u> 、Caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於高基氏體及細胞膜上----- | 155 |

- 圖十、Caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞膜上 caveolae 及細胞質中正在運送的胞囊----- 156
- 圖十一、Caveolin-1 與 ABCA1、膽固醇共同分佈於細胞核周圍與細胞膜上----- 157
- 圖十二、三種抑制胞囊運送的抑制劑：progesterone、brefeldin A 及 monensin 會破壞 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作用及膽固醇釋出給 methyl- β -cyclodextrin 及高密度脂蛋白質----- 158
- 圖十三、降低 ABCA1 表現會抑制高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出，但不會改變 caveolin-1 蛋白質表現----- 159
- 圖十四、降低 ABCA1 會使 caveolin-1 停留在高基氏體----- 160
- 圖十五、ABCA1 會調控 caveolin-1 寡聚化並與 oligomer-caveolin-1 結合----- 161
- 圖十六、高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質或 BSA 能升高 ABCA1 mRNA 表現，但不影響 caveolin-1 mRNA 表現量----- 162
- 圖十七、高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質或 BSA 能升高 ABCA1 蛋白質及 oligomer-caveolin-1 表現----- 163
- 圖十八、高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質或 BSA 能升高 ABCA1 蛋白質及 oligomer-caveolin-1 表現，並刺激膽固醇釋出----- 164
- 圖十九、高密度脂蛋白質在早期會升高 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作用----- 165
- 圖二十、高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 會幫助 caveolin-1 自高基氏體運送到細胞膜上----- 166
- 圖二十一、高密度脂蛋白質需要 ABCA1 去增加的 oligomer-caveolin-1 表現及增加膽固醇釋出----- 167
- 圖二十二、模式圖一----- 168
- 圖二十三、模式圖二----- 169
- 圖二十四、模式圖三----- 170
- 圖二十五、初代培養動脈內皮細胞及 HEK293T 細胞株中 caveolin-1 與 caveolin-3 蛋白質表現圖----- 171
- 圖二十六、ABCA1 的抑制劑：glyburide，不會破壞 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作用----- 172

| | |
|--|-----|
| • <u>圖二十七</u> 、ABCA1 的抑制劑，glyburide 不會抑制 caveolin-1 寡聚化----- | 173 |
| • <u>圖二十八</u> 、PKC 的抑制劑：sphingosine 會抑制 HDL 所增加的 ABCA1 蛋白質表現量----- | 174 |
| • 個人資料表----- | 175 |
| • Curriculum Vitae----- | 178 |
| • 已發表論文----- | 181 |

摘要

動脈管壁中累積過多的膽固醇是造成動脈粥瘤硬化的主因之一。血管內皮細胞位於管壁最內層，持續與血液中攜帶膽固醇的低密度脂蛋白質作用，但卻不會像平滑肌細胞及巨噬細胞在粥瘤形成時無限制地累積膽固醇，故內皮細胞的膽固醇釋出機制一定有其特殊之處，瞭解其機制對於防止動脈硬化極為重要。Caveolin-1 與 ATP-binding cassette transporter (ABCA1) 被發現在許多種細胞中會幫助膽固醇釋出，而本實驗室先前發現 caveolin-1 與 ABCA1 在內皮細胞中會共同分佈並有交互作用，但此兩種蛋白質幫助內皮細胞膽固醇釋出的詳細機制並未有人探討。本研究證實在內皮細胞中大量表現 caveolin-1 會增加 ABCA1 表現並增加膽固醇釋出。大量表現 caveolin-1 也會增加由高密度脂蛋白質所調控膽固醇釋出的“caveolae”結構，而利用轉殖 siRNA 降低 caveolin-1 表現，則會減少 ABCA1 表現並降低膽固醇釋出。另一方面，減少 ABCA1 表現會抑制 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出。免疫沉澱結果顯示細胞處理高密度脂蛋白質後，caveolin-1 與 ABCA1 會在細胞膜及細胞質中形成蛋白質間的交互作用。將 pABCA1-flag 及 phCav-1-myc-His 重組基因轉殖進 HEK 293T 細胞表達出 ABCA1-flag 蛋白質及 caveolin-1-myc-His 蛋白質，再利用 anti-flag agarose 及 Ni-NTA 親合性管柱純化出兩

種蛋白質，利用 pull down 測試法證實 ABCA1-flag 蛋白質與 caveolin-1-myc-His 蛋白質屬直接結合。免疫電子顯微鏡結果顯示 caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞膜的 caveolae 上及細胞質中的小胞囊，且 caveolin-1、ABCA1 與膽固醇也共同分佈於細胞質及細胞膜上。三種抑制胞囊運送的抑制劑：progesterone、brefeldin A 及 monensin，會破壞 caveolin-1 與 ABCA1 間的交互作用並減少細胞內膽固醇傳送到細胞膜上及釋放給高密度脂蛋白質。此結果顯示 caveolin-1 與 ABCA1 的交互作用與高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出有密切關係。我們接著分析 ABCA1 在 caveolin-1 所調控膽固醇釋出中所扮演的角色。利用轉殖 siRNA 降低 ABCA1 表現不會影響 caveolin-1 蛋白質表現，但會抑制 caveolin-1 寡聚化且使 caveolin-1 停留在高基氏體。西方點墨法及免疫螢光染色結果顯示高密度脂蛋白質會增加 ABCA1 表現進而引發 caveolin-1 寡聚化，及促使 caveolin-1 離開高基氏體到細胞膜上並刺激膽固醇釋出。這些由高密度脂蛋白質所引發的現象會因降低 ABCA1 的表現而被抑制。綜合上述結果，我們認為，在動脈內皮細胞中，高密度脂蛋白質會快速增加 ABCA1 表現，而 ABCA1 會調控 caveolin-1 寡聚化並促使 caveolin-1 及膽固醇離開高基氏體到細胞膜上來幫助膽固醇釋出。

Abstract

Accumulation of excess cholesterol in the arterial wall is one of the major factors in the development of atherosclerosis. Vascular endothelial cells (ECs) interact continuously with low-density lipoprotein (LDL) but do not unrestrictedly accumulate cholesterol which seen in vascular smooth muscle cells and macrophages. Understanding the mechanism of cholesterol efflux in ECs may shed light to prevent the atherosclerosis. Caveolin-1 and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) are two important proteins that intimately involved in cellular cholesterol transport as well as cholesterol efflux in many cell types. Our previous study showed that caveolin-1 colocalized and interacted with ABCA1 in the aortic endothelial cells. However, the interactions between caveolin-1 and ABCA1 in the cholesterol efflux in aortic ECs are poorly understood. This study indicated that overexpression of caveolin-1 in aortic ECs up-regulated ABCA1 expression and enhanced cholesterol efflux. Suppression of caveolin-1 by siRNA decreased ABCA1 expression and reduced cholesterol efflux. On the other hand, suppression of ABCA1 by siRNA do not affect caveolin-1 expression but led to the retention of caveolin-1 in the Golgi apparatus, impaired caveolin-1 oligomerization, and inhibited the caveolin-1-mediated cholesterol efflux. Immunoprecipitation assays revealed a molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 in the plasma membrane and in the cytoplasm after HDL incubation. ABCA1 protein and caveolin-1 protein were purified by anti-flag agarose and Ni-NTA affinity column from pABCA1-flag transfected cells and pHCav-1-myc-His transfected cells

respectively. Pull down assay demonstrated the interaction between caveolin-1 and ABCA1 was a direct interaction. Immunoelectron microscopy demonstrated that caveolin-1 colocalized with ABCA1 in the caveolae and in the cytoplasm vesicles; the caveolin-1 and ABCA1 also colocalized with cellular cholesterol by immunofluorescence microscopy. Blocking of intracellular lipid transport by inhibitors: progesterone, brefeldin A and monensin, disrupted the interaction between caveolin-1 and ABCA1 and reduced the translocation of cholesterol to HDL. These results suggest that the molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 is associated with the HDL-mediated cholesterol efflux in aortic ECs. Immunoblotting assay and immunofluorescence microscopy demonstrated that HDL, but not apoAI or BSA, up-regulated ABCA1 expression, induced caveolin-1 oligomerization, and promote its Golgi exit, thereby enhancing cholesterol efflux. These HDL-induced events, however, were inhibited by down-regulated of ABCA1. Taken together, we conclude that ABCA1 modulates the oligomerization and Golgi exit of caveolin-1 during HDL-mediated cholesterol efflux in aortic ECs.

前言

動脈硬化與脂蛋白質

冠狀動脈疾病 (coronary artery disease)和動脈硬化症一直是先進國家病人的主要死因之一，而過去研究發現動脈粥瘤的發生率與血漿中脂蛋白質的組成及含量息息相關 (Assmann et al., 1999; Kannel et al., 1985)。血液中含有許多種類的脂蛋白質，依密度及組成不同可分為四大類：(1) 高密度脂蛋白質 (high density lipoprotein, HDL)、(2) 低密度脂蛋白質 (low density lipoprotein, LDL)、(3) 極低密度脂蛋白質 (very low density lipoprotein, VLDL)及(4) 乳糜微粒 (chylomicron) (附表一)。極低密度脂蛋白質及乳糜微粒的核心主要是三酸甘油脂 (triglyceride)，而低密度脂蛋白質及高密度脂蛋白質的核心大多是膽固醇酯 (cholesteryl ester) 組成，核心的外層包覆著膽固醇 (cholesterol) 及磷脂質 (phospholipid)。除此之外，低密度脂蛋白質的外層含有 apoB 載脂蛋白質 (apolipoprotein B)，高密度脂蛋白質的外層含有 apoAI 載脂蛋白質 (apolipoprotein AI)及 apoAII 載脂蛋白質 (apolipoprotein AII)，其對於脂蛋白質與細胞間的交互作用扮演重要的角色 (Tall, 1998)。正常情況下極低密度脂蛋白質與乳糜微粒分別會由肝細胞及小腸上皮細胞生成並釋出，而在血液或細胞表面上藉由五種不同修飾過程將極低密度脂蛋白質

與乳糜微粒轉換成低密度脂蛋白質及高密度脂蛋白質，這五種過程包括：(1) 磷酸酶 (lipase)水解三酸甘油脂及磷脂；(2) 醯基轉移酶 (acyl transferase)將膽固醇酯化成膽固醇酯；(3) 不同的脂質轉移蛋白質在脂蛋白質間運送膽固醇酯、三酸甘油酯、及磷脂；(4) 脂蛋白質吸收由細胞所釋出的膽固醇或磷脂質；(5) 載脂蛋白質的合成與降解。這些修飾過程會影響高密度脂蛋白質與低密度脂蛋白質的含量，而在過去大規模的流行病學研究中發現，動脈硬化的發生率與低密度脂蛋白質的濃度成正比，而與高密度脂蛋白質的濃度成反比 (Assmann et al., 1999; Johansson et al., 1991; Kannel et al., 1985)，這和高密度脂蛋白質與低密度脂蛋白質在體內的功能不同有關 (附表一)。

動脈硬化形成的病理機制

正常的動脈血管壁最內層為一層內皮細胞 (endothelium)，分隔了動脈血管壁與供血液流動的管腔，內皮細胞的下層是基底膜 (basement membrane)，主要是由膠原蛋白質 (collagen)、核纖層蛋白質 (laminin) 及蛋白質多醣 (proteoglycan)組成 (Stanley et al., 1982)。其下則為由膠原蛋白質，蛋白質多醣及彈性纖維 (elastic fiber)任意排列組成的內皮下層區 (subendothelial space)，以上結構為血管的內膜 (intima)部位；中層

(media)部位則由多層的平滑肌細胞 (smooth muscle cells)及彈性纖維整齊排列而成，動脈外膜 (adventitia)則由細胞外基質 (extracellular matrix)及纖維母細胞 (fibroblasts)所組成。但當動脈血管的內皮細胞受到損傷而通透性發生改變時，過多的低密度脂蛋白質進入內皮細胞下層被動脈壁中細胞的脂加氫酶 (lipoxygenase)及其所產生的自由基 (free radical)所氧化成氧化態低密度脂蛋白質 (oxidized-LDL) (Niki, 2004)，氧化態低密度脂蛋白質會刺激內皮細胞表現吸附分子 (adhesion molecules)，使得血液中單核球細胞 (monocyte)附著在內皮細胞進而進入內皮細胞下層並分化成巨噬細胞 (macrophage)，巨噬細胞會藉其表面上的 scavenger receptor 吞噬氧化態低密度脂蛋白質並形成膽固醇及膽固醇酯堆積在細胞內，形成泡沫細胞 (foam cells) (附圖一 A)，泡沫細胞會和進入內皮下層的 T 淋巴細胞作用進而分泌一些發炎分子 (inflammatory molecules)及生長因子，使得在血管中層的平滑肌細胞由收縮型轉變成分裂型並移動至內皮細胞下層進行分裂，有些平滑肌細胞也會吸收氧化態低密度脂蛋白質而變成泡沫細胞 (附圖一 B)。久而久之，這些由巨噬細胞、平滑肌細胞以及大量堆積的膽固醇及鈣結晶形成的粥瘤，進一步阻擋血流輸送養分給組織，最後導致組織壞死。而巨噬細胞會產生的細胞外基質分解酵素 (matrixmetallopeptidase, MMP)有時會使粥瘤崩解，同時血液中

的血小板會大量累積在崩解處，最後造成血栓 (thrombosis) 引發心臟病或腦中風 (Glass and Witztum, 2001) (附圖一 C)。

高密度脂蛋白質與抗動脈硬化

血管壁的細胞累積過多的膽固醇一直被認為是導致動脈硬化的重要原因 (Glass and Witztum, 2001)，因此可藉由減少累積在血管壁中過多的膽固醇來預防動脈硬化的形成。肝細胞及小腸細胞會生成 apoAI 載脂蛋白質，藉由吸收少量的膽固醇及磷脂質會變成未成熟 HDL 的形式，稱之為 pre- β -HDL，接著再吸收更多膽固醇後會變成富含膽固醇的 pre-HDL，pre-HDL 上的膽固醇經過血漿中的一種酵素：卵磷脂膽固醇醯基轉移酶 (lethicin:cholesterol acyl transferase, LCAT) 酯化變成含膽固醇酯核心的成熟 HDL₂，血漿中 pre- β -HDL 及 HDL₂ 可將血管壁細胞中多餘的膽固醇攜出並帶回肝臟而轉換成膽酸代謝，這個過程稱為膽固醇逆運送 (reverse cholesterol transport) (Fielding and Fielding, 1995a; Tall, 1998) (附圖二)。當 pre- β -HDL 及 HDL₂ 吸收了血管細胞多餘的膽固醇後會回到血漿中，並以兩種方式將膽固醇送至肝臟代謝。第一種方式是利用肝臟細胞上的 SR-BI 接受器將 HDL₂ 中的膽固醇酯送至肝細胞中，但高密度脂蛋白質本身不進入細胞，這種作用稱為選擇性吸收 (selective

cholesterol uptake) (Reaven et al., 1996)。另一種方式則是利用膽固醇酯轉化蛋白質 (Cholesteryl Ester Transfer Protein, CETP)將高密度脂蛋白質上大部分的膽固醇酯傳送到低密度脂蛋白質及極低密度脂蛋白質上，肝臟會以低密度脂蛋白質接受器 (LDL receptor)吸收低密度脂蛋白質、極低密度脂蛋白質，並將兩者的膽固醇轉換成膽酸代謝掉 (Fielding and Fielding, 1995a; Tall, 1998)，此外，HDL₂ 會被肝臟的肝脂肪酶 (hepatic lipase)將其上的三酸甘油脂水解掉而變成 HDL₃ 並回到血液中繼續膽固醇的攜帶工作 (附圖二)。目前許多文獻專注於研究肝臟細胞吸收膽固醇的機制 (Guendouzi et al., 1998; Herz et al., 1988)，但高密度脂蛋白質如何將血管細胞多餘的膽固醇帶出的方式，仍爭議甚多 (Chao et al., 2003; Ji et al., 1997)，而該問題在防止動脈粥瘤形成的機轉尤顯重要 (Francis and Perry, 1999)。

膽固醇在細胞中的代謝與運送機制

膽固醇是組成動物細胞膜的重要成分，且會負責生成許多賀爾蒙來調控生理反應。脂溶性的膽固醇藉由不同的脂蛋白質在血液中運送 (附圖二)，也經由不同的方式在細胞中運送以平衡細胞中膽固醇的含量 (Maxfield and Wustner, 2002)。細胞內的膽固醇有兩個來源，第一來源是

細胞利用 3-甲基-3,5 二氫基戊酸鹽還原酶 (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase, HMG-CoA reductase) 由脂肪酸自行合成，另一個來源則是由低密度脂蛋白質送入 (附圖三)。低密度脂蛋白質會經由接受器所調控的內胞飲作用進入細胞中 (Brown and Goldstein, 1976)，然後與溶酶體 (lysosome) 作用後，膽固醇酯被分解成膽固醇，大約 70 % 的膽固醇會送至細胞膜上，而 30 % 的膽固醇則送往內質網。一旦內質網上的膽固醇過多，則會經由醯基：膽固醇醯基轉移酶 (acyl-CoA : cholesterol acyltransferase, ACAT) 轉化形成膽固醇酯並以油滴形式儲存。細胞內膽固醇的含量受到 SREBP (sterol regulatory element binding protein)、SCAP (SREBP cleavage activating protein) 及 insig-1 蛋白質的調控，這三個蛋白質位於內質網上，當細胞內膽固醇充足時，SCAP 會和 insig-1 緊密結合在一起，且防止 SCAP/SREBP 複合體被併入內質網到高基氏體的運輸胞囊。當細胞內膽固醇減少時，insig-1 將無法再和 SCAP 結合，因此 SCAP/SREBP 複合體會移往高基氏體，在高基氏體 SREBP 會被 S1P 及 S2P 蛋白質酶切割而釋出 N 端含有 bHLH (basic helix-loop-helix) 功能區進入細胞核，在核內會活化 LDL 接受器及 HMG CoA 還原酶基因表現，一方面可接受更多 LDL 進細胞內，另一方面可自行合成更多膽固醇，來補充細胞內的膽固醇含量 (Osborne, 2001; Yang

et al., 2002) (附圖四)。而當細胞內膽固醇過多時，則可藉由幾種重要的方式送到細胞膜上而釋出細胞外：(1) 擴散方式：當細胞內膽固醇量遠大於細胞外濃度時，細胞會藉由擴散方式被動運輸到細胞外，此種運輸方式存在於所有細胞中，但其運輸效能非常差；(2) 許多文獻指出細胞還可藉由 ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1)、ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1)、SR-BI (scavenger receptor BI)、caveolin-1 等蛋白質等去加速細胞的膽固醇釋出 (Yancey et al., 2003)。這些蛋白質與高密度脂蛋白質、pre- β -HDL、apoAI 載脂蛋白質及細胞內的脂質有很強的親合性，會藉由不同的機制運送膽固醇給高密度脂蛋白質、pre- β -HDL 或 apoAI 載脂蛋白質帶回肝臟轉換成膽酸代謝掉。其中 caveolin-1 會將細胞內膽固醇運送到細胞膜上並形成一個凹陷稱為 caveolae 的結構 (Smart et al., 1996) (附圖三)。富含膽固醇的 caveolae 上含有高密度脂蛋白質的接受器 (Fielding and Fielding, 2001)，高密度脂蛋白質結合到這些接受器上，並吸收膽固醇帶回肝臟代謝掉 (Chao et al., 2003; Oram et al., 1983)，因此認為 caveolae 是細胞膽固醇釋出的重要出口 (Fielding and Fielding, 1995b)。apoAI 載脂蛋白質與 pre- β -HDL 則被認為不在 caveolae 上幫助膽固醇釋出 (Mendez et al., 2001)，但此議題尚無定論。

Caveolae 結構

1953 年, George Palade 首次發現在膽囊的表皮細胞及血管內皮細胞的細胞膜上有一些小的燒杯狀凹陷結構, 當時命名為 plasmalemmal vesicles (Palade, 1953)。兩年後, Yamada 將其命名為 Caveolae, 意指細胞膜上的小洞穴 (Yamada, 1955)。Caveolae 結構直徑約 50-100 nm, 富含膽固醇, 鞘磷脂 (sphingomyelin) 和鞘糖酯 (glycosphingolipids), 且不溶於界面活性劑—triton X-100 中 (Anderson, 1998)。Caveolae 結構大量存在於內皮細胞、脂肪細胞、血管平滑肌細胞、表皮細胞、纖維母細胞和肺上皮細胞 (Smart et al., 1999)。先前發現 caveolae 結構在內皮細胞中進行過胞飲作用 (transcytosis) (Fielding and Fielding, 2000; Palade, 1953), 而之後的研究更發現 caveolae 在訊息傳遞、腫瘤抑制、發炎反應及細胞內膽固醇的代謝平衡扮演相當重要的角色 (Fielding and Fielding, 2000; Frank et al., 2001; Galbiati et al., 2001)。

Caveolin 蛋白質家族

Caveolae 的主體結構蛋白質—Caveolin 蛋白質是一個分子量 21~24 kDa 的膜蛋白質 (Anderson, 1998; Fra et al., 1995)。Caveolin 基因家族目

前已經有三個成員，caveolin-1 (Glenney and Soppet, 1992)、caveolin-2 (Scherer et al., 1996)及 caveolin-3 (Tang et al., 1996)。三種 caveolin 蛋白質分子具有相似的蛋白質結構，但卻分佈於不同的細胞中。Caveolin-1 及 caveolin-2 存在於內皮細胞、平滑肌細胞、纖維母細胞及脂肪細胞 (Scherer et al., 1997)。而 caveolin-3 只存在於肌肉細胞中 (Galbiati et al., 2001)。雖然 caveolin-1 是 caveolae 結構中的標定分子，但他不只存在於細胞膜的 caveolae 中。在一些呼吸道上皮細胞中，caveolin-1 會聚集在粒線體中 (Li et al., 2001)。而在一些外分泌和內分泌細胞中，發現它出現在分泌路徑 (secretory pathway)過程中，且還會與脂蛋白質一起送到細胞外 (Liu et al., 1999)。

Caveolin-1 蛋白質結構

Caveolin-1 蛋白質含有 178 個胺基酸 (Fujimoto et al., 2000)，其 N 端與 C 端皆朝向細胞質內。中間第 102 到 134 個胺基酸為疏水性，會形成髮夾結構 (hairpin structure)插入膜內，並將 caveolin-1 蛋白質分為兩個細胞質區 (Fielding and Fielding, 2000) (附圖五)。現已有幾個證據支持這種模型：(1) 在未經穿透處理的細胞中，用針對 N 端和 C 端的抗體檢測不到 caveolin-1 (Dietzen et al., 1995; Monier et al., 1995)；(2)

caveolin-1 不能被細胞表面生物素標記，說明其沒有胞外區 (Sargiacomo et al., 1995; Sargiacomo et al., 1993)；(3) caveolin-1 的 N 端可以發生磷酸化，C 端可以發生棕櫚酸化，而這些都屬於胞內修飾 (Glenney and Zokas, 1989; Li et al., 1996)。在 N 端部分，有兩個對結構和功能起主要作用的功能域 (domain)：一個是臨近穿膜區的第 61-101 胺基酸殘基，稱為 caveolin-1 寡聚化功能區 (oligomerization domain)，它是 caveolin-1 單體之間相互作用形成寡聚體的部位 (Sargiacomo et al., 1995)。在內質網，Caveolin-1 蛋白質會透過寡聚化功能區彼此形成同源雙聚體 (homodimer)，到了高基氏體，這些寡聚體會利用 caveolin-1 的 C 端相互接觸而發生第二次寡聚化，形成背對背結合形式 (Song et al., 1997) 的同源寡聚體 (homooligomers)，caveolin-1 要經過寡聚化後才能離開高基氏體 (Machleidt et al., 2000; Parton and Simons, 2007; Ren et al., 2004) 並直接運送到細胞膜上 (Tagawa et al., 2005)，且有報導指出這些寡聚體會幫助形成 caveolae 結構 (Sargiacomo et al., 1995) (附圖六)。另一個是包括在寡聚化功能區之內第 82-101 個胺基酸殘基，稱為 caveolin-1 絞手架區 (附圖五) (scaffolding domain)，它是 caveolin-1 與細胞內其他信號分子相互作用的區域 (Couet et al., 1997)，且會將 caveolin-1 蛋白質固定在細胞膜上 (Arbuzova et al., 2000; Schlegel and Lisanti, 2000)。最近更發現

caveolin-1 蛋白質的第 66-70 個胺基酸，被稱為 signature domain，這個區域是包括線蟲在內的 caveolin-1 分子中最保守的區域 (Tang et al., 1997)，去除這個功能區會導致 caveolin-1 滯留在內質網中。

Caveolae、caveolin-1 與細胞內膽固醇的釋出

Caveolae 結構內富含膽固醇，在 Fielding 等人的研究中發現當餵食膽固醇之纖維母細胞與高密度脂蛋白質作用後，caveolae 上的膽固醇含量會明顯降低 (Fielding and Fielding, 1995a)，因此推論高密度脂蛋白質是透過 caveolae 來調節細胞內膽固醇的釋出。本實驗室利用免疫螢光染色法及免疫電子顯微鏡發現在內皮細胞中高密度脂蛋白質與 caveolin-1 共同分佈且高密度脂蛋白質會在 caveolae 內作用。此外，以膽固醇培養內皮細胞會增加 caveolin-1 蛋白質的表現 (Chao et al., 2003)。另外，Smart 和 Fu 等人分別轉殖 caveolin-1 進入 L1210-JF 及 HepG2 細胞株，結果會增加細胞內新生成的膽固醇運送到細胞膜上 (Fu et al., 2004; Smart et al., 1996)，而 Arakawa 等人發現抑制了 THP-1 細胞株的 caveolin-1 表現則會抑制膽固醇釋出 (Arakawa et al., 2000)，但探討 caveolin-1 對影響膽固醇釋出的研究仍有不同的實驗結果 (Fu et al., 2004)，例如 Frank 等人發現抑制 NIH-3T3 細胞株的 caveolin-1 會增加膽固醇釋出 (Frank et al.,

2001), Matveev、Wang 和 Frank 等人則發現轉殖 caveolin-1 進 J774、RAW、HEK-293T、FRT 細胞株對膽固醇釋出沒有影響 (Frank et al., 2002; Matveev et al., 2001; Wang et al., 2004)。這些不同的實驗結果，可能是因為轉殖 caveolin-1 進入各種不同細胞株後不一定都會幫助形成 caveolae 結構 (Fu et al., 2004)。Caveolin-1 雖然是 caveolae 的主要結構蛋白質，但曾被報導過需要 heat shock protein (Uittenbogaard et al., 1998)或是 caveolin-2 的幫助 (Gargalovic and Dory, 2003)，才能形成 caveolae 結構。細胞株的內生性 caveolin-1 通常表現量很少 (Engelman et al., 1997)，幫助形成 caveolae 的其他因子可能也很少，才会有上述不同的實驗結果。動脈內皮細胞是血管壁的一層屏障，在粥瘤形成的過程中，內皮細胞不像平滑肌細胞及巨噬細胞會無限制的吸收膽固醇而變成泡沫細胞，故推測內皮細胞可能具有很特殊的膽固醇釋出機制 (O'Connell et al., 2004)，為了試圖釐清問題，我們使用初代培養的動脈內皮細胞來探討 caveolin-1 對膽固醇釋出的影響。

SR-BI 蛋白質與膽固醇的釋出

不同種類細胞的膽固醇釋出速率也不同 (Rothblat GH, 1986)，最近有研究發現是因為細胞具有不同量的 SR-BI 蛋白質 (Ji et al., 1997; Jian

et al., 1998)。而在 COS-7 細胞中轉殖 SR-BI 後，會加快高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出，更驗證了 SR-BI 能幫助膽固醇釋出的功能 (Kellner-Weibel et al., 2000)。除了膽固醇釋出外，SR-BI 還被發現會增加吸收高密度脂蛋白質中的膽固醇酯進入 COS7、J774、RAW 等細胞內 (de la Llera-Moya Margarita, 2001; Yancey et al., 2000)。因此，SR-BI 是一種在細胞膜上雙向運送脂質的蛋白質，而且運送方向則是以脂質在細胞內外的濃度差所決定 (de la Llera-Moya Margarita, 2001; Yancey et al., 2000)。SR-BI 被認為是高密度脂蛋白質的接受器，可增加附近的細胞膜脂質的流動性，進而促進細胞與高密度脂蛋白質之間膽固醇的釋出及吸收 (Peng, 2004)。有研究指出 SR-BI 分佈在 caveolae 內 (Babitt et al., 1997)，但 Briand 等人發現 SR-BI 不需要在 caveolae 內就能吸收高密度脂蛋白質的膽固醇酯 (Briand et al., 2003)，且 Wang 等人發現 caveolin-1 的表現並不會影響 SR-BI 所調控的膽固醇釋出及膽固醇酯吸收 (Wang et al., 2003)。

ABC transporter 家族中的 ABCA1 及 ABCG1 蛋白質

另一種與膽固醇釋出的相關蛋白質為 ABC 蛋白質，ABC transporter 家族包含了 50 個不同功能的穿膜蛋白質 (Dean et al., 2001)，它們是一

群會利用 ATP 的能量將脂質或其他物質傳送穿過細胞膜的蛋白質 (Young and Fielding, 1999)，例如表現在肝臟上的 ABCB4 蛋白質有翻轉酶 (flippase) 的功能，會將細胞膜內側的磷酸醯膽鹽移送到細胞膜外側，最後將其釋出到膽汁中 (Ruetz and Gros, 1994)；肝細胞及小腸細胞可藉由 ABCG5/8 可以運送膽固醇到膽汁中 (Lee et al., 2001)；表現在腎上腺、腎臟及腦的 ABCB1 則可運出親脂性藥物 (Ling, 1997)。而最近發現 ABCA1 與 ABCG1 在膽固醇逆運送過程中扮演相當重要的角色 (Smith, 2006; Yancey et al., 2003)。

ABCA1 與細胞的膽固醇外送

ABCA1 早在 1994 年就被 Luciani 等人定序出來 (Luciani et al., 1994) 其蛋白質分子量約 220 kDa，有 12 個穿膜區，兩個大的胞外區及幾個 ATP 結合區 (Oram, 2002a) (附圖七)。ABCA1 蛋白質表現在很多種細胞中，而在肝、腦、腎上腺及巨噬細胞轉變的泡沫細胞中表現量最多 (Langmann et al., 1999; Lawn et al., 2001; Wellington et al., 2002)。ABCA1 與的蛋白質表達受多種機制調控，肝 X 受體 (Liver X receptor) 和類視黃醇 X 受體 (Retinoid X receptor) 結合到 ABCA1 基因的 promoter 上可單獨

或聯合誘導 ABCA1 的轉錄 (Costet et al., 2000; Schwartz et al., 2000)。

ApoAI 載脂蛋白質結合 ABCA1 後可以穩定 ABCA1 分子，防止它的降解 (Arakawa and Yokoyama, 2002)。ABCA1 基因位於第九對染色體上 (Luciani et al., 1994)，如果發生突變會造成體染色體隱性遺傳疾病：Tangier disease (Bodzioch et al., 1999; Brooks-Wilson et al., 1999; Lawn et al., 1999; Rust et al., 1999)。這種病人主要病徵是雖然 apoAI 載脂蛋白質結構及合成正常，但細胞無法將膽固醇及磷脂質由突變的 ABCA1 送給 apoAI 載脂蛋白質去重組成高密度脂蛋白質，故造成 apoAI 載脂蛋白質的代謝速率極快，而導致血漿 HDL 含量降低，這種病人血漿中的 LDL 含量雖然也很低，但卻會在扁桃腺、胸線、淋巴節、脾臟及肝等器官中累積大量的膽固醇酯，且容易產生動脈硬化 (Oram, 2002b; Young and Fielding, 1999)。在後續的研究中亦證實 ABCA1 與 apoAI 載脂蛋白質有極高的親和力 (Lawn et al., 1999; Wang et al., 2000)，而 apoAI 載脂蛋白質結合 ABCA1 後，會傳遞訊息到細胞內而引發兩種 ABCA1 所調控的膽固醇釋出路徑。第一種路徑是 ABCA1 會結合高基氏體內的膽固醇並帶到細胞膜上送給 apoAI 載脂蛋白質形成高密度脂蛋白質 (Orso et al., 2000)，另一路徑是 apoAI 載脂蛋白質會結合 ABCA1 後一起經由內胞飲作用進到 late endosome 吸收來自高基氏體的膽固醇，再經過反內胞飲作

用回到膜上而形成高密度脂蛋白質送回肝臟 (Neufeld et al., 2001; Neufeld et al., 2004)。

ABCG1 與膽固醇外送

2001 年，Klucken 等人發現 ABC transporter 家族的另一個成員：ABCG1 蛋白質，與高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出有關 (Klucken et al., 2000; Smith, 2006)。將巨噬細胞餵食膽固醇會增加 ABCG1 的表現，去除膽固醇則會減少 ABCG1 的表現 (Klucken et al., 2000)。肝 X 受體 (Liver X receptor) 會讓 ABCG1 從細胞內的胞器移動到細胞膜上來幫助膽固醇運送 (Wang et al., 2006)，而最近的研究發現 ABCG1 只會運送膽固醇給高密度脂蛋白質而不會給 apoAI 載脂蛋白質 (Vaughan and Oram, 2005; Wang et al., 2004; Wang et al., 2006)，而將 ABCG1 剔除鼠餵食高脂食物會使其巨噬細胞累積過多的脂質，而大量表現 ABCG1 則會減少巨噬細胞中的脂質但卻不會增加血漿中的高密度脂蛋白質含量 (Kennedy et al., 2005)，推測 ABCG1 主要只作用在巨噬細胞中 (Gelissen et al., 2006)。

Caveolin-1 與 ABCA1 在膽固醇釋出過程中的關係

如前所述，細胞會利用 caveolin-1、SR-BI、ABCG1、ABCA1 等特定蛋白質幫助膽固醇，而這些特定蛋白質並非單獨運作，而會各自互相影響來調控膽固醇釋出，Chen 等人報導在巨噬細胞中 SR-BI 會抑制 ABCA1 所調控的膽固醇釋出 (Chen et al., 2000)；Gelissen 等人發現 ABCA1 與 ABCG1 會一同幫助 CHO 細胞的膽固醇釋出 (Gelissen et al., 2006)；Wang 等人發現 caveolin-1 表現對 SR-BI 所調控的膽固醇釋出沒有影響 (Wang et al., 2003)。因此不同特定蛋白質間對於膽固醇釋出的交互關係一直是研究細胞膽固醇釋出重要的課題，但目前有關 caveolin-1 與 ABCA1 在膽固醇外送時相關的文獻卻非常少。過去有研究曾探討過 ABCA1 是否在 caveolae 的結構內發揮作用，Mendez 等人發現 ABCA1 主要分佈在細胞中可溶於 triton-X100 的部分 (triton-X100 soluble)，但 caveolin-1 及 caveolae 則是處於 triton-X100 不可溶的部分 (triton-X100 insoluble) (Mendez et al., 2001)；Gargalovic 等人則利用蔗糖梯度超高速離心發現 ABCA1 與 caveolae 存在於不同的 fraction，故認為 ABCA1 不在 caveolae 內 (Gargalovic and Dory, 2003)；但最近 Storey 等人利用非界

面活性劑分離法 (detergent-free isolation) 卻觀察到 ABCA1 主要存在於 caveolae 中 (Storey et al., 2007)，故此議題尚無定論，且始終缺少以電子顯微鏡觀察的直接證據。Arakawa 等人發現當單核球細胞用 PMA (Phorbol Myristate Acetate) 刺激變成巨噬細胞時，caveolin-1 蛋白質與 ABCA1 蛋白質表現量會一同增加 (Arakawa et al., 2000)。另外，Frank 等人觀察到在 caveolin-1 剔除鼠的細胞中，ABCA1 的表現量會減少 (Frank et al., 2006)，推測兩個蛋白質之間可能會互相影響。2000 年時，Orso 等人發現在 ABCA1 剔除鼠及 Tangier disease 病人的纖維母細胞中，雖然會增加 caveolin-1 及 caveolin-2 mRNA 的表現量，但是不會影響 caveolin-1 及 caveolin-2 的蛋白質表現量，而有趣的是雖然 caveolin-1 及 caveolin-2 蛋白質有表現，但是無法將脂質自高基氏體傳送到細胞膜上，推測可能 ABCA1 對 caveolin-1 從高基氏體傳送脂質到細胞膜的傳送過程中扮演重要的角色 (Orso et al., 2000)；Zha 等人發現在膽固醇釋出時，ABCA1 會幫助 non-lipid raft 小胞囊及含 caveolin-1 的 lipid raft rich 小胞囊從高基氏體運送到細胞膜上 (Zha et al., 2003)，因此推測 ABCA1 蛋白質可能會調控 caveolin-1 蛋白質在細胞內的運送。本實驗室先前利用共軛焦顯微鏡發現 caveolin-1、高密度脂蛋白質及 ABCA1 有共同分佈情形，而且利用免疫沉澱法發現 caveolin-1、ABCA1 與高密度脂蛋

白質三者間有蛋白質間交互作用 (Chao et al., 2005)，這些研究都顯示出 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間有密切的關係，但還需要更多實驗來驗證。

研究目的

目標一：

Caveolin-1 蛋白質在大鼠動脈內皮細胞中對膽固醇釋出的影響

Caveolin-1 蛋白質如何影響膽固醇釋出一直存有爭議 (Fu et al., 2004)，且過去的研究大多使用細胞株當做研究材料，所以我們將使用初代培養的細胞當研究材料。而在血管壁細胞中，內皮細胞是血管壁與血流間的一層屏障，會持續與血流中的脂蛋白質接觸，且在粥瘤形成過程中內皮細胞不像平滑肌細胞及巨噬細胞會無限制的吸收膽固醇而變成泡沫細胞，推測內皮細胞可能具有特殊的膽固醇釋出機制 (O'Connell et al., 2004)，因此我們選用初代培養的動脈內皮細胞當研究材料。先利用 lipofectamine 轉殖含 caveolin-1 cDNA 的重組質體—pCav-cDNA 進內皮細胞以大量表現 caveolin-1 蛋白質，另一方面轉殖 caveolin-1 siRNA 進內皮細胞抑制 caveolin-1 的表現，將兩種細胞培養在 $[^3\text{H}]$ 標定的膽固醇培養液中，最後使用高密度脂蛋白質刺激細胞 $[^3\text{H}]$ 膽固醇釋出並測量釋出的量以瞭解 caveolin-1 在內皮細胞中對膽固醇釋出的影響。

目標二：

Caveolin-1 蛋白質對 caveolae 結構形成的影響

Caveolae是高密度脂蛋白質調控膽固醇釋出的重要結構 (Fielding and Fielding, 2000)，但是有報導指出caveolin-1的表現不一定能幫助形成caveolae (Fu et al., 2004)。我們將利用穿透式電子顯微鏡觀察在大量表現caveolin-1的動脈內皮細胞中及控制組的細胞中caveolae的多寡，以瞭解在動脈內皮細胞中caveolin-1的表現是否跟caveolae結構形成有關。

目標三：

Caveolin-1對ABCA1 mRNA及蛋白質表現的影響

爲了探討caveolin-1是否會調控ABCA1的表現，我們將利用半定量RT-PCR及西方點墨法去分別分析在大量表現caveolin-1及降低表現caveolin-1的動脈內皮細胞中，ABCA1的mRNA及蛋白質表現量。

目標四：

Caveolin-1所調控膽固醇釋出路徑與ABCA1所調控膽固醇釋出路徑兩者間的關係

將大量表現caveolin-1的細胞，共同轉殖ABCA1 siRNA去抑制ABCA1，看是否可同樣抑制caveolin-1所調控的膽固醇釋出路徑，以瞭解兩者所調控膽固醇釋出路徑的相關性。

目標五：

膽固醇釋出時，caveolin-1與ABCA1在細胞中的分佈位置

我們利用免疫螢光顯微鏡及免疫電子顯微鏡探討處理高密度脂蛋白質去刺激膽固醇釋出時，caveolin-1蛋白質與ABCA1蛋白質在細胞中的分佈位置及蛋白質間交互作用。

目標六：

探討caveolin-1及ABCA1兩者間的蛋白質間交互作用關係

我們先前發現caveolin-1及ABCA1兩者間有蛋白質間交互作用(Chao et al., 2005)。在本計畫中，將進一步利用超高速離心先將細胞分離出細胞膜部份及細胞質部份(Wu et al., 2004)，再分別用免疫沉澱法偵測caveolin-1與ABCA1間的蛋白質交互作用，以瞭解caveolin-1及ABCA1之間的蛋白質交互作用是發生在細胞膜上或是細胞質中。另一方面，將利用親合性管柱純化出caveolin-1與ABCA1蛋白質，再利用pull down測試法探討兩蛋白質是否為直接結合。

目標七：

探討caveolin-1與ABCA1之間的蛋白質交互作用在膽固醇釋出過程中所扮演的可能角色

在此部份中，我們利用一種抑制caveolin-1所調控膽固醇運送的抑制劑：progesterone (Fu et al., 2004)，及三種會抑制ABCA1所負責膽固醇釋出的抑制劑：brefeldin A、monensin及glyburide (Neufeld et al., 2001; Oram, 2002a)，去處理內皮細胞，再觀察這些抑制劑是否會影響caveolin-1與ABCA1蛋白質間的交互作用及影響細胞膽固醇釋出。

目標八：

探討抑制 ABCA1 表現對 caveolin-1 表現及分佈與膽固醇釋出的影響

Orso 等人發現在 ABCA1 剔除鼠及帶有突變 ABCA1 的 Tangier disease 病人的纖維母細胞中，缺少了有正常功能的 ABCA1，會使 caveolin-1 停留在高基氏體，並且減少細胞內膽固醇從高基氏體傳送到細胞膜上，推測 ABCA1 可能是一種 caveolin-1 自高基氏體傳送到細胞膜的過程中不可缺少的蛋白質 (Orso et al., 2000)。為了驗證此可能性，我們將利用 ABCA1 siRNA 去抑制 ABCA1 的表現，再觀察是否會影響 caveolin-1 的表現與在細胞的分佈位置及膽固醇的釋出。之前報導過高密度脂蛋白質的主體蛋白質，apoAI 載脂蛋白質與 ABCA1 有很強的親

合性 (Lawn et al., 1999; Wang et al., 2000)，並可以刺激 ABCA1 所調控的膽固醇釋出作用 (Young and Fielding, 1999)，因此我們將轉殖 ABCA1 siRNA 的內皮細胞處理高密度脂蛋白質或 apoAI 蛋白質，再分析降低 ABCA1 的表現後對內皮細胞膽固醇釋出的影響。

目標九：

探討 ABCA1 對 caveolin-1 寡聚化的影響

如同前述，Orso 等人發現缺少正常功能 ABCA1 的細胞中，caveolin-1 會停留在高基氏體 (Orso et al., 2000)，另一方面，Zha 等人發現在膽固醇釋出時，ABCA1 會幫助可能含有 caveolin-1 的 lipid raft 胞囊從高基氏體運送到細胞膜上 (Zha et al., 2003)，因此推測 ABCA1 可能可以幫助 caveolin-1 從高基氏體運送到細胞膜上。而 caveolin-1 蛋白質必須經過寡聚化才能離開高基氏體而直接運送到細胞膜上 (Machleidt et al., 2000; Parton and Simons, 2007; Ren et al., 2004; Tagawa et al., 2005)，因此我們推測 ABCA1 可能藉由調控 caveolin-1 蛋白質的寡聚化去幫助 caveolin-1 離開高基氏體而運送到細胞膜上，為了驗證此假設，一方面以西方點墨法偵測在轉殖 ABCA1 siRNA 的內皮細胞中 oligomer-caveolin-1 的表現量，以瞭解減少 ABCA1 表現對 caveolin-1 寡聚化的影響。另一方面，

我們利用免疫沉澱法觀察 ABCA1 是否會與 oligomer-caveolin-1 蛋白質間有交互作用的關係。

目標十：

探討 ABCA1、caveolin-1、caveolin-1 寡聚化在高密度脂蛋白質與 apoAI 載脂蛋白質所調控的膽固醇釋出中所扮演的角色

我們將分別處理內皮細胞高密度脂蛋白質及 apoAI 載脂蛋白質不同時間(5、15、30、60、180 分鐘)，再利用西方點墨法觀察 ABCA1 蛋白質、caveolin-1 蛋白質、oligomer-caveolin-1 蛋白質在不同的時間表現量的變化，並偵測在這些時間點的細胞膽固醇釋出。

實驗材料

化學藥品

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Acetic acid | Merck ; 1.00063 |
| Agarose | Sigma ; A-9533 |
| Ampicillin | Sigma ; 10047 |
| Benzamidine | Sigma ; B-6506 |
| Bromophenol Blue | Tokyo Chemical Industry CO. ; B0631 |
| Chloroform | Sigma ; 36,691-9 |
| DMSO (Dimethyl sulfoxide) | Sigma ; D-2650 |
| Ethanol | Merck ; 1.00983 |
| Glycerol | Amresco ; 0854 |
| Glycine | Bio-rad ; 161-0724 |
| IGEPAL CA630 | Sigma ; I-8896 |
| Isopropanol | Sigma ; I-9516 |
| KCl | Merck ; 1.04936 |
| KH ₂ PO ₄ | Merck ; 1.04873 |
| Methanol | Merck ; 1.06009 |
| Na ₂ HPO ₄ | Merck ; 1.06586 |
| NaCl | Mallinckrodt ; 7581.06 |
| NaHCO ₃ | Sigma ; S-5761 |
| NaOH | Sigma ; 72079 |
| Na ₃ VO ₄ | Sigma ; S6508 |
| NP-40 | Fluka ; 74385 |
| SDS (Sodium dodecyl sulfate) | Bio-rad ; 161-0302 |
| Sodium deoxycholate | Sigma ; D-5670 |
| Tris-Base | Sigma ; T-1503 |
| Tris-HCl | Amresco ; 0234 |
| Tween-20 | Sigma ; P-9416 |

動物實驗

| | |
|---------------------------------|--------------------------|
| Sprague Dawley rat | Laboratory animal center |
| Nembutal (sodium pentobarbital) | Abbott |

細胞培養藥品

| | |
|--|----------------------|
| Apolipoprotein AI | Biodesign ; A95120H |
| Brefeldin A | Sigma ; B-5936 |
| Cholesterol | Sigma ; C-3045 |
| [³ H]cholesterol | Sigma ; C-8794 |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) | Gibco ; 12800-017 |
| Fatty acid free albumin (FAFA) | Sigma ; A-8806 |
| FBS (Fetal Bovine Serum) | Gibco ; 10437-028 |
| HDL | Intracel ; RP-035 |
| Methyl- β -cyclodextrin | Sigma ; C-4555 |
| Monensin | Sigma ; M-5273 |
| Penicillin-Streptomycin solution | Sigma ; P-0781 |
| Progesterone | Sigma ; P-0130 |
| Recovery TM -Cell Culture Freezing Medium | Gibco ; 12648-010 |
| Trypsin | Hyclone ; SH30042.02 |

分生藥品

| | |
|--|------------------------------|
| 3X flag peptide | Sigma ; F-4799 |
| Acrylamide | Bio-rad ; 161-0107 |
| Ammonium persulfate | Sigma ; A-3678 |
| Anti-flag agarose | Sigma ; A-2220 |
| Aprotenin | Sigma ; 4529 |
| BCA kit | Pierce ; 23225 |
| Bis-acrylamide | Bio-rad ; 161-0201 |
| Chemiluminescence reagent plus | Perkinelmer ; NEL105 |
| DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) | Sigma ; D8417 |
| DEPC (Diethyl pyrocarbonate) | Sigma ; D-5758 |
| dNTP set | ABgene ; AB0315 |
| DSP (3,3'-Dithio-bis(propionic acid N-hydroxysuccinimide ester)) | Sigma ; D-3669 |
| EtBr (Ethidium Bromide) | Sigma ; E-9637 |
| Filipin complex | Sigma ; F-9765 |
| HiMark TM pre-stained protein standard | Invitrogen ; LC5699 |
| Imidazole | Sigma ; I-5513 |
| <i>Kpn</i> I restriction enzyme | New England Biolabs ; R0142S |
| LB Broth | Difco ; 244620 |
| LB Agar | Difco ; 244520 |
| Leupeptin | Sigma ; L-2884 |

| | |
|---|------------------------------|
| Lipofectamine | Invitrogen ; P/N 50470 |
| Ni-NTA resin | Qiagen ; 30210 |
| Oligo-d(T) ₁₂₋₁₈ primer | Invitrogen ; 18418-012 |
| PagRuer TM prestained protein ladder | Fermentas ; SM1811 |
| pcDNA 3.1 (a form) | Invitrogen ; V800-20 |
| PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) | Sigma ; P-7626 |
| RNase inhibitor | Promega ; N251B |
| Polypropylene columns | Qiagen ; 34924 |
| SilverQuest TM Sliver staining kit | Invitrogen ; LC 6070 |
| Sphingosine | Sigma ; S-7049 |
| SuperScript TM III reverse transcriptase | Invitrogen ; 18080-044 |
| Taq | Promega ; M829B |
| T4 ligase | New England Biolabs ; M0202T |
| T4 ligase buffer | New England Biolabs ; B0202S |
| TEMED | Sigma ; T-9281 |
| TRIzol [®] reagent | Invitrogen ; 15596-026 |
| <i>Xba</i> I restriction enzyme | New England Biolabs ; R0145S |
| β-mercaptoethanol | Sigma ; M-6250 |

電子顯微鏡藥品

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Paraformaldehyde | Merck ; 1.04005 |
| Glutaraldehyde (25 % solution) | Electron Microscopy Science ; 16220 |
| Osmium Tetroxide (4 % solution) | Electron Microscopy Science ; 19170 |
| Sodium Cacodylate trihydrate | Sigma ; C0250 |
| 1,2-Propylene oxide | Merck ; 1.12492 |
| Embed-812 | Electron Microscopy Science ; 14900 |
| DDSA (Dodenyl succinic anhydride) | Electron Microscopy Science ; 13710 |
| NMA (Nadic methyl anhydride) | Electron Microscopy Science ; 19000 |
| DMP-30 | Electron Microscopy Science ; 13600 |
| 200 Mesh square | Electron Microscopy Science ; G200-Cu |
| Uranyl acetate | Sigma ; 73943 |
| Lead citrate | Electron Microscopy Science ; 17800 |

Primer 組合

Caveolin-1

Forward : 5'-ATGTCTGGGGGGTAAATAC-3'

Reverse : 5'-CTATATCTCTTCCTGCGTG-3'

ABCA1

Forward : 5'-GGGTGGAGGACAGAATGACATC-3'

Reverse : 5'-CCCAGTTTTTCGAATTGCC-3'

β -actin

Forward : 5'-ACACTGTGCCCATCTACGAG-3'

Reverse : 5'-CGGAACCGCTCATTGCCAAT-3'

pCav-cDNA

Forward : 5'-TCTAGAATGTCTGGGGGCAAATACG-3'

Reverse : 5'-GGTACCTATTTCTTTCTGCAAG-3'

phCav-1-myc-His

Forward : 5'-ATATGAATTCATGTCTGGGGGCAAATACGTAGA-3'

Reverse : 5'-ATATCTCGAGTATTTCTTTCTGCAAGTTGATGCG-3'

SiRNA

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| Rat caveolin-1 siRNA pool | Dharmacon ; M-093600-00 |
| Rat ABCA1 siRNA pool | Dharmacon ; M-092371-00 |
| Rat scrambled siRNA pool | Dharmacon ; D-001206-13-20 |

免疫抗體

| Antibody | Host | Company |
|--------------------|-------------|--------------------------|
| Caveolin-1 | Rabbit | Santa Cruz ; SC-894 |
| Caveolin-3 | Mouse | Santa Cruz ; SC-5310 |
| ABCA1 | Mouse | Abcam ; AB18180 |
| ABCA1 | Rabbit | Novus ; NB400-105 |
| β -actin | Mouse | Sigma ; A5316 |
| 58k Golgi protein | Mouse | Abcam ; AB6284 |
| β 1-integrin | Mouse | BD ; 610467 |
| Flag | Mouse | Stratagene ; 200470 |
| GAPDH | Goat | Santa Cruz ; SC-20356 |
| Tubulin | Mouse | Santa Cruz ; SC-8035 |
| <i>myc</i> | Mouse | Invitrogen ; R950-25 |
| Mouse-HRP | Goat | Zymed ; 65-6420 |
| Rabbit-HRP | Goat | Zymed ; 62-6120 |
| Goat-HRP | Rabbit | Zymed ; 81-1620 |
| Mouse-Alexa 555 | Donkey | Molecular Probe ; A31570 |
| Rabbit-Alexa 488 | Donkey | Molecular Probe ; A21206 |

| | | |
|-----------------------------|------|-------------------------------------|
| Mouse-10 nm colloidal gold | Goat | Electron Microscopy Science ; 25128 |
| Rabbit-15 nm colloidal gold | Goat | Electron Microscopy Science ; 25112 |

10X PBS(phosphate buffered saline)

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 80 g |
| KCl | 20 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 11.3 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2 g |

in 1 L ddH₂O (pH 7.0)

10X PBST(phosphate buffered saline Tween-20)

| | |
|----------|--------|
| 10X PBS | 995 ml |
| Tween-20 | 5 ml |

Cell Culture Medium(serum free)

| | |
|-------------------------|-----------|
| DMEM | 1 package |
| NaHCO ₃ | 3.7 g |
| Penicillin-Streptomycin | 5 ml |

in 1 L ddH₂O (pH 7.4)

Stripping Buffer

| | |
|-------------------|--------|
| SDS | 20 g |
| Tris-HCl | 7.56 g |
| β-mercaptoethanol | 7 ml |

in 1 L ddH₂O

Transfer Buffer

| | |
|-----------|--------|
| Glycine | 2.9 g |
| Tris-Base | 5.8 g |
| SDS | 0.37 g |
| Methanol | 200 ml |

in 1 L ddH₂O (store at 4 °C)

2X Sample Buffer

| | |
|----------------------|-----------|
| SDS | 3.43 g |
| Glycerol | 12 ml |
| 1M Tris-HCl (pH 6.8) | 11.668 ml |

Bromophenol Blue 0.004 %

in 100 ml ddH₂O

10X Running Buffer

Tris-base 30.3 g

Glycine 144 g

SDS 10 g

in 1 L ddH₂O

RIPA buffer

25 mM Tris-HCl pH=7.6

150 mM NaCl

1 % NP-40

1 % sodium deoxycholate

0.1 % SDS

1 M Tris-HCl for stacking gel

Tris-base 4.54 g

Tris-HCl 9.85 g

in 200 ml ddH₂O (pH=6.8) (store at 4°C)

1.5 M Tris-HCl for separating gel

Tris-base 22.713 g

Tris-HCl 17.73 g

in 200 ml ddH₂O (pH=8.8) (store at 4°C)

30 % Acrylamide mix

Acrylamide 29 g

Bis-acrylamide 1 g

in 100 ml ddH₂O (store at 4°C)

Resolving Gel of western blotting

8 % Resolving gel

30 % acrylamide mix 2.7 ml

1.5 M Tris (pH 8.8) 2.5 ml

10 % SDS 0.1 ml

10 % ammonium persulfate 0.1 ml

TEMED 0.006 ml

12 % Resolving gel

30 % acrylamide mix 4 ml

1.5 M Tris (pH 8.8) 2.5 ml

10 % SDS 0.1 ml

10 % ammonium persulfate 0.1 ml

TEMED 0.004 ml

| | | | |
|--------------------------|-----------|---------------------------|-----------|
| ddH ₂ O | 4.6 ml | ddH ₂ O | 3.3 ml |
| 4 % Resolving gel | | 15 % Resolving gel | |
| 30 % acrylamide mix | 0.534 ml | 30 % acrylamide mix | 2.1 ml |
| 1.5 M Tris (pH 8.8) | 1 ml | 1.5 M Tris (pH 8.8) | 1.05 ml |
| 10 % SDS | 0.04 ml | 10 % SDS | 0.042 ml |
| 10 % ammonium persulfate | 0.04 ml | 10 % ammonium persulfate | 0.042 ml |
| TEMED | 0.0003 ml | TEMED | 0.0005 ml |
| ddH ₂ O | 2.386 ml | ddH ₂ O | 0.968 ml |

分別配置 4 % 及 15 % resolving gel，再利用 Gradient Maker

(Amersham; 80-6196-09) 混合成 4 %~15 % gradient gel 並注入鑄膠器。

Stacking gel of western blotting

3 % Stacking gel

| | |
|--------------------------|----------|
| 30 % acrylamide mix | 0.4 ml |
| 1.5 M Tris (pH 8.8) | 0.5 ml |
| 10 % SDS | 0.04 ml |
| 10 % ammonium persulfate | 0.04 ml |
| TEMED | 0.004 ml |
| ddH ₂ O | 2.97 ml |

Epon 包埋劑

| | |
|-----------|-------------------|
| Embed-812 | 48.44 ml(51.13 g) |
| DDSA | 30.89 ml(27.02 g) |
| NMA | 20.67 ml(21.85 g) |
| DMP-30 | 2 ml |

Caveolin-1-myc-His purification lysis buffer

| | |
|---------------------------------|----------|
| Tris pH 8.5 | 50 mM |
| β-mercaptoethanol | 5 mM |
| Phenylmethylsulfonyl fluoride | 1 mM |
| leupeptin | 20 μg/ml |
| aprotinin | 20 μg/ml |
| Na ₃ VO ₄ | 1 mM |

Caveolin-1-myc-His purification Buffer A

| | |
|--------------------------|--------|
| Tris-HCl pH 8.5 | 20 mM |
| KCl | 100 mM |
| β -mercaptoethanol | 5 mM |
| glycerol | 10 % |
| imidazole | 20 mM |

Caveolin-1-myc-His purification Buffer B

| | |
|--------------------------|-------|
| Tris-HCl pH 8.5 | 20 mM |
| KCl | 1 M |
| β -mercaptoethanol | 5 mM |
| glycerol | 10 % |

Caveolin-1-myc-His purification Buffer C

| | |
|--------------------------|--------|
| Tris-HCl pH 8.5 | 20 mM |
| KCl | 100 mM |
| β -mercaptoethanol | 5 mM |
| glycerol | 10 % |
| imidazole | 100 mM |

ABCA1-flag purification lysis buffer

| | |
|---------------------|--------|
| IGEPAL CA-630 | 1 % |
| Sodium deoxycholate | 0.25 % |
| Tris pH 7.4 | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |

TBS

| | |
|-----------------|--------|
| Tris-HCl pH 7.4 | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |

實驗方法

細胞培養

取一個月齡約 100 克 Sprague Dawley 品系大白鼠，以 0.01 mg/g 體重的 nembutal (sodium pentobarbital) 進行腹腔注射，將動物麻醉，並且在無菌操作下將腹腔動脈取出，置於 DMEM (Gibco) 培養液中，以 4 號小鑷子將結締組織及血球清乾淨，並將其切成 15 個 2 mm 厚的血管圈，然後將血管圈平放在含適量 DMEM 的無菌培養皿 (35×35 mm) 中。培養液覆蓋血管圈，並使其固定皿底 (Diglio et al., 1989)。培養液內含 10 % 小牛血清 (Gibco) 及每毫升一個單位之盤尼西林 / 硫酸鏈黴素 (Penicillin/Streptomycin ; Sigma)。將血管圈置於 37°C，二氧化碳濃度為 5 % 的培養箱中進行細胞培養，約每兩天更換一次培養液。血管圈培養至第二天，動脈內皮細胞開始出現，繼續培養至第四天將血管圈移至另一新的培養皿中，而原來培養皿中的細胞則繼續培養約 7 天，待此第一代內皮細胞養滿後，以胰蛋白酶 (Hyclone) 處理將細胞自培養皿取下，放入 RecoveryTM Cell Culture Freezing Medium (Gibco) 中置於 -80°C 冷凍以備後續實驗用。內皮細胞可利用胰蛋白酶將細胞轉移至培養瓶中做繼代培養。實驗所採用的細胞是取自第二代到第八代的細胞。

純化外生性的 ABCA1-flag 蛋白質及 caveolin-1-myc-His 蛋白質實驗則使用 HEK 293T 細胞株 (from Dr. Cheng-Po Hu and Dr. Ming-Li Hsieh of Tunghai University)，培養方式與培養內皮細胞相同。

膽固醇的細胞培養實驗

由文獻中證明細胞中如含有大量膽固醇可以誘發更多高密度脂蛋白質的接受器產生 (Fielding and Fielding, 2001)，使高密度脂蛋白質與細胞作用後將多餘的膽固醇自細胞中帶走 (Oram et al., 1983)。先將原來的培養液移除，並且用不含血清之培養液 (Serum free medium) 清洗兩遍，然後在不含血清之培養液中加入大量膽固醇 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma) 或 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^3H] 膽固醇 (Sigma) 及 2 mg/ml 不含自由脂肪酸之白蛋白質 (Fatty acid free albumin, FAFA; Sigma) 在 37°C 中培養 48 小時後，繼續做其他分析。

Progesterone、brefeldin A、monensin 及 glyburide 抑制劑實驗

將內皮細胞餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma) 或 [^3H] 膽固醇 (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$; Sigma) 24 小時後，再分別處理 progesterone (10 mg/ml in FAFA medium; Sigma)，monensin (50 μM in FAFA medium; Sigma)，brefeldin

A (50 μM in FAFA medium ; Sigma)及 glyburde (100 μM in FAFA medium ; Sigma)24 小時，接著處理高密度脂蛋白質 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)1 小時後，再作後續的分析。

萃取 total RNA 及 RT-PCR 實驗

利用 TRIzol 試劑 (Invitrogen)抽取細胞 total RNA。先收集 10^5 動脈內皮細胞後，加入 1 ml TRIzol 試劑在室溫下培養 5 分鐘將細胞打破並均質，再加入 0.2 ml chloroform 搖勻，置於室溫 3 分鐘，接著在 4°C 下以 12000 $\times\text{g}$ 離心 15 分鐘，將上層液移至新的離心管並加入 0.5 ml isopropanol 混勻，置於室溫 10 分鐘後於 4°C 下以 12000 $\times\text{g}$ 離心 10 分鐘，離心後去上清液留 RNA 沉澱物，接著用 1 ml 75 %酒精沖洗沉澱物，再於 4°C 下以 7500 $\times\text{g}$ 離心 5 分鐘，去上清液留 RNA 沉澱物，最後將 RNA 沉澱物風乾後溶於 20 μl DEPC 水 (Sigma)中。再以 total RNA 為模板利用 SuperScriptTM III 反轉錄套組 (Invitrogen)作出 cDNA。將 2 μg total RNA 加入反轉錄套組中的 RNase inhibitor、oligo d(T) primer、First strand buffer、SuperScriptTM III reverse transcriptase、dNTP 混合液置於 50°C 三小時而反轉錄出 cDNA。取 100 ng 的 cDNA 及分別加入 2 pmole 的

caveolin-1、ABCA1、 β -actin 引子組，並加入 5 μ l 的 10 倍反應液、7.5 mM 鎂離子、1 mM dNTP 以及 0.1 μ l 的 Taq 聚合酶 (20 U/ μ l)，最後加水調至 50 μ l 體積，進行下列 PCR 反應：94°C 反應 30 秒、55°C 反應 30 秒及 72°C 反應 1 分鐘，共進行 30 個循環。PCR 產物以混有 ErBr (ethidium bromide) 的 1% 洋菜凝膠 (agarose gel；Sigma) 分離後照像分析。

建構 caveolin-1 表現質體 (pCav-cDNA 及 pHCav-myc-His)

利用前述方法取得大鼠動脈內皮細胞 cDNA，以 cDNA 為模版，利用”材料”中所列的引子組作 PCR 增幅出全長的 caveolin-1 片段，再用 *Xba*I、*Kpn*I 限制切割酶切割，並用 T4 DNA ligase (New England Biolabs) 和已被同樣兩個限制酶切割的 pcDNA 3.1 質體 (Invitrogen) 接合一起，並命名為 pCav-cDNA。另一方面，抽取人類纖維母細胞的 total RNA，並反轉錄成 cDNA，再利用”材料”中所列的引子組作 PCR 增幅出全長的 caveolin-1 片段，再用 *Eco*RI 及 *Xho*I 限制切割酶切割，並用 T4 DNA ligase (New England Biolabs) 和已被同樣兩個限制酶切割的 pcDNA 3.1 質體 (Invitrogen) 接合在一起，並命名為 pHCav-myc-His。

轉殖 pCav-cDNA、pHCav-myc-His、pABCA1-flag、caveolin-1 siRNA

及 ABCA1 siRNA

將 3×10^4 的內皮細胞或是 HEK 293T 細胞株培養於 24 well 孔盤中 24 小時後，將 1 μg pCav-cDNA、1 μg phCav-*myc*-His、1 μg pABCA1-flag (from Dr. Fitzgerald of Harvard medical school)或是 50 ng caveolin-1 siRNA (Dharmacon)、ABCA1 siRNA (Dharmacon)、scrambled siRNA (Dharmacon)溶於 25 μl 不含血清及抗生素的 DMEM 培養液 (Gibco)中，並將 1 μl lipofectamine (Invitrogen)溶於另一管 25 μl 不含血清及抗生素的 DMEM 中置於室溫 5 分鐘，再將兩管混合在一起並置於室溫 20 分鐘，先將 250 μl 不含血清及抗生素的 DMEM 加入培養細胞的 24 well 孔盤中，再加入混合液並置於 37°C 培養 5 小時後，加入 250 μl 含 20 % 血清的 DMEM 培養液繼續培養 24 小時。

西方點墨法

配置 8 %、12 % 或 4~15 % 濃度梯度的十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) 的系統進行蛋白質的分析。利用 BCA 套組 (Pierce) 測量樣品蛋白質濃度後，取 50 μg 蛋白質加入 10 μl 的 sample buffer，於 100°C 沸水中 denature 6 分鐘，破壞蛋白質的雙硫鍵，之後注入膠體的孔槽中，通以

電壓 50 Volt，將樣品通過 stacking gel 後，將電壓調整成 70 Volt 繼續約 3 小時至 sample 跑到膠底部為止。

將 PVDF 膜 (Millipore) 剪裁至與蛋白質電泳膠同樣大小，先用甲醇浸泡 15 秒再用二次水沖洗 2 分鐘，接著浸泡於轉移緩衝液 (transfer buffer) 中約 10 分鐘，另外再裁六張同樣大小的濾紙同樣浸泡在轉移緩衝液中 10 分鐘，待蛋白質進行電泳分離後，將蛋白質電泳膠取出，去掉 stacking gel 的部分，浸泡於轉移緩衝液中 10 分鐘。進行轉移前，先將三張濾紙置於陽極板上，再依序放上 PVDF 膜、蛋白質電泳膠及另三張濾紙，並避免氣泡產生，之後，蓋上陰極板及安全蓋，以 20 Volt 的電壓進行轉移 90 分鐘。轉移完，取出 PVDF 膜，然後在加入 5 % 脫脂奶粉，在室溫下反應一小時，去除非專一性結合部位。接著以 PBST 緩衝溶液清洗 2 次，每次 10 分鐘，然後加入兔子抗人類 caveolin-1 (1:10000 稀釋比例；Santa Cruz)、老鼠抗人類 ABCA1 抗體 (1:1000 稀釋比例；Abcam)、老鼠抗人類 β -actin (1:10000 稀釋比例)、老鼠抗 myc (1:2500 稀釋比例；Invitrogen)、老鼠抗 flag (1:2000 稀釋比例；stratagene) 於室溫下反應 1 小時後，以 PBST 緩衝溶液清洗 3 次，每次 15 分鐘。將 PVDF 膜與 HRP 接合山羊抗兔子二級抗體 (1:7500 稀釋比例；Zymed)、HRP 接合山羊抗老鼠二級抗體 (1:7500 稀釋比例；Zymed) 於室溫下反應 1 小

時，再經 PBST 緩衝溶液清洗 3 次，每次 10 分鐘，以 chemiluminescence 冷光試劑 (Perkinelmer) 顯色，並在冷光影像感應系統 (Fuji) 下照相。

化學聯結法及免疫沉澱法

將 3×10^5 細胞餵食膽固醇 48 小時後，再與 HDL 培養液 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 在 37°C 下作用 5、15、30、60 及 180 分鐘，以 PBS 清洗兩次後加入溶於 PBS 的 3,3'-Dithio-bis (DSP, 250 μM ; Sigma) 在室溫下作用 1 小時，加強分子之間的結合力。接著再用 PBS 清洗兩次後將細胞刮下，並以 2000 rpm 將細胞離下，接著利用 Reversible immuno-precipitation system 套組 (Upstate) 中的 lysis buffer 將細胞溶解，接著取 1 mg/ml 的細胞萃取液 500 μl 加入 4 μg 兔子抗人類 Caveolin-1 抗體 (Santa Cruz)、老鼠抗人類 ABCA1 抗體 (Abcam)、non-immune IgG 及 10 μl 的抗體親和性受體 (套件中所附) 混合置於 4°C 一天。接著將混合液以專用管柱 (套件中所附) 離心過濾，此時被抗體所抓住的相關蛋白質會停留在管柱的管壁上，接著再加入 70 μl elution buffer (套件中所附) 並離心使結合在管壁上之蛋白質沖下，最後利用西方點墨法分析結果。

超高速離心分離細胞膜及細胞質部份

參考 (Wu et al., 2004)的分離方法並稍作修改。將細胞餵食膽固醇48小時後，再與HDL培養液 (50 $\mu\text{g/ml}$; Intracel)在37°C下作用1小時，再以PBS清洗兩次後將細胞刮下，並以2000 rpm離心10分鐘收集細胞，並將細胞溶於含5 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)及1 mM benzamidine的緩衝液中，置於冰上15分鐘，每五分鐘將細胞震盪混合一次，將混合液用12000 $\times g$ ，4°C離心一小時，收集上層澄清液即為細胞質部份，收集底層沉降物即為細胞膜部份，再繼續用西方點墨法分別以細胞膜標定物—老鼠抗人類 $\beta 1$ -integrin抗體 (1:2000稀釋比例; Abcam)及細胞質標定物—山羊抗人類GAPDH (1:1000稀釋比例; Santa Cruz)、老鼠抗人類tubulin (1:1000稀釋比例; Santa Cruz)抗體驗證分離效果。

利用 anti-flag agarose 純化 ABCA1-flag 蛋白質

將 pABCA1-flag (from Dr. Fitzgerald of Harvard Medical School)轉殖進18個3 mm dish的HEK 293T細胞，轉殖24小時後，參考 Okuhira等人的方法純化出 ABCA1-flag 蛋白質 (Okuhira et al., 2005)。將收集的 cell lysate 溶於特製的 lysis buffer 中，利用超音波震盪機於冰上震15秒，休息10秒，持續30分鐘，再於4°C 10000 $\times g$ 離心5分鐘，收集細胞上

清液。取 300 μ l anti-flag agarose (Sigma)，於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，抽掉上清液，再加入 500 μ l TBS 並使 anti-flag agarose 懸浮，接著於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，再抽掉上清液，重覆此沖洗步驟 3 次之後加入 1 ml 細胞上清液，並置於 4°C 混合過夜。隔天取出混合液，於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，收集上清液即為“flow through”，再加 500 μ l TBS 並使 anti-flag agarose 懸浮，接著於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，收集上清液，重覆此步驟三次，收集上清液即為” wash 1”、” wash 2” 及” wash 3”。接著加入 200 μ l 3X flag peptide (150 ng/ μ l)，置於 4°C 混合 30 分鐘，最後於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，收集上清液即為含有 ABCA1-flag 蛋白質的” elute solution”。

利用 Ni-NTA 親合性管柱純化 caveolin-1-myc-His 蛋白質

將 phCav-1-myc-His 轉殖進 18 個 3 mm dish 的 HEK 293T 細胞，轉殖 24 小時後，參考 Tahir 等人的方法純化出 caveolin-1-myc-His 蛋白質 (Tahir et al., 2003)。將收集的 cell lysate 溶於特製的 lysis buffer 中，利用超音波震盪機於冰上震 15 秒，休息 10 秒，持續 30 分鐘，再於 4°C 10000 xg 離心 5 分鐘，收集細胞上清液。將 500 μ l Ni-NTA resin (Qiagen) 加入

polypropylene 管柱中 (Qiagen)，加入 1 ml buffer A 混合 resin，並利用重力使 buffer A 流出，再加入 1 ml cell lysate，置於 4°C 混合 2 小時，再利用重力流出上清液即為” flow through”。接著加入 1 ml buffer A 沖洗 resin 兩次，並利用重力流出液體即為” wash 1” 及” wash 2”，再加入 1 ml buffer B 沖洗 resin 兩次，並利用重力流出液體即為” wash 3” 及” wash 4”，接著再利用 1 ml buffer A 沖洗 resin 兩次，並利用重力流出液體即為” wash 5” 及” wash 6”，最後使用 500 μ l buffer C 沖提出含 caveolin-1-*myc*-His 蛋白質的 “elute solution”。

銀染法

利用 SDS-PAGE 分離完所純化的蛋白質後，加入 50 ml ddH₂O 入 SDS-PAGE 膠搖晃清洗 20 分鐘，再加入 50 ml fixing buffer (20 ml ethanol、5 ml acetic acid、25 ml ddH₂O) 固定過夜。隔天倒掉 fixing buffer 並利用 SilverQuestTM silver staining 套組 (Invitrogen) 將膠體的蛋白質染色。首先加入 50 ml 30 % 酒精搖晃 10 分鐘，接著加入 50 ml Sensitizing buffer (套件中附) 搖晃 10 分鐘，再利用 50 ml 30 % 酒精搖晃 10 分鐘，並利用 50 ml ddH₂O 搖晃 10 分鐘。接著加入 50 ml staining buffer (套件中附) 搖晃 15 分鐘後，加入 50 ml ddH₂O 搖晃 1 分鐘，再用 50 ml developing

buffer (套件中附)呈色直到所要的蛋白質條帶出現為止，立即加入 5 ml stopping buffer (套件中附)停止呈色，最後再用 50 ml ddH₂O 沖洗即完成染色。

Pull down 測試法

將 pABCA1-flag 轉殖進 18 個 3 mm dish 的 HEK 293T 細胞，轉殖 24 小時後，參考 Okuhira 等人的方法純化出 ABCA1-flag 蛋白質 (Okuhira et al., 2005)。將收集的 cell lysate 溶於特製的 lysis buffer 中，利用超音波震盪機於冰上震 15 秒，休息 10 秒，持續 30 分鐘，再於 4°C 10000 xg 離心 5 分鐘，收集細胞上清液。取 300 µl anti-flag agarose (Sigma)，於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，抽掉上清液，再加入 500 µl TBS 並使 anti-flag agarose 懸浮，接著於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，再抽掉上清液，重覆此沖洗步驟 3 次之後加入 1 ml 細胞上清液，並置於 4°C 混合過夜。隔天取出混合液，於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，去除上清液，再加 500 µl TBS 並使 anti-flag agarose 懸浮，接著於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，去掉上清液，重覆此步驟三次。接著將 3 µg 純化好的 caveolin-1-myc-His 加入 anti-flag agarose 及 ABCA1-flag 蛋白質的混合物中，置於 4°C 混合過夜。隔天於 4°C 8200

xg 離心 1 分鐘，去除上清液，再加 500 μ l TBS 並使 anti-flag agarose 懸浮，接著於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，去掉上清液，重覆此步驟三次。最後加入 200 μ l 3X flag peptide (150 ng/ μ l)，置於 4°C 混合 30 分鐘，並於 4°C 8200 xg 離心 1 分鐘，收集上清液並使用西方點墨法分析結果。

另一方面，將 phCav-1-*myc*-His 轉殖進 18 個 3 mm dish 的 HEK 293T 細胞，轉殖 24 小時後，參考 Tahir 等人的方法純化出 caveolin-1-*myc*-His 蛋白質 (Tahir et al., 2003)。將收集的 cell lysate 溶於特製的 lysis buffer 中，利用超音波震盪機於冰上震 15 秒，休息 10 秒，持續 30 分鐘，再於 4°C 10000 xg 離心 5 分鐘，收集細胞上清液。將 500 μ l Ni-NTA resin (Qiagen) 加入 polypropylene 管柱中 (Qiagen)，加入 1 ml buffer A 混合 resin，並利用重力使 buffer A 流出，再加入 1 ml cell lysate，置於 4°C 混合 2 小時，接著陸續用 buffer A 沖洗兩次，buffer B 沖洗兩次及 buffer A 沖洗兩次。再加入 3 μ g 純化好的 ABCA1-flag 蛋白質，置於 4°C 混合過夜，隔天再陸續用 buffer A 沖洗兩次，buffer B 沖洗兩次及 buffer A 沖洗兩次，最後使用 500 μ l buffer C 沖提出含與管柱結合的蛋白質並使用西方點墨法分析。

免疫螢光染色法

將細胞培養在蓋玻片上，之後與高密度脂蛋白質溶液 (50 $\mu\text{g/ml}$ HDL ; Intracel)或 apoAI 蛋白質溶液 (5 $\mu\text{g/ml}$; Biodesign)作用 5、15 及 30 分鐘。將細胞以 4 %福馬林 (Merck)於室溫固定 45 分鐘後，先加入含 3 %白蛋白質 (Sigma)的 PBS 緩衝液於室溫處理 30 分鐘，接著洗去多餘的白蛋白質。加入兔子抗 caveolin-1 抗體 (1:200 稀釋比例 ; Santa Cruz)、老鼠抗人類 58k Golgi protein 抗體 (1:50 稀釋比例 ; Abcam)及老鼠抗人類 ABCA1 抗體 (1:50 稀釋比例 ; Abcam)，於室溫下反應 30 分鐘後，以 PBS 緩衝液洗 3 次，洗去多餘的初級抗體。接著加入紅色螢光結合驢子抗老鼠次級抗體 (1:200 稀釋比例 ; Molecular Probe)及綠色螢光接合驢子抗兔子次級抗體 (1:200 稀釋比例 ; Molecular Probe)，在室溫下反應 1 小時，以 PBS 清洗 3 次，再用 DAPI (1:1000 稀釋比例 ; Sigma)於室溫下反應 10 分鐘，再用 PBS 清洗 3 次。風乾後封片，於免疫螢光顯微鏡 (Nikon E400)下鏡檢，以波長 543nm 為激發光源偵測綠色螢光顯現，以波長 633 nm 為激發光源偵測紅色螢光，以波長 488 nm 為激發光源偵測 DAPI，以藍色螢光顯現。

免疫電子顯微鏡法

將細胞與高密度脂蛋白質 (80 $\mu\text{g/ml}$; Intracel) 溶液於 37°C 下培養 5 分鐘，之後將細胞置於 4°C 下以 PBS-albumin 緩衝液清洗三次，接著以 4 % 福馬林 (Merck) 前固定 30 分鐘。固定後依細胞經以 PBS 清洗後繼續與兔子抗人類 caveolin-1 (1:50 稀釋比例; Santa Cruz) 或老鼠抗人類 ABCA1 (1:5 稀釋比例; Abcam) 初級抗體培養 1 小時，再用 15 nm 金粒子接合山羊抗兔子二級抗體 (1:40 稀釋比例; EMS) 及 10 nm 金粒子接合山羊抗老鼠二級抗體 (1:40 稀釋比例; EMS) 培養 1 小時。以 PBS-albumin 清洗後繼續與 3 % glutaraldehyde (EMS) 作用 2 小時後固定，最後再以 1 % 四氧化鉻 (EMS) 作用 30 分鐘。以細胞鏟將細胞刮起置於小玻璃瓶中，然後再以 0.1 M cacodylate 緩衝液 (Sigma) 清洗三次，每次 10 分鐘。接著以 50 %、70 %、95 %、100 % 的酒精做脫水置換，之後再以 1,2-propylene oxide (Merck) 與 100 % 酒精分別以 1:3、1:1、3:1 比例做置換，最後將酒精完成置換成 1,2-propylene oxide。準備 Epon 包埋劑 (EMS) 分別與 1,2-propylene oxide 以 1:3 置換一小時，1:1 置換 4 小時，3:1 置換 8 小時，100 % 1,2-propylene oxide 12 小時，最後將細胞置於數個 capsule 中，以新配置的 Epon 包埋劑做包埋，並置於烘箱中 40°C 18 小時，接著放入 60°C 烘箱 24 小時後以備製作超薄切片之用。

組織塊經超薄切片機 (Ultramicrotome) 切片後 (80 nm) 以過飽和的醋酸鈾鹽 (uranyl acetate 溶於 50 % 酒精; Sigma) 染 30 分鐘, 再以 0.4 % 檸檬酸鉛 (lead citrate; Sigma) 染 3 分鐘, 最後以電子顯微鏡 (H-600; Hitachi) 觀察。

Caveolae 結構的量化統計實驗中, 收集轉殖 pCav-cDNA 細胞處理組及轉殖 pcDNA 細胞處理組各六個組織塊, 將組織塊切出 25 個超薄切片, 利用電子顯微鏡觀察超薄切片隨機挑選 5 個細胞, 計算細胞膜的長度及 caveolae 結構的數目, 將三次獨立實驗的結果量化平均並統計結果。

膽固醇釋出分析

將內皮細胞置於含 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]膽固醇 (Sigma) 的培養液中於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養 24 小時。以 PBS 緩衝液洗 3 次後, 再與含 50 $\mu\text{g/ml}$ HDL (Intracel) 或 5 $\mu\text{g/ml}$ apoAI (Biodesign) 的 DMEM 中培養 5、15、30、60、180 分鐘及 24 小時, 收集培養液。測量細胞膜上膽固醇的實驗, 則將餵食 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]膽固醇的細胞於 37 $^{\circ}\text{C}$ 處理 methyl- β -cyclo-dextrin (2 mM) 30 分鐘, 再收集培養液。接著在室溫下處理 0.1N NaOH, 0.2 % SDS 五小時去溶解細胞, 再收集溶解液。以冷光分析儀 (Top Count; Perkinelmer) 偵測釋放至培養液中的 [^3H]膽固醇量及其各自的細胞溶解液, 最後計算

(培養液^{[3]H}膽固醇量/培養液^{[3]H}膽固醇量+溶解液^{[3]H}膽固醇量) 得到細胞膽固醇釋出量所佔全部膽固醇的比例。

PKC 抑制劑實驗

將內皮細胞餵食膽固醇 (50 µg/ml ; Sigma)24 小時，再繼續餵食膽固醇並伴隨處理 sphingosine (100 mM ; Sigma)24 小時，接著處理高密度脂蛋白質 (50 µg/ml ; intracel) 0、5、15、30、60、180 分鐘，最後利用西方點墨法分析結果。

統計分析

統計結果呈現是以平均值 ± 標準差表示。統計比較結果根據 Student's *t*-test 分析變異度。*， $P < 0.05$ 及**， $P < 0.01$ 視為顯著差異。

結果

Caveolin-1 幫助動脈內皮細胞的膽固醇釋出

首先將含 caveolin-1 的表現質體 pCav-cDNA 轉殖進內皮細胞，以大量表現 caveolin-1 蛋白質。利用西方點墨法分析 caveolin-1 蛋白質在轉殖 pCav-cDNA 細胞及轉殖 vector 控制組細胞 (pcDNA) 中的表現 (圖一 A)。由於外生性 caveolin-1 蛋白質 (exogenous caveolin-1) 有接合 myc 報導蛋白質，分子量由 22 kD 增加為 29 kD。利用抗 caveolin-1 抗體可以同時偵測到轉殖 pCav-cDNA 組內有 22 kD 的內生性 caveolin-1 蛋白質 (endogenous caveolin-1) 及 29 kD 的外生性 caveolin-1 蛋白質表現，利用抗 myc 抗體也可以偵測到 29 kD 的外生性 caveolin-1 蛋白質，而在控制組細胞內只能偵測到內生性 caveolin-1 蛋白質。在轉殖 pCav-cDNA 細胞中 caveolin-1 蛋白質總表現量較控制組增加 44 % (圖一 A)。我們接著將轉殖 pCav-cDNA 細胞及控制組細胞餵食 [³H] 膽固醇 24 小時，再處理高密度脂蛋白質 24 小時後，收集培養液並測量其釋出 [³H] 膽固醇量。結果顯示大量表現 caveolin-1 蛋白質的 pCav-cDNA 轉殖細胞，其膽固醇釋出量增加了 37 %，並且顯著高於控制組細胞 (圖一 B ; $p < 0.01$)。此外，我們利用轉殖 caveolin-1 siRNA 來抑制 caveolin-1 表現，發現 caveolin-1 siRNA 轉殖細胞中的 caveolin-1 蛋白質表現較 scrambled siRNA 控制組

細胞少 90 % (圖一 C)。此外，比較 caveolin-1 siRNA 轉殖細胞及控制組細胞的膽固醇釋出情形，降低表現 caveolin-1 細胞的^[3H]膽固醇釋出較控制組細胞減少約 30 %，且顯著低於控制組細胞 (圖一 D； $p<0.01$)。根據上述實驗結果，動脈內皮細胞在大量表現 caveolin-1 時，會增加膽固醇釋出，而減少 caveolin-1 表現會降低膽固醇釋出，故 caveolin-1 的表現會幫助動脈內皮細胞的膽固醇釋出 (Lin et al., 2007)。

Caveolin-1 幫助動脈內皮細胞形成 caveolae 結構

有研究指出 caveolae 結構是高密度脂蛋白質所調控膽固醇釋出的重要出口 (Fielding and Fielding, 2000; Fielding and Fielding, 1995b)，我們假設在動脈內皮細胞中，caveolin-1 可藉由幫助形成 caveolae 結構來協助膽固醇的釋出。為了證實此假設，先利用穿透式電子顯微鏡觀察大量表現 caveolin-1 的細胞及控制組細胞的細胞膜上 caveolae 的數量。結果顯示在控制組細胞中，細胞膜上只有較少的 caveolae 結構，而在大量表現 caveolin-1 的內皮細胞中，可以看到很多 caveolae 的結構 (圖二 A，箭頭)。量化結果顯示在單位長度的細胞膜上，大量表現 caveolin-1 的細胞比控制組細胞上的 caveolae 顯著增加 (圖二 B； $p<0.01$)。根據此實驗結果，在動脈內皮細胞中，caveolin-1 的大量表現可以幫助形成

caveolae 的結構 (Lin et al., 2007)。

Caveolin-1 會正向調控 ABCA1 mRNA 及蛋白質的表現量

爲了探討 caveolin-1 是否會調控 ABCA1 的表現量，該實驗先利用半定量 RT-PCR 的方法分析大量表現 caveolin-1 細胞及降低表現 caveolin-1 細胞中，ABCA1 mRNA 的表現量。結果發現 caveolin-1 mRNA 及 ABCA1 mRNA 的表現量會隨轉殖 pCav-cDNA 劑量增加而同步增加 (圖三 A)；Caveolin-1 mRNA 及 ABCA1 mRNA 的表現量會隨轉殖 caveolin-1 siRNA 的劑量增加而同步減少 (圖三 B)。接著利用西方點墨法分析大量表現 caveolin-1 細胞及降低表現 caveolin-1 細胞中，ABCA1 蛋白質的表現量。結果發現在轉殖 pCav-cDNA 細胞中，ABCA1 的表現比轉殖 pcDNA 控制組細胞高 (圖三 C)；在轉殖 caveolin-1 siRNA 細胞中，ABCA1 的表現比轉殖 scrambled siRNA 控制組細胞低 (圖三 D)。根據此實驗結果，得知 caveolin-1 會正向調控 ABCA1 mRNA 與蛋白質表現量 (Lin et al., 2007)。

ABCA1 參與 caveolin-1 所調控膽固醇釋出路徑

先前的研究證明在內皮細胞中，大量 ABCA1 會幫助膽固醇釋出

(Liao et al., 2002)。而在我們先前的實驗中發現 caveolin-1 會正向調控 ABCA1 mRNA 及蛋白質的表現量，因此假設 caveolin-1 可能會藉由增加 ABCA1 表現來幫助內皮細胞膽固醇釋出。為了驗證此假設，我們需要先探討 ABCA1 是否參與在 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出路徑。首先測量四種處理下細胞的膽固醇釋出情形：(1) 共同轉殖 pcDNA 及 scrambled siRNA；(2) 共同轉殖 pcDNA 及 ABCA1 siRNA；(3) 共同轉殖 pCav-cDNA 及 scrambled siRNA；(4) 共同轉殖 pCav-cDNA 及 ABCA1 siRNA (圖四)。比較控制組 (處理一) 與大量表現 caveolin-1 (處理三) 的細胞，其增加的膽固醇釋出可視為外生性 caveolin-1 所調控的膽固醇釋放量，且增加情形符合先前實驗結果 (圖一 B)。比較控制組 (處理一) 與降低 ABCA1 表現 (處理二) 的細胞，其降低的膽固醇釋出可視為減少 ABCA1 表現所抑制的膽固醇釋放量。比較大量表現 caveolin-1 (處理三) 與大量表現 caveolin-1 且降低表現 ABCA1 (處理四) 的細胞，ABCA1 siRNA 處理可以抑制掉外生性 caveolin-1 所調控的膽固醇釋放量，代表減少 ABCA1 表現會抑制掉 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出情形。以上結果證明在內皮細胞中，ABCA1 參與 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出路徑 (Lin et al., 2007)。

Caveolin-1 與 ABCA1 在細胞膜及細胞質中的交互作用

爲了更進一步探討 caveolin-1 與 ABCA1 間的關係，於是利用免疫沉澱法分析 caveolin-1 與 ABCA1 間是否有交互作用。以 non-immune IgG、抗 caveolin-1 抗體及抗 ABCA1 抗體做免疫沉澱，結果發現 caveolin-1 會與 ABCA1 蛋白質共同被抗 ABCA1 抗體免疫沉澱下來，ABCA1 也會與 caveolin-1 蛋白質共同被抗 caveolin-1 抗體免疫沉澱下來 (圖五 A)，而 non-immune IgG 處理卻沒有偵測到 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質，證明了抗 caveolin-1 抗體及抗 ABCA1 抗體處理組的專一性。由此證明，caveolin-1 與 ABCA1 間會有蛋白質間交互作用。爲了進一步探討此兩蛋白質間交互作用是發生在細胞質中或是細胞膜上，先利用超高速離心將處理過膽固醇及高密度脂蛋白質的內皮細胞分離出細胞膜部份及細胞質部份 (Wu et al., 2004)，再利用細胞膜的標定蛋白質： β 1-integrin 及細胞質的標定蛋白質：GAPDH、tubulin 測試分離效果，結果發現 β 1-integrin 只在細胞膜部份被偵測到，GAPDH 及 tubulin 只在細胞質部份被偵測到，證明細胞膜與細胞質被成功的分離出來 (圖五 B)。此外觀察到餵食膽固醇的細胞處理高密度脂蛋白質後，caveolin-1 在細胞膜上分佈較多而分佈較少在細胞質中，ABCA1 則是均勻分佈於細胞膜及細胞質中 (圖五 B)。而後將兩部份的細胞液分別利用抗 caveolin-1

抗體做免疫沉澱，發現 ABCA1 在細胞膜及細胞質部份都與 caveolin-1 蛋白質一同被抗 caveolin-1 抗體免疫沉澱下來 (圖五 B)。由此結果證明 caveolin-1 與 ABCA1 間有蛋白質間交互作用於細胞膜上及細胞質中 (Lin et al., 2007)。

利用免疫沉澱法驗證了 caveolin-1 與 ABCA1 有蛋白質間交互作用，但 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間是直接結合或是間接結合 (兩蛋白質間需要其他蛋白質才能結合成蛋白質複合體)需進一步利用 pull down 測試法探討純化出的 ABCA1 蛋白質及 caveolin-1 蛋白質是否可以單獨於試管中結合。為此目的，我們轉殖 pABCA1-flag 及 phCav-1-myc-His 進 HEK 293T 細胞株分別表現出外生性的 ABCA1-flag 蛋白質及 caveolin-1-myc-His 蛋白質，再利用 anti-flag agarose 親合性管柱及 Ni-NTA 親合性管柱分別純化出 ABCA1 與 caveolin-1 純化蛋白質，最後用 pull down 測試法探討兩純化蛋白質能否結合。

利用 anti-flag agarose 柱純化 ABCA1-flag 蛋白質

首先利用西方點墨法分析 mock 控制組細胞及 pABCA1-flag 轉殖細胞經 anti-flag agarose 純化過程中 ABCA1 (圖六 A)及 flag (圖六 B)的蛋白質表現，並利用銀染法將其所有蛋白質染色以瞭解純化效果 (圖六 C)。

結果顯示 mock 控制組細胞並無內生性的 ABCA1-flag 蛋白質表現，而 pABCA1-flag 轉殖細胞中則大量表現外生性的 ABCA1-flag 蛋白質 (~238 kD)，經純化後抗 ABCA1 抗體及抗 flag 抗體只會偵測到單一條帶 (band)，而銀染法顯示 elute solution 只剩下分子量約 238 kD 的蛋白質條帶 (箭頭；圖六 C)，顯示利用 anti-flag agarose 親合性管柱成功純化出 ABCA1-flag 蛋白質。

利用 Ni-NTA 親合性管柱純化 caveolin-1-myc-His 蛋白質

接著利用西方點墨法分析 mock 控制組細胞及 phCav-1-myc-His 轉殖細胞經 Ni-NTA 親合性管柱純化過程中 caveolin-1 (圖七 A) 及 myc (圖七 B) 的蛋白質表現，並利用銀染法將其所有蛋白質染色以瞭解純化效果 (圖七 C)。結果顯示 mock 控制組細胞並無內生性的 caveolin-1-myc-His 蛋白質表現，而 phCav-1-myc-His 轉殖細胞中則大量表現外生性的 caveolin-1-myc-His 蛋白質 (~26 kD)，經純化後抗 caveolin-1 抗體及抗 myc 抗體只會偵測到單一條帶 (band)，而銀染法顯示 elute solution 有分子量約 26 kD 的明顯蛋白質條帶 (箭頭；圖七 C) 及分子量約 22 kD 的雜條帶，顯示利用 Ni-NTA 親合性管柱成功純化出 caveolin-1-myc-His 蛋白質。

利用 pull down 測試法證實 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質為直接結合

利用 anti-flag agarose 結合住 ABCA1-flag 蛋白質後，再加入 caveolin-1-myc-His 純化蛋白質，一同處理並沖洗後，最後沖提出並用西方點墨法分析 (圖八)，結果顯示若沒有加入 ABCA1-flag 於 anti-flag agarose 中的控制組無法結合 caveolin-1-myc-His 純化蛋白質，而加入 ABCA1-flag 的處理組則可以與 caveolin-1-myc-His 純化蛋白質結合顯示 ABCA1 可與 caveolin-1 直接結合。另一方面，利用 Ni-NTA 親合性管柱結合住 caveolin-1-myc-His 及 LacZ-myc-His 蛋白質後，再加入 ABCA1-flag 純化蛋白質，一同處理並沖洗後，最後沖提出並用西方點墨法分析 (圖八)，結果顯示加入 LacZ-myc-His 蛋白質於 Ni-NTA 親合性管柱中的控制組無法結合 ABCA1-flag 純化蛋白質，而加入 caveolin-1-myc-His 的處理組則可以與 ABCA1-flag 純化蛋白質結合，根據這些結果推測 caveolin-1 可與 ABCA1 直接結合。

Caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈在細胞核周圍 (perinuclear region)及細胞膜上一螢光顯微鏡觀察

接著利用螢光顯微鏡觀察 caveolin-1 與 ABCA1 在餵食膽固醇 48

小時並處理高密度脂蛋白質 5 分鐘後在內皮細胞中的分佈位置 (圖九 A~D)。結果發現 caveolin-1 (圖九 A)與 ABCA1 (圖九 B)共同分佈於細胞核周圍 (perinuclear region)的區域 (圖九 C, 圖六 D1)及細胞膜上 (圖九 C, 圖九 D2~D3)。進而觀察一個高基氏體的標定蛋白質, 58 k Golgi protein, 與 caveolin-1、ABCA1 共同分佈於細胞核周圍區 (圖九 E~J), 驗證了 caveolin-1 會與 ABCA1 共同分佈於細胞的高基氏體及細胞膜上 (Lin et al., 2007)。

Caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞質的小胞囊及細胞膜上 caveolae 中—電子顯微鏡觀察

ABCA1 早在 1994 年就被 Luciani 等人定序出來 (Luciani et al., 1994), 但直到今日始終報導有關在超微結構的細胞位置。以抗 ABCA1 抗體接合 10 nm 膠體金粒子標定 ABCA1 再利用穿透式電子顯微鏡觀察, 結果發現 ABCA1 存在於細胞膜上的 caveolae 結構中 (圖十 A~B)。進一步利用抗 caveolin-1 抗體接合 15 nm 膠體金粒子及抗 ABCA1 抗體接合 10 nm 膠體金粒子分別標定 caveolin-1 (箭號)與 ABCA1 (箭頭), 結果發現在細胞膜上的 caveolae 結構中會發現 caveolin-1 會與 ABCA1 的金粒子結合物 (圖十 C~D), 且在細胞質中的小胞囊內也可觀察到

caveolin-1 與 ABCA1 的金粒子結合物 (圖十 E~F)。由以上結果得知 caveolin-1 會與 ABCA1 共同分佈於細胞膜 caveolae 的結構中及細胞質的小胞囊上 (Lin et al., 2007)。

Caveolin-1、ABCA1 與膽固醇共同分佈於細胞質及細胞膜上

先前報導過 caveolin-1 與 ABCA1 都可以幫助膽固醇從高基氏體運送到細胞膜上 (Fielding and Fielding, 2001; Orso et al., 2000)，而在前述電子顯微鏡結果中發現 caveolin-1 與 ABCA1 會共同分佈於細胞質中的胞囊上，我們假設 caveolin-1 可能會與 ABCA1 一同藉由胞囊方式運送細胞內的膽固醇到細胞膜上。為了驗證此假設，先利用免疫螢光顯微鏡觀察內皮細胞內 caveolin-1、ABCA1 與膽固醇的分佈位置。細胞內膽固醇的位置以 filipin 染劑專一的標定 (Neufeld et al., 2004)，caveolin-1 及 ABCA1 以螢光抗體標定位置。結果發現 caveolin-1 會與 ABCA1 共同分佈於細胞核周圍區域及細胞膜上 (圖十一 A~C)，而膽固醇與 caveolin-1 及 ABCA1 亦共同分佈於同樣位置 (圖十一 D~F)。根據此結果，我們推測 caveolin-1 與 ABCA1 極可能共同運送膽固醇至細胞膜上 (Lin et al., 2007)。

Caveolin-1 與 ABCA1 會藉由胞囊方式共同運送細胞內膽固醇到細胞膜上而幫助高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出

爲了證實 caveolin-1 與 ABCA1 兩種蛋白質間的交互作用在膽固醇釋出過程中所扮演的角色，首先利用一種由 caveolin-1 所調控以胞囊運送膽固醇的抑制劑：progesterone (Fu et al., 2004)，及兩種由 ABCA1 所負責以胞囊運送膽固醇釋出的抑制劑：monensin 及 brefeldin A (Neufeld et al., 2001)去處理內皮細胞，再利用免疫沉澱法測量這些抑制劑是否會影響 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作用。結果發現，progesterone、monensin 及 brefeldin A 都會抑制 ABCA1 與 caveolin-1 蛋白質間的交互作用，而此結果並未影響 ABCA1 或是 caveolin-1 的蛋白質表現量 (圖十二 A)。如同時以此三種抑制劑處理細胞，並測量 methyl- β -cyclodextrin 及高密度脂蛋白質所刺激的膽固醇釋出。根據 Le Goff 等人的研究，將細胞處理 methyl- β -cyclodextrin (2 mmol/L) 30 分鐘只可沖洗出細胞膜上的膽固醇 (Le Goff et al., 2004)。我們的實驗結果發現，progesterone、monensin 及 brefeldinA 會抑制細胞內的膽固醇運送到細胞膜上 (圖十二 B)，同樣的，三種抑制劑也會抑制高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出 (圖十二 C)。由以上結果得知這三種會抑制細胞內膽固醇運送的胞囊抑制劑都會破壞 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互

作用，並且減少細胞內膽固醇運送到細胞膜上及抑制高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出。根據此三種結果的高相關性，我們推測 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作用可能會藉由胞囊形式運送膽固醇到細胞膜上並釋出給高密度脂蛋白質 (Lin et al., 2007)。

之前實驗發現 caveolin-1 會與 ABCA1 一同運送膽固醇到細胞膜上幫助高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出 (Lin et al., 2007)，而接下來要探討的下一個個重要問題是：為何 caveolin-1 與 ABCA1 需要彼此結合來共同幫助膽固醇運送及釋出？Orso 等人發現在 ABCA1 剔除鼠的細胞中，caveolin-1 會停留在高基氏體，並且無法運送脂質到細胞膜上 (Orso et al., 2000)，因此推測 ABCA1 可能對於 caveolin-1 從高基氏體傳送脂質到細胞膜的傳送過程中扮演重要的角色。

降低 ABCA1 的表現不會改變 caveolin-1 蛋白質表現量，但會抑制高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出

爲了驗證前述的假說，我們利用轉殖 ABCA1 siRNA 去降低 ABCA1 的表現，再探討對 caveolin-1 蛋白質表現量的影響。西方點墨法結果顯示，轉殖 ABCA1 siRNA 細胞中的 ABCA1 蛋白質表現量顯著比轉殖

scrambled siRNA 控制組的細胞低約 70 % (圖十三 A~B; $p<0.01$), 但 caveolin-1 蛋白質表現卻沒有顯著差異 (圖十三 A~B)。故減少 ABCA1 表現不會影響 caveolin-1 蛋白質表現。進一步將轉殖 ABCA1 siRNA 及 scrambled siRNA 細胞處理高密度脂蛋白質、apoAI 載脂蛋白質及 BSA (fatty acid free albumin) 並測量其膽固醇釋出。結果發現, 相較於 BSA 控制組, 高密度脂蛋白質顯著增加膽固醇釋出 (圖十三 C), 但 apoAI 載脂蛋白質對膽固醇釋出沒有顯著影響, 因此只有高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質可以刺激內皮細胞膽固醇釋出。相較於 scrambled siRNA 細胞, 減少 ABCA1 表現細胞其高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出顯著減少 (圖十三 C; $p<0.01$), 但 apoAI 所調控的膽固醇釋出沒有顯著影響 (圖十三 C)。根據這些結果, 我們得知 ABCA1 不會影響 caveolin-1 蛋白質的表現量, 只有高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質可以刺激內皮細胞膽固醇釋出, 且 ABCA1 參與高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出作用中。

降低 ABCA1 表現會使 caveolin-1 停留在高基氏體

接下來利用免疫螢光顯微鏡觀察轉殖 ABCA1 siRNA 及 scrambled siRNA 細胞中, ABCA1 與 caveolin-1 的分佈位置。將兩種細胞給予膽固

醇培養並處理高密度脂蛋白質後，發現轉殖 scrambled siRNA 細胞中，caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞質與細胞膜上 (圖十四 A~C)。但在轉殖 ABCA1 siRNA 細胞中，caveolin-1 多分佈在細胞核周圍區域 (perinuclear region) (圖十四 D~F)，以 58k Golgi protein 標定細胞核周圍區域，明顯指出 caveolin-1 分佈於高基氏體上 (圖十四 G~I)。量化結果發現將轉殖 scrambled siRNA 細胞處理高密度脂蛋白質後，約八成細胞的 caveolin-1 會散佈在細胞膜及細胞質中，而約八成轉殖 ABCA1 siRNA 細胞的 caveolin-1 會聚集在細胞核周圍區域。另外將轉殖 ABCA1 siRNA 細胞及轉殖 scrambled siRNA 細胞利用超高速離心分離出 plasma membrane 部份及 cytoplasm 部份後，利用西方點墨法分析 caveolin-1 的分佈位置 (圖十四 K)，結果顯示在控制組細胞中，caveolin-1 較多分佈於細胞膜上，較少分佈於細胞質中，在轉殖 ABCA1 siRNA 細胞中，caveolin-1 則會較多分佈於細胞質中而較少分佈於細胞膜上。根據這些結果，我們知道降低 ABCA1 表現會使 caveolin-1 停留在高基氏體。

ABCA1 會與 oligomer-caveolin-1 結合並且調控 caveolin-1 寡聚化

Caveolin-1 蛋白質必須經過寡聚化才能離開高基氏體並運送到細胞膜上 (Machleidt et al., 2000; Parton and Simons, 2007; Ren et al., 2004;

Tagawa et al., 2005), 因此我們推測 ABCA1 是否可能藉由調控 caveolin-1 蛋白質的寡聚化去幫助 caveolin-1 離開高基氏體而運送到細胞膜上, 為了驗證此假設, 首先利用西方點墨法偵測在轉殖 ABCA1 siRNA 細胞及轉殖 scrambled siRNA 細胞中 oligomer-caveolin-1 的表現量。Sargiacomo 等人驗證了 oligomer-caveolin-1 是一個對 SDS 穩定的構造, 而其分子量約為 400 kD (Sargiacomo et al., 1995), 但被 β -mercaptoethanol 經由 100 °C 處理即可變成 monomer-caveolin-1, 。西方點墨法結果顯示相較於轉殖 scrambled siRNA 細胞, 轉殖 ABCA1 siRNA 細胞中的 oligomer-caveolin-1 (其分子量約 400 kD) 表現量顯著較少 (圖十五 A~B), 同樣的樣品經過 β -mercaptoethanol 100 °C 處理 6 分鐘後, 只能偵測到 22 kD 的 monomer-caveolin-1, 證明其 400 kD 的 caveolin-1 條帶 (band) 即為 oligomer-caveolin-1。以 non-immune IgG 及抗 ABCA1 抗體做免疫沉澱, 發現若沒有經過 β -mercaptoethanol 100 °C 處理的蛋白質, oligomer-caveolin-1 與 monomer-caveolin-1 會一同與 ABCA1 蛋白質被抗 ABCA1 抗體免疫沉澱下來 (圖十五 C)。根據這些結果得知 ABCA1 會與 oligomer-caveolin-1 有蛋白質間交互作用, 並且可以調控 caveolin-1 寡聚化。由於 Caveolin-1 蛋白質必須經過寡聚化才能離開高基氏體 (Machleidt et al., 2000; Parton and Simons, 2007; Ren et al., 2004; Tagawa

et al., 2005), 因此推測 ABCA1 可以藉由幫助 caveolin-1 寡聚化來幫助 caveolin-1 離開高基氏體並運送到細胞膜上。

高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 處理會升高 ABCA1

mRNA 表現，但都不會影響 caveolin-1 mRNA 表現

我們接下來對餵食膽固醇的細胞分別處理高密度脂蛋白質、apoAI 載脂蛋白質及 BSA 不同時間 (0、5、15、30、60、180 分鐘)，並用半定量 RT-PCR 分析 ABCA1 mRNA 及 caveolin-1 mRNA 表現量 (圖十六)。先將不同時間點經不同處理的細胞抽取其 total RNA，並利用 rRNA 及 β -actin 作為 loading control，並將其中一組樣品不做反轉錄反應 (RT-) 以驗證使用 PCR 增幅出來的條帶，並非是因為 genomic DNA 污染而來。結果發現高密度脂蛋白質在早期會升高 ABCA1 mRNA 的表現 (5~15 分鐘)，接著 ABCA1 mRNA 會逐漸恢復至處理高密度脂蛋白質前的基本值 (30~180 分鐘)，但 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 不會對 ABCA1 mRNA 表現量有明顯影響 (圖十六)。高密度脂蛋白質會輕微的減少 caveolin-1 mRNA 的表現，但 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 不會影響 caveolin-1 mRNA 的表現 (圖十六)。此實驗結果顯示高密度脂蛋白質在處理早期會升高 ABCA1 mRNA 表現，三十分鐘後 ABCA1 mRNA 表現量會漸漸回到基

本值，而 apoAI 載脂蛋白質不會對 ABCA1 mRNA 表現量有明顯影響，另外，高密度脂蛋白質及 apoAI 載脂蛋白質對 caveolin-1 mRNA 表現量不會有明顯的影響。

高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 處理能升高 ABCA1 蛋白質表現量，幫助 caveolin-1 寡聚化，但不會影響 caveolin-1 總表現量

我們接著利用西方點墨法分析處理高密度脂蛋白質、apoAI 載脂蛋白質及 BSA 的細胞中，其 ABCA1 蛋白質表現量、caveolin-1 蛋白質總表現量（樣品經過 β -mercaptoethanol 100 °C 處理 6 分鐘）及 oligomer-caveolin-1 蛋白質表現量（圖十七）。結果發現，處理高密度脂蛋白質 15 分鐘後會升高 ABCA1 表現量，接著 30 分鐘後會漸漸回到處理前的基本值，而 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 處理不會明顯改變 ABCA1 蛋白質表現量（圖十七，圖十八 A）。另一方面，高密度脂蛋白質、apoAI 載脂蛋白質及 BSA 處理都不會明顯改變 caveolin-1 總表現量（圖十七，圖十八 B）。高密度脂蛋白質處理 30 分鐘會開始增加 oligomer-caveolin-1，並維持其表現值到實驗結束，但 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 處理不會明顯影響 oligomer-caveolin-1 的表現量（圖十七，圖十八 C）。此結果顯示高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 可以

升高 ABCA1 蛋白質表現，及幫助 caveolin-1 寡聚化，但不會影響 caveolin-1 總表現量。

高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 可快速幫助膽固醇釋出

先前實驗證明只有高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 能刺激內皮細胞膽固醇釋出 (圖十三 C)，而且只有高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質或 BSA 能在 15 分鐘內升高 ABCA1 表現及自 30 分鐘開始至 60 分鐘時增加 caveolin-1 寡聚化 (圖十七、圖十八 A~C)，因此我們接著想測量在處理高密度脂蛋白質、apoAI 載脂蛋白質及 BSA 於 5、15、30、60、180 分鐘時細胞膽固醇釋出情形 (圖十八 D)。結果發現，BSA 處理組在 60 分鐘內膽固醇釋出約 4%，其可認定為擴散作用所導致的膽固醇釋出，而 apoAI 載脂蛋白質約可刺激 6% 膽固醇釋出，其與 BSA 處理組沒有顯著差異，但是高密度脂蛋白質可以於前 30 分鐘快速幫助細胞膽固醇釋出，到 60 分鐘即到達釋出的飽和值，且與 BSA 處理組有顯著差異。根據此實驗結果，我們發現只有高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 可以於 60 分鐘內完成大部份的膽固醇釋出。而 oligomer-caveolin-1 表現量與膽固醇釋出情形之間有高度相關性 (圖十八 C, D)，顯示出 caveolin-1 寡聚化與細胞膽固醇釋出極為重要。

高密度脂蛋白質會增加 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作用

將細胞處理高密度脂蛋白質 0、5、15、30、60、180 分鐘，再用抗 caveolin-1 抗體作免疫沉澱以探討 caveolin-1 與 ABCA1 在不同時間點的交互作用 (圖十九)。結果發現，處理高密度脂蛋白質 5 分鐘時，會增加 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間交互作用，30 分鐘後，caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作用會開始減少。根據此實驗結果，顯示高密度脂蛋白質刺激細胞膽固醇釋出早期時 (5~30 分鐘)，caveolin-1 會增加與 ABCA1 蛋白質間的交互作用，但當細胞膽固醇釋出結束時 (60~180 分鐘)，caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作用會減少。

高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 能幫助 caveolin-1 從高基氏體運送到細胞膜上

接著利用免疫螢光顯微鏡觀察處理高密度脂蛋白質、apoAI 載脂蛋白質及 BSA 於 0、15、30 分鐘時，caveolin-1 與 ABCA1 在細胞中的分佈位置 (圖二十)。在 0 分鐘時，caveolin-1 與 ABCA1 會共同分佈於細胞核周圍區域 (圖二十 A~C)，處理高密度脂蛋白質 15 分鐘時，caveolin-1 會與 ABCA1 共同散開於細胞質中 (圖二十 D~F)，處理高密度脂蛋白質

30 分鐘時, caveolin-1 會與 ABCA1 共同分佈在細胞膜上及細胞質中 (圖二十 G~I)。而處理 apoAI 載脂蛋白質或 BSA 30 分鐘時, caveolin-1 依舊與 ABCA1 共同分佈於細胞核周圍 (圖二十 J~O)。根據先前的實驗結果 (圖九), caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞核周圍區域即是高基氏體。量化結果發現, 沒有處理高密度脂蛋白質、apoAI 載脂蛋白質或 BSA 時, 有 72 % 的細胞其 caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞核周圍, 處理高密度脂蛋白質 30 分鐘時, 有 73 % 的細胞其 caveolin-1 與 ABCA1 共同散佈於細胞膜及細胞質中, 而處理 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 30 分鐘時, 分別有 68 % 的細胞及 71 % 的細胞其 caveolin-1 與 ABCA1 依舊共同分佈於細胞核周圍 (圖二十 P)。根據這些結果, 顯示只有高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質及 BSA 會幫助 caveolin-1 與 ABCA1 共同從高基氏體移動到細胞質及細胞膜上。

高密度脂蛋白質會藉由增加 ABCA1 表現來幫助 caveolin-1 寡聚化及膽固醇釋出

先前實驗結果發現 ABCA1 會調控 caveolin-1 寡聚化 (圖十五), 且高密度脂蛋白質會先增加 ABCA1 的表現量接著增加 oligo-caveolin-1 的表現量 (圖十七, 圖十八), 我們假設高密度脂蛋白質可能藉由增加

ABCA1 的表現去幫助 caveolin-1 寡聚化。爲了驗證此假設，先利用轉殖 ABCA1 siRNA 去抑制高密度脂蛋白質所增加的 ABCA1 表現，再利用西方點墨法分析是否會影響高密度脂蛋白質所增加的 oligomer-caveolin-1 表現量 (圖二十一)。結果發現，在轉殖 scrambled siRNA 控制組細胞中，高密度脂蛋白質會增加 ABCA1 蛋白質的表現並增加 oligomer-caveolin-1 的表現量 (圖二十一 A)。但在轉殖 ABCA1 siRNA 細胞中，可見到 ABCA1 的表現被抑制下來，即使處理高密度脂蛋白質也無法增加 oligomer-caveolin-1 的表現量 (圖二十一 A)。根據此結果，ABCA1 對於高密度脂蛋白質增加 caveolin-1 寡聚化扮演重要的角色。由測量高密度脂蛋白質對於轉殖 scrambled siRNA 及 ABCA1 siRNA 細胞的膽固醇釋出的結果顯示抑制 ABCA1 表現會使膽固醇釋出顯著降低且變慢 (圖二十一 B； $p < 0.05$)。根據這些結果，我們的結論是高密度脂蛋白質會藉由增加 ABCA1 的表現量來幫助 caveolin-1 寡聚化及幫助膽固醇釋出。

結論

根據實驗結果，綜合出下列結論：在動脈內皮細胞中，(1) caveolin-1 的表現會增加 caveolae 結構的形成同時會幫助膽固醇釋出；(2) caveolin-1 會正向調控 ABCA1 mRNA 及蛋白質的表現，而 ABCA1 不會影響 caveolin-1 的蛋白質表現，但會參與由 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出 (圖二十二)；(3) caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間會有交互作用，此交互作用發生於細胞膜上及細胞質中，且 caveolin-1 與 ABCA1 的交互關係屬直接結合；(4) caveolin-1、ABCA1 與膽固醇共同分佈於細胞膜上的 caveolae 結構及細胞質中高基氏體及小胞囊中；(5) 三種會抑制胞囊運送的抑制劑：progesterone、brefeldin A 及 monensin 都會抑制 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作用、細胞內膽固醇傳送到細胞膜上，並進而降低由高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出 (圖二十三)；(6) 將細胞處理高密度脂蛋白質的初期 (5~15 分鐘)，會升高 ABCA1 表現且增加 caveolin-1 與 ABCA1 的交互作用，及幫助 caveolin-1 寡聚化促使 caveolin-1 從高基氏體運送到細胞膜上以幫助細胞膽固醇釋出。降低 ABCA1 表現會抑制 caveolin-1 寡聚化並使 caveolin-1 停留在高基氏體並降低膽固醇的釋出。綜合上述各點，我們提出一個模式 (圖二十四)，即是高密度脂蛋白質藉由某些未知的機制增加 ABCA1 mRNA 及蛋白質的

表現，進而協助 caveolin-1 寡聚化與 caveolin-1 一起以胞囊方式離開高基氏體至細胞膜上，再將膽固醇釋放給高密度脂蛋白質。

討論

一、動脈內皮細胞可能具有特殊的膽固醇釋出機制

動脈粥瘤中主要含三種細胞：內皮細胞、平滑肌細胞與巨噬細胞 (Glass and Witztum, 2001)，三種細胞所扮演的角色都不相同。內皮細胞位於血管壁最內層，分泌一氧化氮及前列環素 (prostacyclin) (Frangos et al., 1985; Sessa, 2005)等因子，有防止血栓形成的功能，而細胞與細胞之間間隙 (junction)，則可防止過多的低密度脂蛋白質進入動脈壁管中。但當內皮細胞受到損傷通透性改變時，細胞表面會表現出許多貼附分子 (adhesion molecule)且細胞間隙變大 (Kao et al., 1995)，使單核球細胞容易貼附內皮細胞上並進入內皮下層區 (subendothelial space)形成巨噬細胞，當吸收低密度脂蛋白質後即成為泡沫細胞 (foam cell)。先前對內皮細胞在動脈硬化的研究中，多半注重在細胞表面貼附分子的表現及通透性的情形 (Boyle et al., 1997; Chen et al., 1997; Kao et al., 1995; Kao et al., 1994; Rao et al., 2007)。平滑肌細胞分佈在動脈壁的中層 (media)，在粥瘤的形成過程中，巨噬細胞所分泌的生長因子及發炎因子會刺激平滑肌細胞增殖並移動到內皮下層區，造成動脈粥瘤阻塞血管 (附圖一 C)，因此對平滑肌細胞於動脈硬化的研究中，多半注重於探討平滑肌增殖及移動的機制 (Gennaro et al., 2004; Patel et al., 2006; Ross, 1999)。巨

噬細胞在動脈粥瘤中，會利用 Scavenger receptor-BI (SR-BI)蛋白質吸收氧化態低密度脂蛋白質而變成泡沫細胞，而未能將膽固醇充分代謝，因此對於巨噬細胞的研究則多注重於膽固醇調控機制等問題 (Collot-Teixeira et al., 2007; Gargalovic and Dory, 2003; Tall et al., 2002)。

動脈硬化形成過程可以視為是一連串發炎的現象，而動脈壁上累積過多的膽固醇則是導致發炎的主因 (Ross, 1999)。形成動脈粥瘤的三種主要細胞中，平滑肌細胞及巨噬細胞都會無限制的吸收膽固醇及膽固醇酯而變成充滿油滴的泡沫細胞，只有內皮細胞不會無限制的累積膽固醇 (Faggitto et al., 1984)。而內皮細胞位於動脈壁最內層並且與血液中低密度脂蛋白質直接接觸，且內皮細胞與平滑肌細胞及巨噬細胞一樣具有能吸收氧化態低密度脂蛋白質的接受器 (Hu et al., 2003; Nagornev and Rabinovich, 1998; Sawamura et al., 1997)，但不像平滑肌細胞及巨噬細胞會無限制的累積膽固醇而形成泡沫細胞，因此推測內皮細胞一定具有特殊的機制來協助膽固醇釋出 (O'Connell et al., 2004)。故在本研究中，內皮細胞中的膽固醇釋出機制是我們探討的目標。

二、caveolin-1 對膽固醇釋出的影響

Caveolin-1 蛋白質已被證實會直接結合膽固醇 (Murata et al.,

1995)，並運送細胞內的膽固醇至細胞膜上 (Fielding and Fielding, 2001; Uittenbogaard et al., 1998)，但對於膽固醇釋出仍有許多不同的看法 (Fu et al., 2004)。Frank 等人發現抑制 NIH-3T3 細胞株的 caveolin-1 會增加膽固醇釋出 (Frank et al., 2001)；Matveev、Wang 和 Frank 等人則發現轉殖 caveolin-1 進 J774、RAW、HEK-293T、FRT 細胞株對膽固醇釋出沒有影響 (Frank et al., 2002; Matveev et al., 2001; Wang et al., 2003)。Fu 和 Smart 等人分別轉殖 caveolin-1 進入 HepG2 及 L1210-JF 細胞株，結果會增加細胞內新生成的膽固醇運送到細胞膜上且幫助膽固醇釋出 (Fu et al., 2004; Smart et al., 1996)；Arakawa 利用轉殖 caveolin-1 oligonucleotide 來降低 caveolin-1 表現，結果會抑制 THP-1 細胞株的膽固醇釋出 (Arakawa et al., 2000)。而在動脈內皮細胞大量表現 caveolin-1 與降低表現 caveolin-1 的結果發現 caveolin-1 與膽固醇釋出有正相關 (Lin et al., 2007) (圖一)。這些不同的實驗結果，可能因為轉殖的細胞不同，導致 caveolae 結構在有些細胞中無法形成 (Briand et al., 2003; Fu et al., 2004)。而前述的實驗只有 Fu 等人與 Lin 等人的研究曾利用電子顯微鏡觀察到在 HepG2 及動脈內皮細胞中大量表現 caveolin-1 會幫助 caveolae 結構的形成 (圖二)。過去 caveolae 結構被認為是細胞膽固醇釋出的重要出口 (Fielding and Fielding, 1995b)，故我們認為 caveolin-1 如能藉由幫

助 caveolae 的形成，則可幫助內皮細胞膽固醇釋出 (Lin et al., 2007)。目前 caveolae 的形成機制尚未完全清楚 (Parton et al., 2006)，在 caveolin-1 與 caveolin-3 剔除鼠的細胞中未發現有 caveolae 的構造 (Drab et al., 2001; Galbiati et al., 2001)，此外，將 caveolin-1 與 caveolin-3 共同表現在缺乏 caveolae 的細胞上，可以幫助 caveolae 結構的形成 (Kirkham et al., 2005)，以上結果顯示 caveolin-1 與 caveolin-3 對 caveolae 的結構形成是必需的。而 caveolin-2 會加速幫助 caveolin-1 去形成 caveolae，但是缺少 caveolin-2 卻不會影響 caveolae 的形成 (Razani et al., 2002)。我們利用西方點墨法分析動脈內皮細胞中及 HEK293T 細胞株中 caveolin-1 及 caveolin-3 的表現，結果發現 caveolin-1 及 caveolin-3 會大量表現在動脈內皮細胞中而沒有表現在 HEK293T 細胞株中 (圖二十五)，因此動脈內皮細胞中含有幫助形成 caveolae 結構的必要蛋白質，但 HEK293T 細胞卻缺少這些蛋白質表現，極有可能只轉殖 caveolin-1 進內皮細胞及 HEK293T 細胞中，內皮細胞可以增加 caveolae 結構的形成，但 HEK293T 細胞無法增加 caveolae 結構的形成，而看到轉殖 caveolin-1 可以增加動脈內皮細胞的膽固醇釋出但卻不可以增加 HEK293T 細胞株的膽固醇釋出的實驗結果 (Lin et al., 2007; Wang et al., 2003)。至於平滑肌細胞或巨噬細胞的情況如何，值得進一步探討。

三、ABCA1 與 caveolae 的相對位置

ABCA1 是另一個與膽固醇釋出有密切關係的蛋白質 (Wang et al., 2001)，而 Liao 等人證實 ABCA1 會幫助內皮細胞的膽固醇釋出 (Liao et al., 2002)，實驗室先前發現 ABCA1 與 caveolae 的結構蛋白質 caveolin-1 共同分佈且彼此間有蛋白質交互作用 (Chao et al., 2005)，因此我們想要探討 ABCA1 是否在 caveolae 結構內作用？Mendez 等人利用界面活性劑分離法發現在纖維母細胞中 caveolin-1 分佈在 triton X-100 insoluble 的細胞膜上 caveolae 區域，但 ABCA1 分佈在 triton X-100 soluble 的非 caveolae 區域，且 ABCA1 所調控的膽固醇釋出發生在非 caveolae 區域 (Mendez et al., 2001)，因此認為 ABCA1 與 caveolin-1 之間沒有相關性。Gargalovic 等人則利用蔗糖梯度超高速離心發現在巨噬細胞中，ABCA1 不在 caveolae 的分佈區域，所以也認為 ABCA1 不在 caveolae 內作用 (Gargalovic and Dory, 2003)。最近的研究中，Stoery 等人則利用非界面活性劑分離法 (non detergent isolation) 發現在 MDCK 細胞株中，ABCA1 會分佈於非 caveolae 區域，但纖維母細胞中，ABCA1 則會分佈在 caveolae 區域 (Storey et al., 2007)。因此 ABCA1 是否位於 caveolae 中可能會因為分離方法不同或是細胞種類不同而有不同的結論，且至目前並無報導

caveolin-1 與 ABCA1 在內皮細胞中的分佈及電子顯微鏡直接觀察兩者在細胞中分佈的情形。本研究利用免疫沉澱法、免疫螢光染色法及免疫電子顯微鏡法共同驗證在內皮細胞中，caveolin-1 會與 ABCA1 間有交互作用並且共同分佈於細胞膜上的 caveolae 結構與細胞質中的高基氏體及胞囊中 (圖五、九、十) (Lin et al., 2007)。

四、Caveolin-1 與 ABCA1 表現量的相互調控

爲了要進一步瞭解 caveolin-1 與 ABCA1 有交互關係且共同分佈的生理意義，首先要瞭解 caveolin-1 與 ABCA1 是否會相互調控表現量。我們發現 caveolin-1 會正向調控 ABCA1 mRNA 及蛋白質表現量 (Lin et al., 2007) (圖三)，而 Frank 等人也證實過 caveolin-1 剔除鼠的細胞中，ABCA1 的蛋白質表現會降低 (Frank et al., 2006)。另一方面，我們發現降低 ABCA1 表現對 caveolin-1 的蛋白質表現量沒有影響 (圖十三 A、B)，此結果符合在 ABCA1 剔除鼠的細胞中，caveolin-1 蛋白質的表現量與野生型 (wild type) 老鼠的細胞並沒有差別 (Orso et al., 2000)，至於增加 ABCA1 的表現量是否會影響 caveolin-1 的表現量，則有待進一步證實。由目前結果看來，caveolin-1 會調控 ABCA1 mRNA 與蛋白質的表現量，但降低 ABCA1 並不會影響 caveolin-1 蛋白質的表現量，因此我

們推測在調控表現量方面，caveolin-1 應該處於 ABCA1 上游位置，但此推論需要更多的實驗驗證。

五、兩步驟及一步驟膽固醇釋出模式

Fielding 等人曾提出由 ABCA1 與 caveolin-1 在內皮細胞中分別所調控的膽固醇釋出模式 (Fielding et al., 2000) (附圖八)；即 apoAI 載脂蛋白質先結合到 ABCA1 上，ABCA1 將磷脂質傳送給 apoAI 載脂蛋白質而形成 apoAI 載脂蛋白質/磷脂質複合體，接著再移送到 caveolae 結構中吸收膽固醇變成 apoAI 載脂蛋白質/磷脂質/膽固醇的未成熟高密度脂蛋白質複合體，而後離開細胞完成膽固醇釋出。但後來 Smith 等人卻提出 ABCA1 在巨噬細胞中會同時釋出磷脂質及膽固醇的模式 (Smith et al., 2004)。而在我們的研究中發現在內皮細胞，ABCA1 極少出現在 caveolae 附近，而多位在 caveolae 結構中 (圖十)，因此我們認為內皮細胞的膽固醇釋出，無論是兩步驟模式或一步驟模式應該都發生在 caveolae 結構中。

六、膽固醇運送抑制劑對 caveolin-1 與 ABCA1 間交互作用的影響

我們發現三種抑制細胞內膽固醇運送的抑制劑：progesterone、brefeldin A 及 monensin 會抑制 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間的交互作

用，進而抑制細胞內膽固醇運送到細胞膜上而釋出給高密度脂蛋白質 (圖十二)。Progesterone 是一個細胞內的膽固醇運送抑制劑 (Mazzone et al., 1995; Sviridov et al., 2001)，後來 Smart 及 Fu 等人發現 progesterone 會藉由不明機制抑制 caveolin-1 運送細胞內膽固醇到細胞膜上 (Fu et al., 2004; Smart et al., 1996)。而在本研究中則發現，progesterone 還會抑制 caveolin-1 與 ABCA1 間的交互作用，因此推測兩個蛋白質間的交互作用對於 caveolin-1 是否能運送細胞內膽固醇到細胞膜上十分重要 (Lin et al., 2007)。Brefeldin A 及 monensin 是常用來抑制胞囊運送的抑制劑，brefeldin A 會破壞 cis-及 medial-Golgi cisternae 結構 (Klausner et al., 1992)，monensin 則會破壞 trans-Golgi cisternae 結構 (Morre et al., 1983)，而破壞 Golgi 的 cisternae 會抑制分泌路徑及內胞飲的胞囊運送 (Mollenhauer et al., 1990)。這兩種抑制劑將高基氏體的結構破壞後，也會破壞 caveolin-1 與 ABCA1 間的交互作用 (圖十二 A)，因此推測 caveolin-1 與 ABCA1 的交互作用需要一個完整的包含有 cis-、medial-、trans-cisternae 的高基氏體。而在免疫螢光染色圖觀察到 caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞質內的高基氏體 (圖九 E~J)，顯示這兩蛋白質與高基氏體有密切的關係。

將餵食膽固醇的內皮細胞處理高密度脂蛋白質 5~15 分鐘時，

caveolin-1 與 ABCA1 會共同分佈於高基氏體 (圖九 D1, E~J; 圖二十 A~F), 在同時間的免疫沉澱結果顯示 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白質間有較強的交互作用 (5~15 分鐘) (圖十九), 因此我們推測在處理高密度脂蛋白質的早期 (約 5~15 分鐘), caveolin-1 與 ABCA1 會在高基氏體有密切的交互作用關係, 而此交互作用的生理意義對膽固醇能成功運送至膜上極為重要, 亦是我的探討主題。而在處理 brefeldin A 及 monensin 抑制劑後, 會抑制細胞內膽固醇運送到細胞膜上並減少由高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出 (圖十二 B, C), 我們認為 caveolin-1 會與 ABCA1 在高基氏體形成交互作用, 而以胞囊的形式共同運送膽固醇到細胞膜上給高密度脂蛋白質來調控膽固醇釋出。

七、Caveolin-1 與 ABCA1 需要彼此結合共同運送膽固醇至細胞膜上

我們發現 caveolin-1 會與 ABCA1 形成交互作用而共同運送膽固醇到細胞膜上, 但是 caveolin-1 與 ABCA1 為何彼此之間需要形成交互作用來共同運送膽固醇? Orso 等人發現在 ABCA1 剔除鼠及 Tangier disease 病人的細胞中, 雖然會增加 caveolin-1 及 caveolin-2 mRNA 的表現量, 但是不會影響 caveolin-1 及 caveolin-2 的蛋白質表現量, 而雖然 caveolin-1 及 caveolin-2 蛋白質有表現, 但是 caveolin-1 卻停留在高基氏

體，並且細胞內的脂質無法傳送到細胞膜上，故推測 ABCA1 可能對 caveolin-1 從高基氏體傳送脂質到細胞膜的過程中扮演重要的角色 (Orso et al., 2000); Zha 等人發現在纖維母細胞的膽固醇釋出時，ABCA1 會幫助 non-lipid raft 胞囊及含 caveolin-1 的 lipid raft 胞囊從高基氏體運送到細胞膜上 (Zha et al., 2003)，因此推測 ABCA1 蛋白質可能會調控 caveolin-1 蛋白質在細胞內的運送。我們的研究中，發現減少 ABCA1 的表現不會改變 caveolin-1 的蛋白質表現量 (圖十三 A, B)，但卻會使 caveolin-1 停留在高基氏體 (圖十四)，因此 ABCA1 在動脈內皮細胞中同樣能幫助 caveolin-1 自高基氏體運送到細胞膜上。我們推測 caveolin-1 需要 ABCA1 協助其離開高基氏體，最後將膽固醇運送到細胞膜上。為何 ABCA1 需要 caveolin-1 來共同幫助膽固醇釋出？先前的研究指出 caveolin-1 蛋白質會直接結合膽固醇 (Murata et al., 1995)，但 ABCA1 不會直接結合膽固醇，而只能直接結合磷脂質 (Wang et al., 2001)，但是 ABCA1 所運送的小胞囊內卻含有膽固醇，因此我們推測其小胞囊內可能需要 caveolin-1 這種與膽固醇結合蛋白質來一同幫助膽固醇運送。另一方面，許多研究指出 ABCA1 能夠運送細胞內的膽固醇到細胞外，當 ABCA1 位於細胞中的胞囊或高基氏體時，或許能將 cytosol 中的膽固醇運送到胞囊中或高基氏體的內腔中，而更有效率的運送膽固醇到細胞膜

上，但 ABCA1 在細胞中是否有 transporter 的功能現今還未報導過。

八、ABCA1 的新角色：幫助 caveolin-1 寡聚化及離開高基氏體

過去的研究主要認為 ABCA1 會在細胞膜上做為 apoAI 載脂蛋白質的接受器，並將細胞內的膽固醇送給 apoAI 來變成富含膽固醇的高密度脂蛋白質 (Singaraja et al., 2006; Vedhachalam et al., 2007; Young and Fielding, 1999)。我們的研究結果發現了 ABCA1 的一個新功能，即是 ABCA1 可以幫助 caveolin-1 寡聚化並使其能離開高基氏體到細胞膜上 (圖十四、十五)。一般蛋白質生成後會快速通過高基氏體，但 caveolin-1 卻會停留在高基氏體較長時間 (Ren et al., 2004; Tagawa et al., 2005)，所以在許多研究中會觀察到 caveolin-1 聚集在高基氏體的區域 (Dupree et al., 1993; Kurzchalia et al., 1992; Luetterforst et al., 1999; Machleidt et al., 2000)。Caveolin-1 離開高基氏體被報導與其蛋白質的轉譯後修飾有關 (Machleidt et al., 2000; Parton and Simons, 2007; Ren et al., 2004)。Sargiacomo 等人首先發現 caveolin-1 會與自己結合形成分子量約 400 kD 且對 SDS 界面活性劑穩定的同源寡聚體 (homooligomer) (Sargiacomo et al., 1995)。經過後來的研究，逐漸瞭解 caveolin-1 寡聚化的形成過程。在內質網中，caveolin-1 蛋白質會透過寡聚化功能區 (61-101 胺基酸殘

基) 彼此形成同源雙聚體 (homodimer)，到了高基氏體，這些寡聚體會利用 caveolin-1 的 C 端相互接觸而發生第二次寡聚化，形成背對背結合形式的同源寡聚體 (homooligomers) (附圖六) (Song et al., 1997)。Ren 等人還發現 caveolae 的膜結構會在高基氏體形成，而 caveolin-1 需形成寡聚體才能與高基氏體上的 caveolae 膜結構結合 (Ren et al., 2004)。

Caveolin-1 蛋白質如發生突變，則 caveolin-1 無法形成寡聚體，而會停留在高基氏體，因此認為 caveolin-1 要經過寡聚化後才能離開高基氏體 (Machleidt et al., 2000; Parton and Simons, 2007; Ren et al., 2004)。Tagawa 等人將 caveolin-1-GFP 轉殖進細胞內，發現 caveolin-1-GFP 蛋白質要離開高基氏體時會聚集成 puncta，並且直接移動到細胞膜上，而在高基氏體聚集的 caveolin-1-GFP 圖案與細胞膜上的 caveolin-1-GFP 螢光圖案相似，其推測成熟的 caveolae 結構會在高基氏體形成後直接運送到細胞膜上 (Tagawa et al., 2005)。Pol 等人發現膽固醇可以加速 caveolin-1 寡聚化 (Pol et al., 2005)，而 Cheng 等人則發現去除 glycosphingolipid 則會抑制 caveolin-1 寡聚化 (Cheng et al., 2006)，而我們的研究則發現 ABCA1 會調控 caveolin-1 寡聚化。另外，Scherer、Monier 及 Volonte 等人還分別發現 caveolin-1 會與 caveolin-2、VIP21 及 flotillin-1 結合形成異源寡聚體 (heterooligomer) (Monier et al., 1995; Scherer et al., 1997; Volonte et al.,

1999)，在我們的研究中，利用免疫沉澱法發現 ABCA1 會與 oligomer-caveolin-1 結合 (圖十五 C)，因此 ABCA1 也會與 caveolin-1 形成異源寡聚體。

九、ABCA1 調控 caveolin-1 寡聚化及離開高基氏體的可能機制

ABCA1 除了可以調控膽固醇釋出外，還被報導可以調控細胞內胞飲作用 (endocytosis) (Zha et al., 2001)、胞噬作用 (phagocytosis) (Hamon et al., 2000)、高基氏體到細胞膜的小胞囊運送 (Zha et al., 2003)、將細胞膜內葉的 phosphatidylserine 翻轉到外葉 (Alder-Baerens et al., 2005; Hamon et al., 2000)，ABCA1 自身形成寡聚體且將附近細胞膜形成一個 apoAI 載脂蛋白質結合區域 (Denis et al., 2004) 等功能。這些研究都顯示出 ABCA1 可能可以改變膜的脂質構造或是特性，因此我們推測 ABCA1 可能藉由改變高基氏體的膜構造，使其聚集膽固醇及鞘磷脂來形成 caveolae 的膜結構，而加速 caveolin-1 寡聚化的形成，但此推測還需要更多實驗驗證。

而我們的研究還發現處理高密度脂蛋白質 5~15 分鐘會先升高 ABCA1 的表現來幫助生成 oligomer-caveolin-1，30~180 分鐘後，ABCA1 逐漸減少而回到處理高密度脂蛋白質前的基本值，但 oligomer-caveolin-1

還是維持高表現的情形 (圖十七、十八)，因此推測 ABCA1 只是幫助 caveolin-1 寡聚化的形成，但 oligomer-caveolin-1 一旦形成後，則不需要 ABCA1 來協助其穩定性。而 oligomer-caveolin-1 的穩定表現與 caveolin-1 蛋白質的半衰期長 (8~10 小時) 可能也有極高的關係 (Conrad et al., 1995)。

我們還發現，ABCA1 會與 oligomer-caveolin-1 及 monomer-caveolin-1 有交互作用，但 ABCA1 調控 caveolin-1 寡聚化是否需要此蛋白質間交互作用還不清楚。我們使用一種 ABCA1 的抑制劑，glyburide，發現並不會抑制 caveolin-1 與 ABCA1 間交互作用 (圖二十六 B)，且不會抑制 caveolin-1 寡聚化 (圖二十七)，而在 O'Connell 等人的研究中更加驗證 glyburide 不會抑制內皮細胞的膽固醇釋出 (O'Connell et al., 2004)，故我們推測 ABCA1 與 caveolin-1 間的交互作用可能對於 ABCA1 調控 caveolin-1 寡聚化及調控膽固醇釋出有密切的關係。而 ABCA1 在高基氏體調控完 caveolin-1 寡聚化為何還要與 oligomer-caveolin-1 一同移動到細胞膜上？根據先述的推論，ABCA1 只是幫助 caveolin-1 寡聚化的形成，但 oligomer-caveolin-1 一旦形成後，則不需要 ABCA1 來協助其穩定性，因此 oligomer-caveolin-1 離開高基氏體運送到細胞膜上似乎不需要 ABCA1 的幫助，但免疫螢光染色法卻觀察到 ABCA1 與 caveolin-1

一同離開高基氏體運送到細胞膜上 (圖二十 A~I)，是否 ABCA1 還有其他功能，尚待更多實驗作進一步的探討。

十、高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質能刺激內皮細胞膽固醇釋出

在我們的研究中發現，只有高密度脂蛋白質而非 apoAI 載脂蛋白質或是 BSA 可以幫助內皮細胞膽固醇釋出 (圖十三 C)，此結果符合先前 O'Connell 等人於內皮細胞的研究 (O'Connell et al., 2004)。高密度脂蛋白質被報導可藉由 SR-BI 或是未知的蛋白質作為接受器來幫助膽固醇釋出 (Martinez et al., 2004)，本實驗室先前的研究指出餵食膽固醇的內皮細胞經過高密度脂蛋白質培養後，會顯著表現 SR-BI 蛋白質 (Yeh et al., 2002)，但未進一步驗證 SR-BI 是否在 caveolae 中。此外利用電子顯微鏡及免疫螢光顯微鏡的確觀察到高密度脂蛋白質位於內皮細胞的 caveolae 中幫助膽固醇釋出 (Chao et al., 2003)。另一方面，apoAI 載脂蛋白質被報導需要結合到 ABCA1 上才能刺激細胞膽固醇釋出 (Singaraja et al., 2006; Vedhachalam et al., 2007)，但相較於平滑肌細胞及纖維母細胞，內皮細胞的 ABCA1 表現量較低 (Fielding et al., 2000)，雖然在處理膽固醇後，ABCA1 的表現量會增加 (Chao et al., 2005; Liao et al., 2002)，但在本研究中發現細胞餵食膽固醇後，ABCA1 多分佈在高基

氏體而非細胞膜上 (圖二十 A~C)，因此 ABCA1 在內皮細胞中可能不像其他種類細胞在細胞膜上扮演 apoAI 載脂蛋白質接受器的角色，而是在內皮細胞中負責調控其他路徑的膽固醇運送，也可能因為內皮細胞缺少細胞膜上的接受器，所以 apoAI 載脂蛋白質無法結合到細胞上來刺激膽固醇釋出。

十一、高密度脂蛋白質快速幫助膽固醇釋出的可能機制：PKC 路徑

先前的研究發現高密度脂蛋白質會結合到細胞上並在 30 分鐘內回到培養液中完成一次膽固醇釋出的循環 (Oram et al., 1987)，因此高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出應該在短時間內就完成。在我們的研究中發現，在加入高密度脂蛋白質的前 30 分鐘，膽固醇釋出非常快速，到 60 分鐘時已到達釋出飽和值 (圖十八 D)。但高密度脂蛋白質是藉由何種機制來快速幫助膽固醇的釋出呢？先前報導指出高密度脂蛋白質會藉由快速提高 Protein kinase C (PKC) 的活性來幫助細胞內膽固醇運送到細胞膜上而進行膽固醇釋出 (Mendez et al., 1991)。Yamauchi 等人則發現活化 PKC 可使 ABCA1 磷酸化而使其穩定不容易被降解，進而維持高的蛋白質量 (Arakawa et al., 2000; Yamauchi et al., 2004; Yamauchi et al., 2003)。我們利用西方點墨法分析處理處理 PKC 路徑的抑制劑，

sphingosine，是否能抑制高密度脂蛋白質所增加的 ABCA1 蛋白質表現 (圖二十八)，結果顯示高密度脂蛋白質於 5~15 分鐘時能升高控制組細胞的 ABCA1 蛋白質表現，但處理 sphingosine 後，高密度脂蛋白質無法升高 ABCA1 蛋白質表現量，此結果顯示高密度脂蛋白質會藉由 PKC 路徑來增加 ABCA1 蛋白質表現。在此過程中，sphingosine 是否會阻止高密度脂蛋白質增加 ABCA1 mRNA 表現量，或抑制 caveolin-1 的寡聚化及離開高基氏體尚待進一步證實。

十二、Caveolin-1 與 ABCA1 結合是否需有其他蛋白質的幫助

我們利用免疫沉澱法觀察到 caveolin-1 與 ABCA1 間會有交互作用 (圖五 A)，但是與 caveolin-1 結合的 ABCA1 較 ABCA1 總表現量少，與 ABCA1 結合的 caveolin-1 也比 caveolin-1 總表現量少，雖然在免疫螢光染色圖中觀察到 caveolin-1 會與 ABCA1 共同分佈在高基氏體及細胞膜上 (圖九)，但還是有許多 caveolin-1 或是 ABCA1 獨立分佈的訊號 (圖九 D1)，因此並非所有 caveolin-1 與 ABCA1 都會互相結合。除了調控膽固醇運送及釋出外，Caveolin-1 蛋白質與 ABCA1 蛋白質還被報導有許多其他的功能，例如訊息傳遞、腫瘤抑制、發炎反應等 (Alder-Baerens et al., 2005; Fielding and Fielding, 2000; Frank et al., 2001; Galbiati et al.,

2001; Hamon et al., 2000)。

在內皮細胞的膽固醇運送機制中需要 caveolin-1 與 ABCA1 的結合，但是否還需要其他蛋白質的幫助，是另外一個值得探討的問題。要回答此問題，首先要瞭解 caveolin-1 與 ABCA1 的結合是直接結合或是兩者間需要其他蛋白質的間接結合，利用免疫沉澱法只能萃取出與 caveolin-1 結合或與 ABCA1 結合的蛋白質複合體，此複合體內可能包含其他未知蛋白質，最常利用來檢測蛋白質是否為直接結合的方法則是以純化後蛋白質放入試管中，使用 pull down 分析法分析兩個蛋白質間是否為直接交互作用 (Yao et al., 2005)。我們利用 HEK 293T 細胞大量表現 caveolin-1-*myc*-His 蛋白質及 ABCA1-flag 蛋白質，再分別利用 Ni-NTA 親合性管柱及 anti-flag agarose 純化出兩種純化蛋白質 (圖六、七)，利用 pull down 測試法推測 caveolin-1 會與 ABCA1 蛋白質直接結合 (圖八)。未來如要探討 caveolin-1 與 ABCA1 這個蛋白質複合體共同運輸膽固醇是否有其他蛋白質參與其中，除了利用免疫沉澱法將與 caveolin-1 及 ABCA1 結合的蛋白質複合體沉降下來，再利用二維電泳法分析有何種蛋白質參與在其中外，另一種方法是研究與 caveolin-1 及 ABCA1 都有交互作用的蛋白質，這些蛋白質有可能與 caveolin-1、ABCA1 共同運送膽固醇。與 caveolin-1 結合的蛋白質被研究的較多 (Liu et al., 2002) (附

表二)’,而與 ABCA1 結合的蛋白質則最近才開始有報導出來 (Bared et al., 2004; Okuhira et al., 2005) (附表三)。比對附表二及附表三的資料，結果發現唯一與 caveolin-1、ABCA1 都有交互作用的蛋白質即為 flotillin-1。Volonte 等人最早發現 flotillin-1 會與 caveolin-1 結合形成異源寡聚體，並幫助形成 caveolae 結構 (Volonte et al., 1999)。Glebov 等人後來利用免疫電子顯微鏡觀察到 flotillin-1 與 caveolin-1 共同分佈在 caveolae 結構中 (Glebov et al., 2006)。另一方面，Bared 等人則發現 flotillin-1 會與 ABCA1 有交互作用並且分佈在不溶於界面活性劑的細胞區域，且此 flotillin-1 與 ABCA1 的交互作用與 ABCA1 所調控的膽固醇釋出有關 (Bared et al., 2004)。因此，依照目前文獻報導，flotillin-1 極有可能作為 caveolin-1 與 ABCA1 間交互作用的另一蛋白質，但其功能仍有待探討。至於 caveolin-1 與 ABCA1 相互間結合的位置為何呢？Couet 等人利用噬菌體展示(phage display) 技術找到了 caveolin-1 binding motif： $\varphi X\varphi XXXX\varphi$ 和 $\varphi XXXX\varphi XX\varphi$ ，也可以是兩者結合形式： $\varphi X\varphi XXXX\varphi XX\varphi$ ，其中 φ 代表芳香環氨基酸(色氨酸 Trp、苯丙氨酸 Phe 或酪氨酸 Tyr)，X 為任意氨基酸 (Couet et al., 1997)。而 ABCA1 蛋白質上面富含此種 caveolin-1 binding motif，推測可能會藉由此 motif 與 caveolin-1 結合，但還須實驗驗證。未來我們將建構剔除 caveolin-1 不同片段的重組質體，並轉殖進 HEK

293T 細胞中表現且純化出其蛋白質，並找出 caveolin-1 與 ABCA1 結合的位點。

十三、Caveolin-1 與 ABCA1 共同幫助膽固醇釋出的重要性

若扣除擴散作用所導致的膽固醇釋出 (BSA 處理組)，我們利用轉殖 RNAi 降低 90 % caveolin-1 的表現會減少約 74 % 的膽固醇釋出 (圖一 C~D)，降低 70 % 的 ABCA1 表現會減少約 45 % 的膽固醇釋出 (圖十三)，由此可見 caveolin-1 與 ABCA1 在內皮細胞總膽固醇釋出中佔極大比例。而處理 progesterone、brefeldin A 及 monensin 會破壞 caveolin-1 與 ABCA1 間的交互作用，並且減少約 51 % 的膽固醇運送到細胞膜上，減少約 43 % 的高密度脂蛋白質所調控的膽固醇釋出 (圖十二)，處理 glyburide 無法破壞 caveolin-1 與 ABCA1 間的交互作用 (圖二十六 B)，O'Connell 等人的研究中也驗證 glyburide 不會抑制內皮細胞的膽固醇釋出 (O'Connell et al., 2004)，從這些結果也顯示出 caveolin-1 與 ABCA1 間的交互作用與內皮細胞的膽固醇釋出有密切的關係。

Robenek 與 Schmitz 發現 Tangier disease 病人的細胞中，高基氏體會不正常膨大且累積許多胞囊在附近而無法運送到細胞膜上，推測 Tangier disease 病人的細胞，其高基氏體與細胞膜間胞囊運送出問題 (Robenek

and Schmitz, 1991)。Orso 等人發現在 Tangier disease 病人細胞及 ABCA1 剔除鼠細胞中，caveolin-1 會停留在高基氏體且細胞內脂質會無法運送到細胞膜上，推測正常功能的 ABCA1 可能可以幫助 caveolin-1 及脂質從高基氏體運送到細胞膜上幫助膽固醇釋出 (Orso et al., 2000)。我們利用動脈內皮細胞為研究材料，發現降低 ABCA1 表現的確會使 caveolin-1 停留在高基氏體 (圖十四)，且更進一步發現 ABCA1 會藉由調控 caveolin-1 寡聚化來幫助 caveolin-1 離開高基氏體 (圖十五)，因此 caveolin-1 寡聚化可能在 Tangier disease 中扮演重要的角色，但未來還需要實驗驗證。

我們更發現高密度脂蛋白質在高膽固醇的細胞中會升高 ABCA1 的表現來幫助 caveolin-1 寡聚化並離開高基氏體共同運送膽固醇並釋出給高密度脂蛋白質，此路徑在本實驗的狀況下約 30~60 分鐘內即可完成。因為內皮細胞在動脈壁的最內層，會持續接觸血液中的高密度脂蛋白質，因此可能可以藉由上述機制快速幫助膽固醇釋出，而較不容易在細胞內累積過多的膽固醇，此機制在巨噬細胞及平滑肌細胞中是何種情況，值得進一步探討。

此研究有助於釐清 caveolin-1 與 ABCA1 互相幫助調節內皮細胞膽固醇釋出的機制，而對於動脈硬化的形成機制也有更進一步的瞭解。

参考文献

- Alder-Baerens, N., Muller, P., Pohl, A., Korte, T., Hamon, Y., Chimini, G., Pomorski, T., and Herrmann, A. (2005). Headgroup-specific exposure of phospholipids in ABCA1-expressing cells. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26321-26329.
- Anderson, R.G.W. (1998). The caveolae membrane system. *Annual Review of Biochemistry* 67, 199-225.
- Arakawa, R., Abe-Dohmae, S., Asai, M., Ito, J., and Yokoyama, S. (2000). Involvement of caveolin-1 in cholesterol enrichment of high density lipoprotein during its assembly by apolipoprotein and THP-1 cells. *Journal of Lipid Research* 41, 1952-1962.
- Arakawa, R., and Yokoyama, S. (2002). Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 22426-22429.
- Arbuzova, A., Wang, L.B., Wang, J.Y., Hangyas-Mihalyne, G., Murray, D., Honig, B., and McLaughlin, S. (2000). Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry* 39, 10330-10339.

- Assmann, G., Carmena, R., Cullen, P., Fruchart, J.C., Jossa, F., Lewis, B., Mancini, M., Paoletti, R., and Coronary, I.T.F.P. (1999). Coronary heart disease: Reducing the risk - A worldwide view. *Circulation* *100*, 1930-1938.
- Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G.W., Xu, S.Z., and Krieger, M. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 13242-13249.
- Bared, S.M., Buechler, C., Boettcher, A., Dayoub, R., Sigruener, A., Grandl, M., Rudolph, C., Dada, A., and Schmitz, G. (2004). Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in Tangier cells. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 5399-5407.
- Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, T., Langmann, T., Bottcher, L., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., *et al.* (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature Genetics* *22*, 347-351.
- Boyle, E.M., Lille, S.T., Allaire, E., Clowes, A.W., and Verrier, E.D. (1997). Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: Atherosclerosis. *Annals of Thoracic Surgery* *63*, 885-894.

- Briand, O., Lestavel, S., Pilon, A., Torpier, G., Fruchart, J.C., and Clavey, V. (2003). SR-BI does not require raft/caveola localisation for cholesteryl ester selective uptake in the human adrenal cell line NCI-H295R. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1631, 42-50.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O.F., *et al.* (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature Genetics* 22, 336-345.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1976). Receptor-mediated control of cholesterol-metabolism. *Science* 191, 150-154.
- Chao, W.T., Fan, S.S., Chen, J.K., and Yang, V.C. (2003). Visualizing caveolin-1 and HDL in cholesterol-loaded aortic endothelial cells. *Journal of Lipid Research* 44, 1094-1099.
- Chao, W.T., Tsai, 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332, 743-749.
- Chen, W.G., Silver, D.L., Smith, J.D., and Tall, A.R. (2000). Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1-mediated

- cholesterol efflux in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 275, 30794-30800.
- Chen, Y.L., Jan, K.M., Lin, H.S., and Chien, S. (1997). Relationship between endothelial cell turnover and permeability to horseradish peroxidase. *Atherosclerosis* 133, 7-14.
- Cheng, Z.J., Singh, R.D., Sharma, D.K., Holicky, E.L., Hanada, K., Marks, D.L., and Pagano, R.E. (2006). Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Molecular Biology of the Cell* 17, 3197-3210.
- Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDennott-Roe, C., Poston, R., and McGregor, J.L. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 75, 468-477.
- Conrad, P.A., Smart, E.J., Ying, Y.S., Anderson, R.G.W., and Bloom, G.S. (1995). Caveolin cycles between plasma-membrane caveolae and the Golgi-complex by microtubule-dependent and microtubule-independent Steps. *Journal of Cell Biology* 131, 1421-1433.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *Journal of Biological Chemistry* 275, 28240-28245.
- Couet, J., Li, S.W., Okamoto, T., Ikezu, T., and Lisanti, M.P. (1997).

Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain - Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *Journal of Biological Chemistry* 272, 6525-6533.

de la Llera-Moya Margarita, C.M., Drazul D, Klein SM, Favari E, Yancey PG, Williams DL, Rothblat GH (2001). Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *Journal of lipid research* 42, 1969-1978.

Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* 42, 1007-1017.

Denis, M., Haidar, B., Marcil, M., Bouvier, M., Krimbou, L., and Genest, J. (2004). Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1 - Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. *Journal of Biological Chemistry* 279, 41529-41536.

Dietzen, D.J., Hastings, W.R., and Lublin, D.M. (1995). Caveolin Is palmitoylated on multiple cysteine residues - palmitoylation is not necessary for Localization of Caveolin to Caveolae. *Faseb Journal* 9, A1475-A1475.

- Diglio, C.A., Grammas, P., Giacomelli, F., and Wiener, J. (1989). Angiogenesis in rat aorta ring explant cultures. *Laboratory Investigation* 60, 523-531.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., *et al.* (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449-2452.
- Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurzchalia, T.V., and Simons, K. (1993). Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial-cells. *Embo Journal* 12, 1597-1605.
- Engelman, J.A., Wykoff, C.C., Yasuhara, S., Song, K.S., Okamoto, T., and Lisanti, M.P. (1997). Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *Journal of Biological Chemistry* 272, 16374-16381.
- Faggiotto, A., Ross, R., and Harker, L. (1984). Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate .1. changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 4, 323-340.
- Fielding, C.J., and Fielding, P.E. (1995a). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research* 36, 211-228.
- Fielding, C.J., and Fielding, P.E. (2000). Cholesterol and caveolae: structural

and functional relationships. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1529, 210-222.

Fielding, C.J., and Fielding, P.E. (2001). Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Advanced Drug Delivery Reviews* 49, 251-264.

Fielding, P.E., and Fielding, C.J. (1995b). Plasma-membrane caveolae mediate the efflux of cellular free-cholesterol. *Biochemistry* 34, 14288-14292.

Fielding, P.E., Nagao, K., Hakamata, H., Chimini, G., and Fielding, C.J. (2000). A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1. *Biochemistry* 39, 14113-14120.

Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K., and Parton, R.G. (1995). De-Novo Formation of caveolae in lymphocytes by expression of Vip21-caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8655-8659.

Francis, G.A., and Perry, R.J. (1999). Targeting HDL-mediated cellular cholesterol efflux for the treatment and prevention of atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 286, 219-230.

Frangos, J.A., Eskin, S.G., Mcintire, L.V., and Ives, C.L. (1985). Flow

effects on prostacyclin production by cultured human-endothelial cells. *Science* 227, 1477-1479.

Frank, P.G., Cheung, M.W.C., Pavlides, S., Llaverias, G., Park, D.S., and Lisanti, M.P. (2006). Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 291, H677-H686.

Frank, P.G., Galbiati, F., Volonte, D., Razani, B., Cohen, D.E., Marcel, Y.L., and Lisanti, M.P. (2001). Influence of caveolin-1 on cellular cholesterol efflux mediated by high-density lipoproteins. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 280, C1204-C1214.

Frank, P.G., Marcel, Y.L., Connelly, M.A., Lublin, D.M., Franklin, V., Williams, D.L., and Lisanti, M.P. (2002). Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. *Biochemistry* 41, 11931-11940.

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. *Journal of Biological Chemistry* 279, 14140-14146.

Fujimoto, T., Kogo, H., Nomura, R., and Une, T. (2000). Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *Journal of Cell Science* 113, 3509-3517.

- Galbiati, F., Engelman, J.A., Volonte, D., Zhang, X.L., Minetti, C., Li, M.M., Hou, H., Kneitz, B., Edelmann, W., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and T-tubule abnormalities. *Journal of Biological Chemistry* 276, 21425-21433.
- Gargalovic, P., and Dory, L. (2003). Caveolins and macrophage lipid metabolism. *Journal of Lipid Research* 44, 11-21.
- Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 26, 534-540.
- Gennaro, G., Menard, C., Michaud, S.E., Deblois, D., and Rivard, A. (2004). Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation in injured arteries by a novel, oral mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase inhibitor. *Circulation* 110, 3367-3371.
- Glass, C.K., and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* 104, 503-516.
- Glebov, O.O., Bright, N.A., and Nichols, B.J. (2006). Flotillin-1 defines a

clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature Cell Biology* 8, 46-U16.

Glenney, J.R., and Soppet, D. (1992). Sequence and expression of caveolin, a protein-component of caveolae plasma-membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous-Sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10517-10521.

Glenney, J.R., and Zokas, L. (1989). Novel tyrosine kinase substrates from Rous-Sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *Journal of Cell Biology* 108, 2401-2408.

Guendouzi, K., Collet, X., Perret, B., Chap, H., and Barbaras, R. (1998). Remnant high density lipoprotein(2) particles produced by hepatic lipase display high-affinity binding and increased endocytosis into a human hepatoma cell line (HEPG(2)). *Biochemistry* 37, 14974-14980.

Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M.F., Toti, F., Chaslin, S., Freyssinet, J.M., Devaux, P.F., McNeish, J., Marguet, D., *et al.* (2000). ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nature Cell Biology* 2, 399-406.

Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., and Stanley, K.K. (1988). Surface location and high-affinity for calcium of a 500-Kd

liver membrane-protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological-role as lipoprotein receptor. *Embo Journal* 7, 4119-4127.

Hu, B., Li, D.Y., Sawamura, T., and Mehta, J.L. (2003). Oxidized LDL through LOX-1 modulates LDL-receptor expression in human coronary artery endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307, 1008-1012.

Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M.D.L.L., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Swaney, J.B., and Tall, A.R. (1997). Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry* 272, 20982-20985.

Jian, B., de la Llera-Moya, M., Ji, Y., Wang, N., Phillips, M.C., Swaney, J.B., Tall, A.R., and Rothblat, G.H. (1998). Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *Journal of Biological Chemistry* 273, 5599-5606.

Johansson, J., Carlson, L.A., Landou, C., and Hamsten, A. (1991). High-density-lipoproteins and coronary atherosclerosis - a strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 11, 174-182.

- Kannel, W.B., Wilson, P., and Blair, S.N. (1985). Epidemiological assessment of the role of physical-activity and fitness in development of cardiovascular-disease. *American Heart Journal* *109*, 876-885.
- Kao, C.H., Chen, J.K., Kuo, J.S., and Yang, V.C. (1995). Visualization of the transport pathways of low-density lipoproteins across the endothelial-cells in the branched regions of rat arteries. *Atherosclerosis* *116*, 27-41.
- Kao, C.H., Chen, J.K., and Yang, V.C. (1994). Ultrastructure and permeability of endothelial-cells in branched regions of rat arteries. *Atherosclerosis* *105*, 97-114.
- Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Connelly, M.A., Stoudt, G., Christian, A.E., Haynes, M.P., Williams, D.L., and Rothblat, G.H. (2000). Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. *Biochemistry* *39*, 221-229.
- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldan, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., and Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metabolism* *1*, 121-131.
- Kirkham, M., Fujita, A., Chadda, R., Nixon, S.J., Kurzchalia, T.V., Sharma, D.K., Pagano, R.E., Hancock, J.F., Mayor, S., and Parton, R.G. (2005).

- Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *Journal of Cell Biology* *168*, 465-476.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G., and Lippincottschwartz, J. (1992). Brefeldin-a - Insights into the Control of Membrane Traffic and Organelle Structure. *Journal of Cell Biology* *116*, 1071-1080.
- Klucken, J., Buchler, C., Orso, E., Kaminski, W.E., Porsch-Ozcurumez, M., Liebisch, C., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., *et al.* (2000). ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 817-822.
- Kurzchalia, T.V., Dupree, P., Parton, R.G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M., and Simons, K. (1992). Vip21, a 21-Kd Membrane-Protein Is an Integral Component of Trans-Golgi-Network-Derived Transport Vesicles. *Journal of Cell Biology* *118*, 1003-1014.
- Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M.F., Chimini, G., Kaminski, W.E., and Schmitz, G. (1999). Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): Evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *257*, 29-33.

- Lawn, R.M., Wade, D.P., Couse, T.L., and Wilcox, J.N. (2001). Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 21, 378-385.
- Lawn, R.M., Wade, D.P., Garvin, M.R., Wang, X.B., Schwartz, K., Porter, J.G., Seilhamer, J.J., Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (1999). The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *Journal of Clinical Investigation* 104, R25-R31.
- Le Goff, W., Peng, D.Q., Settle, M., Brubaker, G., Morton, R.E., and Smith, J.D. (2004). Cyclosporin A traps ABCA1 at the plasma membrane and inhibits ABCA1-mediated lipid efflux to apolipoprotein A-I. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 24, 2155-2161.
- Lee, M.H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H.W., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Allikmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R., *et al.* (2001). Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nature Genetics* 27, 79-83.
- Li, S.W., Seitz, R., and Lisanti, M.P. (1996). Phosphorylation of caveolin by Src tyrosine kinases - The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 271,

3863-3868.

- Li, W.P., Liu, P.S., Pilcher, B.K., and Anderson, R.G.W. (2001). Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *Journal of Cell Science* *114*, 1397-1408.
- Liao, H.L., Langmann, T., Schmitz, G., and Zhu, Y. (2002). Native LDL upregulation of ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* *22*, 127-132.
- Lin, Y.C., Ma, C., Hsu, W.C., Lo, H.F., and Yang, V.C. (2007). Molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 on high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. *Cardiovascular Research* *75*, 575-583.
- Ling, V. (1997). Multidrug resistance: Molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* *40*, S3-S8.
- Liu, P.S., Li, W.P., Machleidt, T., and Anderson, R.G.W. (1999). Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. *Nature Cell Biology* *1*, 369-375.
- Liu, P.S., Rudick, M., and Anderson, R.G.W. (2002). Multiple functions of caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 41295-41298.
- Luciani, M.F., Denizot, F., Savary, S., Mattei, M.G., and Chimini, G. (1994).

Cloning of 2 Novel Abc Transporters Mapping on Human-Chromosome-9. *Genomics* 21, 150-159.

Luetterforst, R., Stang, E., Zorzi, N., Carozzi, A., Way, M., and Parton, R.G. (1999). Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: Identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule. *Journal of Cell Biology* 145, 1443-1459.

Machleidt, T., Li, W.P., Liu, P.S., and Anderson, R.G.W. (2000). Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic. *Journal of Cell Biology* 148, 17-28.

Martinez, L.O., Jacquet, S., Terce, F., Collet, X., Perret, B., and Barbaras, R. (2004). New insight on the molecular mechanisms of high-density lipoprotein cellular interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 2343-2360.

Matveev, S., Uittenbogaard, A., van der Westhuyzen, D., and Smart, E.J. (2001). Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester. *European Journal of Biochemistry* 268, 5609-5616.

Maxfield, F.R., and Wustner, D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *Journal of Clinical Investigation* 110, 891-898.

Mazzone, T., Krishna, M., and Lange, Y. (1995). Progesterone blocks

intracellular translocation of free-cholesterol derived from cholesteryl ester in macrophages. *Journal of Lipid Research* 36, 544-551.

Mendez, A.J., Lin, G.R., Wade, D.P., Lawn, R.M., and Oram, J.F. (2001). Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276, 3158-3166.

Mendez, A.J., Oram, J.F., and Bierman, E.L. (1991). Protein-kinase-C as a mediator of high-density-lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* 266, 10104-10111.

Mollenhauer, H.H., Morre, D.J., and Rowe, L.D. (1990). Alteration of intracellular traffic by monensin - mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1031, 225-246.

Monier, S., Parton, R.G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., and Kurzchalia, T.V. (1995). Vip21-caveolin, a membrane-protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in-vivo and in-vitro. *Molecular Biology of the Cell* 6, 911-927.

Morre, D.J., Boss, W.F., Grimes, H., and Mollenhauer, H.H. (1983). Kinetics of Golgi-apparatus membrane flux following monensin treatment of embryogenic carrot cells. *European Journal of Cell Biology* 30, 25-32.

- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., and Simons, K. (1995). Vip21/Caveolin Is a Cholesterol-Binding Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 10339-10343.
- Nagornev, V.A., and Rabinovich, V.S. (1998). Can endothelial cells accumulate lipids? *Atherosclerosis* *136*, 197-198.
- Neufeld, E.B., Remaley, A.T., Demosky, S.J., Stonik, J.A., Cooney, A.M., Comly, M., Dwyer, N.K., Zhang, M., Blanchette-Mackie, J., Santamarina-Fojo, S., *et al.* (2001). Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 27584-27590.
- Neufeld, E.B., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Knapper, C.L., Combs, C.A., Cooney, A., Comly, M., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Remaley, A.T., *et al.* (2004). The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking - Insights from the correction of the genetic defect in Tangier Disease. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 15571-15578.
- Niki, E. (2004). Antioxidants and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions* *32*, 156-159.
- O'Connell, B.J., Denis, M., and Genest, J. (2004). Cellular physiology of cholesterol efflux in vascular endothelial cells. *Circulation* *110*,

2881-2888.

- Okuhira, K., Fitzgerald, M.L., Sarracino, D.A., Manning, J.J., Bell, S.A., Goss, J.L., and Freeman, M.W. (2005). Purification of ATP-binding cassette transporter A1 and associated binding proteins reveals the importance of beta 1-syntrophin in cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry* 280, 39653-39664.
- Oram, J.F. (2002a). ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Current Opinion in Lipidology* 13, 373-381.
- Oram, J.F. (2002b). Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends in Molecular Medicine* 8, 168-173.
- Oram, J.F., Brinton, E.A., and Bierman, E.L. (1983). Regulation of high-density lipoprotein receptor activity in cultured human-skin fibroblasts and human arterial smooth-muscle cells. *Journal of Clinical Investigation* 72, 1611-1621.
- Oram, J.F., Johnson, C.J., and Brown, T.A. (1987). Interaction of high-density-lipoprotein with its receptor on cultured fibroblasts and macrophages - Evidence for reversible binding at the cell-surface without internalization. *Journal of Biological Chemistry* 262, 2405-2410.

- Orso, E., Broccardo, C., Kaminski, W.E., Bottcher, A., Liebisch, G., Drobnik, W., Gotz, A., Chambenoit, O., Diederich, W., Langmann, T., *et al.* (2000). Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abcl1-deficient mice. *Nature Genetics* *24*, 192-196.
- Osborne, T.F. (2001). CREating a SCAP-less liver keeps SREBPs pinned in the ER membrane and prevents increased lipid synthesis in response to low cholesterol and high insulin. *Genes & Development* *15*, 1873-1878.
- Palade, G.E. (1953). Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* *24*, 1424.
- Parton, R.G., Hanzal-Bayer, M., and Hancock, J.F. (2006). Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *Journal of Cell Science* *119*, 787-796.
- Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *8*, 185-194.
- Patel, V.I., Daniel, S., Longo, C.R., Shrikhande, G.V., Scali, S.T., Czismadia, E., Groft, C.M., Shukri, T., Motley-Dore, C., Ramsey, H.E., *et al.* (2006). A20, a modulator of smooth muscle cell proliferation and apoptosis, prevents and induces regression of neointimal hyperplasia. *Faseb Journal* *20*, 1418-1430.

- Peng (2004). Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 384-396.
- Pol, A., Martin, S., Fernandez, M.A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C., and Parton, R.G. (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Molecular Biology of the Cell* *16*, 2091-2105.
- Rao, R.M., Yang, L., Garcia-Cardena, G., and Luscinskas, F.W. (2007). Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circulation Research* *101*, 234-247.
- Razani, B., Wang, X.B., Engelman, J.A., Battista, M., Lagaud, G., Zhang, X.L., Kneitz, B., Hou, H., Christ, G.J., Edelmann, W., *et al.* (2002). Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 2329-2344.
- Reaven, E., Tsai, L., and Azhar, S. (1996). Intracellular events in the "selective" transport of lipoprotein-derived cholesteryl esters. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 16208-16217.

- Ren, X.Y., Ostermeyer, A.G., Ramcharan, L.T., Zeng, Y.C., Lublin, D.M., and Brown, D.A. (2004). Conformational defects slow Golgi exit, block oligomerization, and reduce raft affinity of caveolin-1 mutant proteins. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 4556-4567.
- Robenek, H., and Schmitz, G. (1991). Abnormal processing of Golgi elements and lysosomes in Tangier disease. *Arteriosclerosis and Thrombosis* *11*, 1007-1020.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American Heart Journal* *138*, S419-S420.
- Rothblat GH, B.M., Phillips MC. (1986). Reverse cholesterol transport. In: Albers J, Segrest J, eds. . *Methods in Enzymology* *129*, 629-644.
- Ruetz, S., and Gros, P. (1994). Phosphatidylcholine translocase - a physiological-role for the *mdr2* gene. *Cell* *77*, 1071-1081.
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J.C., Deleuze, J.F., Brewer, H.B., Duverger, N., Deneffe, P., *et al.* (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature Genetics* *22*, 352-355.
- Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Tang, Z.L., Kubler, E., Song, K.S., Sanders, M.C., and Lisanti, M.P. (1995). Oligomeric structure of caveolin - Implications for caveolae membrane organization. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 92, 9407-9411.

Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z.L., and Lisanti, M.P. (1993). Signal-Transducing Molecules and Glycosyl-Phosphatidylinositol-Linked Proteins Form a Caveolin-Rich Insoluble Complex in Mdk Cells. *Journal of Cell Biology* 122, 789-807.

Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T., *et al.* (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386, 73-77.

Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D.S., vanDonselaar, E., Peters, P., and Lisanti, M.P. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2 - Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29337-29346.

Scherer, P.E., Okamoto, T., Chun, M.Y., Nishimoto, I., Lodish, H.F., and Lisanti, M.P. (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 131-135.

Schlegel, A., and Lisanti, M.P. (2000). A molecular dissection of caveolin-1

membrane attachment and oligomerization - Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 275, 21605-21617.

Schwartz, K., Lawn, R.M., and Wade, D.P. (2000). ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274, 794-802.

Sessa, W.C. (2005). Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 15-18.

Singaraja, R.R., Visscher, H., James, E.R., Chroni, A., Coutinho, J.M., Brunham, L.R., Kang, M.H., Zannis, V.I., Chimini, G., and Hayden, M.R. (2006). Specific mutations in ABCA1 have discrete effects on ABCA1 function and lipid phenotypes both in vivo and in vitro. *Circulation Research* 99, 389-397.

Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T., and Lisanti, M.P. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Molecular and Cellular Biology* 19, 7289-7304.

Smart, E.J., Ying, Y.S., Donzell, W.C., and Anderson, R.G.W. (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to

- plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* 271, 29427-29435.
- Smith, J.D. (2006). Insight into ABCG1-mediated cholesterol efflux. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 26, 1198-1200.
- Smith, J.D., Le Goff, W., Settle, M., Brubaker, G., Waelde, C., Horwitz, A., and Oda, M.N. (2004). ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *Journal of Lipid Research* 45, 635-644.
- Song, K.S., Tang, Z.L., Li, S.W., and Lisanti, M.P. (1997). Mutational analysis of the properties of caveolin-1 - A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin interactions. *Journal of Biological Chemistry* 272, 4398-4403.
- Stanley, J.R., Woodley, D.T., Katz, S.I., and Martin, G.R. (1982). Structure and function of basement-membrane. *Journal of Investigative Dermatology* 79, S69-S72.
- Storey, S.M., Gallegos, A.M., Atshaves, B.P., McIntosh, A.L., Martin, G.G., Parr, R.D., Landrock, K.K., Mer, A.B., Ball, J.M., and Schroeder, F. (2007). Selective cholesterol dynamics between lipoproteins and caveolae/lipid rafts. *Biochemistry* 46, 13891-13906.
- Sviridov, D., Fidge, N., Beaumier-Gallon, G., and Fielding, C. (2001). Apolipoprotein A-I stimulates the transport of intracellular cholesterol

- to cell-surface cholesterol-rich domains (caveolae). *Biochemical Journal* *358*, 79-86.
- Tagawa, A., Mezzacasa, A., Hayer, A., Longatti, A., Pelkmans, L., and Helenius, A. (2005). Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *Journal of Cell Biology* *170*, 769-779.
- Tahir, S.A., Ren, C.Z., Timme, T.L., Gdor, Y., Hoogeveen, R., Morrisett, J.D., Frolov, A., Ayala, G., Wheeler, T.M., and Thompson, T.C. (2003). Development of an immunoassay for serum caveolin-1: A novel biomarker for prostate cancer. *Clinical Cancer Research* *9*, 3653-3659.
- Tall, A.R. (1998). An overview of reverse cholesterol transport. *European Heart Journal* *19*, A31-A35.
- Tall, A.R., Costet, P., and Wang, N. (2002). Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *Journal of Clinical Investigation* *110*, 899-904.
- Tang, Z.L., Okamoto, T., Boontrakulpoontawee, P., Katada, T., Otsuka, A.J., and Lisanti, M.P. (1997). Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode *Caenorhabditis elegans* - Implications for the molecular evolution of mammalian caveolin genes. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 2437-2445.

- Tang, Z.L., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D.S., Nishimoto, I., Lodish, H.F., and Lisanti, M.P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *Journal of Biological Chemistry* 271, 2255-2261.
- Uittenbogaard, A., Ying, Y.S., and Smart, E.J. (1998). Characterization of a cytosolic heat-shock protein caveolin chaperone complex - Involvement in cholesterol trafficking. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6525-6532.
- Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2005). ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 280, 30150-30157.
- Vedhachalam, C., Ghering, A.B., Davidson, W.S., Lund-Katz, S., Rothblat, G.H., and Phillips, M.C. (2007). ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 27, 1603-1609.
- Volonte, D., Galbiati, F., Li, S.W., Nishiyama, K., Okamoto, T., and Lisanti, M.P. (1999). Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in

vivo - Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *Journal of Biological Chemistry* 274, 12702-12709.

Wang, L.B., Connelly, M.A., Ostermeyer, A.G., Chen, H.H., Williams, D.L., and Brown, D.A. (2003). Caveolin-1 does not affect SR-BI-mediated cholesterol efflux or selective uptake of cholesteryl ester in two cell lines. *Journal of Lipid Research* 44, 807-815.

Wang, N., Lan, D.B., Chen, W.G., Matsuura, F., and Tall, A.R. (2004). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9774-9779.

Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F., and Tall, A.R. (2006). LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 26, 1310-1316.

Wang, N., Silver, D.L., Costet, P., and Tall, A.R. (2000). Specific binding of apoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33053-33058.

- Wang, N., Silver, D.L., Thiele, C., and Tall, A.R. (2001). ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry* 276, 23742-23747.
- Wellington, C.L., Walker, E.K.Y., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R., Yang, Y.Z., Zhang, L.H., James, E., Wilson, J.E., *et al.* (2002). ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Laboratory Investigation* 82, 273-283.
- Wu, C.A., Tsujita, M., Hayashi, M., and Yokoyama, S. (2004). Probucol inactivates ABCA1 in the plasma membrane with respect to its mediation of apolipoprotein binding and high density lipoprotein assembly and to its proteolytic degradation. *Journal of Biological Chemistry* 279, 30168-30174.
- Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 445-458.
- Yamauchi, Y., Chang, C.C.Y., Hayashi, M., Abe-Dohmae, S., Reid, P.C., Chang, T.Y., and Yokoyama, S. (2004). Intracellular cholesterol mobilization involved in the ABCA1/apolipoprotein-mediated assembly of high density lipoprotein in fibroblasts. *Journal of Lipid Research* 45, 1943-1951.

- Yamauchi, Y., Hayashi, M., Abe-Dohmae, S., and Yokoyama, S. (2003). Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47890-47897.
- Yancey, P.G., Bortnick, A.E., Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (2003). Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 23, 712-719.
- Yancey, P.G., de la Llera-Moya, M., Swarnakar, S., Monzo, P., Klein, S.M., Connelly, M.A., Johnson, W.J., Williams, D.L., and Rothblat, G.H. (2000). High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *Journal of Biological Chemistry* 275, 36596-36604.
- Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: Sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489-500.

- Yao, Q., Chen, J., Cao, H., Orth, J.D., McCaffery, J.M., Stan, R.V., and McNiven, M.A. (2005). Caveolin-1 interacts directly with dynamin-2. *Journal of Molecular Biology* 348, 491-501.
- Yeh, Y.C., Hwang, G.Y., Liu, I.P., and Yang, V.C. (2002). Identification and expressions of scavenger receptor SR-BI in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in, vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 161, 95-103.
- Young, S.G., and Fielding, C.J. (1999). The ABCs of cholesterol efflux. *Nature Genetics* 22, 316-318.
- Zha, X.H., Gauthier, A., Genest, J., and McPherson, R. (2003). Secretory vesicular transport from the Golgi is altered during ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1)-mediated cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry* 278, 10002-10005.
- Zha, X.H., Genest, J., and McPherson, R. (2001). Endocytosis is enhanced in Tangier fibroblasts - Possible role of ATP-binding cassette protein A1 in endosomal vesicular transport. *Journal of Biological Chemistry* 276, 39476-39483.

附表一，人類四大種類脂蛋白的不同組成及功能 (Lodish H, 2004)。

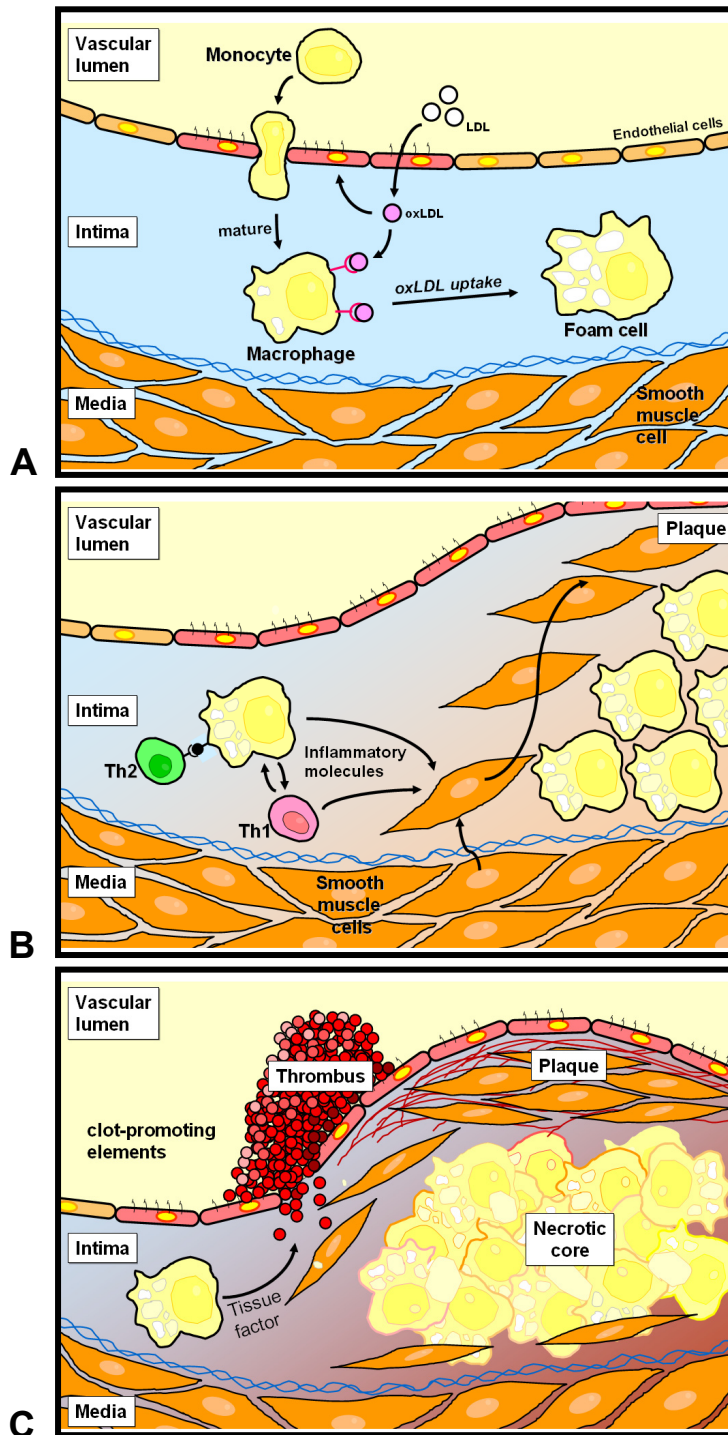
| Property | Chylomicron | VLDL | LDL | HDL |
|--|---|---|--|--|
| Mass , apporx.(kDa) | 50-1000 x 10 ³ | 10-80 x 10 ³ | 2.3 x 10 ³ | 0.175-0.360 x 10 ³ |
| Diameter (nm) | 75-1200 | 30-80 | 18-25 | 5-12 |
| Triglycerides (% of core lipid) | 97 | 75 | 12 | 11 |
| Cholesteryl esters (% of core lipids) | 3 | 25 | 88 | 89 |
| Protein: lipid mass ratio | 1:100 | 9:100 | 25:100 | 90:100 |
| Major apolipoproteins | A, B-48, C, E | B-100, C, E | B-100 | A, C |
| Major physiological function | Transports dietary triglyceride from intestines to extrahepatic tissues; Triglyceride-depleted remnants deliver dietary cholesterol and some triglycerides to the liver | Transports hepatic triglyceride to extrahepatic tissues; converted into LDL | Transports plasma cholesterol to liver and to extrahepatic tissues | Takes up cholesterol from extrahepatic tissues and delivers it to liver, steroid-producing tissues, and other lipoproteins |

附表二、與 caveolin-1 結合的蛋白 (Liu et al., 2002)

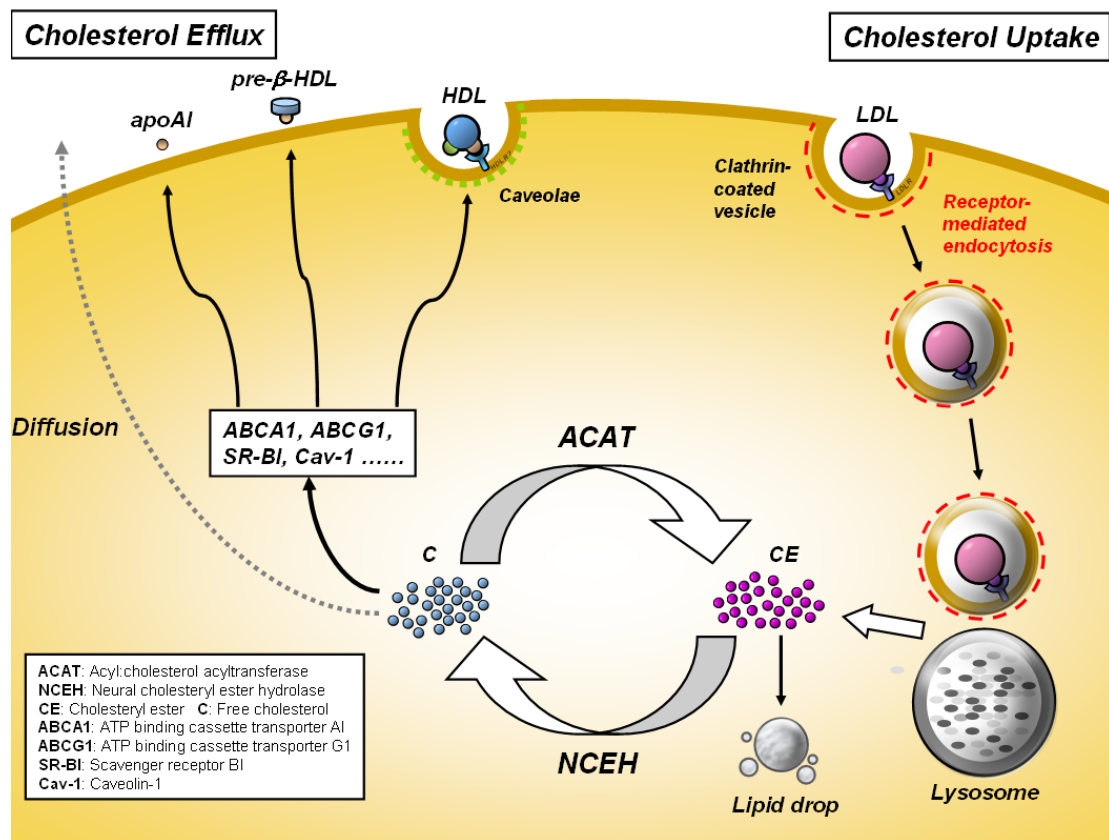
| Proteins | Interacting region of cav-1 | Detection method |
|--|-----------------------------|------------------|
| PDGFR α and β | 82-101 | IP |
| EGFR | 61-101 | IP |
| Insulin receptor | 81-101 | IP |
| TGF β RI | 61-101 | IP |
| TrkA/p75NTR | Whole protein | IP |
| Hedgehog receptor | 81-101 | IP |
| Estrogen receptor | 82-101 | IP |
| Androgen receptor | Whole protein | IP/two hybrid |
| H-Ras | 61-101 | GST |
| Gaq/Gao/Gas | Whole protein | GST |
| Adenylyl cyclase/PLC β 2 | 82-101 | IP |
| Trp1/IP3R/Gq11 | Whole protein | IP |
| c-Src | 61-101 | IP |
| Lyn | 81-101 | IP |
| Csk | PY14 | Two hybrid/IP |
| GRK1, 2 and 5 | 61-101 | IP |
| COX-2 | Whole protein | IP |
| PLD/PKC α | 82-101 | IP |
| PKA | 81-101 | IP |
| PKC ϵ | Whole protein | IP |
| Integrin/cortactin/Src | Whole protein | IP |
| Integrin(α , β)/Shc/Fyn | Whole protein | IP |
| UPAR/integrin β 1 | Whole protein | IP |
| eNOS | 82-101 | IP |
| nNOS | Whole protein | GST |
| Flotillin 1, 2/Cav-2 | Whole protein | IP |
| 190-kDa pY | Whole protein | IP |
| 30-kDa pY | Whole protein | IP |
| HSP56/cyc40/cycA | Whole protein | IP |
| Filamin | 1-101 | GST/2 hybrid |
| Grb7 | PY 14 | GST |
| Striatin/SG2NA/zinedin | Whole protein | IP/GST |
| Connexin 43 | 82-101 and 135-178 | IP |

附表三、與 ABCA1 結合的蛋白 (Bared et al., 2004; Okuhira et al., 2005)

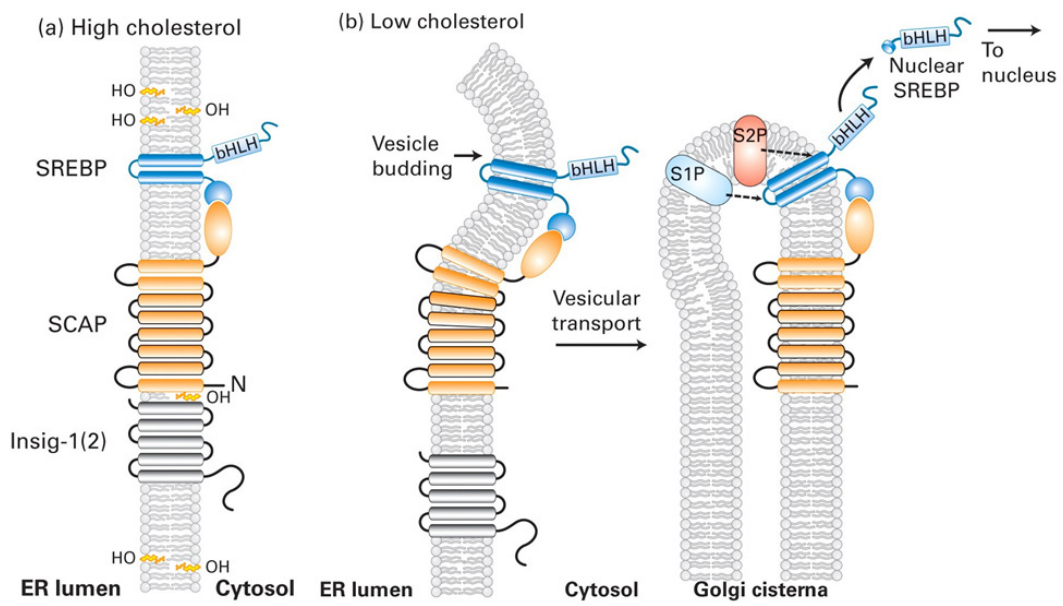
| Proteins | Interacting region of ABCA1 | Detection method |
|---|------------------------------------|-------------------------|
| Utrophin | Whole protein | IP |
| β 2 syntrophin | Whole protein | IP/Two hybrid |
| β 1 syntrophin | Whole protein | IP |
| β 1 dystrobrevin | Whole protein | IP |
| Mannosidase α 1B | Whole protein | IP |
| Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) | Whole protein | IP |
| α 1 syntrophin | Whole protein | IP |
| Ankyrin 3 | Whole protein | IP |
| NADH dehydrogenase | Whole protein | IP |
| Syntaxin 16 | Whole protein | IP |
| Syntaxin 4A | Whole protein | IP |
| Syntaxin 7 | Whole protein | IP |
| Fas-associated death domain | C-ter 40 amino acid | Two hybrid/IP |
| RET finger protein | C-ter 40 amino acid | Two hybrid |
| PRP8 splicing factor | C-ter 40 amino acid | Two hybrid |
| UDP-glucose pyrophosphorylase | C-ter 40 amino acid | Two hybrid |
| Succinate dehydrogenase | C-ter 40 amino acid | Two hybrid |
| Aldehyde oxidase 1 | C-ter 40 amino acid | Two hybrid |
| Flotillin-1 | Whole protein | IP |



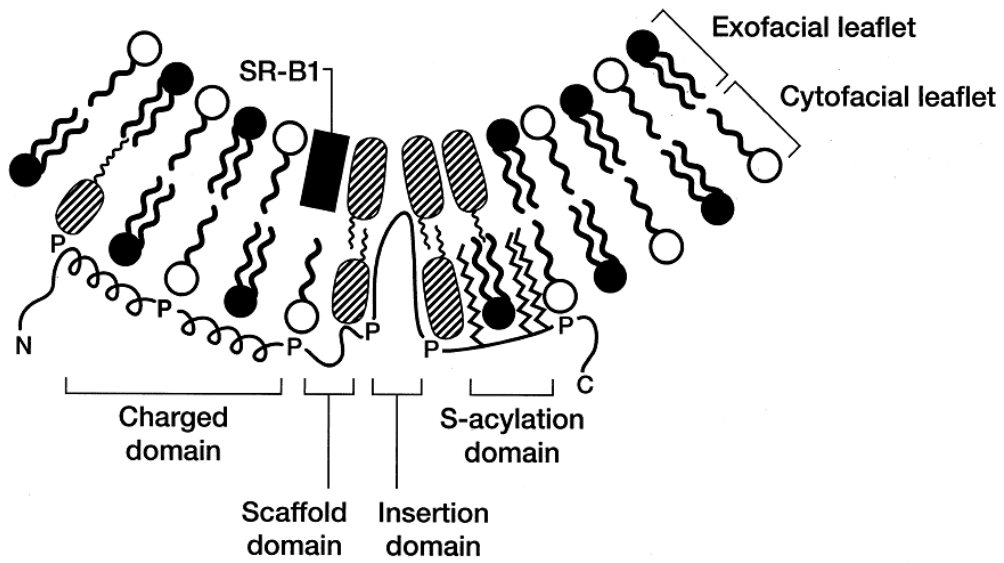
附圖一、動脈粥瘤形成機制的模式圖 (Glass and Witztum, 2001)。



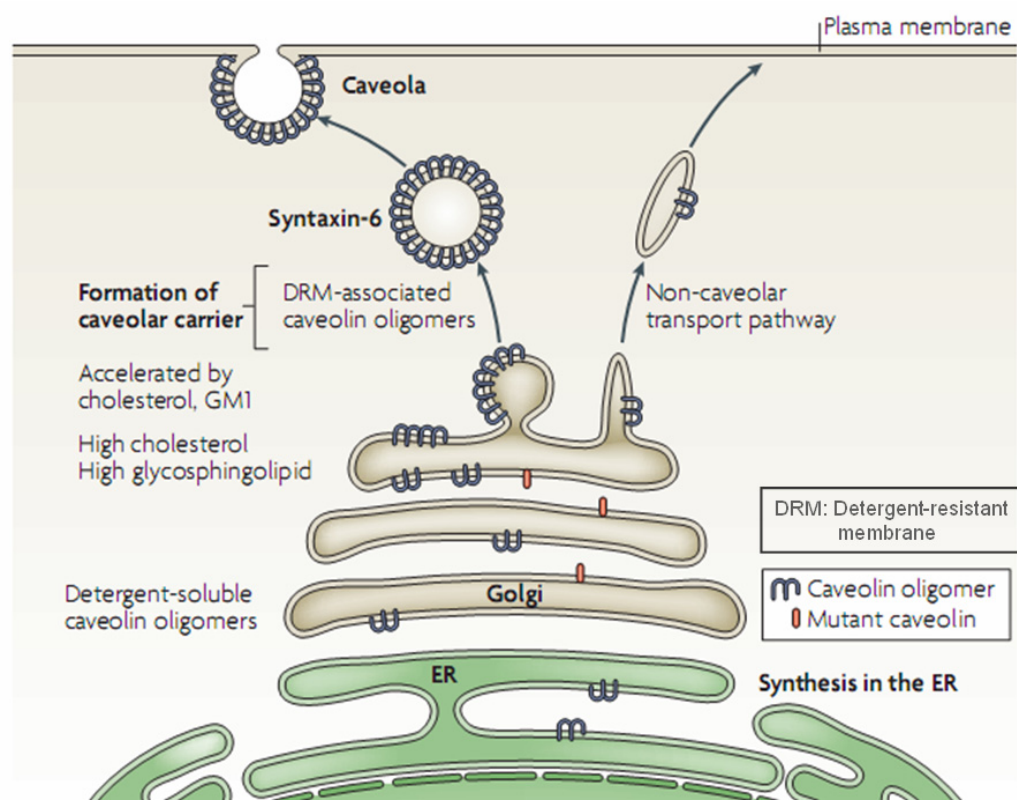
附圖三、膽固醇在細胞中的代謝機制 (Brown and Goldstein, 1976; Chao et al., 2003; Fielding and Fielding, 1995b; Yancey et al., 2003)。



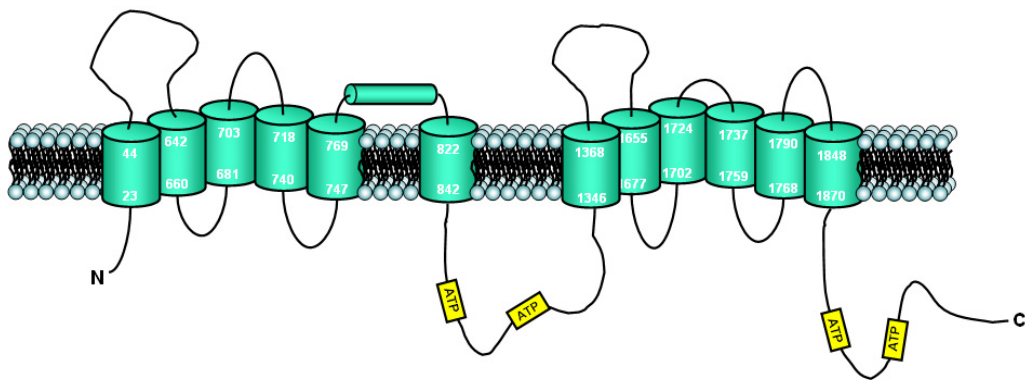
附圖四、由 insig-1 及 SCAP 主導，使 SREBP 活化的膽固醇調控模式圖 (Lodish H, 2004; Osborne, 2001; Yang et al., 2002)。



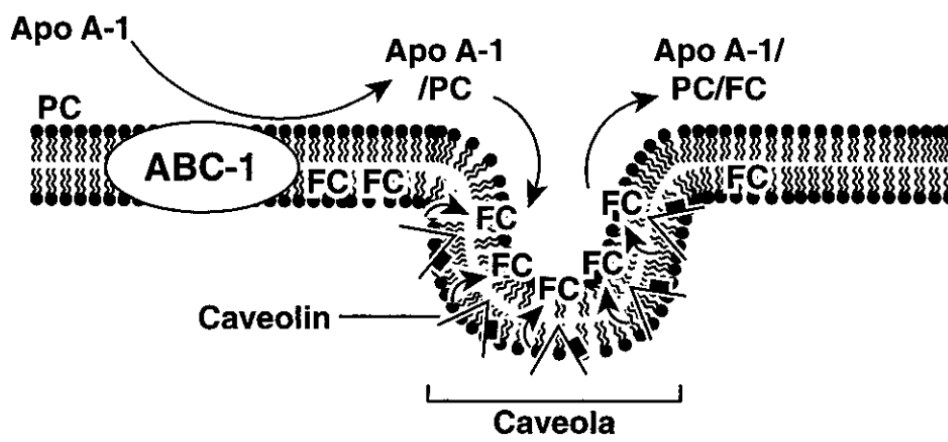
附圖五、Caveolin-1 蛋白嵌入 caveolae 結構的模式圖 (Fielding and Fielding, 2000)



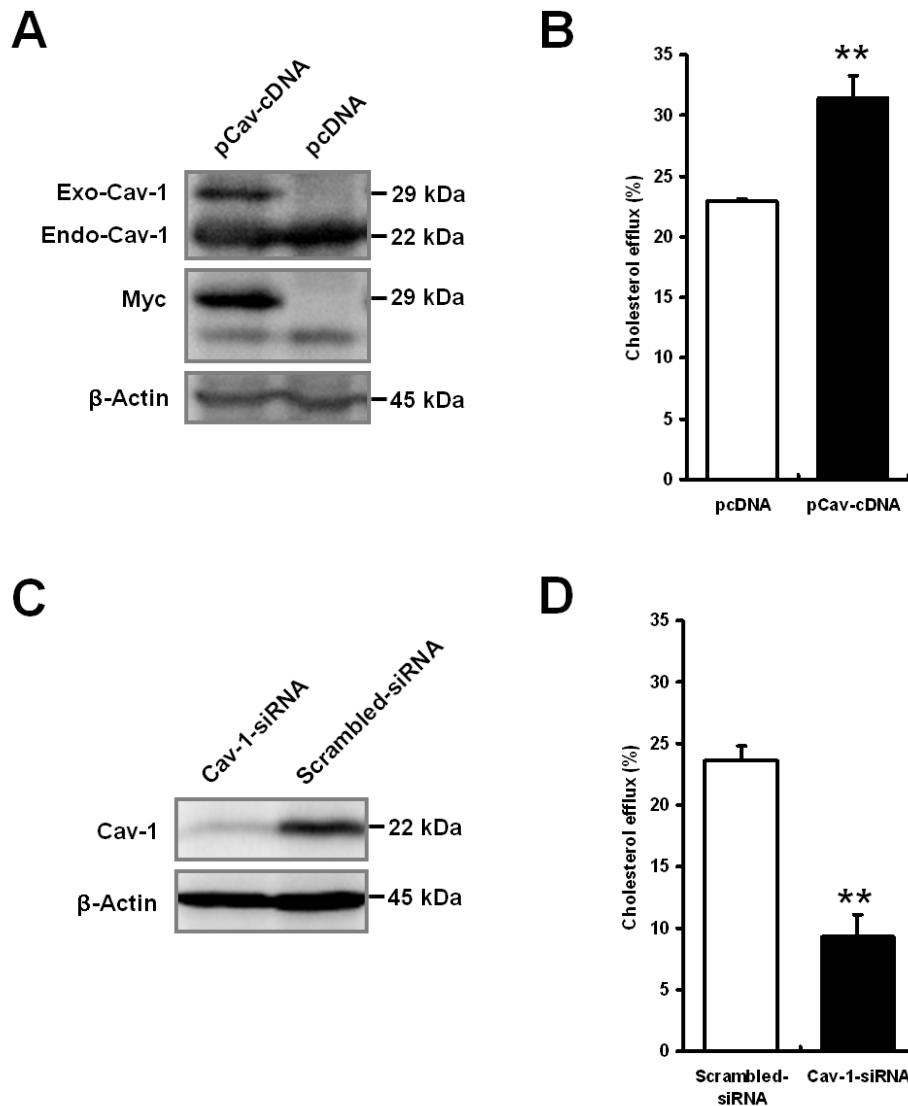
附圖六、Caveolin-1 蛋白寡聚化及運送的模式圖 (Parton and Simons, 2007)。



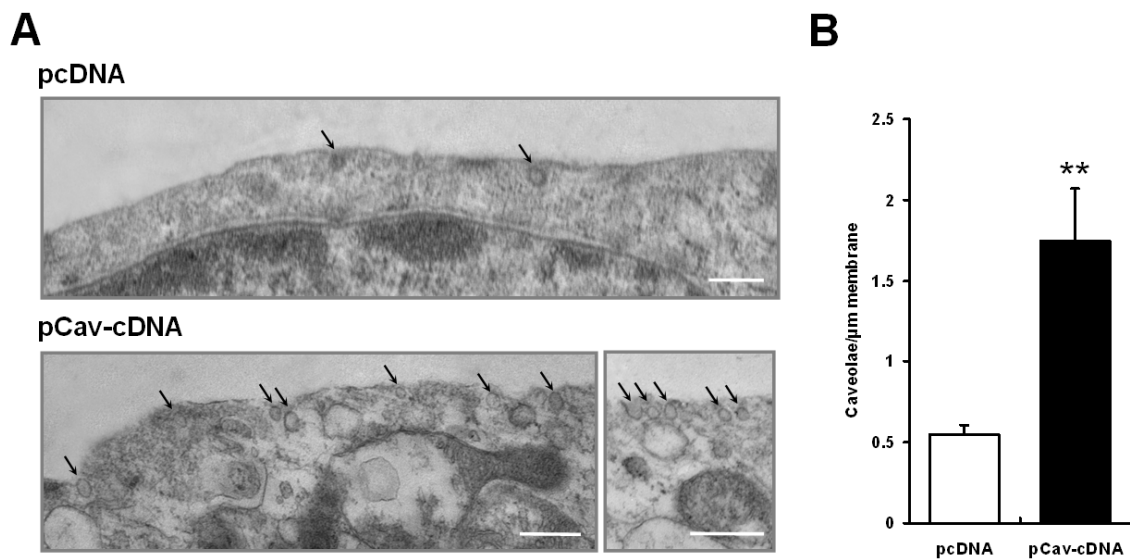
附圖七、ABCA1 蛋白的立體模式圖 (Oram, 2002a)。



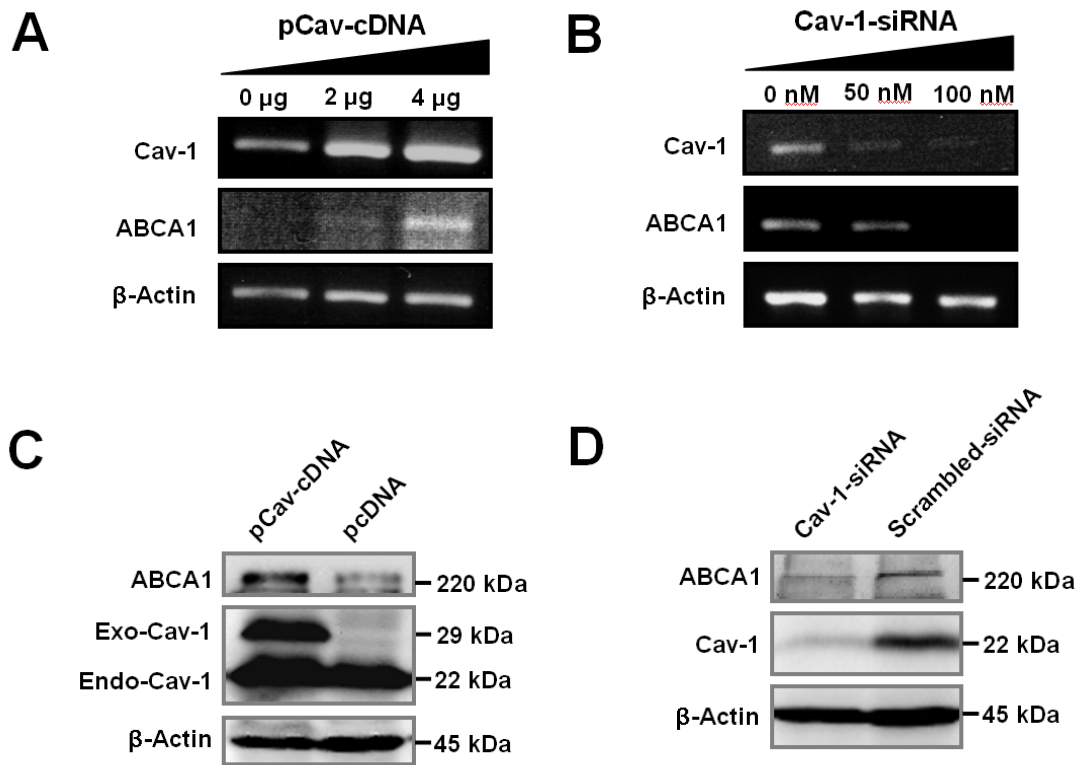
附圖八、膽固醇釋出兩步驟的模式圖 (Fielding et al., 2000)。



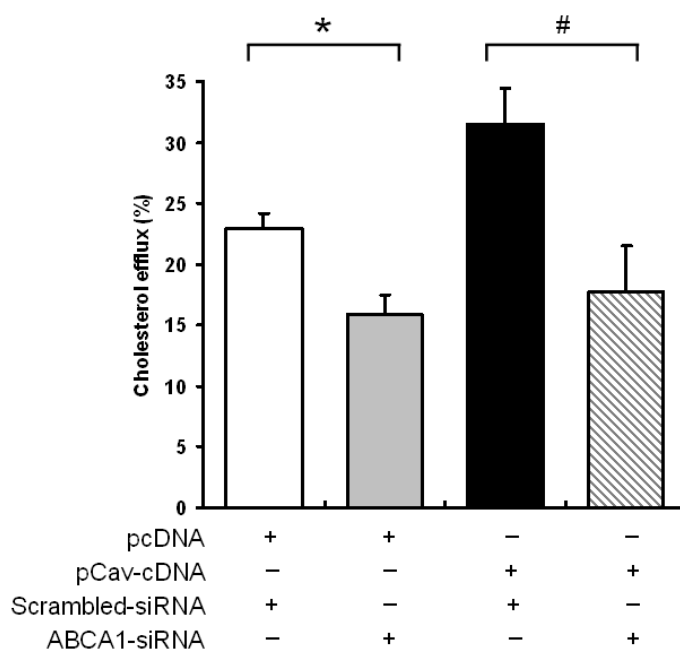
圖一、Caveolin-1 對內皮細胞膽固醇釋出的影響。將餵食 $[^3\text{H}]$ 膽固醇 ($0.5 \mu\text{Ci/ml}$) 的內皮細胞分別轉殖 pCav-cDNA、pcDNA、scrambled siRNA 及 caveolin-1 siRNA，再處理高密度脂蛋白 ($50 \mu\text{g/ml}$) 24 小時去刺激細胞膽固醇釋出。(A) 轉殖 pCav-cDNA 細胞及轉殖 pcDNA 細胞的 caveolin-1 蛋白表現；(B) 轉殖 pCav-cDNA 細胞及轉殖 pcDNA 細胞的膽固醇釋出情形；(C) 轉殖 caveolin-1 siRNA 細胞及轉殖 scrambled siRNA 細胞的 caveolin-1 蛋白表現；(D) 轉殖 caveolin-1 siRNA 細胞及轉殖 scrambled siRNA 細胞膽固醇釋出情形。數據來自三次獨立實驗，以平均值 \pm 標準差表示，**代表 $p < 0.01$ 。



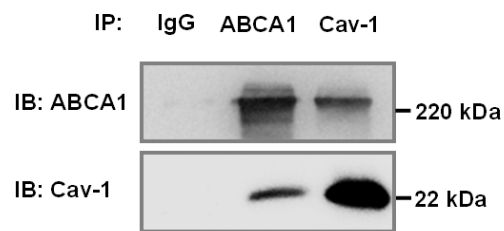
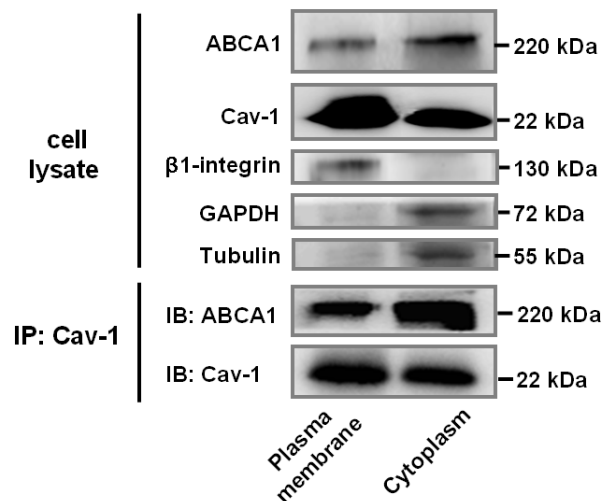
圖二、Caveolin-1 會幫助形成 caveolae 結構。將餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g/ml}$) 的內皮細胞分別轉殖 pCav-cDNA 及 pcDNA 處理高密度脂蛋白 (80 $\mu\text{g/ml}$) 5 分鐘，再利用穿透式電子顯微鏡觀察細胞膜上的 caveolae 構造。(A) 轉殖 pCav-cDNA 細胞及轉殖 pcDNA 細胞的細胞膜上 caveolae 構造 (箭號)；(B) 量化轉殖 pCav-cDNA 細胞及轉殖 pcDNA 細胞單位長度的細胞膜上的 caveolae 數目，以平均值 \pm 標準差表示，**代表 $p < 0.01$ 。



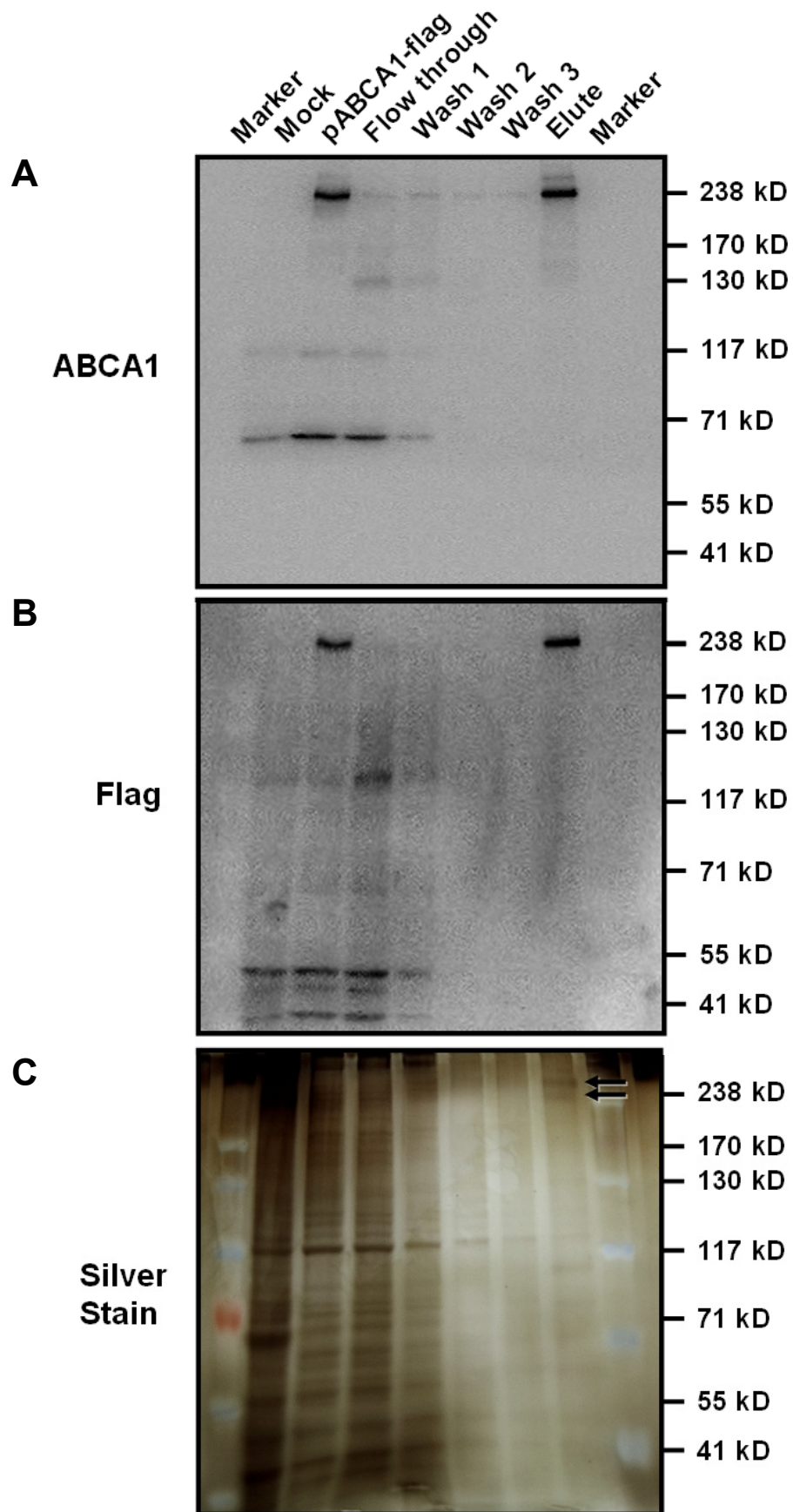
圖三、Caveolin-1 正向調控 ABCA1 mRNA 及蛋白表現量。將餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的內皮細胞分別轉殖不同劑量的 pCav-cDNA 及 caveolin-1 siRNA，再利用半定量 RT-PCR 及西方點墨法分析 caveolin-1 與 ABCA1 mRNA 及蛋白的表現量。(A) 轉殖不同劑量 pCav-cDNA 細胞中 caveolin-1 mRNA 與 ABCA1 mRNA 的表現量；(B) 轉殖不同劑量 caveolin-1 siRNA 細胞中 caveolin-1 mRNA 與 ABCA1 mRNA 的表現量；(C) 轉殖 pCav-cDNA 細胞與 pcDNA 細胞中 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白的表現量；(D) 轉殖 caveolin-1 siRNA 細胞與 scrambled siRNA 細胞中 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白的表現量。



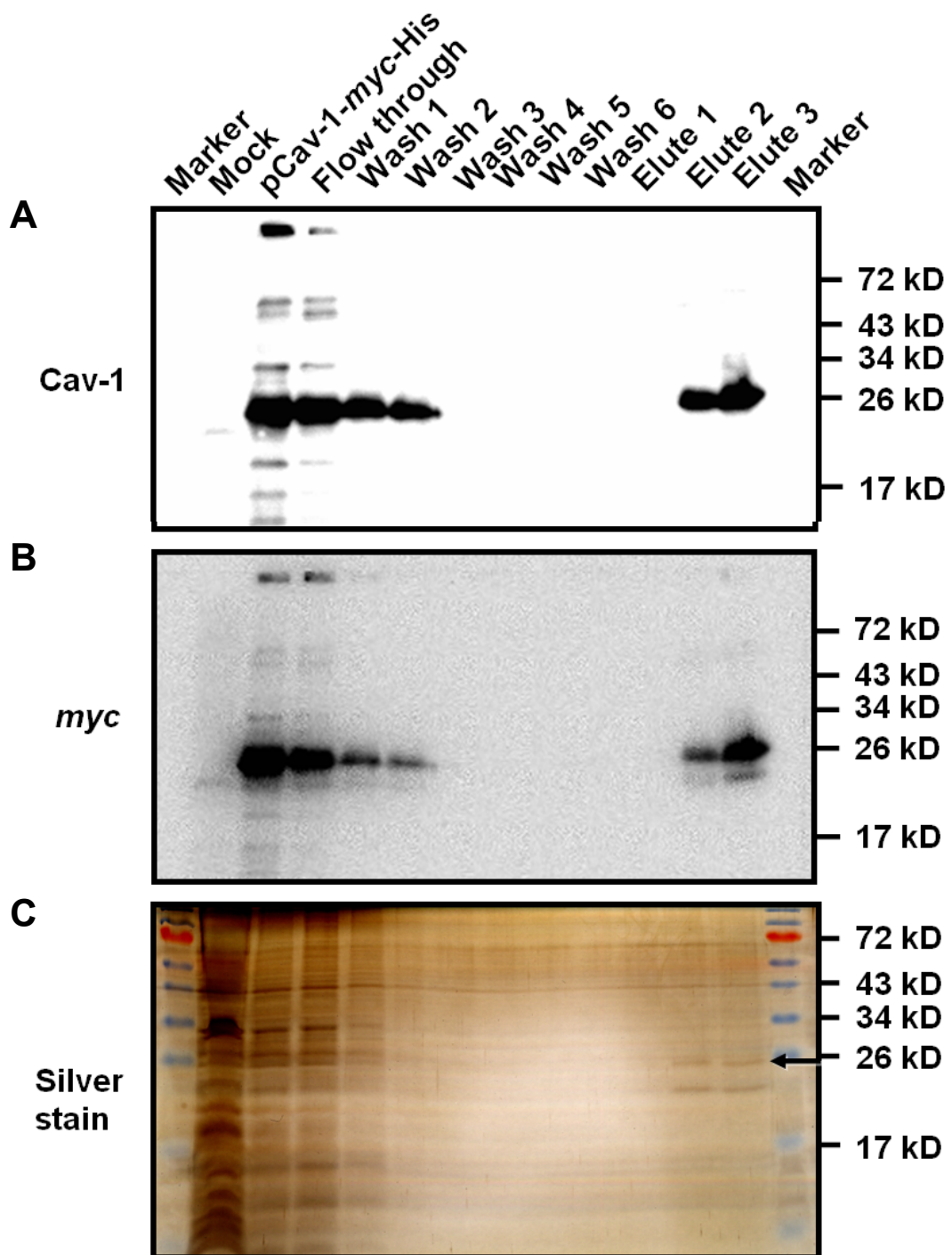
圖四、ABCA1 參與 caveolin-1 所調控的膽固醇釋出路徑。將餵食 $[^3\text{H}]$ 膽固醇 ($0.5 \mu\text{Ci/ml}$)的內皮細胞分別共同轉殖 pcDNA 與 scrambled siRNA (open bar)、pcDNA 與 ABCA1 siRNA (gray bar)、pCav-cDNA 與 scrambled siRNA (black bar)、pCav-cDNA 與 ABCA1 siRNA (hatch bar)，再處理高密度脂蛋白 ($50 \mu\text{g/ml}$) 24 小時刺激其膽固醇釋出。數據來自三次獨立實驗，以平均值 \pm 標準差表示，*及#代表 $p < 0.05$ 。

A**B**

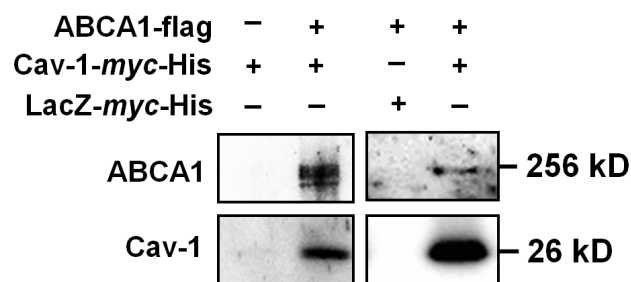
圖五、Caveolin-1 與 ABCA1 會有蛋白間交互作用，且發生於細胞質中及細胞膜上。將細胞餵食膽固醇 (50 μ g/ml)，再處理高密度脂蛋白 (50 μ g/ml) 後，利用 non-immune IgG、抗 caveolin-1 抗體及抗 ABCA1 抗體做免疫沉澱法 (**A**)。將細胞利用超高速離心分離出細胞膜及細胞質部份，並使用細胞膜的標定蛋白； β 1-integrin 及細胞質的標定蛋白：GAPDH 及 tubulin 驗證分離效果後，再利用抗 caveolin-1 抗體做兩部分的細胞液做免疫沉澱法 (**B**)。



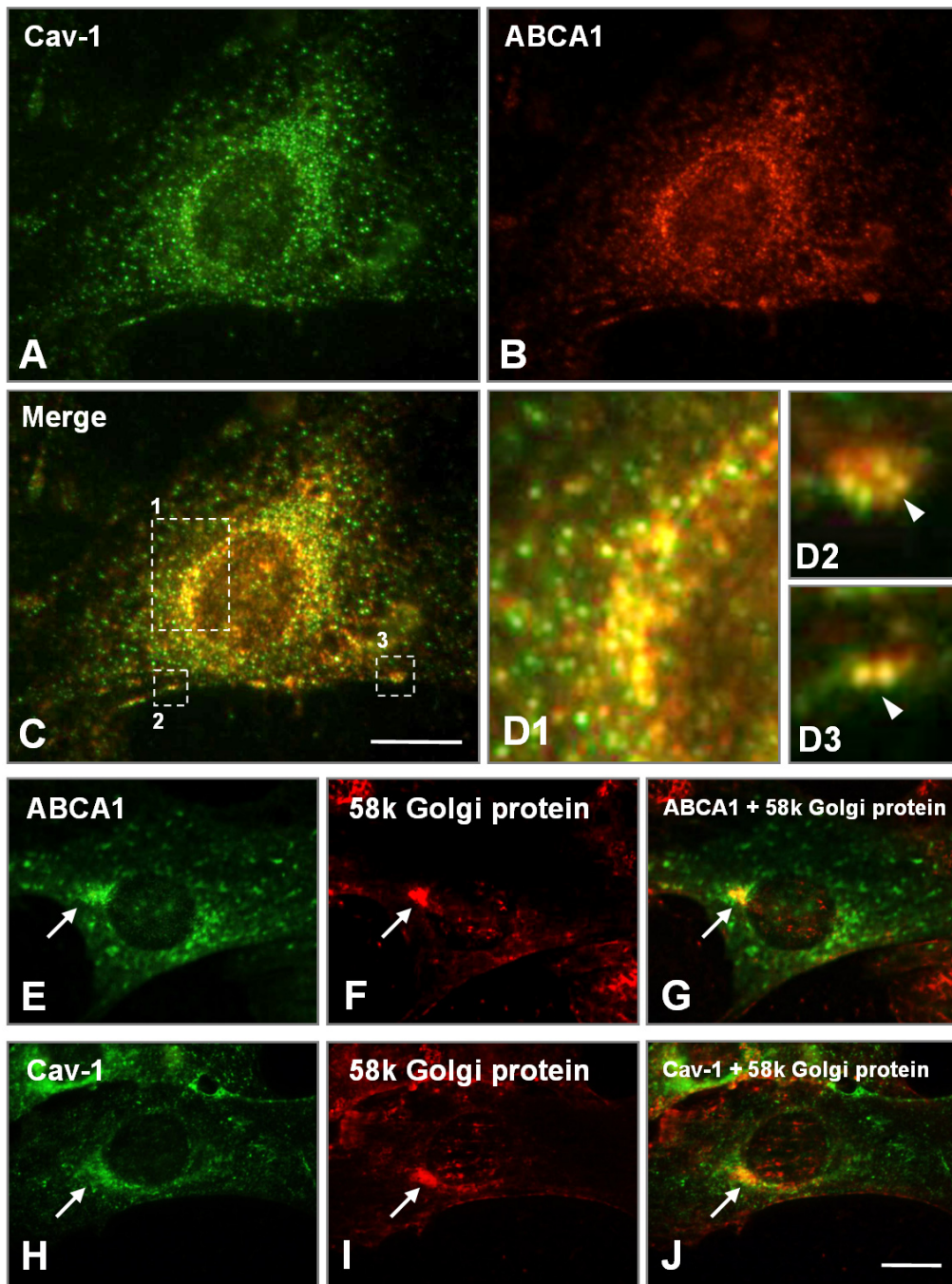
圖六、利用西方點墨法及銀染法分析利用 anti-flag agarose 所純化的 ABCA1-flag 蛋白純度。(箭頭：ABCA1-flag 蛋白可能位置)



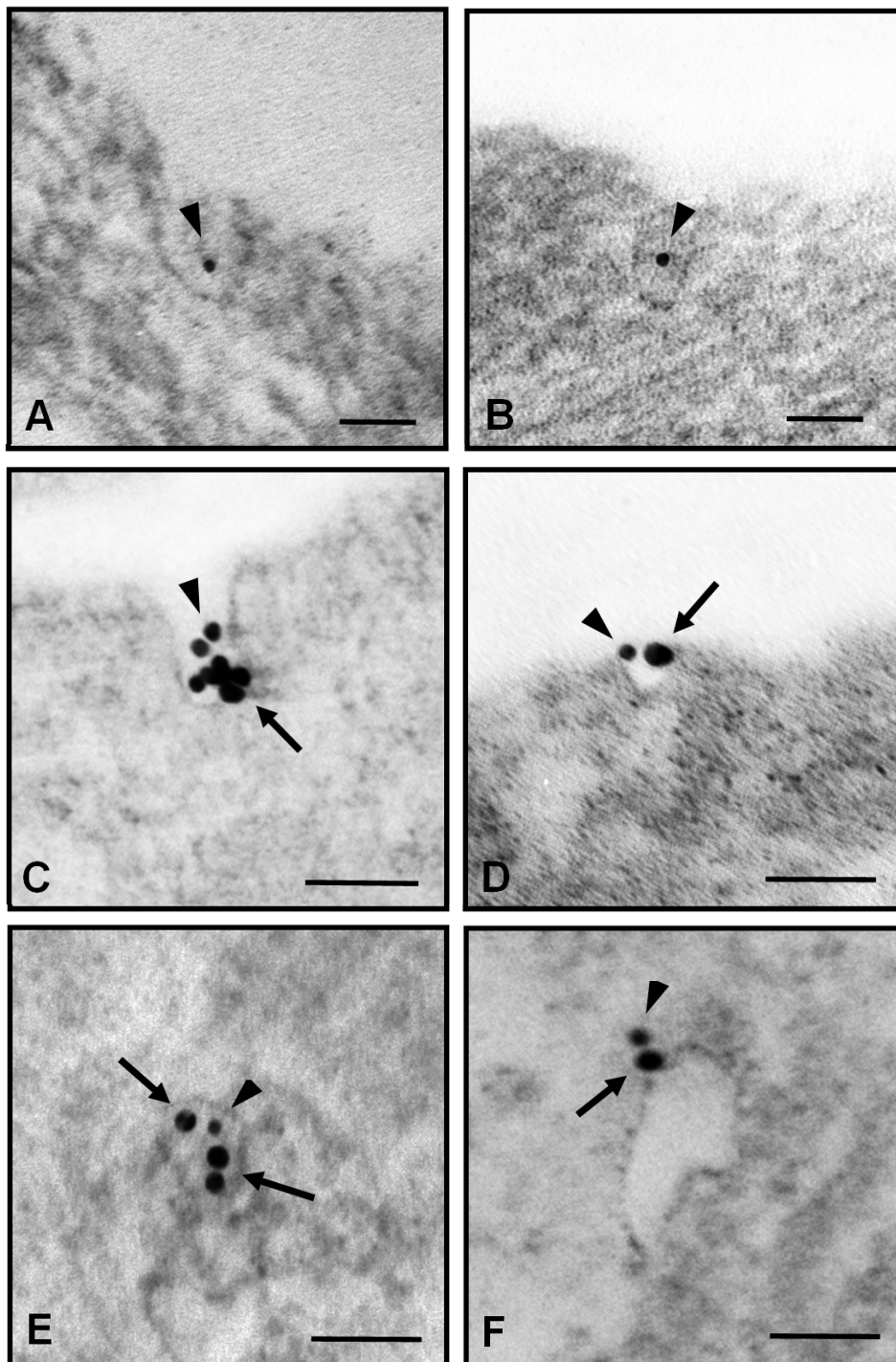
圖七、利用西方點墨法及銀染法分析利用 Ni-NTA 親合性管柱所純化的 caveolin-1-myc-His 蛋白純度。(箭頭：caveolin-1-myc-His 蛋白的可能位置)



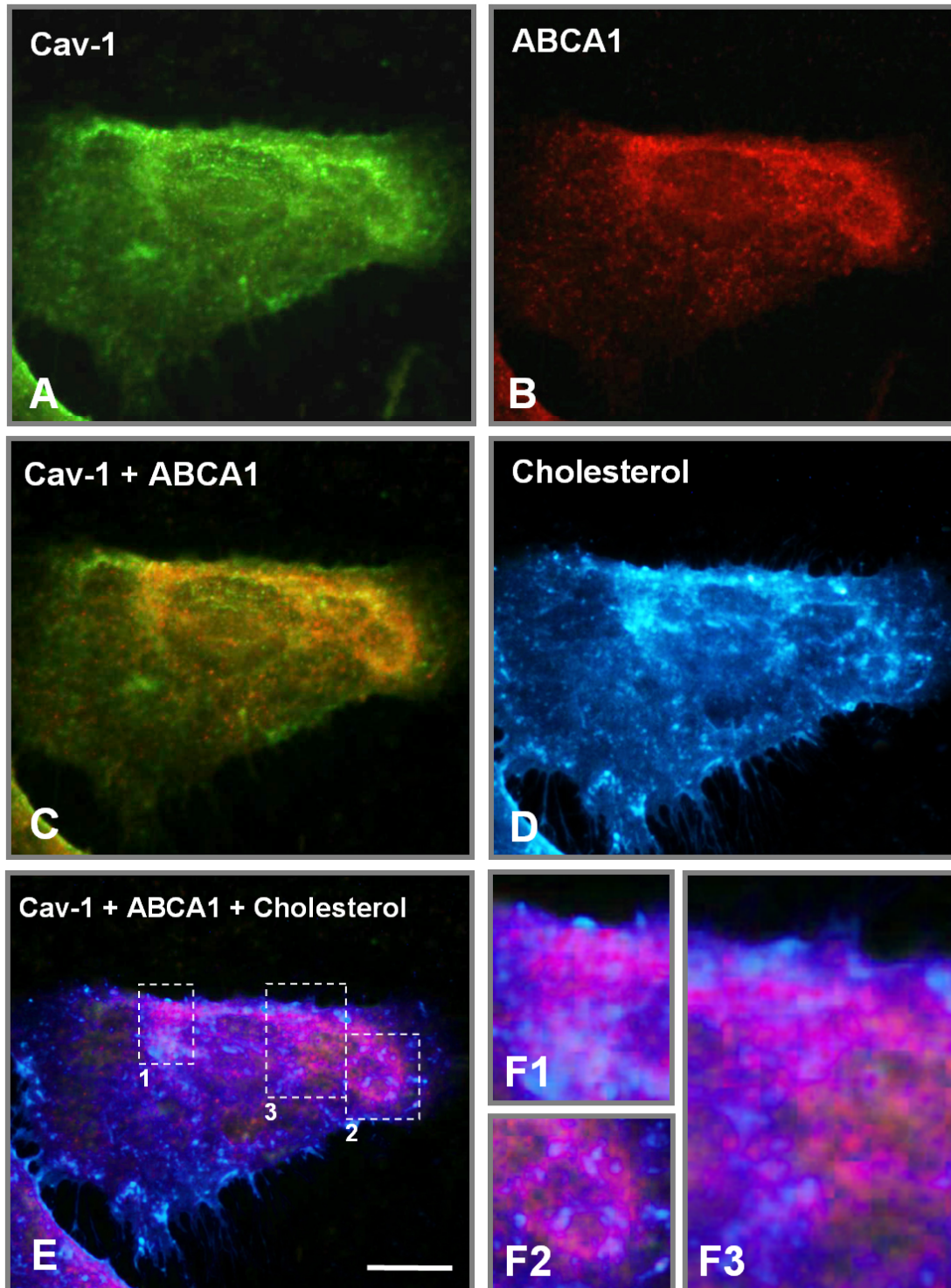
圖八、利用 pull down 測試法驗證 caveolin-1 與 ABCA1 直接結合。利用 anti-flag agarose 結合住 ABCA1-flag 蛋白，再單獨加入 caveolin-1-myc-His 蛋白一同處理，利用 buffer 沖洗後再用 elute buffer 沖提出結合蛋白，西方點墨法結果顯示 ABCA1-flag 會與 caveolin-1-myc-His 直接結合。利用 Ni-NTA 親合性管柱結合住 caveolin-1-myc-His 蛋白，再單獨加入 ABCA1-flag 蛋白一同處理，利用 buffer 沖洗後再用 elute buffer 沖提出結合蛋白，西方點墨法結果顯示 caveolin-1-myc-His 會與 ABCA1-flag 蛋白直接結合。



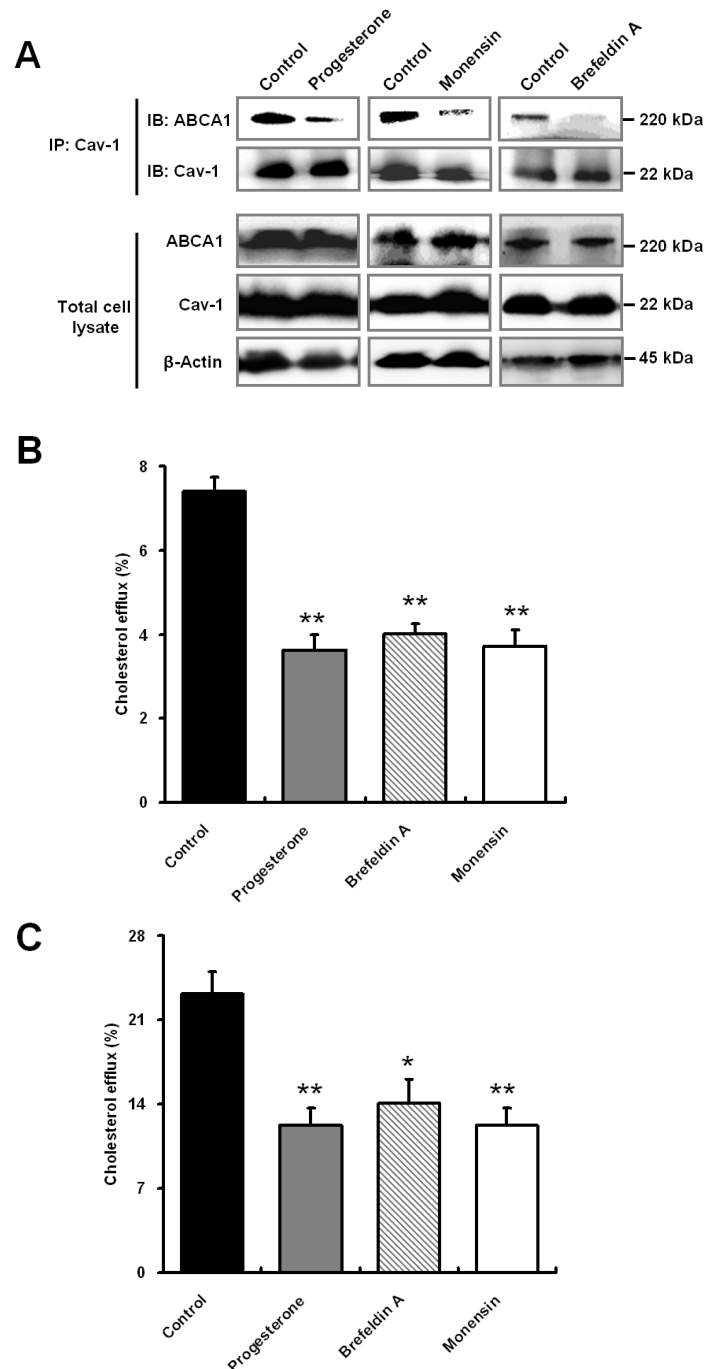
圖九、Caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於高基氏體及細胞膜上。將細胞餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g/ml}$) 再處理高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g/ml}$) 後，使用抗 caveolin-1 抗體、抗 ABCA1 抗體及抗 58k Golgi protein 抗體分別標定 caveolin-1、ABCA1 與 58 K Golgi protein 在細胞中分佈的位置。免疫螢光圖顯示 caveolin-1 蛋白 (A)(綠色螢光)與 ABCA1 蛋白 (B)(紅色螢光)共同分佈於細胞核周圍 (C)(D1) 與細胞膜上 (C)(D2~D3)。ABCA1 (E~G)、caveolin-1 (H~J)與高基氏體蛋白的標定蛋白，58k Golgi protein 共同分佈顯示 ABCA1 與 caveolin-1 共同分佈在細胞核周圍的高基氏體上。標準尺，10 μm 。



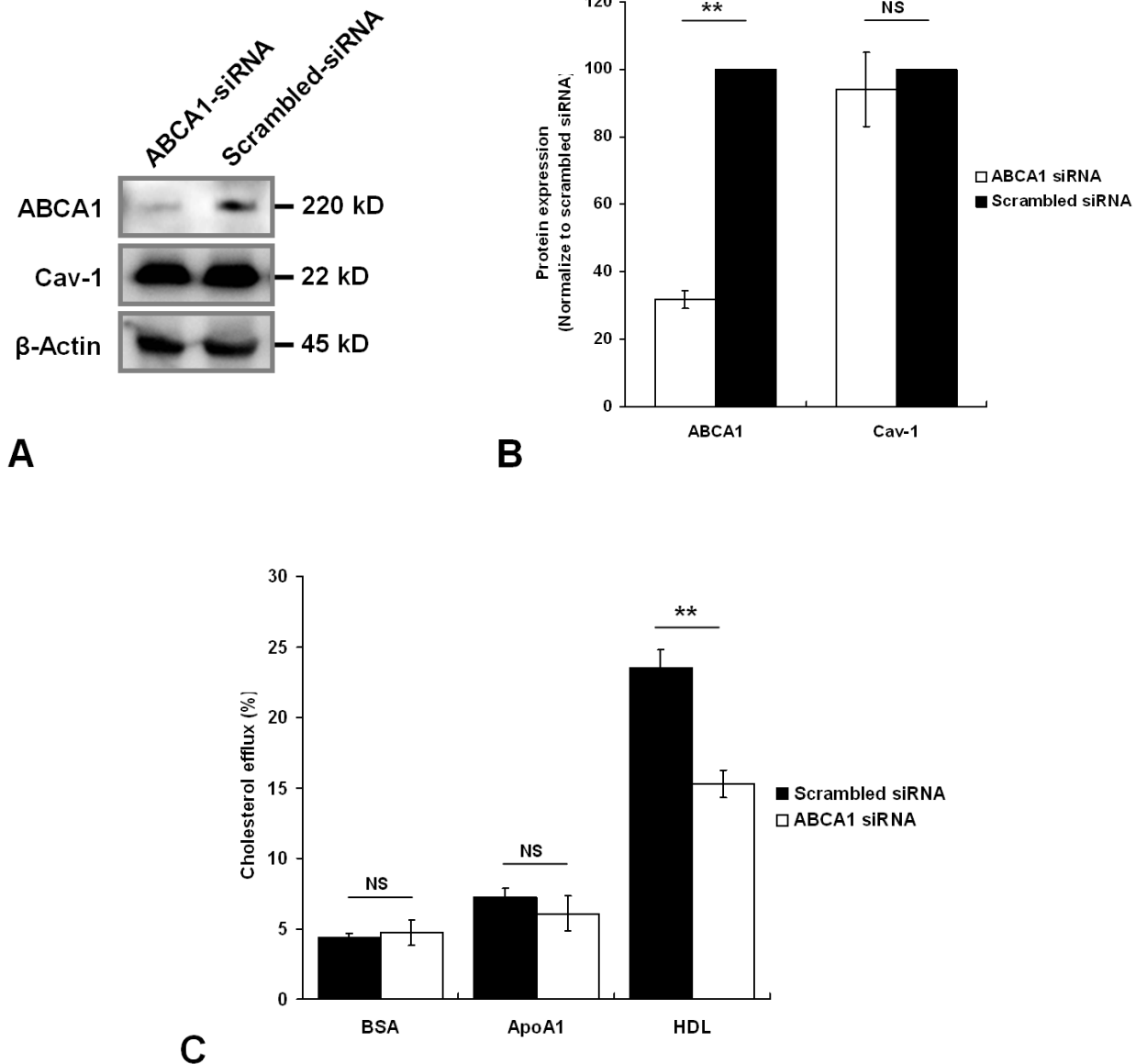
圖十、Caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞膜上 caveolae 及細胞質中正在運送的胞囊。將細胞餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 再處理高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 後，使用抗 caveolin-1 抗體及抗 ABCA1 抗體搭配二級抗體接合膠體金粒子標定 caveolin-1 與 ABCA1 的位置。免疫電子顯微鏡圖顯示 ABCA1 接合 10 nm 膠體金粒子分佈在細胞膜上的 caveolae 結構中 (A)(B)(箭頭)。Caveolin-1 接合 15 nm 膠體金粒子 (箭號)與 ABCA1 接合 10 nm 膠體金粒子 (箭頭)共同分佈在細胞膜上 caveolae 結構中 (C)(D)及細胞質中正在運送的小胞囊 (E)(F)。標準尺，100 nm。



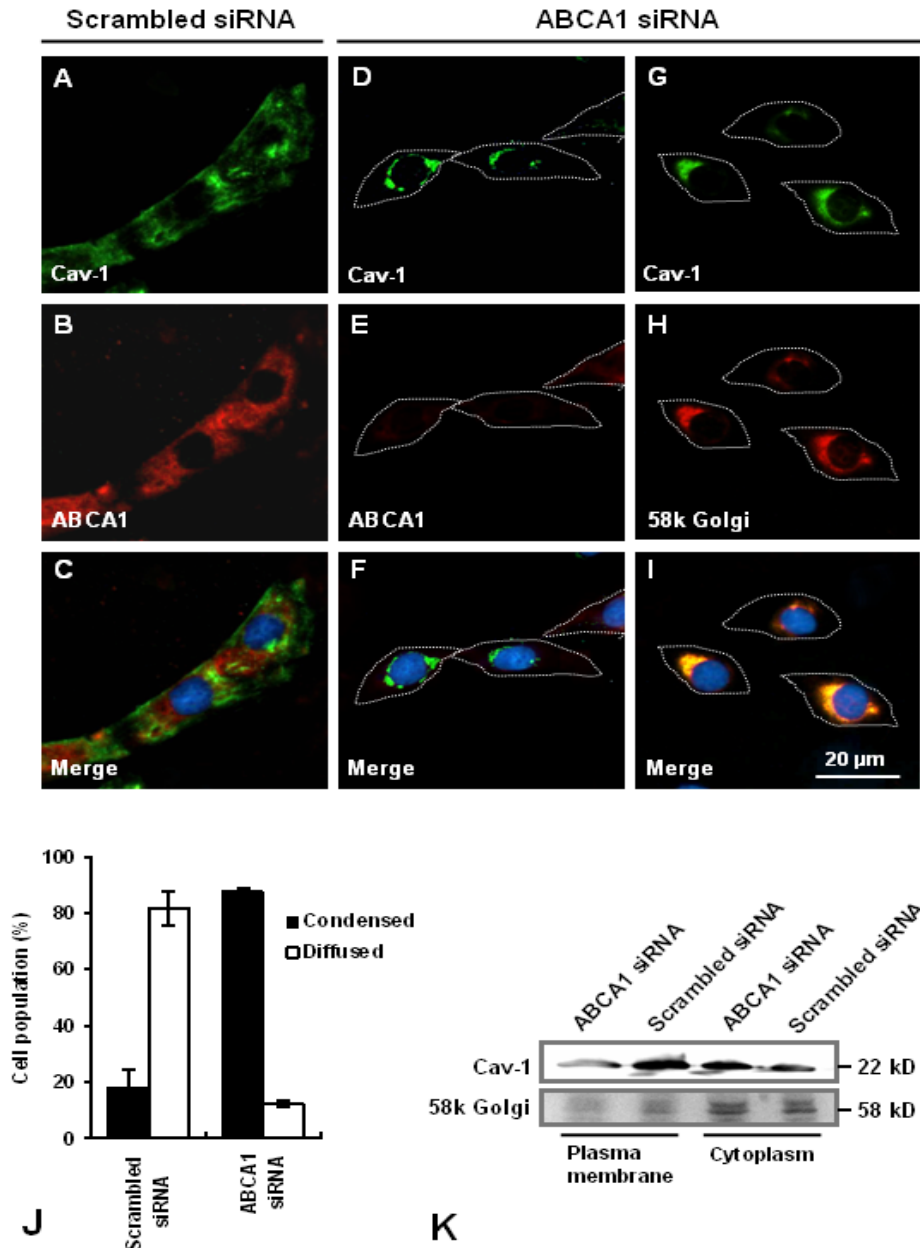
圖十一、Caveolin-1 與 ABCA1、膽固醇共同分佈於細胞核周圍與細胞膜上。將細胞餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 再處理高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 後，使用抗 caveolin-1 抗體及抗 ABCA1 抗體搭配 filipin 染劑分別標定 caveolin-1 (A)(綠色螢光)、ABCA1 (B)(紅色螢光)及膽固醇 (C)(藍色螢光)共同分佈於細胞核周圍及細胞膜上 (E)(F)。標準尺，10 μm 。



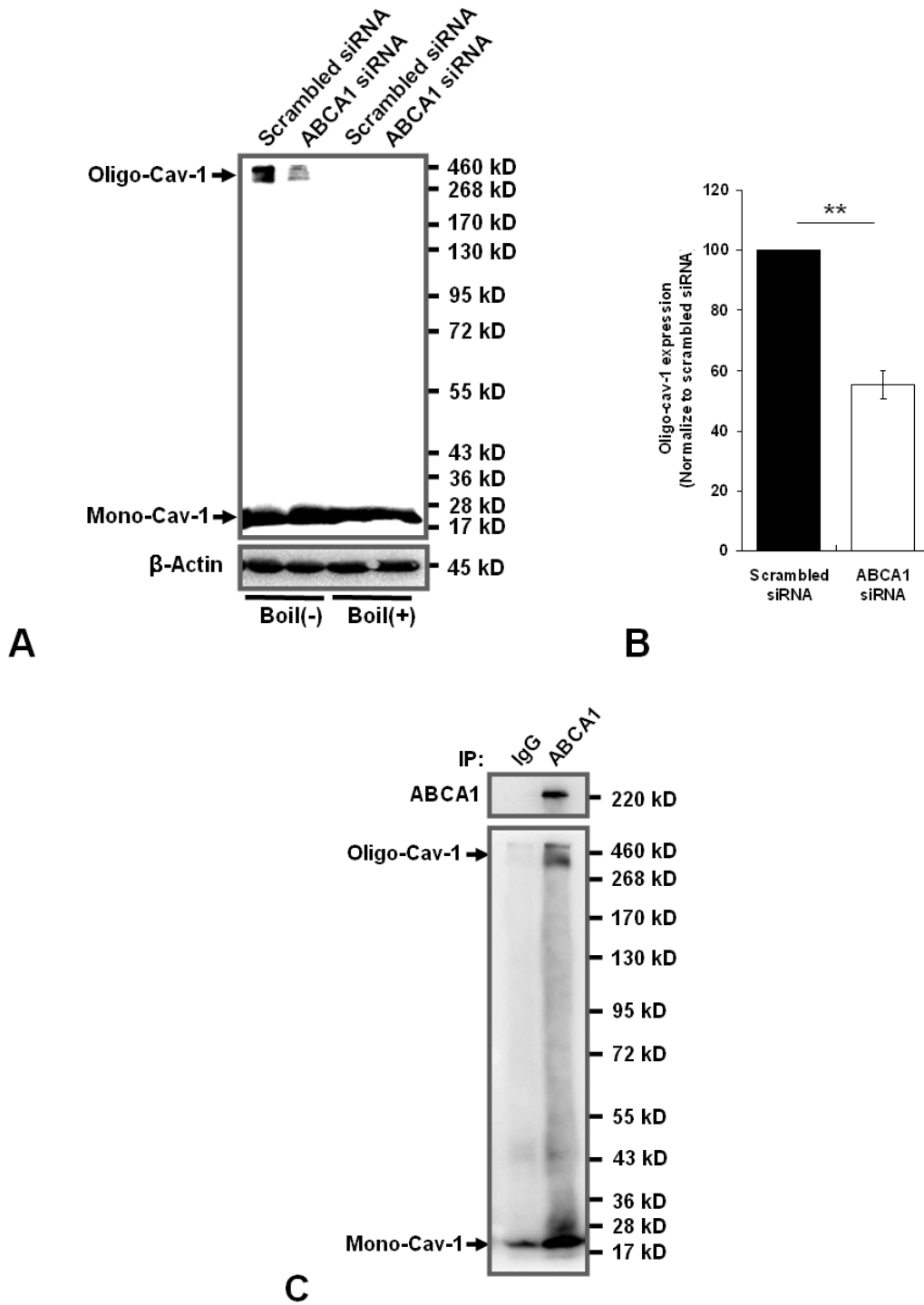
圖十二、三種抑制胞囊運送的抑制劑：progesterone、brefeldin A 及 monensin 會破壞 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白間的交互作用及膽固醇釋出給 methyl-β-cyclodextrin 及高密度脂蛋白。(A) 將餵食膽固醇 (50 μg/ml) 的內皮細胞分別處理 progesterone (10 mg/ml)、brefeldin A (50 μM) 及 monensin (50 μM) 24 小時，接著加入高密度脂蛋白 (50 μg/ml) 於培養液中，最後使用免疫沉澱法及西方點墨法分析 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白表現量及蛋白間交互作用。將餵食 [³H] 膽固醇 (0.5 μCi/ml) 的內皮細胞分別處理三種抑制劑後，使用 methyl-β-cyclodextrin (2 mM) 30 分鐘來沖洗下細胞膜上的膽固醇 (B)，另外，使用高密度脂蛋白 (50 μg/ml) 24 小時刺激膽固醇釋出 (C)。



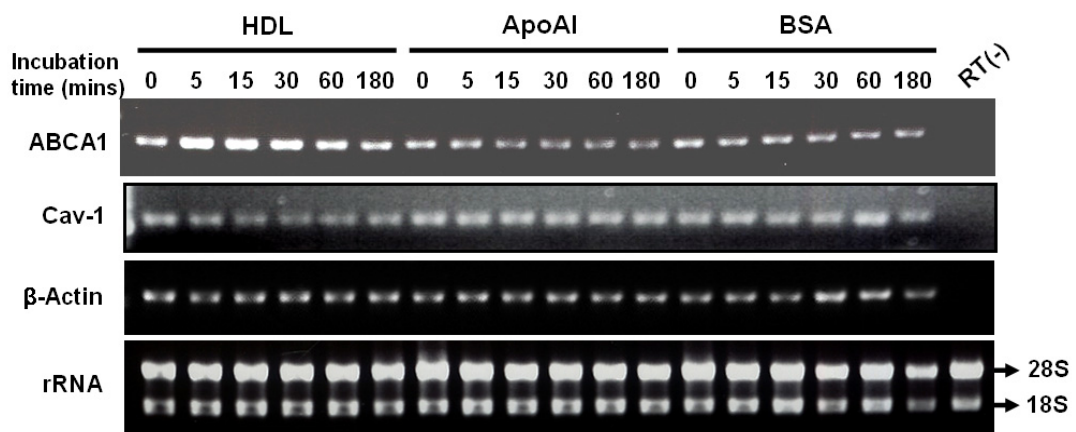
圖十三、降低 ABCA1 表現會抑制高密度脂蛋白所調控的膽固醇釋出，但不會改變 caveolin-1 蛋白表現。轉殖 ABCA1 siRNA 細胞及轉殖 scrambled siRNA 細胞中 ABCA1 與 caveolin-1 蛋白表現量 (A)及其蛋白表現量之量化結果 (B)。將轉殖 ABCA1 siRNA 細胞與轉殖 scrambled siRNA 細胞餵食 ^3H 膽固醇 (0.5 $\mu\text{Ci/ml}$)，再分別使用高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g/ml}$)、apoAI 載脂蛋白 (5 $\mu\text{g/ml}$)及 BSA 去刺激膽固醇釋出情形。數據來自三次獨立實驗，以平均值 \pm 標準差表示，**代表 $p < 0.01$ 。



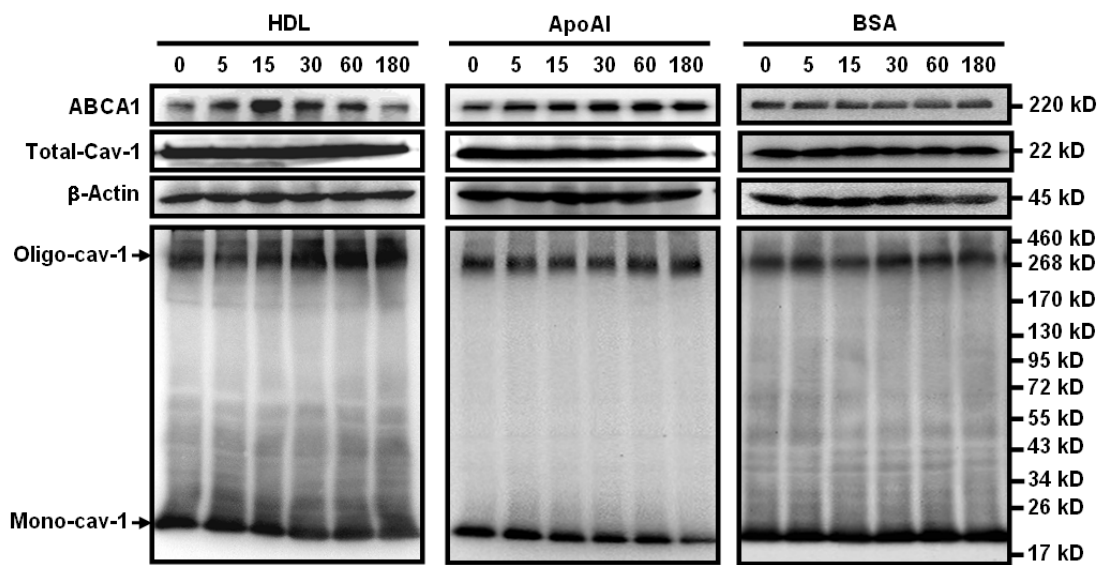
圖十四、降低 ABCA1 會使 caveolin-1 停留在高基氏體。將轉殖 ABCA1 siRNA 細胞及轉殖 scrambled siRNA 細胞餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g/ml}$)，再處理高密度脂蛋白後，利用免疫螢光顯微鏡觀察 caveolin-1、ABCA1 及高基氏體標定蛋白，58k Golgi protein 的分佈位置。轉殖 scrambled siRNA 細胞中，caveolin-1 (A)(綠色螢光)與 ABCA1 (B)(紅色螢光)共同分佈於細胞質中及細胞膜上 (C)。轉殖 ABCA1 siRNA 細胞中，ABCA1 表現降低 (E)，而 caveolin-1 (D)(G)會與 58k Golgi protein (H)共同分佈於高基氏體 (I)。(J) 轉殖 ABCA1 siRNA 細胞與轉殖 scrambled siRNA 細胞中，caveolin-1 呈現聚集在高基氏體或散佈在細胞質及細胞膜上所佔的比例。(K) 將轉殖 ABCA1 siRNA 細胞及轉殖 scrambled siRNA 細胞利用超高速離心分離出 plasma membrane 部份及 cytoplasm 部份後，利用西方點墨法分析 caveolin-1 的分佈位置。數據來自三次獨立實驗，以平均值 \pm 標準差表示。



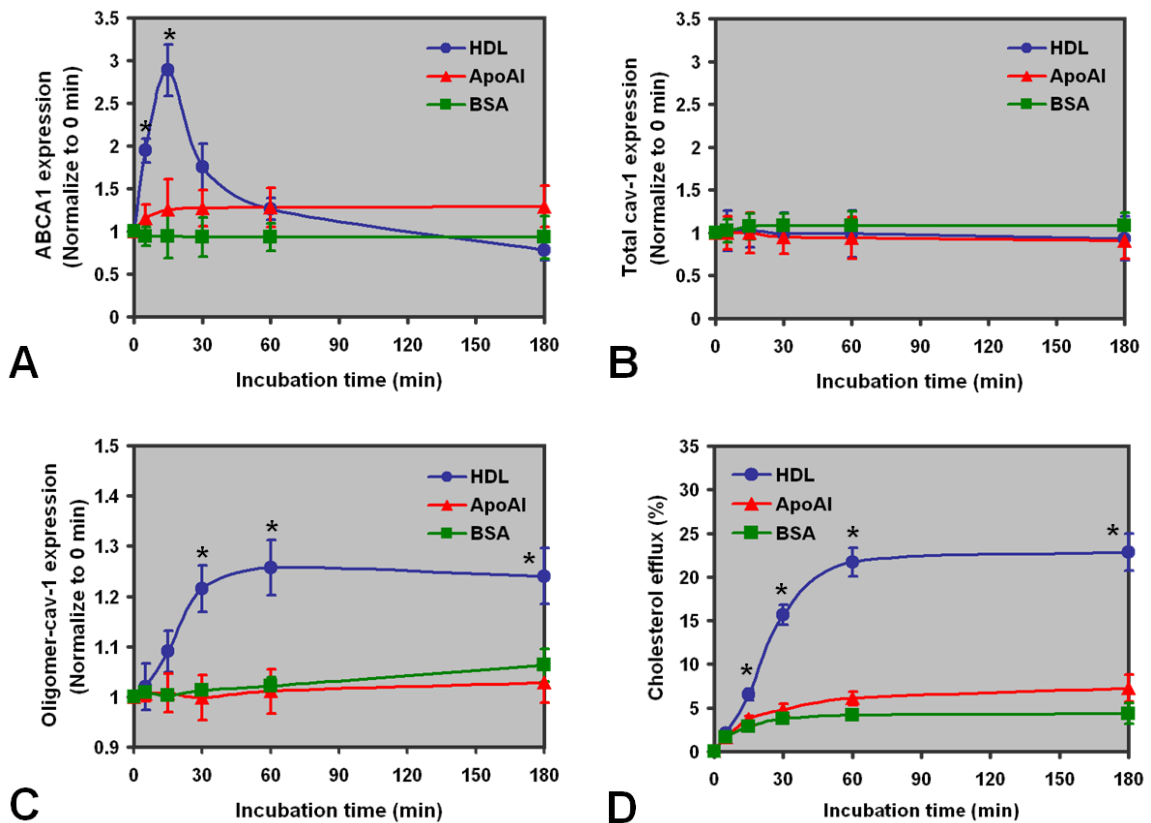
圖十五、ABCA1 會調控 caveolin-1 寡聚化並與 oligomer-caveolin-1 結合。將轉殖 ABCA1 siRNA 細胞及轉殖 scrambled siRNA 細胞餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g/ml}$)，再處理高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g/ml}$) 後，利用西方點墨法及免疫沉澱法分別分析 ABCA1、oligomer-caveolin-1 蛋白表現 (A) 及 ABCA1 與 oligomer-caveolin-1、monomer-caveolin-1 蛋白間交互作用 (C)。(B) 轉殖 ABCA1 siRNA 細胞及轉殖 scrambled siRNA 細胞其 oligomer-caveolin-1 蛋白表現的量化圖。數據來自三次獨立實驗，以平均值 \pm 標準差表示，**代表 $p < 0.01$ 。



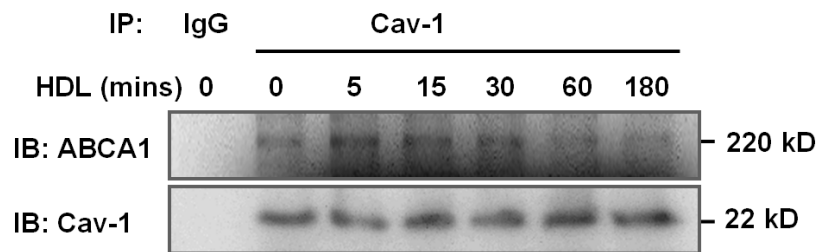
圖十六、高密度脂蛋白而非 apoAI 載脂蛋白或 BSA 能升高 ABCA1 mRNA 表現，但不影響 caveolin-1 mRNA 表現量。將內皮細胞餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g/ml}$) 後，分別處理高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g/ml}$)、apoAI 載脂蛋白 (5 $\mu\text{g/ml}$) 及 BSA 0、5、15、30、60、180 分鐘，再利用半定量 RT-PCR 分析 ABCA1 mRNA 及 caveolin-1 mRNA 表現量。



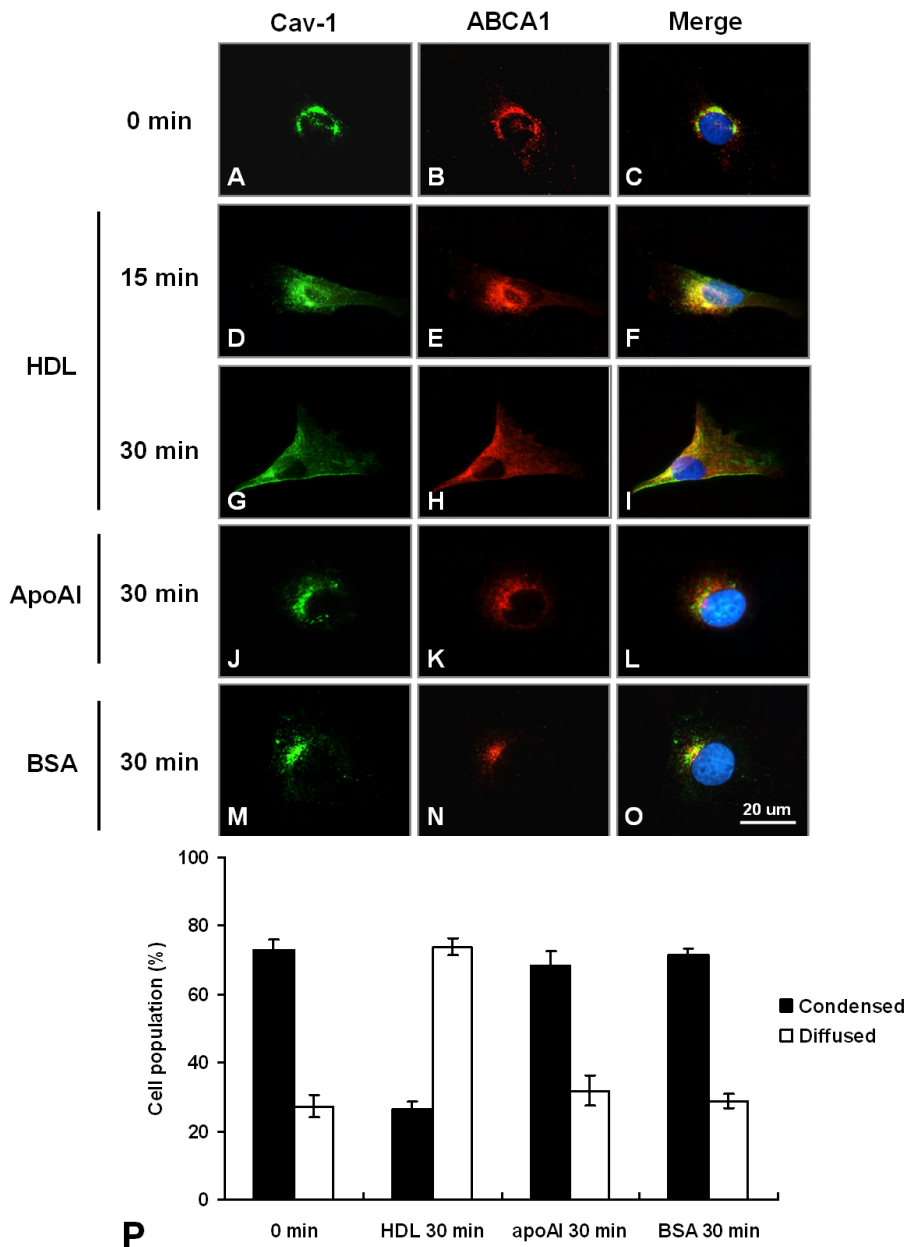
圖十七、高密度脂蛋白而非 apoAI 載脂蛋白或 BSA 能升高 ABCA1 蛋白及 oligomer-caveolin-1 表現。將內皮細胞餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g/ml}$) 後，分別處理高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g/ml}$)、apoAI 載脂蛋白 (5 $\mu\text{g/ml}$) 及 BSA 0、5、15、30、60、180 分鐘，再利用西方點墨法分析 ABCA1 蛋白，caveolin-1 蛋白總量及 oligomer-caveolin-1 蛋白表現量。



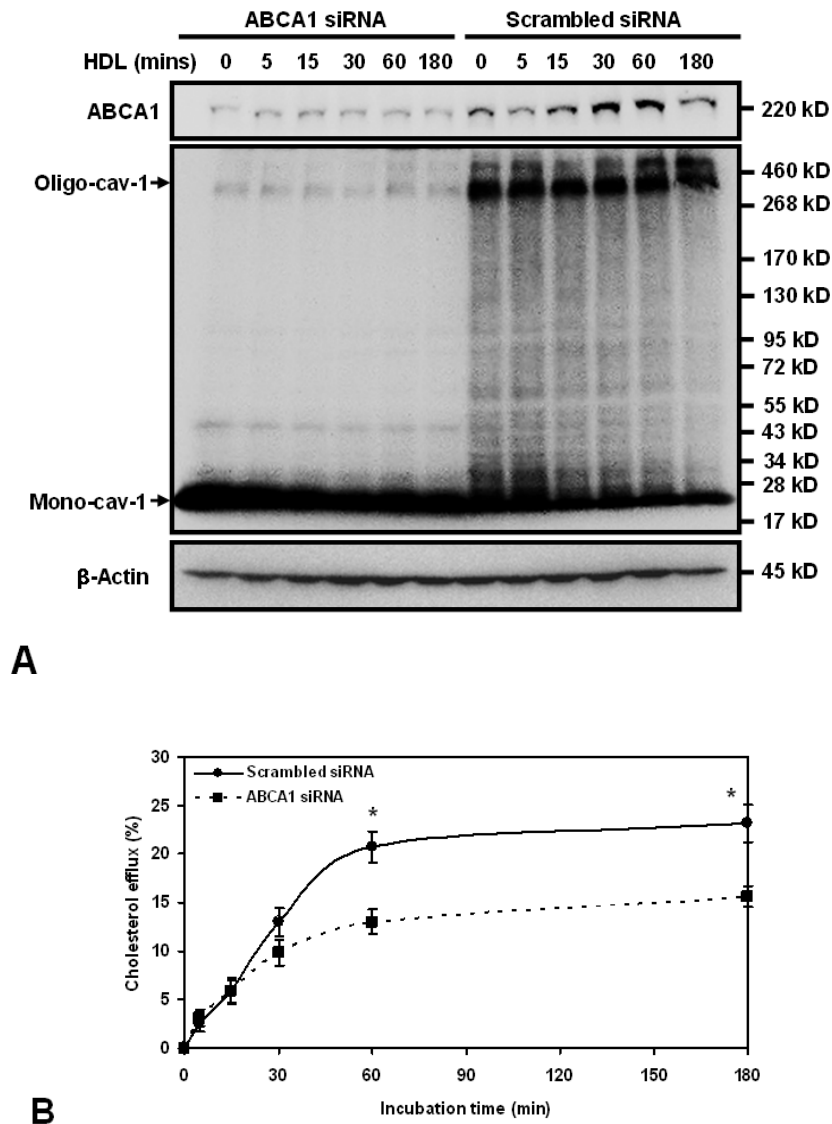
圖十八、高密度脂蛋白而非 apoAI 載脂蛋白或 BSA 能升高 ABCA1 蛋白及 oligomer-caveolin-1 表現，並刺激膽固醇釋出。高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、apoAI 載脂蛋白 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)及 BSA 於不同時間點调控內皮細胞 ABCA1 蛋白表現量的量化圖 (A)，caveolin-1 蛋白總表現量的量化圖 (B)，oligomer-caveolin-1 蛋白表現量的量化圖 (C)，對膽固醇釋出的影響 (D)。數據來自三次獨立實驗，以平均值 \pm 標準差表示，*代表 $p < 0.05$ 。



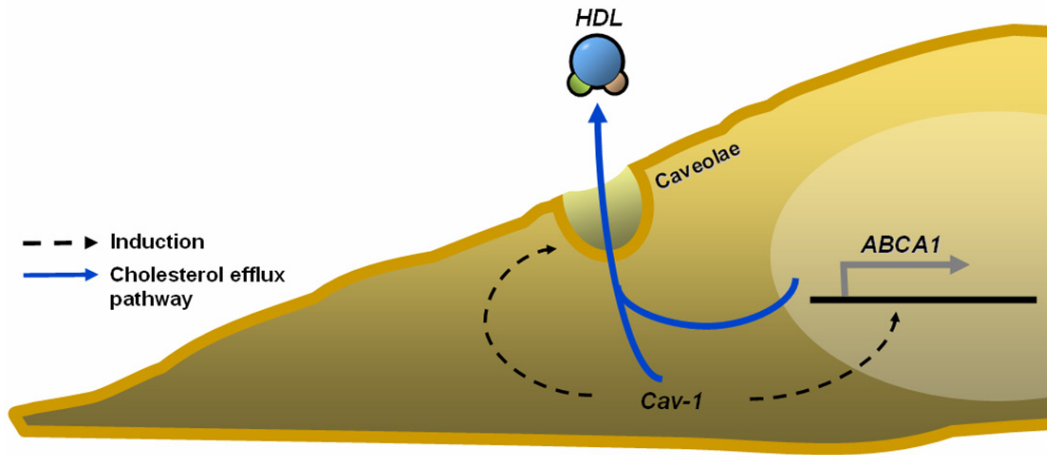
圖十九、高密度脂蛋白在早期會升高 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白間的交互作用。將內皮細胞餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 後，處理高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0、5、15、30、60、180 分鐘，再利用抗 caveolin-1 抗體做免疫沉澱法去分析 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白間的交互作用。



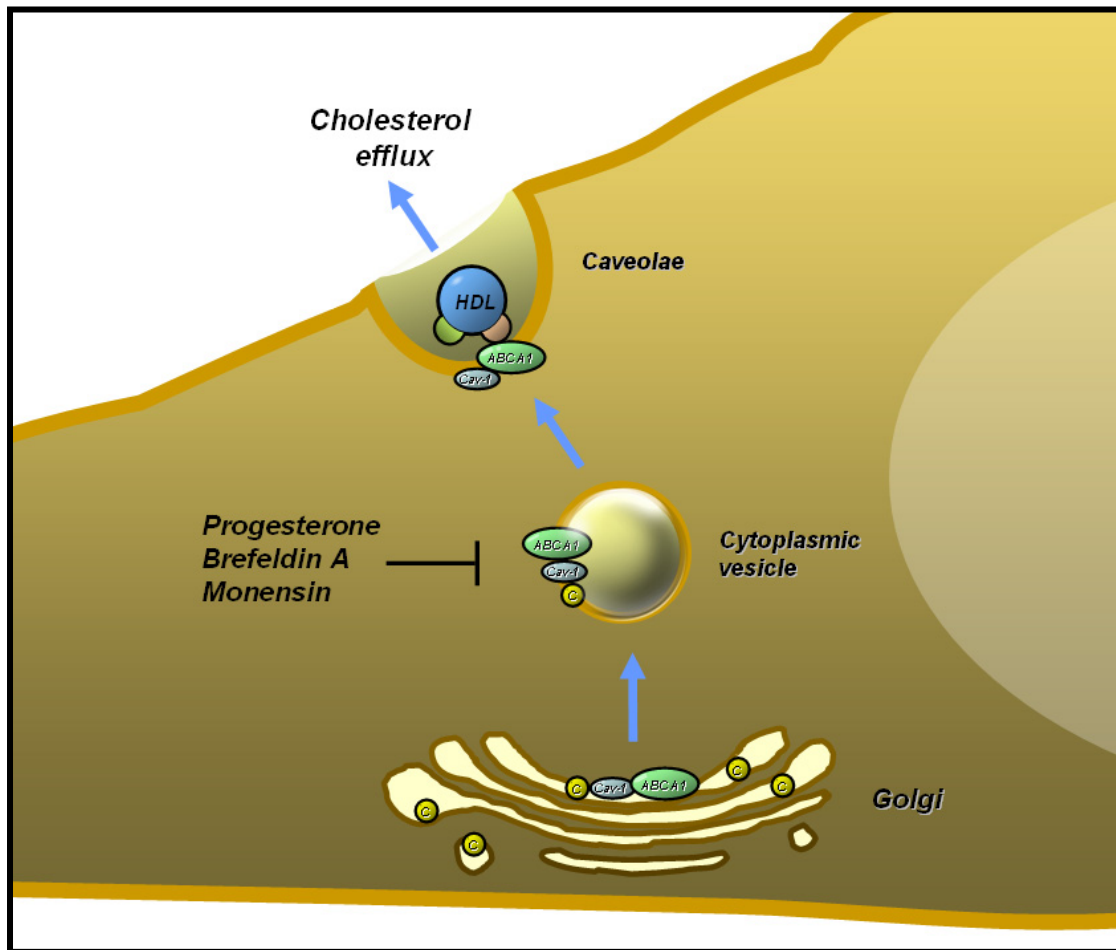
圖二十、高密度脂蛋白而非 apoAI 載脂蛋白及 BSA 會幫助 caveolin-1 自高基氏體運送到細胞膜上。將內皮細胞餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 後，分別處理高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、apoAI 載脂蛋白 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 及 BSA 0、15、30 分鐘，再利用免疫螢光顯微鏡觀察 caveolin-1 與 ABCA1 的分佈位置。處理前 caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞核周圍 (A-C)，處理高密度脂蛋白 15 分鐘，caveolin-1 與 ABCA1 共同散佈於細胞質中 (D-F)，處理高密度脂蛋白 30 分鐘，caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈於細胞質及細胞膜上 (G-I)，處理 apoAI 載脂蛋白 30 分鐘 (J-L) 及 BSA 30 分鐘 (M-O)，caveolin-1 與 ABCA1 依舊共同分佈於細胞核周圍。(P) 處理前、處理高密度脂蛋白、apoAI 載脂蛋白、BSA 30 分鐘，caveolin-1 與 ABCA1 聚集在細胞核周圍 (condensed) 或散佈於細胞質及細胞膜上 (diffused) 所佔的比例。數據來自三次獨立實驗，以平均值 \pm 標準差表示。



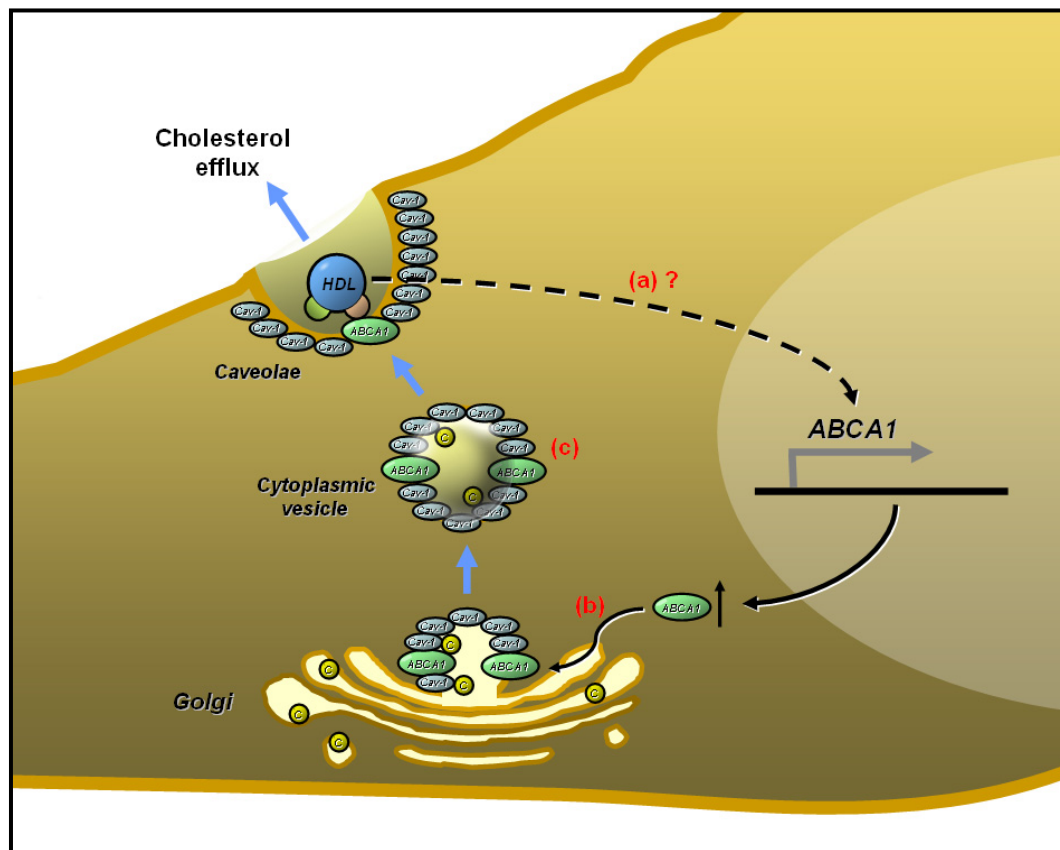
圖二十一、高密度脂蛋白需要 ABCA1 去增加的 oligomer-caveolin-1 表現及增加膽固醇釋出。將轉殖 scrambled siRNA 細胞及轉殖 ABCA1 siRNA 細胞餵食^[3H]膽固醇 (0.5 μ Ci/ml)後，處理高密度脂蛋白 (50 μ g/ml) 0、5、15、30、60、180 分鐘，再利用西方點墨法分析 oligomer-caveolin-1 表現量並測量膽固醇釋出情形。(A) 在轉殖 scrambled siRNA 細胞中，高密度脂蛋白會升高 ABCA1 表現並增加 oligomer-caveolin-1 表現，在轉殖 ABCA1 siRNA 細胞中，高密度脂蛋白無法升高 ABCA1 表現且無法增加 oligomer-caveolin-1 蛋白表現。(B) 轉殖 ABCA1 siRNA 細胞的膽固醇釋出顯著低於轉殖 scrambled siRNA 細胞。數據來自三次獨立實驗，以平均值 \pm 標準差表示，*代表 $p < 0.05$ 。



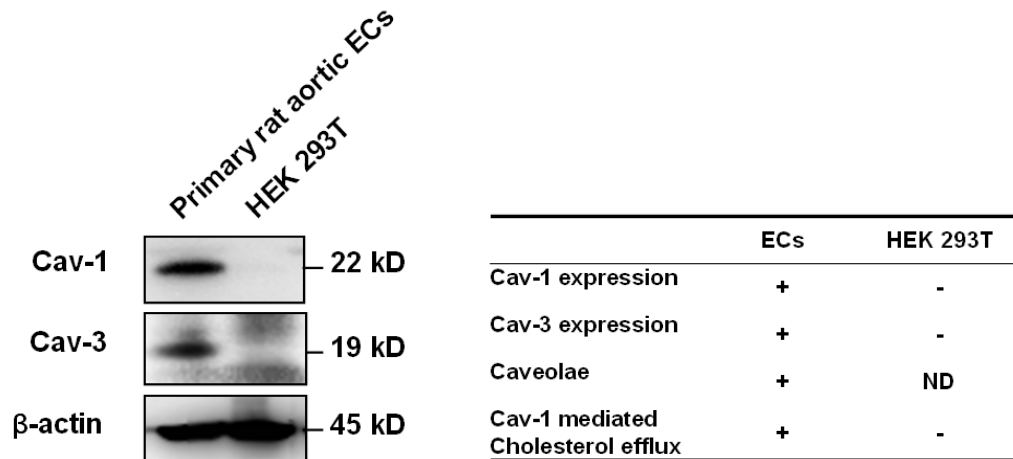
圖二十二、模式圖一：caveolin-1 會藉由幫助形成 caveolae 結構且增加 ABCA1 表現來幫助內皮細胞膽固醇釋出。



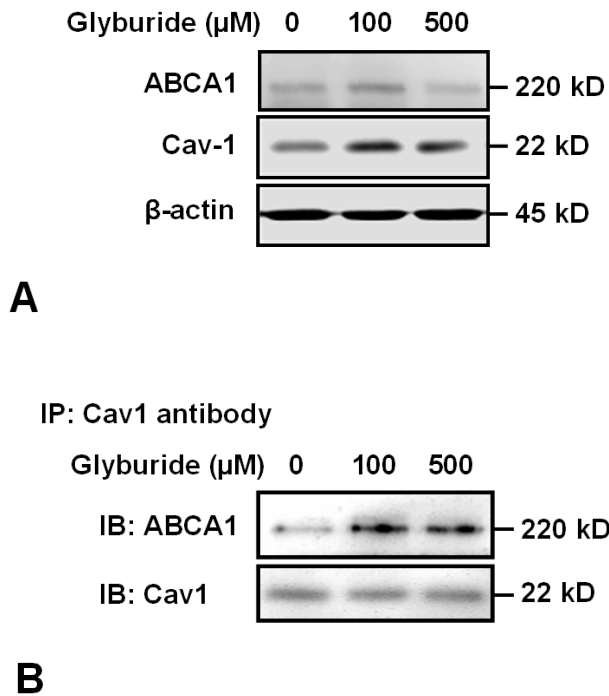
圖二十三、模式圖二：caveolin-1 與 ABCA1 結合共同以胞囊形式運送細胞內膽固醇到細胞膜上來幫助高密度脂蛋白所調控的膽固醇釋出，此路徑會被三種胞囊抑制劑：progesterone、brefeldin A 及 monensin 所抑制的模式圖。



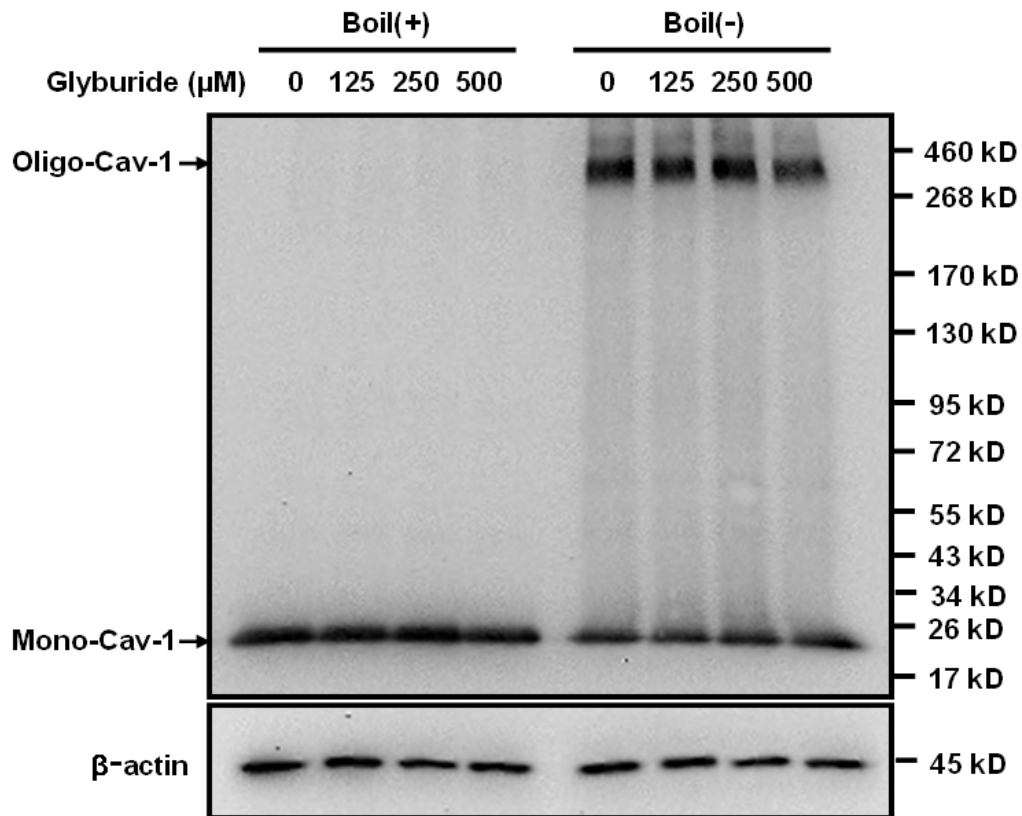
圖二十四、模式圖三：(a) 高密度脂蛋白而非 apoAI 載脂蛋白會藉由還不清楚的機制先升高 ABCA1 mRNA 及蛋白表現，(b) ABCA1 會藉由幫助 caveolin-1 寡聚化來幫助 caveolin-1 離開高基氏體，(c) ABCA1 會與 oligomer-caveolin-1 結合共同運送膽固醇到細胞膜上來幫助高密度脂蛋白所調控的膽固醇釋出。



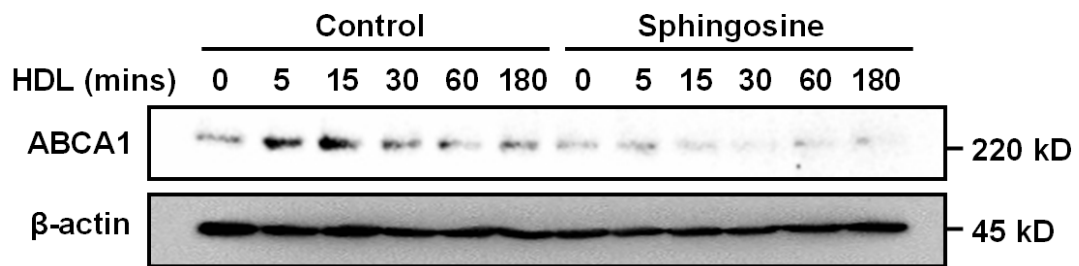
圖二十五、初代培養動脈內皮細胞及 HEK293T 細胞株中 caveolin-1 與 caveolin-3 蛋白表現圖 (A) 及轉殖 caveolin-1 進動脈內皮細胞及 HEK293T 細胞株中是否幫助形成 caveolae 結構及幫助膽固醇釋出整理圖 (B) (Lin et al., 2007; Matveev et al., 2001)。(ND: non determine)



圖二十六、ABCA1 的抑制劑：glyburide，不會破壞 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白間的交互作用。將餵食膽固醇 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的內皮細胞分別處理不同劑量的 glyburide 24 小時，接著加入高密度脂蛋白 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 於培養液中，最後使用西方點墨法 **(A)** 及利用抗 caveolin-1 抗體做免疫沉澱法 **(B)** 分析 caveolin-1 與 ABCA1 蛋白表現量及蛋白間交互作用。



圖二十七、ABCA1 的抑制劑，glyburide 不會抑制 caveolin-1 寡聚化。將餵食膽固醇 (50 μ g/ml) 的內皮細胞處理不同劑量的 glyburide (0 μ M、125 μ M、250 μ M、500 μ M) 24 小時，接著加入高密度脂蛋白 (50 g/ml) 於培養液中，利用西方點墨法分析 caveolin-1 蛋白總表現量 (處理 β - mercaptoethanol 100°C 6 分鐘) 及 oligomer-caveolin-1 表現量 (未處理 β - mercaptoethanol 100°C 6 分鐘)。



圖二十八、PKC 的抑制劑：sphingosine 會抑制 HDL 所增加的 ABCA1 蛋白表現量。將細胞餵食膽固醇 24 小時後，將細胞繼續餵食膽固醇並伴隨處理 sphingosine (100 mM) 24 小時，再處理高密度脂蛋白 (50 μ g/ml) 及 sphingosine (100 mM) 0、5、15、30、60、180 分鐘，再利用西方點墨法分析 ABCA1 的蛋白表現。控制組細胞中，高密度脂蛋白會於 5~15 分鐘時增加 ABCA1 表現量，而 sphingosine 會抑制高密度脂蛋白所增加的 ABCA1 蛋白表現。

個人資料

中文姓名：林玉俊

英文姓名：Yu-Chun, Lin

出生日期：1981年7月16日

戶籍地址：苗栗縣苗栗市北苗里自治路62巷50號

聯絡電話：(家) 037-356592

(手機) 0923648586

電子信箱：yuchunlin@livemail.tw

學歷：

東海大學生物系學士 (1999-2003)

東海大學生命科學系碩士生 (2003-2004)

東海大學生命科學系博士 (2004-2008)

經歷：

東海大學生命科學系普通生物學兼任助教 (2003-2004)

東海大學生命科學系細胞生物學兼任助教 (2004-2005)

榮譽：

2006 The Phi Tau Phi Scholastic Honor Society of the Republic of China.

2007 Chinese Society of Cell and Molecular Biology, Research Assistant,
Graduate Student and Postdocs Traveling Award, Taiwan.

2008 The 16th Symposium on Recent Advances in Cellular and Molecular

Biology, Excellent Poster Award, Taiwan.

2008 The 3rd NTU-Kyoto U student Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology, Outstanding poster design and presentation, Japan.

期刊論文發表：

1. Chao, W.T., Tsai, 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332, 743-749. (SCI)
2. Lin, W.W., **Lin, Y.C.**, Chang, T.Y., Tsai, S.H., Ho, H.C., Chen, Y.T., and Yang, V.C. (2006). Caveolin-1 expression is associated with plaque formation in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54, 897-904. (SCI)
3. **Lin, Y.C.**, Ma, C., Hsu, W.C., Lo, H.F., and Yang, V.C. (2007). Molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 on high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. *Cardiovascular Research* 75, 575-583. (SCI)
4. **Lin, Y.C.**, Lin, C.H., Yang, V.C. (2008). ABCA1 modulates the oligomerization and Golgi exit of caveolin-1 during HDL-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. (Submitted)
5. Ho, H.C., Lin, W.W., **Lin, Y.C.**, Yang, V.C. (2008). Application of infiltrator angioplasty balloon catheter to deliver caffeic acid phenethyl ester or caveolin-1 gene into arterial walls of rabbits: something beyond stent. (Submitted)

研討會論文發表：

1. Chao, W.T., Tsai, S.H., **Lin, Y.C.**, Yang, V.C. (2004). Cellular localization and interaction of HDL, caveolin-1, and ABCA1 in cholesterol-loaded aortic endothelial cells. The American Society of Cell Biology 44th Annual Meeting. Washington D.C., U.S.A.
2. **Lin, Y.C.**, Lin, W.W., Yang, V.C. (2005). Roles of caveolin-1 and ABCA1 on cholesterol efflux in rat aortic endothelial cells. The American Society of Cell Biology 45th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A.
3. **Lin, Y.C.**, Hsu, W.C., Lo, H.F., Yang, V.C. (2006). Interaction of caveolin-1 and ATP-Binding Cassette Transporter A1 on Cholesterol efflux. The American Society of Cell Biology 46th Annual Meeting. San Diego, U.S.A.
4. **Lin, Y.C.**, Yang, V.C. (2007) Downregulation of ABCA1 reduces oligomerization and blocks Golgi exit of caveolin-1 in aortic endothelial cells. The American Society of Cell Biology 47th Annual Meeting. Washington D.C., U.S.A.
5. **Lin, Y.C.**, Hsu, W.C., Lo, H.F., Yang, V.C. (2008). The relationships between caveolin-1 and ABCA1 on the HDL-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. The 16th Symposium on Recent Advances in Cellular and Molecular Biology. KenTing, Taiwan.
6. **Lin, Y.C.**, Hsu, W.C., Lo, H.F. Lin, C.H., Yang, V.C. (2008). The relationships between caveolin-1 and ABCA1 on the HDL-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. The 3rd NTU-Kyoto U Student Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology. Kyoto, Japan.

Curriculum Vitae

PERSONAL

Name: Yu-Chun Lin

Birthday: JUL 16, 1981

Nationality: Taiwan, R.O.C.

Sex: Male

CONTACT INFORMATION

No 50, Lane 62, Zihjhih Rd, Miaoli, Taiwan.

TEL: 886-37-356592

Cell phone: 886-923648586

e-mail: yuchunlin@livemail.tw

EDUCATION

B.S., Department of Biology, Tunghai University, Taiwan. (1999-2003)

M.S. student, Department of Life Science, Tunghai University, Taiwan.
(2003-2004)

Ph.D., Department of Life Science, Tunghai University, Taiwan
(2004-2008)

HONOR

2006 The Phi Tau Phi Scholastic Honor Society of the Republic of China.

2007 Chinese Society of Cell and Molecular Biology, Research Assistant,
Graduate Student and Postdocs Traveling Award, Taiwan.

2008 The 16th Symposium on Recent Advances in Cellular and Molecular
Biology, Excellent Poster Award, Taiwan.

2008 The 3rd NTU-Kyoto U student Mini-Symposium on Molecular and
Cell Biology, Outstanding poster design and presentation, Japan.

Publication

Refereed paper:

1. Chao, W.T., Tsai, 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. *Biochemical and
Biophysical Research Communications* 332, 743-749. (SCI)
2. Lin, W.W., **Lin, Y.C.**, Chang, T.Y., Tsai, S.H., Ho, H.C., Chen, Y.T.,
and Yang, V.C. (2006). Caveolin-1 expression is associated with

- plaque formation in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54, 897-904. (SCI)
3. **Lin, Y.C.**, Ma, C., Hsu, W.C., Lo, H.F., and Yang, V.C. (2007). Molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 on high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. *Cardiovascular Research* 75, 575-583. (SCI)
 4. **Lin, Y.C.**, Lin, C.H., Yang, V.C. (2008). ABCA1 modulates the oligomerization and Golgi exit of caveolin-1 during HDL-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. (Submitted)
 5. Ho, H.C., Lin, W.W., **Lin, Y.C.**, Yang, V.C. (2008). Application of infiltrator angioplasty balloon catheter to deliver caffeic acid phenethyl ester or caveolin-1 gene into arterial walls of rabbits: something beyond stent. (Submitted)

Conference paper:

1. Chao, W.T., Tsai, S.H., **Lin, Y.C.**, Yang, V.C. (2004). Cellular localization and interaction of HDL, caveolin-1, and ABCA1 in cholesterol-loaded aortic endothelial cells. The American Society of Cell Biology 44th Annual Meeting. Washington D.C., U.S.A.
2. **Lin, Y.C.**, Lin, W.W., Yang, V.C. (2005). Roles of caveolin-1 and ABCA1 on cholesterol efflux in rat aortic endothelial cells. The American Society of Cell Biology 45th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A.
3. **Lin, Y.C.**, Hsu, W.C., Lo, H.F., Yang, V.C. (2006). Interaction of caveolin-1 and ATP-Binding Cassette Transporter A1 on Cholesterol efflux. The American Society of Cell Biology 46th Annual Meeting. San Diego, U.S.A.
4. **Lin, Y.C.**, Yang, V.C. (2007) Downregulation of ABCA1 reduces oligomerization and blocks Golgi exit of caveolin-1 in aortic endothelial cells. The American Society of Cell Biology 47th Annual Meeting. Washington D.C., U.S.A.
5. **Lin, Y.C.**, Hsu, W.C., Lo, H.F., Yang, V.C. (2008). The relationships between caveolin-1 and ABCA1 on the HDL-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. The 16th Symposium on Recent Advances in Cellular and Molecular Biology. KenTing, Taiwan.
6. **Lin, Y.C.**, Hsu, W.C., Lo, H.F. Lin, C.H., Yang, V.C. (2008). The relationships between caveolin-1 and ABCA1 on the HDL-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. The 3rd NTU-Kyoto U

Student Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology. Kyoto,
Japan.

Molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 on high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells

Yu-Chun Lin, Chang Ma, Wei-Ching Hsu, Hsiao-Fan Lo, Vivian C. Yang*

Department of Life Science, Tunghai University, Taichung, Taiwan, ROC

Received 1 January 2007; received in revised form 9 April 2007; accepted 16 April 2007

Available online 21 April 2007

Time for primary review 29 days

Abstract

Objective: Caveolin-1 and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) are proteins that are involved in cellular cholesterol efflux. In this study, we analyzed the relationships between caveolin-1 and ABCA1 on high-density lipoprotein (HDL)-mediated cholesterol efflux in rat aortic endothelial cells.

Methods and results: Overexpression of caveolin-1 by transfection with caveolin-1 cDNA in aortic endothelial cells up-regulated ABCA1 expression and enhanced cholesterol efflux. Suppression of caveolin-1 by siRNA decreased ABCA1 expression and reduced cholesterol efflux. The number of caveolae increased after transfection with caveolin-1 into cells. Immunoprecipitation assays revealed a molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 in the plasma membrane and in the cytoplasm after HDL incubation. Immunoelectron microscopy demonstrated that caveolin-1 colocalized with ABCA1 in the caveolae and in the cytoplasmic vesicles; it was also found that caveolin-1 and ABCA1 colocalized with cellular cholesterol by immunofluorescence microscopy. Blocking of intracellular lipid transport by inhibitors disrupted the interaction between caveolin-1 and ABCA1 and reduced cholesterol to methyl- β -cyclodextrin and HDL.

Conclusions: The molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 is associated with the HDL-mediated cholesterol efflux pathway in aortic endothelial cells.

© 2007 European Society of Cardiology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Caveolin-1; ABCA1; HDL; Cholesterol efflux; Aortic endothelial cells

1. Introduction

Caveolae are free cholesterol-rich, invaginated microdomains (50–100 nm in diameter) at the surface of most peripheral cells. They have been implicated in many cellular activities [1]. Caveolin-1, the main structural protein of caveolae, is involved in the regulation of cellular cholesterol metabolism and lipid uptake, as well as efflux [2]. However, the effect of caveolin-1 expression on cholesterol efflux is still controversial [3–8]. For example, cholesterol efflux increased in L1210-JF cells and human fibroblasts after transfection with caveolin-1 [3,4]. On the contrary, the inhibition of caveolin-1

expression was shown to stimulate high-density lipoprotein (HDL)-mediated cholesterol efflux in NIH-3T3 fibroblasts [5]. Several other studies have indicated that there was no alteration of cholesterol efflux after transfection with caveolin-1 [6–8]. Aortic endothelial cells (ECs) represent one of the major cell types involved in atherogenesis, however, the formation of caveolae after overexpression of caveolin-1 and its effect on cholesterol efflux have not yet been investigated.

In addition to caveolin-1, it is well known that ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) at the plasma membrane also functions in cellular lipid efflux in the presence of apolipoproteins [9]. Tangier disease, a rare genetic condition caused by loss-of-function mutations in the ABCA1 transporter that eliminate apoAI-stimulated cholesterol efflux [10]. Tangier disease patients have near-absence of circulating HDL [11]. Loss of ABCA1 activity specifically in macrophages may predispose them to foam cell formation [12]. The aortic

Abbreviations: ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; HDL, high-density lipoprotein; siRNA, small interfering RNA; ECs, endothelial cells.

* Corresponding author. Tel.: +886 4 23590121x2481; fax: +886 4 23590296.

E-mail address: vcyang@thu.edu.tw (V.C. Yang).

endothelium interacts continuously with plasma proteins and is the most resistant to cholesterol accumulation among the cells that compose the atherosclerotic plaque. They do not undergo the foam cell phenotype changes seen in macrophages and smooth muscle cells in the plaque. We, therefore, speculate that ABCA1 might play a role in aortic ECs during the cellular cholesterol efflux.

The caveolin-1 and ABCA1 are expressed coordinately in differentiated THP-1 cells [13]. Our previous study provided evidence for an interaction between ABCA1 and caveolin-1 in the cell lysate of aortic ECs after HDL incubation [14]. It is appealing to assume that the interaction of caveolin-1 and ABCA1 may be important in the cholesterol efflux in aortic endothelium. In the present study, we aimed to further clarify the relationships between caveolin-1 and ABCA1 on HDL-mediated cholesterol efflux in aortic ECs.

2. Methods

2.1. Cell culture and HDL isolation

Sprague–Dawley rats 4 weeks old were sacrificed. Rings 1 mm thick were cut from the thoracic aorta, cultured at 37 °C in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin–streptomycin (50 U/ml) under 5% CO₂/95% air atmosphere. In order to establish pure endothelial cell cultures, ring explants were removed after 3–4 days of culture. Cultures exhibiting pure ECs, maintained for 2–7 passages, were used in the experiment. Prior to the experiment, subconfluent monolayers of endothelial cells were washed twice with PBS containing fatty acid-free albumin (FAFA, 2 mg/ml) and incubated with DMEM containing FAFA (2 mg/ml) and cholesterol (50 µg/ml) in ethanol (10 mg/ml) for 24–48 h at 37 °C. HDL isolation was performed according to the method by Chao et al. [15]. The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

2.2. Transient transfection of plasmids and small interfering RNA (siRNA)

A full length rat caveolin-1 cDNA was subcloned into pcDNA 3.1 vector using *EcoRI* sites; the resulting plasmid was called pCav-cDNA. siRNA targeting to caveolin-1 (Dharmacon), siRNA targeting to ABCA1 (Qiagen) and rat scrambled-siRNA (Dharmacon) was used to modulate caveolin-1 and ABCA1 expression. Twenty-four hours before transfection, 3×10^4 cells were seeded per 24-well plate. On the day of transfection, 1 µg of plasmid DNA or 50 nM siRNA was diluted in 25 µl of serum-free DMEM. In a separate tube, 1 µl of lipofectamine (Invitrogen) was diluted in 25 µl of serum-free DMEM. The diluted DNA and the lipofectamine were then gently mixed and incubated at 25 °C for 20 min. After the incubation, 250 µl of serum-free DMEM was added to the DNA/lipofectamine mixture. The

final mixture was added into cultured cells which were grown on 24-well plate. After incubation at 37 °C for 5 h, the cells were added to 250 µl of DMEM containing 20% serum and grown for an additional 24 h.

2.3. Reverse transcription PCR

Total RNA was isolated from ECs with TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was prepared with an oligo(dT) primer and Omniscript® Reverse Transcription kit (Qiagen) and amplified by polymerase chain reaction (PCR) with Taq DNA polymerase and standard protocol (Promega). Primers used in this experiment were as follows: rat caveolin-1 forward, 5' ATGTCTGGGGGGTAAATAC3' and reverse, 5' CTATA-TCTCTTCCTGCGTG3'; rat ABCA1 forward, 5' GG-GTGGAGGACAGAATGACATC3' and reverse, 5' CCCAGTTTTTCGAATTGCC3'; rat β-actin forward, 5' ACACTGTGCCCATCTACGAG3', and reverse, 5' CGGA-ACCCTCATTGCCAAT3'. The amplified products were separated on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under ultraviolet illumination.

2.4. Immunoblot analysis

Cell lysate was harvested in lysis buffer (Tris–HCl, 10 mM, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 1 mM benzamidine, 0.5 mM EDTA, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride dissolved in dimethyl sulfoxide), homogenized, and centrifuged for 10 min at 800 g at 4 °C. The protein concentration of post-nuclear supernatants was measured with the BCA protein assay (Pierce). The protein was separated by 8% SDS-PAGE for ABCA1 and 12% SDS-PAGE for caveolin-1. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane (Millipore). Blots were probed with mouse anti-human ABCA1 (1:1000, v/v, Abcam), rabbit anti-human caveolin-1 (1:5000, v/v, Santa Cruz), and mouse anti-β-actin (1:10,000, v/v, Sigma) primary antibody. The appropriate HRP-conjugated secondary IgG antibodies were visualized using enhanced chemiluminescence reagent (NEN). The intensity of reaction bands was analyzed by an Image Gauge system (Fuji).

2.5. Immunoprecipitation analysis

The cholesterol-loaded ECs were grown on a T25 flask and incubated with HDL medium (50 µg/ml) at 37 °C for 1 h. Cells were then placed on ice for 15 min and washed 3 times with PBS. Dithiobis (DSP, Sigma) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) immediately before use, diluted to 250 µM with PBS, and added in the flask. Cells were then incubated with DSP solution at room temperature for 1 h. After incubation, the cells were washed twice with PBS and lysed with lysis buffer (1% NP-40, 0.25% deoxycholic acid and 15 mM imidazole) overnight at 4 °C. The immunoprecipitation was performed with a reversible immunoprecipitation system kit (Upstate). In brief, a 500 µl aliquot of diluted cell lysate

(500 μg) was incubated with 10 μl (4 μg) rabbit anti-human caveolin-1 antibody (Santa Cruz), 10 μl (4 μg) mouse anti-human ABCA1, 10 μl (4 μg) non-immune rabbit IgG and 10 μl (1 μg) antibody capture affinity ligand on a rocking platform at 4 °C overnight. The lysate and antibody mixture were transferred to an affinity spin column and centrifuged for 5–10 min at 1500 g . After centrifugation, the final “flow through” samples were tested by western blot analysis as the controls. The spin column was washed with release lysis/wash buffer and IP elution buffer. The eluted proteins and the control samples were determined by immunoblot analysis.

2.6. Subcellular membrane fractionation

Subcellular membrane fractionation was performed as described by Wu et al. [16] with a minor modification. In

brief, the cholesterol-loaded cells grown on a T25 flask were harvested and lysed with cold extract solution (0.02 M boric acid, 0.3 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, pH 10) for 15 min on ice with vortexing every 5 min. The cell debris and nuclei were discarded after centrifugation at 650 g for 10 min at 4 °C, and supernatant was centrifuged at 12,000 g for 1 h at 4 °C. Subsequently, the harvested pellet was plasma membrane fraction, and the supernatant was concentrated by Nanosep® Centrifugal Devices (Pall) as cytoplasm fraction.

2.7. Immunofluorescence staining

Endothelial cells grown on a cover slip in a 24-well plate were incubated with cholesterol (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h and treated with HDL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 5 min at 37 °C. The cells were then chilled on ice, washed 3 times with cold PBS–albumin, and fixed in 2% paraformaldehyde for 25 min at room temperature. After fixation, the cells were blocked with PBS–albumin either in the presence or absence of filipin (0.05%). After washing with PBS, cover slip cultures were incubated with rabbit anti-human caveolin-1 antibody (1:200; Santa Cruz), mouse anti-human ABCA1 (1:50; Abcam) and Golgi marker, mouse anti-rat 58 k Golgi protein (1:50; Abcam), for 30 min at room temperature. Cover slips were then washed three times with PBS and incubated for 30 min with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200; Zymed), and TRITC-conjugated goat anti-mouse IgG (1:200; Zymed). Cover slips were washed 3 times with PBS, mounted on slides, and photographed with a Nikon E400 immunofluorescence microscope (Nikon).

2.8. Immunoelectron microscopy

The pcDNA and pCav-cDNA transfected cells were treated with cholesterol for 24 h. After washing in PBS–albumin three times, cells were incubated with HDL medium (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 37 °C for 5 min. After incubation, the cells were chilled on ice, washed 3 times with ice-cold PBS–albumin, and then prefixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at 4 °C. After washing, the prefixed cells were incubated with rabbit anti-caveolin-1 primary antibody (1:40 in PBS–albumin; Santa Cruz) and mouse anti-ABCA1 primary antibody (1:5 in PBS–albumin; Abcam) for 1 h at room temperature. The cells were then washed 3 times with PBS–albumin and incubated with either goat anti-rabbit IgG-15 nm colloidal gold (1:40 in PBS–albumin; EMS), or goat anti-mouse IgG-10 nm colloidal gold (1:40 in PBS–albumin; EMS) for 1 h. After washing 3 times with PBS–albumin, the cells were post-fixed with 3 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, at 4 °C for 2 h. The cells were then washed 3 times with 0.1 M cacodylate buffer, incubated with 1% OsO₄ for 30 min at 4 °C, dehydrated in a graded ethanol series, and embedded in epon 812 (EMS). Thin sections (80 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed under a Hitachi H-600 transmission electron microscope (Hitachi). Quantitative data were obtained

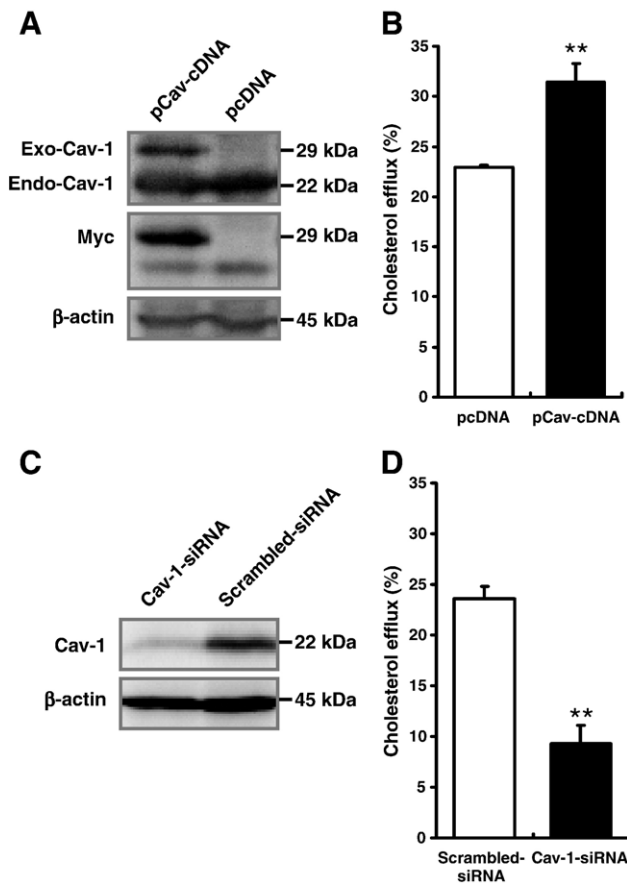


Fig. 1. Effect of caveolin-1 on cholesterol efflux in aortic ECs. ECs were transfected with pCav-cDNA, pcDNA, scrambled-siRNA, and caveolin-1-siRNA, respectively, in the presence of [³H]cholesterol (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) for 24 h. Cholesterol efflux was initiated by adding HDL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and allowed to proceed for 24 h. Immunoblots of protein expression (A) and cholesterol efflux (B) from pCav-cDNA transfected cells and pcDNA transfected cells. Immunoblots of protein expression (C) and cholesterol efflux (D) from scrambled-siRNA transfected cells and caveolin-1-siRNA transfected cells. The data of cholesterol efflux are from 3 independent experiments performed in triplicate. Values are expressed as mean \pm SD. $n=3$; ** $p<0.01$ for test versus control (pCav-cDNA versus pcDNA in [B], caveolin-1-siRNA versus scrambled-siRNA in [D]).

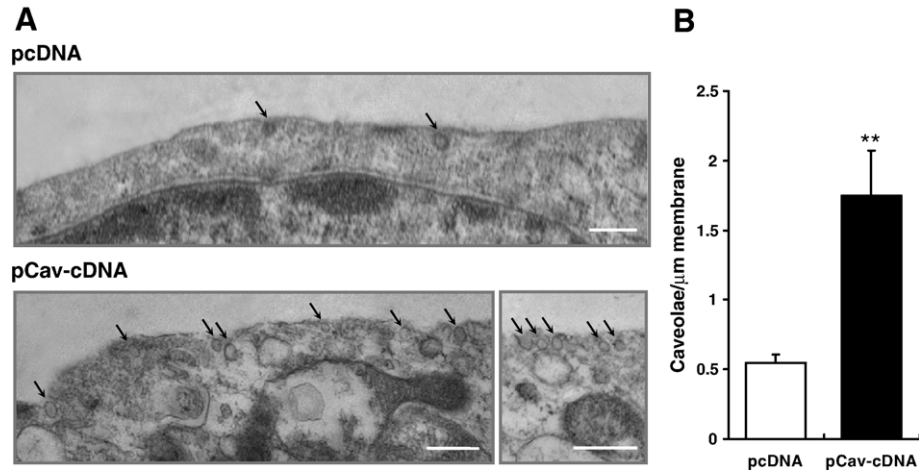


Fig. 2. Caveolin-1 expression induces caveolae formation. (A) Transmission electron micrographs of pcDNA cells and pCav-cDNA transfected cells. Plasma membrane invaginations with the typical bulb-shape and characteristic size are recognized as caveolae (indicated with arrows). Scale bar, 300 nm. Quantitative data indicated that the incidence of caveolae/ μm significantly increased (** $p < 0.01$) in the pCav-cDNA group as compared with pcDNA group.

from three of the six tissue blocks from each group. Fifteen to 25 sections were cut from each block, electron micrographs were taken from each of the five cells in a randomly selected section. The numbers of caveolae per μm were counted over the plasma membrane. Statistical analysis was performed where appropriate using Student's *t*-test.

2.9. Cholesterol efflux

ECs were grown in a 24-well plate for 24 h, followed by transfection with either plasmids or siRNA using lipofectamine for 5 h. The cells were then labeled with 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] cholesterol for 24 h. In the inhibition experiment, ECs labeled with [^3H]cholesterol (0.5 $\mu\text{Ci/ml}$) for 24 h, followed by incubation with progesterone (10 mg/ml), monensin (50 μM), and brefeldin A (50 μM), respectively, for 24 h. Before each efflux experiment, cells were washed with DMEM and then incubated with either HDL medium (50 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h or methyl- β -cyclodextrin (2 mM) for 30 min. After incubation, the medium was collected and the cells were solubilized in 0.5 N NaOH. The radioactivity of the medium and cell extract was measured by TOPcount machinery (PerkinElmer). The results represent radioactivity in the medium as a percentage of the total radioactivity (medium plus cell lysate).

2.10. Statistics

Data are shown as mean \pm SD. The 2 groups were compared by a 2-tailed *t*-test using SAS software.

3. Results

3.1. Caveolin-1 induces cholesterol efflux and caveolae formation in aortic endothelial cells

To evaluate the effect of caveolin-1 on cholesterol efflux in aortic ECs, the level of cholesterol efflux was measured in

up-regulated and down-regulated caveolin-1 cells. Both exogenous c-myc tagged caveolin-1 (29 kDa) and endogenous caveolin-1 (22 kDa) existed in pCav-cDNA transfected cells. The total level of caveolin-1 expression in the pCav-cDNA transfected cells increased by 44% compared with control cells (Fig. 1A). The cholesterol efflux from the pCav-cDNA transfected cells was 37% higher than that in control cells ($p < 0.01$, Fig. 1B). However, the expression of caveolin-1 protein decreased 90% in the siRNA targeting caveolin-1 transfected cells (Fig. 1C), and the cholesterol efflux was reduced by 61% ($p < 0.01$, Fig. 1D). These results indicated that caveolin-1 was a positive regulator of HDL-mediated cholesterol efflux in aortic ECs.

Several studies have demonstrated that caveolae are the major portal for HDL-mediated cholesterol efflux [1,17]. A possible mechanism by which caveolin-1 enhances cholesterol efflux may result from the formation of more caveolae. To address this, we observed an abundance of caveolae in the pCav-cDNA transfected cells and the pcDNA transfected cells by electron microscopy. Numerous caveolae were found in the pCav-cDNA transfected cells, but only a few caveolae were revealed in the control cells (Fig. 2A). Quantitative data indicated that the numbers of caveolae per unit membrane significantly increased in the pCav-cDNA group ($1.74 \pm 0.32/\mu\text{m}$) compared with the pcDNA group ($0.54 \pm 0.06/\mu\text{m}$) (Fig. 2B). Thus, overexpression of caveolin-1 seems to contribute to the formation of caveolae in cells.

3.2. Caveolin-1 positively regulates the ABCA1 expression

In view of the possible link between expression of caveolin-1 and ABCA1, we analyzed the expression of the ABCA1 gene in up-regulated and down-regulated caveolin-1 cells. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that the level of ABCA1 mRNA increased in the up-regulated caveolin-1 cells and decreased in the down-regulated caveolin-1 cells in a dose-

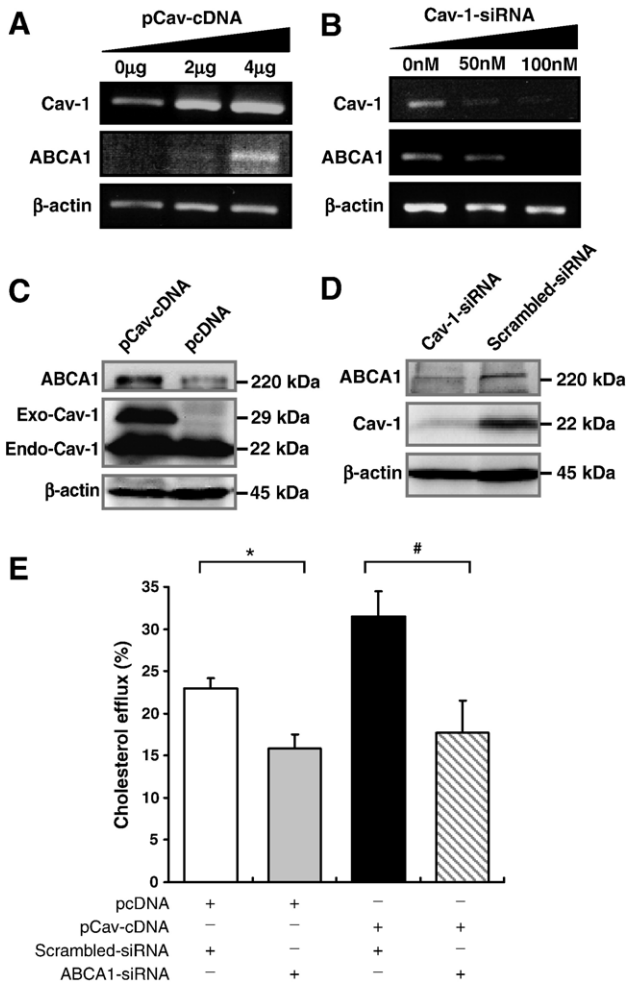


Fig. 3. Caveolin-1 positively regulates ABCA1 expression. ABCA1 is involved in caveolin-1-mediated cholesterol efflux. ECs were transfected with different concentrations of either pCav-cDNA or caveolin-1-siRNA in the presence of cholesterol (50 μ g/ml) for 24 h. Reverse transcription PCR (A and B) and immunoblotting (C and D) for caveolin-1, ABCA1, and β -actin in pCav-cDNA transfected cells and caveolin-1-siRNA transfected cells. (E) ECs were co-transfected with pcDNA and scrambled-siRNA (open bar), pcDNA and ABCA1-siRNA (gray bar), pCav-cDNA and scrambled-siRNA (solid bar), pCav-cDNA and ABCA1-siRNA (hatch bar), respectively, in the presence of [3 H]cholesterol (0.5 μ Ci/ml) for 24 h. Cholesterol efflux was initiated by adding HDL (50 μ g/ml) and allowed to proceed for 24 h. The data of cholesterol efflux are from 3 independent experiments performed in triplicate. Values are expressed as mean \pm SD. * p < 0.05 for pcDNA + scrambled-siRNA versus pcDNA + ABCA1-siRNA, # p < 0.05 for pCav-cDNA + scrambled-siRNA versus pCav-cDNA + ABCA1-siRNA.

dependent manner (Fig. 3A and B). Immunoblotting analysis also showed that the protein level of ABCA1 increased in the up-regulated caveolin-1 cells and decreased in the down-regulated caveolin-1 cells (Fig. 3C and D). These data indicate that caveolin-1 positively regulates ABCA1 expression both at the RNA and protein levels.

We have demonstrated that caveolin-1 positively regulated the cholesterol efflux (Fig. 1A–D). This raises the possibility that caveolin-1 facilitates the cholesterol efflux by inducing ABCA1 expression. To address this, we further examined the effect of ABCA1 expression on the caveolin-1-mediated

cholesterol efflux pathway. The percentage of cholesterol efflux in pCav-cDNA transfected cells was increased by 40% compared with that in pcDNA transfected cells. This increased cholesterol efflux was also markedly reduced by ABCA1-siRNA treatment (p < 0.05, Fig. 3E). Both in pCav-cDNA transfected cells and pcDNA transfected cells, the cholesterol efflux reduced to similar levels after ABCA1-siRNA treatment (p < 0.05, Fig. 3E), indicating that suppression of ABCA1 expression inhibits the caveolin-1-mediated cholesterol efflux. We conclude that ABCA1 is involved in the caveolin-1-mediated cholesterol efflux pathway.

3.3. Caveolin-1 interacts with ABCA1 in plasma membrane and in cytoplasm

Immunoprecipitation analysis indicated that caveolin-1 have protein–protein interaction with ABCA1 in ECs (Fig. 4A). The plasma membrane and cytoplasm were fractionated as described in Methods. Each fraction was analyzed by immunoblotting with the plasma membrane marker, integrin β 1, and the cytoplasmic markers, GAPDH and tubulin. ABCA1 and caveolin-1 were found in both fractions. The fraction-specific immunoprecipitation analysis showed that ABCA1 was co-immunoprecipitated with

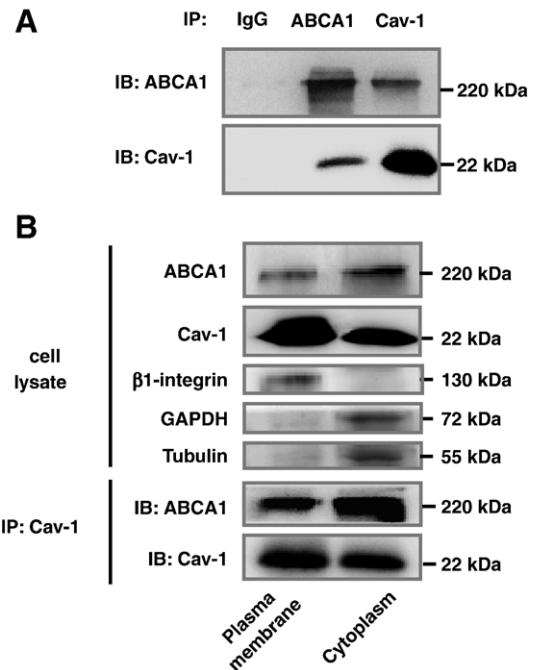


Fig. 4. The molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 occurs in plasma membrane and cytoplasm. ECs were incubated with cholesterol (50 μ g/ml) for 48 h followed by treatment with HDL (50 μ g/ml) for 1 h. Cells were washed 3 times with PBS and exposed to DSP cross-linker for 1 h. (A) Total cell lysates were immunoprecipitated with ABCA1 antibody, caveolin-1 antibody and non-immune rabbit IgG, respectively, and were subjected to immunoblot analysis. (B) ECs were fractionated as described in Methods. Fractionated cellular protein was examined by immunoblot analysis. Fractionated cellular protein was also immunoprecipitated with caveolin-1 antibody and was subjected to immunoblot analysis.

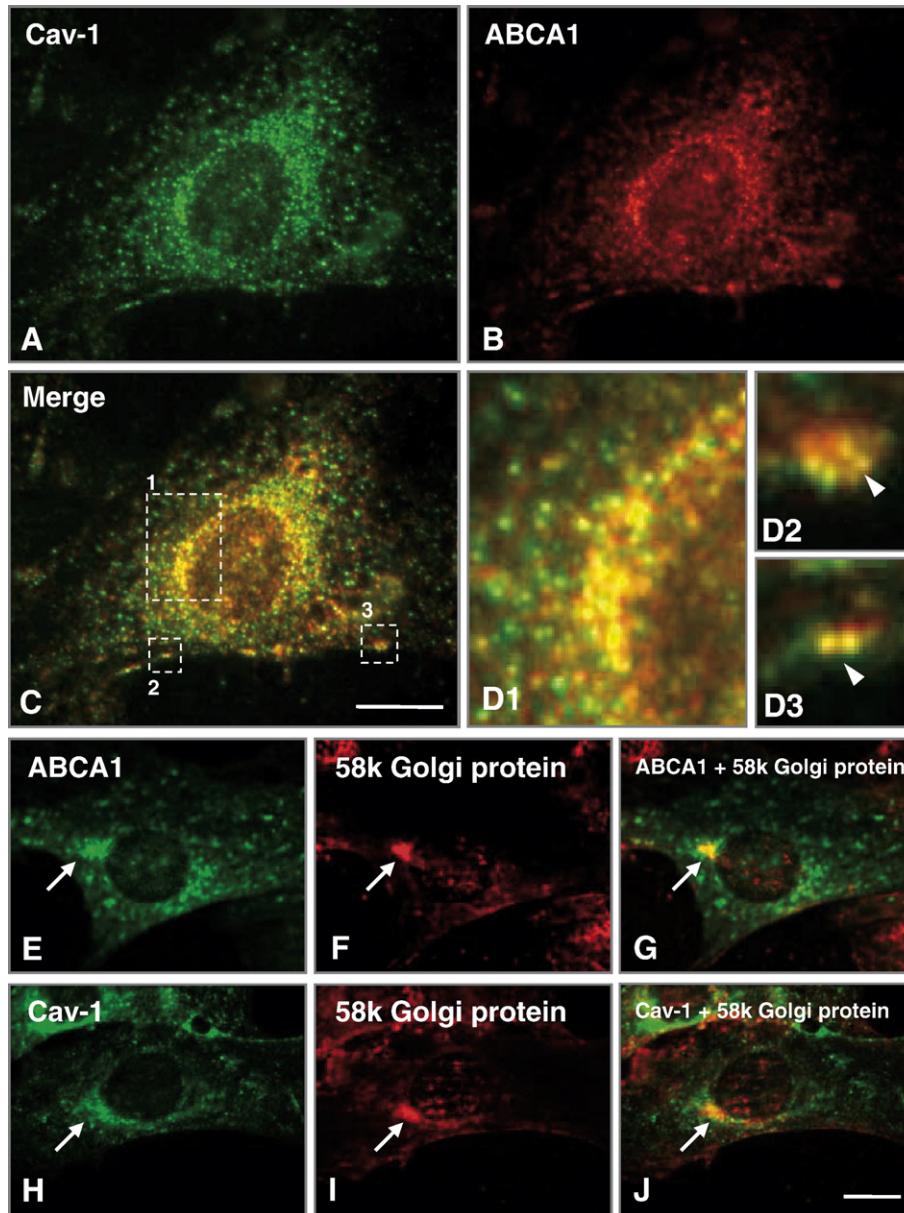


Fig. 5. Immunofluorescence micrographs show the distribution of caveolin-1 (green fluorescence) (A) and ABCA1 (red fluorescence) (B). The caveolin-1 colocalized with ABCA1 (C). Enlarged images of (C) showed the colocalization of caveolin-1 and ABCA1 in the perinuclear region (D1) as well as on the cell surface (D2 and D3). Caveolin-1 (green fluorescence) and ABCA1 (green fluorescence) colocalized with Golgi marker (red fluorescence) in the perinuclear region (E)–(J). Scale bar, 10 μm .

caveolin-1 in the plasma membrane and in the cytoplasm (Fig. 4B). Immunofluorescence microscopy showed that the caveolin-1 intimately colocalized with ABCA1 in the perinuclear region as well as on the cell surface (Fig. 5A–D). The caveolin-1 and ABCA1 colocalized with Golgi marker, 58 k Golgi protein, in the perinuclear region (Fig. 5E–J).

3.4. Colocalization of caveolin-1, ABCA1, and cholesterol in caveolae and cytoplasmic vesicles

ABCA1 was cloned in 1994 [18], and since then the cellular localization of ABCA1 has not been identified at the

ultrastructural level. In the current study, we found that the ABCA1 colloidal gold particles were located predominately in the caveolae structure (Fig. 6A and B) and were occasionally located in the non-caveolae region and in the cytoplasm (data not shown) after HDL incubation. Caveolin-1 colloidal gold particles (15 nm in diameter) colocalized with ABCA1 colloidal gold particles (10 nm in diameter) in the caveolae structure (Fig. 6C and D) and in cytoplasmic vesicles (Fig. 6E and F). We also analyzed the distribution of cellular cholesterol, caveolin-1 and ABCA1 in cholesterol-loaded cells after HDL incubation by immunofluorescence microscopy. We found that caveolin-1 colocalized with ABCA1 in

the perinuclear region and on the cell surface (Fig. 7A–C). The cellular cholesterol, revealed by cholesterol-specific cytochemical staining with filipin [19] (Fig. 7D), was intimately colocalized with caveolin-1 and ABCA1 (Fig. 7E and F).

3.5. Caveolin-1 and ABCA1 are intimately involved in cholesterol efflux via vesicular transport

It has been reported that caveolin-1-mediated lipid transport from Golgi to the plasma membrane is defective in the patients with Tangier disease and in *Abca1*^{-/-} mice [20]. The progesterone, brefeldin A, and monensin were used to examine the effects of these inhibitors on cholesterol efflux [21,22]. Methyl- β -cyclodextrin, which strips free cholesterol from the plasma membrane, was used as an indicator of plasma membrane content [23]. The results showed that all three intracellular lipid transport inhibitors

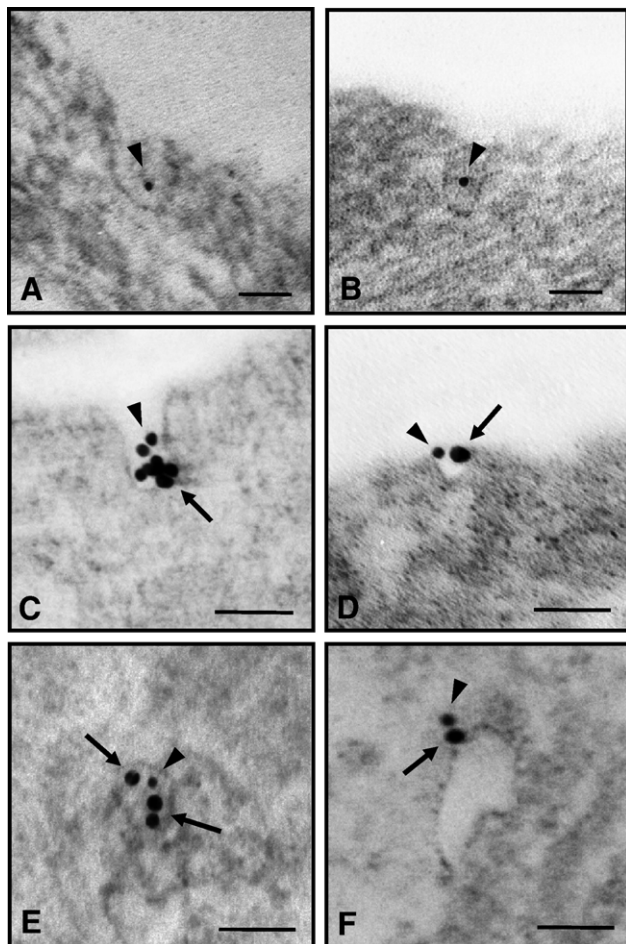


Fig. 6. Caveolin-1 colocalizes with ABCA1 in caveolae and cytoplasmic vesicles. ECs were incubated with cholesterol (50 μ g/ml) for 24 h, and followed by treatment with HDL (50 μ g/ml) for 5 min at 37 $^{\circ}$ C. Cells were then processed as described in Methods. (A and B) ABCA1-gold conjugates present in the caveolae (indicated as arrowheads). The ABCA1-gold conjugates (indicated as arrowheads) and caveolin-1-gold conjugates (indicated as arrows) are seen in caveolae (C and D), and in cytoplasmic vesicles (E and F). Scale bars, 100 nm.

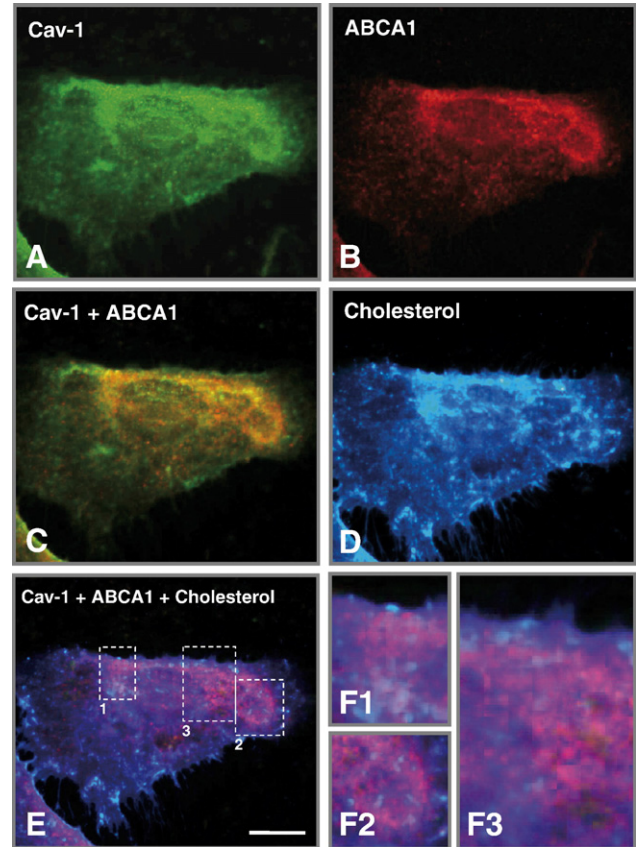


Fig. 7. Caveolin-1 colocalizes with ABCA1 and cholesterol in aortic ECs. ECs were pretreated with cholesterol (50 μ g/ml) for 48 h, and followed by incubation with HDL (50 μ g/ml) for 5 min at 37 $^{\circ}$ C. (A)–(E) The fluorescent images of the ECs stained with caveolin-1, ABCA1 and cholesterol. The green fluorescence, red fluorescence, and blue fluorescence indicate the location of caveolin-1, ABCA1, and cholesterol, respectively. (F1)–(F3) Enlarge merged image of (E) showed the colocalization of caveolin-1, ABCA1 and cholesterol. Scale bar, 10 μ m.

abolished the molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 (Fig. 8A) and reduced the level of cholesterol transport to the plasma membrane (Fig. 8B) as well as efflux of cholesterol from membrane to HDL (Fig. 8C). These results suggested that the interaction between caveolin-1 and ABCA1 modulates cholesterol efflux via vesicular transport.

4. Discussion

Many laboratories have shown that the role caveolin-1 plays in the cholesterol efflux pathway in various cell types is equivocal [3–8]. A possible reason for the various interpretations might be related to the varying degree of caveolae formation after transfection with caveolin-1 in different types of cells [21]. In this study, we revealed that the number of caveolae in aortic endothelial cells dramatically increased after overexpression of caveolin-1. Concomitantly, cholesterol efflux also increased. We suggest that caveolin-1 facilitates cholesterol efflux by inducing caveolae formation in aortic endothelial cells.

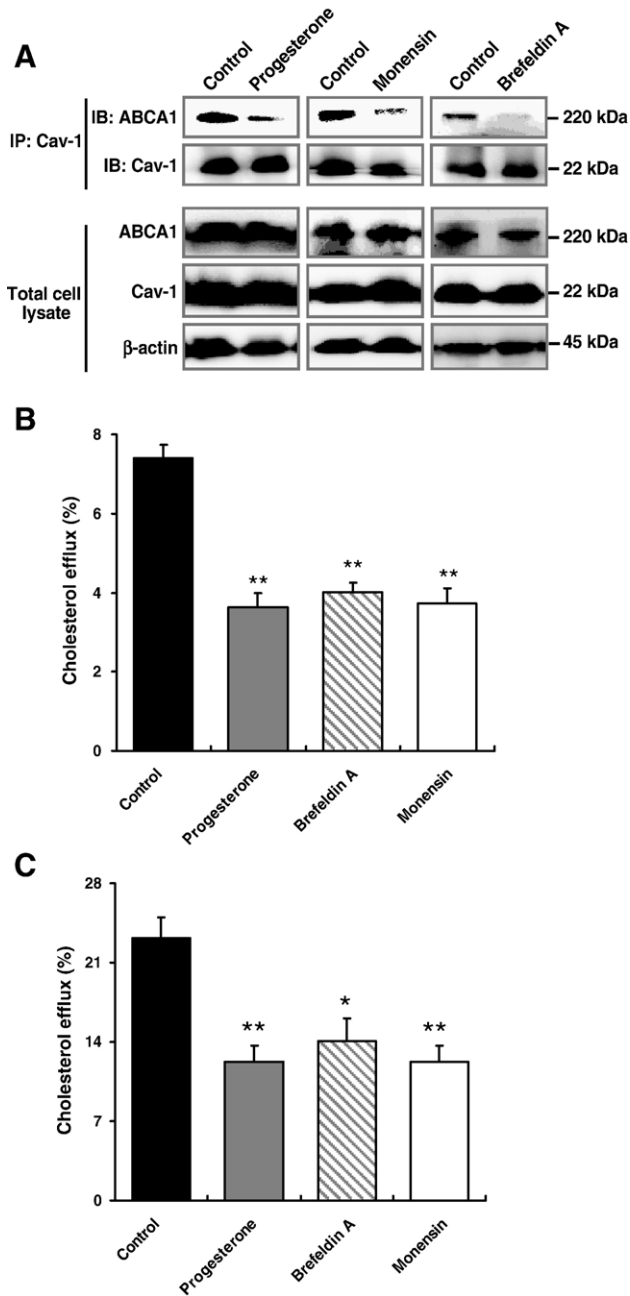


Fig. 8. Vesicular transport inhibitors disrupt the interaction between caveolin-1 and ABCA1 and reduce the cholesterol efflux to methyl- β -cyclodextrin and HDL. (A) ECs were pretreated with cholesterol (50 μ g/ml) and incubated with progesterone (10 mg/ml), monensin (50 μ M), and brefeldin A (50 μ M), respectively. The cells were incubated with HDL (50 μ g/ml) at 37 $^{\circ}$ C for 1 h. The total cell lysates and the protein immunoprecipitated with caveolin-1 antibody were examined by immunoblotting analysis. ECs were labeled with [3 H]cholesterol (0.5 μ Ci/ml) and incubated with inhibitors, respectively. Cholesterol efflux was initiated by adding methyl- β -cyclodextrin (2 mM) (B) or HDL (50 μ g/ml) (C) and was allowed to proceed at 37 $^{\circ}$ C for 30 min or 24 h, respectively. The data of cholesterol efflux are from 3 independent experiments performed in triplicate. Values are expressed as mean \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01 for test versus control.

Multiple mechanisms for efflux of cellular cholesterol have been reported [24]. Accelerated efflux of cholesterol is mediated by several prominent proteins, such as caveolin-1,

ABCA1, ABCG1, SR-BI, and CYP27A1 [25–28]. In this study, we found a molecular interaction between caveolin-1 and ABCA1 in the plasma membrane and cytoplasm. Caveolin-1 also colocalized with ABCA1 and cholesterol in the plasma caveolae and cytoplasm. We suggested that cholesterol is co-transported with caveolin-1 and ABCA1 in the endothelial cells after HDL incubation.

Several studies indicated that newly synthesized free cholesterol in the ER is transported to caveolae in a single step via the cytosolic complex of caveolin-1, HSP56, cyclophyllins and free cholesterol [3,29]. Another study has indicated that intracellular free cholesterol is transported through the trans-Golgi network (TGN) to caveolae via the vesicular complex of caveolin-1-VIP 21 [30]. We observed that the caveolin-1 and ABCA1 colocalized with cellular cholesterol in the Golgi apparatus, cytoplasmic vesicles, and plasma membrane caveolae. It raised the possibility that the caveolin-1 and ABCA1 transport the free cholesterol from the TGN to plasma membrane caveolae. Monensin, an inhibitor of vesicular transport, has been used as one criterion for verifying passage of molecules through the Golgi apparatus [31]. Brefeldin A disassembles the Golgi apparatus by targeting the cis- and medial Golgi cisternae [32] and blocks anterograde transport of cholesterol to an acceptor particle. Indeed, Mendez has reported that monensin and brefeldin A inhibited HDL-mediated cholesterol efflux [33]. In our study, we demonstrated that monensin and brefeldin A disrupted the interaction between caveolin-1 and ABCA1, and reduced the HDL-mediated cholesterol efflux. Taken together, we assume that the interaction between caveolin-1 and ABCA1 plays an important role in the lipids transport between the Golgi apparatus and the plasma membrane caveolae.

It has been reported that cellular lipid transport from the Golgi to the plasma membrane is defective, and that caveolin-1 is retained in the Golgi complex in the patients with Tangier disease and in *Abca1*^{-/-} mice [20]. It raises the possibility that wild-type ABCA1 functions as an accessory protein in caveolin-1-mediated lipid transport from Golgi to plasma membrane. Whether ABCA1 functions as an accessory protein in the aortic ECs during cholesterol transport from Golgi to plasma membrane is an interesting issue and should be investigated in the future.

Acknowledgment

This research was supported by Grant NSC-95-2311-B-029-003-from the National Science Council, Taiwan, Republic of China.

References

- [1] Fielding CJ, Fielding PE. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:210–22.
- [2] Fielding CJ, Fielding PE. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;49:251–64.

- [3] Smart EJ, Ying Y-S, Donzell WC, Anderson RGW. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 1996;271:29427–35.
- [4] Fielding CJ, Bist A, Fielding PE. Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts. *Biochemistry* 1999;38:2506–13.
- [5] Frank PG, Galbiati F, Volonte D, Razani D, Cohen DE, Marcel YL, et al. Influence of caveolin-1 on cellular cholesterol efflux mediated by high-density lipoproteins. *Am J Physiol* 2001;280:C1204–14.
- [6] Matveev S, Uittenbogaard A, van Der Westhuyzen D, Smart EJ. Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester. *Eur J Biochem* 2001;268:5609–16.
- [7] Wang L, Connelly MA, Ostermeyer AG, Chen H-H, Williams DL, Brown DA. Caveolin-1 does not affect SR-BI-mediated cholesterol efflux or selective uptake of cholesteryl ester in two cell lines. *J Lipid Res* 2003;44:807–15.
- [8] Frank PG, Marcel YL, Connelly MA, Lublin DM, Franklin V, Williams DL, et al. Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. *Biochemistry* 2002;41:11931–40.
- [9] Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of apoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABCA1. *J Biol Chem* 2000;275(42):33053–8.
- [10] Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999;22(4):352–5.
- [11] Schaefer EJ, Zech LA, Schwartz DE, Brewer Jr HB. Coronary heart disease prevalence and other clinical features in familial high-density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Ann Intern Med* 1980;93:261–6.
- [12] Von Der Thusen JH, Kuiper J, Fekkes ML, De Vos P, Van Berkel TJ, Biessen EA. Attenuation of atherogenesis by systemic and local adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-10 in LDLr^{-/-} mice. *FASEB J* 2001;15(14):2730–2.
- [13] Arakawa R, Abe-Dohmae S, Asai M, Ito JI, Yokoyama S. Involvement of caveolin-1 in cholesterol enrichment of high density lipoprotein during its assembly by apolipoprotein and THP-1 cells. *J Lipid Res* 2000;41:1952–62.
- [14] 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;332:743–9.
- [15] Chao WT, Fan SS, Yang VC. Visualization of the uptake of high-density lipoprotein by rat aortic endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. *Histochem J* 2002;34:232–9.
- [16] Wu CA, Tsujita M, Hayashi M, Yokoyama S. Probucol 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* 2004;279:30168–74.
- [17] Fielding PE, Fielding CJ. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* 1995;34:14288–92.
- [18] Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* 1994;21:150–9.
- [19] Neufeld EB, Stonik JA, Demosky Jr SJ, Knapper CL, Combs CA, et al. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insight from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J Biol Chem* 2004;279:15571–8.
- [20] Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, et al. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet* 2000;24:192–6.
- [21] Fu Y, Hoang A, Escher G, Parton RG, Krozowski Z, Sviridov D. Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J Biol Chem* 2004;279:14140–6.
- [22] Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, et al. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem* 2001;276:27584–90.
- [23] Le Goff W, Peng D-Q, Settle M, Brubaker G, Morton RE, Smith JD. Cyclosporin A traps ABCA1 at the plasma membrane and inhibits ABCA1-mediated lipid efflux to apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2155–61.
- [24] Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:712–9.
- [25] O'Connell BJ, Denis M, Genest J. Cellular physiology of cholesterol efflux in vascular endothelial cells. *Circulation* 2004;110:2881–8.
- [26] Liao H, Langmann T, Schmitz G, Zhu Y. Native LDL upregulation of ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:127–32.
- [27] Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997;272:20982–5.
- [28] Escher G, Krozowski Z, Croft KD, Sviridov D. Expression of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) enhances cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2003;278:11015–9.
- [29] Uittenbogaard A, Ying Y-S, Smart EJ. Characterization of a cytosolic heat-shock protein–caveolin chaperone complex. *J Biol Chem* 1998;273:6525–32.
- [30] Kurzchalia TV, Dupree P, Monier S. VIP21-caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae. *FEBS Lett* 1994;346:88–91.
- [31] Mollenhauer HH, Morre DJ, Rowe LD. Alteration of intracellular traffick by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1990;1031:225–46.
- [32] Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 1992;116:1071–80.
- [33] Mendez AJ. Monensin and brefeldin A inhibit high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux from cholesterol-enriched cells. *J Biol Chem* 1995;5891–900.