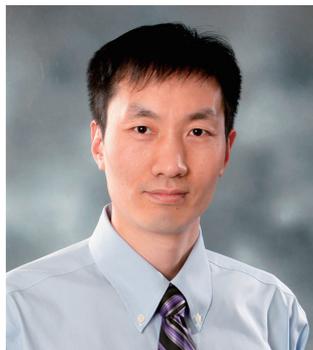


DOI: 10.13376/j.cbls/2015117

文章编号: 1004-0374(2015)07-0847-12



宋保亮, 武汉大学生命科学学院教授、院长、长江学者、杰青。2002年毕业于中科院上海生科院生化与细胞所, 2002年至2006年在美国西南医学中心从事博士后研究, 2006年至2014年在中科院上海生科院生化与细胞所任研究员, 2014年起担任武汉大学生命科学院工作。长期从事胆固醇代谢研究, 揭示了内源胆固醇合成途径的负反馈调控机制; 小肠胆固醇吸收的分子机制; 以及发现细胞内过氧化物酶体介导胆固醇运输的新途径。他的系统性工作推动了胆固醇研究领域的发展, 是本领域最前沿的实验室之一。已在国际学术期刊上发表研究论文30余篇, 其中作为通讯作者发表 *Cell* 1篇、*Nature Medicine* 1篇、*Cell Metabolism* 4篇和 *PNAS* 1篇。曾获得首届陈嘉庚青年科学奖和中国青年科技奖等奖项, 并担任 *JBC* 杂志的 *Editorial Board Member*、*JMCB* 副主编、国际脂质协会 (ICBL) 筹划委员。

胆固醇的内源合成与小肠吸收

魏 健¹, 江路易², 宋保亮^{1,2*}

(1 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; 2 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘 要: 以乙酰辅酶 A 为原料的从头合成和小肠从食物中吸收是人体获得胆固醇的主要来源。胆固醇的内源合成在转录水平上受 SREBP 通路调控, 在转录后水平上主要受胆固醇合成途径限速酶 HMGCR 和 SM 的降解调控。小肠对胆固醇吸收是一个涉及胆汁乳化、转运及酯化等多个步骤的复杂过程。定位于小肠上皮刷状缘膜上的 Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) 是介导胆固醇吸收的关键蛋白, 负责跨膜运输胆固醇进入小肠吸收细胞。现主要总结胆固醇合成途径的调控机制、NPC1L1 蛋白介导胆固醇吸收的分子途径, 以及讨论小肠胆固醇吸收与人体血液胆固醇水平之间的相关性。

关键词: 胆固醇合成; 胆固醇吸收; SREBP; HMGCR; NPC1L1; 低密度脂蛋白

中图分类号: R963; R394.3 文献标志码: A

Cholesterol *de novo* synthesis and intestinal absorption

WEI Jian¹, JIANG Lu-Yi², SONG Bao-Liang^{1,2*}

(1 Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2 College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The humans obtain cholesterol through *de novo* synthesis from acetyl-CoA and intestinal absorption from food. The *de novo* synthesis of cholesterol is regulated both transcriptionally by SREBP pathway and posttranscriptionally by the degradation of rate-controlling enzymes HMGCR. Intestinal cholesterol absorption is a complex process that involves multiple steps including emulsification by bile, transport and esterification. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) residing on enterocyte brush border membrane, a key protein for cholesterol absorption, transports cholesterol into cells across plasma membrane. This review summarizes the regulation of cholesterol

收稿日期: 2015-01-18

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(30925012)

*通信作者: E-mail: blsong@whu.edu.cn

synthesis, the molecular mechanism whereby NPC1L1 effectively and specifically transports cholesterol, and the correlation between intestinal cholesterol absorption and human blood cholesterol level.

Key words: cholesterol synthesis; cholesterol absorption; SREBP; HMGCR; NPC1L1; low-density lipoprotein

胆固醇是哺乳动物细胞膜的成分之一，同时也是生物活性分子的前体，对于生命活动至关重要。人体获得胆固醇主要通过两个途径：细胞利用乙酰辅酶A经30多步酶促反应从头合成胆固醇；小肠直接从食物中吸收胆固醇。然而，过量的胆固醇合成或吸收会导致高胆固醇血症，进而诱发动脉粥样硬化等心血管疾病，严重威胁人类健康。因此，了解胆固醇合成与吸收的机制及调控因素不仅有助于加深对人体胆固醇代谢稳态的认识，而且能够为相关疾病的防治提供必要的思路和方法。

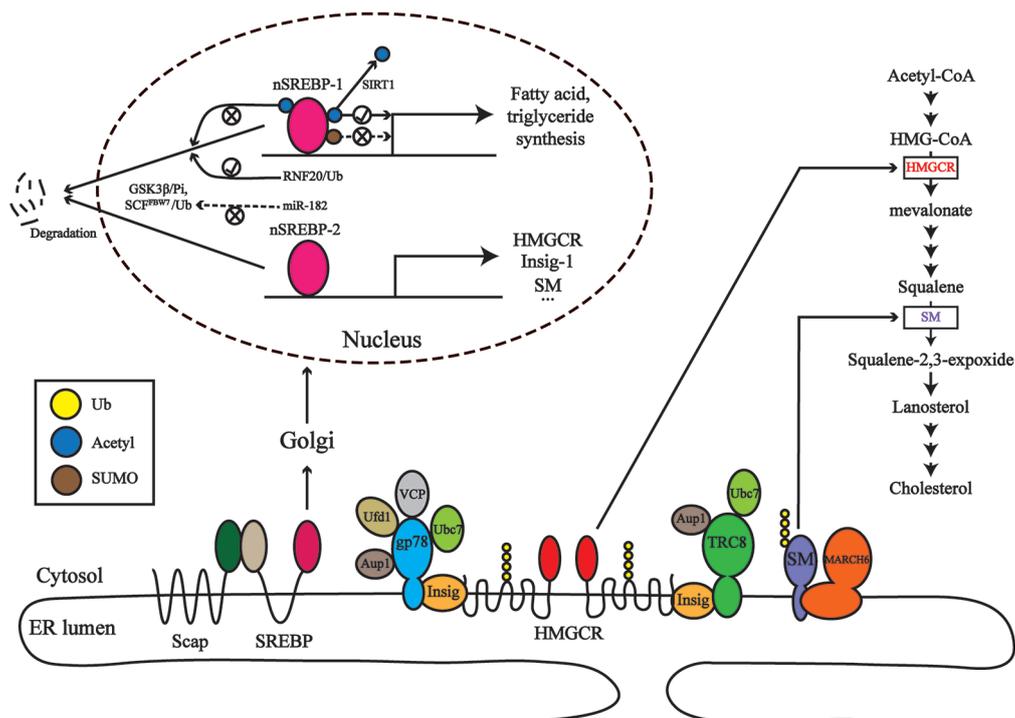
1 胆固醇内源合成的调控

作为生物体内经典的反馈调控途径之一，胆固醇合成调控的研究无疑具有重要的意义。经过数代科学家的不懈努力，人们对于胆固醇的合成代谢调

控已经有了比较系统和深入的了解。现有的研究成果认为，转录因子SREBP介导的转录调控和转录后胆固醇合成途径限速酶HMGCR和SM的降解调控均在胆固醇合成代谢中发挥了重要作用(图1)。

1.1 通过转录因子介导的调控

转录因子SREBPs (sterol regulatory element binding proteins) 能够激活所有胆固醇合成所需要基因的表达。现已知存在3种形式的SREBP: SREBP1a、SREBP1c和SREBP2, 其中前两者是由同一基因通过不同的转录起始位点产生的, 其N端具有行使转录调控功能的bHLH-Zip (basic helix-loop-helix-leucine zipper) 结构域, 中部是两个跨膜区和两者中间的约30个氨基酸的朝向内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 的亲水区, C端则是SREBP的自剪切调控区。



转录因子SREBP经过剪切入核后，能够启动脂质代谢相关基因的表达。GSK-3 β 对nSREBP的磷酸化修饰能够招募SCF^{Fbw7}复合物对其进行泛素化修饰，进而导致nSREBP的降解。microRNA-182可以负调控Fbw7，稳定nSREBP。RNF20也可以泛素化修饰SREBP-1c导致其降解，但该过程不依赖于磷酸化修饰。nSREBP-1的乙酰化能增强其转录活性，同时竞争性地占据其泛素化位点，起到稳定蛋白的作用；而其SUMO化会减弱其转录活性。胆固醇合成途径限速酶HMGCR和SM的蛋白水平严格地受细胞内甾醇水平的调控，泛素连接酶(E3)gp78和TRC8参与HMGCR的降解过程，参与SM降解的E3是MARCH3。

图1 SREBP通路和胆固醇合成途径限速酶降解通路

1.1.1 SREBP的剪切调控

SREBP的剪切入核是受胞内胆固醇水平调节的。在细胞内胆固醇水平高时,SREBP通过C端结构域与Scap(SREBP cleavage-activating protein)及Insig-1(insulin-induced gene-1)共同组成一个复合结构,从而被锚定在ER上,此时SREBP的N端转录调控结构域无法入核,这样胞内胆固醇的合成被限制;当细胞内胆固醇水平低时,Insig-1会与Scap分离,之后Scap带着全长的SREBP从ER上转运到高尔基体(golgi),经过由Site-1 protease和Site-2 protease介导的两步酶切后,SREBP最终释放出独立的nSREBPs(nuclear forms of SREBPs),入核行使转录调控功能,结合SRE(sterol regulatory element)元件,激活下游基因的表达,包括激活胆固醇的合成途径的相关基因,以弥补胞内较低的脂质水平^[1]。

1.1.2 SREBP的修饰与调控

Hirano等^[2]最先揭示了SREBP与泛素-蛋白酶体(ubiquitin-proteasome)途径存在联系,当抑制蛋白酶体后SREBP的稳定性会增加,而介导此过程的是Skp1-Cull1-FBW7泛素连接酶复合体(SCF^{FBW7})^[3]。此过程是通过GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta)对SREBP的3个苏氨酸或丝氨酸进行磷酸化修饰来调控的,nSREBP1(nuclear forms of SREBP1)上磷酸化的苏氨酸和丝氨酸会招募SCF^{FBW7}对其进行泛素化修饰,从而启动nSREBP1的降解^[2-3]。在此过程中,nSREBP1与DNA的结合会加速其磷酸化和随后的泛素化降解^[4]。2013年,Jeon等^[5]研究发现,miR-182可以负调控Fbw7,进而影响SREBP通路。

与磷酸化相反,乙酰化可以促进SREBP通路。首先,乙酰化可以增强nSREBP的转录活性;其次,乙酰化也可以调节nSREBP的稳定性,通过竞争性地乙酰化修饰同样为泛素化修饰位点的赖氨酸,可以抑制其泛素化修饰和降解过程^[6]。而去乙酰化酶SIRT1则可以直接将所有nSREBP的乙酰化修饰去掉,从而促进nSREBP的降解^[7-8]。SREBPs的SUMO化则能够减弱其转录活性^[9]。这些实验结果能够部分印证SREBP通路在禁食条件下被关闭的现象(此时SIRT1的活性和SREBP1c的SUMO化均增加)。

2014年, Lee等^[10]研究发现,RNF20(ring finger protein 20)可以介导SREBP1c的降解。RNF20可以直接与SREBP1c相互作用,进而泛素化修饰SREBP1c。在小鼠的原代肝细胞和肝脏内表达RNF20会抑制SREBP1c及其下游基因的表达;

nSREBP1的蛋白水平和其下游基因的表达会随着RNF20蛋白的减少而明显增加;PKA可以正调控RNF20的表达与RNF20对SREBP1c的泛素化修饰。

TRC8(translocation in renal cancer from chromosome 8)也参与稳定SREBP的过程。2009年,Irisawa等^[11]报道,TRC8与SREBP存在相互作用,阻止其向高尔基体的转运;同时,TRC8能够调控SREBP-2前体的蛋白水平,这是通过蛋白酶体介导的;TRC8也可以对Insigs进行泛素化修饰,这与SREBP的剪切密切相关^[12]。

1.1.3 白桦酯醇影响SREBP通路

SREBP作为脂质代谢的一类关键转录调控因子,毫无疑问有着发展成为药物靶点的潜质,我们实验室针对SREBP通路进行了大规模的药物筛选,最终发现了能够负调控SREBP途径的白桦酯醇(Betulin)^[13]。白桦酯醇是从桦木的树皮内提取的一种三萜类化合物。白桦酯醇能够将SCAP限制在内质网上,促进SCAP和Insigs的相互作用,阻止SREBP剪切入核。后果是nSREBP的减少会下调胆固醇和脂肪酸的生物合成。对小鼠喂食白桦酯醇能够降低其血清中的脂质水平,也能够增加其胰岛素敏感性。进一步,白桦酯醇能够让LDLR(low-density lipoprotein receptors)敲除小鼠体内的血管动脉粥样硬化斑块显著减少,具有临床意义。

1.2 胆固醇合成途径限速酶的降解

1.2.1 HMGCR的降解

生物体以乙酰辅酶A(acetyl-CoA)为原料最终合成胆固醇。此过程的最初几步反应是将乙酰辅酶A合成为甲羟戊酸(mevalonate),被称为甲羟戊酸途径,其中HMGCR(3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase)负责将3-羟基-3-甲戊二酸单酰辅酶A(HMG-CoA)催化转化为甲羟戊酸,是甲羟戊酸途径的限速酶^[14]。

在酵母内,HMGCR存在一种受调控的结构转变,使得HMGCR能够被HRD(HMG-CoA reductase degradation protein)识别为其降解底物^[15];而在哺乳动物细胞内,HRD1参与到了HMGCR的最基本的降解过程中,但这种降解是不受胞内甾醇水平调控的^[16]。大量的实验结果表明,在哺乳动物细胞内,HMGCR的蛋白水平的确受到了甾醇的严格调控。首先,HMGCR的mRNA水平会受到SREBP的调节,胞内的高甾醇水平使得HMGCR的mRNA显著减少^[14],胞内的低甾醇水平诱导产生的nSREBP会激活HMGCR基因的转录;而翻译后层面上,

HMGCR 会积极地响应胞内甾醇水平。具体来说,在缺乏甾醇的细胞内, HMGCR 的半衰期超过 12 h, 而一旦细胞内积累过多的甾醇时, HMGCR 的半衰期缩短至 1 h, 说明 HMGCR 被迅速地降解了, 说明此过程也是受甾醇水平影响的负反馈调控^[17], 而且这种调控也是依赖于 Insigs 的^[18]。

最先被发现的参与 HMGCR 降解过程的泛素连接酶是 gp78^[19]。gp78 由 4 个结构域组成: (1) 一个 N 端的长 298 个氨基酸的膜结合区域, 此区域也可以与 Insigs 相互作用; (2) 一个长 43 个氨基酸的包含 RING finger 结构域, 行使泛素连接酶功能; (3) 一个与酵母的 ER 膜蛋白 Cue1p 同源的由 42 个氨基酸构成的区域, 作为一个名叫 Ubc7 的泛素交联酶 (ubiquitin conjugating enzymes, E2) 的锚定位点; (4) 一个长 48 个氨基酸的结构域, 能够介导 gp78 与 VCP (valosin-containing protein) 的相互作用。VCP 是一种 ATP 酶, 参与了内质网介导的蛋白质多聚泛素化降解途径 (ER-associated protein degradation, ERAD)。

在正常的生理状态下, 细胞内一部分膜结合的 Insig-1 预先与 gp78 进行结合, 同时 gp78 分别与 Ubc7 和 VCP 结合, 在此基础上添加羊毛固醇^[20] (lanosterol, 胆固醇代谢的中间产物之一) 会使得 HMGCR 与此复合物结合, 之后 gp78 将泛素分子转移到 HMGCR 的 89 和 248 位的赖氨酸上^[21], 进而 VCP 就会介导 HMGCR 向蛋白酶体的转运与降解过程。我们实验室在对 gp78 的研究过程中发现, Ufd1 (ubiquitin fusion degradation 1) 能够直接与 gp78 相互作用进而促进 gp78 的泛素连接酶活性, 加速 HMGCR 的降解^[22]。

同时, 研究还发现 gp78 也调控了人源 Insig-1 的降解, 这是通过对其 156 和 158 位的赖氨酸进行多聚泛素化来实现的^[23-24]。甾醇能够通过 SCAP 的 SSD 区域 (sterol-sensing domain) 使 SCAP 的构象发生改变从而与 Insig-1 结合, 抑制 SREBP 的剪切成熟, 此过程一方面如前文所述使得 SREBP 的入核大大减少, 能够响应胞内高的甾醇水平, 直接减少内源合成基因的表达; 另一方面又可以使得 Insig-1 与 gp78 分离, 使得 gp78 无法有效地对 Insig-1 进行泛素化修饰, 这样 Insig-1 就能够更加稳定的存在, 对滞留 SCAP-SREBP 过程进行“巩固”。

综上所述, Insig-1 和 HMGCR 在胆固醇内源合成中均具有重要的作用, Insig-1 调节 SREBP 的入核和 HMGCR 的降解, HMGCR 则是胆固醇合成

反应中的限速酶, 两者的降解均是通过 gp78 实现的。众所周知, 肝脏是脂质代谢的核心器官, 更是胆固醇合成的核心器官, 为了进一步研究 gp78 对生物体的意义, 我们实验室构建了肝脏特异性敲除 gp78 的小鼠 (L-gp78^{-/-}) 并对其进行了深入研究^[25]。首先, 我们发现 L-gp78^{-/-} 小鼠的肝脏内 HMGCR 和 Insig-1 均有明显的增加, 同时其 Insig-2 也明显增加, 这表明在小鼠肝脏内 gp78 也可以调控 Insig-2 的降解; 与此同时, 伴随着 Insigs 的增多, SREBP 的入核则被大幅削弱, 这直接导致了 L-gp78^{-/-} 小鼠肝脏内脂质合成的减少。与 WT 相比, L-gp78^{-/-} 小鼠的 SREBP 途径耐受饥饿-再进食调控, 也能够抵抗饮食和年龄引起的肥胖; 它们具有更多的能量消耗, 更低的体内脂质水平, 以及高于正常的胰岛素敏感性。这些实验结果都说明, 在小鼠肝脏内敲除 gp78 能够通过 SREBP 途径显著地影响其体内的脂质水平, 这提示我们 gp78 是一个潜在的药物靶点, 我们有可能通过抑制生物体内的 gp78 活性来下调 SREBP 代谢通路, 进而达到治疗高胆固醇血症和 II 型糖尿病等代谢疾病的目的。

TRC8 也能够作为泛素连接酶对 HMGCR 进行泛素化修饰, 此过程也依赖于 Insig。TRC8 能够与 Insig-1 和 Insig-2 相互作用, 通过甾醇介导的 HMGCR 与 Insigs 的结合, 调控 HMGCR 的降解。一个值得注意的现象是, 在 gp78 敲除的细胞内, TRC8 的稳定性会显著增加, 可能原因是 TRC8 被用以弥补胞内 gp78 的非正常的低水平。通过动态调节 gp78/TRC8 的比例, 来更加精确地调控胆固醇合成代谢途径^[12]。

Aup1 (ancient, ubiquitous protein-1) 能同时促进 Ubc7 与 gp78 和 TRC8 的相互作用, 介导泛素化修饰的 HMGCR 进入 26S 蛋白酶体进而被降解, 此过程由与 ER 结合的脂滴介导其与 ER 的解离。除了 HMGCR 外, Aup1 也广泛地影响 SREBP 通路: 在细胞内沉默 Aup1 基因会抑制 Insig-1、SREBP-1 和 SREBP-2 的降解^[26]。

然而, 2012 年 Tsai 等^[27] 研究发现, 在 gp78 KO 的小鼠的原代 MEF 细胞 (mouse embryonic fibroblasts) 内, HMGCR 仍然可以正常地被甾醇调控降解, 后续通过 RNAi 在另外两种成纤维细胞 Rat-1 和 SV-589 内沉默 gp78 和 TRC8 之后, HMGCR 仍然能够正常被降解, 这提示我们在这些细胞内应该是另外的泛素连接酶参与到了 HMGCR 的降解过程中, 所以可以期待后续的研究能够解开这个谜团。

1.2.2 鲨烯单加氧酶的降解

鲨烯单加氧酶 (squalene monooxygenase, SM) 能够将鲨烯转化为 2,3- 环氧鲨烯, 近年来针对此酶的降解也开展了相关研究。参与 SM 降解调控的泛素连接酶是 MARCH6 (membrane-associated ring finger (C3HC4) 6), 一个在 ER 上多次跨膜的蛋白质^[28]。胆固醇的加入能够加速 SM 的降解^[29], 而不饱和脂肪酸则可以通过减弱胆固醇与 MARCH6 的相互作用, 进而减缓 SM 的降解^[30]。与被广泛研究的 HMGCR 降解受氧化性甾醇 (oxysterols) 和甲羟戊酸合成途径的代谢中间产物调控不同, SM 的降解则是直接受胆固醇调控。胞内胆固醇水平并不在转录层面调控 MARCH6 基因的转录, 而是直接影响了 MARCH6 的活性, 具体的影响机制目前并不清楚。但是, SM 的降解并不依赖于 Insigs 或 SCAP, 或者其他通过 SREBP-2 激活的基因^[29], 这说明有可能是类似与 HMGCR 的 SSD 一样通过生物分子影响了蛋白质的结构从而启动降解程序的。研究也发现胆固醇能够与 SM 发生直接的相互作用, 所以, 有可能是这种相互作用影响了 SM 跨膜区的空间结构。

在哺乳动物细胞内, MARCH6 活性缺失会导致 SM 的大量富集^[28]。这种调节机制在哺乳动物和植物里面是保守的^[28, 31]。而在酵母里, 催化 SM 的同源蛋白 ERG1 泛素化降解的泛素连接酶是 MARCH6 的同源蛋白 Doa10^[32]。MARCH6 的 N 端的 100 个氨基酸是胆固醇调控其降解所必需的^[29], 与 MARCH6 序列相比, Doa10 缺乏 MARCH6 N 端的 100 个氨基酸, 这提示我们 Doa10 对 ERG1 的泛素化修饰可能与 MARCH6 调控 SM 不是完全一致的。

SM 的降解并不会对依赖于甲羟戊酸途径的其他类异戊二烯分子的合成有决定性的影响, 鉴于甲羟戊酸途径处于甾醇合成通路的最上游, 避开 HMGCR 的降解直接对 SM 或其他下游酶的调控在某种程度上更加显示出生物体对代谢调控的精确性。

2 小肠胆固醇吸收

小肠从饮食中吸收胆固醇是人体获得胆固醇的另一重要途径。在现代饮食条件下, 人体平均每日摄取的胆固醇量约为 300~500 mg, 可达胆固醇更新总量的 50%^[33]。此外, 肝脏分泌的胆汁和脱落的消化道上皮细胞在流经小肠时, 其中含有的胆固醇也可以被重新吸收利用。

2.1 小肠胆固醇吸收过程

小肠胆固醇吸收是受多因素调控的涉及若干步骤的复杂过程, 在这一过程中来源于食物和胆汁的胆固醇经由小肠上皮细胞摄取并最终进入淋巴系统。虽然整个小肠都具有吸收胆固醇的能力, 但主要的吸收部位在肠道的上段, 如十二指肠、空肠和回肠段^[33]。

食物进入小肠后, 经多种消化酶 (如胰甘油三酯酶和 1B 型磷脂酶 A2) 作用, 其中的甘油三酯和磷脂被逐渐分解消化, 释放出胆固醇^[34]。只有未经酯化的胆固醇才能够穿过小肠上皮细胞的刷状缘膜进入细胞内, 因此, 食物中的胆固醇酯需预先经消化液中的胆固醇酯酶水解为游离胆固醇^[33]。胆固醇是高度疏水的, 其本身无法扩散通过肠腔与吸收细胞之间的静水层屏障, 需要依赖胆汁酸的乳化作用。由肝脏分泌进入肠腔的胆汁酸是既包含亲水性的羟基和羧基, 又含有疏水烃基的两性分子。高浓度的胆汁酸能够将包括胆固醇在内的脂类分子乳化形成羧基端朝外而疏水脂类在内的球状微团 (micelles), 协助穿越静水层屏障并成功将胆固醇递送到上皮细胞表面。胆汁酸的乳化作用对于小肠高效吸收胆固醇是至关重要的。在小鼠体内通过干扰胆汁酸合成途径的关键基因胆固醇 7 α -羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase, *CYP7A1*) 或固醇 27-羟化酶 (sterol 27-hydroxylase, *CYP27*) 的表达, 减少胆汁酸的合成, 均能显著降低胆固醇的吸收效率^[35-36]。

被递送到小肠上皮细胞表面后, 胆固醇穿越细胞膜并进入细胞内是吸收过程的关键步骤。近期研究发现小肠绒毛上一个名为 Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) 的跨膜蛋白负责高效特异地转运胆固醇进入吸收细胞^[37]。有关 NPC1L1 转运胆固醇的分子机制下文将作具体阐述。进入吸收细胞后, 胆固醇最终被运输到内质网上, 由 ACAT2 (acyl-CoA: cholesterolacyltransferase isoform 2) 催化形成胆固醇酯^[38-40]。之后, 在载脂蛋白 Apo-B48 和微粒体甘油三酯转移蛋白 (microsomal triglyceride transfer protein, MTP) 等的帮助下, 胆固醇酯同甘油三酯、磷脂及少部分游离胆固醇一起组装形成乳糜微粒 (chylomicron), 后经基底膜分泌进入淋巴循环^[41-43]。

2.2 关键蛋白 NPC1L1 的发现及功能

长期以来, 人们对于胆固醇如何跨越刷状缘膜转运进入小肠吸收细胞并不清楚, 但 1997 年以来对 Niemann-Pick C1 (NPC1) 蛋白的研究为相关机制的揭示提供了极具价值的线索。NPC1 蛋白广泛存

在于体内各个组织,在细胞内定位于溶酶体膜上,负责将胆固醇跨膜转运出溶酶体。NPC1 功能缺失会导致胆固醇等脂质在溶酶体内过量累积,引起严重的神经退行性疾病^[44-45]。由于不分布于细胞质膜上,NPC1 蛋白并不能转运胞外胆固醇进入细胞。2004年,Altmann等^[37]运用生物信息学的方法鉴定出NPC1的类似蛋白NPC1L1,并揭示了其在小肠胆固醇吸收过程中的关键作用。NPC1L1与NPC1约有50%的氨基酸序列同源性,是一个由1332个氨基酸残基组成的13次跨膜蛋白^[46-47],其3~7跨膜区段构成在多个胆固醇代谢相关基因中保守的甾醇感受结构域(sterol sensing domain, SSD)^[48]。NPC1L1在小肠中大量表达,尤其在空肠和回肠段表达最高,主要定位于小肠上皮细胞刷状缘膜上^[37,49],其NH2端位于细胞膜外侧朝向肠腔,而C端在细胞内^[46]。

相较于野生型小鼠,NPC1L1缺陷小鼠的胆固醇吸收效率下降约70%,而甘油三酯等其他脂类的吸收不受影响,表明NPC1L1蛋白特异地参与胆固醇的吸收过程^[37]。饲喂胆固醇吸收抑制药物依泽麦布(Ezetimibe,又名依泽替米贝)不能进一步降低NPC1L1缺陷小鼠的胆固醇吸收,证明NPC1L1依赖的胆固醇吸收通路正是Ezetimibe的作用靶点^[37,50]。NPC1L1的组织表达具有种属特异性:在啮齿类动物中,NPC1L1仅表达于小肠中,参与小肠对胆固醇的吸收;而在人或其他灵长类动物体内,除小肠外,NPC1L1也在肝脏中朝向胆汁的胆小管膜(canalicular membrane)上表达,负责重吸收肝脏分泌到胆汁中的胆固醇^[51-52]。因此,在人体小肠和肝脏中表达的NPC1L1协同作用,既实现了对饮食胆固醇的高效率吸收,又防止胆汁分泌造成的胆固醇过量流失,作用效果都是增加血液中的胆固醇水平。目前对于NPC1L1基因在肝肠特异表达的机制还不清楚,但有证据提示细胞内胆固醇含量可通过SREBP-2(sterol regulatory element binding protein 2)通路调节NPC1L1的转录^[53-55]。此外,NPC1L1基因启动子区DNA甲基化水平可能是决定其在肠道不同区段表达差异的主要因素^[56]。

2012年,Sainz等^[57]研究发现,NPC1L1蛋白还参与了丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染肝细胞的过程。沉默NPC1L1的表达能够阻断HCV感染的起始阶段,NPC1L1的拮抗剂Ezetimibe也可以阻断病毒侵染进入细胞的过程,为丙型肝炎的治疗提供了一个新的抗病毒靶点和潜在药物。

2.3 NPC1L1介导胆固醇吸收的机制

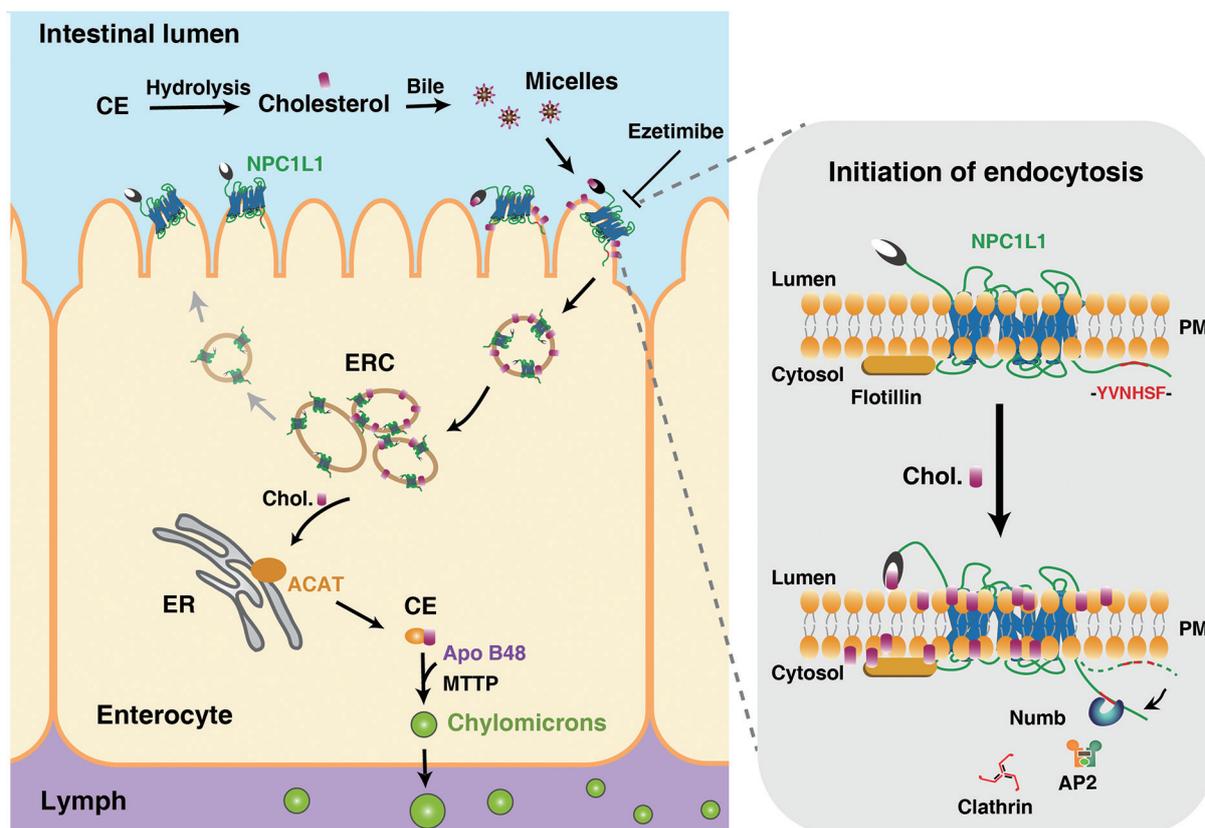
动物实验证明NPC1L1蛋白对于小肠胆固醇高效吸收是必需的,那么NPC1L1介导胆固醇进入吸收细胞的分子机制是怎样的?对此,我们开展了深入研究,提出并证明了NPC1L1介导胆固醇吸收的工作模型,鉴定发现了参与该途径的多个蛋白因子(图2)。

2.3.1 NPC1L1通过囊泡内吞的方式转运胆固醇

表达在大鼠肝细胞CRL-1601中的NPC1L1主要定位于质膜和由多囊泡构成的内吞循环体(endocytic recycling compartment, ERC),并在两者之间循环转运。当细胞处于低胆固醇水平时,大量的NPC1L1会从ERC沿微丝转运到细胞质膜上;给细胞补充外源胆固醇后,质膜上的NPC1L1将携带胆固醇一起发生囊泡内吞,之后转运胆固醇至ERC^[51,58]。NPC1L1内吞依赖于Clathrin/AP2复合物,干扰Clathrin表达能够阻断NPC1L1的内吞并显著降低胆固醇的吸收。胆固醇吸收抑制剂Ezetimibe也可阻断NPC1L1的内吞^[58]。细胞内胆固醇含量下降时,内吞进入ERC的NPC1L1会与胆固醇分离,激活的Cdc42蛋白通过调控N-WASP、Arp2/3、Rab11a/Rab11-FIP2/Myosin Vb等膜泡运输相关蛋白将NPC1L1重新转运回质膜^[59-60]。在小鼠体内,我们观察到食物中的胆固醇会诱导NPC1L1携带胆固醇从小肠绒毛刷状缘膜内吞进入细胞^[49]。Xie等^[61]在研究中同样发现,喂食胆固醇可以诱导在小鼠小肠刷状缘膜下出现包含NPC1L1的囊泡,而Ezetimibe处理则会抑制上述囊泡的出现。一系列发现证明NPC1L1通过Clathrin依赖的囊泡运输模式介导胆固醇的吸收。Ezetimibe通过结合NPC1L1胞外第二个loop区,阻断NPC1L1的内吞从而抑制胆固醇进入吸收细胞^[58,61-62]。

2.3.2 胆固醇的感受与内吞起始

NPC1L1的N端和C端序列是重要的功能区域。N端结构域(N-terminal domain, NTD)构成一个疏水“口袋”,可以特异地结合1个胆固醇分子^[63]。2014年,Li等^[64]研究发现NPC1L1蛋白C端含有一个进化保守的内吞信号序列YVNxxF(x代表任意氨基酸)。该信号可以被细胞质内接头蛋白(adaptor protein)Numb的PTB结构域(phosphotyrosine-binding domain)识别并结合。Numb蛋白会同时招募Clathrin/AP2,启动囊泡内吞。在细胞内干扰Numb表达会减弱NPC1L1的内吞。相应地,小肠Numb基因敲除小鼠呈现显著降低的胆固醇吸收效率。



食物中的胆固醇酯(CE)进入小肠后会被酯酶水解为游离的胆固醇(cholesterol),在胆汁(bile)的乳化作用下形成球状微团(micelles),其携带胆固醇扩散通过肠腔和肠上皮细胞刷状缘膜之间的静水层屏障。刷状缘膜上的NPC1L1通过囊泡内吞的机制将胆固醇吸收进入细胞内的内吞循环体(ERC)。胆固醇吸收抑制剂Ezetimibe通过阻断NPC1L1内吞抑制胆固醇进入吸收细胞。“卸载”胆固醇后,NPC1L1可转运回到细胞质膜上。内吞循环体上的胆固醇会被继续运输到内质网(ER),在ACAT的催化下转化为胆固醇酯(CE)。Apo-B48和MTTP装配胆固醇酯进入乳糜微粒(chylomicrons),经基底膜分泌最终进入淋巴循环。NPC1L1介导胆固醇内吞进入细胞是胆固醇吸收的关键步骤。细胞质膜上的NPC1L1可感受胆固醇浓度决定内吞的起始。质膜胆固醇含量较低时,NPC1L1蛋白C端的YVNxxF内吞信号区段会与质膜结合而无法启动内吞。当肠腔内有胆固醇流过时,NPC1L1的N端会结合胆固醇并将其插入到质膜上,Flotillin蛋白协助在NPC1L1周围形成富含胆固醇的微结构域。胆固醇浓度升高会诱导NPC1L1构象发生变化,YVNxxF序列与质膜解离,Numb蛋白进而识别和结合暴露的YVNxxF序列,并招募脚手架蛋白Clathrin/AP2,装配形成内吞复合体,最终启动内吞。

图2 NPC1L1介导的小肠胆固醇吸收过程

NPC1L1与Numb是如何感受细胞的胆固醇水平,从而决定内吞起始的。我们首先注意到NPC1L1的C端与Numb的结合受质膜胆固醇含量的影响,质膜胆固醇含量高时NPC1L1与Numb的结合要比胆固醇含量低时强。之后发现C端的内吞信号序列在低胆固醇时与质膜磷脂内层结合,而高胆固醇水平会诱导分离^[64]。据此,我们提出了NPC1L1感受胆固醇浓度的分子模型:细胞质膜胆固醇水平较低时,NPC1L1在胞内的C端内吞信号序列与质膜磷脂内层结合,此时Numb无法识别内吞信号,NPC1L1会滞留在吸收细胞的质膜上;当食物或胆汁来源的胆固醇被运送到吸收细胞表面后,

NPC1L1朝向肠腔的NTD会结合胆固醇并将其插入到细胞质膜,高浓度的胆固醇诱导NPC1L1构象发生变化,C端内吞信号序列与质膜解离,之后被Numb识别而发生内吞。

NPC1L1的内吞信号序列类似于最早在低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)中发现的经典内吞信号NPxF,后者可被接头蛋白ARH和Dab2识别结合^[65-67]。尽管两种信号在序列上十分相似,然而,参与两者内吞过程的接头蛋白却是不同的。Numb不具有结合NPxF信号启动LDLR内吞的能力;类似地,ARH和Dab2也不能够识别NPC1L1的内吞信号序列YVNxxF,其表达

缺陷不影响 NPC1L1 的内吞^[68]。因此, NPC1L1 蛋白 C 端的 YVNxxF 序列可能代表了一类新的可被 Numb 识别的内吞信号。

2.3.3 胆固醇高效吸收的分子基础

一个 NPC1L1 蛋白的 NTD 只能结合一分子的胆固醇, 然而, 小肠吸收胆固醇的效率最高却可达 80%。假如 NPC1L1 是以“一对一”的方式携带胆固醇内吞进入细胞的话, 显然无法达到如此高的吸收效率。那么, NPC1L1 是如何高效率地转运胆固醇的, 脂筏 (lipid raft) 组成蛋白 Flotillin 在胆固醇吸收中功能的揭示为我们揭开了谜题^[69]。细胞质膜上的脂质并非均匀分布, 其中胆固醇会富集在脂筏区域。Flotillin-1 和 Flotillin-2 蛋白对脂筏的形成和维持是至关重要的。在质膜上, Flotillin-1 和 Flotillin-2 与 NPC1L1 相结合, 协助在其周围形成一个富含胆固醇的微结构域 (micro-domain), 局部高浓度的胆固醇会诱发 NPC1L1 构象变化启动内吞。NPC1L1 会连同 Flotillin 蛋白及膜微结构域一起内吞, 从而实现将大量胆固醇转运进入吸收细胞^[69]。

2.4 小肠胆固醇吸收与低密度脂蛋白胆固醇水平

胆固醇吸收效率在不同个体间存在较大差异, 从 29%~80% 不等^[70]。小肠胆固醇吸收是一个复杂的多步骤过程, 因此, 影响胆固醇吸收效率的因素也是多种多样的。从年龄、饮食结构、小肠蠕动速率、肠道菌群到消化酶、胆汁的合成与分泌、吸收相关基因的表达和突变等因素均会影响胆固醇的最终吸收效率。在此我们主要讨论可遗传的基因变异对胆固醇吸收的影响, 及其与心血管疾病风险因素血液低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平的关联性。

作为介导胆固醇吸收的关键因子, *NPC1L1* 基因的表达水平与变异必然与胆固醇的吸收效率密切相关。目前, 利用测序技术已在人群中鉴定出多个 *NPC1L1* 的非同义突变^[71-73]。部分变异被证明会导致 NPC1L1 的表达、亚细胞定位、糖基化及蛋白质稳定性的异常, 影响 NPC1L1 介导胆固醇吸收的正常功能^[74]。另外, 少数突变被发现能够改变 NPC1L1 对胆固醇吸收抑制剂 Ezetimibe 的敏感性^[75-76]。统计数据显示, 大约每 650 个人中就有 1 个是 *NPC1L1* 基因功能性变异的杂合携带者^[73]。在内吞起始阶段, Numb 作为连接 NPC1L1 蛋白和内吞复合物的“桥梁”发挥作用, 其功能性变异也会影响胆固醇的吸收效率。从来自中国新疆的血液胆固醇异常样本中我们鉴定出一个 Numb 的变异 G595D,

发现其仅存在于低 LDL-C 的人群中且与低血液胆固醇水平具有相关性^[68]。功能研究表明, G595D 变异会减弱 Numb 与 Clathrin/AP2 的亲合力, 引起 NPC1L1 内吞缺陷而降低胆固醇吸收。

高 LDL-C 水平是动脉粥样硬化等心血管疾病的主要风险因素之一。作为人体获得胆固醇的重要途径, 小肠胆固醇吸收对血液 LDL-C 水平的贡献是怎样的; 其在心血管疾病发生中又扮演什么样的角色。由于小肠胆固醇吸收被抑制, *NPC1L1* 基因敲除小鼠和 Ezetimibe 喂食的野生型小鼠的血液胆固醇水平均显著降低, 能够抵抗饮食诱导的高胆固醇血症^[77]。Xie 等^[61]利用基因工程小鼠模型的研究确证 NPC1L1 介导的小肠胆固醇吸收是决定血液中 LDL-C 水平的主要因素。越来越多的实验和临床数据表明在人体中, 血液 LDL-C 水平同样与小肠胆固醇的吸收效率存在正相关性^[78-79]; 过量的胆固醇吸收会导致高胆固醇血症, 进而诱发动脉粥样硬化等心血管疾病^[80]; 相反, 药物抑制或遗传因素导致的小肠胆固醇低效率吸收会有效降低血液胆固醇水平及心血管疾病发生的风险^[81]。1987 年, Kesäniemi 等^[78]以血液中植物甾醇 betasitosterol 含量作为胆固醇吸收水平的指标, 在随机选取的芬兰中年人群中测量数据提示, 胆固醇吸收效率与血液 LDL-C 水平存在显著的正相关性, 在决定血液胆固醇水平中发挥了重要作用。近年来多篇文章报道, 人群中影响 NPC1L1 正常功能的自发突变通常与较低的 LDL-C 水平和低心血管疾病风险具有关联性^[71-73,82]。临床上使用 Ezetimibe 治疗可抑制约 50% 的胆固醇吸收, 降低 LDL-C 水平约 15%~20%^[83-84]。因此, NPC1L1 介导的小肠胆固醇吸收过程可作为治疗高胆固醇血症的作用靶点, 发展更高效的胆固醇吸收抑制药物将有益于动脉粥样硬化等心血管疾病的防治。

3 总结和展望

HMGCR 作为胆固醇合成途径的限速酶之一, 除了使用他汀类药物抑制其活性外^[85-87], 控制其蛋白水平也是另外一种策略, 这可以降低罹患高胆固醇血症等病症的患者体内的胆固醇水平。我们的研究表明, gp78 通过影响 HMGCR 降解通路与 SREBP 通路也有可能成为胆固醇合成途径的药物靶点^[25]。不过值得注意的是, 2012 年, Tsai 等^[27]研究表明, 在不同的细胞内介导 HMGCR 降解的泛素连接酶应该不尽相同, 这让我们有理由开展更多的研究来寻

找还未被发现的参与到此过程的泛素连接酶,从而对各种泛素连接酶在 HMGCR 的降解过程中贡献多少的比重进行一个精确地衡量,这会让我们研发相关药物能够更有针对性。值得注意的另外一点是,泛素连接酶介导的底物泛素化修饰能够有效地被去泛素化酶 (deubiquitylases, DUBs) 逆转^[88]。到目前为止,已知的去泛素化酶接近 100 种,到底是哪些去泛素化酶通过何种方式参与到胆固醇合成途径的负反馈调控机制中来亟待探索和揭示。最后,由于胆固醇合成通路并不是简单的几步酶促反应来完成的,所以,在此过程中可能存在未被发现的潜在的调控节点和药物靶点^[89]。

小肠胆固醇吸收对于维持人体胆固醇代谢平衡至关重要,虽然先前的研究已经取得重要进展,但对胆固醇吸收的部分细节仍不清楚,如胆固醇是如何诱导 NPC1L1 蛋白构象变化从而使 C 端从质膜解离的;内吞至 ERC 的胆固醇如何继续运输到内质网;与胆固醇解离后,启动 NPC1L1 从 ERC 转运回到细胞质膜的信号是什么。另外,目前临床上仅有 Ezetimibe 一种抑制胆固醇吸收的药物,小肠胆固醇吸收机制的阐明将为研发新的降胆固醇吸收药物提供理论基础。Numb 与 NPC1L1 的特异性结合将是一个可行的药物靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1125-31
- [2] Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M, et al. Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36431-7
- [3] Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X, et al. Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab*, 2005, 1(6): 379-91
- [4] Punga T, Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. Phosphorylation and ubiquitination of the transcription factor sterol regulatory element-binding protein-1 in response to DNA binding. *J Biol Chem*, 2006, 281(35): 25278-86
- [5] Jeon TI, Esquejo RM, Roqueta-Rivera M, et al. An SREBP-responsive microRNA operon contributes to a regulatory loop for intracellular lipid homeostasis. *Cell Metab*, 2013, 18(1): 51-61
- [6] Giandomenico V, Simonsson M, Gronroos E, et al. Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(7): 2587-99
- [7] Walker AK, Yang F, Jiang K, et al. Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. *Genes Dev*, 2010, 24(13): 1403-17
- [8] Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem*, 2010, 285(44): 33959-70
- [9] Hirano Y, Murata S, Tanaka K, et al. Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 16809-19
- [10] Lee JH, Lee GY, Jang H, et al. Ring finger protein20 regulates hepatic lipid metabolism through protein kinase A-dependent sterol regulatory element binding protein1c degradation. *Hepatology*, 2014, 60(3): 844-57
- [11] Irisawa M, Inoue J, Ozawa N, et al. The sterol-sensing endoplasmic reticulum (ER) membrane protein TRC8 hampers ER to Golgi transport of sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2)/SREBP cleavage-activated protein and reduces SREBP-2 cleavage. *J Biol Chem*, 2009, 284(42): 28995-9004
- [12] Lee JP, Brauweiler A, Rudolph M, et al. The TRC8 ubiquitin ligase is sterol regulated and interacts with lipid and protein biosynthetic pathways. *Mol Cancer Res:MCR*, 2010, 8(1): 93-106
- [13] Tang JJ, Li JG, Qi W, et al. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab*, 2011, 13(1): 44-56
- [14] Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 1990, 343(6257): 425-30
- [15] Gardner RG, Shearer AG, Hampton RY. *In vivo* action of the HRD ubiquitin ligase complex: mechanisms of endoplasmic reticulum quality control and sterol regulation. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(13): 4276-91
- [16] Kikkert M, Doolman R, Dai M, et al. Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2004, 279(5): 3525-34
- [17] Gil G, Faust JR, Chin DJ, et al. Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell*, 1985, 41(1): 249-58
- [18] Sever N, Yang T, Brown MS, et al. Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell*, 2003, 11(1): 25-33
- [19] Song BL, Sever N, DeBose-Boyd RA. Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol Cell*, 2005, 19(6): 829-40
- [20] Song BL, Javitt NB, DeBose-Boyd RA. Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab*, 2005, 1(3): 179-89
- [21] Sever N, Song BL, Yabe D, et al. Insig-dependent

- ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem*, 2003, 278(52): 52479-90
- [22] Cao J, Wang J, Qi W, et al. Ufd1 is a cofactor of gp78 and plays a key role in cholesterol metabolism by regulating the stability of HMG-CoA reductase. *Cell Metab*, 2007, 6(2): 115-28
- [23] Lee JN, Song B, DeBose-Boyd RA, et al. Sterol-regulated degradation of Insig-1 mediated by the membrane-bound ubiquitin ligase gp78. *J Biol Chem*, 2006, 281(51): 39308-15
- [24] Gong Y, Lee JN, Lee PC, et al. Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab*, 2006, 3(1): 15-24
- [25] Liu TF, Tang JJ, Li PS, et al. Ablation of gp78 in liver improves hyperlipidemia and insulin resistance by inhibiting SREBP to decrease lipid biosynthesis. *Cell Metab*, 2012, 16(2): 213-25
- [26] Jo Y, Hartman IZ, DeBose-Boyd RA. Ancient ubiquitous protein-1 mediates sterol-induced ubiquitination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in lipid droplet-associated endoplasmic reticulum membranes. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(3): 169-83
- [27] Tsai YC, Leichner GS, Pearce MM, et al. Differential regulation of HMG-CoA reductase and Insig-1 by enzymes of the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(23): 4484-94
- [28] Zelcer N, Sharpe LJ, Loregger A, et al. The E3 ubiquitin ligase MARCH6 degrades squalene monooxygenase and affects 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase and the cholesterol synthesis pathway. *Mol Biol Cell*, 2014, 34(7): 1262-70
- [29] Gill S, Stevenson J, Kristiana I, et al. Cholesterol-dependent degradation of squalene monooxygenase, a control point in cholesterol synthesis beyond HMG-CoA reductase. *Cell Metab*, 2011, 13(3): 260-73
- [30] Stevenson J, Luu W, Kristiana I, et al. Squalene monooxygenase, a key enzyme in cholesterol synthesis, is stabilized by unsaturated fatty acids. *Biochem J*, 2014, 461(3): 435-42
- [31] Doblas VG, Amorim-Silva V, Pose D, et al. The SUD1 gene encodes a putative E3 ubiquitin ligase and is a positive regulator of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25(2): 728-43
- [32] Foresti O, Ruggiano A, Hannibal-Bach HK, et al. Sterol homeostasis requires regulated degradation of squalene monooxygenase by the ubiquitin ligase Doa10/Teb4. *eLife*, 2013, 2: e00953
- [33] Wang DQ. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 221-48
- [34] Wang TY, Liu M, Portincasa P, et al. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43(11): 1203-23
- [35] Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, et al. Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 α -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *J Lipid Res*, 2001, 42(10): 1594-603
- [36] Repa JJ, Lund EG, Horton JD, et al. Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in hepatomegaly and hypertriglyceridemia. Reversal by cholic acid feeding. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 39685-92
- [37] Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 2004, 303(5661): 1201-4
- [38] Anderson RA, Joyce C, Davis M, et al. Identification of a form of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates. *J Biol Chem*, 1998, 273(41): 26747-54
- [39] Buhman KK, Accad M, Novak S, et al. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med*, 2000, 6(12): 1341-7
- [40] Zanlungo S, Nervi F. The ACAT2 gene encodes a gatekeeper of intestinal cholesterol absorption that regulates cholesterolemia and gallstone disease. *Hepatology*, 2001, 33(3): 760-1
- [41] van Greevenbroek MM, Robertus-Teunissen MG, Erkelens DW, et al. Participation of the microsomal triglyceride transfer protein in lipoprotein assembly in Caco-2 cells: interaction with saturated and unsaturated dietary fatty acids. *J Lipid Res*, 1998, 39(1): 173-85
- [42] Young SG, Cham CM, Pitas RE, et al. A genetic model for absent chylomicron formation: mice producing apolipoprotein B in the liver, but not in the intestine. *J Clin Invest*, 1995, 96(6): 2932-46
- [43] Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, et al. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*, 1992, 258(5084): 999-1001
- [44] Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*, 1997, 277(5323): 228-31
- [45] Loftus SK, Morris JA, Carstea ED, et al. Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science*, 1997, 277(5323): 232-5
- [46] Wang J, Chu BB, Ge L, et al. Membrane topology of human NPC1L1, a key protein in enterohepatic cholesterol absorption. *J Lipid Res*, 2009, 50(8): 1653-62
- [47] Davies JP, Levy B, Ioannou YA. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. *Genomics*, 2000, 65(2): 137-45
- [48] Jia L, Betters JL, Yu L. Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 239-59
- [49] Xie C, Zhou ZS, Li N, et al. Ezetimibe blocks the internalization of NPC1L1 and cholesterol in mouse small intestine. *J Lipid Res*, 2012, 53(10): 2092-101
- [50] Rosenblum SB, Huynh T, Afonso A, et al. Discovery of 1-(4-fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone

- (SCH 58235): a designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption. *J Med Chem*, 1998, 41(6): 973-80
- [51] Yu L, Bharadwaj S, Brown JM, et al. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem*, 2006, 281(10): 6616-24
- [52] Temel RE, Tang W, Ma Y, et al. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J Clin Invest*, 2007, 117(7): 1968-78
- [53] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 1997, 89(3): 331-40
- [54] Alrefai WA, Annaba F, Sarwar Z, et al. Modulation of human Niemann-Pick C1-like 1 gene expression by sterol: Role of sterol regulatory element binding protein 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(1): G369-76
- [55] Pramfalk C, Jiang ZY, Cai Q, et al. HNF1 α and SREBP2 are important regulators of NPC1L1 in human liver. *J Lipid Res*, 2010, 51(6): 1354-62
- [56] Malhotra P, Soni V, Kumar A, et al. Epigenetic modulation of intestinal cholesterol transporter Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) gene expression by DNA methylation. *J Biol Chem*, 2014, 289(33): 23132-40
- [57] Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med*, 2012, 18(2): 281-5
- [58] Ge L, Wang J, Qi W, et al. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metab*, 2008, 7(6): 508-19
- [59] Chu BB, Ge L, Xie C, et al. Requirement of myosin Vb.Rab11a.Rab11-FIP2 complex in cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface. *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 22481-90
- [60] Xie C, Li N, Chen ZJ, et al. The small GTPase Cdc42 interacts with Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) and controls its movement from endocytic recycling compartment to plasma membrane in a cholesterol-dependent manner. *J Biol Chem*, 2011, 286(41): 35933-42
- [61] Xie P, Zhu H, Jia L, et al. Genetic demonstration of intestinal NPC1L1 as a major determinant of hepatic cholesterol and blood atherogenic lipoprotein levels. *Atherosclerosis*, 2014, 237(2): 609-17
- [62] Weinglass AB, Kohler M, Schulte U, et al. Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(32): 11140-5
- [63] Zhang JH, Ge L, Qi W, et al. The N-terminal domain of NPC1L1 protein binds cholesterol and plays essential roles in cholesterol uptake. *J Biol Chem*, 2011, 286(28): 25088-97
- [64] Li PS, Fu ZY, Zhang YY, et al. The clathrin adaptor Numb regulates intestinal cholesterol absorption through dynamic interaction with NPC1L1. *Nat Med*, 2014, 20(1): 80-6
- [65] Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 1990, 265(6): 3116-23
- [66] Garcia CK, Wilund K, Arca M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*, 2001, 292(5520): 1394-8
- [67] Maurer ME, Cooper JA. The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 20): 4235-46
- [68] Wei J, Fu ZY, Li PS, et al. The Clathrin adaptor proteins ARH, Dab2, and Numb play distinct roles in niemann-pick C1-Like 1 versus low density lipoprotein receptor-mediated cholesterol uptake. *J Biol Chem*, 2014, 289(48): 33689-700
- [69] Ge L, Qi W, Wang LJ, et al. Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(2): 551-6
- [70] Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, et al. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res*, 1999, 40(2): 302-8
- [71] Cohen JC, Pertsemlidis A, Fahmi S, et al. Multiple rare variants in NPC1L1 associated with reduced sterol absorption and plasma low-density lipoprotein levels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(6): 1810-5
- [72] Polisecki E, Peter I, Simon JS, et al. Genetic variation at the NPC1L1 gene locus, plasma lipoproteins, and heart disease risk in the elderly. *J Lipid Res*, 2010, 51(5): 1201-7
- [73] Stitzel NO, Won HH, Morrison AC, et al. Inactivating mutations in NPC1L1 and protection from coronary heart disease. *N Engl J Med*, 2014, 371(22): 2072-82
- [74] Wang LJ, Wang J, Li N, et al. Molecular characterization of the NPC1L1 variants identified from cholesterol low absorbers. *J Biol Chem*, 2011, 286(9): 7397-408
- [75] Simon JS, Karnoub MC, Devlin DJ, et al. Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment. *Genomics*, 2005, 86(6): 648-56
- [76] Wang J, Williams CM, Hegele RA. Compound heterozygosity for two non-synonymous polymorphisms in NPC1L1 in a non-responder to ezetimibe. *Clin Genet*, 2005, 67(2): 175-7
- [77] Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*, 2004, 279(32): 33586-92
- [78] Kesaniemi YA, Miettinen TA. Cholesterol absorption efficiency regulates plasma cholesterol level in the Finnish population. *Eur J Clin Invest*, 1987, 17(5): 391-5
- [79] Dawson PA, Rudel LL. Intestinal cholesterol absorption. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10(4): 315-20
- [80] Weingartner O, Bjorkhem I, Lutjohann D. Intestinal cholesterol absorption and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(7): 695-6
- [81] Catapano AL, Catapano L, Fellin R. [Intestinal cholesterol absorption: a pharmacological target for lowering of

- plasma cholesterol]. *Ital Heart J Suppl*, 2004, 5(10): 779-84
- [82] Geach T. Coronary heart disease: NPC1L1 mutations lower CHD risk. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(1): 3
- [83] Ezzet F, Wexler D, Statkevich P, et al. The plasma concentration and LDL-C relationship in patients receiving ezetimibe. *J Clin Pharmacol*, 2001, 41(9): 943-9
- [84] Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A, et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation*, 2002, 106(15): 1943-8
- [85] Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett*, 1976, 72(2): 323-6
- [86] Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, et al. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur J Biochem: FEBS*, 1977, 77(1): 31-6
- [87] Chin DJ, Luskey KL, Anderson RG, et al. Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with a 500-fold increase in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(4): 1185-9
- [88] Komander D, Clague MJ, Urbe S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(8): 550-63
- [89] Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J Biol Chem*, 2013, 288(26): 18707-15