

降血脂功效成分体外筛选方法研究进展

陈继承, 卢晓凤, 何国庆*

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310029)

摘要: 高通量降血脂活性成分筛选为高脂血症治疗药物和保健品开发提供了便捷通道。本文从受体筛选模型、胆固醇代谢筛选模型、模拟胆汁胶束法和脂质代谢调控酶的抑制剂方面, 对近年来国内外降血脂成分体外筛选方法进行了介绍, 为降血脂活性成分的筛选研究提供参考。

关键词: 高脂血; 胆固醇; 降血脂; 体外筛选方法

Research Progress of Screening Methods for Hypolipidemic Components *in vitro*

CHEN Ji-cheng, LU Xiao-feng, HE Guo-qing*

(School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Abnormal lipid metabolism is one of risk factors for atherosclerotic cardiovascular disease. The commonly used hypolipidemic drugs have toxicity to some extents. Screening effective, non-toxic, natural hypolipidemic ingredients has become one of hot topics in the fields of modern medicine, nutrition and biotechnology at home and abroad. Animal models with hyperlipidemia were high cost, time-consuming and unsuitable for high throughput screening. A convenient strategy for developing hypolipidemic drugs and health foods is to screen bioactive components *in vitro*. In this paper, screening methods for hypolipidemic drugs *in vitro* have been reviewed, which will provide references for further research of hypolipidemic components.

Key words: hyperlipemia; cholesterol; hypolipidemic; screening methods *in vitro*

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)13-0287-05

血脂是血浆中甘油三酯、胆固醇等中性脂肪和磷脂、糖脂、固醇、类固醇等类脂的总称。高脂血症属体内血脂代谢异常所致, 因血脂过高诱发的动脉粥样硬化、冠心病、心肌梗死等心脑血管疾病已严重威胁人类健康。血脂高低与日常膳食摄入和体内代谢有着密切关系。降血脂功效成分筛选和降血脂药物开发的相关研究备受学术界关注, 国内外学者对降血脂药物的筛选靶标及体外筛选方法进行了广泛研究和探讨。不同降脂成分筛选方法基于不同降脂途径, 主要包括增加降脂因子的表达和促进脂质代谢和排泄、抑制外源性脂类吸收、减少内源性脂质合成等途径。本文分类概述近年来降血脂功效成分体外筛选方法研究进展, 旨在为降血脂活性成分的筛选研究提供参考。

1 受体筛选模型

受体是调脂药物治疗重要靶标之一, 基于受体可以

建立降血脂成分高通量快速检测平台。寻找调控脂质代谢相关的受体, 筛选其相关受体激动剂或阻断剂是脂质代谢研究的新方向。筛选模型可以对这些基因调控元件进行表达调控, 以荧光素酶基因为报告基因, 最终通过检测荧光素酶的表达量间接反映降血脂效果。目前研究较多的受体主要有蛋白受体和核受体。

1.1 低密度脂蛋白受体(LDLR)

LDLR 在调节 LDL 代谢和保持血液中胆固醇正常浓度方面起着非常重要的作用。通过激活 LDLR 基因的表达来吸收血液中的 LDL 是一种降低血液 LDL 浓度的途径。以控制 LDLR 基因表达的血清反应元件为靶位点, 构建 LDLR 启动子荧光素酶报告基因质粒, 将此质粒转染人肝癌细胞系等可构建 LDLR 报告基因模型。张华等^[1]利用 LDLR 报告基因系统, 从微生物发酵产物中筛选获得一种降脂药物。这种筛选方法在泻泽、姜黄、决明子等传统中药的降血脂成分筛选方面也有应用。

收稿日期: 2009-12-30

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2006BAD27B09)

作者简介: 陈继承(1978—), 男, 博士研究生, 研究方向为发酵工程及降血脂功能性食品开发。E-mail: newtaicjc@163.com

* 通信作者: 何国庆(1957—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与发酵工程、食品生物技术。E-mail: gqhe@zju.edu.cn

1.2 巨噬细胞清道夫受体(SR)

变性的 LDL 被公认为是导致动脉粥样硬化(AS)的危险因子。SR 具有广泛的配体活性,能与修饰脂蛋白乙酰化和氧化的 LDL 高亲和性结合,是形成泡沫的主要原因。以人清道夫受体 CD36 或者受体 A 等为靶点,构建受体拮抗剂高通量筛选细胞模型,利用该模型对化合物样品或者微生物发酵提取物进行筛选可以获得阳性化合物,可能成为治疗 AS 的药物先导化合物^[2]。Chen 等^[3]以 SR-A 的胞浆域为靶点,通过筛选噬菌体随机多肽库,得到一种与 SR-A 胞浆域特异性结合的多肽,可以抑制诱导分化的 THP-1 细胞结合摄取乙酰化脂蛋白。

1.3 核受体

核受体是配体依赖性转录因子超家族,可通俗理解为一种关闭和开启基因的蛋白。与脂质代谢相关的核受体有氧化物体增殖因子激活受体(PPAR)、肝脏 X 受体(LXR)、类法尼醇 X 受体(FXR),每种核受体各自又有不同的亚型且功能各异。利用哺乳动物细胞核受体的配体结合域与含有 GAL4 基因的结合域连接构成融合表达载体,与含有 GAL4 结合序列的报告质粒共转染动物细胞,可通过测定荧光素酶的表达量,评价和筛选核受体的激动剂。

大量研究证实 PPAR 在体内参与多种能量代谢及细胞活性物质的调节过程,具有改善糖脂代谢作用。激活的 PPAR α 可诱导脂蛋白酯酶表达,促进血脂中的甘油三酯水解;诱导转运蛋白和乙酰辅酶 A 合成酶表达;促进肝脏摄取脂肪酸、抑制肝脏合成甘油三酯;诱导肝细胞 ApoA I 和 ApoA II 基因表达,增加 HDL 及促进胆固醇逆转运等。降脂药 Wy 14643、西普洛贝特(ciprofibrate)、氯贝特(clofibrate)、GW2331、ETYA 等都是 PPAR α 的激活剂。PPAR γ 的超生理活化可诱导乙酰辅酶 A 合成酶、脂肪酸转运蛋白、LPL 和脂肪酸结合蛋白的表达增加,使转运至肌肉和肝脏的脂肪酸减少,脂肪合成降低^[4]。胰岛素增敏剂噻唑烷酮类(TZDs)、西普洛贝特等则是 PPAR γ 的激活剂。PPAR β/δ 激动剂可以增加胰岛素抵抗和肥胖动物的血浆 HDL 浓度。英国葛兰素威康公司开发的 GW 2433,是人类 PPAR δ 的高亲和配体,为 PPAR δ 、PPAR α 双重激动剂^[5]。苯扎贝特(bezafibrate)也是 PPAR δ 的激活剂。PPAR α 和 PPAR γ 是通过诱导 LXR α 的表达增加,间接诱导 ABCA1 的表达;PPAR β/δ 活化物诱导 ABCA1 表达的分子机制可能不依赖于 LXR α 。

LXR 作为中心调节子参与胆固醇和脂质代谢中有关基因调控,其调控的基因包括参与胆固醇流出的 ABC 转运子,高密度脂蛋白(HDL)调节蛋白和调节胆固醇分泌到胆汁中的基因。FXR 是胆汁酸的传感器,可以调节机体胆酸水平的相对恒定,可使机体免受胆汁酸浓度过

高造成的损害。美国 Howard Hughes 医学研究中心发现向老鼠体内注射 LXR 受体和 FXR 受体,并饲喂 LG268 药物,能够显著阻止细胞对胆固醇的吸收。人工合成的 GW396 和 T0901317 是 LXR 激动剂,可抑制人类肝细胞中白介素 -1 β /白介素 -6 诱导的 C 反应蛋白 mRNA 及蛋白水平表达,预防动脉粥样硬化发生发展^[6]。

2 胆固醇代谢筛选模型

2.1 降低细胞中胆固醇含量

细胞内胆固醇的流出对维持细胞胆固醇平衡、促进胆固醇逆转运及抗动脉粥样硬化都起着非常重要的作用。以血管平滑肌细胞源性荷脂细胞为模型,不同浓度及时间姜黄素处理细胞,高效液相色谱分析法检测细胞内总胆固醇^[7]。结果表明,姜黄素可降低胞内总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯含量,且这种作用跟固醇调节元件结合蛋白 I 的表达上调有一定关系。以 3T3-L1 脂肪细胞为模型^[8],给予不同浓度的烟酸干预后,收集细胞,采用液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出。结果表明,烟酸可加速细胞内胆固醇流出,降低细胞内胆固醇含量。张露等^[9]研究了银杏叶提取物 GBE50 对培养细胞内胆固醇代谢的影响,采用胆固醇氧化酶终点法检测 GBE50 对培养细胞 HepG2、HUVEC、SH-SY5Y 总胆固醇含量的影响。结果表明,GBE50 可有效降低部分培养细胞内总胆固醇的含量。

2.2 阻止胆固醇的吸收

Caco-2 细胞模型已经成为一种预测药物人体小肠吸收以及研究药物转运机制的标准体外筛选工具。体外人结肠腺癌(Caco-2)细胞系法,可应用于多类药物研究,帮助了解药物的吸收机制,预测体内吸收和药物相互作用,研究药物的小肠代谢情况,从而促进新药研发。向处于对数生长期的 Caco-2 细胞添加含有药物和 ¹⁴C 同位素标记的胆固醇胶束溶液,共培养后裂解细胞,放射定量检测细胞中胆固醇的含量;计算加药物处理与未处理细胞中胆固醇含量的比值。Nagaoka 等^[10-11]报道了 β -乳球蛋白肽对 Caco-2 细胞胆固醇吸收的影响,胰蛋白酶水解后的 β -乳球蛋白多肽 Ile-Ile-Ala-Glu-Lys 可以明显降低 Caco-2 细胞对胆固醇的吸收。van Heek 等^[12]发现 Ezetimibe 可以选择性的抑制小肠上皮细胞对于胆固醇的吸收。

3 模拟胆汁胶束法

3.1 胆汁酸结合

肠道中的胆汁酸经过内部循环,阻断肝胆循环,结合胆汁可使肝脏中的胆固醇减少。胆汁酸结合能力测定:适量样品溶于牛磺胆酸盐缓冲溶液,振荡摇匀后 37℃

孵育^[13], 然后室温下透析, 检测透析液中牛磺胆酸盐的含量, 计算样品胆汁结合能力。考来烯胺(消胆胺)和考来替泊(降胆宁)为碱性阴离子交换树脂, 在肠道与胆汁酸形成络合物随粪排出, 故能阻断胆汁酸的重吸收, 影响胆固醇吸收。因此具有胆汁酸结合能力的物质, 具有一定的降血脂活性。

3.2 胆固醇吸收抑制

胆固醇只有溶于混合胶束, 才会被运至小肠绒毛进行吸收, 因此其溶于胶束是胆固醇吸收的关键。植物甾醇、活性多肽、活性多糖类物质能降低胆固醇在油相和胶束相中的溶解度, 与胆固醇竞争进入胆盐胶束, 竞争混合胶束的空间并取代胆固醇, 干扰其吸收。体外模拟人体的肠道, 用超声波乳化的方法制备出一种人造胆汁胶束溶液。此方法可以对这类降血脂活性物质进行筛选。Nagaoka 等^[14]从 β -乳球蛋白水解产物中分离纯化得到了第一条降血脂多肽(HIAEK)。Zhong 等^[15]先后采用此方法进行了大豆降胆固醇活性肽的分离纯化, 并分离到了具有显著降低胆固醇活性肽组分 Try-Gly-Ala-Pro-Ser-Leu。此法不足之处是样品需要量在毫克级, 不利于高通量筛选方法的建立。

4 脂质代谢调控酶的抑制剂

研究较多的参与脂质代谢的酶与蛋白质主要有脂蛋白脂肪酶、肝脂酶、卵磷脂胆固醇酰基转移酶、3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶、胆固醇酯转移蛋白等。

4.1 HMG-CoA 还原酶抑制剂

HMG-CoA 还原酶是体内催化 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-CoA)生成二羟甲基戊酸(MVA)的关键酶, 这一步是体内合成胆固醇的限速步骤, 也是目前最主要的高血脂症临床药物的靶点。HMG-CoA 还原酶抑制剂是降血脂功效成分和药物筛选主要手段之一。

目前, 抑制剂对 HMG-CoA 还原酶抑制活性的研究方法主要有: 1) 分光光度法。从猪肝中提取 HMG-CoA 还原酶, 以 NADPH、Cysteamine 为底物, 于波长 339nm 处测定 NADPH 光吸收的下降可代表酶活力大小及反应速度。但是此法反应条件难以控制, 背景干扰无法去除, 会造成测定结果的不准确; 2) 同位素标记法。如以 [14 C]-乙酸、D,L-[14 C]HMG-CoA 或 D,L-[14 C]-甲羟戊酸作为底物, 反应后测定形成的固醇中同位素的掺入率, 可计算出样品抑制固醇脂质合成能力^[16]。方法简便、不需分离步骤, 且灵敏度高, 定位定量准确, 但对实验人员要求较高; 3) 薄层层析法。胡海峰等^[17]建立了体外酶反应系统, 以 HMG-CoA 还原酶抑制剂美伐他汀为阳性对照, 使用 TLC 分析胆固醇合成量, 筛选真菌次级代谢产物。其他分离方法如纸层析法和柱层析法, 同

样可以有效地将底物与产物分离; 4) 液相色谱法。通过检测反应体系中 NADPH 浓度的变化, 测定 HMG-CoA 还原酶抑制剂活性^[18]。不过由于反应体系只有 100 μ L, 容易引起操作误差。

另外, 人们已从微生物代谢产物中发现了角鲨烯合成酶抑制剂, 不仅能降低血浆胆固醇水平, 还能降低血浆甘油三酯水平^[19], 而且对类异戊二烯的合成没有影响。角鲨烯合成酶抑制剂的研究也已成为降血脂药物研制的一个重要方向。

4.2 脂肪分解与合成酶抑制剂

4.2.1 脂肪酶抑制剂

脂肪酶抑制剂筛选已成为降血脂和减肥药物筛选的重要方向。脂肪酶抑制剂筛选过程中酶活测定方法和脂肪酶、底物的选择都非常重要。稳定的脂肪酶活性测定方法是其抑制剂筛选的关键。目前, 脂肪酶活性测定的方法很多, 尚无统一标准。常用的脂肪酶水解底物有 1,2-二月桂基-rac-丙三氧基-3-戊二酸试灵酯、对硝基苯酚棕榈酸酯、三油酸甘油酯、橄榄油, 以及其他油类如苏籽油、亚麻油、鱼油、月见草油等。Umezawa 等^[20]从 *Streptomyces lavendulae* MD4-Cl 的发酵液中纯化得到了一种强效胰酯酶抑制剂 esterastin, 其 IC_{50} 为 0.36 μ mol/L。Weibel 等^[21]从 *Streptomyces toxytricini* 分离到了胰脂酶抑制剂 lipstatin, 其 IC_{50} 为 0.14 μ mol/L, 对其他的胰酶如磷脂酶 A2 和胰蛋白酶活性基本没有影响。罗氏公司又将 Lipstatin 氢化还原衍生为更稳定的 orlistat, 并被 FDA 批准为抗肥胖药。临床研究表明 orlistat 具有显著的降血脂和减肥效果^[22-23], 它们的作用机制为通过与胃、胰脂肪酶活性部位的丝氨酸残基共价结合而使其失活, 抑制甘油三酯水解, 并使单甘酯和游离脂肪酸的摄入减少。Takahashi^[24]申报了脱脂大米胚芽中提取脂肪酶抑制剂的美国专利。

4.2.2 脂肪酸合成酶(FAS)抑制剂

脂肪酸合成酶为维持食物摄入和能量消耗之间合适的平衡点提供了很好的调节靶位。浅蓝菌素(cerulenin)作为第一个脂肪酸合成酶抑制剂, 可以与脂肪酶共价结合形成复合物, 是 FAS 的非竞争性抑制剂。Loftus 等^[25]以浅蓝菌素为模板合成了 C75, 腹腔注射 C75(15mg/kg)对内源性脂肪酸合成酶抑制率达 95%, 丙二酰辅酶 A 浓度增加了 110%。在外周, 它可以增加 CPT-1 活性, 通过加速脂肪酸的氧化来加快能量消耗进程。绿茶中表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)也对 FAS 有抑制作用。

4.3 酰基辅酶 A-胆固醇酰基转移酶(ACAT)抑制剂

酰基辅酶 A-胆固醇酰基转移酶(ACAT)抑制剂可抑制体内小肠、肝脏及动脉的 ACAT, 降低血浆总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇水平, 同时阻止胆固醇酯化,

减少胆固醇在动脉壁的蓄积,防止动脉粥样硬化的形成及发展。ACAT对胆固醇的吸收、VLDL的形成及胆固醇在动脉粥样硬化病变中的蓄积起着关键性作用。从20世纪80年代后期已开始从微生物代谢产物中筛选ACAT抑制剂,其研究主要集中在日本,产生菌有青霉、烟曲霉、粘帚霉、镰孢霉等。微粒体ACAT活性的测定^[26],应用¹⁴C标记的游离胆固醇,以大鼠肝微粒体作为酶的来源。测定油酸转化成它的CoA酯及随后酯化成游离胆固醇过程中两个酶学反应的产物活性。Tomoda等^[27]从*Penicillium purpurenium*的代谢产物中发现ACAT抑制剂。Fukuda等^[28]从苦丁茶中分离到单萜苷类化合物活性较高,IC₅₀为0.269 μmol/L。Nishimura等^[29]分离到三萜类化合物,其ACAT抑制活性很强,IC₅₀为0.044 μmol/L。

4.4 胆固醇代谢调控关键蛋白抑制剂

Cao等^[30]研究组报道了调节胆固醇代谢的新机制,发现新的胆固醇代谢调控关键蛋白——gp78结合蛋白Ufd1,并发现Ufd1蛋白与gp78蛋白的结合增强了gp78的泛素连接酶活性,加速胆固醇合成代谢的关键酶——羟甲基戊二酰辅酶A还原酶的降解,进而增强细胞对低密度脂蛋白的吸收,降低血液胆固醇水平。Altmann等^[31]通过染色体生物信息系统证实了药物的分子学机制,其作用靶点是胆固醇吸收蛋白(Niemann Pick C1 like 1, NPC1L1),其氨基酸结构有42%与Niemann Pick C1型蛋白(NPC1)相同。胆固醇吸收蛋白目前已被证实为胆固醇浓度最主要的调节因子^[32],机制可能是通过细胞核的胆固醇感受器LXR,其在调节细胞内胆固醇、脂肪酸、葡萄糖的动态平衡中发挥了重要作用,主要表达在肝脏、小肠、肾脏、脂肪等器官和组织^[33-34]。Ge等^[35]报道了在肝脏和小肠细胞中,NPC1L1控制胆固醇在细胞表面和细胞内循环转运,并鉴定出这个过程依赖于细胞内的微丝系统和Clathrin/AP2蛋白复合体。他们进一步阐明了新近上市的降胆固醇药物Ezetimibe的作用机制,证明该药物通过抑制NPC1L1蛋白,从而抑制细胞对胆固醇的吸收。这些研究都为寻找更加有效的新型降胆固醇药物提供了靶点和研究基础。另外微粒体甘油三酯(MTP)抑制剂和固醇断裂活化蛋白(SCAP)配体的研究也在进行中。

胆固醇酯转运蛋白(CETP)是胆固醇逆向转运过程中的关键酶之一。在CETP介导下,HDL中的胆固醇酯与LDL和VLDL的TG相互交换,调节血浆HDL水平、组成和颗粒大小,提高血浆HDL-C水平。鉴于CETP缺陷可提高HDL-C水平,研发CETP抑制剂给人们带来了新的希望。

5 结 论

血脂水平与机体脂质合成和代谢的平衡有关。现有

方法可从脂肪/胆固醇的几个不同代谢途径考察药物降脂功效,达到降脂成分初步筛选目的。但所获结果较单一,较难全面反映药物在体内的具体功效。不同筛选途径相互结合、多靶点综合考虑是降血脂功效成分筛选的趋势。同时基于降脂新机制、作用新靶点的筛选方法正在不断的研究和完善。20世纪降脂研究主要集中在脂质代谢调控酶的抑制剂筛选方面,目前降血脂临床药物大多是酶抑制剂类。近年来,核受体调节脂质代谢的研究已成为国内外研究的新热点,核受体能调节大量与脂质代谢相关的靶基因,对胆固醇、脂肪酸、脂蛋白等物质的代谢过程有重要的调节作用。目前已利用分子生物学手段构建了高通量的筛选方法,部分筛选到的核受体激动剂已成为临床药物,并显现出其在治疗脂质代谢紊乱相关疾病的潜在优势和重大意义。

参考文献:

- [1] 张华,张成刚,姜成林. Ascofuranone 增加 HepG2 细胞 LDLR 报告基因表达的生物活性的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(8): 449-469.
- [2] LAUKKANEN J, LEHTOLAINEN P, GOUGH P J, et al. Adenovirus transfer of a secreted for human macrophage scavenger receptor inhibits modified low density lipoprotein degradation and foam cell formation in macrophages[J]. Circulation, 2000, 101(10): 1091-1096.
- [3] CHEN Yaoyu, WANG Xiaohua, BEN Jingjing, et al. The Di-leucine motif contributes to class a scavenger receptor-mediated internalization of acetylated lipo-protein[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(6): 1317-1322.
- [4] LAPSIS N M, KRIKETOS A D, LIM-FRASER M, et al. Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferators-activated receptor γ expression in human skeletal muscle [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(11): 4293-4297.
- [5] BROWN P J, SMITH T A, CHARIFSON P S, et al. Identification of peroxisome proliferator-activated receptor ligands from a biased chemical library[J]. Chemistry and Biology, 1997, 4(12): 909-918.
- [6] BLASCHKE F, TAKATA Y, CAGLAYAN E, et al. A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor[J]. Circulation Research, 2006, 99(12): 88-99.
- [7] 匡双玉, 庾勤慧, 朱炳阳, 等. 姜黄素对血管平滑肌细胞源性荷脂细胞胆固醇代谢及 SREBP- I 表达的影响[J]. 南华大学学报: 医学版, 2006, 34(3): 317-319; 323.
- [8] 于碧莲, 赵水平, 谢湘竹, 等. 烟酸对 3T3-L1 脂肪细胞胆固醇流出的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(4): 289-292.
- [9] 张露, 谢作权, 宋怀光, 等. 银杏叶提取物 GBE50 对培养细胞内胆固醇代谢的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(3): 313-317.
- [10] NAGAOKA S, MIWA K, ETO M, et al. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cell[J]. Journal of Nutrition, 1999, 129(9): 1725-1730.
- [11] NAGAOKA S, AWANO T, NAGATA N, et al. Serum cholesterol reduction and cholesterol absorption inhibition in CaCo-2 cells by a soyprotein peptic hydrolysate[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61(2): 354-356.
- [12] van HEER M, COMPTON D S, DAVIS H R. The cholesterol absorp-

- tion inhibitor, ezetimibe, decreases diet induced hypercholesterolemia in monkeys[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2001, 415(1): 79-84.
- [13] STORY J A, KRITCHEVSKY D. Comparison of the binding of various bile acids and bile salts *in vitro* by several types of fiber[J]. *Journal of Nutrition*, 1976, 106(9): 1292-1294.
- [14] NAGAOKA S, FUTAMURA Y, MIWA K, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 281(1): 11-17.
- [15] ZHONG Fang, ZHANG Xiaomei, MA Jianguo, et al. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein alcalase hydrolysates[J]. *Food Research International*, 2007, 40 (6): 756-762.
- [16] ENDO A. MONACOLIN K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. *The Journal of Antibiotics*, 1980, 33(3): 334-336.
- [17] 胡海峰, 朱宝泉, 龚炳永. 生物活性物质的筛选与新药研究[J]. 国外医药: 抗生素分册, 1998, 19(6): 401-406.
- [18] 于刚, 曹晓钢, 叶小利, 等. 高效液相色谱法测定 3- 羟基 -3- 甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶抑制剂的活性[J]. *分析化学*, 2009, 37(1): 87-90.
- [19] TSUKASA I, HIROTOSHI K, HIROSHI M, et al. Synthesis and biological evaluation of quinuclidine derivatives incorporating phenothiazine moieties as squalene synthase inhibitors[J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 52(10): 1204-1209.
- [20] UMEZAWA H, AOYAGI T, HAZATO T, et al. Esterastin, an inhibitor of esterase, produced by actinomycetes[J]. *Journal of Antibiotics(Tokyo)*, 1978, 31(6): 639-641.
- [21] WEIBEL E K, HADVARY P, HOCHUL E, et al. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase produced by *Streptomyces toxytricini*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1987, 40(8): 1081-1085.
- [22] CLAPHAM C J, ARCH J R, TADAYYON M. Anti-obesity drugs: a critical review of current therapies and future oportunities[J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 89(1): 81-121.
- [23] ARONNE L J. Modern medical management of obesity: the role of pharmaceutical intervention[J]. *J Am Diet Assoc*, 1998, 98(10): 23-26.
- [24] TAKAHASHI H. Lipase inhibitor derived from a defatted rice germ: US, 5503831[P]. 1994-05-25.
- [25] LOFTUS T M, JAWORSKY D E, FREHYWOT G L, et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors[J]. *Science*, 2000, 288(5475): 2379-2381.
- [26] 唐勇, 杨大军, 姚天爵. 微生物来源的胆固醇酰基转移酶抑制剂研究 I. 菌株分类、发酵、分离和生物学特性[J]. *中国抗生素杂志*, 2000, 25(3): 161-163.
- [27] TOMODA H, NISHIDA H, MASUMA R, et al. Purpactins, new inhibitors of Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase produced by *pencillium purpurogenum* I. Production, isolation, and physico-chemical and biological properties[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1991, 44(2): 136-143.
- [28] FUKUDA T, KITADA Y, CHEN X M, et al. Two new monoterpene glycoside from Kudingcha inhibitors of ACAT[J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1996, 44(11): 2173-2176.
- [29] NISHIMURA K, FUKUDA T, MIYASE T, et al. Activity-guided isolation of triterpenoid ACAT inhibitors from *Ilex kudingcha*[J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(7): 1061-1064.
- [30] CAO Jian, WANG Jiang, QI Wei, et al. Ufd1 is a cofactor of gp78 and plays a key role in cholesterol metabolism by regulating the stability of HMG-CoA reductase[J]. *Cell Metabolism*, 2007, 6(2): 115-128.
- [31] ALTMANN S W, DAVIS H R, ZHU L J, et al. Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption[J]. *Science*, 2004, 303(5661): 1201-1204.
- [32] REPA J J, BUHMAN K K, FARESE R V, et al. ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterol-fed mouse: impact on cholesterol homeostasis[J]. *Hepatology*, 2004, 40(5): 1088-1097.
- [33] REPA J J, MANGELSDORF D J. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis[J]. *Nature Medicine*, 2002, 8 (11): 1243-1248.
- [34] DUVAL C, TOUCHE V, TAILLEUX A, et al. NPC1L1 gene expression is down regulated by LXR activators in the intestine[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(4): 1259-1263.
- [35] GE Liang, WANG Jing, QI Wei, et al. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1[J]. *Cell Metabolism*, 2008, 7(6): 508-519.