



胆固醇修饰的研究进展

刘强强, 宋保亮*

武汉大学生命科学学院, 武汉 430072

*通讯作者, E-mail: blsong@whu.edu.cn

收稿日期: 2024-09-24; 接受日期: 2024-12-13; 网络版发表日期: 2025-01-20

国家自然科学基金重大研究计划集成项目(编号: 92253301)和中国博士后科学基金(编号: 2023M742704)资助项目

摘要 胆固醇作为生物体内含量最丰富的甾醇类分子, 不仅在维持细胞膜的流动性和完整性以及参与多种信号转导过程中发挥着关键作用, 还是合成胆汁酸和固醇类激素等重要生物活性物质的前体. 胆固醇分子在体内可以发生多种化学反应, 以 3β 羟基为官能团的酯化、硫酸化和亲核取代等反应是胆固醇分子参与体内生理活动的重要方面. 此外, 胆固醇分子除了能够与脂肪酸共价结合形成胆固醇酯外, 还能通过共价连接的方式对蛋白质进行修饰, 这一过程需要经过一系列复杂的生化反应, 并在调控底物蛋白的正常功能中发挥重要作用. 目前, 已被发现的胆固醇修饰蛋白还比较少, 随着胆固醇修饰技术研究的不断进步, 该领域有望实现新的突破. 靶向并抑制Smoothed (Smo)蛋白胆固醇修饰的小分子化合物, 能有效杀伤肿瘤细胞, 同时具有克服耐药性和联合用药可提高疗效的优势. 胆固醇还被用于修饰小分子、多肽和核酸药物, 以增加药物分子的生物亲合度并改善药物稳定性, 展现出更好的治疗效果. 本文主要对胆固醇分子在体内发生的化学反应、蛋白质胆固醇修饰的研究进展及研究方法进行综述, 并探讨了胆固醇修饰在生物医药领域的应用, 旨在为胆固醇修饰领域的研究和发展提供参考.

关键词 胆固醇修饰, 亲核取代, 共价连接, 化学探针, 多肽药物

1 引言

胆固醇(cholesterol)是细胞膜中的关键组成, 能与邻近脂类分子作用以调节膜的刚性、流动性和渗透性, 与跨膜蛋白结合维持或改变后者的构象, 对维持细胞膜的结构完整性和功能至关重要^[1,2]. 胆固醇在不同的细胞器和亚细胞结构膜中的分布是高度异质的, 在内质网和线粒体膜中胆固醇的含量通常较低, 而质膜中含量较高, 这种异质性分布对于细胞正常功能和对环境变化的响应非常关键^[3,4]. 除此之外, 胆固醇也是胆汁酸和甾醇类激素的必备合成前体, 在代谢和内分

泌过程中发挥功能. 胆固醇代谢是人体维持生命活动的重要过程, 涉及胆固醇的外源吸收、内源合成、酯化和外排等多个环节, 受到多种机制的严格调控^[5]. 人体内的胆固醇主要来源于内源性合成, 外源性摄入胆固醇所占比例较小. 食物中的胆固醇通过肠道上皮细胞的Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)介导内吞, 参与体内代谢, 长期不均衡饮食可导致高胆固醇血症, 严重危害人类健康^[6]. 胆固醇的生物合成主要在肝脏中进行, 是以乙酰辅酶A为从头合成底物, 涉及约30步酶促反应的复杂过程. 胆固醇合成相关的酶大多数定位在内质网中, 其中3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原

引用格式: Liu Q, Song B. Research progress of cholesterol modification. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 808–824, doi: 10.1360/SSC-2024-0224

酶(HMGCR)和鲨烯单加氧酶(SM)是胆固醇内源合成途径的限速酶,前者也是降胆固醇药物他汀的靶点^[7].肝脏将内源合成和外源摄入的胆固醇以脂蛋白的形式分泌到血液中,并转化为低密度脂蛋白(LDLs),进而在外周组织细胞表面的低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)介导下进入不同细胞,释放的游离胆固醇被细胞利用^[8].细胞中胆固醇还可被酰基辅酶A胆固醇酰基转移酶(acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase, ACATs,也称为甾醇O-酰基转移酶(sterol O-acyltransferase, SOATs))催化成胆固醇酯,储存在脂滴中或通过ATP-binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1)或ATP-binding cassette subfamily G member 1 (ABCG1)外排至血液,形成高密度脂蛋白(HDLs)被运回肝脏或肠道,在肝、肠细胞的ATP-binding cassette subfamily G member 5/8 (ABCG5/ABCG8)的作用下胆固醇最终被排出体外或循环利用^[9,10].胆固醇代谢平衡对细胞和机体生命活动至关重要,代谢失衡可导致心脑血管等多种疾病发生.

胆固醇具有亲水性的羟基和疏水性的尾部,其自身可以与体内多种物质发生反应.胆固醇头部的3 β 羟基参与的酯化反应在脂质平衡和能量储存过程中十分重要.胆固醇与脂肪酸在相应催化酶的作用下结合形成胆固醇酯的过程被称为胆固醇的酯化^[11],反之亦可被称为脂肪酸的胆固醇化.除此之外,蛋白质的氨基酸链也可以和胆固醇发生化学反应,形成共价结合物,这一过程被称为蛋白质的胆固醇化修饰.目前已发现的可以发生胆固醇修饰的蛋白只有Hedgehog (Hh)和Smoothed (Smo)^[12,13].蛋白质的胆固醇化修饰对于其功能发挥至关重要^[14],但详细机制并不非常清楚.根据体内胆固醇修饰蛋白质或脂质的反应过程制备的胆固醇修饰多肽药物和胆固醇脂质药物递送系统,已表现出更好的生物亲和性和更好的治疗效果^[15].此外,通过合成靶向体内蛋白胆固醇化修饰的甾醇类似物,在动物实验中已表现出显著的肿瘤抑制效果,具有克服耐药性和与传统药物联用可提高疗效的优势,有望用于肿瘤治疗^[16].蛋白质的胆固醇化修饰是一个古老而充满挑战的领域,由于技术方法的限制,该领域迟迟得不到突破性的进展.瓶颈的突破需要新的研究方法和系统的建立,传统和新兴检测手段的结合是有效的研究方式.此外该领域还存在诸多悬而未决的关键

问题,例如,是否存在更多的胆固醇修饰蛋白,是否有蛋白质的胆固醇修饰催化酶存在,是否有(类似于磷酸化和泛素化)胆固醇修饰的宏观调控过程等等,以上诸多科学问题都需要更多的研究揭示.

本文系统整理了胆固醇分子在体内可以发生的化学反应、蛋白质的胆固醇化修饰、胆固醇化修饰的研究方法和胆固醇化修饰在生物医药领域的应用等,旨在为胆固醇修饰领域的发展提供参考.

2 胆固醇分子在体内发生的生物化学反应

胆固醇是哺乳动物体内含量最丰富的甾醇类分子,也是胆汁酸和甾醇类激素的必备合成前体.胆固醇具有亲水性的头部(3 β 羟基)、刚性的四元环躯干和疏水性的尾巴,自身具有多种功能性官能团,能够发生多种生化反应,参与多种生理活动(图1).

2.1 胆固醇的酯化

为了在体内有效地储存和运输,在相应催化酶的作用下胆固醇可以与长链脂肪酸结合形成胆固醇酯(cholesteryl ester, CE),这一过程称为胆固醇的酯化反应^[11].胆固醇酯的形成和代谢在脂质平衡、能量储存和相关疾病中起着重要作用.

在细胞内胆固醇主要通过ACATs催化生成胆固醇酯.在哺乳动物中,存在编码两个不同ACAT蛋白质的基因: *Acat 1*和*Acat 2*.其中,ACAT1是内质网常驻酶在所有组织中均普遍表达,ACAT2主要在肠道和肝细胞中表达^[11].ACAT可以催化多种甾醇的酯化,并且它们的催化活性会受到多种甾醇的调控,其中胆固醇是ACAT催化酶的最佳底物和最有效的激活剂^[17].在正常或过量胆固醇条件下,ACAT的活性被激活,通过改变其活性位点构型促进胆固醇的3 β -羟基成为亲核受体,进而攻击酰基辅酶A硫酯键的羰基碳,导致硫酯键断裂并释放辅酶A,从而使酰基从酰基辅酶A转移到胆固醇的羟基上,形成胆固醇酯^[18].这一酯化反应在胆固醇的储存转运和脂滴的整合中发挥作用,对胆固醇代谢平衡至关重要.ACAT作为细胞内合成胆固醇酯的关键酶,其功能活性的变化对机体的正常生理活动影响较大.Farese Jr.等^[19]通过构建*Acat 1*基因敲除小鼠,发现缺乏ACAT1会导致小鼠胚胎成纤维细胞和肾上腺中的胆固醇酯化减少,伴随白细胞增多和骨髓细

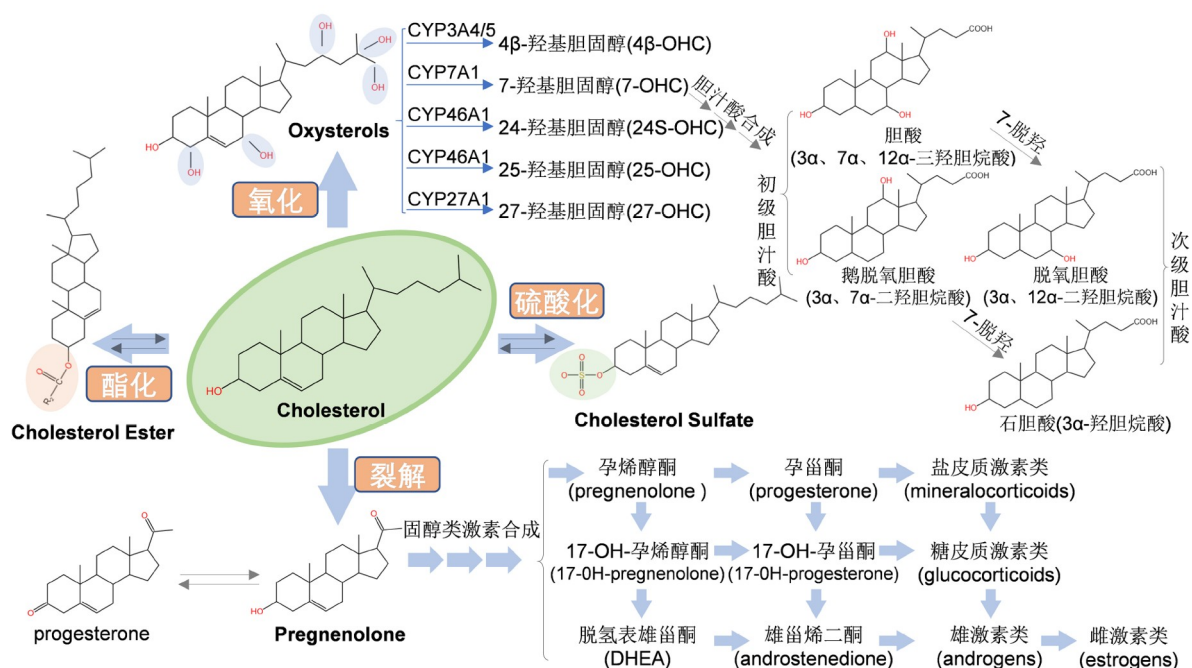


图1 (网络版彩图)胆固醇分子在体内发生的生化反应

Figure 1 (Color online) Biochemical reactions of cholesterol molecules occurring *in vivo*.

胞增殖。ACAT1在动脉粥样硬化的泡沫细胞形成和斑块发展中扮演重要角色, 尽管其确切作用存在争议, 但动物实验表明ACAT与动脉粥样硬化及神经退行性疾病的发生发展密切相关^[20]。此外, 阻断ACAT1的功能可以改善阿尔茨海默病症状, 并抑制胰腺癌和前列腺癌肿瘤生长^[21]。抑制ACAT1的催化酶活性可以增减CD8阳性T细胞质膜胆固醇含量, 促进T细胞受体聚集和免疫突触形成, 从而增强这些细胞的抗肿瘤活性^[22]。

在血浆中, 胆固醇通过卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT)催化生成胆固醇酯。LCAT由肝脏合成并分泌到血液中, 其催化机制与ACAT相似, 都是通过胆固醇的3β-羟基与酰基链上的酯键反应, 成新的酯键, 从而生成胆固醇酯^[23]。然而, LCAT和ACAT在酰基链来源上有所不同: LCAT利用磷脂酰胆碱作为酰基链来源, 而ACAT则使用酰基辅酶A (图2)。LCAT主要作用于高密度脂蛋白, 促进胆固醇从外周组织逆向转运至肝脏, 这是HDL颗粒形成和胆固醇逆向运输的关键过程^[24]。LCAT酶功能异常会引发胆固醇代谢相关疾病。LCAT基因发生突变导致的LCAT酶活性丧失或功能异常, 会引发遗传性LCAT缺乏症。这种病症会严重阻碍HDL颗粒的形成

和胆固醇的逆向运输, 影响脂蛋白代谢和胆固醇稳态, 引发角膜混浊、溶血性贫血、蛋白尿、肾脏疾病和高脂血症等临床症状^[25,26]。针对遗传性LCAT缺乏症尚无有效根治方法, 目前只能通过使用降脂药物来控制血脂水平进行症状管理和预防并发症的发生。

2.2 胆固醇的氧化

体内胆固醇的氧化是一个重要的生化过程, 会产生氧化甾醇(oxysterols), 这些物质在胆固醇稳态、信号传导和代谢中发挥多种作用。胆固醇氧化反应由特定的酶催化, 主要是属于细胞色素P450家族的酶^[27]。

肝脏是胆固醇代谢的中心器官, 胆固醇在肝脏中可以通过细胞色素P450 (CYP450)酶系进行氧化, 生成多种氧化产物, 包括胆汁酸和氧化甾醇。胆固醇的氧化可以发生在甾环或侧链的不同位置, 7-羟基胆固醇(7-OHC)、24-羟基胆固醇(24S-OHC)、25-羟基胆固醇(25-OHC)和27-羟基胆固醇(27-OHC)等^[28]。7-羟基胆固醇是胆汁酸合成的关键中间体, 由胆固醇7α-羟化酶(CYP7A1)催化胆固醇在7α位置的羟化反应生成。这一步骤是经典胆汁酸合成途径中的起始和限速步骤, 7-羟基胆固醇经过一系列酶促反应, 最终转化为初级

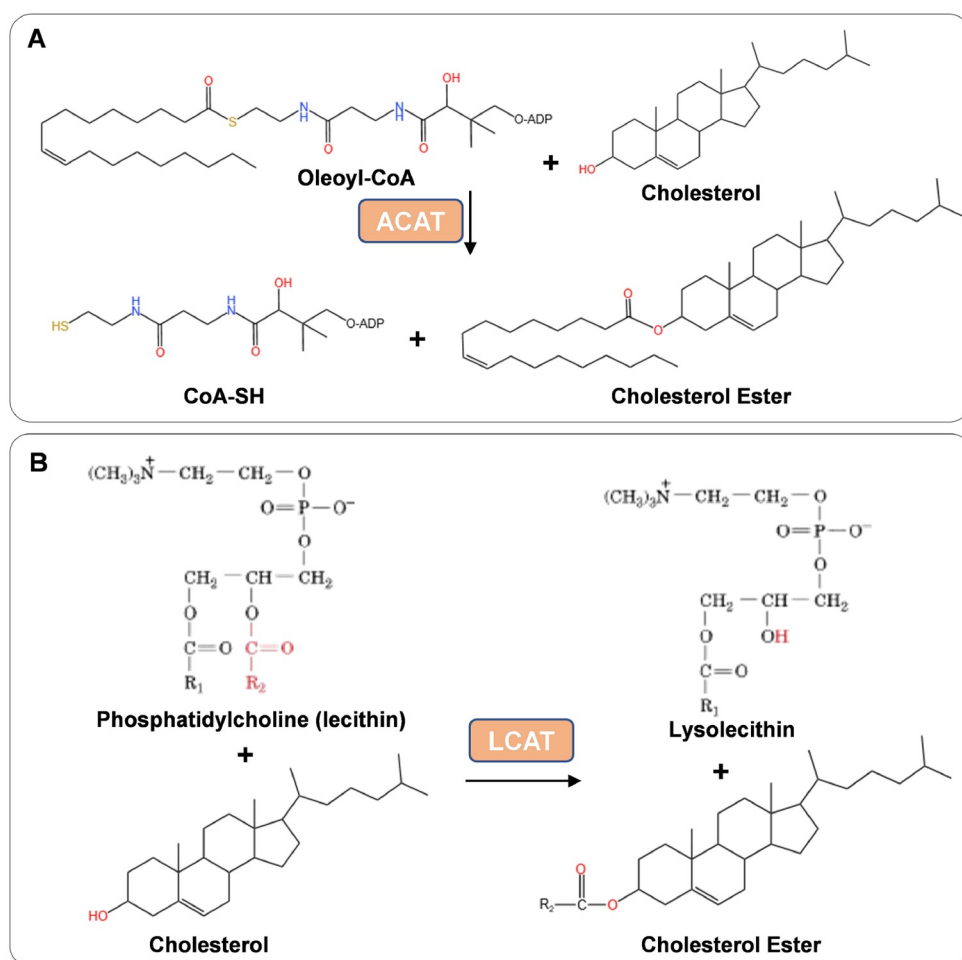


图 2 (网络版彩图) ACAT (A)和LCAT (B)催化胆固醇酯化反应

Figure 2 (Color online) ACAT (A) and LCAT (B) catalyze cholesterol esterification reactions.

胆汁酸, 如胆酸(CDCA)和鹅去氧胆酸(CDCA) [29]. 24-羟基胆固醇主要由Cytochrome P450 46A1 (CYP46A1) 催化在胆固醇的24号碳上形成羟基生成. 24S-OHC主要在大脑中形成, 通过将胆固醇转化为更易溶于水的形式, 帮助多余的胆固醇从中枢神经系统中移除, 有助于脑胆固醇稳态的维持 [30]. 25-羟基胆固醇由同一酶 (CYP46A1) 催化生成, 参与免疫调节和胆固醇生物合成的负反馈调节 [31]. 25-OHC可以抑制病毒的复制和调节免疫细胞的活性, 还可以与胰岛素诱导基因(IN-SIG)蛋白结合, 促进HMG-CoA还原酶降解, 来负反馈调节胆固醇的生物合成, 防止胆固醇的过量生产 [32]. 27-羟基胆固醇由CYP27A1催化生成, 具有跨膜穿透性, 通过促进胆固醇从外周组织向肝脏的运输, 参与胆固醇的稳态调节. 此外, 27-OHC还参与雌激素受体

信号传导, 影响细胞生长和分化, 并作为胆汁酸合成的中间体, 通过进一步氧化和侧链裂解产生鹅去氧胆酸, 为胆汁酸合成提供替代途径 [33]. 24S-羟基胆固醇和27-羟基胆固醇还能激活核受体LXR, 促进胆固醇稳态. 此外, 胆固醇还可通过非酶促氧化反应生成氧化固醇, 如7-酮胆固醇和5,6-环氧胆固醇, 参与炎症反应和细胞损伤 [29]. 肝脏中的胆固醇氧化过程复杂, 涉及多种酶和氧化产物, 对维持胆固醇稳态和人体健康具有重要作用.

人体内胆汁酸的生成途径是一个复杂的调控过程, 主要通过经典的胆汁酸合成途径实现. 在肝脏中, 胆固醇首先被CYP7A1转化为7-羟基胆固醇, 这是胆汁酸合成的限速步骤. 随后, 经过一系列酶促反应, 包括羟化、氧化、还原和异构化, 生成初级胆汁酸, 包括胆

酸和鹅去氧胆酸^[34]。这些初级胆汁酸可进一步与甘氨酸或牛磺酸结合, 形成可溶性的结合型胆汁酸, 如甘氨酸胆酸(GCDCA)和牛磺胆酸(TCDA)^[35]。结合型胆汁酸被分泌到胆汁中, 参与脂肪的消化和吸收, 并通过肠肝循环在小肠中被重吸收, 部分胆汁酸在肠道细菌作用下转化为次级胆汁酸, 未被重吸收的胆汁酸随粪便排出体外。此外, 胆固醇还可以通过24-羟化途径和27-羟化途径直接生成次级胆汁酸, 作为旁路途径参与胆汁酸的合成^[34]。胆汁酸不仅在消化中发挥作用, 还参与胆固醇和脂质代谢的调节以及多种细胞内信号传导途径。整个胆汁酸生成和代谢过程受到严格的调控, 以维持人体的代谢健康和内环境稳定。

2.3 胆固醇的硫酸化

胆固醇的硫酸化是指胆固醇分子通过硫酸化作用添加一个硫酸基团形成胆固醇硫酸酯(cholesterol sulfate, CS)的过程^[36]。硫酸胆固醇主要在肝脏和其他特定组织中生成, 并在信号传导、膜流动性调节和皮肤屏障功能调节等多种生理过程中发挥重要作用。

胆固醇的硫酸化反应主要由胆固醇硫酸转移酶(SULT2B1b)催化, 该酶属于硫酸转移酶家族。胆固醇硫酸化反应过程中, 3'-磷酸-5'-磷酸腺苷硫酸(PAPS)作为硫酸基团的供体, 通过SULT2B1b的催化作用, 将硫酸基团转移到胆固醇分子的3 β -羟基上, 形成硫酸酯结构, 生成硫酸胆固醇和3'-磷酸-5'-磷酸腺苷(PAP)^[37]。这是一种亲核取代反应, 胆固醇的羟基被硫酸基取代, 从而产生极性和溶解性更高的硫酸胆固醇, 使其更易于在体内转运和分泌。此外, 硫酸胆固醇可以通过硫酸脱磺酶(sulfatases)的作用水解, 去除硫酸基团, 恢复胆固醇的原始结构, 使其能够重新参与到胆固醇的代谢途径中^[38,39]。胆固醇的硫酸化和随后的脱磺过程在调节胆固醇的稳态和功能中发挥着重要作用。

硫酸胆固醇具有重要的生理功能。作为细胞膜的关键成分, 硫酸胆固醇对保持细胞膜的完整性和功能至关重要, 特别是在皮肤中, 它在角质层的形成和维护中发挥着关键作用, 有助于构建和维护皮肤屏障^[40]。在细胞信号转导方面, 硫酸胆固醇参与调控细胞内的信号传递和基因表达, 对细胞的生理活动产生影响。它还作为固醇类激素合成的前体, 在内分泌系统的平衡和功能中起着至关重要的作用。此外, 硫酸胆固醇在免疫系统中发挥作用, 影响免疫细胞的活动和功能,

参与免疫调节和炎症反应的控制, 对维持机体的免疫平衡和健康状态具有重要意义^[41]。

2.4 胆固醇的裂解

胆固醇侧链的断裂反应是生物体内关键的代谢途径, 主要在肝脏中由胆固醇侧链裂解酶(P450_{sc}或CYP11A1)催化进行^[42]。通过一个3步、6电子氧化反应过程, 导致胆固醇分子在20~22之间的C-C键断裂, 去除侧链的6个碳原子, 生成重要的生物中间体孕烯醇酮(pregnenolone)^[43]。这个转化过程是哺乳动物合成所有固醇类激素的第一步, 也是整个合成途径的限速步骤, 意味着它控制着整个固醇类激素合成的速率。孕烯醇酮作为固醇类激素合成的初始前体分子, 在不同组织中通过特定的酶促反应转化成肾上腺皮质激素、性激素等不同类型的固醇类激素, 在调节代谢、免疫、生殖等生理功能中发挥重要作用。胆固醇侧链断裂反应是固醇类激素合成的第一步, 因此它在生物体的内分泌系统中起着核心作用^[44]。任何影响这一反应的因素, 如酶活性的变化或底物胆固醇的可用性, 都可能对整个固醇类激素的合成和生物体的健康状态产生深远的影响^[42]。

胆固醇合成是一个复杂的生物化学过程, 主要由近30步酶促反应组成, 将乙酰辅酶A转化为含有环戊烷多氢菲结构的胆固醇分子。由于缺乏相应的酶和代谢途径, 人体无法将胆固醇完全氧化分解为二氧化碳和水重新利用, 因此胆固醇及其衍生物主要通过外排过程排出体外。胆固醇外排是维持体内胆固醇平衡的关键步骤, 主要通过胆汁中以胆汁酸和游离胆固醇的形式分泌到肠道中, 随粪便排出体外。固醇类激素在完成其生物作用后, 被转运到肝脏进行代谢。代谢过程通常包括羟化、硫酸化、葡萄糖醛酸化等反应, 将激素转化为更具水溶性的衍生物。这些代谢产物可通过尿液排出体外, 或随胆汁进入肠道并排出体外。体内胆固醇及其衍生物的异常堆积会危害机体健康, 促进胆固醇及其衍生物的外排是治疗高胆固醇血症等相关疾病的有效手段。

3 蛋白质的胆固醇修饰

胆固醇的3 β 羟基不仅可以和脂肪酸链发生亲核取代形成胆固醇酯, 还可以和蛋白质的氨基酸链发生酯

化反应,使得胆固醇和蛋白质之间形成共价键,从而在蛋白质上发生胆固醇修饰^[12].这种修饰方式在调控信号传导、蛋白质定位和代谢调控中起重要作用.目前已报道的可以发生胆固醇修饰的蛋白是Hedgehog信号通路中的Hh和Smo(图3)^[13].

Hedgehog信号通路是调控动物胚胎发育和成体组织再生的关键信号传导系统,涉及多种细胞过程,包括细胞增殖、分化和组织形态发生.该通路以分泌型信号蛋白Sonic Hedgehog (Shh)、Indian Hedgehog (Ihh)和Desert Hedgehog (Dhh)为中心,在内质网中经历自催化裂解和胆固醇化修饰,然后被分泌到细胞外发挥功能^[45].Hh蛋白与Patched (Ptc)受体结合,解除了Ptc对Smo的抑制,激活下游信号.激活的Smo进一步促进Gli转录因子的激活,这些转录因子调控一系列靶基因的表达,影响细胞命运和组织发展.Hh信号通路受到包括负反馈机制和其他调节因子的作用在内的精细调控,以确保适度的信号激活.异常的Hh信号激活与发育缺陷和多种癌症的发生有关,使其成为药物开发

的重要靶点^[14].

3.1 Hedgehog蛋白的胆固醇修饰

Hedgehog蛋白最初合成一条前体蛋白(Hh precursor),其包含一个N端信号肽、一个氨基末端信号结构域(Hh-N)和一个羧基末端结构域(Hh-C),其中,Hh-C片段具有自催化和胆固醇转移的功能^[46].Hh的胆固醇修饰反应通过两个连续的亲核取代进行.首先,Hh-N与Hh-C断裂界面半胱氨酸侧链的巯基亲核攻击相邻主链肽键的羰基碳,并进行重排形成硫酯键,取代Gly-Cys之间的主链肽键.然后,由第二个亲核试剂攻击相同的羰基碳,取代硫酯键,形成新的酯键并切断Hh-N和Hh-C之间的连接.在体外,亲核性质的小分子或者高浓度的含硫醇分子可以作为亲核试剂,与Hh-N形成共价加合物.在体内,胆固醇分子中的3 β -羟基基团作为亲核体,对酰基硫酯中间体进行亲核攻击,导致硫酯键断裂,形成一个新的酯键,将胆固醇共价连接到Hh-N片段的C端^[14].Hh-C从内质网转位并最终被蛋白

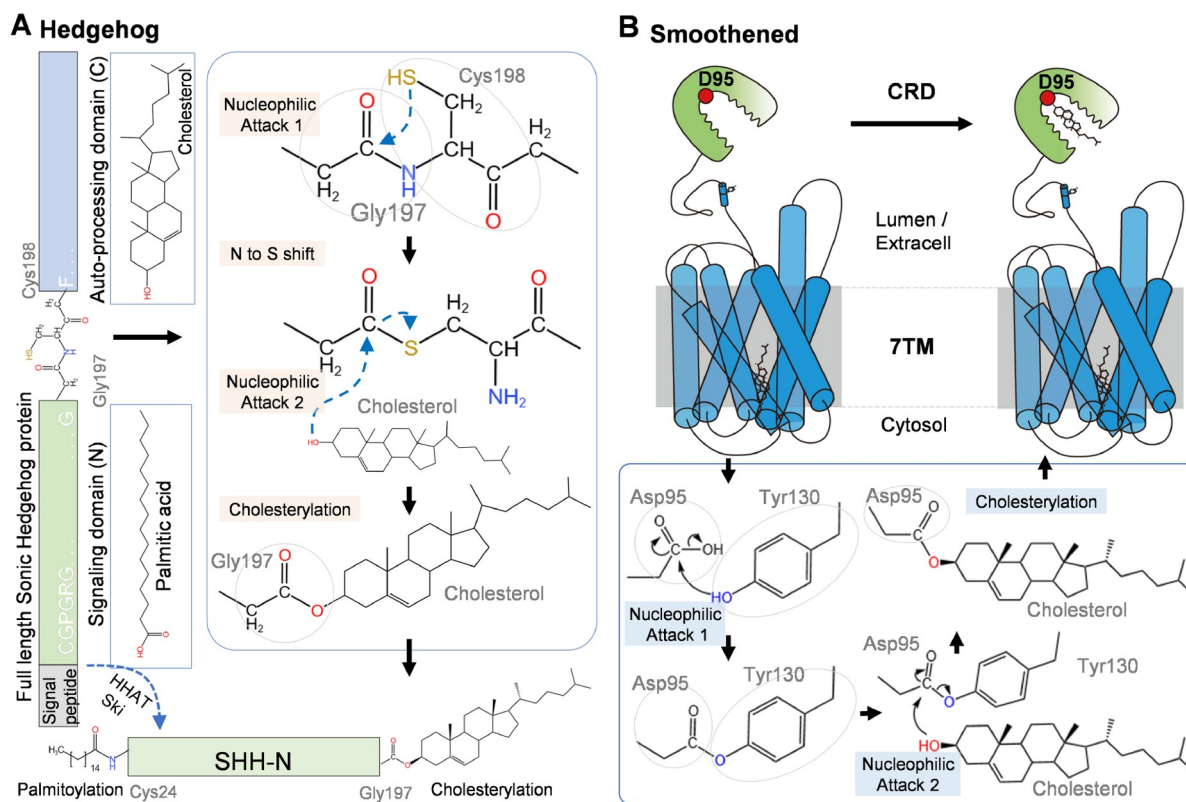


图3 (网络版彩图) Hedgehog (A)和Smoothened (B)蛋白发生自催化胆固醇修饰过程

Figure 3 (Color online) Self-catalyzed cholesterol modification processes of Hedgehog (A) and Smoothened (B) proteins.

酶体降解。此外,在酰基转移酶的催化下,棕榈酸基团被连接到Hh-N的氨基末端的Cys残基上形成棕榈酸修饰,从而产生双脂质修饰的成熟蛋白^[47]。双脂质修饰的Hh-N以单体的形式与细胞膜脂质双分子层结合,直至被分泌发挥功能。

胆固醇化修饰和棕榈酰化修饰的双脂质修饰可以增加Hedgehog蛋白的疏水性,促进其有效地嵌入细胞膜,调节其扩散和局部浓度。并能增强Hedgehog蛋白与其受体Patched的结合能力,从而实现精确的信号传导功能,启动下游信号传导^[48]。

3.2 Smoothened蛋白的胆固醇修饰

自从Hh被鉴定为第一个可以发生胆固醇修饰的蛋白开始,科学家们努力寻找更多潜在的胆固醇修饰底物。由于相对于经典的翻译后修饰,胆固醇修饰作为一种特殊的修饰缺乏有效的检测手段和鉴定方法,导致近二十年时间该领域毫无进展,致使很多人认为Hh可能是唯一的胆固醇修饰蛋白。宋保亮课题组^[13]通过设计并合成尾部融合叠氮基团的胆固醇探针,用此探针与细胞共孵育代替内源性胆固醇,然后通过点击化学反应的方法实现在体外对胆固醇及其复合物的富集和检测。利用此系统,并经过后续系统性筛选和生化实验验证,发现Smo蛋白存在胆固醇共价修饰,颠覆了长久以来认为Hedgehog是唯一被胆固醇修饰蛋白的认识。

Smoothened蛋白是一个具有七个跨膜螺旋的G蛋白偶联受体样蛋白,有三个主要结构域,包含位于细胞外或管腔区域富含半胱氨酸结构域(cysteine-rich domain, CRD)的N端、七次跨膜区域(7TM)和位于胞质的C端尾部^[49]。N端的CRD结构域会形成一个可以结合甾醇或胆固醇凹槽,该区域特异氨基酸突变导致其不能结合胆固醇会抑制Smo对Hh信号的响应。Smo通过响应Patched受体的信号,调节其自身的构象和活性,从而控制Hh信号的传递。Smo蛋白是Hh信号通路的关键转导蛋白,负责将Hh信号从细胞膜传递至胞内,激活下游基因表达^[50]。Smo的活性和功能受胆固醇共价修饰的精细调控。Smo受胆固醇调控的发现过程曲折而复杂,最初Corcoran和Rohatgi等人^[51]检测到侧链甾醇足以激活培养细胞中的Hh信号传导并诱导初级纤毛中Smo的积累和活化,并证实甾醇可以直接结合并激活Smo,但是动物实验显示氧化甾醇的缺失

并不能有效地抑制Hh信号通路的活性。随后研究人员利用结构生物学、遗传学和CRISPR系统筛选等手段证明了胆固醇可以直接结合并激活Smo^[52-54]。晶体结构显示胆固醇可以特异地与Smo蛋白富含半胱氨酸结构域(CRD)的疏水沟结合,细胞和动物实验显示这种结合是Smo蛋白活性和Hh信号转导所必需的。Smo-CRD区域关键氨基酸位点突变和跨膜结构域抑制剂Vismodegib引发的Smo构象变化,会导致CRD丧失胆固醇结合能力,显著降低Hh信号通路活性^[49]。

结构生物学证据显示,Smo蛋白N端CRD区域通过折叠形成一个疏水的空腔区域,该区域可以通过氢键和各种弱相互作用力容纳一个胆固醇分子稳定存在^[52]。Xiao等人^[13]利用叠氮标记的胆固醇探针进行深入研究发现,Smo蛋白不仅可以和胆固醇相互结合,其侧链氨基酸基团还可以和胆固醇3 β 羟基发生化学反应形成共价键,从而使得Smo蛋白发生胆固醇共价修饰。分子机制研究发现,通过三维折叠Smo-CRD的第95位天冬氨酸的侧链羧基与第130位的酪氨酸侧链酚羟基接近,并处于疏水口袋底部。Y130的酚羟基会亲核攻击D95羧基的羰基碳原子,从而形成不稳定的高能反应中间体: D95-Y130分子内酯键。在胆固醇存在的情况下,胆固醇的3 β 羟基作为亲核试剂会进一步攻击D95-Y130分子内酯键,从而取代Y130的酚羟基,与D95侧链羧基形成稳定的酯键,最终共价链接到Smo蛋白上形成胆固醇修饰^[55]。D95与胆固醇之间的酯键能为-96.5 kcal/mol,比D95和Y130之间的分子内酯键能(-92.2 kcal/mol)低4.3 kcal/mol,因此,D95-胆固醇酯对D95-Y130酯键的交换反应在能量上是有利且趋于稳定的。Smo蛋白的D95-Y130分子内酯键这一高能中间体的形成类似于Hh-C端自催化产生的硫酯中间体,并最终被胆固醇亲核取代。Smo蛋白的第95位天冬氨酸是胆固醇的修饰位点,该位点对Smo蛋白功能和Hh信号通路活性调控至关重要,其突变会致使Smo蛋白不能发生胆固醇修饰,从而导致小鼠胚胎致死。Smo蛋白的第130位酪氨酸对于其胆固醇修饰十分重要,该位点突变为组氨酸、丝氨酸或苏氨酸等氨基酸后均可影响Smo蛋白胆固醇修饰的发生^[55]。

Smo蛋白的胆固醇修饰是其发挥功能所必需的,其胆固醇修饰水平受多种因素调控。钙离子(Ca²⁺)通过促进D95-Y130分子内酯键向D95-胆固醇酯键的交换反应,促进Smo胆固醇化修饰^[56]。Hh可以通过调控胞

内体中的 Ca^{2+} 浓度,从而调控Smo胆固醇化修饰.另一方面,Hh还可以通过促进甾醇转运蛋白ASTER介导的胆固醇从质膜向内质网转运,从而促进Smo的胆固醇修饰和成熟以及进一步转位出内质网.与之相反的是,PTCH1通过抑制ASTER介导的胆固醇转运来降低内质网中的胆固醇浓度,抑制Smo蛋白的胆固醇修饰和进一步成熟转位^[57].此外,定位于内质网上的emopamil结合蛋白(emopamil binding protein, EBP),可以通过其胞质尾部直接结合Smo,将Smo捕获在内质网中,负向调节Smo胆固醇化和活性,阻断Smo从ER中出芽转运^[58].Smo胆固醇修饰位点纯和突变(*Smo*^{D99N/D99N})小鼠与Smo纯和缺失(*Smo*^{-/-})小鼠类似,会引发严重的发育缺陷导致胚胎致死.只影响Smo的胆固醇共价修饰而不影响其和胆固醇相互结合的转基因小鼠(*Smo*^{D99E/D99E})表现出与*Smo*^{D99N/D99N}或*Smo*^{-/-}小鼠高度相似的表型,Smo蛋白功能完全丧失导致胚胎致死,证明Smo的胆固醇修饰对于其蛋白功能和机体正常发育十分必要^[55].

3.3 抑制SMO蛋白的胆固醇修饰可用来治疗肿瘤

Hh信号通路的异常激活与多种疾病有关,包括髓母细胞瘤和基底细胞癌.临床上可用的Hh通路抑制剂大多针对Smo的七次跨膜区域(Smo-7TM),获得性耐药性是Smo抑制治疗的紧迫问题.Xiao^[13]和Hu等人^[55]发现Smo-CRD的胆固醇化修饰是Hh信号传导所必需的,因此,可以阻断Smo胆固醇修饰的小分子化合物,有望成为潜在的治疗Hh信号通路异常激活相关疾病的新药物.Liu等人^[16]筛选并鉴定了一种甾醇类似物Q29,其可以通过与Smo的CRD结合阻断Smo的胆固醇化来抑制Hh通路.细胞实验显示,Q29可以抑制Hh信号传导依赖性细胞增殖并阻止Hh依赖性髓母细胞瘤的生长.并且,Q29与临床用于治疗基底细胞癌(BCC)的Smo-7TM抑制剂维莫德吉(vismodegib)联合使用时,对髓母细胞瘤表现出叠加的抑制作用.甾醇类似物Q29通过阻碍Smo蛋白的胆固醇化修饰发挥作用,克服了Smo突变体对Smo-7TM抑制剂的耐药性,并抑制了Smo致癌变异体的活性^[16].由此可见,靶向蛋白质的胆固醇化修饰可能是治疗相关信号通路异常所引发癌症的一种新方法,因此,更多潜在胆固醇修饰蛋白底物的筛选及其分子机制的阐述,有望为相关信号通路疾病的治疗带来新方向和新疗法.

3.4 蛋白质胆固醇修饰催化酶以及其他潜在的胆固醇修饰蛋白

目前已经发现的胆固醇修饰蛋白只有Hedgehog信号通路里的两个关键蛋白—Hedgehog和Smoothened蛋白.Hh和Smo蛋白发生胆固醇修饰过程都涉及到两步亲核攻击,其诱发和稳定亲核加成中间体的基团都来自于蛋白自身,例如Hh蛋白胆固醇修饰位点的Cys残基和Smo蛋白的第130位Tyr残基.Hh蛋白的胆固醇修饰自催化过程,有些类似于酶催化的胆固醇酯化反应,因此有人认为hedgehog蛋白的C端序列可能是蛋白质胆固醇修饰的催化酶.Smo蛋白的胆固醇修饰受钙离子水平和多种蛋白的影响,但其本质上还是自催化的过程.蛋白质胆固醇共价修饰是否像常规翻译后修饰一样,存在特异性催化其修饰和去修饰的催化酶仍然是该领域的研究热点.

同时,是否存在其他潜在的胆固醇修饰蛋白是该领域另外一个研究热点,但是由于胆固醇分子的特殊性导致其富集和检测手段具有一定的局限性,因此更多潜在的胆固醇修饰底物依然有待发现.胆固醇化修饰作为一种特殊的修饰类型,尚未发展出广泛应用的特异性抗体或探针,用于靶向检测胆固醇化蛋白.大多数现有的研究依赖于质谱(mass spectrometry, MS)分析和标记方法来识别胆固醇化修饰,但这些方法对于检测可能存在的蛋白底物动态胆固醇修饰和低丰度胆固醇修饰存在一定的挑战.其次,蛋白质的胆固醇化修饰可能在不同的细胞类型、组织、发育阶段以及病理条件下有所不同,并且与细胞的代谢状态密切相关.胆固醇化修饰的蛋白在细胞中的丰度可能较低,特别是在特定代谢状态下,因此其识别和定量具有一定难度.另外,胆固醇化修饰可能是一个动态的过程,类似于其他翻译后修饰(如磷酸化)那样随细胞的代谢状态和环境条件变化,由于目前研究证据较少,对胆固醇修饰条件认知有限,增加了捕捉这些修饰的难度.随着技术的进步和对代谢重编程等生物学过程深入了解,未来可能会发现更多胆固醇化修饰的蛋白,进一步揭示其在细胞功能和病理中的重要作用.

4 蛋白质胆固醇修饰的研究方法

新型翻译后修饰的鉴定和发现离不开研究方法的

更新和进步. 针对蛋白质的胆固醇化这种特殊的翻译后修饰, 其检测手段单一, 鉴定方法匮乏, 导致潜在的胆固醇修饰蛋白底物至今鲜有报道. 为了筛选和鉴定更多潜在的胆固醇修饰蛋白底物, 丰富对胆固醇修饰的理解, 全面了解胆固醇修饰在机体内的重要生理作用和相关疾病的治疗, 在结合传统的实验方法的同时, 需要积极开拓新的检测手段(表1). 新研究方法的设计和新检测手段的开发, 不仅可以促进胆固醇修饰底物的筛选和分子机制的探究, 同时为其他生物大分子的修饰提供有效的借鉴手段, 更为深入理解糖脂等大分子代谢过程和代谢产物的生理意义提供新的见解, 为治疗和预防相关疾病提供新的方案.

4.1 同位素标记法

同位素是具有相同数量的质子但中子数不同的原子. 由于中子数的不同, 同位素的原子质量和物理性质会有所不同, 但都具有相同的化学性质. 同位素标记分为放射性同位素标记和稳定同位素标记. 常用的放射性同位素有如氚-3 (^3H)、碳-14 (^{14}C)、磷-32 (^{32}P)和硫-35 (^{35}S). 稳定同位素由于其不具有放射性, 且能够提供安全有效的标记手段而受到越来越广泛的应用. 常用的稳定同位素有氘 (^2H)、碳-13 (^{13}C)、氮-15 (^{15}N)等. 同位素标记法在生物学领域被广泛应用, 通过引入同位素标记物, 可以实现对各种生物大分子的

合成和代谢过程高灵敏度的检测和分析, 同时也是蛋白质胆固醇化修饰的有效检测手段.

同位素标记法可以通过标记胆固醇前体或蛋白质本身, 检测蛋白质的胆固醇化修饰. 将同位素(如 ^3H 或 ^{13}C)引入修饰分子中形成标记胆固醇(如 ^3H -胆固醇或 ^{13}C -胆固醇). 将标记的胆固醇添加到细胞培养基中, 使细胞吸收并利用这些标记分子参与蛋白质的胆固醇化修饰. 通过细胞裂解和蛋白质提取, 并利用放射自显影、液相色谱-质谱联用(LC-MS)或核磁共振(NMR)等技术手段, 可检测目标蛋白的胆固醇化修饰水平. 同位素标记法具有极高的灵敏度, 可以检测到极微量的同位素标记物, 研究低丰度的蛋白质胆固醇化修饰具有较强优势. 此外, 借用高分辨率质谱技术分离和鉴定同位素标记的肽段, 通过同位素峰的质量偏移, 可以确定蛋白质胆固醇化修饰的位点, 实现精确测量胆固醇化修饰的分子机制和动力学过程.

4.2 质谱法

质谱法是现代生物化学研究中极其重要的分析技术, 其高灵敏度、高分辨率和高通量的分析在新型蛋白质翻译后修饰研究中发挥着关键作用. 质谱法的基本流程包括样品制备、离子化、质谱分析和数据解析. 质谱法是检测蛋白质胆固醇化修饰的有效手段, 通过从细胞或组织样品中提取目的蛋白质, 利用蛋白酶分

表 1 蛋白质胆固醇修饰检测方法
Table 1 Protein cholesterylation detection methods

方法	应用优点	局限性	主要应用
同位素标记法	可通过稳定同位素标记胆固醇分子, 实现高精度定量蛋白质胆固醇修饰. 适用于体内研究. 适合研究胆固醇化的动态变化和修饰随时间或条件的调控.	需要设计合成同位素标记的胆固醇中间物, 需要高成本的同位素试剂和设备. 技术较为复杂, 实验周期较长.	可用于蛋白质胆固醇化修饰的定量分析, 尤其适合细胞内动态变化的研究.
质谱法	高灵敏度, 可用于胆固醇化修饰的高通量检测和位点定位. 可以直接检测修饰位点和修饰量的变化.	对胆固醇修饰样品的富集具有较高要求. 样品复杂性可能影响胆固醇化信号的检测.	应用于胆固醇化修饰的鉴定和位点分析, 是研究胆固醇化修饰的核心工具.
化学标记法	可灵活选择标记基团, 便于胆固醇修饰蛋白的特异性富集与检测. 适用于体内研究. 可与荧光和其他检测手段结合, 实现定量或追踪分析.	需要合成携带特异基团的胆固醇探针, 标记效率可能受限, 导致非特异性信号.	用于胆固醇化修饰的特定检测和验证, 适合研究胆固醇化的存在和分布.
结构解析法	可直接提供胆固醇化修饰位点的高分辨结构信息. 可直接观察胆固醇化修饰在蛋白质中的定位及其对相邻结构的影响.	需要高纯度样品, 且样品制备较为复杂. 技术要求高, 实验周期较长, 适用于静态结构研究.	主要用于研究胆固醇化修饰对蛋白质结构、稳定性及功能的影响, 如X射线晶体学或冷冻电镜.
人工智能和大数据学习算法	基于已有数据归纳总结, 预测潜在胆固醇化修饰底物蛋白, 速度快、成本低. 可分析多种因素并进行跨物种高通量比对预测.	需要开发对应软件并对已有数据进行学习. 预测结果需实验验证, 准确率受算法和数据质量影响.	用于快速筛选胆固醇化修饰的潜在底物蛋白, 辅助实验设计和数据分析.

解成肽段, 并通过免疫沉淀或亲和捕获等方法富集胆固醇化修饰的肽段, 进而利用电喷雾离子化技术将肽段转化为带电液滴, 通过测定质量/电荷比(m/z)获取质量信息, 识别和定量胆固醇化修饰。

应用液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)技术, 可显著提高对胆固醇化修饰肽段的分辨率。将液相色谱与质谱结合, 先通过液相色谱分离蛋白质或肽段, 选择特定的肽段离子, 通过碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)产生碎片离子, 然后通过串联质谱方法检测获得肽段序列信息, 可以有效检测胆固醇修饰肽段。胆固醇化修饰的蛋白质在质谱分析中会显示特定的质量增益(约368 Da), 通过串联质谱利用碎片离子信息可以精确定位胆固醇化修饰位点。此外, 质谱法结合不同的标记技术, 如同位素标记的胆固醇, 可实现对胆固醇化修饰肽链的定量分析和修饰过程的动态追踪。

4.3 化学标记法

化学标记法的基本原理是根据研究目的选择合适的标记物, 如荧光基团、生物素、活性基团、亲和标签等, 然后通过点击化学、NHS酯-胺反应、巯基-烯反应等特定的化学反应将标记物连接到蛋白质、核酸、脂质等目标分子上。在研究胆固醇代谢和转运相关信号通路时, 众多化学标记的胆固醇探针已被成功应用, 例如, 荧光标记的胆固醇探针(BODIPY-胆固醇探针、NBD-胆固醇探针和Top Fluor-胆固醇探针等)和生物素标记的胆固醇探针等。在研究与胆固醇相互结合蛋白时, 常用到的胆固醇类似物探针包被的beads, 例如20(S)-hydroxycholesterol beads (20-OHC beads)和22-norhydroxycholesterol beads (22-NHC beads)等。22-NHC beads是胆固醇的类似物包被的beads, 通过将胆固醇22号碳位置改为氮杂环丙烷来增强胆固醇与结合蛋白的亲合力, 可提高目标蛋白的富集效率。

点击化学通过高效温和的化学反应, 实现了对包括胆固醇在内的生物分子精确标记和富集, 已被成功应用于生命科学的各个领域。常见的点击化学反应包括铜催化的叠氮-炔环加成反应(CuAAC)和环张力促发叠氮-炔环加成反应(SPAAC)。点击化学给胆固醇修饰领域带来了新的突破。Xiao等人^[13]通过在胆固醇尾部碳链上添加叠氮基团(N3), 制备了和胆固醇分子具有相同生理功能的胆固醇探针。并将该胆固醇探针加

入细胞培养基中, 使细胞吸收并利用胆固醇探针参与各项生理活动。使用含有强去垢剂和尿素的变性裂解液进行细胞裂解和蛋白质提取, 利用与biotin偶联的炔基在体外进行点击化学反应, 使胆固醇与biotin连接, 最后使用识别生物素的beads将整个复合物富集。利用免疫印迹或质谱的方法检测和胆固醇探针具有共价连接的蛋白, 从而确定了胆固醇修饰的新底物-Smoothened蛋白。

化学标记探针和点击化学等技术为生物大分子动态修饰的机制研究提供了具有化学特征的新工具和新模式, 为深入了解生物大分子动态修饰的生物学效应和调控规律提供了新范式。北京大学的王初、陈兴和董魁伟老师课题组^[59,60]合作, 使用化学标记探针结合点击化学技术在糖基修饰和衣康酸修饰领域取得一系列研究突破。使用合成叠氮标记的新一代半胱氨酸糖探针(1-OH-Az), 结合定量化学蛋白质组学技术, 成功地在巨噬细胞蛋白质组中鉴定到数百个衣康酸修饰的半胱氨酸位点。结合标记探针和点击化学技术, 系统探究了衣康酸在巨噬细胞内修饰蛋白底物, 并揭示了衣康酸对糖酵解负反馈调控发挥抗炎作用的新机制, 阐述了一系列糖脂化学相关内在机制^[61]。美国斯坦福大学的Flynn等人^[62]利用叠氮标记的唾液酸前体(Ac4-ManNAz)对唾液酸聚糖进行标记, 并在高度纯化的RNA中检测到叠氮信号, 首次发现细胞表面糖基化RNA (glycoRNA)的存在。哈佛医学院的Du等人^[63]利用炔基标记的棕榈酸作为探针, 揭示了活性氧(ROS)介导的焦亡关键蛋白GSDMD在Cys191上发生S-棕榈酰化分子机制及其生理意义。中国科学院上海有机化学研究所的许代超团队^[64], 使用炔基标记的棕榈酸类似物鉴定了GSDMD的S-棕榈酰化及其去棕榈酰化分子机制和生理功能。化学标记法结合点击化学等项技术, 使检测手段更高效、更灵敏, 极大地推动了各类新型修饰的进展, 同时为深入理解糖脂等大分子代谢过程和代谢产物的生理意义提供新的见解。

4.4 胆固醇修饰蛋白结构解析

蛋白质结构解析技术能够揭示蛋白质的三维形态, 包括其主链和侧链的精确位置, 这对于理解蛋白质的功能至关重要。蛋白质的结构是其功能的基础, 无论是蛋白酶的催化过程、信号转导蛋白的工作原理, 还是转运蛋白的活性机制, 都与其结构紧密相关。此外,

蛋白质与其它分子或配体的相互作用会改变其构象,而高分辨率的结构分析能够详细揭示蛋白质与小分子、核酸和其他蛋白质等配体之间的空间构象及其相互作用方式,这对于理解配体的结合机制和生理功能具有重大意义。

胆固醇修饰蛋白也可以通过蛋白质结构解析技术进行检测,高分辨率蛋白质结构解析技术可以有效地揭示胆固醇分子与底物蛋白之间的共价修饰位点和空间构象等信息。利用X射线晶体学方法和冷冻电子显微镜(Cryo-EM)解析蛋白质结构的方法,都可以获得高分辨率的胆固醇和蛋白质复合物的原子分辨率结构。结晶纯化过程中,需要获得高质量的胆固醇修饰蛋白质晶体,然后使用X射线衍射仪收集衍射数据,并利用软件进行数据处理和结构解析,获得蛋白质-胆固醇的原子分辨率结构和结合位点及其周围的环境信息。冷冻电镜法需要制备目的蛋白或者含有胆固醇修饰的蛋白质样品,快速冷冻形成玻璃态薄膜。使用超高分辨率冷冻电镜获取大量二维投影图像,并用软件对所得图像进行处理和重构,从而得到蛋白质-胆固醇的超高分辨率三维结构。根据胆固醇修饰蛋白质的三维结构,可以通过定点突变和嵌合体设计等手段改造蛋白质功能,还可以筛选具有特异性结合并调控蛋白功能的小分子化合物等作为潜在的药物分子。

4.5 借助人工智能和大数据学习算法进行预测

生命科学的核心在于理解生物体内复杂的分子机制。其中,以DNA、RNA和蛋白质为中心的中心法则,是现代生物学的基石。这一法则描述了遗传信息如何在生物体内流动和表达,从而控制生物体的生长、发育和功能。随着人类基因组计划的完成以及转录组学、蛋白质组学等技术的进步,人们对从单一遗传物质到复杂生命体的运作方式有了前所未有的深入理解。生命基本单元物质通过不同的排列组合,形成的DNA链或多肽链包含所有高级结构和功能信息,揭示了生命体内在机制的规律性和复杂性,并使得使用人工智能(AI)对已知生物基本信息和规则进行归纳总结和预测成为了可能。同时,AI和大数据学习在处理庞大信息量和规律性事件中展现出巨大的优势和应用潜能,为解析复杂的生物学问题提供了新的工具和方法。

人工智能根据蛋白质一级序列精确预测蛋白质的高级复杂结构及多分子相互作用的过程,是AI在生命

科学领域成功应用的典型代表。AlphaFold是一种利用深度学习技术预测蛋白质结构的先进AI软件,它通过神经网络方法从大量蛋白质结构数据中学习特征,并结合多数据库信息,归纳总结后根据蛋白质序列预测出高精度的三维结构。AlphaFold通过对蛋白质同源序列的比对,捕捉多肽序列间的相似性,并将氨基酸和肽链转化为计算机可识别的点和线信息,从而进行识别和高效处理。通过引入能量函数,模拟蛋白质折叠过程中的能量最小化原则,并应用几何约束确保预测结构的合理性。同时,还通过与已知结构的蛋白质信息对比,不断优化模型参数提高预测准确性,使其能够更准确地预测未知结构。

类似地,我们可以利用AlphaFold的学习原理,训练人工智能对包括胆固醇修饰在内的蛋白质翻译后修饰信息进行大量的学习、归纳和总结,进而使用该人工智能预测潜在的胆固醇修饰底物和修饰类型。例如,使用相应软件分析与Hedgehog具有相似氨基酸序列的蛋白质,结合生化实验验证是否具有类似于Hh蛋白自催化发生胆固醇修饰的能力;智能分析与Smoothened具有相似三维结构,并可以形成容纳胆固醇分子的疏水沟壑或空腔,并且在胆固醇的3 β 羟基附近具有形成内酯键的亲核残基存在的蛋白质,结合生化实验验证这类蛋白是否具有发生胆固醇修饰的能力。此外,还可以利用大数据学习和智能算法,根据胆固醇修饰的特点,分析并寻找潜在的具有促进胆固醇修饰发生能力的催化酶。

5 胆固醇共价偶联物在生物医药中的应用

胆固醇作为细胞膜中广泛分布的关键生物脂质分子,因其独特的两亲性质,在新药研发中发挥着重要作用。胆固醇共价修饰的药物通过提高稳定性、生物利用度和靶向性,显著增强了疗效,特别是在抗肿瘤、抗菌和抗病毒药物的研发中展现出巨大潜力。同时,胆固醇修饰的药物递送系统和疫苗开发也因其能够改善药物释放方式、提升疗效和减少副作用而受到重视。模拟胆固醇在体内与多种小分子化合物、脂肪酸和蛋白质的共价修饰过程,不仅有助于构建多样化的胆固醇修饰药物,还为药物设计提供了创新思路和策略,推动了药物研发朝着更精准、更高效的方向发展(图4)^[65]。

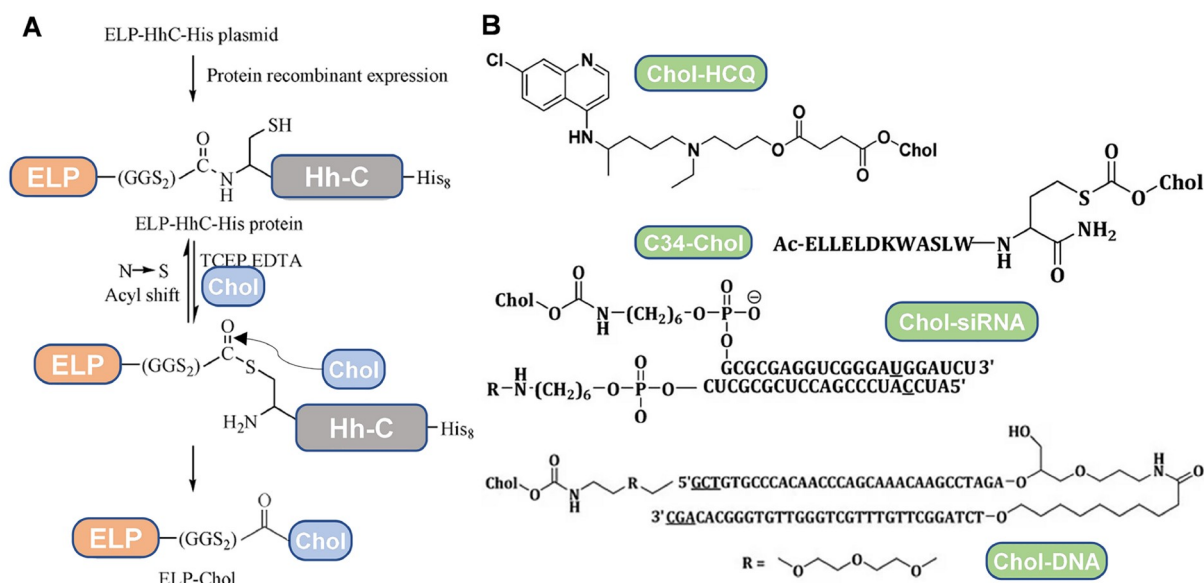


图 4 (网络版彩图) (A) 类弹性蛋白多肽(ELP)自催化胆固醇修饰过程. (B) 胆固醇修饰的各类小分子、多肽、siRNA和DNA分子药物

Figure 4 (Color online) (A) Self-catalyzed cholesterol modification process of elastin-like polypeptides (ELP). (B) Cholesterol-modified small molecules, peptides, siRNA, and DNA molecular drugs.

5.1 胆固醇修饰小分子药物

表阿霉素(epirubicin, EPI)是一种具有广谱抗肿瘤活性的蒽环类抗生素,能够有效治疗多种癌症,但由于其不稳定、易分解和难以递送等限制导致其抗肿瘤效果有限。为了增强EPI肿瘤治疗的靶向性和特异性毒性, Zhou等人^[66]开发了一种新型的胆固醇修饰的唾液酸缀合物(SA-Chol)作为EPI的载药脂质体。这种脂质体通过胆固醇连接的SA与肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)表面的Siglec-1受体特异性结合,提高了药物在肿瘤部位的浓度,并通过受体介导的内吞作用增强了药物的细胞内摄取。SA-Chol修饰显著提高了EPI的稳定性和在肿瘤部位的释放,从而提高EPI的抗肿瘤效果,减少副作用。

他莫昔芬(tamoxifen, TMX)是一种用于治疗雌激素受体和孕激素受体阳性乳腺癌的药物。为了提高其细胞穿透力、包封率和药代动力学特性, Mazumdar等人^[67]开发了一种自组装的胆固醇修饰的脂质多聚物:mPEG-b-(CB-g-chol-co-LA)。这种胆固醇修饰的脂质多聚物能显著提高TMX的细胞摄取效率和药代动力学特性,并且具有特异靶向酸性肿瘤微环境的特点,提高抗肿瘤活性。抗疟药氯喹(CQ)和羟氯喹(HCQ)通过下调细胞促炎因子发挥抗炎作用,有效抑制成纤维细

胞增殖和皮肤纤维化病的发展。Liu等人^[68]通过合成胆固醇修饰的羟氯喹(Cho-HCQ),使其具有更低的肺成纤维细胞毒性和更强的抗纤维化活性,显著提高了药物的治疗效果。

5.2 胆固醇修饰多肽药物

多肽药物因其特异性强、生物活性高、免疫原性低以及在体内不易蓄积等优势,在内分泌、免疫和肿瘤等多种重大疾病的治疗中得到广泛应用,成为新药研发的重要方向。然而,多肽药物在细胞膜穿透性、口服生物利用度、稳定性和半衰期等方面存在的不足,限制了其广泛应用^[65]。为解决这些问题,研究者发展了多种策略,其中化学修饰尤其是胆固醇修饰因其生物相容性好、安全性高、毒副作用低等优点而得到广泛应用。胆固醇修饰可显著提高多肽的亲脂性、生物活性,降低蛋白酶敏感性,延长半衰期。目前有多款胆固醇修饰多肽药物进入临床前及临床研究阶段,展现出很好的治疗冠状病毒和HIV病毒的潜力。

5.2.1 胆固醇修饰的抗肿瘤多肽药物

紫杉醇(paclitaxel, PTX)是应用较为广泛的有效抗肿瘤药物,通过和人血清白蛋白(HSA)组合成的Abrax-

ane纳米颗粒复合物, 虽然已获批用于癌症治疗, 但存在胶体稳定性差和不能改善PTX血清半衰期的问题。为了解决这些问题, Battogtokh等人^[69]开发了胆固醇修饰牛血清白蛋白(Chol-BSA)纳米颗粒作为PTX载体, 从而提高了载体对药物的加载效率和负载能力, 实现了更慢的PTX释放速度和更高的细胞摄取率。细胞毒性研究和体内抗肿瘤实验进一步证实了其具有更低的细胞毒性和更强的抗肿瘤作用, 表明Chol-BSA纳米颗粒作为PTX载体具有更高的安全性和抗肿瘤疗效。

5.2.2 胆固醇修饰的抗菌肽

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是一类具有广谱抗菌活性的天然短肽, 能对抗多种微生物, 包括细菌、真菌、病毒和寄生虫。随着抗生素耐药性问题的加剧, 抗菌肽作为新型抗菌剂的研究和开发受到重视。然而, 抗菌肽的临床应用受到稳定性差、毒性和免疫原性等问题的限制。胆固醇修饰作为一种提高抗菌肽稳定性和生物活性的有效策略, 已被广泛研究。为了提高AMPs的抗菌效果并减少溶血性, Zhang等人^[70]通过胆固醇修饰开发了改良型抗菌肽AMP DP7, 其在体外和体内都显示出更高的抗菌功效和更低的毒副作用。而且动物实验表明在高剂量给药情况下, 相对于传统抗菌肽来说, 胆固醇修饰改造的AMP DP7在安全性和治疗潜力方面更具有优势。

Chol-37是一种通过在抗菌肽PMAP-37的N末端引入胆固醇修饰得到的衍生物^[71]。Wang课题组^[72]发现这种修饰增强了PMAP-37的抗菌活性, 体外实验显示Chol-37对金黄色葡萄球菌、单核增生乳杆菌和鼠伤寒葡萄球菌的最小抑制浓度(MIC)值显著降低, 表明其抗菌效力得到了提升。胆固醇修饰还增强了Chol-37对细菌细胞膜的穿透性, 同时保持了低细胞毒性, 这使得Chol-37在不增加溶血性和细胞毒性的前提下, 具有更有效的抗菌特性。在体内实验中, Chol-37对金黄色葡萄球菌感染的小鼠模型表现出显著的治疗作用, 能显著减少小鼠全身的细菌负荷并减轻器官损伤。此外, 胆固醇修饰还提高了Chol-37的亲脂性, 有助于其穿透血脑屏障, 这为其在治疗中枢神经系统感染提供了潜在的应用前景。

5.2.3 胆固醇修饰的抗病毒肽

胆固醇修饰抗病毒肽因其特殊的细胞亲和性能显

著提升对病毒的杀伤效力。C34-Chol是HIV-1融合抑制剂C34的胆固醇修饰形式, 由Pessi等人^[15]利用Hedgehog蛋白自催化胆固醇修饰策略开发, 动物实验显示其抗病毒效力比未修饰肽提高约50倍, IC₅₀从205 μ M降至4 μ M, 且比获批上市的Enfuvieride强100倍。C34-Chol在小鼠体内展示出高血药浓度和长半衰期, 表明胆固醇修饰增强了与脂质膜的结合力, 提高了抗病毒能力和体内稳定性, 使其成为有效抗艾滋病毒候选药物。另一种胆固醇修饰肽pssm-m4HR-Chol通过在HIV融合抑制剂m4HR的C端引入胆固醇修饰, 由Wang等人^[73]通过Hedgehog蛋白胆固醇修饰自催化原理开发。体外实验显示, pssm-m4HR-Chol对HIV病毒入侵和胞内复制具有高效抑制能力, 对主要HIV-1分离毒株和Enfuvieride耐药毒株均展现高效抗病毒活性, 且细胞毒性低。这些结果表明, 胆固醇修饰显著提升了pssm-m4HR的抗病毒效力和选择性, 使其成为艾滋病治疗的潜在药物。

Bavari等人^[74]成功研发了一种胆固醇修饰的多肽EBOV-7, 用于针对埃博拉病毒(EBOV)和马尔堡病毒(MARV)的治疗。EBOV-7的结构基于埃博拉病毒GP2蛋白的C末端六螺旋区域, 并通过半胱氨酸引入胆固醇修饰, 以PEG2作为间隔。胆固醇的修饰增强了EBOV-7在血清中的稳定性, 并在体外测试中显示对EBOV具有高效的抑制作用。在小鼠模型中, EBOV-7能有效抵抗EBOV感染, 显著提高生存率, 远高于其他多肽类似物的效果。胆固醇修饰的EBOV-7在体内外实验中均显示出抑制EBOV和MARV产生的潜力, 有望成为治疗EBOV的新分子。

5.3 胆固醇修饰核酸药物

胆固醇修饰的siRNA (Chol-siRNA)在提高siRNA的生物利用度和疗效方面发挥了重要作用。胆固醇修饰能够减少siRNA在血清中的降解, 促进其向靶细胞和组织的递送, 从而提高siRNA的稳定性和疗效。这种修饰还降低了siRNA在肾脏中的积累, 同时增强了其在肝脏和肿瘤中的积累, 有助于减少肿瘤药物抗性, 为新型抗肿瘤药物研发提供了可能^[75]。此外, Göringer等人^[76]开发了一种新型的核壳结构DNA-胆固醇纳米粒子, 可利用亲水性DNA外壳和疏水性脂质核心自组装成胶束型结构, 能够特异性破坏布氏锥虫的溶酶体膜, 以纳摩尔级效力杀死寄生虫, 并通过在DNA外壳

上添加剪接引导(SL) RNA特异性的DNA酶实现双重靶向, 降低药物抗性风险. 另一方面, 阿霉素(doxorubicin)作为广泛使用的化疗药物, 其较低的递送效率和肿瘤靶向性导致副作用明显. Choi等人^[77]利用碱基配对和DNA生物共轭技术, 合成了一种由DNA-胆固醇/DNA-肽杂交双链(c-DNA-p)组成的阿霉素递送纳米载体. 胆固醇修饰和肽链连接赋予了DNA杂交双链亲水亲脂性, 能在水溶液中自组装成类似脂质体的纳米粒子, 有效提高药物递送和摄取, 降低细胞毒性. c-DNA-p对阿霉素的pH依赖性结合, 有助于药物在细胞摄取后释放到细胞质或靶向肿瘤细胞酸性环境, 从而提高抗肿瘤效果, 减少副作用.

6 总结与展望

胆固醇是一种多功能的甾醇类分子, 在保持细胞膜的流动性和完整性以及多种信号转导方面发挥重要功能, 同时还是合成胆汁酸和固醇类激素等重要生物活性物质的关键前体. 胆固醇分子在体内可以发生多种化学反应, 以3 β 羟基为官能团的酯化, 硫酸化和亲核取代等反应是胆固醇分子参与体内生理活动的重要方面. 胆固醇作为修饰分子参与蛋白质翻译后修饰过程也是依赖与其羟基的亲核取代反应, 这与胆固醇和脂肪酸之间的酯化反应有着极其相似的反应过程. 不同的是, 胆固醇与脂肪酸的亲核取代是在相应的酰基转移酶催化下发生的, 酰基转移酶通过稳定中间过渡态使得胆固醇酯化的发生, 而在胆固醇对于蛋白质共价修饰过程中的亲核取代反应, 更多的是通过自催化发生, 其中间过渡态往往需要相邻氨基酸的侧链基团. 例如Hh蛋白胆固醇修饰的自催化反应需要半胱氨酸侧链的巯基, Smo蛋白胆固醇修饰的自催化

反应需要相邻Y130上的酚羟基. 这其中可能是因为蛋白质相对于脂肪酸来说具有更复杂的一级结构组成(多氨基酸组成的肽链)和高级三维结构的产生(三维折叠后相近官能团同一空间位阻发挥功能). Hedgehog蛋白和Smo蛋白的胆固醇修饰水平会受到细胞内胆固醇浓度的影响. ASTER介导的胆固醇由质膜向内质网的转运促进Smo蛋白的胆固醇化修饰, 并进一步加速Smo的成熟和内质网退出过程. 同时, 在一定生理条件下, Hh和Smo蛋白的胆固醇修饰水平通过调控Hedgehog信号通路活性影响细胞内胆固醇代谢. 胆固醇代谢可通过影响胆固醇修饰“原材料”的方式调控胆固醇修饰水平变化, 但是胆固醇修饰是否是胆固醇代谢水平变化的感受器值得进一步深入探究.

科技进步极大地丰富了胆固醇修饰的研究手段, 其中点击化学和标记化学的应用为胆固醇修饰领域带来了高效且选择性强的化学探针, 这些工具对于深入理解胆固醇代谢和修饰过程至关重要. 随着研究工具的不断优化, 我们对胆固醇分子功能的认识将更加深入, 为揭示胆固醇在生物体内的作用机制提供了新的视角. 同时, 胆固醇修饰领域的一些关键科学问题, 例如蛋白质与胆固醇共价键的形成机制、潜在催化酶的存在以及其他胆固醇共价修饰蛋白的可能性, 将随着研究的深入逐步得到解答, 从而加速我们对这一领域的全面理解. 目前, 人工合成的胆固醇修饰药物已在多种疾病的治疗中显示出良好的疗效; 靶向蛋白质胆固醇修饰位点合成的甾醇类似物, 显示出良好的肿瘤抑制效果和克服耐药性的优势, 有望用于肿瘤治疗. 随着对胆固醇修饰及相关领域的持续深入研究, 预计未来将有更多高效药物被开发出来, 为疾病治疗提供新的选择和希望.

参考文献

- Goldstein JL, Brown MS. *Cell*, 2015, 161: 161–172
- Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 361–374
- Trinh MN, Brown MS, Seemann J, Vale G, McDonald JG, Goldstein JL, Lu F. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2120411119
- Wong LH, Gatta AT, Levine TP. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 85–101
- Luo J, Yang H, Song BL. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 225–245
- Wang LJ, Song BL. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Biol Lipids*, 2012, 1821: 964–972
- Song BL, Javitt NB, DeBose-Boyd RA. *Cell Metab*, 2005, 1: 179–189
- Goldstein JL, Brown MS. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 431–438

- 9 Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N. *Atherosclerosis*, 2010, 211: 361–370
- 10 Wang JQ, Li LL, Hu A, Deng G, Wei J, Li YF, Liu YB, Lu XY, Qiu ZP, Shi XJ, Zhao X, Luo J, Song BL. *Nature*, 2022, 608: 413–420
- 11 Rogers MA, Liu J, Song BL, Li BL, Chang CCY, Chang TY. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 151: 102–107
- 12 Porter JA, Young KE, Beachy PA. *Science*, 1996, 274: 255–259
- 13 Xiao X, Tang JJ, Peng C, Wang Y, Fu L, Qiu ZP, Xiong Y, Yang LF, Cui HW, He XL, Yin L, Qi W, Wong CCL, Zhao Y, Li BL, Qiu WW, Song BL. *Mol Cell*, 2017, 66: 154–162.e10
- 14 Zhang Y, Beachy PA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 668–687
- 15 Ingallinella P, Bianchi E, Ladwa NA, Wang YJ, Hrin R, Veneziano M, Bonelli F, Ketas TJ, Moore JP, Miller MD, Pessi A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 5801–5806
- 16 Liu YB, He LM, Sun M, Luo WJ, Lin ZC, Qiu ZP, Zhang YL, Hu A, Luo J, Qiu WW, Song BL. *Cell Chem Biol*, 2024, 31: 1264–1276.e7
- 17 Chang C, Dong R, Miyazaki A, Sakashita N, Zhang Y, Liu J, Guo M, Li BL, Chang TY. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2006, 38: 151–156
- 18 Pal P, Gandhi H, Giridhar R, Yadav MR. *MRMC*, 2013, 13: 1195–1219
- 19 Meiner VL, Cases S, Myers HM, Sande ER, Bellosta S, Schambelan M, Pitas RE, McGuire J, Herz J, Farese Jr. RV. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 14041–14046
- 20 Hai Q, Smith JD. *Metabolites*, 2021, 11: 543
- 21 Alavez-Rubio JS, Juarez-Cedillo T. *Curr Alzheimer Res*, 2019, 16: 699–709
- 22 Yang W, Bai Y, Xiong Y, Zhang J, Chen S, Zheng X, Meng X, Li L, Wang J, Xu C, Yan C, Wang L, Chang CCY, Chang TY, Zhang T, Zhou P, Song BL, Liu W, Sun S, Liu X, Li B, Xu C. *Nature*, 2016, 531: 651–655
- 23 Oldoni F, Baldassarre D, Castelnovo S, Ossoli A, Amato M, van Capelleveen J, Hovingh GK, De Groot E, Bochem A, Simonelli S, Barbieri S, Veglia F, Franceschini G, Kuivenhoven JA, Holleboom AG, Calabresi L. *Circulation*, 2018, 138: 1000–1007
- 24 Lin DS, Steiner RD, Merckens LS, Pappu AS, Connor WE. *Atherosclerosis*, 2010, 208: 155–160
- 25 Yang K, Wang J, Xiang H, Ding P, Wu T, Ji G. *Biomed Pharmacother*, 2022, 147: 112677
- 26 Pavanello C, Calabresi L. *Curr Opin Lipidol*, 2020, 31: 232–237
- 27 Griffiths WJ, Wang Y. *J Lipid Res*, 2022, 63: 100165
- 28 Kulig W, Cwiklik L, Jurkiewicz P, Rog T, Vattulainen I. *Chem Phys Lipids*, 2016, 199: 144–160
- 29 Passarelli MN, McDonald JG, Thompson BM, Arega EA, Palys TJ, Rees JR, Barry EL, Baron JA. *J Clin Lipidol*, 2022, 16: 345–355
- 30 Takabe W, Urano Y, Vo DKH, Shibuya K, Tanno M, Kitagishi H, Fujimoto T, Noguchi N. *J Lipid Res*, 2016, 57: 2005–2014
- 31 Bottemanne P, Paquot A, Ameraoui H, Guillemot-Legris O, Alhouayek M, Muccioli GG. *FASEB Journal*, 2021, 35: e21514
- 32 Sun S, Liu C. *Front Pharmacol*, 2015, 06: 60
- 33 Kim D, Lee KM, Lee C, Jo YS, Muradillaevna MS, Kim JH, Yoon JH, Song P. *Adv Biol Regulation*, 2022, 83: 100837
- 34 Hu H, Shao W, Liu Q, Liu N, Wang Q, Xu J, Zhang X, Weng Z, Lu Q, Jiao L, Chen C, Sun H, Jiang Z, Zhang X, Gu A. *Nat Commun*, 2022, 13: 252
- 35 Kouno T, Liu X, Zhao H, Kisseleva T, Cable EE, Schnabl B. *J Biol Chem*, 2022, 298: 102056
- 36 Xu D, Ma R, Ju Y, Song X, Niu B, Hong W, Wang R, Yang Q, Zhao Z, Zhang Y, Zheng Y, Bai Q, Lv M, Sun N, Li X. *Nat Commun*, 2022, 13: 4428
- 37 Prah J, Winters A, Chaudhari K, Hersch J, Liu R, Yang SH. *Brain Res*, 2019, 1723: 146378
- 38 Momoeda M, Cui Y, Sawada Y, Taketani Y, Mizuno M, Iwamori M. *J Biochem*, 1994, 116: 657–662
- 39 Wang J, Feng Y, Liu B, Xie W. *Steroids*, 2024, 201: 109335
- 40 Fandrei F, Engberg O, Opálka L, Jančálková P, Pullmannová P, Steinhart M, Kováčik A, Vávrová K, Huster D. *J Lipid Res*, 2022, 63: 100177
- 41 Wang S, Wang R, Xu N, Wei X, Yang Y, Lian Z, Cen B, Shen C, Li W, Wang J, Zhang Z, Tang L, Wei Q, Lu D, Xu X. *Hepatology*, 2023, 78: 1064–1078
- 42 Efimova VS, Isaeva LV, Labudina AA, Tashlitsky VN, Rubtsov MA, Novikova LA. *J Cell Biochem*, 2019, 120: 3124–3136
- 43 Carroll E, Ravi Gopal B, Raghavan I, Mukherjee M, Wang ZQ. *Nat Commun*, 2023, 14: 4042
- 44 Bassi G, Sidhu SK, Mishra S. *Cells*, 2021, 10: 1851
- 45 Varjosalo M, Taipale J. *Genes Dev*, 2008, 22: 2454–2472
- 46 Ingham PW. *Curr Top Dev Biol*, 2022, 149: 1–58

- 47 Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A. *J Biol Chem*, 1998, 273: 14037–14045
- 48 Mann RK, Beachy PA. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 891–923
- 49 Radhakrishnan A, Rohatgi R, Siebold C. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 1303–1313
- 50 Wang C, Wu H, Katritch V, Han GW, Huang XP, Liu W, Siu FY, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. *Nature*, 2013, 497: 338–343
- 51 Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran RB, Scott MP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 3196–3201
- 52 Kinnebrew M, Iverson EJ, Patel BB, Pusapati GV, Kong JH, Johnson KA, Luchetti G, Eckert KM, McDonald JG, Covey DF, Siebold C, Radhakrishnan A, Rohatgi R. *eLife*, 2019, 8: e50051
- 53 McConnell HM, Radhakrishnan A. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*, 2003, 1610: 159–173
- 54 Endapally S, Frias D, Grzemska M, Gay A, Tomchick DR, Radhakrishnan A. *Cell*, 2019, 176: 1040–1053.e17
- 55 Hu A, Zhang JZ, Wang J, Li CC, Yuan M, Deng G, Lin ZC, Qiu ZP, Liu HY, Wang XW, Wei PC, He X, Zhao X, Qiu WW, Song BL. *Cell Res*, 2022, 32: 288–301
- 56 Kong Z, Xu M, Zhang Y, Huang W, Zhao X, Luo J, Song BL. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2022, 54: 1171–1179
- 57 Qiu ZP, Lin ZC, Hu A, Liu YB, Zeng WE, Zhao X, Shi XJ, Luo J, Song BL. *EMBO J*, 2023, 42: e111513
- 58 Qiu ZP, Hu A, Song BL. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Biol Lipids*, 2021, 1866: 159041
- 59 Liu J, Cheng B, Fan X, Zhou X, Wang J, Zhou W, Li H, Zeng W, Yang P, Chen X. *Angew Chem Int Ed*, 2023, 62: e202303410
- 60 Cheng B, Wang C, Hao Y, Wang J, Xia X, Zhang H, He R, Zhang S, Dai P, Chen X. *Chem Eur J*, 2023, 29: e202203054
- 61 Qin W, Qin K, Zhang Y, Jia W, Chen Y, Cheng B, Peng L, Chen N, Liu Y, Zhou W, Wang YL, Chen X, Wang C. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 983–991
- 62 Flynn RA, Pedram K, Malaker SA, Batista PJ, Smith BAH, Johnson AG, George BM, Majzoub K, Villalta PW, Carette JE, Bertozzi CR. *Cell*, 2021, 184: 3109–3124.e22
- 63 Du G, Healy LB, David L, Walker C, El-Baba TJ, Lutowski CA, Goh B, Gu B, Pi X, Devant P, Fontana P, Dong Y, Ma X, Miao R, Balasubramanian A, Puthenveetil R, Banerjee A, Luo HR, Kagan JC, Oh SF, Robinson CV, Lieberman J, Wu H. *Nature*, 2024, 630: 437–446
- 64 Zhang N, Zhang J, Yang Y, Shan H, Hou S, Fang H, Ma M, Chen Z, Tan L, Xu D. *Nat Cell Biol*, 2024, 26: 757–769
- 65 Ruwizhi N, Aderibigbe BA. *Molecules*, 2020, 25: 4330
- 66 Zhou S, Zhang T, Peng B, Luo X, Liu X, Hu L, Liu Y, Di D, Song Y, Deng Y. *Int J Pharm*, 2017, 523: 203–216
- 67 Mazumdar S, Italiya KS, Sharma S, Chitkara D, Mittal A. *Int J Pharm*, 2018, 543: 96–106
- 68 Liu L, Ren J, He Z, Men K, Mao Y, Ye T, Chen H, Li L, Xu B, Wei Y, Wei X. *Sci Rep*, 2017, 7: 10737
- 69 Battogtokh G, Kang JH, Ko YT. *Eur J Pharm BioPharm*, 2015, 96: 96–105
- 70 Zhang R, Wu F, Wu L, Tian Y, Zhou B, Zhang X, Huang R, Yu C, He G, Yang L. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62: e00368-18
- 71 Shi S, Dong H, Chen X, Xu S, Song Y, Li M, Yan Z, Wang X, Niu M, Zhang M, Liao C. *J Vet Sci*, 2023, 24: e44
- 72 Chen L, Shen T, Liu Y, Zhou J, Shi S, Wang Y, Zhao Z, Yan Z, Liao C, Wang C. *BMC Vet Res*, 2020, 16: 419
- 73 Wang C, Shi W, Cai L, Lu L, Yu F, Wang Q, Jiang X, Xu X, Wang K, Xu L, Jiang S, Liu K. *J AntiMicrob ChemoTher*, 2014, 69: 1537–1545
- 74 Pessi A, Bixler SL, Soloveva V, Radoshitzky S, Retterer C, Kenny T, Zamani R, Gomba G, Gharabeih D, Wells J, Wetzel KS, Warren TK, Donnelly G, Van Tongeren SA, Steffens J, Duplantier AJ, Kane CD, Vicat P, Couturier V, Kester KE, Shiver J, Carter K, Bavari S. *Antiviral Res*, 2019, 171: 104592
- 75 Ye Z, Abdelmoaty MM, Curran SM, Dyavar SR, Kumar D, Alnouti Y, Coulter DW, Podany AT, Singh RK, Vetro JA. *ncRNA*, 2022, 8: 8
- 76 Knieß R, Leeder W, Reißig P, Geyer FK, Göringer HU. *ChemBioChem*, 2022, 23: e202200410
- 77 Choi K, Kwon IC, Ahn HJ. *Biomaterials*, 2013, 34: 4183–4190

Research progress of cholesterol modification

Qiangqiang Liu, Baoliang Song^{*}

College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

^{*}Corresponding author (email: blsong@whu.edu.cn)

Abstract: As the most abundant sterol in organisms, cholesterol plays a crucial role not only in maintaining the fluidity and integrity of cell membranes and participating in various signal transduction processes, but also as a precursor for the synthesis of important bioactive substances such as bile acids and steroid hormones. Cholesterol can undergo a variety of chemical reactions in the body, including esterification, sulfation, and nucleophilic substitution reactions involving the 3 β hydroxyl group, which are important aspects of cholesterol's involvement in physiological activities. In addition to forming cholesterol esters through covalent linkage to fatty acids, cholesterol can also modify proteins through covalent conjugation, a process that involves a series of complex biochemical reactions and plays an important role in regulating the normal function of substrate proteins. Currently, only a few proteins have been identified with cholesterylation. With the continuous progress in cholesterol modification research, this field holds promise for new breakthroughs. Furthermore, cholesterol-modifying drugs synthesized through the simulation of *in vivo* cholesterol modification reactions have demonstrated good therapeutic effects. Small molecule compounds that target and inhibit cholesterol modification of the Smoothed (Smo) protein can effectively kill tumor cells, while also having the advantages of overcoming drug resistance and enhancing efficacy when used in combination. Cholesterol is also used to modify small molecules, peptides, and nucleic acid drugs to increase the bioaffinity of drug molecules and improve drug stability, resulting in better therapeutic effects. This review primarily summarizes the chemical reactions involving cholesterol molecules in the body, research progress on protein cholesterylation, and research methods, while discussing the application of cholesterol modification in the field of biomedicine. The aim is to provide references for research and development in the field of cholesterol modification.

Keywords: cholesterol modification, cholesterylation, nucleophilic substitution, covalent linkage, chemical probes, peptide drugs

doi: [10.1360/SSC-2024-0224](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0224)