



依泽替米贝对非酒精性脂肪肝病细胞模型脂质沉积和凋亡的影响及其与自噬关系的研究

宋 琪, 吴鹏波, 谭诗云*

(武汉大学人民医院消化内科 消化系统疾病湖北省重点实验室, 武汉 430060)

中图分类号: R575.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-2084(2019)08-1650-06

摘要:目的 探讨依泽替米贝(Eze)对以油酸(OA)预处理 HepG2 细胞为模型的非酒精性脂肪肝病(NAFLD)细胞模型脂质沉积和凋亡的影响及其与自噬的关系。方法 以 OA 预处理 HepG2 细胞为 NAFLD 细胞模型,加入 Eze 及自噬抑制剂氯喹(CQ)干预其过程;通过油红 O 染色检测 Eze 对肝细胞内脂质沉积的影响;细胞计数试剂盒 8 和流式细胞术检测 Eze 对肝细胞增殖和凋亡的影响;Western blot 及免疫荧光染色检测 Eze 对肝细胞 Beclin-1 和微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)表达水平的影响。结果 经 Eze 处理后,OA 预处理的 HepG2 细胞增殖活性无明显改变($P > 0.05$);OA + Eze 组细胞脂质沉积少于 OA 组,OA 诱导的细胞凋亡率低于 OA 组[(2.777 ± 0.114)% 比 (1.673 ± 0.094)%]($P < 0.01$),Beclin-1 和 LC3 蛋白表达高于 OA 组(1.101 ± 0.099 比 0.738 ± 0.079、1.948 ± 0.318 比 1.196 ± 0.060)($P < 0.05$);加入 CQ 后,OA + Eze + CQ 组细胞脂质沉积多于 OA + Eze 组,细胞凋亡率和 LC3 蛋白表达水平高于 OA + Eze 组[(5.710 ± 0.109)% 比 (1.673 ± 0.094)%、(4.326 ± 1.361) 比 (1.948 ± 0.318)]($P < 0.05$),Beclin-1 表达水平低于 OA + Eze 组(0.603 ± 0.108 比 1.101 ± 0.099)($P < 0.05$)。结论 Eze 可降低 NAFLD 细胞模型中细胞内脂质沉积和细胞凋亡率,因此可能对 NAFLD 具有一定的治疗作用,其作用机制可能是通过增强非酒精性脂肪肝细胞的自噬水平实现的。

关键词:非酒精性脂肪肝病;依泽替米贝;自噬

Effects of Ezetimibe on Lipid Deposition and Apoptosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Cell Model and Its Relationship with Autophagy SONG Qi, WU Pengbo, TAN Shiyun. (Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University/Hubei Key Laboratory of Digestive System Disease, Wuhan 430060, China)

Abstract: Objective To investigate effects of ezetimibe(Eze) on lipid deposition and apoptosis in oleic acid(OA) induced nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD) HepG2 cell model and its relationship with autophagy. **Methods** HepG2 cells were pretreated with OA to establish a NAFLD cell model. Eze and autophagy inhibitor chloroquine(CQ) were added to interfere with the process. The effect of Eze on lipid deposition in HepG2 cells was detected by oil red O staining, and proliferation rate by cell counting Kit-8, apoptosis rate by flow cytometry, expression levels of Beclin-1 and microtubule associated protein 1 light-chain 3(LC3) proteins by Western blotting and immunofluorescence staining. **Results** After addition of Eze, the proliferative activity of OA-pretreated HepG2 cells did not change significantly($P > 0.05$). The lipid deposition of the OA + Eze group was less than that of the OA group, and OA-induced apoptosis in the OA + Eze group were lower than those in the OA group[(2.777 ± 0.114)% vs (1.673 ± 0.094)%]($P < 0.01$), but the expression levels of Beclin-1 and LC3 proteins were higher(1.101 ± 0.099 vs 0.738 ± 0.079, 1.948 ± 0.318 vs 1.196 ± 0.060)($P < 0.05$). After adding CQ, lipid deposition of the OA + Eze + CQ group was more than that of the OA + Eze group, apoptosis rate and the expression level of LC3 in the OA + Eze + CQ group were higher than those in the OA + Eze group[(5.710 ± 0.109)%

DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2019.08.037

基金项目:湖北省卫生计生委面上项目(WJ2017M019)

*通信作者 E-mail:tanshiyun@medmail.com.cn

vs $(1.673 \pm 0.094) \%$, (4.326 ± 1.361) vs (1.948 ± 0.318)] ($P < 0.05$), but the expression level of Beclin-1 was lower (0.603 ± 0.108 vs 1.101 ± 0.099) ($P < 0.05$). **Conclusion** Eze may have a therapeutic effect on NAFLD since it can reduce intracellular lipid deposition and apoptosis rate in NAFLD cell model, and the mechanism may be enhancing autophagy level in nonalcoholic fatty liver cells.

Key words: Nonalcoholic fatty liver; Ezetimibe; Autophagy

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是西方国家慢性肝病最常见的病因, 预计也将于 2030 年成为肝移植最常见的指征^[1]。自 2001 年以来, NAFLD 已成为世界上慢性肝病的主要病因, 由其病程进展可分为单纯性脂肪肝变、非酒精性脂肪肝炎及肝纤维化^[2], 其发病机制复杂多样, 包括胰岛素抵抗、脂肪细胞激素分泌、肠道微生态改变、营养因素和遗传因素等^[3-5]。肥胖、胰岛素抵抗、2 型糖尿病和血脂异常是 NAFLD 最重要的危险因素^[6]。在全球范围内的成年人中, NAFLD 的发病率已高达 20%~40%^[7]。

依泽替米贝 (ezetimibe, Eze) 作为一类新型的选择性胆固醇吸收抑制剂, 已有多篇文献报道了它联合他汀类药物对血清胆固醇水平的降低作用^[8-10]。Patel 等^[11]的研究也表明 Eze 可改善伴有肝功能损害的 NAFLD 患者血清胆固醇及肝功能水平。体内研究发现 Eze 可抑制肠道和肝脏的胆固醇吸收靶点 NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1), 从而降低食物中胆固醇的吸收、降低肝脂肪含量及改善肝脏胰岛素敏感性等, 进而起到治疗 NAFLD 的作用^[12]。

自噬, 即细胞自我消化, 是细胞内的溶酶体降解细胞内受损的细胞器、未折叠的蛋白质和细胞内的病原体的代谢过程^[13-14]。Lee 等^[15]研究表明, Eze 可通过激活 Nr1f2 对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝炎小鼠起到一定的治疗作用, 而这个过程与自噬相关蛋白 p62 密切相关。本实验以油酸 (oleic acid, OA) 诱导 HepG2 细胞为体外模型^[16], 探讨 Eze 对 NAFLD 细胞模型脂质沉积和凋亡的影响及其与自噬的关系, 为 Eze 治疗 NAFLD 提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 细胞株和试剂 人肝癌细胞株 HepG2 由武汉大学中南医院赠送。Eze 购于上海阿拉丁生物公司 (产品编号: E126609); Gibco DMEM/H (Dulbecco's modified eagle medium/high glucose) 培养液购自

美国赛默飞世尔公司, NQBB 胎牛血清购自澳大利亚 Bolise Co., Ltd. 公司; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒、苏木精染液、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、膜联蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide annexin, V-FITC/PI) 凋亡检测试剂盒和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 购自上海碧云天生物公司; 油红 O、 β -肌动蛋白 (β -actin) 购于北京索莱宝科技有限公司, OA 购于美国 Sigma 公司 (货号: O1383); Beclin-1 和微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light 3, LC3) 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司; 质粒购于上海海吉浩格生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购于北京康为世纪有限公司。

1.1.2 仪器 THERMOHeracellVIVOS 160i/250i CO₂ 培养箱 (德国 Thermo Scientific 公司), Bio-Rad imark 全自动酶标仪, Bio-Rad 凝胶成像系统 Chemi-Doc™ XRS +, OLYMPUS IX71 显微镜, OLYMPUS BX53 显微镜, Bio-Rad 电泳仪, 流式细胞仪 BD FACS Calibur。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 从液氮罐中取出 HepG2 细胞冻存管, 置于 37 °C 恒温水浴中于 1~2 min 内迅速解冻, 以离心半径 8 cm, 1 000 r/min 离心 4 min 后去除冻存液, 并用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 完全培养基重悬后移至细胞培养瓶中, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。隔日换液, 3~5 d 后传代, 取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 CCK-8 实验 取对数生长期的 HepG2 细胞, 用完全培养基调整细胞浓度为 5×10^4 /mL, 接种于 96 孔板中, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液置于培养箱中培养。次日按照每组 3 个复孔及培养板顺序进行分组给药, 分为空白对照组、OA 组 (OA 浓度为

0.6 mmol/L)、Eze 低浓度组(Eze 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)、Eze 中浓度组(Eze 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$)、Eze 高浓度组(Eze 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$)，药物处理 36 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，孵育 1 h 用酶标仪在 450 nm 测定吸光度。增殖率 = $A_{\text{实验组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

1.2.3 油红 O 染色 取对数生长期的 HepG2 细胞，将细胞浓度调整为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ ，接种于 24 孔板中，每孔加入 1 mL 细胞悬液进行培养。次日按照是否加入 OA、Eze 和氯喹(chloroquine, CQ)及培养板顺序进行分组给药，分为空白对照组、OA 组、OA + Eze 组及 OA + Eze + CQ 组，其中各药物浓度分别为 OA 浓度为 0.6 mmol/L，Eze 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ ，CQ 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。药物处理 24 h 后，每孔用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 3 次，4% 多聚甲醛固定 30 min，再次用 PBS 洗涤 3 次，每孔加入 500 μL 油红 O 染液(提前用双蒸水以 2:3 比例稀释 0.5% 油红 O 溶液，混匀后静置 30 min，并用直径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤)，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中染色 1 h，用 75% 乙醇洗涤 5 s 后以苏木精染核，甘油明胶封片，倒置显微镜下观察脂滴沉积情况。

1.2.4 Western blot 检测 Beclin-1 和 LC3 表达水平

取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中，每孔加入 2 mL 完全培养基进行培养。次日分组给药(分组同油红 O 染色)，药物处理 24 h 后提取细胞蛋白，并用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度，根据测得浓度调整上样量，将蛋白样品加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，后经电泳、转膜、封闭，Tris-HCl + Tween-20 缓冲盐溶液清洗 3 次(每次 5 min)，在一抗溶液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，Tris-HCl + Tween-20 缓冲盐溶液清洗 3 次(每次 15 min)后于二抗中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，TBST 清洗 3 次(每次 15 min)，用 ECL 化学发光液浸润 1 min，于凝胶成像系统中扫描成像并计算灰度值。

1.2.5 细胞凋亡实验(Annexin V-FITC/PI 双染)

将对数生长期的细胞用胰酶消化后重悬于完全培养基中，然后接种于 6 孔板中进行培养。次日分组给药(分组同油红 O 染色)，24 h 后，用胰酶消化细胞并洗涤 3 次，用结合缓冲液重新悬浮细胞，加入 5 μL Annexin V/FITC 和 10 μL 浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 PI 溶液，混匀后于室温避光孵育 15 min，后在反应管中加 400 μL PBS，流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

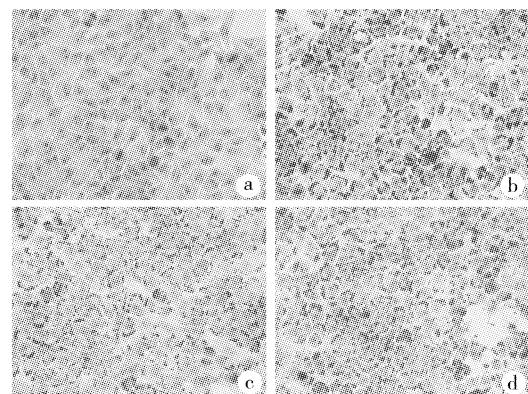
1.2.6 免疫荧光染色 将对数生长期的 HepG2 细胞按照每孔 2.5×10^4 个细胞接种于 24 孔板中，接种前与 24 孔板内放置无菌细胞爬片，每孔加入 1 mL 完全培养基，置于细胞培养箱中培养。次日分组给药(分组同油红 O 染色)，24 h 后进行细胞固定和封闭，操作步骤如下：将细胞用 PBS 洗涤 3 次，4% 多聚甲醛固定 30 min，再次用 PBS 洗涤 3 次，免疫荧光通透液通透 5 min，PBS 洗涤 3 次，用山羊血清封片 30 min。然后加入一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，PBS 洗涤 3 次，加入 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG，PBS 洗涤 3 次，用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚染核 5 min，PBS 洗涤 3 次，取出细胞爬片，抗荧光淬灭剂封片，在正置显微镜下以 495 nm 为激发波长观察细胞 LC3 表达情况。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析，计量资料符合正态分布用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Eze 对 HepG2 细胞增殖活性的影响 OA 组、Eze 低浓度组、Eze 中浓度组、Eze 高浓度组细胞增殖率分别为 $(0.829 \pm 0.048)\%$ 、 $(0.845 \pm 0.105)\%$ 、 $(0.864 \pm 0.086)\%$ 、 $(0.796 \pm 0.109)\%$ ，各组比较差异无统计学意义($F = 0.202, P = 0.892$)。

2.2 油红 O 染色结果 OA + 影响 Eze 组脂滴含量明显低于 OA 组，加入自噬抑制剂 CQ 后，OA + Eze + CQ 组脂滴含量明显高于 OA + Eze 组，Eze 对 OA 造模的 HepG2 细胞内脂滴含量的影响见图 1。



a: CON; b: OA; c: OA + Eze; d: OA + Eze + CQ

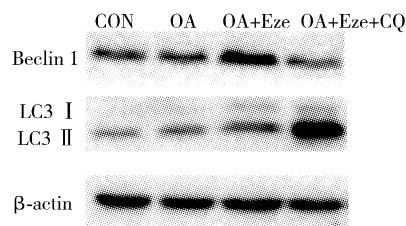
图 1 Eze 对油酸造模的 HepG2 细胞内脂滴含量的影响

2.3 Eze 对 HepG2 细胞 Beclin-1 和 LC3 表达的影响 各组 HepG2 细胞 Beclin-1 和 LC3 表达水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 OA + Eze 组 Beclin-1/ β -actin 和 LC3 II/ β -actin 表达高于 OA 组($P < 0.05$),OA + Eze + CQ 组 Beclin-1/ β -actin 低于 OA + Eze 组($P < 0.05$),OA + Eze + CQ 组 LC3 II/ β -actin 高于 OA + Eze 组($P < 0.05$),见表 1。Eze 对 HepG2 细胞 Beclin-1 和 LC3 表达水平的影响,见图 2。

表 1 各组 HepG2 细胞 Beclin-1 和 LC3 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Beclin-1/ β -actin	LC3 II/ β -actin
CON 组	3	0.679 \pm 0.045	1.226 \pm 0.096
OA 组	3	0.738 \pm 0.079	1.196 \pm 0.060
OA + Eze 组	3	1.101 \pm 0.099 ^a	1.948 \pm 0.318 ^a
OA + Eze + CQ 组	3	0.603 \pm 0.108 ^b	4.326 \pm 1.36 ^b
F 值		12.621	8.904
P 值		0.002	0.006

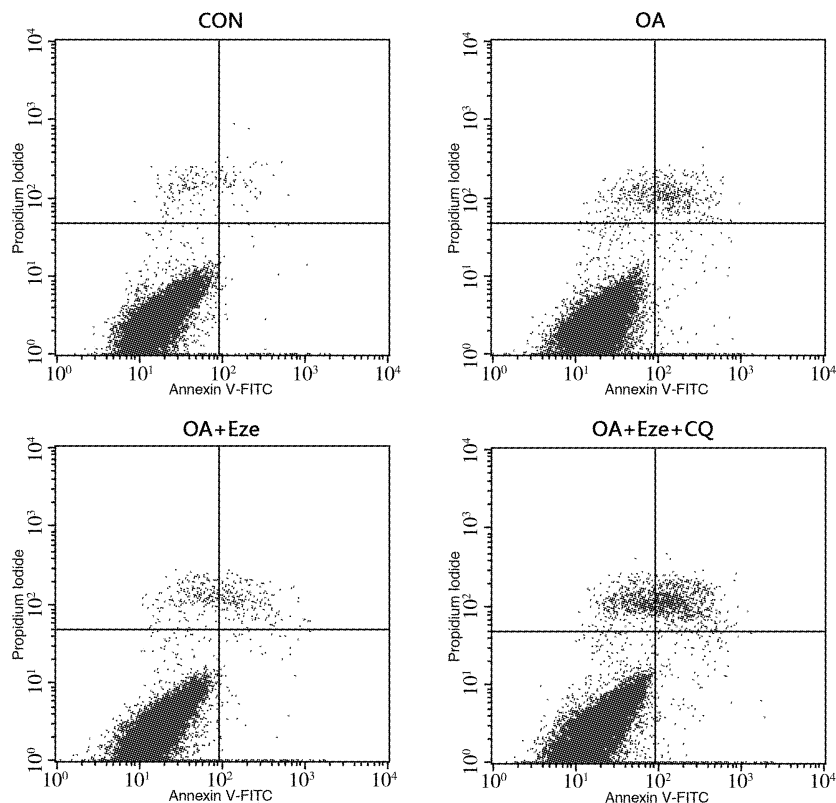
CON:空白对照;OA:油酸;Eze:依泽替米贝;CQ:氯喹;Beclin 1: Beclin-1 蛋白;LC3:微管相关蛋白 1 轻链 3; β -actin: β -肌动蛋白;^a 与 OA 组比较, $P < 0.05$;^b 与 OA + Eze 组比较, $P < 0.05$



CON:空白对照;OA:油酸;Eze:依泽替米贝;CQ:氯喹; Beclin 1: Beclin-1 蛋白;LC3:微管相关蛋白 1 轻链 3; β -actin: β 肌动蛋白

图 2 Eze 对 HepG2 细胞 Beclin-1 和 LC3 表达水平的影响

2.4 细胞凋亡实验检测结果 空白对照组、OA 组、OA + Eze 组、OA + Eze + CQ 组细胞凋亡率分别为(0.820 \pm 0.083)%、(2.777 \pm 0.114)%、(1.673 \pm 0.094)%、(5.710 \pm 0.109)% ,各组比较差异有统计学意义($F = 109.397, P < 0.05$)。OA 组细胞凋亡率高于空白对照组($P < 0.05$),OA + Eze 组细胞凋亡率低于 OA 组($P < 0.05$);OA + Eze + CQ 组细胞凋亡率高于 OA + Eze 组($P < 0.05$)。Eze 对 OA 造模的 HepG2 细胞凋亡率的影响,见图 3。



CON:空白对照;OA:油酸;Eze:依泽替米贝;CQ:氯喹;Propidium iodide:碘化丙啶;Annexin V-FITC:FITC 标记的重组人 Annexin V

图 3 Eze 对油酸造模的 HepG2 细胞凋亡率的影响

2.5 免疫荧光染色结果 与空白对照组比较, OA 组 LC3 表达水平无明显变化, 加入 Eze 后, Eze + OA 组 LC3 表达水平相较于 OA 组均升高, 加入 CQ 后, LC3 表达水平相较于 Eze + OA 组升高, Eze 对油酸造模的 HepG2 细胞 LC3 表达水平的影响见图 4。

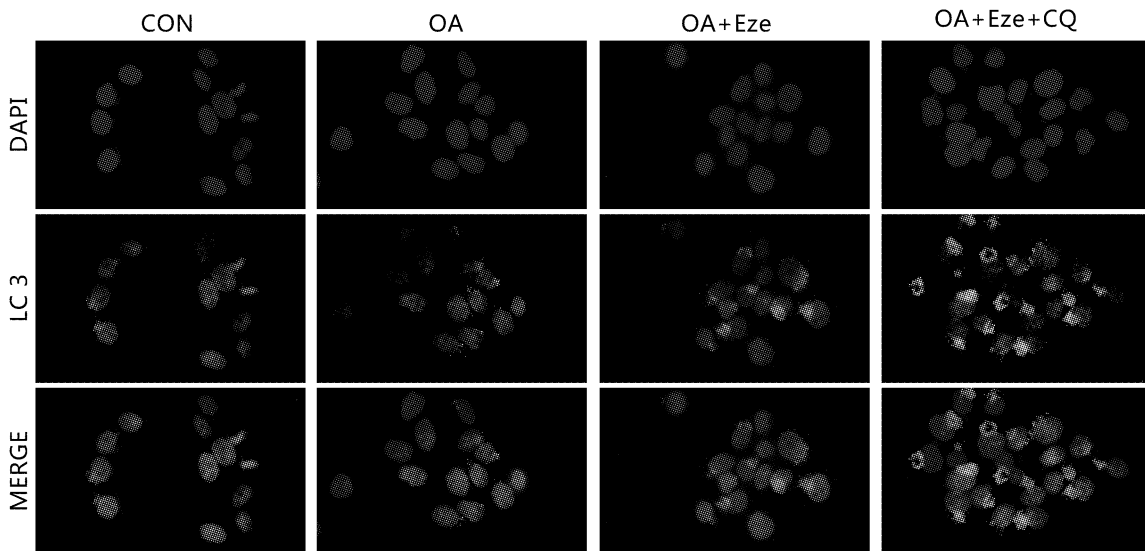
3 讨论

近年来 NAFLD 发病率不断增高, 却仍缺乏安全有效的治疗药物, 本研究致力于在细胞水平上探讨 Eze 对 NAFLD 的治疗作用及其机制。通过 OA 造模, 模拟出 NAFLD 的细胞模型, 从油红 O 染色的结果可以看出, Eze 可显著降低细胞模型中脂滴含量, 这与 Patel 等^[11]的研究结果一致, 提示 Eze 可改善 NAFLD 时肝细胞内脂质沉积。而在加入自噬抑制剂 CQ 时, 其改善脂质沉积的效果降低, 提示其改善脂质沉积的机制与自噬有一定的相关性。

CQ 作为一种传统的抗疟药, 近年来多项研究表明对多种晚期肿瘤具有一定的治疗效果^[17-20], 其抗肿瘤作用正是通过阻碍自噬实现的^[21]。CQ 含有的疏水性弱碱基, 在其扩散到溶酶体后被捕获并质子化, 导致溶酶体内 pH 值上升, 从而阻碍自噬体和溶酶体结合成自噬溶酶体进而降解的过程, 在自噬晚期阻碍自噬的发生、发展^[22]。LC3 II 及 Beclin-1

作为普遍承认的自噬相关蛋白, LC3 II/ β -actin 及 Beclin-1 水平的增高提示自噬水平升高^[23]。CQ 对自噬的阻碍作用表现在 LC3 II/ β -actin 水平的增高及 Beclin-1 水平的降低。Western blot 的结果提示, 相对于 OA 组, 加入 Eze 后细胞自噬水平明显升高, 加入 Eze 和 CQ 后细胞自噬水平降低, 表明 Eze 可增强非酒精性脂肪肝细胞的自噬, 而自噬抑制剂 CQ 表现出对自噬的显著抑制效果。同时, 通过 LC3B 的免疫荧光染色检测也与 Western blot 的结果一致, 提示 Eze 可增强非酒精性脂肪肝细胞的自噬, 加入 CQ 后自噬水平下降。

在 NAFLD 的初始阶段, 细胞内出现过多的脂质积聚和脂肪变性, 进而通过氧化剂或细胞因子损伤肝细胞, 使疾病进展为非酒精性脂肪肝炎^[24-25]。促进自噬对肝细胞脂滴沉积减少可能与细胞自噬体的代谢功能相关, 自噬体含有降解细胞器相关脂质和外源脂蛋白的脂肪酶, 促进自噬有助于促进自噬体和溶酶体的融合及其脂质的分解^[24]。Eze 在升高细胞内自噬水平的同时降低了细胞内脂质沉积水平, 且这种作用在加入自噬抑制剂 CQ 后被抑制, 因此, 推测 Eze 可通过增强 NAFLD 细胞模型自噬水平减少细胞内脂质沉积。



CON:空白对照;OA:油酸;Eze:依泽替米贝;CQ:氯喹;Beclin 1:Beclin-1 蛋白;LC3:微管相关蛋白 1 轻链 3; DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吡啶;MERGE:合并

图 4 Eze 对油酸造模的 HepG2 细胞 LC3 表达水平的影响

本研究中,加入 Eze 可明显改善 OA 诱导 NAFLD 细胞模型的细胞凋亡率,而加入自噬抑制剂 CQ 后,其凋亡水平又明显增加,表明 Eze 可减轻 NAFLD 细胞模型的细胞凋亡率,自噬抑制剂 CQ 可在一定程度上逆转这种效果。Schleicher 等^[26]研究表明细胞内脂质沉积减少后,脂肪变性状态的细胞可以被逆转成为健康细胞。在 NAFLD 中,细胞脂质沉积是导致细胞脂性凋亡的最主要原因^[27],本研究中 Eze 既降低了细胞内脂质沉积水平,又减少了细胞的凋亡率,因此,推测 Eze 通过增强细胞自噬水平减少 NAFLD 细胞模型中的细胞凋亡。

综上所述,Eze 在增强细胞的自噬水平的同时,减轻细胞内脂质沉积并明显减少细胞凋亡的发生,且这种效果在 CQ 显著抑制自噬后被逆转,因此,说明 Eze 可能通过增强非酒精性脂肪肝细胞的自噬水平降低 NAFLD 细胞模型脂质沉积和凋亡发生,因此可能对 NAFLD 具有一定的治疗效果。

参考文献

- [1] Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1 Suppl): S47-64.
- [2] Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters [J]. *Drug Metab Rev*, 2017, 49(2): 197-211.
- [3] Bzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1038-1048.
- [4] Alwahsh SM, Gebhardt R. Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Arch Toxicol*, 2017, 91(4): 1545-1563.
- [5] Gastaldelli A. Insulin resistance and reduced metabolic flexibility: Cause or consequence of NAFLD? [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(22): 2701-2704.
- [6] Masuoka HC, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease: An emerging threat to obese and diabetic individuals [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1281: 106-122.
- [7] Zhu JZ, Dai YN, Wang YM, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and economy [J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(11): 3194-3202.
- [8] Barbosa CP, Ritter AM, Da Silva LG, et al. Effects of simvastatin, ezetimibe, and their combination on histopathologic alterations caused by adjuvant-induced arthritis [J]. *Inflammation*, 2014, 37(4): 1035-1043.
- [9] Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, et al. Ezetimibe added to statin therapy after acute coronary syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(25): 2387-2397.
- [10] Paraskevas KI, Mikhailidis DP, Giannoukas AD. Atorvastatin in combination with ezetimibe and carotid atherosclerosis [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3): 4805-4807.
- [11] Patel JV, Hughes EA. Efficacy, safety and LDL-C goal attainment of ezetimibe 10 mg-simvastatin 20 mg vs. placebo-simvastatin 20 mg in UK-based adults with coronary heart disease and hypercholesterolaemia [J]. *Int J Clin Pract*, 2006, 60(8): 914-921.
- [12] Averna M. The effect of ezetimibe on NAFLD [J]. *Atheroscler Suppl*, 2015, 17: 27-34.
- [13] Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: Their role in cell survival and cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12 Suppl 2: 1509-1518.
- [14] Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: Molecular machinery for self-eating [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12 Suppl 2: 1542-1552.
- [15] Lee DH, Han DH, Nam KT, et al. Ezetimibe, an NPC1L1 inhibitor, is a potent Nrf2 activator that protects mice from diet-induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 99: 520-532.
- [16] Zaitu Y, Iwatake M, Sato K, et al. Lipid droplets affect elimination of *Porphyromonas gingivalis* in HepG2 cells by altering the autophagy-lysosome system [J]. *Microbes*, 2016, 18(9): 565-571.
- [17] Maes H, Rubio N, Garg AD, et al. Autophagy: Shaping the tumor microenvironment and therapeutic response [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(7): 428-446.
- [18] Yang S, Wang X, Contino G, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(7): 717-729.
- [19] Maclean KH, Dorsey FC, Cleveland JL, et al. Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(1): 79-88.
- [20] Jiang PD, Zhao YL, Deng XQ, et al. Antitumor and antimetastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(9): 609-614.
- [21] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [22] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 8(4): 445-544.
- [23] Ma CL, Qiao S, Li YC, et al. TGF- β_1 promotes human hepatic carcinoma HepG2 cells invasion by upregulating autophagy [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(11): 2604-2610.
- [24] Amir M, Czaja MJ. Autophagy in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 5(2): 159-166.
- [25] Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, et al. Lipid droplets and liver disease: From basic biology to clinical implications [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(6): 343-355.
- [26] Schleicher J, Guthke R, Dahmen U, et al. A theoretical study of lipid accumulation in the liver-implications for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(1): 62-69.
- [27] Engin A. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 960: 443-467.