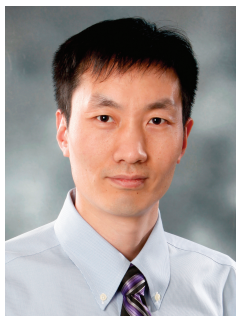


特约综述



胆固醇是生物膜的重要组成成分之一,在许多生命过程中发挥着重要作用。但是血液中高水平胆固醇会导致动脉粥样硬化、冠心病和中风等严重疾病。人体获得胆固醇主要通过自身合成以及从饮食中吸收。本实验室的研究方向包括:胆固醇合成的调控机制;饮食胆固醇吸收的分子途径;细胞内胆固醇的动态运输;胆固醇代谢的药靶系统及新药研发。对胆固醇代谢途径和调控机制的研究将为预防和治疗相关疾病提供必不可少的基础。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=50>

胆固醇合成途径的负反馈调控机制

柳童斐 宋保亮*

(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)

摘要 胆固醇是高等生物体不可或缺的一种脂质小分子,发挥着重要的生物学功能。生物体进化出一整套堪称完美的机制来调控胆固醇的代谢平衡。该文重点介绍了在胆固醇合成途径中的两个主要的负反馈调节途径: SREBP通路和HMGCR蛋白降解通路。

关键词 胆固醇; SREBP; HMGCR; gp78; 泛素; 泛素连接酶

Mechanisms of Negative Feedback Regulation of Cholesterol Biosynthesis

Liu Tongfei, Song Baoliang*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Cholesterol is an essential lipid and plays pivotal roles in eukaryotic organisms. The cells have evolved elegant mechanisms to maintain the cholesterol homeostasis. This review focuses on SREBP pathway and sterol-regulated degradation of HMG-CoA reductase, two major mechanisms governing the negative feedback regulation of *de novo* cholesterol biosynthesis.

Key words cholesterol; SREBP; HMGCR; gp78; ubiquitin; ubiquitin ligase

1 胆固醇的生物功能

胆固醇(cholesterol)是含有环戊烷多氢菲骨架的一种脂质小分子,在体内发挥着重要的生理作用。

胆固醇作为细胞膜的主要组成成分之一,在生理温度范围内调控细胞膜的流动性,参与脂筏(lipid raft)和膜微结构域的形成。在神经系统中,胆固醇的含

国家自然科学基金(批准号: 91213306、81270155)和国家重大科学研究计划(批准号: 2009CB919000)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921649, E-mail: blsong@sibcb.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91213306, 81270155) and the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2009CB919000)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921649, E-mail: blsong@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2013-04-01 14:50

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130401.1450.003.html>

量也特别丰富,对突触和髓鞘的形成非常重要。

同时,胆固醇还是合成许多生物活性分子的前体。例如,胆汁酸及其盐类(乳化并促进吸收食物中的脂质以及脂溶性的维生素A、E、K等)、维生素D、皮质醇(cortisol)、醛固酮(aldosterone)、孕酮(progesterone)、雌激素(estrogens)、睾酮(testosterone)以及它们的衍生物等^[1]。另外,胆固醇修饰是蛋白质一种重要的修饰形式。例如,胆固醇修饰对于hedgehog信号蛋白发挥生物功能是必需的^[2]。

如果缺乏胆固醇,哺乳动物就不能生存。另一方面,过多的胆固醇会导致一系列非常严重的疾病。例如,动脉粥样硬化、脂肪肝、冠心病等。因此,胆固醇代谢必须处于严密而精准的调控之中。研究胆固醇代谢平衡的调控机制有重要的临床意义。

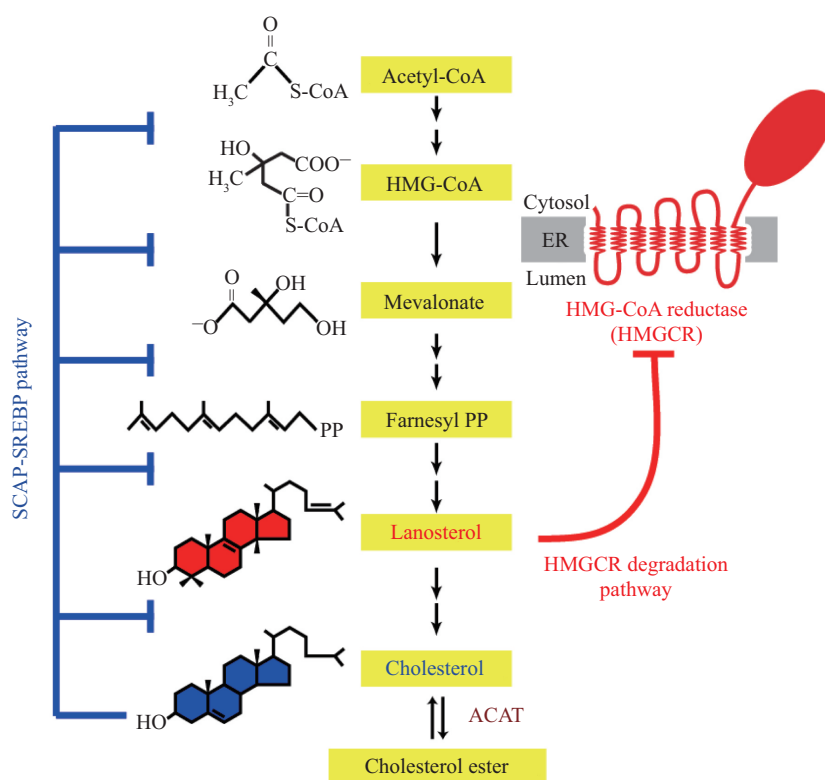
2 胆固醇合成中负反馈调控的分子机制

哺乳动物可以通过自身合成以及饮食吸收来

获得胆固醇,关于饮食胆固醇吸收的分子机制,可以参考其他文献^[3]。细胞利用2个碳的乙酰辅酶A,经过30余步酶促反应合成27个碳的胆固醇(图1),该过程严格受到其下游产物的负反馈调控^[4-5]。其中,SREBP通路与HMGCR降解通路是两个主要的负反馈调控机制^[6-8]。

2.1 SREBP通路

美国西南医学中心的Brown和Goldstein两位科学家对该机制的发现贡献巨大。他们深入研究家族高血脂症(familial hypercholesterolemia, FH),克隆了LDL受体基因(LDL receptor, *LDLR*),并发现在*LDLR*及胆固醇合成途径的基因启动子上存在一个10 bp的顺式作用元件,此元件被命名为Sterol regulatory element(SRE)。当插入SRE序列后,原本不响应胆固醇调控的启动子也会受到调控。这暗示存在着一个转录因子可以识别并结合SRE元件从而调控*LDLR*、*HMGCR*(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A



细胞利用乙酰辅酶A为原料合成胆固醇,一方面,胆固醇结合SCAP,通过SCAP-SREBP途径在转录水平抑制胆固醇合成基因的表达;另一方面,胆固醇合成中间体lanosterol可促进羟甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGCR)降解,从而降低胆固醇合成。胆固醇还可以由酰基辅酶A:胆固醇酰基转移酶(ACAT)转化为胆固醇酯。

Cholesterol is a specific regulator of SCAP-SREBP pathway. It binds SCAP, alters its conformation, and therefore inhibits the transport of SREBP from ER to Golgi. On the other hand, lanosterol, an intermediate in cholesterol synthesis, is an endogenous regulator for the degradation of HMGCR. Acyl-CoA: cholesterol acyl-transferase(ACAT) catalyzes the formation of cholesterol ester.

图1 胆固醇的合成调控

Fig.1 Regulation of cholesterol biosynthesis

reductase)、*HMGCS*(3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A synthase)等基因的转录表达。

随后, Brown-Goldstein实验室的王晓东博士从Hela细胞核抽提物中成功纯化得到了一个约60 kDa的蛋白, 命名为sterol regulatory element binding protein (SREBP)^[9-10]。基于部分蛋白序列, 克隆到*SREBP*基因的全长序列。发现*SREBP*基因实际上编码一个125 kDa蛋白。SREBP蛋白序列分析发现, 60 kDa核蛋白对映着N-端序列, 属于basic-helix-loop-helix-leucine zipper(bHLH-Zip)蛋白超家族(识别E-box)^[11]。虽然SRE元件不属于E-Box, 但SREBP的DNA结合区域的一个酪氨酸替代了在其他bHLH-Zip成员中保守的精氨酸。晶体结构研究发现, 这个酪氨酸对SREBP识别SRE元件至关重要^[12]。

后续的研究发现, SREBP有两个基因: *SREBP-1*和*SREBP-2*。*SREBP-1*又由于转录的起始位点不同而产生两个不同的转录本: *SREBP-1a*和*SREBP-1c*。其中, *SREBP-1c*是*SREBP-1*在肝脏中的主要形式^[13]。在同一时期, Bruce Spiegelman实验室在研究脂肪分化中的关键转录因子时, 也克隆到了SREBP(他们命名为ADD1)^[14]。

有趣的是, 利用SREBP的抗体检测内源蛋白时, 发现当细胞胆固醇饥饿时, SREBP就会进入细胞核内, Western blot显示核内有60 kDa条带。然而, 当加入胆固醇后, SREBP只在内质网上, 而且Western blot显示核内60 kDa条带消失, 只有胞质中的125 kDa的条带^[15-16]。

详细研究蛋白质序列发现, SREBP蛋白被中间80个氨基酸分为480个氨基酸的N-端入核区(含bHLH-Zip)和550个氨基酸的C-端调控区。中间的80个氨基酸又可分为两段跨膜序列和30个氨基酸的亲水区(朝向内质网腔)。SREBP蛋白整体在内质网上呈“Hairpin”式结构, N-端和C-端朝向细胞质。

基于上述实验现象, 推测在细胞胆固醇缺乏时, SREBP发生蛋白剪切释放N-端, 进入细胞核启动下游靶基因的表达。深入的生化分析显示, 要经过两步剪切反应才能成功释放SREBP的成熟N-端。第一步剪切发生在朝向内质网腔的30个氨基酸上, 催化此步反应的蛋白酶被命名为Site-1 Protease (S1P)^[17]。此时, SREBP被一分为二, 含有bHLH-Zip的那部分通过单次的跨膜区与膜结合。第二步剪切就发生在这段上, 令人惊奇的是, 剪切位点位于疏水的跨膜区。

催化此步反应的蛋白酶被称为Site-2 Protease(S2P)^[18]。进一步的实验分析表明, 第一步剪切可以被胞内高胆固醇所抑制; 没有第一步剪切就不会有第二步剪切的发生。

S1P是一种丝氨酸蛋白酶, 通过其C-端疏水区与膜结合。S2P属于zinc metalloprotease家族, 高度疏水, 它在疏水环境中催化蛋白水解反应。而且S2P在所有哺乳动物, 甚至大肠杆菌、古菌中都能找到。SREBP通过蛋白剪切调控活性的机制被称为Regulated intramembrane proteolysis(Rip)。现已证明除了SREBP途径外, ATF6、Notch、APP(amyloid precursor protein)等诸多蛋白都采取了Rip调控方式^[19]。

S1P与S2P两蛋白酶定位与高尔基体上, 那么SREBP是怎么从ER到达高尔基体上的呢?

Chang实验室发现了一株突变的CHO细胞系25-RA^[20]。SREBP剪切正常, 但是丧失了胆固醇抑制SREBP剪切的能力。细胞融合实验证明, 此细胞系的突变是显性的。Brown-Goldstein实验室构建了25-RA细胞的cDNA文库, 再将其转染到正常的CHO细胞系中^[21]。利用报告基因系统, 成功筛选到突变基因。该基因被命名为SREBP cleavage activating protein(SCAP)。SCAP的N-端725个氨基酸组成八次跨膜区, C末端550个氨基酸亲水、朝向胞质, 含有多个WD40序列^[22]。已知WD40会形成 β 螺旋介导蛋白与蛋白相互作用。25-RA中SCAP蛋白的第443位的天冬氨酸突变为天冬酰胺(D443N), 它使SREBP剪切不再受胆固醇的调控^[23]。这个突变位点位于一个名为Sterol-Sensing Domain(SSD)的区域。与胆固醇代谢相关的蛋白HMGCR、Neimann Pick C1(NPC1)、Neimann Pick C1 Like 1(NPC1L1)等蛋白中都含有SSD。最近的研究发现, SCAP的Loop 2可以直接结合胆固醇, 其在胆固醇调控中的作用还不清楚。

对SCAP的糖基化分析结合荧光显微镜技术显示, 当细胞处于低胆固醇水平时, SCAP会带着SREBP从内质网到高尔基体上。相反, 当加入过量的胆固醇, SCAP/SREBP复合物只会待在内质网上, 从而阻断SREBP的剪切, 关闭SREBP通路(图2)。

另一个问题是, 胆固醇是如何调控SREBP成熟剪切的呢?

有趣的是, 当在细胞中过表达SCAP时, 胆固醇抑制SREBP剪切的能力就丧失了。这提示当胆固

醇存在时,内质网上某一驻留蛋白可以锚定SCAP蛋白。当过量表达SCAP蛋白时,这一驻留蛋白被饱和掉了。多余的SCAP蛋白就会将SREBP运输到高尔基体进行成熟剪切。因此,胆固醇就无法再抑制SREBP的成熟剪切了。

Brown-Goldstein实验室的Tong Yang博士等研究人员通过免疫共沉淀联合质谱分析,鉴定与SCAP结合的蛋白^[24]。最后,发现此蛋白为Insig-1。Insig-1只有在胆固醇存在下才可以与SCAP的SSD区域结合。早在1991年,Insig-1的mRNA就被发现。起初该基因被命名为CL-6。由于它受胰岛素的诱导而转录上升,所以又称作insulin-induced gene(*Insig*)。后续的研究表明,*Insig-1*是SREBP的靶基因。胰岛素

对Insig-1的作用是间接的,主要是通过SREBP起作用的。胞内高胆固醇水平时,Insig-1蛋白主要通过SCAP的SSD区域结合,将SCAP/SREBP复合物锚定于内质网,抑制SREBP成熟剪切(图2)。

Insig-2是与Insig-1功能相似的同源蛋白,2002年通过生物信息学手段被发现^[25]。与*Insig-1*不同的是,*Insig-2*不是SREBP的靶基因。在肝脏中它有两个转录本分别为*Insig-2a*和*Insig-2b*,两者主要是由于转录起始位置不同而造成的,但翻译出的蛋白是一样的。*Insig-2a* mRNA量与血液中的Insulin浓度呈反比。Insulin浓度高时,*Insig-2a* mRNA减少;Insulin浓度低时,*Insig-2a* mRNA增多。但*Insig-2b* mRNA不受调控低量恒定表达^[26]。

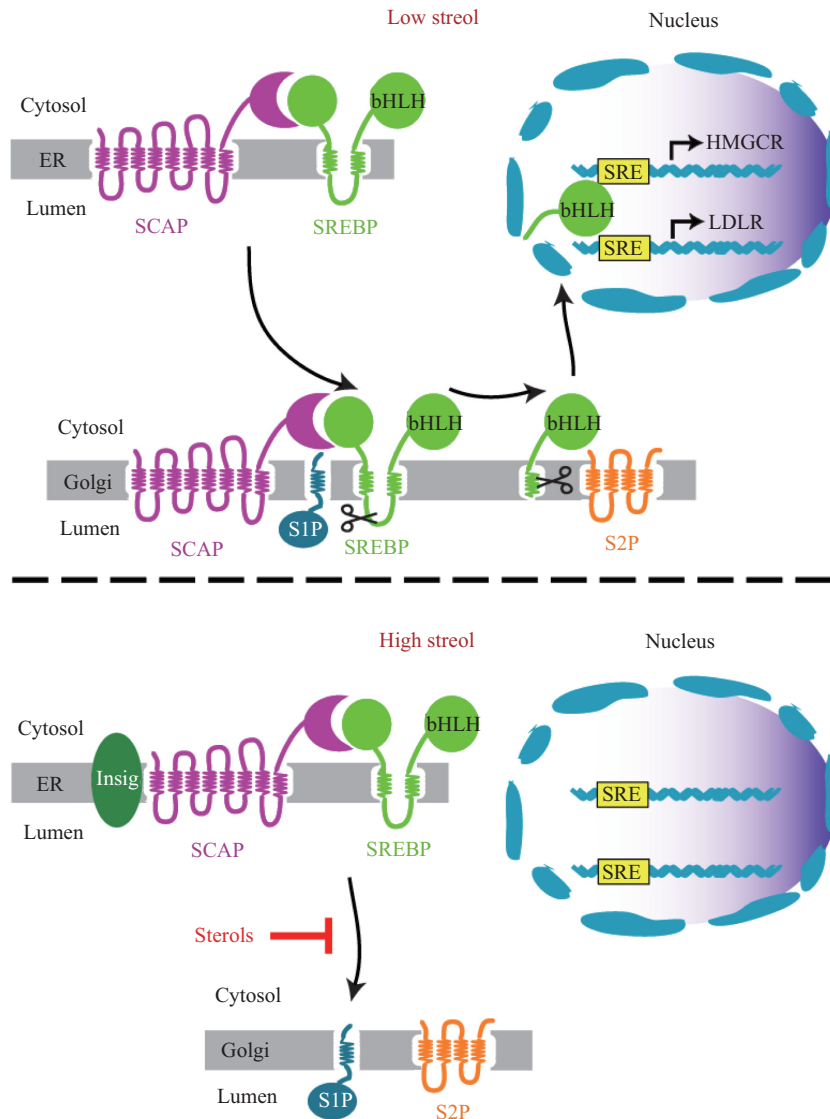


图2 SCAP-SREBP通路

Fig.2 SCAP-SREBP pathway

进一步实验发现, 当缺乏胆固醇时, SCAP蛋白会掺入到Cop II包被小泡中, 后者将蛋白质从ER运输至高尔基体。但加入胆固醇后, SCAP蛋白就不会掺入到Cop II包被小泡中。序列突变分析显示, SCAP蛋白Loop 6中的六个氨基酸MELADL (methionine-glutamic acid-leucine-alanine-aspartic acid-leucine)直接介导了与CopII小泡蛋白Sec23/24结合。当内质网胆固醇达到阈值时, SCAP Loop 6构像发生变化, 使MELADL无法与Sec23/24接触, 从而造成SCAP蛋白无法掺入到COPII包被小泡中。这样就抑制了SREBP的成熟剪切过程。

基于其他实验室对SCAP功能的详细研究, 我们实验室将其作为一个新的降胆固醇的靶标, 并开展大规模筛选工作。我们从众多化合物中得到了一个特异结合SCAP蛋白的小分子化合物即白桦酯醇(Betulin)^[27]。白桦酯醇可以抑制SCAP的构象变化, 从而阻止其将SREBP运输到高尔基体, 下调SREBP通路。进一步的动物实验发现, 白桦酯醇可以有效降低小鼠的血脂和肝脂。白桦酯醇可以从天然的白桦树皮中大量提纯, 有可能成为新的降脂药物^[27]。

2.2 HMGCR蛋白降解通路

3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, 简称HMGCR)催化HMG-CoA转化为甲羟戊酸(mevalonate)。甲羟戊酸作为合成前体参与了胆固醇、类异戊二烯(isoprenoid)、泛醌(ubiquinone)、血红素(heme)、多萜醇(dolichol)、牻牛儿基(geranylgeranyl)、法尼基(farnesyl)等终产物的生物合成^[5,28]。

UT-1细胞是在CHO细胞系基础上筛选到的一株可以在去脂血清培养条件下正常生长并抵抗高浓度compactin(HMGCR抑制剂)的细胞系。此细胞中, HMGCR蛋白量极高, 可以达到总蛋白量的2%。从UT-1中, 得到360条不完整的cDNA, 并从其中克隆到了HMGCR基因。随后的研究发现, HMGCR是胆固醇合成的限速酶。甾醇与异戊二烯类等合成终产物通过负反馈机制来进行严格调控。在转录水平上, HMGCR mRNA含量主要受到SREBP的调控。除此之外, 在翻译后水平上, HMGCR蛋白主要受到泛素-蛋白酶体途径的调节。

Insig蛋白的发现解开了一个多年的疑云。当最初克隆到HMGCR时, 发现加入胆固醇或氧化性甾醇(如25-hydroxylcholesterol)后, 内源HMGCR蛋

白就会快速地降解。后续的详细研究还证明, 羊毛固醇(lanosterol)是诱导HMGCR降解的一个重要的内源小分子^[29]。但是, 当在细胞系中过表达外源HMGCR时, 胆固醇诱导HMGCR快速降解的现象就消失了。这暗示HMGCR快速降解还需要另一个蛋白的参与。过量的HMGCR会饱和掉这个内源蛋白。因此, 过表达HMGCR并不受甾醇诱导的快速降解。之前已经证明Insig可以结合SCAP的SSD区域而发挥作用, 又由于HMGCR也含有SSD区域, 所以推测这个被饱和的蛋白就是Insig^[30]。

实验证明Insig确实介导HMGCR蛋白的降解。动物水平上的工作也支持这一结论。Insig-1、Insig-2双敲除小鼠肝脏中, HMGCR的蛋白水平上调了几百倍^[31-32]。

在目前研究较多的哺乳动物(如人、仓鼠、大鼠和小鼠)中, HMGCR都定位于内质网, 而且由887或888个氨基酸组成。依据功能以及结构, 可以将HMGCR划分为两个不同的区域: N-端339个氨基酸构成八次跨膜区; 由C-端548个氨基酸构成胞质区。在大多数哺乳动物中, HMGCR跨膜区的氨基酸序列都是高度保守的。这提示膜结构域不仅仅是将HMGCR胞质区锚定于内质网上, 而且还有其他的生物学功能。(1)缺失膜结构域的HMGCR可以稳定表达并具有完全的催化活性, 但是丧失了甾醇诱导HMGCR降解的能力。(2)膜结构域与 β -半乳糖苷酶的融合蛋白具有响应甾醇诱导降解的能力, 如同正常的HMGCR一样。而且进一步发现, MG132(蛋白酶体抑制剂)可以阻断甾醇诱导的HMGCR降解。因此, 说明HMGCR的膜结构域对降解至关重要, 而且它是通过泛素蛋白酶体途径进行降解的。

甾醇诱导的HMGCR降解是通过泛素(Ubiquitin)蛋白酶体途径完成的。泛素化是通过3种不同的酶依次作用而完成的: 泛素活化酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素交联酶(Ubiquitin conjugating enzymes, E2)、泛素连接酶(ubiquitin ligases, E3)。泛素活化酶、交联酶活化泛素, 最后泛素连接酶将其共价连接到被降解蛋白的赖氨酸残基(lysine)上。泛素连接酶决定底物的特异性。

2005年, 宋保亮等^[33]通过免疫共沉淀联合质谱的实验方法, 鉴定出介导HMGCR泛素蛋白酶体降解途径的泛素连接酶是gp78。gp78又名autocrine

motility factor receptor (AMFR), 五次跨膜, 主要定位于内质网。gp78具有 ring figure domain、CUE motif 和 E2 binding site, 被划分为 Ring-H2 泛素连接酶。20 世纪 80 年代中期, gp78 被不同的实验室所发现。最初, 发现 gp78 与癌细胞的 Metastasis 发生过程相关, 后来发现抑癌基因 *KAI1* (又名 *CD82*) 的编码蛋白是 gp78 的底物^[34-35]。研究还发现 gp78 参与错误折叠蛋白的 ER-associated degradation (ERAD) 过程^[35-40]。

当细胞内胆固醇水平升高时, Insig 结合 HMGCR, 同时还结合 gp78。Insig 介导 gp78 与 HMGCR 的结合。gp78 催化 HMGCR 在 89 位与 248 位赖氨酸残基的泛素化^[33]。泛素化的 HMGCR 被迅速递送到蛋白酶体进行降解, 从而降低细胞内合成胆固醇的速率。

我们实验室进一步找寻与 HMGCR 蛋白降解过程相关的调控蛋白。通过免疫共沉淀 gp78 结合蛋白并联合质谱的方法, 我们发现了 Ufd1 蛋白^[42]。Ufd1 含有单泛素和多泛素结合位点, 并通过结合 gp78 调节 gp78 的酶活性, 加速 HMGCR 降解, 减少细胞内胆固醇的合成, 同时增加细胞对低密度脂蛋白的吸收, 可降低血液胆固醇水平(图3)^[42]。

除了 HMGCR, gp78 还介导 Insig-1 的快速降解过程^[43]。gp78 催化 Insig-1 蛋白(人源)的 156 位、158 位赖氨酸残基发生泛素化, 紧接着泛素化的 Insig-1 被转运到蛋白酶体进行降解。甾醇通过 SCAP 蛋白可

以稳定 Insig-1 蛋白抑制其降解。主要是由于甾醇诱导 SCAP 构象发生变化而结合 Insig-1, 导致 gp78 解离, 无法催化 Insig-1 泛素化, 从而稳定 Insig-1 蛋白。实验表明, SCAP 蛋白 SSD 区域的 Y298C 突变后, 就会失去对 Insig-1 的保护作用。另一方面, SCAP/SREBP 复合体与 Insig-1 的解离不依赖于 Insig-1 蛋白的泛素化。实验表明, Insig-1 (K156R、K158R) 突变型只能延缓 SCAP 的解离, 但不能阻止^[44]。

gp78 参与了两个相反的生物过程。一方面, gp78 可以催化 HMGCR 泛素化使其快速降解。由于 HMGCR 是胆固醇生物合成过程中的限速酶。过量的甾醇可以诱导其快速降解, 从而负反馈调控胆固醇合成速率^[33]。另一方面, gp78 也参与了 Insig-1 的泛素化-蛋白酶体降解途径^[43]。Insig-1 是 SREBP 成熟剪切过程中的负调控因子^[45]。如果快速降解 Insig-1, 就可以解除对 SREBP 通路的抑制, 激活其下游靶基因的表达, 从而上调脂质合成。gp78 响应胞内不同的代谢信号, 分别介导 HMGCR 和 Insig-1 蛋白的快速降解来精确地调控胆固醇的合成速率。为了进一步研究其生理功能及其调控机制, 又因为肝脏是胆固醇反馈调节的主要响应器官, 因此我们实验室构建了 gp78 基因肝脏特异敲除小鼠 (*L-gp78^{-/-}*) 模型^[46]。

与前期细胞系上的工作一致的是, 在 *L-gp78^{-/-}*

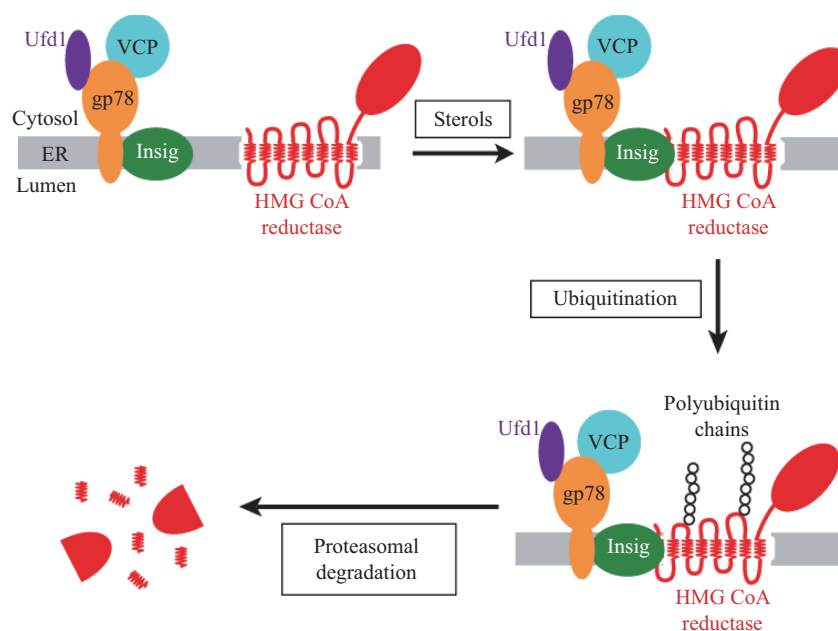


图3 甾醇诱导HMGCR的降解

Fig.3 Sterol-regulated degradation of HMG-CoA reductase

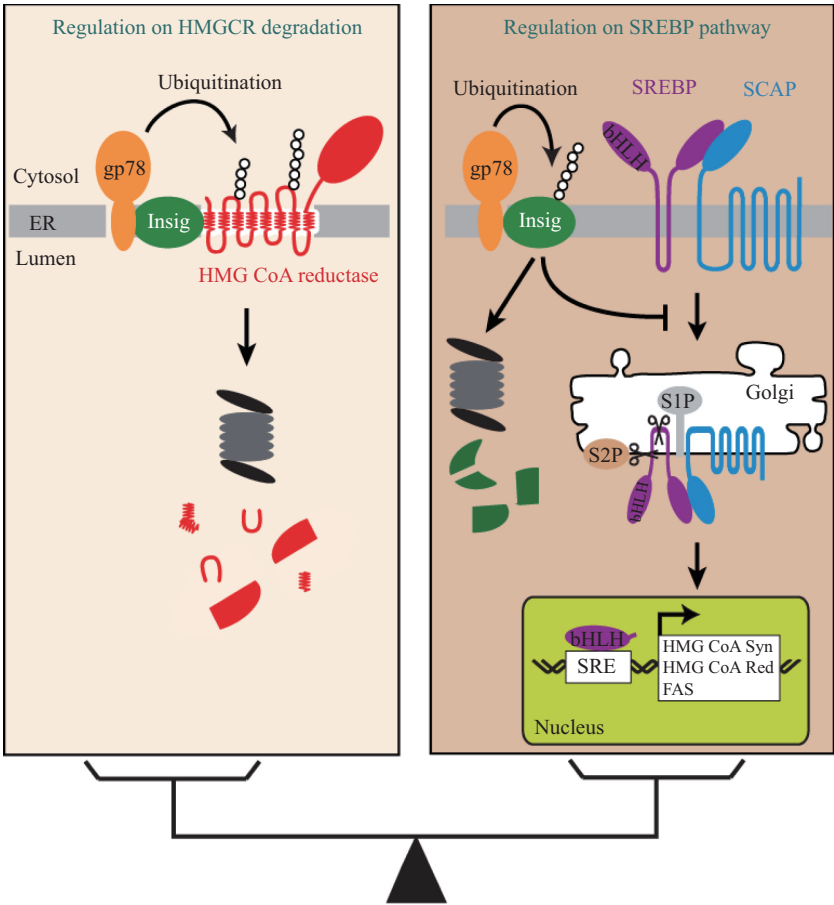


图4 gp78在脂质代谢中的作用
Fig.4 Function of gp78 in lipid metabolism

小鼠肝脏中HMGCR与Insig-1蛋白含量明显增加了。通过在肝脏原代细胞上的实验分析,显示HMGCR泛素化显著减少。有趣的是,Insig-2蛋白量以及蛋白稳定性均显著增加,表明Insig-2也是gp78的降解底物^[46]。

通过同位素示踪技术,我们发现*L-gp78*^{-/-}小鼠中HMGCR的酶活力增强,但胆固醇和脂肪酸等脂质的合成速率却下降了。基因表达分析发现,*L-gp78*^{-/-}小鼠肝脏中SREBP靶基因表达下调。结合Western blot分析,*L-gp78*^{-/-}小鼠肝脏中SREBP成熟剪切过程被抑制了。这说明Insig蛋白增多,阻止了SREBP的成熟剪切,下调参与胆固醇合成的基因表达。虽然HMGCR酶活性增加了,但其上下游基因表达下调,总的效果是抑制胆固醇合成(图4)^[46]。

综上所述,HMGCR作为胆固醇合成的限速酶,是胆固醇反馈抑制的重要调控位点。HMGCR受到多个水平的调控,其中甾醇诱导的HMGCR蛋白降解是重要的调控机制。gp78是介导这一过程的泛素

连接酶。Ufd1是起到加速降解作用的一个因子。我们实验室通过gp78的动物模型进一步加深了对gp78生理功能的了解。这些工作暗示泛素连接酶gp78可以作为治疗代谢疾病的新靶标。

3 总结

胆固醇作为哺乳动物细胞中最重要的脂质小分子之一,发挥着重要的生物学功能,与我们的生命健康息息相关。又由于胆固醇合成是体内胆固醇的主要来源之一,因此胆固醇合成的速率需要精确的调节以满足细胞的生理需求。缺乏胆固醇时,合成速率要增加;合成满足需求或摄入大量胆固醇后,合成途径就需要马上关闭,用以节约能量。

生物体经过千百万年的进化,逐渐发展出一整套精巧的分子机制来完成这些任务。经过许多科学家将近一个世纪的探索与发现,SREBP通路与HMGCR降解通路等分子机制逐渐清晰起来。细胞通过这两个主要的通路分别在转录水平上以及转录

后水平上调胆固醇的合成。但是胆固醇合成调控的复杂性远远超过我们的想象,随着研究的深入,会有更多有趣而惊人的发现。

参考文献 (References)

- Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 43(8): 779-804.
- Jeong J, McMahon AP. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *J Clin Invest* 2002; 110(5): 591-6.
- 张莹钰, 宋保亮. 饮食胆固醇吸收的研究进展. *生物物理学报* (Zhang Yingyu, Song Baoliang. Progress in the mechanism of dietary cholesterol absorption. *Acta Biophysica Sinica*) 2012; 28(7): 573-82.
- Bloch K. The biological synthesis of cholesterol. *Science* 1965; 150(3692): 19-28.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343(6257): 425-30.
- Brown MS, Goldstein JL, Dietschy JM. Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver of the rat. Comparison with the rate of cholesterol synthesis in different physiological states. *J Biol Chem* 1979; 254(12): 5144-9.
- DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: Sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res* 2008; 18(6): 609-21.
- Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 2007; 41: 401-27.
- Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem* 1993; 268(19): 14490-6.
- Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1993; 268(19): 14497-504.
- Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, *et al.* SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 1993; 75(1): 187-97.
- Parraga A, Bellolell L, Ferre-D'Amare AR, Burley SK. Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution. *Structure* 1998; 6(5): 661-72.
- Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(22): 12737-42.
- Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: A novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 1993; 13(8): 4753-9.
- Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys* 2010; 501(2): 177-81.
- Sato R, Inoue J, Kawabe Y, Kodama T, Takano T, Maeda M. Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* 1996; 271(43): 26461-4.
- Sakai J, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS. Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from *in vivo* competition studies. *J Biol Chem* 1998; 273(10): 5785-93.
- Rawson RB, Zelenski NG, Nijhawan D, Ye J, Sakai J, Hasan MT, *et al.* Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell* 1997; 1(1): 47-57.
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 2000; 100(4): 391-8.
- Chang TY, Limanek JS. Regulation of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25-hydroxycholesterol in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1980; 255(16): 7787-95.
- Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* 1996; 87(3): 415-26.
- Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL. Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem* 1998; 273(27): 17243-50.
- Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL. Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(22): 12848-53.
- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, *et al.* Crucial step in cholesterol homeostasis: Sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 2002; 110(4): 489-500.
- Yabe D, Brown MS, Goldstein JL. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(20): 12753-8.
- Yabe D, Komuro R, Liang G, Goldstein JL, Brown MS. Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: Implications for fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(6): 3155-60.
- Tang JJ, Li JG, Qi W, Qiu WW, Li PS, Li BL, *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.
- Goldstein JL, Bose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 2006; 124(1): 35-46.
- 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.
- Sever N, Song BL, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA. 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.
- 31 Engelking LJ, Evers BM, Richardson JA, Goldstein JL, Brown MS, Liang G. Severe facial clefting in *Insig*-deficient mouse embryos caused by sterol accumulation and reversed by lovastatin. *J Clin Invest* 2006; 116(9): 2356-65.
- 32 Engelking LJ, Liang G, Hammer RE, Takaishi K, Kuriyama H, Evers BM, *et al.* Schoenheimer effect explained—feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by *Insig* proteins. *J Clin Invest* 2005; 115(9): 2489-98.
- 33 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.
- 34 Joshi B, Li L, Nabi IR. A role for KAI1 in promotion of cell proliferation and mammary gland hyperplasia by the gp78 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2010; 285(12): 8830-9.
- 35 Tsai YC, Mendoza A, Mariano JM, Zhou M, Kostova Z, Chen B, *et al.* The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nat Med* 2007; 13(12): 1504-9.
- 36 Vij N, Fang S, Zeitlin PL. Selective inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator and suppresses interleukin-8 levels: therapeutic implications. *J Biol Chem* 2006; 281(25): 17369-78.
- 37 Yang H, Liu C, Zhong Y, Luo S, Monteiro MJ, Fang S. Huntingtin interacts with the cue domain of gp78 and inhibits gp78 binding to ubiquitin and p97/VCP. *PLoS One* 2010; 5(1): e8905.
- 38 Ying Z, Wang H, Fan H, Zhu X, Zhou J, Fei E, *et al.* Gp78, an ER associated E3, promotes SOD1 and ataxin-3 degradation. *Hum Mol Genet* 2009; 18(22): 4268-81.
- 39 Ying Z, Wang H, Fan H, Wang G. The endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation system regulates aggregation and degradation of mutant neuroserpin. *J Biol Chem* 2011; 286(23): 20835-44.
- 40 Chen Z, Du S, Fang S. gp78: A multifaceted ubiquitin ligase that integrates a unique protein degradation pathway from the endoplasmic reticulum. *Curr Protein Pept Sci* 2012; 13(5): 414-24.
- 41 St PP, Nabi IR. The Gp78 ubiquitin ligase: Probing endoplasmic reticulum complexity. *Protoplasma* 2011; 249 Suppl 1: S11-8.
- 42 Cao J, Wang J, Qi W, Miao HH, Wang J, Ge L, *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.
- 43 Lee JN, Song B, DeBose-Boyd RA, Ye J. Sterol-regulated degradation of *Insig*-1 mediated by the membrane-bound ubiquitin ligase gp78. *J Biol Chem* 2006; 281(51): 39308-15.
- 44 Gong Y, Lee JN, Lee PC, Goldstein JL, Brown MS, Ye J. 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.
- 45 Engelking LJ, Kuriyama H, Hammer RE, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL, *et al.* Overexpression of *Insig*-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J Clin Invest* 2004; 113(8): 1168-75.
- 46 Liu TF, Tang JJ, Li PS, Shen Y, Li JG, Miao HH, *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.