

DOI: 10.13376/j.cblls/2023126

文章编号: 1004-0374(2023)09-1147-13

脂质自噬对肝脏脂质代谢的影响及机制研究进展

黄超群, 刘有华, 王新霞*

(浙江大学动物科学学院, 教育部动物分子营养学重点实验室, 农业农村部(华东)动物营养与饲料重点实验室, 浙江省饲料与动物营养重点实验室, 杭州 310058)

摘要: 肝脏是机体脂质代谢的枢纽。自噬是真核生物体内高度保守的生物学过程, 选择性地清除细胞内脂质的过程被称为脂质自噬, 简称脂噬。越来越多的研究表明, 脂噬在维持肝脏及全身脂质稳态中发挥重要的调控作用, 脂噬功能障碍与肝脏的多种病理、生理过程密切相关。因此, 靶向脂噬可能有利于开发新的治疗肝脂代谢紊乱的手段。本文综述了脂噬发生过程以及调节肝脏脂噬的最新进展, 并对靶向脂噬治疗肝脂代谢紊乱的研究进行了总结, 为理解脂噬的调控机制及其生物学意义提供参考。

关键词: 肝脏; 肝细胞; 脂质自噬; 脂代谢

中图分类号: Q493.9; Q591.9 **文献标志码:** A

Role and mechanisms of lipophagy on liver lipid metabolism

HUANG Chao-Qun, LIU You-Hua, WANG Xin-Xia*

(Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science (Eastern of China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Animal Feed and Nutrition of Zhejiang Province, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The liver is the key regulator of systemic lipid metabolism. Autophagy is a highly conserved biological process in eukaryotes. Lipophagy is a selective type of autophagy which targets lipid droplets for degradation. Studies have shown that lipophagy plays an important regulatory role in maintaining homeostasis of lipid droplets, and its dysfunction is closely related to a variety of pathological and physiological processes in the liver. Therefore, targeting lipophagy may serve as a potential therapeutic strategy for the treatment of hepatic lipid metabolism disorder. This article reviews the underlying mechanism by which lipophagy is induced and regulated, and the current findings on targeting lipophagy to counteract abnormal lipid metabolism, so as to provide a reference for better understanding the regulatory mechanism of lipophagy and its biological significance.

Key words: liver; hepatocytes; lipophagy; lipid metabolism

1 肝脏脂质沉积的主要途径

与脂肪组织 (adipose tissue, AT) 不同, 健康的肝脏虽然通常不会储存大量的中性脂质, 但其仍在维持全身脂质稳态中发挥着不可忽视的作用, 是机体脂肪酸合成、代谢和运输的主要部位, 且其中任何环节出现异常都可能会导致肝脏脂质代谢失调以及机体代谢紊乱^[1]。当积累的脂质含量超过肝脏储存、分泌和氧化脂肪酸的能力时, 就会对肝脏产生脂毒性, 这被认为是非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的主要致病驱动因素。

2020年, NAFLD 被建议更名为代谢相关脂肪性肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD)^[3-4], 以凸显代谢紊乱在其发生和发展中的作用, 同时更充分地反映该疾病的当前知识和病理生理学。产生脂毒性的这些有毒脂质, 例如溶血磷脂酰胆碱类、二酰基甘油、神经酰胺, 可诱导肝细胞应激、细胞

收稿日期: 2023-03-07; 修回日期: 2023-05-04

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目(LZ22C170002)

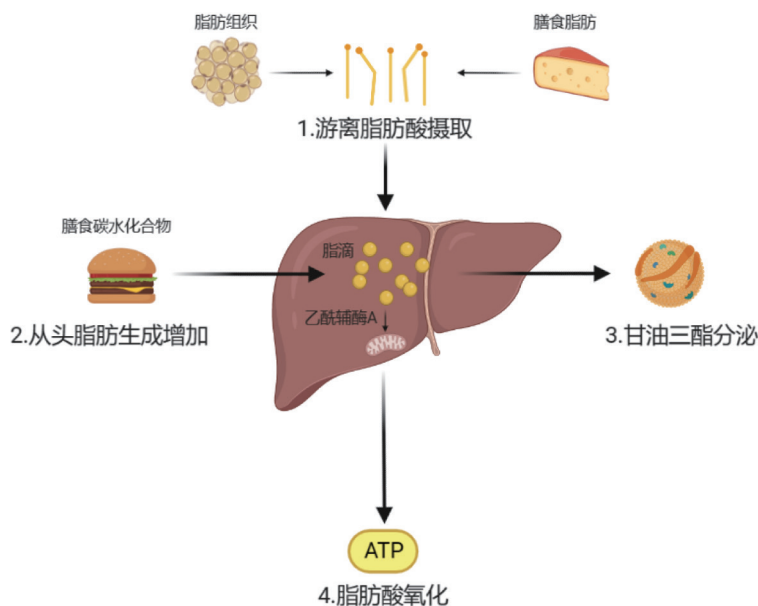
*通信作者: E-mail: xinxiawang@zju.edu.cn; Tel: 0571-88982128

损伤和死亡,引起炎症和纤维化^[1,5]。因此,控制肝脏的脂质含量对治疗 MAFLD 至关重要。

脂肪组织是哺乳动物体内甘油三酯 (triglyceride, TG) 储存的主要部位,与全身脂质代谢稳态密切相关。当机体出现脂肪营养不良,即脂肪组织萎缩时,会表现出全身性、部分性或区域性的脂肪丢失,这会导致在萎缩脂肪组织中无法沉积的脂质进入血液循环,随后异位储存在非脂肪组织特别是肝脏和骨骼肌等器官,从而导致机体出现 NAFLD、胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 等代谢性疾病^[6]。而正常情况下,当机体因禁食或运动等需要大量消耗能量时,储存在 AT 中的 TG 就会以游离脂肪酸 (free fatty acids, FFAs) 的形式通过脂肪分解释放,并随后与白蛋白结合随血液循环运输,然后由肝脏摄取从而进行生酮作用^[7]。众所周知,胰岛素能够通过抑制 AT 脂解进而调节机体 FFAs 水平,进而有利于餐后膳食脂肪的储存和在禁食期间从 AT 中释放能量。但在胰岛素抵抗期间,胰岛素不再能够抑制脂肪分解,随即会导致 AT 来源的 FFAs 长期高通量地流向肝脏,这一过程被认为是 NAFLD 发生的主要驱动因素之一^[2,8]。一项稳定同位素示踪的研究表明,AT 衍生的 FFAs 是 NAFLD 中 TG 积累的最主要来源,占比约 60%,另一主要来源是肝细胞的

从头脂肪生成 (*de novo* lipogenesis, DNL) 合成,其余则来自于膳食^[7]。CD36 是一种广为人知的 FFAs 转运蛋白,可促进脂肪细胞、心脏和骨骼肌细胞对 FFAs 的摄取,但目前 CD36 对肝脏 FFAs 摄取贡献尚无定论,值得进一步研究^[9-10]。值得注意的是,NAFLD 小鼠和患者的肝脏中 CD36 表达上调,且 CD36 被发现参与肝脏中的固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element binding protein 1, SREBP1) 的加工并促进 DNL^[10]。图 1 总结了肝脏脂质积累的主要途径。已知膳食中过量的碳水化合物是 DNL 衍生的 TG 的最重要来源^[11],它们可以激活肝组织中的 DNL,进而导致极低密度脂蛋白 (very low density lipoproteins, VLDL) 的合成和分泌增加^[12]。除了碳水化合物的数量外,碳水化合物的类型也会影响 DNL 的速度,单糖在刺激肝脏 DNL 方面比复合碳水化合物更有效,而果糖是对 DNL 具有特别强效作用的单糖^[13-14]。最近的研究发现,膳食果糖可以通过微生物群衍生的乙酸盐促进肝脏脂肪生成^[15]。

当机体营养过剩后,肝脏中过多的 TG 可经由 VLDL 分泌到循环中,随后 VLDL 表面的载脂蛋白 ApoE (apolipoprotein E, ApoE) 和 ApoB 被外周组织细胞表面的低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 识别进而由外周组织吸收利用^[16]。



肝脏脂质代谢主要包括四个途径:(1)游离脂肪酸摄取:通过摄取来自脂肪组织或膳食脂肪的游离脂肪酸进行脂质合成;(2)从头脂肪生成增加:利用来自膳食的碳水化合物进行脂肪从头合成;(3)甘油三酯分泌:通过极低密度脂蛋白将过多的甘油三酯分泌到血液中;(4)脂肪酸氧化:通过脂肪酸氧化清除过多的脂质。肝脏中积累的脂质不能及时代谢清除将会引起肝脏中脂质积累,严重时会引起肝脏脂肪变性,导致非酒精性脂肪肝。

图1 肝脏脂质积累的主要途径(根据参考文献[11]修改)

肝脏 VLDL 代谢是调节肝脏和循环脂质水平的核心, 其紊乱可以导致 NAFLD 或高脂血症^[17-18]。研究发现, 内质网蛋白 PNPLA7 (patatin-like phospholipase domain containing protein 7) 可以通过和 ApoE 相互作用调节 ApoE 蛋白的泛素化降解, 从而调控 ApoE 介导的肝脏 VLDL 分泌, 进而影响肝脏甘油三酯代谢稳态^[19]。源自肝脏储存的 TG、循环脂质或 DNL 的脂肪酸还可以通过多种途径氧化^[2]。肝细胞中脂肪酸的氧化主要发生在线粒体中, 包括短链 (<C4)、中链 (C4~C12) 和长链 (C12~C20) 脂肪酸, 但极长链 (C22~C26) 脂肪酸的氧化主要发生在过氧化物酶体^[2]。肝脏脂肪酸氧化紊乱会促进脂肪肝的发展^[1-2]。

2 脂质自噬

自噬在 20 世纪 60 年代首次被描述^[20]。过去几十年的研究表明, 自噬是一种高度保守的生物学过程, 可以影响细胞的稳态、分化、发育和生存, 它通过溶酶体参与细胞内各种物质的降解, 如线粒体、内质网 (endoplasmic reticulum, ER)、细胞核、病原体, 乃至溶酶体本身; 自噬失调会影响包括肥胖和 NAFLD、炎症和传染病、神经退行性疾病和癌症在内的多种疾病进程^[21-23]。2009 年, 自噬的另一种特定形式——脂质自噬 (lipophagy) 被首次发现^[24]。其后, 这种依赖于自噬-溶酶体的脂滴 (lipid droplets, LDs) 降解途径在多种细胞中被证实, 并被发现在维持肝脏脂质代谢稳态中发挥重要作用^[25-28]。例如当机体营养缺乏时, 为了提供能量, 肝细胞内储存在 LDs 中的 TG 除了被特定的脂肪酶水解为游离脂肪酸外, 还可以通过脂质自噬进行选择性的降解^[24, 28]。在这一过程中, 与传统脂肪酶驱动的“中性”脂肪分解不同, 作为 LDs 分解的替代机制, 脂质自噬通过自噬在溶酶体中使用“酸性”脂肪分解, 这一过程依赖于溶酶体中的酸性脂肪酶 (lysosomal acid lipase, LAL)。与大量非选择性自噬类似, 脂质自噬存在巨脂噬 (macrolipophagic) 和微脂噬 (microlipophagic) 两种形式, 以何种方式发生取决于 LDs 如何被转运到溶酶体中^[29]。在高等真核生物中, 巨脂噬需要自噬体介导 LDs 的“隔离”来将其递送到溶酶体进行分解^[24, 29]。在酵母中, 微脂噬则直接通过液泡来吞噬 LDs^[29-30]。脂质自噬深刻影响着肝细胞内脂质的储存和使用, 与 NAFLD 和肝 TG 积累密切相关^[11]。通常, 这一途径 (巨脂噬) 的启动过程分为五个步骤: 脂质自噬启动、吞噬泡成核、吞噬泡延伸和自噬体形成、溶酶体与自噬体对接并融

合形成自噬溶酶体以及自噬溶酶体降解。近年来的研究表明, 脂质自噬和传统的脂肪分解之间不是孤立的, 而是存在协同作用。例如, 冷暴露能诱导小鼠下丘脑神经中枢自噬激活, 进而激活棕色脂肪 (brown adipose tissue, BAT) 和肝脏组织中的脂质自噬和胞质脂肪酶, 以介导外周组织中的脂肪分解, 并且在 BAT 中 ATGL 需要与自噬体标志物 LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3) 相互作用才能有效地催化 LDs 分解, 但 ATGL 需要 LC3 存在才能分解 LDs 的原因仍有待阐明^[31]。此外, ATGL 还可以通过增强沉默信息调节因子 1 (sirtuin 1, Sirt1) 的活性及其下游 PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α)/PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor α) 信号转导来同时促进脂质自噬和随后 FFAs 的氧化分解^[32-33], 从而控制 LDs 分解代谢。不仅如此, 肝细胞中的 LDs 还可先由脂肪分解将其变成更小的 LDs, 进而再由脂质自噬将其完全降解^[34]。除了营养不足时, 脂质自噬也会在相反的情况发生: 即当大量的膳食脂质被输送到肝脏时, 为了防止肝脂毒性而被激活^[35]。此外, 研究还发现肝细胞中还存在着一种直接基于溶酶体的自噬 (direct lysosome-based autophagy), 在这个过程中, LDs 可以和溶酶体稳定接触使得在营养有限的条件下能将 LDs 的脂质和蛋白质直接转移到溶酶体中, 而无需自噬体中间体的存在^[36]。上述研究表明, ATGL 可以作为脂质自噬的上游调节因子, 并通过脂质自噬而不是其本身来促进 LDs 的大量分解。值得注意的是, 由于脂肪分解是一个高度动态的过程, 受到许多信号通路 (如 cAMP/PKA、AMPK 等) 和许多已知的与 ATGL 相互作用的蛋白质的影响, 同时这些蛋白质有些又会间接影响 ATGL 活性。因此, 关于 ATGL 如何整合这些不同的“输入端”信息并协调脂质自噬, 值得进一步研究^[37]。

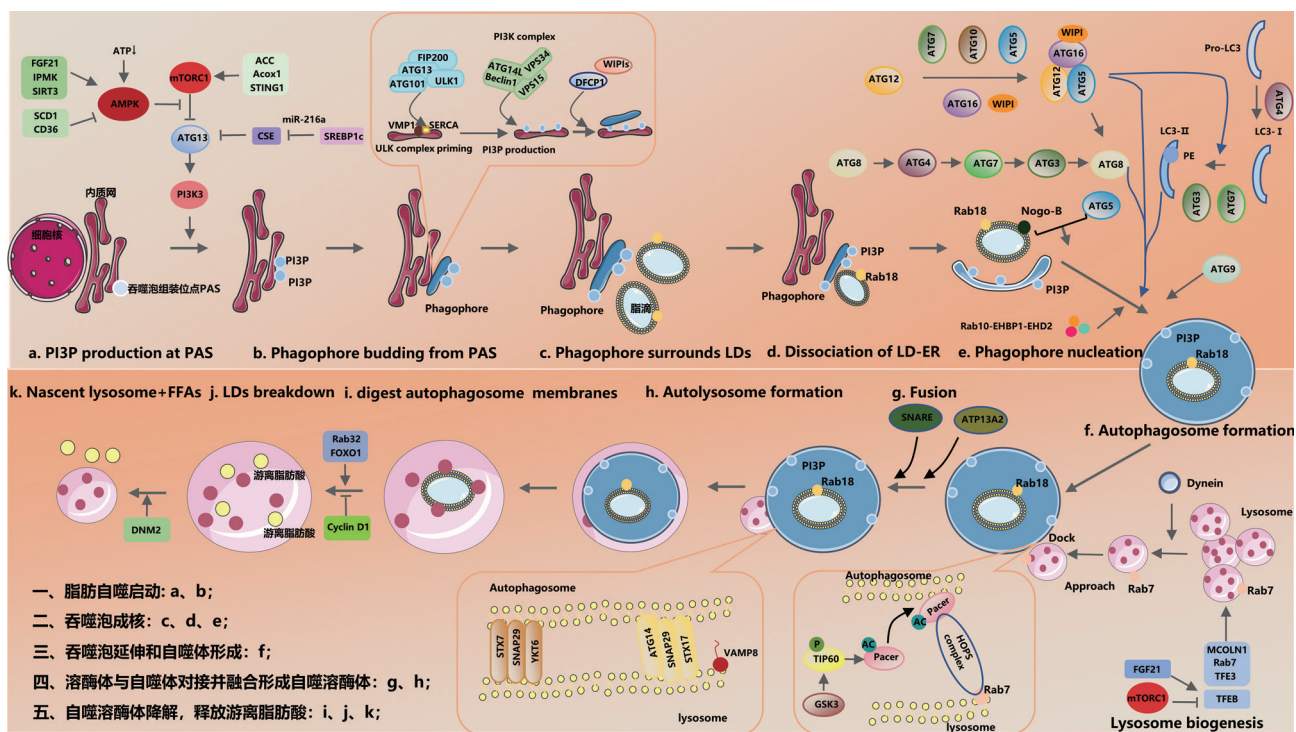
3 脂质自噬的启动过程

3.1 脂质自噬启动与成核

当机体营养缺乏时, 为响应体内三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 水平的降低, 积累的单磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP) 会激活 AMP 依赖的蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK), 并通过抑制靶标哺乳动物雷帕霉素复合物 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1), 从而抑制失调 51 样激酶 1 (uncoordinated

51-like kinase 1, ULK1) 复合物的活化^[38-39]。ULK1 复合物由 ULK1 或 ULK2、ATG13、ATG101 和 200 kD 的黏着斑激酶家族相互作用蛋白 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD, FIP200) 组成^[39-40]。ULK1 复合物的激活会进一步激活III类磷脂酰肌醇 3 激酶 (class III PI3-kinase, PI3K) 复合物的几种组分——催化脂质激酶亚基 VPS34、调控元件 Beclin1 以及 VPS15、ATG14L 和自噬/ 苜蓿素 1 调节因子 (activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1, Ambra1)^[39, 41-42], 进而导致吞噬泡组装位点 (phagophore assembly site, PAS) 局部产生磷脂酰肌醇 3- 磷酸 (phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P), PI3P 将效应蛋白, 即 WD 重复结构域蛋白 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting proteins, WIPIs) 和含双 FYVE 结构域蛋白 1 (double FYVE-containing protein 1, DFCP1) 募集, 并形成欧

米茄体 (omegasome), 以作为吞噬泡 (phagophore, also named the crescent-shaped isolation membrane) 生物合成以及吞噬泡扩展延伸的起点^[43-44]。WIPIs 家族成员包括 WIPI1 和 WIPI4, 它们在招募脂质转运蛋白 ATG2A 和 ATG2B 中发挥作用, ATG2A 和 ATG2B 随后负责将脂质从 ER 转移到吞噬泡^[45-49]。内质网膜上含有 PI3P 的部分形成吞噬泡, ER 上 PAS 吞噬泡的出芽即表明自噬起始^[44]。随后, 吞噬泡与 ER 脱离, 接近并包住同样来源于 ER 的 LDs 以诱导吞噬泡成核 (图 2)。虽然众多研究已经表明, ER 在吞噬泡的形成以及扩展延伸中起着关键作用, 但目前关于吞噬泡形成后, ER 如何继续和其相互接触帮助其“成长”, 这一接触过程是如何被调节的, 接触过程如何维持以及完成接触后如何“拆卸”, 这些问题在很大程度上仍然未知。研究表明正常情况下, ER 上的自噬蛋白 VMP1/EPG-3 (metazoan-specific



一、脂质自噬启动: 在各种信号刺激下, ULK1复合物激活PI3K复合物, 导致PAS产生PI3P (a)。ER上含有PI3P的膜部分会成为吞噬泡(Phagophore), 这一过程离不开DFCP1和WIPIs的帮助。ER 中 PAS吞噬泡的出芽(b)提示自噬起始。二、吞噬泡成核: 吞噬泡形成后, 与ER脱离, 同时接近并包住来自ER的LDs, 以诱导吞噬泡扩增成核(c、d、e)。三、吞噬泡延伸和自噬体形成: 有核的吞噬泡随后在两套泛素样蛋白偶联系统及其他相关组分的参与下伸长形成自噬体(f)。四、溶酶体与自噬体对接并融合形成自噬溶酶体: 调节溶酶体生成相关基因的转录水平升高以促进溶酶体的生物发生, 随后动力蛋白Dynein帮助溶酶体接近并停靠在自噬体上, Rab7和HOPS复合物介导溶酶体向自噬体的靶向和融合(g), 融合完毕后形成自噬溶酶体(h)。五、自噬溶酶体降解和游离脂肪酸释放: 自噬溶酶体形成后, 溶酶体降解自噬体的内膜(i), 两者的内容物合为一体, 随后LDs被LAL分解成FFAs(j)。Rab32和FOXO1促进LDs的分解, 而CCND1抑制这一过程, DNM2促进FFAs和新生溶酶体的释放(k)。

图2 脂质自噬的步骤(根据参考文献[44]修改)

ER-localized transmembrane protein EPG-3) 可通过促进 SERCA (endoplasmic reticulum calcium ATPase 2) 的活性来控制 ER 与吞噬泡的接触过程, 这一发现说明位于 ER 和吞噬泡上的其他自噬蛋白之间的相互作用也可能有助于 ER 和吞噬泡之间接触的形成^[50]。除了上述内容外, 脂质自噬的启动过程还涉及到其他的多条通路和多个关键蛋白^[39]。例如研究发现 HFD 会诱导肝脏固醇调节元件结合蛋白 1c (sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c) 的表达增加并促进其靶标 miR-216a 的表达, miR-216a 进而抑制胱硫醚 γ -裂解酶 (cystathionine gamma-lyase, CSE) 的表达, 导致细胞内 H₂S 生成增加, 从而使得 ULK Cys951 位点硫酸化程度增强, 损害其活性进而抑制了自噬水平^[51]。其他涉及自噬启动调控的部分见后文。

3.2 吞噬泡延伸和自噬体形成

有核的吞噬泡形成后, 会在两套泛素-蛋白酶体系统的帮助下伸长形成自噬体, 它们分别是 ATG12 系统和 ATG8 系统^[52-53]。ATG12 系统利用类 E1 泛素活化酶 ATG7 和类 E2 泛素偶联酶 ATG10 将泛素样蛋白 ATG12 偶联到 ATG5 上, 随后与二聚体 ATG16 共同形成 ATG12-ATG5-ATG16 (ATG16L) 复合体^[54]。ATG8 在哺乳动物细胞中的同源物是 LC3, 该系统包括半胱氨酸蛋白酶 ATG4、ATG7 和类 E2 泛素结合酶 ATG3^[54]。为了形成自噬体, ATG8 首先被具有蛋白内切酶活性的 ATG4 在羧基端剪切, 生成胞质 LC3-I^[55]。2021 年, ATG4 被发现可独立于 ATG8, 在线粒体自噬中促进吞噬泡的生长, 并可通过其邻近蛋白在脂质转移过程中促进吞噬泡和 ER 的接触^[56]。ATG8 由 ATG4 切割暴露其羧基端的甘氨酸以用于连接后^[57], ATG12-ATG5-ATG16 (ATG16L) 复合体会“扮演”E3 泛素连接酶的角色, 促进 ATG8 和自噬膜中的磷酸酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) 的酰胺基团 (amide group) 连接形成 LC3-II^[54]。ATG9 是自噬相关蛋白中的唯一一个跨膜蛋白, 除了在从脂滴到自噬小体和线粒体的脂质动员过程中发挥关键作用外, 还能在体外促进 ATG2-ATG18 复合物介导的脂质转移, 并提供吞噬泡伸长所需的膜成分^[58-59]。位于吞噬泡内膜或外膜上的 LC3-II, 通过与 p62 (sequestosome 1)、OPTN (optineurin) 和 NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1) 等泛素依赖性的选择性自噬受体蛋白相互作用来将各种“货物”递送到吞噬泡中^[60-61]。与此同时, 吞噬泡膜上活化的 Rab10, 即 Rab GTP 酶, 能与其效应

蛋白 (the endocytic adaptor Eps15 homology domain binding protein 1, EHP1) 以及腺苷三磷酸酶 (ATPase) 和含 EH 结构域 2 蛋白 (EH domain containing 2, EHD2) 结合, 形成的三聚体复合物将吞噬泡膜延伸至 LDs 表面, 最终导致 LDs 被吞噬并形成完整的自噬体^[62]。Nogo-B (epithelial reticulon 4B, Nogo-B) 是定位于 ER 和 LDs 上的网状蛋白, 其表达水平可随 CD36 摄取氧化修饰低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, oxLDL) 增加导致 CEBP β (CAAT enhancer binding protein beta, CEBP β) 表达增加后, 由 CEBP β 促进, 增加的 Nogo-B 可以和 ATG5 共同促进自噬体的形成^[63]。总之, 虽然现在人们对吞噬泡延伸和自噬体形成过程越来越了解, 但还有一些问题尚不清晰, 例如, 脂滴是如何被识别为“货物”的, 自噬相关蛋白是如何被募集到脂滴表面的, 回答以上问题对于了解脂质自噬的分子机制十分重要^[64]。

3.3 溶酶体与自噬体对接融合形成自噬溶酶体

自噬体形成后, 需要和溶酶体发生融合形成自噬溶酶体以降解自噬体中的货物。上调溶酶体基因的表达有助于促进溶酶体的生成, 进而增加自噬通量。在饥饿条件下, 黏脂蛋白 TRP 阳离子通道 2 (mucopolip TRP cation channel 2, MCOLN2) 激活钙调神经磷酸酶 (PP2B/calcineurin), 进而去磷酸化胞质中的转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB)^[38, 65]。去磷酸化的 TFEB 随即转位到细胞核并直接与溶酶体基因网络 CLEAR (coordinated lysosomal expression and regulation) 启动子位点结合, 促进溶酶体基因表达^[66-67]。此外, 转录因子 E3 (TFE3) 同样会转位到细胞核并与 CLEAR 结合, 从而诱导溶酶体生物发生^[68]。溶酶体形成后, 在动力蛋白 (dynein) 的帮助下与自噬体对接融合形成自噬溶酶体 (autolysosome)^[69]。与 Rab10 一致, Rab7 同样是小 Rab GTP 酶 Ras 超家族的成员, 活化的 Rab7 是 LDs 的基本组成部分, 可促进脂噬性突触 (lipophagic synapses) 的形成, 以介导自噬体向溶酶体的靶向融合。Pacer 是 2017 年发现的一种自噬调节因子^[70], 小鼠肝细胞特异性敲除 Pacer 会导致自噬通量降低、肝脏糖原和脂质积累, Pacer 的活性受到 mTORC1 的调控。在营养充足时, mTORC1 会增加 Pacer serine157 位点磷酸化水平, 随即扰乱 Pacer 通过其 N-末端结构区和 Stx17 以及 HOPS 复合物 (homotypic fusion and protein sorting complex, HOPS complex) 的联系, 进而阻止 Pacer 介导自噬体形成。而当条件转为营养匮乏时, 去磷酸化的 Pacer 会在组蛋白乙酰基转移酶 TIP60 (tat-

interacting protein 60, TIP60) 的帮助下发生乙酰化, 这促进了 HOPS 复合物的募集, 进而促进自噬体成熟和脂滴清除, 而糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase-3, GSK3) 则可以磷酸化 TIP60 的 serine86 位点, 进而激活 TIP60 并激活自噬^[71]。Rab7 可以通过招募 HOPS 复合物使其与溶酶体结合^[72]。可溶性 NSF 附着蛋白受体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE) 是一种进化上保守的膜锚定蛋白家族, 在介导自噬体 - 溶酶体融合中具有重要作用^[73]。ATP13A2 (ATPase cation transporting 13 A2) 是一种晚期溶酶体转运蛋白, 可通过促进组蛋白去乙酰化酶 6 (histone deacetylase 6, HDAC6) 招募到溶酶体, 进而促进自噬体和溶酶体融合^[74]。自噬体与溶酶体的融合还受到两种可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (soluble NSF attachment protein receptors, SNARE) 复合物的调控^[75], 第一种 SNARE 复合物包括蛋白质 STX17 (syntaxin 17)、SNAP29 (synaptosomal-associated protein 29) 和 VAMP8 (vesicle-associated membrane protein 8)^[75]。STX17 募集并与自噬体上的胞质蛋白 SNAP29 形成二元复合物, 自噬相关蛋白 ATG14 可直接与该二元复合物结合^[76], 然后该复合物与溶酶体蛋白 VAMP8 形成三元 SNARE 复合物, 这种 STX17-SNAP29-VAMP8 复合物将自噬体和溶酶体拉在一起以实现膜融合^[77]。第二种 SNARE 复合物是 YKT6-SNAP29-STX7, YKT6 可以通过其 N 末端 longin 结构域与自噬体结合, 进而与 SNAP29 和溶酶体上的 STX7 一起形成三元复合物以帮助自噬体和溶酶体的融合^[78-79]。需要更多的研究来确定这两种 SNARE 复合物在功能上的区别, 并更多地解析自噬体与溶酶体的融合机制。

3.4 自噬溶酶体降解和 FFA 释放

自噬溶酶体形成后, 最初定位在溶酶体中的 LAL 会作用于储存在 LDs 中的 TG, 并将其降解为 FFAs 释放到细胞质中^[21]。LAL 由 Lipa (lysosomal acid type, Lipase A) 基因编码且普遍表达, 在肝细胞和巨噬细胞中表达量最高, 负责降解胆固醇酯 (cholesteryl ester, CE)、TG、甘油二酯 (DG) 和维生素 A 酯 (retinyl esters)^[80-84], 是目前已知的唯一可以在溶酶体酸性条件下保持活性的中性脂质水解酶^[84]。不似中性脂肪酶, LAL 的表达主要受转录调控, 目前已知可以激活 LAL 表达的转录因子包括过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)、叉头盒蛋白 O1 (forkhead box O1,

Foxo1) 和 E-box 转录因子 (transcription factor EB, TFEB) 和转录因子结合 IGHM 增强子 3 (transcription factor binding to IGHM enhancer, TFE3)^[85]。研究表明 FOXO1 可通过上调 LAL 的表达触发脂质自噬, 然后促进自噬溶酶体中 TG 的分解代谢, 这一作用在脂肪组织中得到了验证, 但在肝细胞中是否相同仍然未知^[86]。此外, 尽管脂质自噬的调节机制尚未完全阐明, 但属于 Ras 超家族并参与膜运输过程的小 Rab GTP 酶蛋白被认为直接调节脂质自噬, 如前所述 Rab7 和 Rab10 以及 Rab18 和 Rab32 等已被发现在脂质自噬中起重要作用^[87]。Rab32 是一种小型 GTPase, 属于多功能的囊泡相关蛋白, 可在溶酶体和自噬体中表现出环状定位模式, 加速脂质 LDs 分解 (LDs breakdown)^[88]。LDs 降解过程会迅速消耗细胞内的溶酶体, 为了维持细胞内溶酶体稳态, 自噬溶酶体会发生管化, 回收并生成新溶酶体 (nascent lysosome), 这一过程被称为自噬溶酶体再生^[89]。GTPase 发动蛋白 2 (Dynamin 2, DN2) 可通过促进脂噬过程中新生溶酶体与自噬溶酶体管 (autolysosomal tubules) 的“断连”来促进脂质自噬^[90]。而与 DN2 和 Rab32 促进脂质自噬的功能相反, 细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1, CCND1) 作用于 LDs, 通过增加 LDs 的数量或破坏 LDs 在自噬溶酶体中的降解来干扰脂质自噬^[91]。目前, 溶酶体介导 LDs 降解后产生的 FFAs 如何离开溶酶体的机制尚不清楚, 并且离开溶酶体后去往何处同样尚不清楚。有研究认为 FFAs 在离开溶酶体后, 优先会被外排离开细胞随后再被细胞摄取并被引导至氧化途径^[92]。这一结果好像与脂质自噬降解 LDs 为细胞提供氧化底物以满足能量需求的初衷相违背, 并且直观地说, 将溶酶体衍生的 FFAs 直接转运到线粒体进行 β -氧化或者进行再酯化似乎是合乎逻辑和最有效的。关于 FFAs 外排的一个可能原因是: 细胞内过多的 FFAs 会作为底物产生脂毒性物质, 导致细胞死亡, 因此细胞必须将其外排。另一项基于肝细胞的研究也发现, FFAs 在细胞之间转移较为常见, 积累更多 LDs 的肝细胞会将 FFAs 转移到脂质储存较少的邻近细胞中^[93]。以上结果说明, FFAs 的外排可能是允许细胞根据自身代谢需求选择再摄取与否, 从而作为降低脂毒性的保护机制或作为将能量重新分配给邻近细胞的手段。由于肝脏是一个高度分区的器官, 因此, 外排的 FFAs 是否以及如何影响非肝细胞的脂质代谢, 这一影响是否又会对肝脏整体的脂质代谢产生影响, 以上问题有待于进一步研究。

4 脂质自噬对肝脏脂质代谢的影响

肝细胞在不同的应激反应下, 可通过不同的转录因子和信号通路调节脂质自噬的启动和发生过程; 同时, 近年来研究表明一些激素、植物提取物和中草药、化学药物乃至不同的生活方式等都可以通过影响脂质自噬进而调控肝脏脂质代谢, 了解其中的机制有助于我们更好地开发肝脏脂质代谢紊乱的治疗方案^[11, 22, 44, 94]。

4.1 调控脂质自噬的关键因子

研究发现一些因素可通过作用于 AMPK/mTORC1 来调节脂质自噬。例如, 成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21) 可通过多种途径激活 AMPK 促进自噬^[95-96]。作为一种主要由肝脏分泌的激素, FGF21 在控制全身葡萄糖和脂质代谢方面发挥重要作用, 应当注意的是, FGF21 的许多代谢作用是通过 AMPK 信号通路产生的, 例如, FGF21 可激活 AMPK 进而增强胰岛素敏感性, 增加葡萄糖摄取, 同时还可以增加脂质氧化并抑制脂肪生成^[97]。并且, 多项研究表明 AMPK 激活同样可以调节 FGF21 的表达^[98-100], 例如二甲双胍可促进 AMPK 活化进而诱导肝脏 FGF21 表达^[99]。研究发现, AMPK 与 FGF21 之间的相互作用可能与前馈调节机制有关, 如当心肌缺血发作后, 循环中的饱和脂肪酸和去甲肾上腺素水平显著增加, 诱导 AMPK 磷酸化, 进而激活 AMPK 的下游靶标, 如 SIRT1、PGC-1 α 和 FGF21, 然后 FGF21 以自分泌方式激活心肌细胞中的 AMPK, 进而有助于维持线粒体稳态和保护心脏^[101], 这一调节方式在肝细胞中是否同样存在有待研究。与 FGF21 相反, 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (stearoyl-coenzyme A desaturase 1, SCD1) 是通过抑制 AMPK 活性来抑制自噬从而促进肝细胞脂质沉积^[102]。此外, CD36 表达的增加、肌醇多磷酸激酶 (inositol polyphosphate multikinase, IPMK) 的缺失以及去乙酰化酶 SIRT3 (sirtuin 3) 表达的减少可通过促进 AMPK 保持在“静息”状态而抑制自噬^[102-104]。而干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING)、酰基辅酶 A 氧化酶 1 (acyl-CoA oxidase 1, Acox1) 和乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 则可通过 mTORC1 发挥作用^[105-107]。

4.2 调控脂质自噬的天然产物和药物

中草药和植物提取物是来自自然界的天然资源, 大多具有来源广泛、功能多样、安全方便等特

点且无残留、无抗药性、毒副作用小, 是药物开发的良好资源^[108-109]。我国自古以来就有“药食同源”的说法, 随着现代社会的发展, 越来越多的人开始重视中草药和植物提取物在治疗代谢性脂肪肝病中的作用^[110-113]。此外, 一些药物也展现出靶向脂质自噬抑制肝脏脂质沉积的疗效, 详见表 1。

4.3 生活方式对脂质自噬的影响

4.3.1 运动对脂质自噬的影响

越来越多证据表明适度运动有助于缓解脂肪肝病, 并且 MAFLD 最常推荐的治疗方法除了饮食限制外就是运动^[16], 然而运动通过何种方式减少肝脏脂质含量目前尚不明晰^[127]。近年来几项研究表明, 运动可影响肝细胞 LDs 动力学, 并促进脂质自噬进而促进脂代谢^[96, 128-130]。15 周的跑步机运动可以缓解 HFD 引起的小鼠肝脂肪变性、炎症和肝损伤, 并通过抑制促进脂质积聚的 LDs 包被蛋白 Plin2 (adipose differentiation related protein)、Plin3 (tail-interacting protein 47) 和参与 LDs 生长、出芽和扩增的脂肪储存诱导跨膜蛋白 2 (fat storage inducing transmembrane protein 2, FITM2)、细胞死亡诱导 DFFA 样效应蛋白 A (cell death inducing DFFA like effector A, CIDEA) 和脂肪特异性蛋白 27 (fat-specific protein of 27, FSP27) 的表达来降低 LDs 的大小^[129]。同时运动还促进了脂质自噬相关蛋白如 ATG5、LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1)、LAMP2、LAL 和 CTSD (cathepsin D) 的表达, 并增加了 LAMP1 和 LDs 的共定位, 这抑制了脂滴的异常扩增并增强了溶酶体对 LDs 的清除^[129]。另一项研究同样表明 16 周游泳训练可以通过刺激 AMPK/SIRT1 信号转导通路, 并增加 LAMP1 和 LDs 的共定位进而激活脂质自噬, 改善脂肪肝小鼠脂滴代谢障碍^[130]。不过, 另有研究表明运动 8 周虽然可以减少脂肪肝小鼠肝损伤和肝细胞内 LDs 的大小, 但却不能减少肝内 TG 含量, 并无法增加 LDs 和 LC3 的共定位, 这可能与不同研究中小鼠的运动时长以及年龄不同有关^[128]。此外, 尽管运动可以改善脂肪肝病, 但目前尚不清楚运动的持续时间和强度如何直接或间接刺激肝脏中的脂质自噬, 鉴于运动对全身机体代谢的影响, 了解运动如何影响肝脏和其他器官之间的串扰也很重要^[131-132]。研究表明运动可刺激肌肉产生 FGF21 进入循环到达肝脏, 随后通过 AMPK 依赖性途径促进脂质自噬^[96]。

4.3.2 禁食对脂质自噬的影响

间歇性饮食在过去几年受到广泛关注, 虽然部

表1 天然产物和药物在治疗脂肪肝中的作用

动物模型	天然产物和药物	试验结果	文献
8周龄C57BL/6J小鼠	刺芒柄花素	体重和肝脏重量↓ 肝脏TG含量↓ 胰岛素抵抗↓ 肝功能↑ 脂质自噬↑	[114]
8周龄C57BL/6小鼠	甘草香豆素	肝脏TG含量↓ 脂肪酸合酶表达↓ 脂质自噬↑	[115]
6周龄db/db小鼠	人参皂苷Rb2	体重、肝脏重量↓肝脏TG含量↓ Sirt1表达↑AMPK磷酸化↑ 脂质自噬↑	[116]
Sprague-Dawley大鼠	槲皮素	肝脏TG和胆固醇含量↓肝脏高密度脂蛋白胆固醇↑VLDL↑ 溶酶体和LDs共定位↑脂质自噬↑	[117]
8周龄C57BL/6小鼠	海藻糖	肝脏TG、胆固醇和FFAs↓ AMPK磷酸化↑ULK1磷酸化↑ 脂质自噬↑	[118]
6~8周龄C57BL/6小鼠	黄芩素	叉头框蛋白1表达↑重组人效应蛋白1表达↑ 自噬通量↑脂质自噬↑ 内质网应激↓	[119]
4~6周龄Wistar大鼠	萝卜硫素	ATG5、ATG7和LDs的共定位↑ 脂质自噬↑	[120]
6周龄C57BL/6 J小鼠	连翘脂素	体重↓肝脏重量↓肝脏TG↓ 胆固醇含量↓巨噬细胞浸润↓ 肝功能↑脂质自噬↑	[121]
9~10周龄C57BL/6 ApoE ^{-/-} 小鼠	川陈皮素	体重↓肝损伤程度↓ 肝脏炎症程度↓ TFEB↑脂质自噬↑	[122]
6周龄C57BL/6小鼠	益母草苷	体重↓肝脏TG及胆固醇含量↓ 胰岛素抵抗↓肝损伤程度↓ 溶酶体数量↑脂质自噬↑	[123]
10周龄db/db小鼠	甜菊糖苷	体重↓血清TG及胆固醇含量↓ AMPK磷酸化↑ TFEB↑脂质自噬↑	[124]
6~8周龄小鼠	和厚朴酚	肝脏甘油三酯含量↓肝功能↑ 脂质自噬↑ 线粒体数量↑线粒体功能↑	[125]
5周龄C57B/6J小鼠	非诺贝特	体重↓肝脏重量和TG含量↓ 肝脏炎症水平↓胰岛素抵抗↓ 自噬通量↑脂质自噬↑	[126]

注：↓表示减少，↑表示增加；

分研究认为其对人类健康具有积极影响，例如可改善肥胖、胰岛素抵抗、血脂异常、高血压和炎症，但其对MAFLD的作用机制仍然难以捉摸^[133-134]。有证据表明，脂质自噬介导了禁食对肝脏脂质代谢的影响。禁食可以激活脂肪肝小鼠肝脏AMPK/ULK1信号通路，并抑制mTOR的磷酸化进而促进脂质自噬^[135]。禁食还可促进肝脏中FGF21和PPAR α

的表达^[136]，FGF21随后激活蛋白激酶A (protein kinase A, PKA)，增加组蛋白去甲基化酶JMJD3 (jumonji domain containing-3) Thr-1044位点磷酸化水平，进而增加JMJD3的核定位及其与PPAR α 的互作。JMJD3随后可通过降低Tfeb、Atg27、Atg1和Fgf21的组蛋白H3K27me3的水平来促进它们的表达，最终促进自噬介导的脂质降解^[137]。

5 结论与展望

肝脏是一个高度动态的代谢器官, 在糖异生和糖原储存、脂质代谢等生理过程中起着关键作用^[44]。过去几十年的研究表明, 自噬是由溶酶体介导的细胞分解代谢过程, 在维持肝脏和代谢稳态方面扮演重要角色。肝脏脂质自噬功能障碍可导致各种肝脏疾病^[22, 138]。目前, 异常的脂质自噬如何导致肝脏脂质代谢紊乱的具体细节尚不清楚^[44]。随着单细胞测序、蛋白质组学和下一代测序等其他技术的发展, 发现和解析更多与脂质自噬相关的枢纽因子将有助于更好地了解其中的潜在机制和开发新的脂肪肝治疗方案。具体而言, 一方面, 鉴于自噬底物的多样性和调控网络的复杂性, 识别和鉴定特异性影响脂质自噬的蛋白质、代谢产物和信号通路等将会是未来的研究重点, 这将有利于多通道、多靶点药物的设计和开发; 另一方面, 虽然许多靶向脂质自噬相关因子的候选药物已经或正在被开发研究, 并已在多种脂肪肝小鼠模型中显示出了治疗效果^[44], 但由于部分候选药物可能还会影响其他类型自噬以及同一组织中不同细胞中的脂质自噬, 因此施用这些药物是否会导致不同类型自噬以及不同细胞中自噬的过度激活, 进而产生副作用有待进一步研究。除了脂质自噬调控机制尚不明晰外, 如何准确测定活细胞中的脂质自噬通量是另一个重要问题。解决这一问题的主要挑战是构建 LDs 的真正标记物, 从而能以高灵敏度观察巨脂噬或微脂噬途径并准确测量这些细胞器的吞噬和降解过程。值得注意的是, 一种小分子探针 Q-lipo 已展现出对 LDs 良好的动态跟踪能力, 并可在酸性条件下发出近红外荧光, 从而有利于通过活细胞成像及流式细胞术检测脂质自噬^[139]。而目前除 Q-lipo 和另一种探针 CMHCH 外^[140], 可用于脂肪自噬成像的荧光探针很少, 开发更多的活细胞脂质自噬成像工具将为理解其分子机制和阐明其生物学作用提供新的见解。此外, 构建合适的活细胞脂质自噬监测条件也很重要。当下体外常见的脂质自噬诱导条件是在营养完全剥夺或部分剥夺条件下进行细胞培养, 这一体外模型是否合理值得进一步商榷, 因为机体即便在禁食/饥饿条件下, 各种营养物质对组织器官的供应也只是会减少而不会完全丧失^[37]。最后, 当下的研究主要集中在利用营养或遗传等手段激活或抑制脂质自噬, 以观察脂质自噬在生命活动中的作用^[141], 且一系列结果表明脂质自噬最重要的任务似乎只是在营养

缺乏时促进 LDs 分解来维持足够的 β -氧化水平以提供 ATP^[142]。但在正常的生理状态下, 脂质自噬存在的意义及其对机体脂质代谢的影响目前尚不了解, 未来进行这方面的研究具有一定的意义, 因为即便脂质自噬在正常情况下对脂质代谢的影响很小, 其也有可能帮助机体应对短期脂质过载方面起着重要作用^[143]。

[参 考 文 献]

- [1] Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 3313-27
- [2] Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 2018, 8: 1-22
- [3] Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. *J Hepatol*, 2020, 73: 202-9
- [4] Eslam M, Sanyal AJ, George J, et al. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology*, 2020, 158: 1999-2014
- [5] Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*, 2018, 24: 908-22
- [6] Tanaka T, Kusakabe T, Ebihara K, et al. Practice guideline for lipodystrophy syndromes-clinically important diseases of the Japan Endocrine Society (JES) Preface. *Endocr J*, 2021, 68: 1027-42
- [7] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 2005, 115: 1343-51
- [8] Cariou B, Byrne CD, Loomba R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease as a metabolic disease in humans: a literature review. *Diabetes Obes Metab*, 2021, 23: 1069-83
- [9] Yang XC, Okamura DM, Lu XF, et al. CD36 in chronic kidney disease: novel insights and therapeutic opportunities. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13: 769-81
- [10] Zeng H, Qin H, Liao M, et al. CD36 promotes *de novo* lipogenesis in hepatocytes through INSIG2-dependent SREBP1 processing. *Mol Metab*, 2022, 57: 101428
- [11] Grefhorst A, van de Peppel IP, Larsen LE, et al. The role of lipophagy in the development and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Front Endocrinol*, 2021, 11: 601627
- [12] Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of *de novo* lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2010, 45: 199-214
- [13] Schwarz JM, Neese RA, Turner SM, et al. Effect of fructose ingestion on glucose-production (Gp) and *de-novo* lipogenesis (dnl) in normal and hyperinsulinemic obese humans. *Diabetes*, 1994, 43: A52-A52

- [14] Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, et al. *De novo* lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 2014, 63: 895-902
- [15] Zhao S, Jang C, Liu J, et al. Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate. *Nature*, 2020, 579: 586-91
- [16] Badmus OO, Hillhouse SA, Anderson CD, et al. Molecular mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD): functional analysis of lipid metabolism pathways. *Clin Sci*, 2022, 136: 1347-66
- [17] Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 1079-86
- [18] Sparks JD, Sparks CE, Adeli K. Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 2104-12
- [19] Wang XY, Guo M, Wang Q, et al. The patatin-like phospholipase domain containing protein 7 facilitates VLDL secretion by modulating ApoE stability. *Hepatology*, 2020, 72: 1569-85
- [20] Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 521-7
- [21] Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective. *Cell*, 2019, 176: 11-42
- [22] Byrnes K, Blessinger S, Bailey NT, et al. Therapeutic regulation of autophagy in hepatic metabolism. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 33-49
- [23] Faruk MO, Ichimura Y, Komatsu M. Selective autophagy. *Cancer Sci*, 2021, 112: 3972-8
- [24] Singh R, Kaushik S, Wang YJ, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 2009, 458: 1131-5
- [25] Liu Q, Wang YM, Gu HF. Lipophagy in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 2020, 511: 208-14
- [26] Haidar M, Loix M, Bogie JFJ, et al. Lipophagy: a new player in CNS disorders. *Trends Endocrinol Metab*, 2021, 32: 941-51
- [27] Maan M, Peters JM, Dutta M, et al. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504: 582-9
- [28] Zhang S, Peng XQ, Yang S, et al. The regulation, function, and role of lipophagy, a form of selective autophagy, in metabolic disorders. *Cell Death Dis*, 2022, 8: 132
- [29] Filali-Mounecef Y, Hunter C, Roccio F, et al. The menage a trois of autophagy, lipid droplets and liver disease. *Autophagy*, 2022, 18: 50-72
- [30] van Zutphen T, Todde V, de Boer R, et al. Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2014, 25: 290-301
- [31] Martinez-Lopez N, Garcia-Macia M, Sahu S, et al. Autophagy in the CNS and periphery coordinate lipophagy and lipolysis in the brown adipose tissue and liver. *Cell Metab*, 2016, 23: 113-27
- [32] Sathyanarayan A, Mashek MT, Mashek DG. ATGL promotes autophagy/lipophagy via SIRT1 to control hepatic lipid droplet catabolism. *Cell Rep*, 2017, 19: 1-9
- [33] Sathyanarayan A, Khan S, Mashek M, et al. ATGL-catalyzed lipolysis regulates SIRT1 to control PGC-1 α /PPAR- α signaling. *Diabetes*, 2015, 64: 418-26
- [34] Schott MB, Weller SG, Schulze RJ, et al. Lipid droplet size directs lipolysis and lipophagy catabolism in hepatocytes. *J Cell Biol*, 2019, 218: 3320-35
- [35] Madrigal-Matute J, Cuervo AM. Regulation of liver metabolism by autophagy. *Gastroenterology*, 2016, 150: 328-39
- [36] Schulze RJ, Krueger EW, Weller SG, et al. Direct lysosome-based autophagy of lipid droplets in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 32443-52
- [37] Schulze RJ, Sathyanarayan A, Mashek DG. Breaking fat: the regulation and mechanisms of lipophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862: 1178-87
- [38] Han JB, Wang YG. mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism. *Protein Cell*, 2018, 9: 145-51
- [39] Xiang HG, Zhang JF, Lin CC, et al. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 569-81
- [40] Lee YG, Jeon TI. Modulation of the autophagy-lysosomal pathway in hepatocellular carcinoma using small molecules. *Molecules*, 2020, 25:1580
- [41] Wirth M, Joachim J, Tooze SA. Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23: 301-9
- [42] Stjepanovic G, Baskaran S, Lin MG, et al. Vps34 kinase domain dynamics regulate the autophagic PI 3-kinase complex. *Mol Cell*, 2017, 67: 528-34
- [43] Twu WI, Lee JY, Kim H, et al. Contribution of autophagy machinery factors to HCV and SARS-CoV-2 replication organelle formation. *Cell Rep*, 2021, 37: 110049
- [44] Li HY, Peng ZG. Targeting lipophagy as a potential therapeutic strategy for nonalcoholic fatty liver disease. *Biochem Pharmacol*, 2022, 197: 114933
- [45] Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 349-64
- [46] Kotani T, Kirisako H, Koizumi M, et al. The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: 10363-8
- [47] Maeda S, Otomo C, Otomo T. The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes. *Elife*, 2019, 8: e45777
- [48] Osawa T, Kotani T, Kawaoka T, et al. Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26: 281-8
- [49] Zheng JX, Li Y, Ding YH, et al. Architecture of the ATG2B-WDR45 complex and an aromatic Y/HF motif crucial for complex formation. *Autophagy*, 2017, 13: 1870-83
- [50] Zhao YG, Chen Y, Miao GY, et al. The ER-localized transmembrane protein EPG-3/VMP1 regulates SERCA activity to control ER-isolation membrane contacts for autophagosome formation. *Mol Cell*, 2017, 67: 974-89
- [51] Nguyen TTP, Kim DY, Lee YG, et al. SREBP-1c impairs ULK1 sulfhydration-mediated autophagic flux to promote

- hepatic steatosis in high-fat-diet-fed mice. *Mol Cell*, 2021, 81: 3820-32
- [52] Yang MJ, Zhang YM, Ren J. Autophagic regulation of lipid homeostasis in cardiometabolic syndrome. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5: 38
- [53] Walczak M, Martens S. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy*, 2013, 9: 424-5
- [54] Zhang SD, Yazaki E, Sakamoto H, et al. Evolutionary diversification of the autophagy-related ubiquitin-like conjugation systems. *Autophagy*, 2022, 18: 2969-84
- [55] Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 3290-8
- [56] Lahiri V, Klionsky DJ. ATG4-family proteins drive phagophore growth independently of the LC3/GABARAP lipidation system. *Autophagy*, 2021, 17: 1293-5
- [57] Maruyama T, Noda NN. Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *J Antibiot*, 2018, 71: 72-8
- [58] Ramirez SC, Gomez-Sanchez R, Verlhac P, et al. --Atg9 interactions via its transmembrane domains are required for phagophore expansion during autophagy. *Autophagy*, 2023, 19: 1459-78
- [59] Mailler E, Guardia CM, Bai XF, et al. The autophagy protein ATG9A enables lipid mobilization from lipid droplets. *Nat Commun*, 2021, 12: 6750
- [60] Vargas JNS, Hamasaki M, Kawabata T, et al. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 167-85
- [61] Rasmussen NL, Kournoutis A, Lamark T, et al. NBR1: the archetypal selective autophagy receptor. *J Cell Biol*, 2022, 221: e202208092
- [62] Li ZP, Schulze RJ, Weller SG, et al. A novel Rab10-EHBP1-EHD2 complex essential for the autophagic engulfment of lipid droplets. *Sci Adv*, 2016, 2: e1601470
- [63] Tian Y, Yang B, Qiu WN, et al. ER-residential Nogo-B accelerates NAFLD-associated HCC mediated by metabolic reprogramming of oxLDL lipophagy. *Nat Commun*, 2019, 10: 3391
- [64] Ward C, Martinez-Lopez N, Otten EG, et al. Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861: 269-84
- [65] Medina DL, Di Paola S, Peluso I, et al. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 288-99
- [66] Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, 2009, 325: 473-7
- [67] Franco-Juarez B, Coronel-Cruz C, Hernandez-Ochoa B, et al. TFEB; beyond its role as an autophagy and lysosomes regulator. *Cells*, 2022, 11: 3153
- [68] Martina JA, Diab HI, Lishu L, et al. The nutrient-responsive transcription factor TFE3 promotes autophagy, lysosomal biogenesis, and clearance of cellular debris. *Sci Signal*, 2014, 7: ra9
- [69] Rubinsztein DC, Ravikumar B, Acevedo-Arozena A, et al. Dyneins, autophagy, aggregation and neurodegeneration. *Autophagy*, 2005, 1: 177-8
- [70] Cheng XW, Ma XL, Ding XM, et al. Pacer mediates the function of class III PI3K and HOPS complexes in autophagosome maturation by engaging Stx17. *Mol Cell*, 2017, 65: 1029-43
- [71] Cheng X, Ma X, Zhu Q, et al. Pacer is a mediator of mTORC1 and GSK3-TIP60 signaling in regulation of autophagosome maturation and lipid metabolism. *Mol Cell*, 2019, 73: 788-802
- [72] Balderhaar HJK, Ungermann C. CORVET and HOPS tethering complexes—coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci*, 2013, 126: 1307-16
- [73] Tian XY, Teng JL, Chen JG. New insights regarding SNARE proteins in autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 2021, 17: 2680-8
- [74] Wang RX, Tan JQ, Chen TT, et al. ATP13A2 facilitates HDAC6 recruitment to lysosome to promote autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Biol*, 2019, 218: 267-84
- [75] Li LS, Tong MD, Fu YH, et al. Lipids and membrane-associated proteins in autophagy. *Protein Cell*, 2021, 12: 520-4
- [76] Liu R, Zhi XY, Zhong Q. ATG14 controls SNARE-mediated autophagosome fusion with a lysosome. *Autophagy*, 2015, 11: 847-9
- [77] Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE Syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 2012, 151: 1256-69
- [78] Bas L, Papinski D, Licheva M, et al. Reconstitution reveals Ykt6 as the autophagosomal SNARE in autophagosome-vacuole fusion. *J Cell Biol*, 2018, 217: 3656-69
- [79] Matsui T, Jiang PD, Nakano S, et al. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *J Cell Biol*, 2018, 217: 2633-45
- [80] Grumet L, Eichmann TO, Taschler U, et al. Lysosomal acid lipase hydrolyzes retinyl ester and affects retinoid turnover. *J Biol Chem*, 2016, 291: 17977-87
- [81] Sheriff S, Du H, Grabowski GA. Characterization of lysosomal acid lipase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem*, 1995, 270: 27766-72
- [82] Warner TG, Dambach LM, Shin JH, et al. Purification of the lysosomal acid lipase from human-liver and its role in lysosomal lipid hydrolysis. *J Biol Chem*, 1981, 256: 2952-7
- [83] Ameis D, Merkel M, Eckerskorn C, et al. Purification, characterization and molecular-cloning of human hepatic lysosomal acid lipase. *Eur J Biochem*, 1994, 219: 905-14
- [84] Grabner GF, Xie H, Schweiger M, et al. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nat Metab*, 2021, 3: 1445-65
- [85] Zechner R, Madeo F, Kratky D. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 671-84
- [86] Barbato DL, Tatulli G, Aquilano K, et al. FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin

- treatment. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e861
- [87] Liyun Z, Wu Y. Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. *Eur J Immunol*, 2019, 49: 511
- [88] Wang C, Liu ZH, Huang X. Rab32 Is Important for autophagy and lipid storage in *Drosophila*. *PLoS One*, 2012, 7: e32086
- [89] Saffi GT, Botelho RJ. Lysosome fission: planning for an exit. *Trends Cell Biol*, 2019, 29: 635-46
- [90] Schulze RJ, McNiven MA. A well-oiled machine DNMT2/dynamin 2 helps keep hepatocyte lipophagy running smoothly. *Autophagy*, 2014, 10: 388-9
- [91] Wu H, Ploeger JM, Kamarajugadda S, et al. Evidence for a novel regulatory interaction involving cyclin D1, lipid droplets, lipolysis, and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepato Comm*, 2019, 3: 406-22
- [92] Cui WQ, Sathyanarayan A, Lopresti M, et al. Lipophagy-derived fatty acids undergo extracellular efflux via lysosomal exocytosis. *Autophagy*, 2021, 17: 690-705
- [93] Herms A, Bosch M, Ariotti N, et al. Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. *Curr Biol*, 2013, 23: 1489-96
- [94] Sinha RA, Singh BK, Yen PM. Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14: 259-69
- [95] Lewis JE, Ebling FJP, Samms RJ, et al. Going back to the biology of FGF21: new insights. *Trends Endocrinol Metab*, 2019, 30: 491-504
- [96] Gao Y, Zhang W, Zeng LQ, et al. Exercise and dietary intervention ameliorate high-fat diet-induced NAFLD and liver aging by inducing lipophagy. *Redox Biol*, 2020, 36:101635
- [97] Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. FGF21 activates AMPK signaling: impact on metabolic regulation and the aging process. *J Mol Med*, 2017, 95: 123-31
- [98] Zhou FY, Bai MY, Zhang YQ, et al. Berberine-induced activation of AMPK increases hepatic FGF21 expression via NUR77. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495: 1936-41
- [99] Nygaard EB, Vienberg SG, Orskov C, et al. Metformin stimulates FGF21 expression in primary hepatocytes. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 465282
- [100] Cho W, Choi SW, Oh H, et al. Oroxylin-A alleviates hepatic lipid accumulation and apoptosis under hyperlipidemic conditions via AMPK/FGF21 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 648: 59-65
- [101] Sunaga H, Koitabashi N, Iso T, et al. Activation of cardiac AMPK-FGF21 feed-forward loop in acute myocardial infarction: role of adrenergic overdrive and lipolysis byproducts. *Sci Rep*, 2019, 9: 11841
- [102] Zhou YP, Zhong L, Yu SJ, et al. Inhibition of stearyl-coenzyme A desaturase 1 ameliorates hepatic steatosis by inducing AMPK-mediated lipophagy. *Aging (Albany-NY)*, 2020, 12: 7350-62
- [103] Guha P, Tyagi R, Chowdhury S, et al. IPMK mediates activation of ULK signaling and transcriptional regulation of autophagy linked to liver inflammation and regeneration. *Cell Rep*, 2019, 26: 2692-703
- [104] Li Y, Yang P, Zhao L, et al. CD36 plays a negative role in the regulation of lipophagy in hepatocytes through an AMPK-dependent pathway. *J Lipid Res*, 2019, 60: 844-55
- [105] He A, Chen X, Tan M, et al. Acetyl-CoA derived from hepatic peroxisomal β -oxidation inhibits autophagy and promotes steatosis via mTORC1 activation. *Mol Cell*, 2020, 79: 30-42.e4
- [106] He A, Dean JM, Lu D, et al. Hepatic peroxisomal β -oxidation suppresses lipophagy via RPTOR acetylation and MTOR activation. *Autophagy*, 2020, 16: 1727-8
- [107] Liu KP, Qiu DB, Liang X, et al. Lipotoxicity-induced STING1 activation stimulates MTORC1 and restricts hepatic lipophagy. *Autophagy*, 2022, 18: 860-76
- [108] Veiga M, Costa EM, Silva S, et al. Impact of plant extracts upon human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60: 873-86
- [109] Tovar RT, Petzel RM. Herbal toxicity. *Dis Mon*, 2009, 55: 592-641
- [110] Frasinariu O, Serban R, Trandafir LM, et al. The role of phytosterols in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, 2022, 14: 2187
- [111] Van De Wier B, Koek GH, Bast A, et al. The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57: 834-55
- [112] Zhang L, Yao ZM, Ji G. Herbal extracts and natural products in alleviating non-alcoholic fatty liver disease via activating autophagy. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1459
- [113] Zhang WJ, Lin H, Cheng WL, et al. Protective effect and mechanism of plant-based monoterpenoids in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Agric Food Chem*, 2022, 70: 4839-59
- [114] Wang Y, Zhao HL, Li X, et al. Formononetin alleviates hepatic steatosis by facilitating TFEB-mediated lysosome biogenesis and lipophagy. *J Nutr Biochem*, 2019, 73: 108214
- [115] Zhang EX, Song XH, Yin ST, et al. Glycycomarin prevents hepatic steatosis through activation of adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase signaling pathway and up-regulation of BTG1/Tob-1. *J Funct Foods*, 2017, 34: 277-86
- [116] Huang Q, Wang T, Yang L, et al. Ginsenoside Rb2 alleviates hepatic lipid accumulation by restoring autophagy via induction of Sirt1 and activation of AMPK. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1063
- [117] Zhu XH, Xiong T, Liu PY, et al. Quercetin ameliorates HFD-induced NAFLD by promoting hepatic VLDL assembly and lipophagy via the IRE1a/XBP1s pathway. *Food Chem Toxicol*, 2018, 114: 52-60
- [118] DeBosch BJ, Heitmeier MR, Mayer AL, et al. Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Sci Signal*, 2016, 9: ra21
- [119] Zhang XY, Huo ZJ, Luan HL, et al. Scutellarin ameliorates hepatic lipid accumulation by enhancing autophagy and suppressing IRE1 α /XBP1 pathway. *Phytother Res*, 2022, 36: 433-47
- [120] Lei P, Hu YQ, Gao P, et al. Sulforaphane ameliorates

- hepatic lipid metabolism via modulating lipophagy *in vivo* and *in vitro*. *J Agric Food Chem*, 2022, 70: 15126-33
- [121] Zhou WL, Yan X, Zhai YY, et al. Phillygenin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease via TFEB-mediated lysosome biogenesis and lipophagy. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154235
- [122] Yang XS, Deng YD, Tu YL, et al. Nobiletin mitigates NAFLD via lipophagy and inflammation. *Food Funct*, 2022, 13: 10186-99
- [123] Zhang H, Lu JF, Liu H, et al. Ajugol enhances TFEB-mediated lysosome biogenesis and lipophagy to alleviate non-alcoholic fatty liver disease. *Pharmacol Res*, 2021, 174: 105964
- [124] Park M, Sharma A, Baek H, et al. Stevia and stevioside attenuate liver steatosis through PPAR α -mediated lipophagy in db/db mice hepatocytes. *Antioxidants*, 2022, 11: 2496
- [125] Liu JX, Zhang T, Zhu JZ, et al. Honokiol attenuates lipotoxicity in hepatocytes via activating SIRT3-AMPK mediated lipophagy. *Chin Med*, 2021, 16:115
- [126] Yoo J, Jeong IK, Ahn KJ, et al. Fenofibrate, a PPAR α agonist, reduces hepatic fat accumulation through the upregulation of TFEB-mediated lipophagy. *Metabolism*, 2021, 120: 154798
- [127] Stine JG, DiJoseph K, Pattison Z, et al. Exercise training is associated with treatment response in liver fat content by magnetic resonance imaging independent of clinically significant body weight loss in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 2023, 118:1204-13
- [128] de la Fuente FP, Quezada L, Sepulveda C, et al. Exercise regulates lipid droplet dynamics in normal and fatty liver. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864: 158519
- [129] Yang YJ, Li X, Liu ZH, et al. Moderate treadmill exercise alleviates NAFLD by regulating the biogenesis and autophagy of lipid droplet. *Nutrients*, 2022, 14: 4910
- [130] Li H, Dun YS, Zhang WL, et al. Exercise improves lipid droplet metabolism disorder through activation of AMPK-mediated lipophagy in NAFLD. *Life Sci*, 2021, 273: 119314
- [131] Sabaratnam R, Wojtaszewski JFP, Hojlund K. Factors mediating exercise-induced organ crosstalk. *Acta Physiol (Oxf)*, 2022, 234: e13766
- [132] Gonzalez-Gil AM, Elizondo-Montemayor L. The role of exercise in the interplay between myokines, hepatokines, osteokines, adipokines, and modulation of inflammation for energy substrate redistribution and fat mass loss: a review. *Nutrients*, 2020, 12: 1899
- [133] Varady KA, Cienfuegos S, Ezpeleta M, et al. Clinical application of intermittent fasting for weight loss: progress and future directions. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18: 309-21
- [134] de Cabo R, Mattson MP. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease (vol 381, pg 2541, 2019). *N Engl J Med*, 2020, 382: 298
- [135] Zhang WT, Wang J, Wang LF, et al. Alternate-day fasting prevents non-alcoholic fatty liver disease and working memory impairment in diet-induced obese mice. *J Nutr Biochem*, 2022, 110: 109146
- [136] Liu XL, Zhang Y, Ma CY, et al. Alternate-day fasting alleviates high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease through controlling PPAR α /Fgf21 signaling. *Mol Biol Rep*, 2022, 49: 3113-22
- [137] Byun S, Seok S, Kim YC, et al. Fasting-induced FGF21 signaling activates hepatic autophagy and lipid degradation via JMJD3 histone demethylase. *Nat Commun*, 2020, 11: 807
- [138] Qian H, Chao XJ, Williams J, et al. Autophagy in liver diseases: a review. *Mol Aspects Med*, 2021, 82: 100973
- [139] Chen W, Luo N, Zhang Y, et al. An activatable near-infrared fluorescent probe facilitated high-contrast lipophagic imaging in live cells. *Chem Commun*, 2021, 57: 8664-7
- [140] Meng FF, Niu J, Zhang HM, et al. A pH-sensitive spirocyclization strategy for constructing a single fluorescent probe simultaneous two-color visualizing of lipid droplets and lysosomes and monitoring of lipophagy. *Anal Chem*, 2021, 93: 11729-35
- [141] Li W, He PC, Huang YG, et al. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances. *Theranostics*, 2021, 11: 222-56
- [142] Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev Cell*, 2015, 32: 678-92
- [143] Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, et al. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14: 343-55