

目錄

目錄.....	1
中文摘要.....	5
英文摘要.....	6
前言.....	8
低密度脂蛋白與動脈硬化.....	8
高密度脂蛋白與抗動脈硬化.....	9
膽固醇在細胞中的代謝機制.....	10
高密度脂蛋白與周邊細胞的作用.....	11
Caveolae 與高密度脂蛋白.....	13
ABCA-1 與高密度脂蛋白.....	15
論文研究方向.....	16
材料與方法.....	20
細胞培養.....	20
膽固醇的培養實驗.....	21
高密度脂蛋白與細胞的接合及吸收.....	21
電子顯微鏡法.....	22
量化分析.....	23
西方點墨分析法.....	23

細胞免疫化學染色法.....	25
抑制 endosome 路徑的實驗.....	26
免疫電子顯微鏡法.....	27
結果.....	28
高密度脂蛋白在餵食膽固醇之動脈內皮細胞之吸收方式.....	28
膜小囊在高密度脂蛋白調節膽固醇釋出的過程所扮演的角色..	30
在動脈內皮細胞中的高密度脂蛋白對 caveolin-1 表現及分佈的影 響.....	31
電子顯微鏡之連續切片.....	33
Endosome 標的物與高密度脂蛋白在動脈內皮細胞中的分佈...34	
高密度脂蛋白、caveolin-1 及 ABCA1 在動脈內皮細胞中的表現 及分佈.....	35
討論.....	36
高密度脂蛋白在餵食膽固醇的動脈內皮及平滑肌細胞中的作用 方式.....	36
膜小囊在高密度脂蛋白調節膽固醇釋出的過程中所扮演的角 色.....	37
動脈內皮細胞中的高密度脂蛋白與 caveolin-1 表現及分佈的關 係.....	38

電子顯微鏡之連續切片.....	40
Endosome 標的物與高密度脂蛋白在動脈內皮細胞中的分佈...	41
Caveolae 與細胞骨架.....	42
高密度脂蛋白、caveolin-1 及 ABCA-1 在動脈內皮細胞中的表現 及分佈.....	43
參考文獻.....	45
圖目錄.....	54
附圖一.....	56
附圖二.....	57
附圖三.....	58
附圖四.....	59
附圖五.....	60
圖一.....	61
圖二.....	62
圖三.....	63
圖四.....	64
圖五.....	65
圖六.....	66
圖七.....	67

圖八.....	68
圖九.....	69
圖十.....	70
圖十一.....	71
圖十二.....	72
圖十三.....	73
圖十四.....	74
圖十五.....	75
圖十六.....	76
圖十七.....	77
個人資料.....	78
論文發表.....	79

中文摘要

高密度脂蛋白可藉由膽固醇逆運送的方式來防止動脈硬化的形成，然而對高密度脂蛋白如何將細胞中多餘膽固醇攜出的機轉尚不清楚。過去的研究中發現，caveolae 為一細胞膜凹陷的結構，而 caveolin-1 為其膜上的主要蛋白，在生化實驗的報告中認為 caveolae 在細胞中運送膽固醇及膽固醇酯的進出則扮演重要的角色，但有關高密度脂蛋白調控膽固醇外運送時與 caveolae 在細胞上分佈的情形則尚待釐清。在本實驗中發現高密度脂蛋白在調控內皮及平滑肌細胞中過多膽固醇釋出時，與膜小囊之形成有密切的關係。利用共軛焦顯微鏡及免疫電子顯微鏡觀察結果顯示以膽固醇餵食之細胞與高密度脂蛋白作用後，高密度脂蛋白與 caveolin-1 共同分佈於細胞膜上或穿越整個細胞，而高密度脂蛋白並不與 endosome 標的物 CD71 或 LAMP2 共同分布在細胞中。Endosome 的抑制劑 monensin 也不會改變 HDL-DI 及 caveolin-1 的分佈。在電子顯微鏡的觀察中，高密度脂蛋白與 caveolin-1 則共同分佈於膜小囊中。從以上實驗結果，我們認為高密度脂蛋白主要利用細胞膜上凹陷的 caveolae 結構調節動脈內皮細胞中過多的膽固醇的釋出。

Abstract

It has been demonstrated that the high-density lipoprotein (HDL) has the atheroprotective effect because of its involvement in the reverse cholesterol transport. However there is considerable debate about the mechanisms by which HDL removes excess cholesterol from cells. The non-coated vesicular invaginations structure “caveolae” was recognized as flask-shaped indentations of the cell membrane. Biochemical studies indicated that this structure plays an important role in cellular cholesterol trafficking and facilitates the transferring of free cholesterol and cholesterol ester into and out of the cell. This study demonstrated that the removal of cholesterol from aortic endothelial and smooth muscle cells in the presence of HDL is facilitated by plasmalemmal invaginations and plasmalemmal vesicles. Confocal microscopic analysis demonstrated that HDL-DiI either colocalized with caveolin-1 on the cell surface or throughout the cell. No free HDL-DiI was revealed in the cytoplasm. The HDL-DiI did not colocalize with early endosome marker (CD71) and late endosomal marker (LAMP2). In addition, the monensin (endosome inhibitor) treatment did not change the distribution pattern of HDL and caveolin-1. Immunoelectron microscopy further demonstrated that caveolin-1-gold (15 nm in diameter) conjugates colocalized with HDL-gold (10 nm) conjugates in the plasmalemmal invaginations. These

results indicated that caveolae are the major membrane domains facilitating the transport of excess cholesterol to HDL on the cell surface of aortic endothelial cells.

前言

低密度脂蛋白與動脈硬化

在臨床流行病學的研究中認為動脈硬化的形成與血漿中低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)的含量有密切關係(Kannel et al., 1985)。在正常情況下低密度脂蛋白由肝臟合成後經血液循環送至週邊細胞中,細胞以接受器調控的內胞飲作用將低密度脂蛋白吸收後將其分解成胺基酸及膽固醇供細胞利用(Brown & Goldstein, 1970)。但當動脈血管的內皮細胞一但受到損傷時,通透性發生改變,血漿中大量的低密度脂蛋白就容易進入內皮細胞下層而進一步被氧化成氧化態低密度脂蛋白(ox-LD),而吸附在內皮細胞上的單核球細胞則會移動進入內皮細胞下層並分化為巨噬細胞(macrophage),巨噬細胞會吞噬氧化態低密度脂蛋白最後形成泡沫細胞(foam cell)(附圖 1a)。在內皮細胞堆積的泡沫細胞會釋放許多細胞素(cytokines),刺激內皮下的平滑肌細胞增生接著往內皮細胞下層移動,並釋放細胞外基質(extracellular matrix),使得動脈管壁隆起形成纖維化粥瘤(fibrous plaque)(附圖 1b)。這些由巨噬細胞、平滑肌細胞以及大量堆積的膽固醇所形成的粥瘤最後會由於巨噬細胞產生的細胞基質分解酵素(MMP)而崩解,因此血液中的血小板就會大量聚集在崩解處,最後造成血栓

(thrombosis) (Glass et al., 2001)。

高密度脂蛋白與抗動脈硬化

血漿中另外一種重要的脂蛋白—高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL) —與動脈硬化的產生則是呈負相關(Johansson et al., 1991)。由實驗及臨床的研究結果認為高密度脂蛋白主要透過四種方式來防止心血管疾病的形成(Stein & Stein, 1999: Kwiterovich, 2000)：

1. 促進膽固醇逆運送。
2. 抑制低密度脂蛋白的氧化。
3. 減低吸附性蛋白的產生。
4. 加速纖維蛋白分解。

在膽固醇逆運送的過程中，高密度脂蛋白能將周邊細胞中多餘的膽固醇攜出帶回肝臟代謝(附圖 2)。目前認為帶有大量膽固醇之高密度脂蛋白會以三種方式進入肝臟代謝(Tall, 1998)：第一種方式是利用高密度脂蛋白其上的 apoE 蛋白原與肝臟細胞上的接受器辨識而被肝臟吸收，至目前對該接受器尚未能純化及鑑定；第二種是利用肝臟細胞上的 SR-BI 接受器將高密度脂蛋白粒子中的膽固醇酯釋放至肝細胞中，但高密度脂蛋白本身並不進入細胞，這種作用稱為選擇性吸收(selective cholesterol uptake) (Reaven et al., 1996)；第三種方式為利用膽固醇酯轉化蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)將高密度脂蛋白上之膽固醇轉換至極低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)或是低密度脂蛋白上，

再由其帶入肝臟代謝。

由文獻顯示目前有關膽固醇之代謝多著重於肝臟的再吸收，而關於高密度脂蛋白如何自周邊組織細胞將多餘的膽固醇帶出的方式，仍爭議甚多(Ji et al., 1997)，而該問題在防止動脈粥瘤形成的機轉上尤顯重要(Francis & Perry, 1999)。

膽固醇在細胞中的代謝機制

膽固醇除了藉由脂蛋白在血液中運送外，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(Sviridov, 1999)。細胞中主要膽固醇的來源為低密度脂蛋白所提供，低密度脂蛋白經由 receptor-mediated endocytosis 的方式進入細胞中，接著與溶酶體作用後膽固醇酯被分解為膽固醇，這些自由膽固醇有 70% 會送至細胞膜上，有 30% 則送往內質網。不論是外來的膽固醇或是內生性的膽固醇都會在內質網形成一動態的膽固醇來源以供細胞利用，一旦內質網上的膽固醇過多，則會經由 ACAT 酵素將膽固醇酯化形成脂肪滴儲存，或由 retroendocytosis 方式運送至細胞外，內質網上豐富的膽固醇也會利用 caveolin-1 或是 SCP-2 (Sterol carrier protein 2) 運送至高爾基氏體中，再繼續由 caveolin-1 送至細胞膜上，並形成 caveolae。而高爾基氏體中的膽固醇含量也會由 caveolin-1 或是 SCP-2 運回至內質

網，除此之外，低密度脂蛋白也會利用選擇性運送方式即不被細胞吸收及代謝直接將其自由膽固醇運送至高爾基氏體中。細胞膜上的 caveolae 結構含有大量的膽固醇，因此認為是膽固醇先送至 caveolae 上的接受蛋白如 ApoA-I 及高密度脂蛋白的區域，另外高密度脂蛋白也會透過位於 caveolae 上的 SR-BI 接受器將膽固醇酯送入細胞中(附圖 3)。

高密度脂蛋白與周邊細胞的作用

高密度脂蛋白將膽固醇從細胞帶出的方式目前有兩種假說：第一種為入場方式(docking pathway)；即以放射性物質 ^{125}I 標定高密度脂蛋白後與小牛動脈內皮細胞及人類皮膚纖維母細胞作用發現高密度脂蛋白與細胞作用時不會進入細胞中(Oram et al., 1991)，並認為細胞膜上的接受器對高密度脂蛋白具有專一性。目前已證明高密度脂蛋白上之 apoA-I 對於膽固醇的釋出扮演極重要的角色(Rothblat et al., 1999)，但仍未找到 apoA-I 的接受器(Fidge, 1999)。當高密度脂蛋白與其接受器接合後，即引發細胞訊息傳遞系統 PKC (Mendez et al., 1991)，導致膽固醇自細胞中轉移至細胞膜上(Oram et al., 1991)，再經由 LCAT (lecithin:cholesterol acyltransferase) 作用與高密度脂蛋白結合返回血漿，最後送至肝臟中代謝(Philips et al., 1998; Tall, 1998)。第

二種方式則為反內胞飲作用(retroendocytosis)，過去以電子顯微鏡或免疫染色方式觀察高密度脂蛋白與細胞的作用，發現高密度脂蛋白分佈於巨噬細胞、肝臟細胞及小腸細胞的胞囊中，因此認為高密度脂蛋白以內胞飲作用進入細胞後與膽固醇結合，在加上 apoE 蛋白後以反內胞飲作用離開細胞(Alam et al., 1989; DeLamatre et al., 1990; Schmitz et al., 1985)(附圖 4)，而擔任這種作用的主要胞器，稱為小胞囊(vesicles)。過去我們的實驗室以免疫電子顯微鏡定位的研究結果，發現高密度脂蛋白分佈在活體的大白鼠動脈內皮及平滑肌細胞中(Yang et al., 1999)，且隨著年齡及高膽固醇血症的發生，分佈亦隨之增加。在 2000 年 Rogler 的研究中以電子顯微鏡觀察發現高密度脂蛋白在小腸細胞株(Caco-2)中是以小胞囊運送來調節膽固醇釋出。而這兩種運送方式到底哪一種是正確，或兩者同具重要性，目前尚無定論(Takamashi & Smith, 1999)。

然而在細胞運送物質的過程中，小胞囊的形成是由於細胞膜內陷的結果，或是因為切片角度的關係，在電子顯微鏡下呈現出獨立的小胞囊結構，長久以來就一直有所爭議(Boundgaard et al., 1979)，故高密度脂蛋白是否確實位於獨立的胞囊中，或是因高密度脂蛋白與接受器結合後促使細胞的骨架改變造成細胞產生凹陷之膜小囊(plasmalemmal vesicles)結構，以利於膽固醇的輸出，則是值得探討的

問題。

Caveolae 與高密度脂蛋白

在過去十年來對於細胞膜結構的研究發現細胞膜上會有大量的膽固醇或是 sphingolipids 分佈於特定區塊中，這樣的結構稱為 rafts 或是 caveolae。在 rafts 的結構中並無蛋白質的成分，而 caveolae 則是由主體蛋白 caveolin 所組成。由於 caveolae 上具有 caveolin 蛋白，因此在功能上 caveolae 則扮演許多重要角色。Caveolae 在細胞膜上形成一錐狀凹陷結構，半徑約為 60-80 nm，其膜上富含 glycolipids、sphingolipid、膽固醇及主要結構蛋白 caveolin (Fra et al., 1995; Anderson, 1998)。Caveolae 在許多不同的細胞中都有其分佈，尤其在纖維母細胞、脂肪細胞、內皮細胞、表皮細胞及平滑肌細胞有較多的表現 (Galbiati et al., 2001)。在 1953 年，Palade 首先發現 caveolae 結構，並且認為在內皮細胞中具有 transcytosis 功能 (Palade, 1953)，而之後的研究更發現 caveolae 在細胞移行、細胞訊息傳遞、腫瘤抑制及細胞內膽固醇的平衡扮演相當重要的角色(Fielding & Fielding, 2000; Frank et al., 2001; Galbiati et al., 2001)。

Caveolin 有三種不同的形式存在於細胞中，分別為 caveolin-1, caveolin-2 及 caveolin-3。Caveolin-1 和 caveolin-2 在各種細胞上都有

表現，尤以脂肪細胞最多，而 caveolin-3 則主要表現在心肌、骨骼肌及平滑肌細胞上(Galbiati et al., 2001)。Caveolin 為一穿越細胞膜的蛋白質，暴露於細胞質一端具有 scaffold domain 可與訊息傳遞作用相關的蛋白質結合，尤其以 caveolin-1 更能夠與膽固醇結合，因此認為與細胞內膽固醇的平衡有關。在 caveolin-1 knockout 的老鼠細胞中則沒有 caveolae 的結構產生(Kurzchlia & Parton, 1999)，而將細胞膽固醇含量降低或是降低 caveolin-1 的表現同樣能減少細胞膜上 caveolae 的凹陷結構(Chang et al., 1992; Fra et al., 1995)。Caveolin-1 從內質網製造出來後送至高爾基氏體，接著再送至細胞膜上形成 caveolae 結構，而細胞內的過多的膽固醇也同時與 caveolin-1 結合送至細胞膜上(Sviridov, 1999)。Caveolin-1 的表現與 caveolae 上膽固醇的含量有密切關係，當 caveolae 上的膽固醇含量減少時，細胞膜上的 receptor kinase (REC)便會引發細胞訊息傳遞作用使得 sterol regulatory binding protein (SREBP)磷酸化，被磷酸化的 SREBP 會去跟 caveolin-1 基因的 transcription factor 競爭，一旦 caveolin-1 基因與 SREBP 結合，caveolin-1 的蛋白將不會製造出來運送至細胞膜上，因此細胞中的膽固醇也無法與 caveolin-1 結合而送至細胞膜上(Fielding, 2001)(附圖 5)。在 Fielding 研究中發現當餵食膽固醇之纖維母細胞與高密度脂蛋白作用後，Caveolae 上的膽固醇含量則明顯降低，而富含膽固醇的高

密度脂蛋白在從 THP-1 細胞將膽固醇攜出的過程與 caveolin 也有很大的關係(Arakawa et al., 2000)。而當高密度脂蛋白長時間與餵食膽固醇之 NIH/3T3 細胞作用後則會降低 caveolin-1 的表現(Frank et al., 2001)。因此認為高密度脂蛋白是透過 caveolae 來調節細胞內膽固醇的釋出(Chang et al., 1992; Fielding & Fielding, 1995)。目前認為 caveolae 會將細胞內的膽固醇或膽固醇酯自高爾基氏體運送至細胞膜上(Sviridov, 1999)，而在血漿中高密度脂蛋白則能將 caveolae 上的膽固醇釋出(Fielding & Fielding, 1997)。然而在高密度脂蛋白調控細胞中膽固醇外運送過程中高密度脂蛋白與 caveolin-1 的表現及分佈關係仍尚待釐清。

ABCA-1 與高密度脂蛋白

在膽固醇逆運送的過程中目前亦發現一種細胞膜接受器 ATP-binding cassette A1 (ABCA1)扮演相當重要的角色，ABCA1 如發生突變會造成體染色體隱性遺傳疾病—Tangier disease。這種病人主要代謝特徵是 apolipoprotein A-I 結構及合成正常，但它的代謝速率極快，而導致血漿 HDL 含量降低，因此這種病人血漿中的 LDL 含量雖然很低，但卻容易產生動脈硬化(Oram & Vaughan, 2000)。在後續的研究中亦證實 ABCA1 與 apoA-1 有極高的親合力，在高密度

脂蛋白調節膽固醇逆運送的過程中具有將細胞內膽固醇釋出的能力 (Lawn et al, 1999)。

Caveolin 與 ABCA1 在參與膽固醇逆運送時的相互關係目前尚未有所定論，有研究指出脂蛋白在透過 ABCA1 接受器將膽固醇釋出時，必須在富含脂質的特殊結構如 caveolae 上進行(Kurzchalia & Parton, 1999)。但是亦有其他報導指出 caveolae 結構與 ABCA1 接受器的功能無正相關(Mendez et al., 2001)。因此本研究也將探討 caveolin-1 及 ABCA1 在餵食膽固醇的內皮細胞中的分佈。

論文研究方向

目標一、 高密度脂蛋白在餵食膽固醇的動脈內皮及平滑肌細胞中的作用方式

在過去以電子顯微鏡所做的觀察發現高密度脂蛋白可能以反內胞飲作用將膽固醇攜出胞外，為了更進一步確認此過程，本實驗先以螢光顯微鏡觀察螢光標定之高密度脂蛋白與餵食螢光膽固醇酯之動脈內皮細胞作用情形，同時以形態定量分析的方式來量化以膠體金粒子標定之高密度脂蛋白在與餵食膽固醇之細胞作用 5 分鐘、15 分鐘及 30 分鐘後分佈於細胞中不同區域之比例，以了解高密度脂蛋白與細胞作用後在不同時間下的吸收路徑。

目標二、 膜小囊在高密度脂蛋白調節膽固醇釋出的過程中所扮演的角色

在電子顯微鏡觀察中發現高密度脂蛋白與細胞作用後，分佈於細胞小胞囊中，但這是否為獨立的胞囊或是細胞膜內陷的結構，除了以顯微鏡作形態觀察外，同時以胰蛋白酶處理與高密度脂蛋白作用之細胞，將脂蛋白與細胞膜上之接受器分離，之後進行西方點墨法來偵測高密度脂蛋白在細胞中的含量，以確認高密度脂蛋白被細胞吸收後是否位於細胞小胞囊中。

目標三、 在動脈內皮細胞中高密度脂蛋白與 caveolin-1 表現及分佈的關係

Caveolae 為細胞膜上膽固醇及各種脂類聚集的區域，其主蛋白 caveolin 亦扮演著訊息傳遞作用的重要角色，近年來已有一些研究以間接方式認為高密度脂蛋白利用 caveolin-1 幫助細胞內膽固醇的釋出。因此在高密度脂蛋白參與膽固醇逆運送的過程中，利用共軛焦顯微鏡及電子顯微鏡探討 caveolin 的表現及與高密度脂蛋白在細胞中的分佈情形亦為本論文的重點。

目標四、 電子顯微鏡之連續切片

為了追蹤高密度脂蛋白被細胞吸收後所分佈之膜小囊結構是否為一獨立之小胞囊，將標定高密度之蛋白及 caveolin-1 之組織塊進行超薄連續切片，並在電子顯微鏡下觀察標有高密度脂蛋白及 caveolin-1 的膜小囊其三度空間的分佈。

目標五、 Endosome 標的物與高密度脂蛋白在動脈內皮細胞中的分佈

當細胞外分子以小胞囊方式進入細胞後，會先與含有 transferrin receptor (CD71) 的 early endosome 結合，接著在送往溶體的過程中會與含有 LAMP2 的 late endosome 胞囊結合。因此，本實驗以這兩種 endosome marker 來觀察高密度脂蛋白與細胞作用的過程中是否進入 endosome 胞囊中，實驗中也利用 endosome 的抑制劑 monensin 與細胞培養進而觀察高密度脂蛋白與細胞作用的情形。

目標六、 高密度脂蛋白、caveolin-1 及 ABCA-1 在動脈內皮細胞中的表現及分佈

在最近的研究報告中認為 ABCA-1 是高密度脂蛋白調節細胞膽固醇釋出的主要接受器，然而 ABCA-1 是否位於 caveolae 上進而藉由高密度脂蛋白調節 caveolae 區域中膽固醇的釋出，則是急於探討的問

題，因此本實驗亦利用免疫螢光染色法來定位 ABCA1, caveolin-1 與
高密度脂蛋白在細胞中的分佈。

材料與方法

細胞培養

取一個月齡約 100 克 Sprague Dawley 品系大白鼠，以 0.01mg/g 體重的 nembutal (Abbott; sodium pentobarbital, 美國) 進行腹腔注射，將動物麻醉，並且在無菌操作下將胸腔動脈取出，置於 DMEM (Gibco, 德國) 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 2mm 厚的血管圈，然後將血管圈平放在已覆蓋膠原 (10 μ g/ml) (sigma; type I collagen, 美國), 含適量 DMEM 的無菌培養皿 (35 \times 35mm) 中。培養液覆蓋血管圈，並使其固定皿底 (Diglio, 1989)。培養液內含 10% 小牛血清 (Gibco, 德國) 及每毫升一個單位之盤尼西林 (sigma, 美國)。將血管圈置於 37 $^{\circ}$ C，二氧化碳濃度為 5% 的培養箱中進行細胞培養，約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，以胰蛋白酵素 (trypsin) 處理將細胞自培養皿取下，放入 DMSO 中冷凍以備後續實驗用。而移至新培養皿的血管圈一天後開始長出平滑肌細胞，再繼續培養至第八天，待內皮細胞已不再出現時，便將血管圈移

至另一個新的培養皿以培養較純的平滑肌細胞，四天後將血管圈移除，並將所得到的第一代平滑肌細胞繼續培養 7 天備用。內皮細胞及平滑肌細胞可利用胰蛋白酵素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或第三代的細胞。

膽固醇的培養實驗

由文獻中證明細胞中如含有大量之膽固醇可以誘發更多高密度脂蛋白的接受器產生，使高密度脂蛋白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) (SFM; Sigma)清洗兩遍，然後在不含血清之培養液中加入大量膽固醇 (50 μ g/ml) (Sigma)或螢光膽固醇 BODIPY-FL C₁₂(Molecular probe)及 2 mg / ml 不含自由脂肪酸之白蛋白(Fatty acid free albumin, FFA; Sigma)在 37 °C 中培養 48 小時。

高密度脂蛋白與細胞的接合及吸收

將餵食膽固醇之細胞以含 2 mg/ml FFA 之不含血清培養基清洗三次，之後將細胞預冷至 4 °C 中 30 分鐘。將螢光或膠體金粒子結合之高密度脂蛋白溶液(50 μ g/ml，含 2 mg/ml FFA)與細胞在 4 °C 中培養 2 小時，以使高密脂蛋白與於膜上接受器接合，但不進行內胞飲作用。

之後將細胞回溫至 37 °C 中培養 5 分鐘、15 分鐘及 30 分鐘。在電子顯微鏡的觀察中，則先將膠體金粒子與高密度脂蛋白培養液移除，換成不含血清之培養液(內含 2 mg/ml FFA)，再回溫至 37 °C 中培養。接著以含 2 mg/ml FFA 的 PBS 清洗三次，並進行相關實驗。

電子顯微鏡法

將細胞以 4 % Paraformaldehyde 及 5 % Glutaraldehyde, 溶於 0.16 M 的 cacodylate buffer PH 7.4, 在 4 °C 做前固定 1.5 小時，以細胞刮將細胞刮起置於小玻璃瓶中，以 0.1 M cacodylate 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘。再以 1 % 四氧化鐵做後固定 1.5 小時，然後再以 0.1 M cacodylate 緩衝液清洗三次，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 與 100 % 酒精分別以 1:3、1:1、3:1 比例作置換，最後將酒精完全置換成 1,2-Propylene oxide 準備 Epon 包埋劑分別與 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，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 小時後以製作超微薄片。

將組織塊先以刀片將切面修成梯形狀。最後以超薄切片機將組織塊切成約 80nm 厚的連續薄片，置於銅網中。銅網上的切片先以

過飽和的醋酸鈾鹽 (uranyl acetate 溶於 75%酒精) 染 30 分鐘 , 再以 0.4 % 檸檬酸鉛(lead citrate) 染 10 分鐘 , 最後以電子顯微鏡(Hitachi, H-600)觀察。

量化分析

當高密度脂蛋白與餵食膽固醇之細胞在 37 °C 作用 0、5、15、及 30 分鐘時 , 分別進行組織包埋 , 並在每組時間製作 6 個組織塊 , 並隨意取 3 個組織塊做超薄切片。每個組織塊切 15-25 片薄片 , 並任意選取一片在電顯下觀察。在每一薄片中選取 5 個完整細胞 , 在 30000 倍的放大率下 , 每個細胞拍攝 10 張相片 , 因此在每個時間中約產生 150 張相片作為量化之用。利用點算方式進行形態定量分析 (Weibel, 1973)計算高密度脂蛋白與膠體金粒子複合物在細胞膜上、膜小囊、小胞囊及溶酶體中分佈的情形 , 最後以 *t*-test 做統計分析。

西方點墨分析法

在以胰蛋白酶切斷細胞膜表面接受器的實驗中 , 一組在膽固醇培養液培養 48 小時的細胞置於 4 °C 下與高密度脂蛋白培養 2 小時或是另一組將細胞先培養在不含脂蛋白之血清中 24 小時再與低密度脂蛋白於 4 °C 下培養 2 小時。接著兩組不同處理之細胞繼續在 37 °C 下培

養 15 分鐘，於 4 °C 中以胰蛋白酵素作用 10 分鐘，然後用胰蛋白酵素抑制劑(trypsin inhibitor) (2 mg/ml) (Sigma, 美國)清洗後將細胞刮入 PBS 中，以 200 g 離心 5 分鐘收集細胞。而在 caveolin-1 表現量的實驗中則將細胞與膽固醇培養液培養 48 小時後與高密度脂蛋白在 37 °C 下作用 5、15、分鐘及 1、2、3 小時，接著在 4 °C 下分別將細胞刮下，以 200 g 離心 5 分鐘收集細胞。所收集的細胞懸浮液離心後將上清液移除，加入 lysis buffer (10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1 mM benzamidine, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF) (Graham & Oram 1987)將細胞打碎，並以超音波粉碎器處理 30 秒 4 次，最後在 800 g 下離心 10 分鐘去核，取上清液。將含有 20 µg 細胞蛋白質的萃取液注入不連續式 12 % SDS-PAGE 電泳膠中先以 50 伏特電壓進行蛋白質壓縮 (stacking), 待樣品通過 stacking gel 後接著以 70 伏特電壓繼續在 12 % 膠中將蛋白質分離。進行約 1.5 個小時後將在 SDS-PAGE 上的蛋白質以半乾濕轉漬器(Bio-Rad, 美國)以 20 伏特的電壓進行 30 分鐘將蛋白質轉移至 PVDF 膜上。取出 PVDF 膜，然後加入 5 % 脫脂奶粉，在室溫下反應 1 小時，使非專一性部位覆蓋 接著以 TBS-0.05% Tween 20 緩衝溶液清洗 2 次、每次 10 分鐘，然後加入山羊抗人類高密度脂蛋白抗體(1: 1500 稀釋比例) (Cortex Biochem, 美國)或兔子抗人類低密度脂蛋白抗體(1: 1500 稀釋比例) (Biogenesis, 英國)以及兔子抗人

類 caveolin-1 抗體(1: 10000 稀釋比例) (Senta Cruz, 美國)作用一小時。將 PVDF 膜與兔子抗山羊及山羊抗兔子的 HRP 接合二級抗體(1:7500 稀釋比例)於室溫下反應 1 小時，再經 TBS-0.05% Tween 20 緩衝溶液清洗 3 次、每次 10 分鐘後，以 chemiluminescence 冷光試劑顯色，並在冷光影像感應系統(Fuji, Japan)下照相。

免疫細胞化學染色法

將體外培養的大白鼠動脈內皮細胞與膽固醇培養液培養 48 小時後，以 PBS 緩衝液清洗 3 次，之後與高密度脂蛋白與螢光複合物溶液(50 μ g/ml HDL-DiI 溶於 2 mg/ml FFA 的 SFM 中)作用 5 分鐘 將細胞以冷的甲醇固定 5 分鐘後，先加入含 3 % 白蛋白的 PBS 緩衝液 (3 % BSA in PBS buffer)，於室溫下反應 30 分鐘，之後以 PBS 緩衝液清洗 3 次，洗去多餘的白蛋白。接著在 caveolin-1 與高密度脂蛋白的作用關係實驗中加入兔子抗人類 Caveolin-1(1: 200 稀釋比例) 老鼠抗人類 α -actin 抗體(1: 1500 稀釋比例) (Sigma, 美國)，在 endosome 標的物實驗中分別加入兔子抗老鼠 CD71(1: 100 稀釋比例) (Senta Cruz, 美國)及兔子抗老鼠 LAMP2 抗體(1: 100 稀釋比例) (Senta Cruz, 美國)，在 ABCA1 與 caveolin-1 實驗中加入老鼠抗人類 caveolin-1 及兔子抗人類 ABCA1 抗體(1: 50 稀釋比例) (Novus, 美國)，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 以 1: 200 的稀釋比例加入適當山羊抗兔子及山羊抗老鼠螢光接合次級抗體，在室溫下反應 1 小時，以 PBS 清洗 3 次。風乾後封片，於共軛焦螢光顯微鏡(LSM510, Zeiss)下鏡檢，以波長 543 nm 為激發光源偵測 FITC 並以綠色螢光顯現，以波長 633 nm 為激發光源偵測 Rhodamine，以紅色螢光顯現，以波長 488nm 為激發光源偵測 Cy5，以藍色螢光顯現。利用 Z 軸垂直做切面掃描，每一切面厚度約為 0.2 μ m，最後以 Zeiss LSM Image 2.3 軟體將每一切面影像重組成為三度空間圖像。

抑制 Endosome 路徑的實驗

將餵食膽固醇膽之內皮細胞以不含血清之培養液清洗兩遍後繼續將細胞培養在含 10 μ M monensin (Sigma, 美國)及 2 mg/ml 不含自由脂肪酸之白蛋白的無血清培養液中於 37 $^{\circ}$ C 下培養三小時。接著與螢光標定之高密度脂蛋白 HDL-Dil 作用五分鐘後以冷的甲醇固定並進行 caveolin-1 免疫螢光染色(方法如免疫螢光法所述)，最後在 confocal 螢光顯微鏡下觀察高密度脂蛋白與 caveolin-1 分佈的情形，並進行共軛焦三度空間掃描及影像重組。

免疫電子顯微鏡法

將餵食膽固醇之細胞以 PBS-albumin 緩衝液清洗三次後，將細胞與高密度脂蛋白 - 膠體金粒子(10nm)複合物溶液於 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，接著在 4 °C 下以 4% Paraformaldehyde 前固定 30 分鐘 固定後之細胞經以 PBS 清洗後繼續與兔子抗 Caveolin-1 初級抗體在室溫下培養 1 小時，然後與金粒子(15 nm)接合山羊抗兔子二級抗體在室溫下作用 1 小時。以 PBS-albumin 清洗後繼續與 3 % Glutaraldehyde 在 4 °C 下固定 2 小時，最後再以 1 % 四氧化鐵在 4 °C 下作用 1.5 小時。以細胞刮將細胞刮起置於小玻璃瓶中，以 0.1 M cacodylate 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘。然後再以 0.1 M cacodylate 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘。接著回到室溫中以 50 %、70 %、95 %、100 % 的酒精做脫水置換，之後再以 1,2-Propylene oxide 與 100% 酒精分別以 1:3、1:1、3:1 比例作置換，最後將酒精完全置換成 1,2-Propylene oxide。準備 Epon 包埋劑分別與 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，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。80 nm 的超薄切片以醋酸鈾醃及檸檬酸鉛染色後，在 HITACHI 600 電子顯微鏡下觀察照相。

結果

高密度脂蛋白在餵食膽固醇之動脈內皮細胞之吸收方式

1. 形態觀察

將餵食 48 小時膽固醇之內皮細胞與含高密度脂蛋白的培養基於 4 培養 2 小時，經脫水包埋後於電子顯微鏡下觀察。結果顯示在低倍率(8000X)下細胞膜形態平整，細胞內小胞囊的數量並不多(圖 1a)，在 37 下培養 5 分鐘後，多處細胞膜開始內陷形成膜小囊，並且產生許多偽足及小胞囊結構(圖 1b)。到了 15 分鐘及 30 分鐘後，細胞膜則又恢復平整，細胞內小胞囊的數量則明顯減少(圖 1c-d)。(Chao et al., 2002)

2. 高密度脂蛋白與細胞的吸收方式

以螢光標定之高密度脂蛋白(HDL-DiI)與餵食螢光膽固醇(BODIPY FL C₁₂)之動脈內皮細胞在 4 下作用 2 小時後，高密度脂蛋白成均勻分佈(圖 2a)，將細胞於 37 中培養 5-30 分鐘後，高密度脂蛋白以小胞囊狀分佈於細胞中(圖 2b-d)，並且與螢光膽固醇呈現共同分佈(圖 2e-h)。電子顯微鏡結果顯示，高密度脂蛋白與金粒子複合物在 4 中與細胞作用 2 小時後，高密度脂蛋白多分佈在細胞膜上(圖 3a)。將細胞於 37 中培養 5 分鐘後，高密度脂蛋白則多分佈在細胞內之胞

囊中(圖 3b)。15 分鐘時, 高密度脂蛋白則又多重新分佈在細胞膜上(圖 3c)。到了 30 分鐘, 少數高密度脂蛋白分佈於溶? 體中(圖 3d)。(Chao et al., 2002)

3. 形態定量分析

高密度脂蛋白與膠體金粒子的複合物分佈在細胞膜上、膜小囊、小胞囊及溶? 體 4 個不同區域中分佈的量化資料結果顯示(圖 4), 高密度脂蛋白與金粒子的複合物在每 μm 長度細胞膜上的分佈在 0 分鐘時達到最高點, 在 5 分鐘時則顯著降低($p<0.05$), 15 分鐘後, 則又比 5 分鐘時顯著增加 ($p<0.05$)。在另一方面, 當細胞與高密度脂蛋白複合物在 37°C 下培養後, 每 μm 長度細胞膜上膜小囊中及每 μm^2 細胞質內小胞囊中含有複合物之分佈密度於 5 分鐘時顯著增加($p<0.05$), 在 15 分鐘後則顯著降低($p<0.05$), 到了 30 分鐘後則有極少數高密度脂蛋白與膠體金粒子的複合物出現在溶? 體中。(Chao et al., 2002)

4. 膽固醇釋出

當高密度脂蛋白與餵食螢光膽固醇酯 BODIPY FL C_{12} 的內皮細胞作用 0, 5, 15 及 30 分鐘後, 培養液中由細胞所釋出的螢光膽固醇含量經測定後隨著時間的增加而增加(圖 5)。

膜小囊在高密度脂蛋白調節膽固醇釋出的過程中所扮演的角色

1. 胰蛋白酶自細胞中移除高密度脂蛋白實驗

當餵食膽固醇 48 小時的內皮細胞與高密度脂蛋白在 4°C 下作用 2 小時或繼續在 37°C 作用 15 分鐘後，分別以胰蛋白酶處理，並將細胞萃取液以西方點墨法分析高密度脂蛋白的含量。結果顯示當高密度脂蛋白在 4°C 與細胞作用後，確實偵測到脂蛋白含量，顯示高密度脂蛋白在 4°C 時確實與細胞膜結合。而在 37°C 時則有更多高密度脂蛋白與細胞作用。當以胰蛋白酶處理後，在 4°C 時無高密度脂蛋白的存在，表示細胞表面的高密度脂蛋白確實被酵素作用與細胞分離。而在 37°C 時同樣偵測不到高密度脂蛋白的存在，顯示胰蛋白酶同樣能將細胞表面的所有高密度脂蛋白移除(圖 6a)，而內胞飲作用亦並未發生。由於在控制組中 actin 的表現量一致，因此推測酵素並未進入細胞中，而是將膜小囊中的高密度脂蛋白移除(Chao et al., 2003)。

2. 胰蛋白酶自細胞中移除低密度脂蛋白實驗

低密度脂蛋白已證實是以內胞飲作用方式運送至細胞中代謝，因此本實驗利用低密度脂蛋白與細胞的作用作為本實驗的另一控制組。將內皮細胞培養在不含血清之培養液中 24 小時使其飢餓，接著加入低密度脂蛋白與細胞在 4°C 下作用 2 小時或繼續在 37°C 作用 15 分鐘

後，分別以胰蛋白酵素處理，並將細胞萃取液以西方點墨法分析低密度脂蛋白的含量。結果顯示，低密度脂蛋白與細胞在 37 °C 中作用 15 分鐘後，以胰蛋白酵素處理移走細胞膜表面之脂蛋白，仍能在細胞萃取液中探測到低密度脂蛋白的含量，顯示低密度脂蛋白確實以內胞飲方式運送至細胞中(圖 6b) (Chao et al., 2003)。

在動脈內皮細胞中高密度脂蛋白對 caveolin-1 表現及分佈的影響

1. Caveolin-1 在餵食膽固醇之細胞及與高密度脂蛋白作用之表現

將動脈內皮細胞培養在含膽固醇的培養基中 24 及 48 小時，並收集細胞，萃取蛋白質液。接著將培養在膽固醇培養基 48 小時之細胞繼續培養在 50 µg/ml 高密度脂蛋白的培養基中 5、15 分鐘及 1、2、3、6 小時後，收集細胞萃取液。將各時間點所收集之細胞萃取液以 12 % 之丙烯醯胺(acrylamide)的硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺(SDS)電泳膠片將蛋白質進行分離，接著進行西方點墨法(Western blot)，以 caveolin-1 抗體偵測 caveolin-1 表現的含量。結果顯示，當內皮細胞開始培養在膽固醇培養基中 24 及 48 小時後，caveolin-1 的表現明顯上升(圖 7a)。而當餵食過膽固醇之細胞繼續與高密度脂蛋白作用 5-15 分鐘後，caveolin-1 的表現略為上升，1 小時之後則逐漸下降(圖 7b)。此結果顯示當細胞餵食膽固醇後會誘使 caveolin-1 的大量表現，而高密度脂蛋白與細胞作

用後則會降低 caveolin-1 的表現(Chao et al., 2003)。

2. 以共軛焦顯微鏡觀察 caveolin-1 及高密度脂蛋白在細胞上的分佈

將內皮細胞分別培養在無血清培養基(serum-free medium), 正常培養基與膽固醇培養基中, 接著與螢光接合高密度脂蛋白(HDL-DiI)在 37

下作用 5 分鐘。細胞固定後以 caveolin-1 及 actin 抗體作細胞免疫染色, 最後以螢光二級抗體顯色, 並在共軛焦顯微鏡下作觀察。結果顯示當細胞培養於無血清培養基時, 並無高密度脂蛋白分佈在細胞中, 也無大量 caveolin-1 分佈。當細胞培養在正常培養基時, 有少量高密度脂蛋白分佈於細胞中。而當細胞培養在膽固醇培養基後, 則觀察到大量高密度脂蛋白及 caveolin-1 共同分佈於細胞中(圖 8)。此結果顯示當細胞中含有較多膽固醇時會大量表現 caveolin-1, 並開始與培養基中的高密度脂蛋白結合, 以共軛焦顯微鏡圖經局部放大後顯示 caveolin-1 與 HDL 在細胞中呈現共同分佈(圖 9)。

將同樣餵食膽固醇之內皮細胞與 DiI 標定之高密度脂蛋白作用後進行 caveolin-1 及 actin 之免疫螢光染色, 並以共軛焦顯微鏡將細胞作三度空間掃描, 結果發現以藍色螢光顯示 actin 為細胞質區域, 而紅色螢光之高密度脂蛋白與綠色螢光顯示之 caveolin-1 則共同分佈在細胞膜上(圖 10d, 11a), 而將三度空間圖以側面觀顯示發現 actin 分佈於

細胞中間層，caveolin-1 分佈在上下細胞膜區域，而高密度脂蛋白則是分佈在細胞膜上或是穿越整個細胞(圖 11b)，極少發現以小胞囊方式獨立存在於細胞質中。我們以卡通示意圖顯示高密度脂蛋白位於細胞膜凹陷的結構中(圖 11c) (Chao et al., 2003)

3. 以免疫電子顯微鏡法觀察 caveolin-1 及高密度脂蛋白在細胞上的分佈

將內皮細胞培養於膽固醇培養基後與膠體金粒子(10 nm)標定之高密度脂蛋白在 37 °C 作用下 5 分鐘，經固定後與 caveolin-1 抗體培養，並以膠體金粒子(15 nm)標定之二級抗體作偵測。細胞經脫水包埋及切片後，以穿透式電子顯微鏡觀察發現小金粒子標定之高密度脂蛋白與大金粒子標定之 caveolin-1 共同分佈於細胞膜上的 caveolae 結構中(圖 12a, b, c,)，少數高密度脂蛋白位於 COPI 的胞囊中(圖 12d)，有些高密度脂蛋白則位於連續內凹的胞囊中(圖 13) (Chao et al., 2003)。

電子顯微鏡之連續切片

將免疫電子顯微鏡觀察之組織塊進行超薄連續切片後，在電鏡下尋找一含有膠體粒子標定之高密度脂蛋白的獨立小胞囊(圖 14a)，而在其相鄰的切片中，在同一個細胞的同一個位置，此小胞囊形態已改變，

而成為一細胞膜凹陷之結構(圖 14b)。由組合之卡通圖可以進一步了解其相對位置(圖 14c)。

Endosome 標的物與高密度脂蛋白在動脈內皮細胞中的分佈

將內皮細胞培養在膽固醇培養基 48 小時後，與螢光接合高密度脂蛋白(HDL-DiI)在 37 °C 下作用 5 分鐘。細胞固定後以 early endosome marker (CD71) 及 late endosome (LAMP2) 抗體作細胞免疫螢光染色。結果顯示絕大部分高密度脂蛋白並未與 CD71 分佈於同一位置上，而僅有零星的高密度脂蛋白與 CD71 呈現共同分佈情形(圖 15a)。而細胞中並無太多 LAMP2 的分佈，高密度脂蛋白也未與 LAMP2 呈現共同分佈(圖 15b)。

當細胞餵食膽固醇後先與 endosome 抑制劑 monensin 作用三小時，接著與螢光接合高密度脂蛋白(HDL-DiI)在 37 °C 下作用 5 分鐘。以共軛焦螢光顯微鏡作三度空間掃描顯示高密度脂蛋白分佈於細胞膜上或者穿越整個細胞(圖 16)，與先前未處理過 endosome 抑制劑的結果類似，顯示高密度脂蛋白與細胞的作用極可能不經由 endosome 過程。

高密度脂蛋白、caveolin-1 及 ABCA-1 在動脈內皮細胞中的表現及分

佈

當餵食膽固醇之動脈內皮細胞與高密度脂蛋白作用 5 分鐘後，進行 caveolin-1 及 ABCA1 之免疫螢光染色，結果顯示大部分 ABCA1(紅色螢光)與 Caveolin-1(綠色螢光)呈現共同分佈，而有 caveolin-1 之處則不一定有 ABCA1 之訊號(圖 17)。

討論

高密度脂蛋白在餵食膽固醇的動脈內皮及平滑肌細胞中的作用方式

由近年來的研究報告，大家均認為高密度脂蛋白可將周邊細胞中多餘的膽固醇逆運送至肝臟代謝 (Assmann & Funke, 1990)，然而僅對高密度脂蛋白將膽固醇酯運送至肝細胞以及生醇性細胞中的機轉有初步的瞭解 (Fielding & Fielding, 1995)，至於高密度脂蛋白如何將多餘的膽固醇自周邊細胞中釋出的方式則仍有許多爭論。目前的假說認為高密度脂蛋白可能以入塢(docking)的方式，或是以反內胞飲作用 (retroendocytosis)的方式將周邊細胞的膽固醇攜出。內皮細胞及平滑肌細胞為動脈管壁上主要的兩種細胞，而內皮細胞由於位在管腔表面與血液直接接觸，因此與血漿中脂蛋白的作用尤為重要 (Rader & Dugi, 2000)。本實驗則著重在內皮細胞與高密度脂蛋白的作用。

早期利用放射線同位素標定高密度脂蛋白及膽固醇的實驗結果顯示高密度脂蛋白與細胞膜接合後不進入細胞中，而只經信號傳遞方式，將膽固醇釋放至高密度脂蛋白中排出體外 (Slot et al., 1987)。在 2000 年，Lin 等人利用電子顯微鏡觀察發現高密度脂蛋白是與細胞膜突出的構造結合。然而在同一年，Rogler 等人同樣利用電子顯微鏡發現高密度脂蛋白是以小胞囊形式藉著 tubulin 在小腸細胞中運送。在

本實驗的研究中發現，以螢光標定之高密度脂蛋白確實以小顆粒狀分佈在餵食膽固醇的內皮細胞上，而且更進一步在電子顯微鏡下觀察到以膠體金粒子標定之高密度脂蛋白在 4 小時分佈在細胞膜上(圖 3a)，當細胞培養在 37 °C 下 5 分鐘時，許多脂蛋白分佈在細胞膜內陷處或接近細胞表面小胞囊中(圖 3b)。培養 15 分鐘或 30 分鐘後，高密度脂蛋白則又分佈在細胞膜上。以形態定量法分析脂蛋白在細胞中不同時間的分佈(圖 4)，顯示在餵食膽固醇的動脈內皮細胞中由高密度脂蛋白調控的膽固醇外送機轉與細胞膜小囊(plasmalemmal vesicles)有密切關係(Chao et al., 2003)。

膜小囊在高密度脂蛋白調節膽固醇釋出的過程中所扮演的角色

過去在研究 transcytosis 的機制中，科學家認為小胞囊結構可能是細胞膜凹陷產生的結果。因此在本實驗中，如果高密度脂蛋白與金粒子複合物是位於細胞膜凹陷所形成的胞小囊中，有可能因切片角度的關係會呈現分佈於獨立的小胞囊中。因此高密度脂蛋白是否確實位於獨立的胞囊中進行內胞飲或反內胞飲作用或只是將訊息經由細胞膜小囊傳入細胞中引發膽固醇外送是很值得探討的問題。在本實驗中以電子顯微鏡觀察動脈內皮細胞與高密度脂蛋白作用後細胞形態的改變，發現當高密度脂蛋白與餵食膽固醇細胞作用 5 分鐘後，細胞膜

內陷產生許多偽足狀構造，並且有許多靠近細胞膜的小胞囊(圖 1b)，因此推測這些胞囊可能是由細胞膜內陷產生。因此更進一步利用胰蛋白酶加入與高密度脂蛋白作用的細胞中，將分佈於細胞外的脂蛋白及接受器分解，最後以 Western blotting 偵測細胞中的高密度脂蛋白。結果顯示經胰蛋白酶作用後，高密度脂蛋白未分佈於細胞中(圖 6a)。而以低密度脂蛋白與細胞作用後，同樣以胰蛋白酶處理，結果發現低密度脂蛋白存在於細胞中(圖 6b)，目前已公認低密度脂蛋白確實以內胞飲作用進入細胞中(Goldstein et al., 1985)。由以上實驗結果，我們初步認為高密度脂蛋白與細胞的作用是以接合方式進行，而在這個過程中引發細胞膜的內陷形成膜小囊(plasmalemmal vesicle)結構，這種膜小囊與高密度脂蛋白引發膽固醇的外送有密切關係。

在動脈內皮細胞中高密度脂蛋白與 caveolin-1 表現及分佈的關係

在膽固醇逆運送的過程中，高密度脂蛋白調節細胞膽固醇釋出的機轉一直未有明確的結論。而膽固醇釋出至細胞外之前，必須先從高爾基氏體送出至細胞膜上，在目前的研究中亦發現細胞內的膽固醇由內質網或是高爾基氏體送出時會伴隨著 caveolin-1 的表現而互相結合，最後送至細胞膜上形成 caveolae 結構(Sviridov, 1999)。在本實驗中，內皮細胞經過膽固醇餵食後，caveolin-1 的表現大量增加(圖 7a)，

而在共軛焦顯微鏡觀察中亦發現大量高密度脂蛋白與 caveolin-1 共同分佈在一起，與未處理膽固醇之細胞結果不同(圖 8)，因此細胞內含大量膽固醇確實能引發 caveolin-1 的表現，並且與高密度脂蛋白調節細胞內膽固醇釋出有密切關係。在 Fielding 等人的研究中指出，高密度脂蛋白能降低 caveolae 上膽固醇的含量(Fielding & Fielding, 1995)，他們進一步提出假說認為，當細胞內含有大量膽固醇時，便藉 caveolae 將膽固醇送至細胞膜上，而細胞可能藉血漿中之高密度脂蛋白將 caveolae 上的膽固醇釋放出去，一但細胞中膽固醇含量減少，便會引發細胞訊息傳遞作用使 SREBP 蛋白磷酸化進而抑制 caveolin-1 的轉譯，caveolin-1 的表現量就會降低以防止更多膽固醇釋出，以維持細胞中膽固醇的平衡(Fielding & Fielding, 2000)。在本實驗中，當餵食膽固醇的細胞繼續與高密度脂蛋白作用一小時後，caveolin-1 的表現逐漸下降(圖 7b)，顯示當高密度脂蛋白不斷與細胞作用，隨後降低 caveolin-1 的表現，可能與防止細胞內膽固醇的無限制外送有關。

Caveolae 的結構在 1950 年即由電子顯微鏡觀察發現，而在最近的研究中，雖然對 caveolae 與高密度脂蛋白將細胞中膽固醇釋出的機轉關係有許多討論，然而卻無研究直接觀察在此過程中，高密度脂蛋白與 caveolae 在細胞中的分佈表現。在本實驗中，以共軛焦顯微鏡作三度空間觀察發現高密度脂蛋白與 caveolae 共同分佈於細胞膜凹陷

結構上(圖 11), 而更進一步以免疫電子顯微鏡法發現到以不同大小金粒子標定之 caveolin-1 與高密度脂蛋白確實共同分佈在細胞膜上之 caveolae(圖 12)。

caveolae 除了含有大量的膽固醇外, 其結構蛋白 caveolin-1 更可以與多種訊息傳遞分子結合, 如 GPI-anchor 蛋白, src tyrosine kinase 等, 而在過去的報告中也指出高密度脂蛋白將細胞中膽固醇釋出的過程也與 GPI-anchor 蛋白, protein kinase C、cAMP 等訊息傳遞物質有關(Nion et al., 1997), 因此 caveolae 在高密度脂蛋白調節細胞內膽固醇釋出機轉上扮演重要的角色。

電子顯微鏡之連續切片

在本研究中利用生物化學方法以胰蛋白酶處理細胞發現高密度脂蛋白可能不進入細胞小胞囊中, 而且螢光標定之高密度脂蛋白也在細胞三度空間結構中呈現由細胞膜穿透至細胞質的分佈, 並無在細胞質獨立分佈的情形, 為了得到進一步的結論, 初步以連續切片方式, 在電子顯微鏡下觀察到含有高密度脂蛋白的獨立細胞小胞囊在相鄰切片中的同一位置所呈現的是一開口向外的細胞膜凹陷結構(圖 14)。因此, 高密度脂蛋白所分佈的細胞小胞囊有可能是細胞膜凹陷的一部份。本實驗連續超薄切片的厚度為 80 nm, 但是 caveolae 的凹

陷結構為 50-100 nm，因此無法以較多薄片涵蓋同一結構，如果要在連續切片得到更確實的結果，未來切片的厚度要減為 20 nm，會對該結構提出更有力的證據。

Endosome 標的物與高密度脂蛋白在動脈內皮細胞中的分佈

一般認為 caveolae 為不被 clatherin 包圍的細胞膜凹陷結構，因此高密度脂蛋白與 caveolae 作用在細胞所引形成的膜胞囊應與內胞飲作用成的細胞內小胞囊無關，然而有實驗認為一些存在於 caveolae 的分子如 GPI anchor protein, folate receptor 或是 cholesterol 同樣存在於 endosome 結構中(Gagescu et al., 2000)。因此本實驗也同時利用 early 及 late endosome 標的物：CD71 及 LAMP2 做免疫螢光染色，結果發現高密度脂蛋白並不與這些標的物呈現共同分佈(圖 15)。而進一步將細胞以 endosome 抑制劑 monensin 處理後並不會影響高密度脂蛋白的分佈情形(圖 16)，因此高密度脂蛋白與細胞作用後並不會與形成 endosome 的小胞囊結合運送。在 Mundy 等人 2002 年的研究中也發現在 CHO 細胞中以基因表達的 caveolin-1 並不會與 transferrin receptor (CD71)共同分佈，因此推測 caveolin-1 所形成的 caveosome 與 endosome 是不同的結構，但是由於兩者之間分佈的距離很近，再加上許多研究發現存在於 caveolae 的蛋白質如 GPI anchor protein 確實也

分佈於 endosome 上，因此兩種結構間可能有交互作用，即 caveosome 會與 endosome 接觸，將 caveosome 膜上的蛋白質以翻轉的方式轉移至 endosome 中做進一步代謝。

Caveolae 與細胞骨架

細胞內的胞器或是胞囊的移動均需靠細胞骨架完成，因此細胞骨架對於 Caveolae 所形成的細胞膜凹陷結構扮演很重要的角色。在 Mundy 等人 2002 年的研究中發現 microtubules 與 actin filaments 藉由不同的方式調控 caveolae 在細胞上的移動。以 GFP 螢光蛋白連結的 caveolin-1 過度表達在中國蒼鼠的卵巢細胞(CHO cell)中，以共軛焦顯微鏡發現有大量 caveolin-1 分佈在細胞膜上，細胞質中也有許多 caveolin-1 不斷移動、並且容易形成管狀的延長結構。以 nocodazole 藥物破壞 microtubule 的功能後則抑制了 caveolae 在細胞的移動，以及所形成管狀的延伸結構。以 Latrunculin A 處理細胞防止 actin 聚合後，發現 caveolae 不會在細胞上出現，而是以 caveosome 的方式運送至 centrosome 區域。由此實驗結果認為 caveolae 可能以三種方式存在細胞中，一個為細胞膜上固定凹陷的結構，此結構必須由細胞膜下方的 actin filaments 所維持，一個為由細胞膜凹陷往內延伸的管狀結構，此結構的延伸必須藉由 microtubule 完成，而此模式與本論文以高密

度脂蛋白與細胞作用後所呈現的結果相同(圖 12) , 但是否同樣受 microtubule 調控則需進一步實驗證明。第三種為在細胞內移動的 caveosome 結構。

高密度脂蛋白、caveolin-1 及 ABCA-1 在動脈內皮細胞中的表現及分佈

Caveolae 為一複雜的結構, 雖然主要是由 caveolin 的產生所形成 (Fra et al.,1995), 但是目前為止發現許多細胞接受器如 EGF 接受器或是 SR-BI 等都以 caveolae 為作用區域(Fielding, 2001; Babitt et a., 1997), 而目前認為是高密度脂蛋白主要接受器的 ABCA1 也以間接的方式發現其蛋白質表現量會隨著 caveolae 的表現而增加(Kojima et al., 2001), 但是兩者在細胞形態上的分佈情形則尚未進一步證實。在本實驗中, 以細胞免疫螢光染色發現當餵食膽固醇的內皮細胞與高密度脂蛋白培養後, ABCA1 與 caveolin-1 的分佈大致相同(圖 17), 因此 ABCA1 接受器可能位在 caveolae 結構上與高密度脂蛋白作用, 此結果則仍需更進一步證明。而 caveolin-1 除了與 ABCA1 有共同分佈外, 則有其獨立的分佈, 其原因可能是 caveolin-1 在細胞中除了調節膽固醇的平衡外, 在細胞訊息傳遞或是細胞移行上均有其重要功能, 因此 caveolin-1 在餵食膽固醇的內皮細胞中的分佈除了與細胞內膽固醇的

平衡有關外，仍舊有其他功能執行。

總結本實驗結果做以下結論，(1)高密度脂蛋白在調節細胞膽固醇釋出的過程是在細胞膜小囊中進行，(2)經過免疫標定後確認此構造為細胞膜凹陷結構 caveolae，而 caveolae 上的主要蛋白 caveolin-1 與高密度脂蛋白呈現共同分佈情形，(3)高密度脂蛋白與細胞作用後不會形成自由的細胞內小胞囊，(4)高密度脂蛋白接受器 ABCA1 可能經由 caveolae 之結構與高密度脂蛋白發生運送膽固醇的作用。

參考文獻

- Alam R, Yatsu FM, Tsui L, Alam S (1989) Receptor-mediated uptake and retroendocytosis of high-density lipoproteins by cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages: possible role in enhancing reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* **1004**: 292-299.
- Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**: 199-225.
- Arakawa R, Abe-Dohmae S, Asai M, Ito J, Yokoyama S. (2000) Involvement of caveolin-1 in cholesterol enrichment of high density lipoprotein during its assembly by apolipoprotein and THP-1 cells. *J Lipid Res.* **41**: 1952-1962.
- Assmann G, Funke H (1990) HDL metabolism and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* **16** (suppl. 9): S15-20.
- Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RGW, Xu S, 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 plasmamembrane caveolae. *J. Biol. Chem.* **272**: 13242-13249.
- Brown MS, Goldstein JL (1970) Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* **191**: 150-154.

- Boundgaard M, Frokjaer-Jensen J, Crone C (1979) Endothelial plasmalemmal vesicles as elements in a system of branching invaginations from the cell surface. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 6439-6442.
- Chang WJ, Rothberg KG, Kamen BA, Anderson RGW (1992) Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *J Cell Biol* **118**: 63-69.
- Chao WT, Fan SS, Yang VC (2002) Visualization of the uptake of high-density lipoprotein by rat aortic endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. *The Histochemical Journal* **34**: 233-239.
- Chao WT, Fan SS, Chen JK, Yang VC. (2003). Visualizing caveolin-1 and HDL in cholesterol-loaded aortic endothelial cells. *J Lipid Res* **44**: 1094-1099..
- DeLamatre JG, Sarphie TG, Archibold RG, Hornick CA (1990) Metabolism of apoE-free high density lipoproteins in rat hepatoma cells: evidence for a retroendocytic pathway. *J Lipid Res* **31**: 191-202.
- Diglio CA, Grammas P, Giacomelli F, Wiener J (1989) Angiogenesis in rat aorta ring explant culture. *Lab Invest* **60**: 523-531.
- Fidge NH (1999) High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J Lipid Res* **40**: 187-201.
- Fielding CJ, Fielding PE (1995) Molecular physiology of reverse

- cholesterol transport. *J Lipid Res* **36**: 211-228.
- Fielding CJ, Fielding PE (1997) Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* **38**: 1503-1521.
- Fielding CJ, Fielding PE (2000) Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**: 210-222.
- Fielding CJ, (2001). Caveolae and signaling. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**: 281-287.
- Fielding PE, Fielding CJ (1995) Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* **34**: 14288-14292.
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) *De novo* formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8655-8659.
- Francis GA, Perry RJ (1999) Targeting HDL-mediated cellular cholesterol efflux for the treatment and prevention of atherosclerosis. *Clin Chim Acta* **286**: 219-230.
- Frank PG, Galbiati F, Volonte D, Razani B, Cohen DE, Marcel YL, Lisanti MP (2001) Influence of caveolin-1 on cellular cholesterol efflux mediated by high-density lipoproteins. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: C1204-1214.
- Gagescu R, Demaurex N, Parton RG, Hunziker W, Huber LA, Gruenberg J (2000) The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney

- cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell* **11**: 2775-2791.
- Galbiati F, Razani B, Lisanti MP (2001) Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* **106**: 403-411.
- Glass CK, Witztum JL (2001) Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* **104**: 503-516.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russell DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* **1**: 1-39.
- Graham DL, Oram JF (1987) Identification and characterization of a high density lipoprotein-binding protein in cell membranes by ligand blotting. *J Biol Chem.* **262**: 7439-7442.
- Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, de la Llera-Moya M, Philips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR (1997) Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* **272**: 20982-20985.
- Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A (1991) High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* **11**: 174-182.
- Kannel WB, Wilson P, Blair SN (1985) Epidemiological assessment of the role of physical activity and fitness in development of cardiovascular disease. *Am Heart J* **109**: 876-885.

- Kojima K, Abe-Dohmae S, Arakawa R, Murakami I, Suzumori K, Yokoyama S (2001) Progesterone inhibits apolipoprotein-mediated cellular lipid release: a putative mechanism for the decrease of high-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1532**: 173-184.
- Kurzchalia TV, Parton RG (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 424-431.
- Kwiterovich PO (2000) The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: A current review. *Am J Cardiol* **86** (suppl): 5L-10L.
- Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG (1999) The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* **104**: R25-31.
- Lin G, Oram JF (2000) Apolipoprotein binding to protruding membrane domains during removal of excess cellular cholesterol. *Atherosclerosis* **149**: 359-370.
- Mendez AJ, Oram JF, Bierman EL (1991) Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J Biol Chem* **266**: 10104-10111.
- Mendez AJ, Lin G, Wade DP (2001) Membrane lipid domains distinct from cholesterol / sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway. *J Biol Chem* **276**:

3158-3161.

Mundy DI, Machleidt T, Ying YS, Andeson RGW, Bloom GS (2002)

Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **115**: 4327-4339.

Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly

M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB (2001) Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem* **276**: 27584-27590.

Nion S, Briand O, Lestavel S, Torpier G, Nazih F, Delbart C, Fruchart JC,

Clavey V (1997) High-density-lipoprotein subfraction 3 interaction with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochem J* **328**: 415-423.

Oram JF, Brinton EA, Bierman EL (1983) Regulation of high density

lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* **72**: 1611-1621.

Oram JF, Mendez AJ, Slotte P, Johnson TF (1991) High density

lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts. *Arterioscler Thromb* **11**: 403-414.

Oram JF, Vaughan AM (2000) ABCA1-mediated transport of cellular

cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* **11**: 253-260.

- Palade GE (1953) Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* **24**: 1424.
- Phillips MC, Gillotte KL, Haynes MP, Johnson WJ, Lund-Katz S, Rothblat GH (1998) Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes. *Atherosclerosis* **137** (Suppl.): S13-17.
- Rader DJ, Dugi K (2000) The endothelium and lipoproteins: insights from recent cell biology and animal studies. *Semin Thromb Hemost* **26**: 521-528.
- Reaven E, Tsai L, Azhar S (1996) Intracellular events in the selective transport of lipoprotein-derived cholesteryl esters. *J Biol Chem* **271**: 16208-16217.
- Rogler G, Aschenbrenner E, Gross V, Stange EF, Scholmerich J (2000). Intracellular transport of high-density lipoprotein 3 in intestinal epithelial cells (Caco-2) is tubulin associated. *Digestion* **61**: 47-58.
- Rogler G, Herolg G, Fahr C, Fahr M, Rogler D, Reimann FM, Stange EF (1992) High-density lipoprotein 3 retroendocytosis: A new lipoprotein pathway in the enterocyte. *Gastroenterology* **103**: 467-480.
- Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC (1999) Cellular cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res* **40**:

781-796.

Schmitz G, Robenek H, Lohmann U, Assmann G (1985) Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *EMBO J* **4**: 613-622.

Slott JP, Oram JF, Bierman EL (1987) Binding of high density lipoproteins to cell receptors promote translocation of cholesterol from intracellular membranes to the cell surface. *J Biol Chem* **262**: 12904-12907.

Stein O, Stein Y (1999) Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* **144**: 285-301.

Sviridov D (1999) Intracellular cholesterol trafficking. *Histol Histopathol* **14**: 305-319.

Tall AR (1998) An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* **19**: A31-35.

Takamashi Y, Smith JD (1999) Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 11358-11363.

Weibel ER. 1973. Stereological techniques for electron microscopy. In: Hayat, M. A. Principles and techniques of electron microscope,

biological applications. Van Nostrand-Reinhold. New York.

Yang VC, Lee TY, Hwang GY, Kao CH, Chen JK (1999)

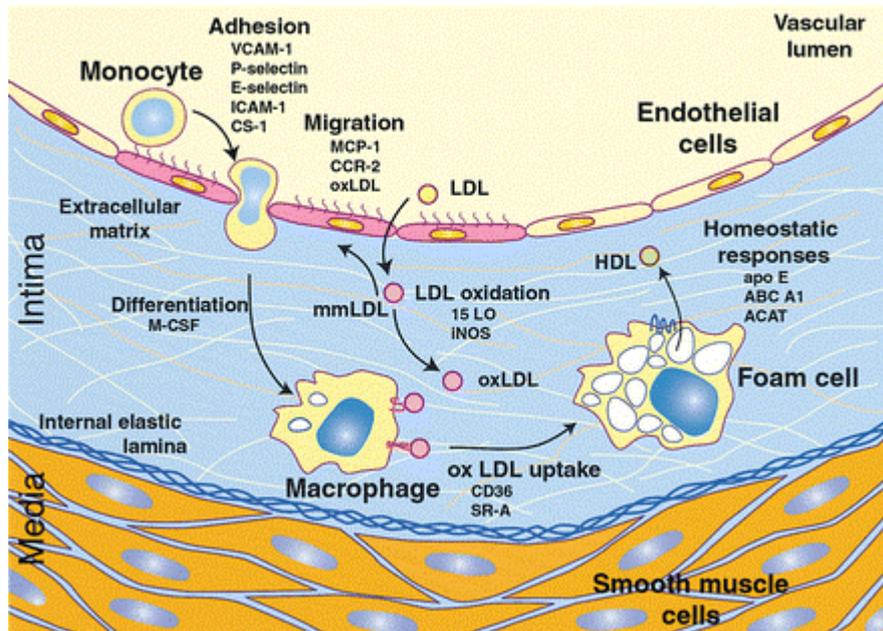
Immunolocalization of high-density lipoproteins in arterial walls of rats. *Atherosclerosis* **142**: 269-277.

Zha XH, Links P, Marcel Y (1998) Caveolin-1 expression and its role in cholesterol efflux in rat hepatoma cells. *Mol Cell Biol* **9**: 562S

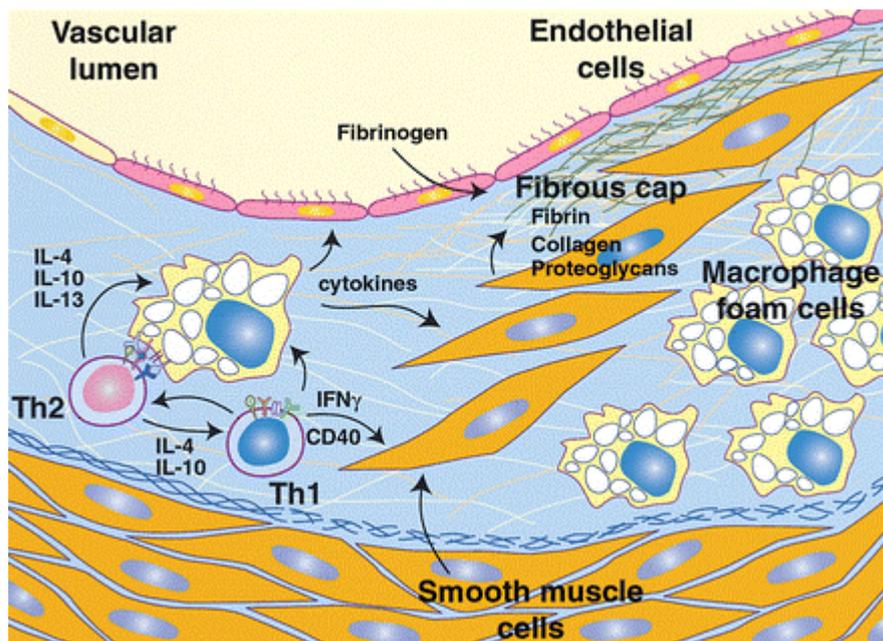
圖目錄

附圖一 動脈粥瘤的形成.....	56
附圖二 膽固醇的逆運送.....	57
附圖三 細胞內膽固醇的運送途徑.....	58
附圖四 高密度脂蛋白在周邊細胞中的代謝途徑.....	59
附圖五 膽固醇調節 caveolin-1 表現的分子機制.....	60
圖一 電子顯微鏡觀察餵食膽固醇之內皮細胞與高密度脂蛋白作用 後細胞形態的改變.....	61
圖二 螢光膽固醇(BODIPY FL C ₁₂)培養的動脈內皮細胞, 與 HDL-DiI 在細胞中的分佈.....	62
圖三 電子顯微鏡觀察金粒子標定之高密度脂蛋白與餵食膽固醇之 內皮細胞的作用情形.....	63
圖四 以形態定量分析法分析高密度脂蛋白與膠體金粒子複合物在 細胞中不同區域的分佈.....	64
圖五 高密度脂蛋白調控細胞內螢光標定之膽固醇釋出的情形....	65
圖六 以胰蛋白酵素處理後高密度脂蛋白在細胞中的含量.....	66
圖七 動脈內皮細胞與膽固醇及高密度脂蛋白培養後 caveolin-1 在細 胞中的表現含量.....	67

圖八	共軛焦螢光顯微鏡觀察高密度脂蛋白與 caveolin-1 在動脈內皮細胞中的分佈情形.....	68
圖九	螢光標定之高密度脂蛋白與 caveolin-1 在動脈內皮細胞中呈現共同分佈之放大圖.....	69
圖十	螢光標定之高密度脂蛋白、caveolin-1 與 actin 在細胞中三度空間的分佈情形(正面觀).....	70
圖十一	螢光標定之高密度脂蛋白、caveolin-1 與 actin 在細胞中三度空間的分佈情形(側面觀).....	71
圖十二	以免疫電子顯微鏡法觀察高密度脂蛋白與 caveolin-1 在動脈內皮細胞中的分佈.....	72
圖十三	電子顯微鏡觀察高密度脂蛋白位於細胞膜連續凹陷的胞囊中.....	73
圖十四	電子顯微鏡觀察高密度脂蛋白與膜小囊在連續切片中的分佈.....	74
圖十五	高密度脂蛋白與 endosome 標的物在細胞中的分佈情形...	75
圖十六	Endosome 抑制劑對高密度脂蛋白在細胞中分佈的影響...	76
圖十七	ABCA1 與 caveolin-1 在動脈內皮細胞中的分佈.....	77



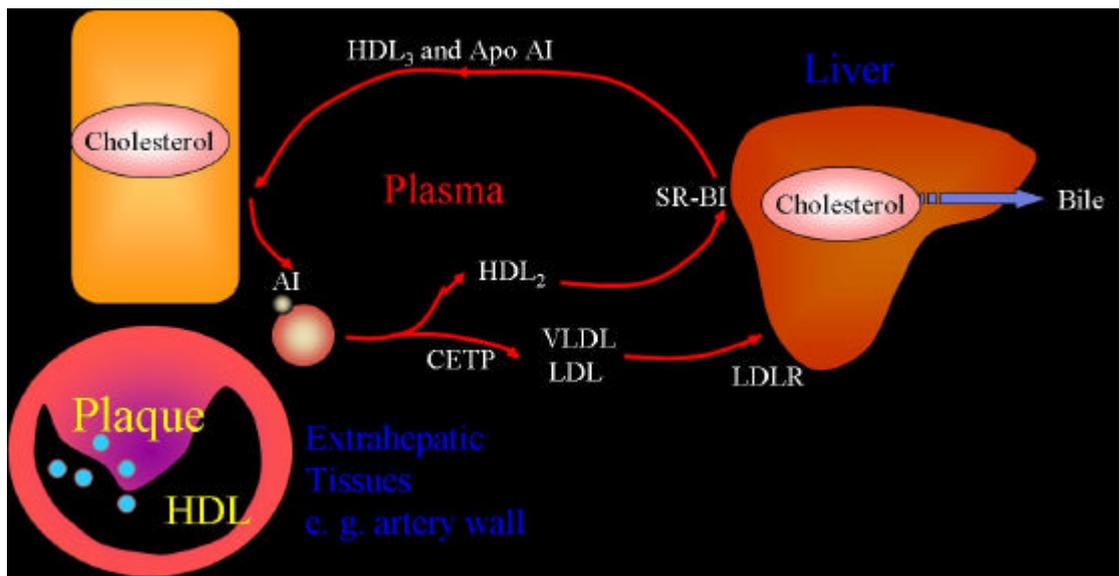
a



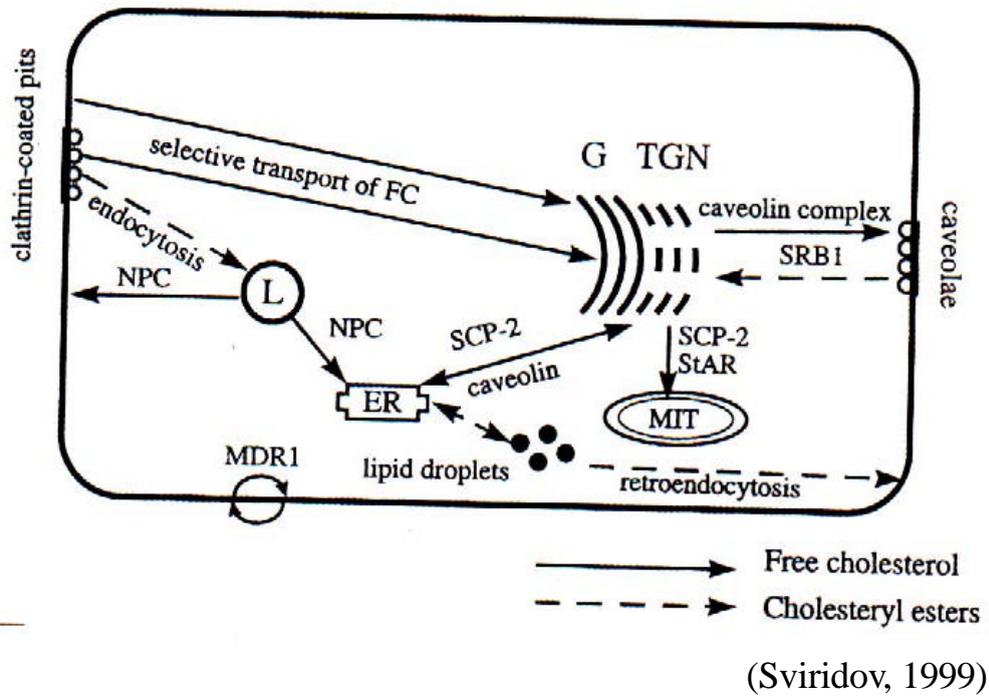
b

(Glass & Witztum, 2001)

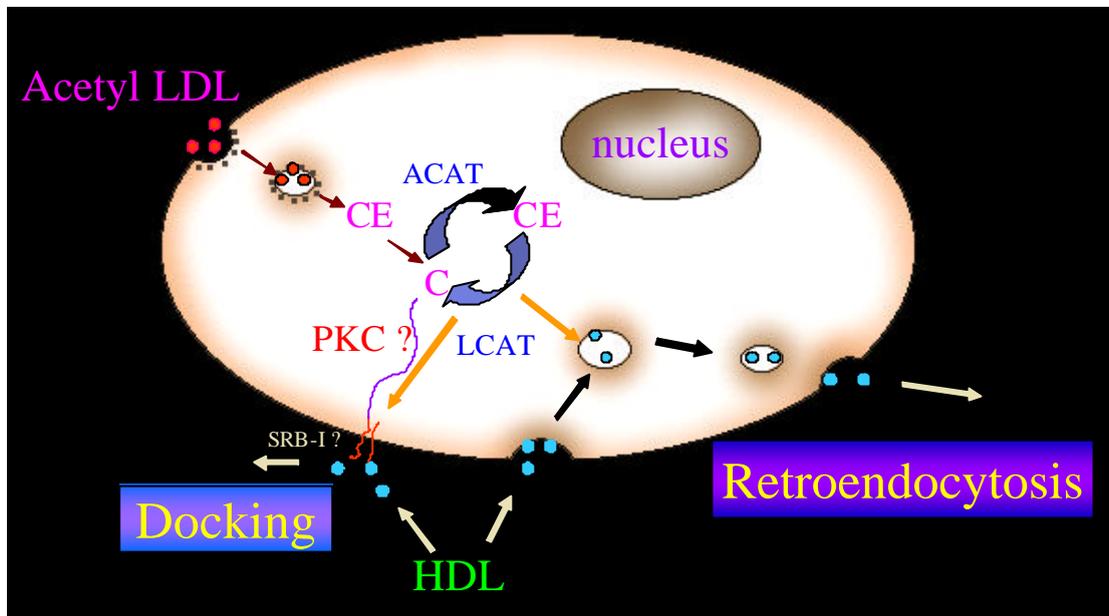
附圖一 動脈粥瘤的形成



附圖二 膽固醇的逆運送

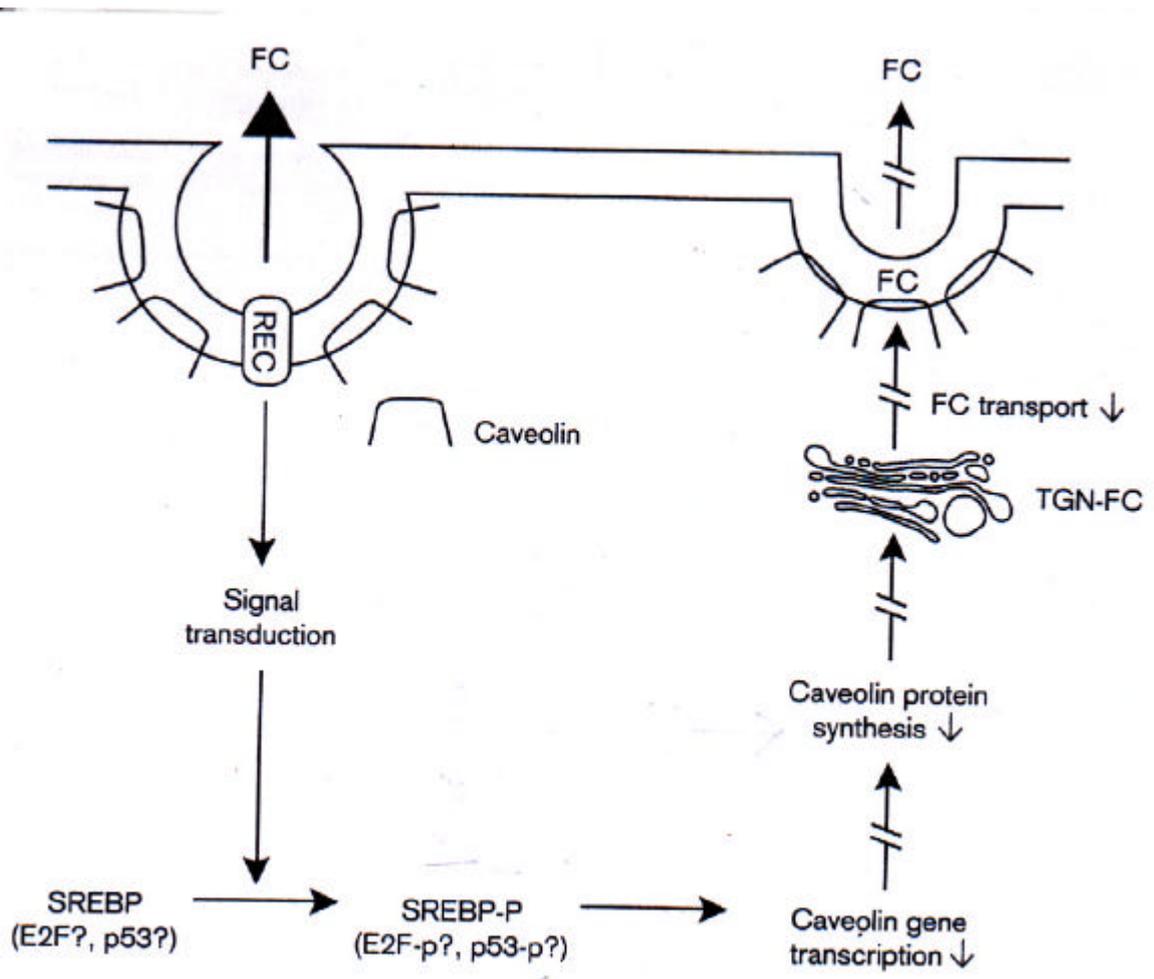


附圖三 細胞內膽固醇的運送途徑



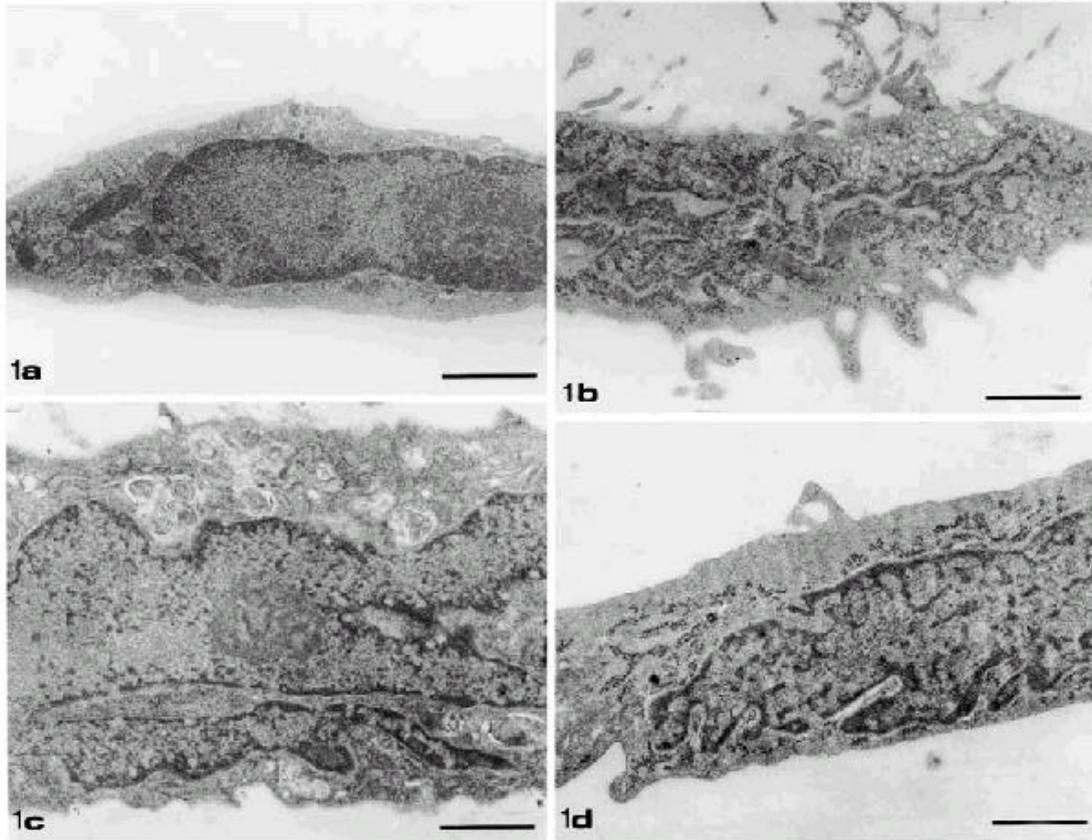
(Assmann & Funke, 1990)

附圖四 高密度脂蛋白在周邊細胞中的代謝途徑

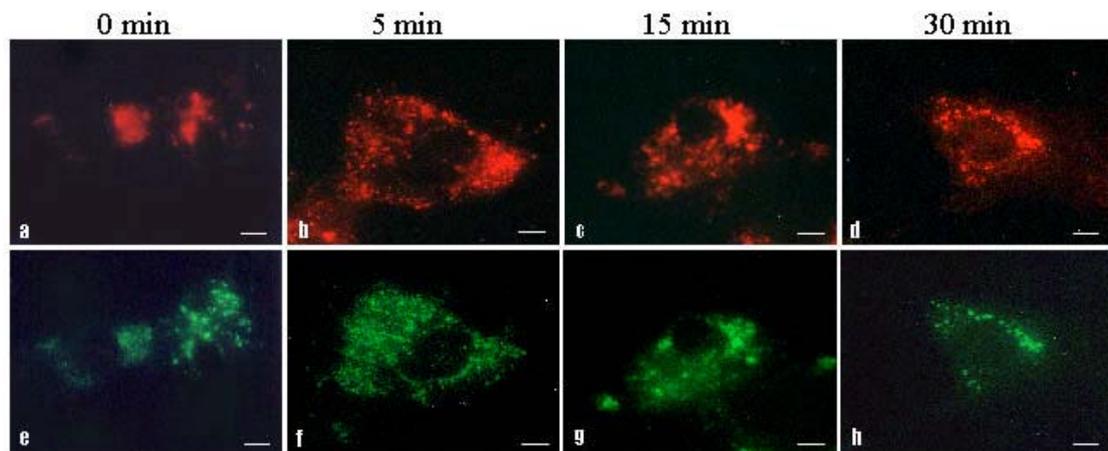


(Fielding, 2001)

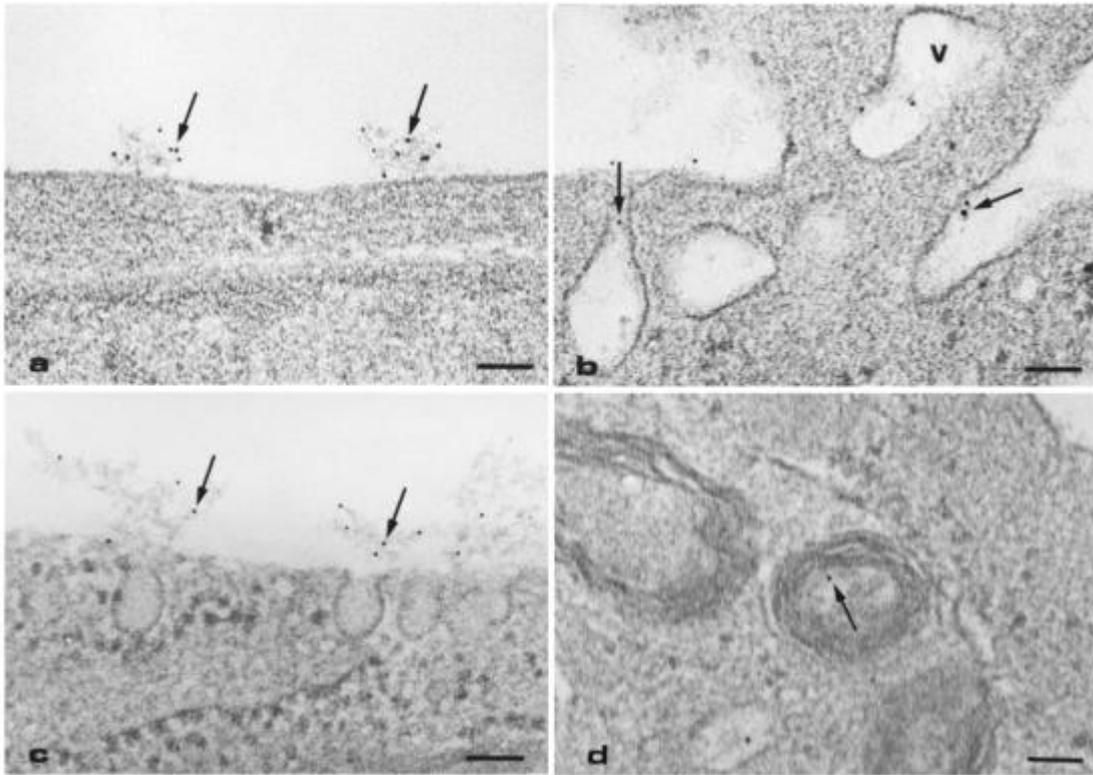
附圖五 膽固醇調節 caveolin-1 表現的分子機制



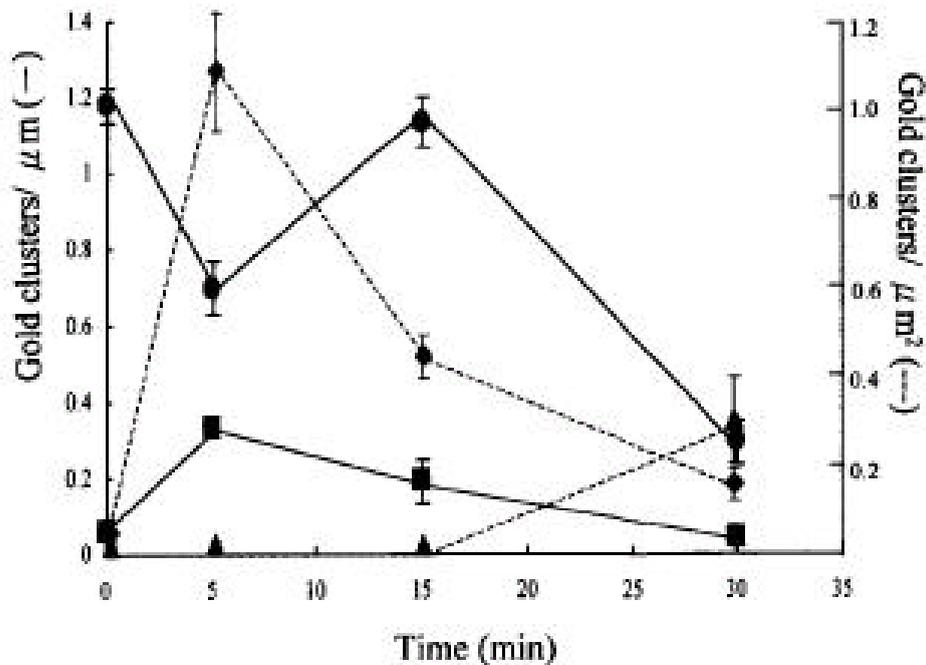
圖一、以電子顯微鏡觀察細胞形態結果顯示，當細胞與高密度脂蛋白在 4℃ 下作用 2 小時後，細胞膜較為平坦，並且細胞質中並無太多膜小囊出現(a)。當細胞與高密度脂蛋白在 37℃ 下培養 5 分鐘時，細胞膜開始內陷，並且出現偽足構造，在靠近偽足部分的細胞質則有許多膜小囊出現(b)。15 分鐘及 30 分鐘後，細胞膜則又回復平坦，而膜小囊的數量也顯著減少(c-d)。游標尺= 2 μ m



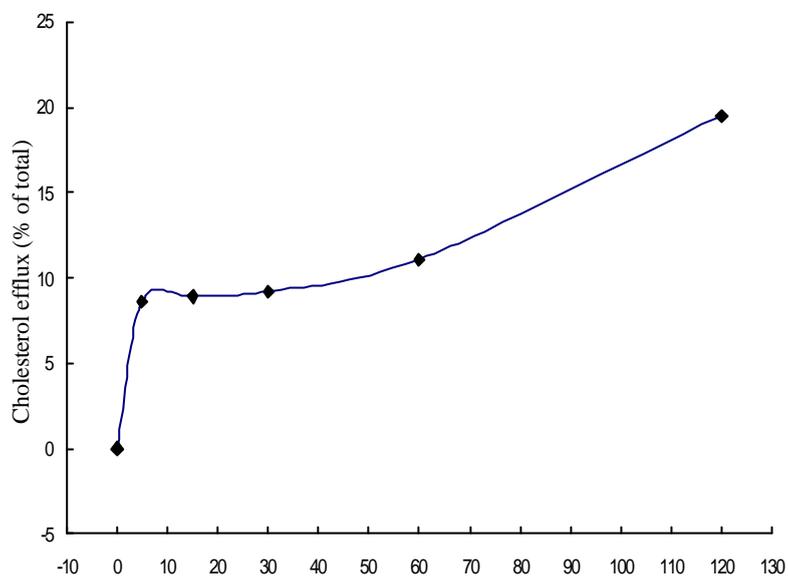
圖二、經過 48 小時餵食過螢光膽固醇(BODIPY FL C₁₂)的動脈內皮細胞，與 50 μg/ml HDL-DiI 於 4 °C 下培養 2 小時後，HDL-DiI 在細胞中分佈呈現擴散狀(a)。當細胞繼續在 37 °C 下培養 5 分鐘至 30 分鐘時，HDL-DiI 以顆粒狀分佈於細胞上(b-d)。而細胞內螢光膽固醇則與高密度脂蛋白呈現共同分佈(e-h)。游標尺=2 μm



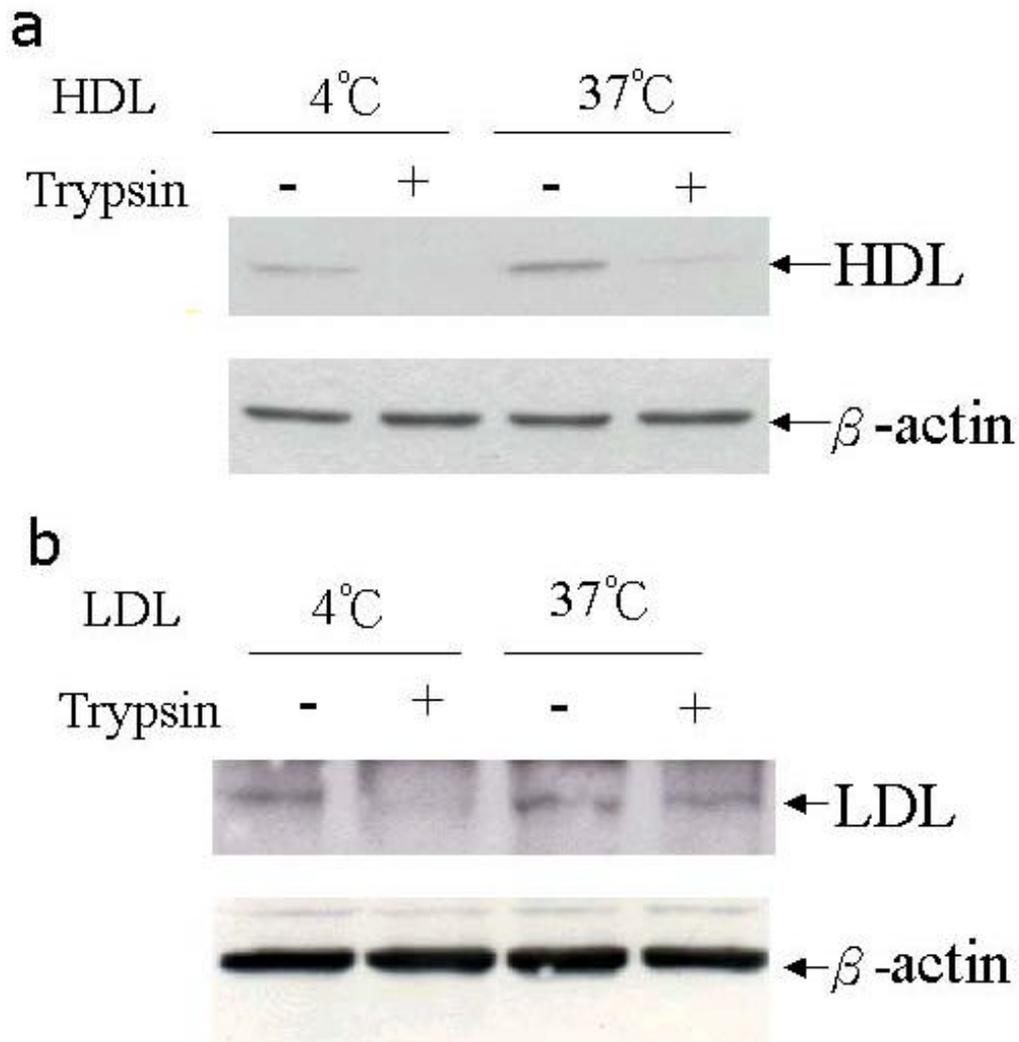
圖三、將餵食 48 小時膽固醇之內皮細胞在含 $50 \mu\text{g/ml}$ 高密度脂蛋白與膠體金粒子複合物的培養基中於 4°C 培養 2 小時，高密度脂蛋白與金粒子複合物(箭號)在出現在細胞膜上(a)，接著在 37°C 中培養 5 分鐘後，金粒子出現在凹陷的細胞膜或小胞囊中(b)，經過 15 分鐘後，大部分的金粒子則又出現在細胞膜上(c)。到了 30 分鐘後，少數金粒子分佈於細胞膜上凹陷部分或是溶體中(d)。V:小胞囊。游標尺= $0.1 \mu\text{m}$



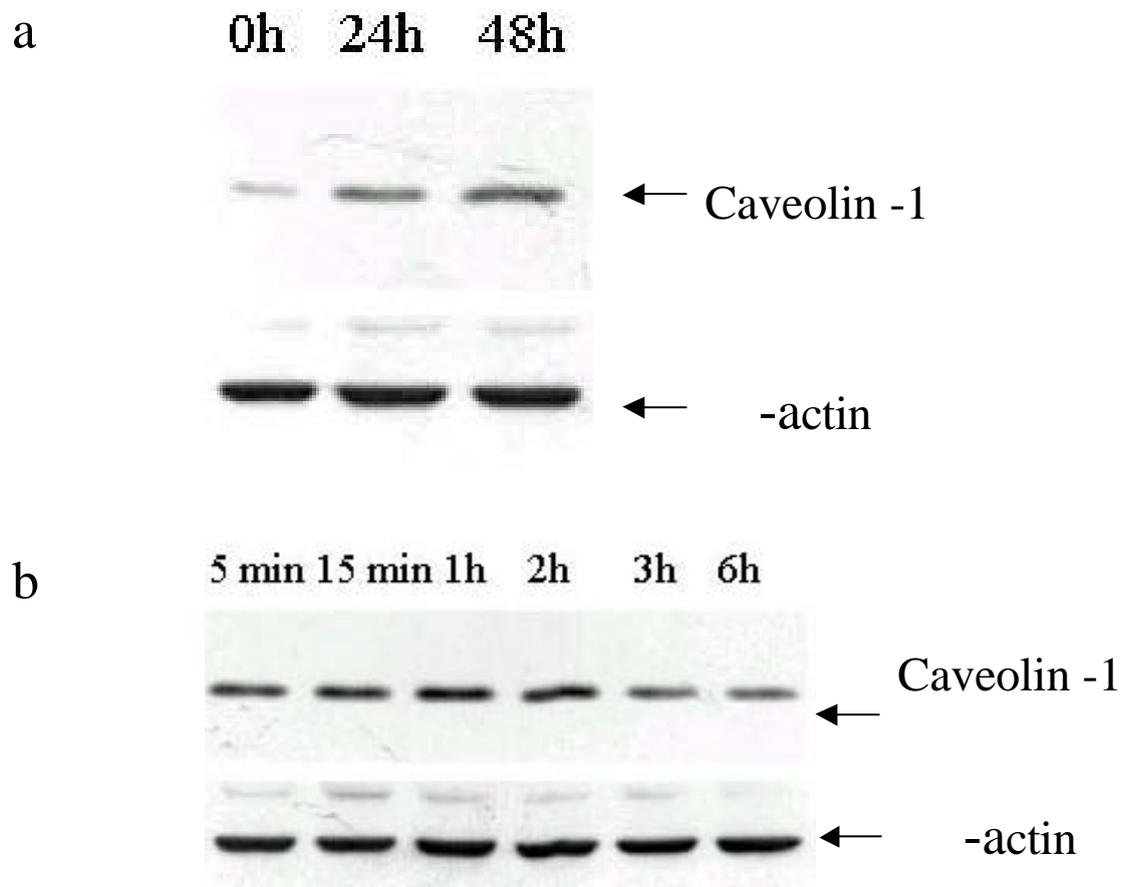
圖四、以型態定量分析法分析高密度脂蛋白與膠體金粒子複合物在細胞中不同區域的分佈，細胞膜.，膜小囊.，小胞囊.，溶體. 數值為平均值 ±標準偏差，其對應為每 1 μ m 細胞膜 (—) 或 1 μ m² 細胞質 (---) 所含金粒子之數目.



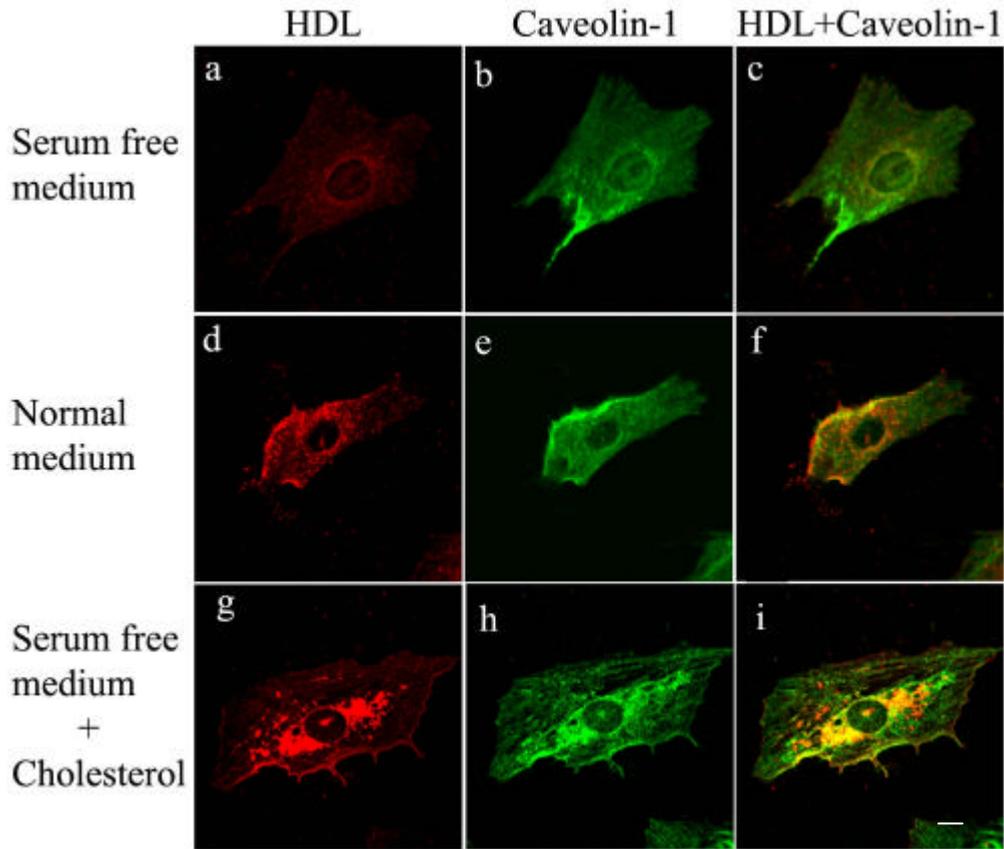
圖五 動脈內皮細胞餵食螢光膽固醇酯(BODIPY FL C₁₂) 48 小時後與高密度脂蛋白(100 μ g/ml) 培養 0, 5, 15, 30, 60 及 120 分鐘。培養液中螢光膽固醇的含量隨著時間的增加而增加。



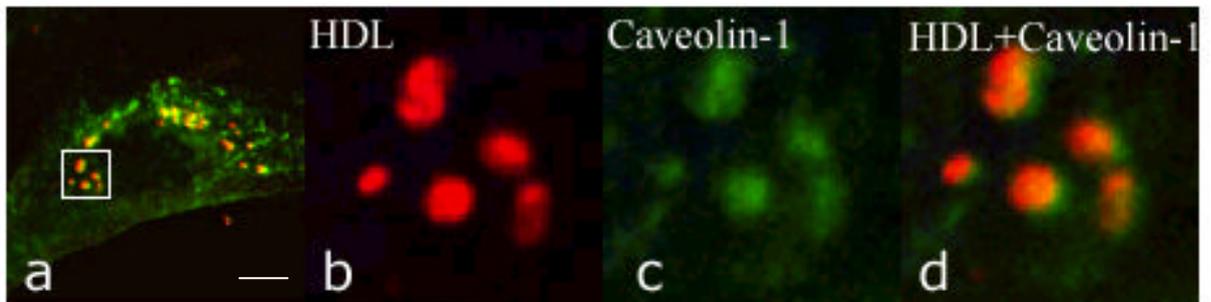
圖六、在西方點墨法結果中顯示當餵食膽固醇的內皮細胞與高密度脂蛋白在 4°C 下作用 2 小時或繼續在 37°C 作用 15 分鐘，不以胰蛋白酵素處理，則細胞萃取液中含有高密度脂蛋白，當以胰蛋白酵素處理後，在 4°C 時無高密度脂蛋白的存在，而在 37°C 時只偵測到極微量高密度脂蛋白的存在(a)。在另一組低密度脂蛋白的實驗中，脂蛋白在 37°C 下則未被胰蛋白酵素移除 (b)。



圖七、當動脈內皮細胞與膽固醇培養 24 及 48 小時後，以西方點墨法偵測 caveolin-1 的表現明顯增加(a)，而當細胞與高密度脂蛋白作用後，caveolin-1 的表現在 5 分鐘及 15 分鐘時上升，一小時後逐漸下降 (b)。

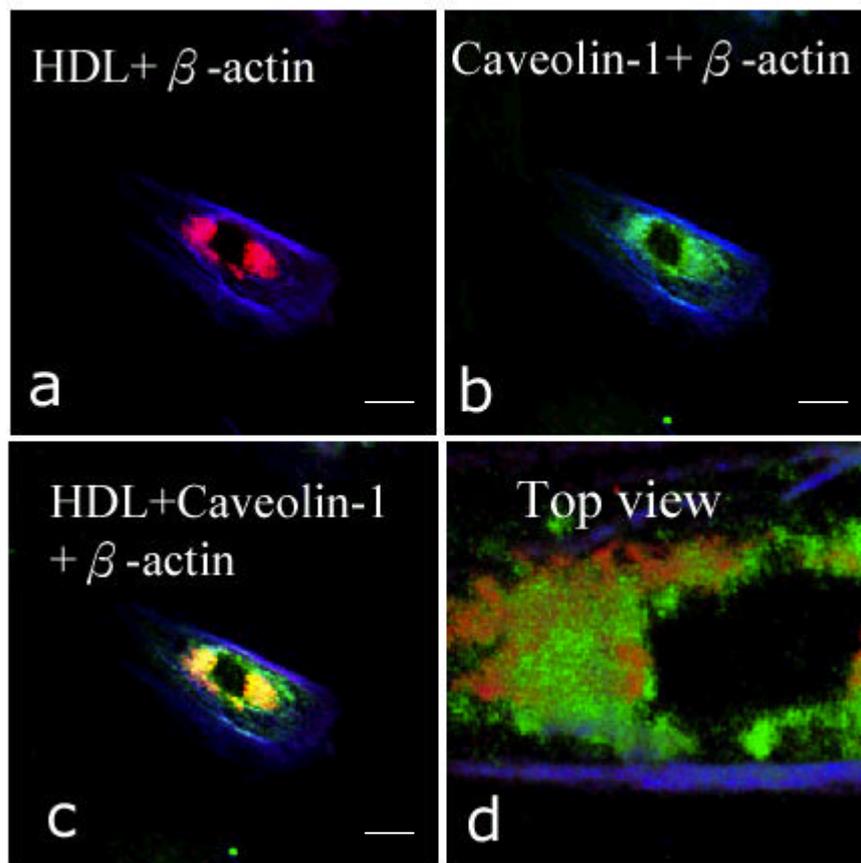


圖八、共軛焦顯微鏡結果顯示當細胞培養於無血清培養基 24 小時後，與螢光標定高密度脂蛋白在 37 °C 下培養 5 分鐘，則細胞中並無大量高密度脂蛋白及 caveolin-1 分佈(a-c)。當細胞培養在正常培養基時，則有少量高密度脂蛋白分佈於細胞中(d-f)。而當細胞培養在膽固醇培養基 48 小時後，則觀察到大量高密度脂蛋白及 caveolin-1 分佈於細胞中(g, h)，且其分佈區域極為相似(i)。游標尺= 2 μm

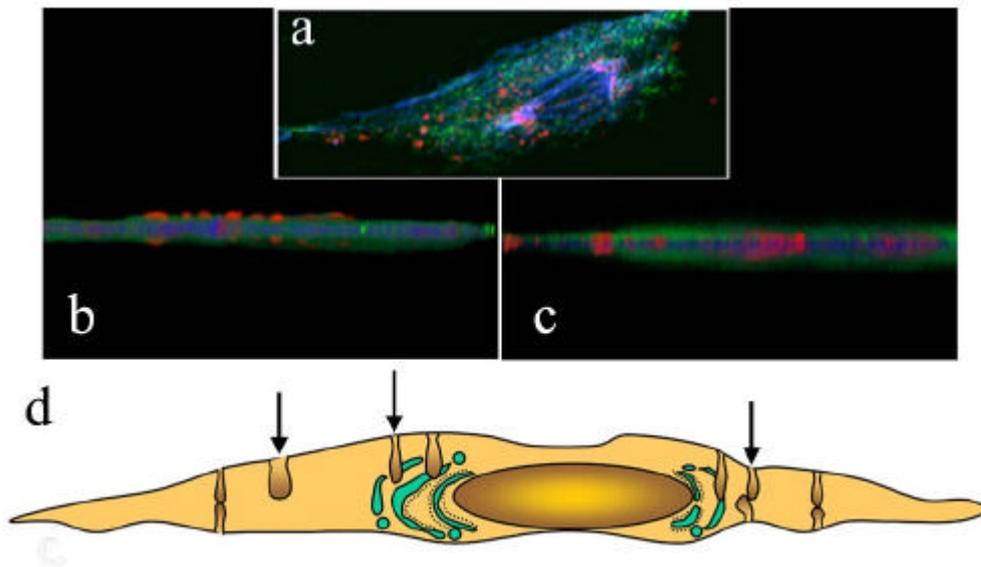


圖九、經膽固醇餵食之動脈內皮細胞在共軛焦螢光顯微鏡下顯示 HDL(紅色)及 caveolin-1(綠色)之分佈(a), 白色方塊經放大後顯示 HDL 及 caveolin-1 共同分佈的情形(b-d)。游標尺= 2 μ m

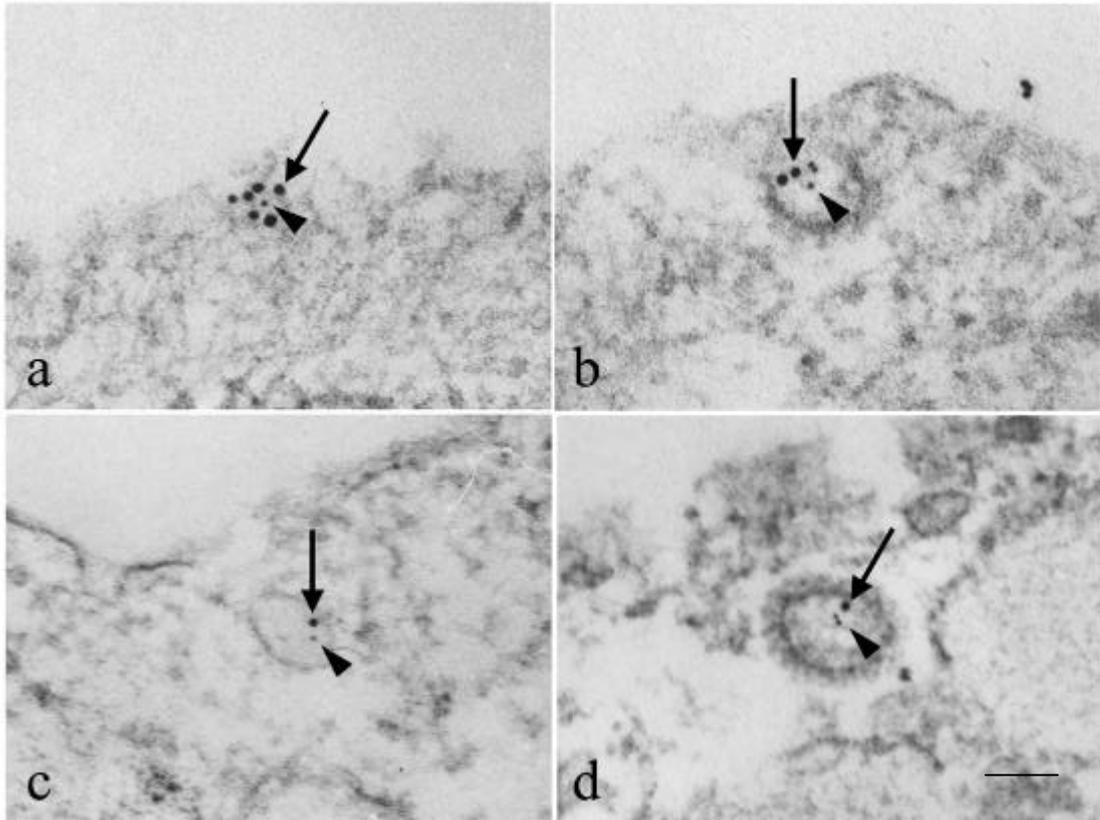




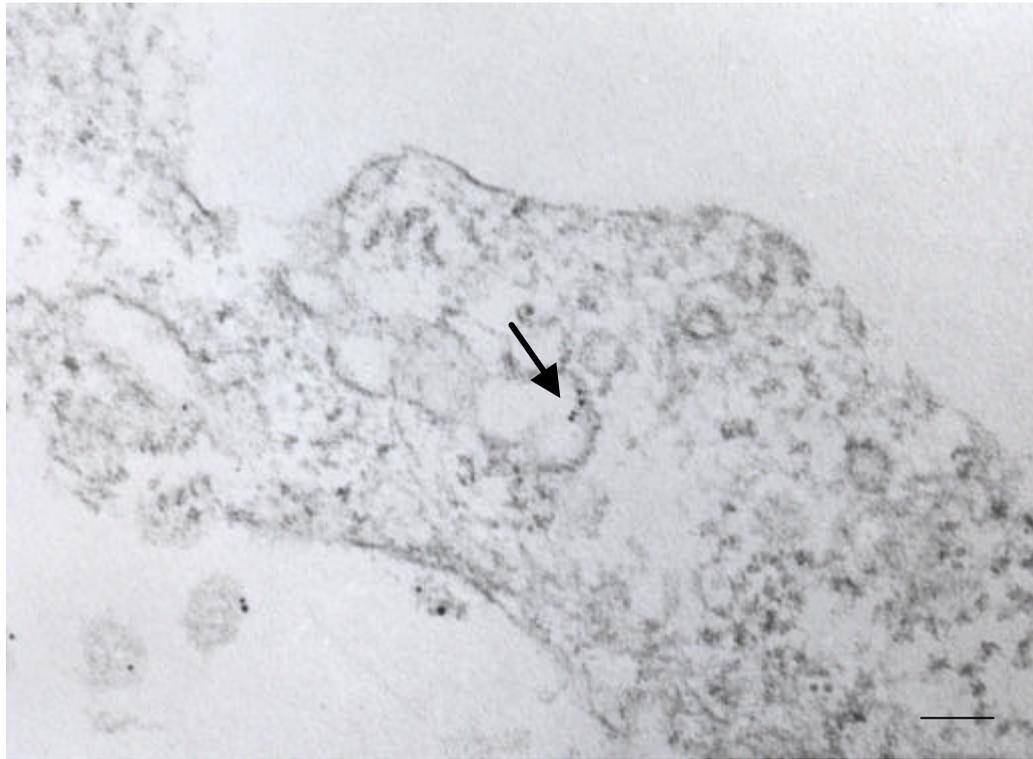
圖十、餵食膽固醇之動脈內皮細胞經免疫染色後其高密度脂蛋白、caveolin-1 及 actin 的分佈分別以紅色、綠色及藍色表示(a-c)。以共軛焦顯微鏡觀察經 3D 掃描後得到影像顯示高密度脂蛋白與 caveolin-1 共同分佈於細胞膜上(d)。游標尺=2 μ m



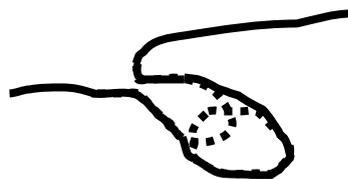
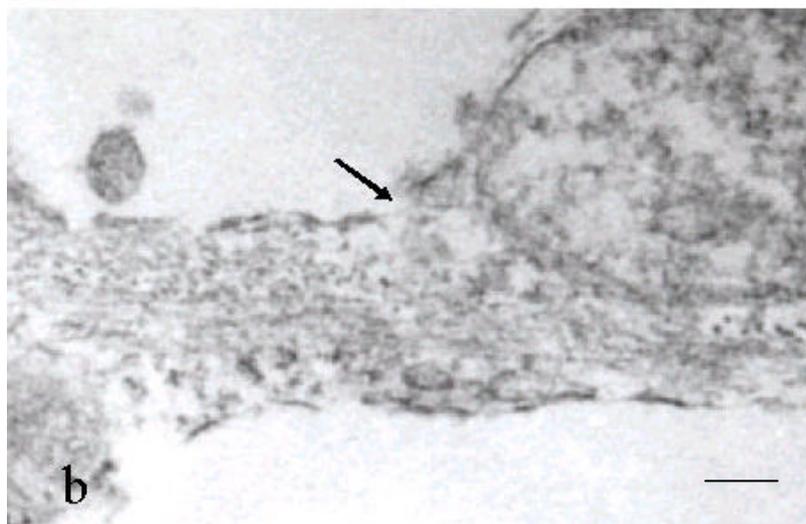
圖十一、餵食膽固醇之動脈內皮細胞經免疫染色後其高密度脂蛋白、caveolin-1 及 actin 分別以紅色、綠色及藍色表示(a)。其 3D 共軛焦影像以側面觀顯示藍色的 actin 位於細胞質部位，而綠色的 caveolin-1 則位於外圍細胞膜上(b, c)。高密度脂蛋白(紅色)分佈於細胞膜上(b)或是穿越整個細胞(c)。卡通示意圖顯示高密度脂蛋白位於細胞膜凹陷處。



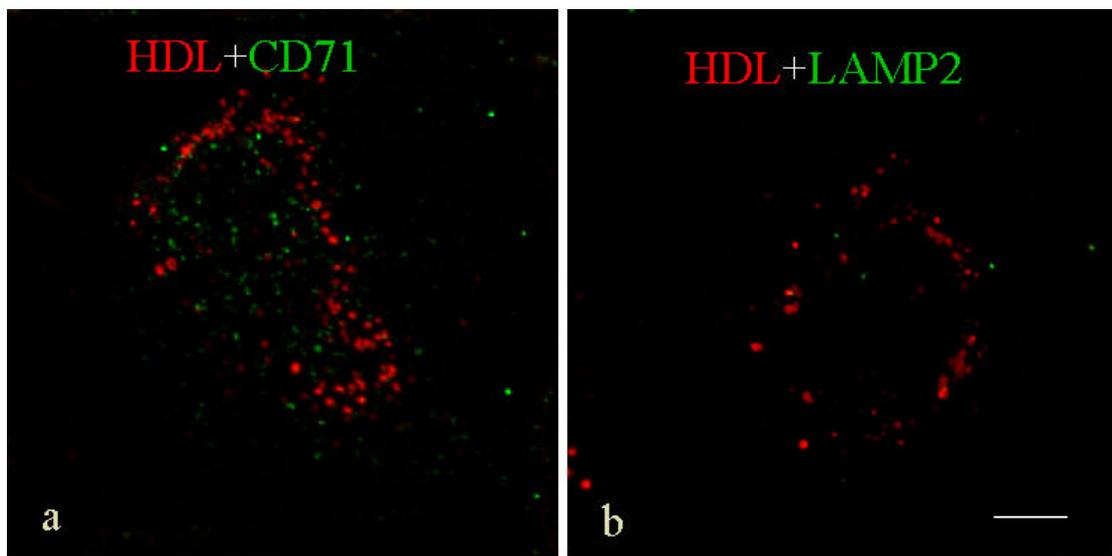
圖十二、免疫電子顯微鏡結果顯示高密度脂蛋白(箭頭)與 caveolin-1(箭號)共同分佈於細胞膜凹陷(a, b)及小胞囊中(c), 極少數高密度脂蛋白與 caveolin-1 分佈於有 coat 的胞囊中(d), 游標尺= 0.1 μ m



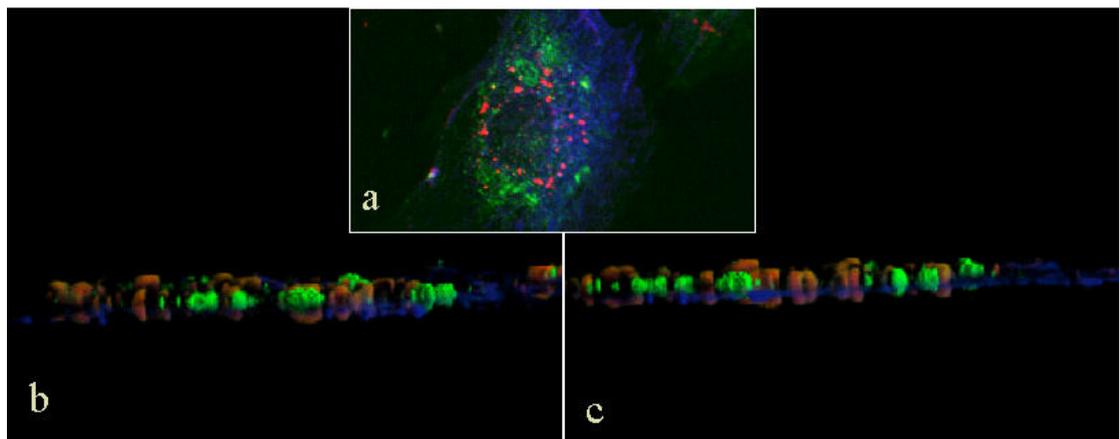
圖十三、電子顯微鏡照片顯示高密度脂蛋白(箭號)位於細胞膜連續凹陷的胞囊中。游標尺= 0.1 μ m



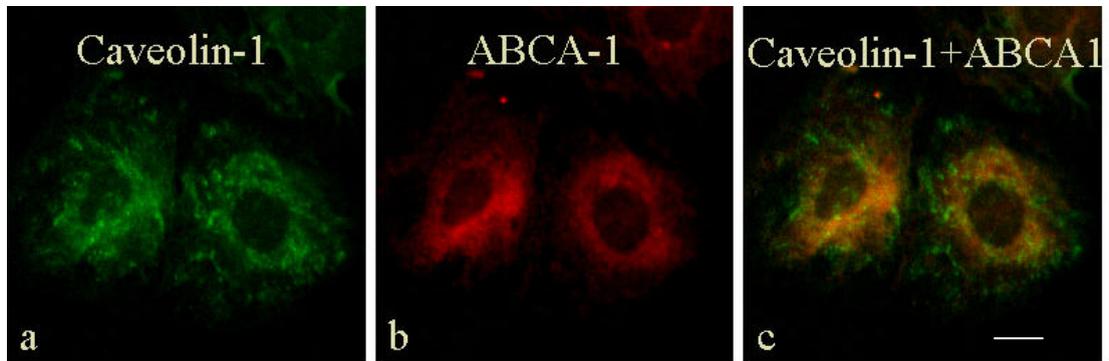
圖十四、電子顯微鏡觀察連續切片。標有金粒子之高密度脂蛋白位於細胞小胞囊中(a)，在相鄰的切片中的同一位置，小胞囊已成開口向外之細胞膜凹陷結構(箭號)(b)。



圖十五、膽固醇餵食之動脈內皮細胞與螢光標定高密度脂蛋白在 37
下培養 5 分鐘後高密度脂蛋白與 endosome 標的物的分佈。紅色螢
光標定之高密度脂蛋白(HDL-DiI)與綠色螢光標定的 early endosome
marker CD71(a)及 late endosome marker LAMP2 (b)在細胞中均呈現獨
立的分佈。游標尺=2 μ m



圖十六、Endosome 抑制劑對高密度脂蛋白的影響。餵食膽固醇之內皮細胞以 $10\mu\text{g/ml}$ monensin 處理三小時後與螢光標定之高密度脂蛋白(HDL-DiI)作用。免疫染色後高密度脂蛋白、caveolin-1 及 actin 分別以紅色、綠色及藍色表示(a)。3D 共軛焦影像以側面觀顯示高密度脂蛋白(紅色)分佈於細胞膜上(b)或是穿越整個細胞(c)。



圖十七、ABCA1 與 caveolin-1 在細胞中的分佈。當餵食膽固醇之內皮細胞與高密度脂蛋白作用後進行 caveolin-1 (a)與 ABCA1 (b)的免疫螢光染色, (c)為 caveolin-1 與 ABCA1 共同分佈的情形。游標尺= 2 μ m

個人資料表

中文姓名：趙偉廷

英文姓名：Chao Wei-Ting

出生日期：1975 年 3 月 18 日

出生地：中華民國台灣省嘉義市

戶籍地：嘉義市興中街 86 號

電子信箱：thufred@yahoo.com.tw

學歷：碩士 (9. 1997- 6. 1999)東海大學生物學系

學士 (9. 1993- 6. 1997)東海大學生物學系

經歷：兼任助教(1997-2001)、東海大學生物學系

研究助理(1997-2003)、東海大學生物學系

得獎

Microscopy & Microanalysis Congress, 1st prize of student poster, 2000. USA.

Focus on Microscopy Congress, Excellent Poster Award, 2002. Taiwan.

論文發表

期刊論文

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., Fan, S. S., and Yang, V. C. (2002). Visualization of the uptake of high-density lipoprotein by rat aortic endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. *The Histochemical Journal* 34: 233-239.

Lee, W. C., **Chao, W. T.**, and Yang, V. C. (2001). Effects of high-cholesterol diet on the interendothelial clefts and the associated junctional complexes in rat aorta. *Atherosclerosis* 155: 307-312.

研討會論文

Chao, W. T., Fan, S. S., Chen, J. K., and Yang, V. C. (2002). Colocalization of caveolin-1 and HDL in the plasmalemmal invaginations of cholesterol-loaded aortic endothelial cells. ASCB 2002 meeting, San Francisco, USA.

Chao, W. T., and Yang, V. C. (2002). The expression of caveolin by HDL in cholesterol-loaded aortic endothelial cells. The 4th Asian-Pacific Organization for Cell Biology Congress, Taipei, Taiwan.

Chao, W. T., and Yang, V. C. (2002). The expression of caveolin by HDL in cholesterol-loaded aortic endothelial cells. *Microscopy & Microanalysis '02*, Quebec, Canada.

Chao, W. T., and Yang, V. C. (2002). Visualization of the uptake of high-density lipoprotein by rat aortic endothelial cells in vitro. *Focus on Microscopy 2002*, Kaohsiung, Taiwan.

Chao, W. T., and Yang, V. C. (2002). Visualization of high density lipoprotein by rat aortic endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. The 10th symposium on Recent Advances in Cellular and Molecular Biology, KenTing, Taiwan.

Chao, W. T., and Yang, V. C. (2001). Role of plasmalemmal vesicles on the HDL-mediated cholesterol efflux in aortic endothelial cells. Microscopy & Microanalysis '01, Long Beach, USA.

Chao, W. T., and Yang, V. C. (2000). Visualization of uptake of high-density lipoprotein by rat aortic endothelial cells and smooth muscle cells *in vitro*. Microscopy & Microanalysis '00, Philadelphia, USA.