

三种纳米材料 C_{70} , $C_{60}Cl_6$ 和 $C_{60}Ph_6$ 引起细胞自噬的现象

孙轲婧, 郑芳, 温龙平

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥微尺度物质科学国家实验室, 安徽合肥 230027)

摘要: 为了进一步研究富勒烯家族及其衍生物引起细胞自噬的现象, 运用荧光显微镜、透射电子显微镜、蛋白免疫印迹等技术, 对水溶性的纳米 C_{70} , $C_{60}Cl_6$ 和 $C_{60}Ph_6$ 诱导的细胞自噬现象进行了初步探讨. 实验结果显示, C_{70} , $C_{60}Cl_6$ 和 $C_{60}Ph_6$ 稳定分散于水中形成的纳米颗粒, 均能诱导 HeLa 细胞产生自噬现象, 揭示了富勒烯家族及其衍生物在生物医药领域更广泛的研究和应用价值.

关键词: 富勒烯; 纳米颗粒; C_{70} ; $C_{60}Cl_6$; $C_{60}Ph_6$; 细胞自噬

中图分类号: Q255 **文献标识码:** A doi: 10.3969/j.issn.0253-2778.2010.04.002

Studies on autophagy induced by nano- C_{70} , nano- $C_{60}Cl_6$ and nano- $C_{60}Ph_6$

SUN Kejing, ZHENG Fang, WEN Longping

(School of Life Sciences, and Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale,
University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Abstract: In order to further study the autophagy induced by fullerene family and its derivatives, nano- C_{70} , $C_{60}Cl_6$ and $C_{60}Ph_6$ were selectively investigated by means of fluorescence microscope, transmission electron microscope and western blot. The results show that, nano- C_{70} , $C_{60}Cl_6$ and $C_{60}Ph_6$ can form crystal structures in water and induce HeLa cells into autophagy process, which indicates that fullerene family and its derivatives might play a new role in the biomedical field.

Key words: fullerene; nanoparticle; C_{70} ; $C_{60}Cl_6$; $C_{60}Ph_6$; autophagy

0 引言

细胞自噬是在细胞质中形成的双层或多层膜结构的自噬小体通过和溶酶体融合对包裹的内容物进行降解的过程^[1]. 目前关于自噬的研究表明, 自噬在某些情况下会保护细胞, 但在另外一些情况下又会引起细胞损伤^[2]. 自噬在肿瘤的发生发展^[3]、神经退行性疾病^[4], 以及病原体感染^[5]的过程中扮演了重要的角色, 在人类的生理和病理学中起着十分重要

的作用.

富勒烯是由五元环、六元环构成的封闭式共轭烯, 特殊的几何结构和烯键结构使富勒烯家族及其衍生物具有一系列独特的物理化学性质, 并在生物医药领域引起了广泛关注^[6]. 然而, 由于 C_{60} 固有的封闭式结构导致的疏水性, 无法与人体内的“靶分子”相互作用, 使得其在生物医药领域的研究和应用受到很大限制. 近年来, 合成水溶性富勒烯衍生物方法的突破和成功, 包括向富勒烯表面引入带有特定

收稿日期: 2009-05-13; 修回日期: 2009-06-10

基金项目: 国家重点基础研究发展(973)计划(2006CB933300, 2009CB930300)资助.

作者简介: 孙轲婧, 女, 1985年生, 硕士. 研究方向: 纳米材料的生物学功能研究. E-mail: ake302@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 温龙平, 博士/教授. E-mail: lpwen@ustc.edu.cn

功能的极性基团,加速了富勒烯衍生物在生物医药方面的研究.相关文献报道富勒烯及其衍生物可以光催化剪切 DNA^[7],同时具有抗 HIV 酶的活性^[8],以及可以作为药物载体等. Eiichi Nakamura 等^[9]在 C₆₀ 表面连上末端带氨基的分子使 C₆₀ 衍生物带正电荷,并和带负电荷的 DNA 结合可以有效在体外进行转染.此外, C₆₀ 的衍生物在药物输运以及自由基清除剂等方面也有着突出的应用.

相关文献报道富勒烯 C₆₀ 可以在神经胶质瘤中诱导自噬现象的发生^[10],我们前期的工作^[11]也表明纳米富勒烯 C₆₀ 在光照条件下能够引起细胞自噬,并增强化疗药物的敏感性,促进抗癌药物杀死肿瘤细胞.这里,我们选择 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 三种物质,通过将不溶于水的纳米材料粉末转化为悬浮于水中的晶体颗粒^[12],研究它们在细胞自噬方面的作用,以挖掘富勒烯家族及其衍生物在生物医药领域的潜在应用价值.

1 材料和方法

1.1 实验材料

LC³-eGFP 质粒由日本东京都临床医学综合研究所 Noboru Mizushima 教授提供.纳米 C₇₀ 粉末购于河南省濮阳市永新试剂经营部,纳米 C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 粉末依据文献^[13]中的方法,由厦门大学化学化工学院郑兰荪院士实验室制备提供.雷帕霉素、3-甲基腺嘌呤(3-MA)购于美国 Sigma 公司. LC³ 抗体购于美国 Novus 公司. GFP 和 GAPDH 抗体购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司.文章中所有未注明的细胞培养试剂购于美国 Gibco 公司.

1.2 细胞培养

所有细胞在 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,细胞培养于改良的 DMEM 培养基中,培养基中加入 10% 的胎牛血清, 50 mg/L 链霉素和 75 mg/L 青霉素.

1.3 GFP-LC³/HeLa 细胞的建立

根据说明书上的方法用 Lipofectamine 2000 将 pGFP-LC³ 转染入 HeLa 细胞, 24 h 后将细胞转入新的培养皿中,在含有 0.6 g/L G418 (Promega, Madison, WI) 的 DMEM 培养基中进行筛选,每 3 天更换一次培养基.转染后第 10 天左右挑取绿色荧光现象明显的细胞转入新的培养皿中进一步培养.

1.4 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 晶体溶液的制备与浓度测定

根据文献^[12]中的方法将 5 mg 的纳米 C₇₀

C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 粉末溶于 250 mL 未开封的四氢呋喃中常温避光搅拌 24 h 使纳米材料充分溶解;然后用滤纸将未溶解的粉末过滤得到溶液,将 250 mL 超纯水 (Milli-Q, 密理博) 按照 1 000 mL/min 的速率加入到剧烈搅拌的上述溶液中,分别出现颜色深度不等的纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 晶体悬浮液;搅拌 5 min 后,用旋转蒸发仪 (BC-R202, 上海生物化学仪器公司) 55 °C 将四氢呋喃分离出来,再在 80 °C 将以上溶液浓缩至 25 mL,紫外灯照射灭菌 24 h 后,存储在 4 °C 冰箱备用.

按照文献^[12]中描述的方法,通过甲苯萃取和 HPLC (Eclipse XD8-C18, 5 μm, 150 × 4.6 mm, Agilent, 加拿大) 测定三种溶液的浓度.

1.5 动态光散射

制备得到的纳米材料晶体溶液以 1 : 100 的比例稀释后,使用 DynaPro-MS800 动态光散射仪 (Wyatt Technology, 美国) 进行检测.

1.6 GFP-LC³ 荧光点状聚集分析

用荧光显微镜观察稳定表达 GFP-LC³ 的 HeLa 细胞,在 500 个细胞中,统计出有 GFP-LC³ 荧光点状聚集(至少 5 个点)的阳性细胞在总的绿色荧光细胞中所占比例(我们的细胞百分之百稳定表达 GFP-LC³).

1.7 电子显微镜检查法

GFP-LC³/HeLa 细胞培养于 24 孔板,用纳米富勒烯衍生物水溶液处理 24 h,收集细胞,进行常规电子显微镜检测.细胞沉淀用含有 2% 戊二醛的 0.1 mol/L 钠-磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 固定 1 h.蒸馏水清洗,之后与 50% 乙醇孵育 10 min,然后用含有 2% 乙酸双氧铀的 70% 乙醇封闭染色 2 h.细胞在浓度梯度增加的乙醇中进一步脱水,然后用环氧树脂包埋.用乙酸双氧铀和柠檬酸铅对超薄切片进行二重染色.在电子显微镜 (JEOL-1230, 日本东京) 下观察.

1.8 蛋白质印迹法

HeLa 细胞收集之后,加入细胞裂解液 (0.5% Nonidet P-40/10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5/100 mmol/L NaCl) 和蛋白酶抑制剂 (Sigma),再加入等量的 2X SDS,煮沸 10 min.得到的蛋白样品在 15% SDS/PAGE 中分离后转移到硝酸纤维素膜 (Amersham, Freiburg, 德国) 上,之后加入一抗孵育 2 h,连接辣根过氧化物酶的二抗孵育 1 h,使用 ECL 试剂盒 (生物工业, Beit Haemek, 以色列) 进行

显影.

1.9 数据分析

所有实验重复至少 3 次. 数据都用平均值±标准方差表示. 数据分析是通过 Two-tailed student's test 处理的. 统计上显著的标准是 $P < 0.05$.

2 实验结果

2.1 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 溶液的鉴定

根据改进的制备方法处理三种纳米材料, 得到可以在水中稳定分散的纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 的晶体溶液, 如图 1. 由透射电镜(TEM)结果可以看

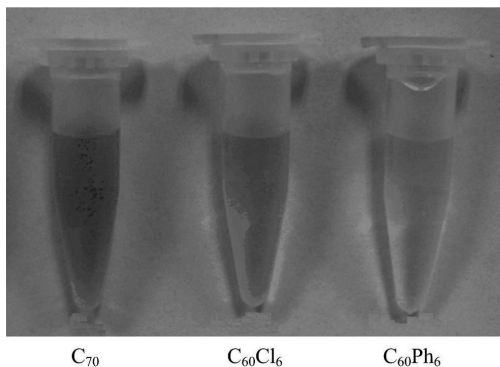


图 1 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 水溶液

Fig.1 Water solution of nano-C₇₀, C₆₀Cl₆ and C₆₀Ph₆

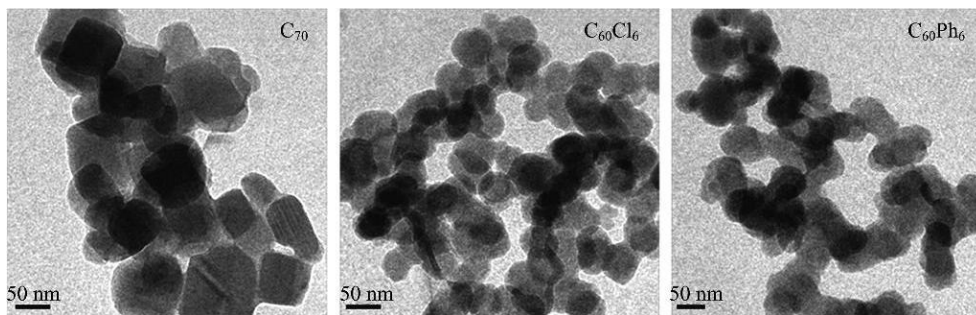


图 2 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 水溶液中的晶体形态

Fig.2 Crystal structure of water-soluble nano-C₇₀, C₆₀Cl₆ and C₆₀Ph₆

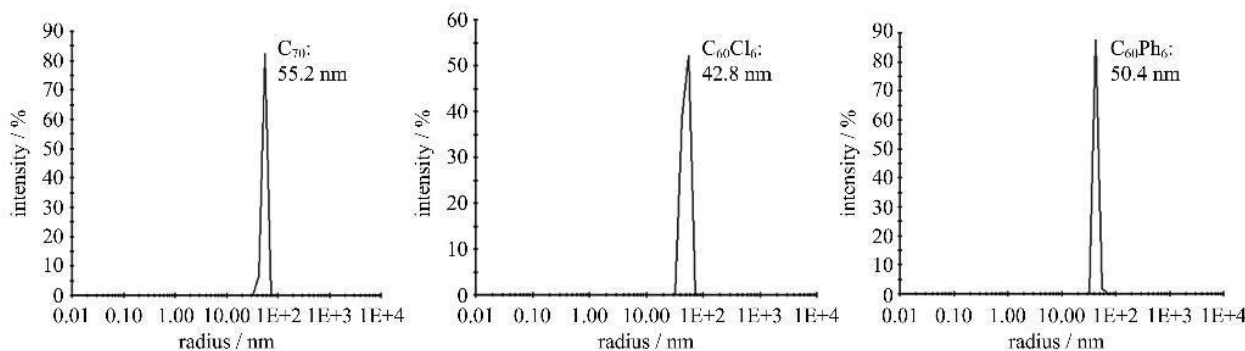


图 3 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 在动态光散射中测得的粒径大小

Fig.3 The radius of nano-C₇₀, C₆₀Cl₆ and C₆₀Ph₆ through dynamic light scattering

出, 合成的纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 晶体形态多以圆形或矩形为主, 如图 2. 对于合成后的三种纳米材料晶体溶液, 我们用动态光散射的方法测定其水溶液中晶体的粒径, 得到 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 的大小分别为 55.2, 42.8 和 50.4 nm, 如图 3.

2.2 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 溶液诱导癌细胞 HeLa 发生自噬

2.2.1 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 诱导 GFP-LC3/HeLa 细胞产生荧光点状聚集

LC3 蛋白是细胞中自噬体的标记蛋白. LC3-I 分子量为 18 kD, 均匀分布在细胞质中; LC3-II 分子量为 16 kD, 主要分布在自噬体表面和内部. 当自噬发生时, 自噬体形成增多, LC3-I 被特异性地修饰成 LC3-II, 同时转移到自噬体上, 形成的 LC3-磷脂酰乙醇胺一直存在于自噬体形成的各个阶段. 因此通常可以通过检测 LC3 的聚集或 LC3-I 向 LC3-II 的转换来检查自噬的发生.

为了直观地检测以上三种材料诱导细胞自噬的活性强弱, 我们首先建立了稳定表达 GFP-LC3 融合蛋白的 HeLa 细胞株(GFP-LC3/HeLa). 细胞感染了 eGFP-LC3 质粒后, 稳定表达的 GFP-LC3 蛋白在正常情况下分散于细胞质中, 但当细胞发生自

噬时,分散于细胞质中的 GFP-LC³ 蛋白会聚集在自噬小体的膜上^[14],这样在细胞中就会出现绿色的点状聚集.

实验结果显示,在 GFP-LC³/HeLa 细胞中,浓度分别为 0.5 mg/L, 5 mg/L, 1 mg/L 的纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 处理 24 h 后,可以使细胞产生明显的绿色点状聚集,自噬细胞的百分比分别达到 (68.82 ± 2.16)%, (73.61 ± 1.86)% 和 (70.47 ± 2.92)% (评判自噬细胞的标准是:细胞内至少出现 5 个 GFP-LC³ 点状聚集的为阳性细胞),并且这种聚集现象能够被细胞自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)抑制.另外,作为阳性对照的细胞自噬诱导剂雷帕霉素(Rap)也可以诱导细胞产生大量的绿色点状聚集,如图 4.

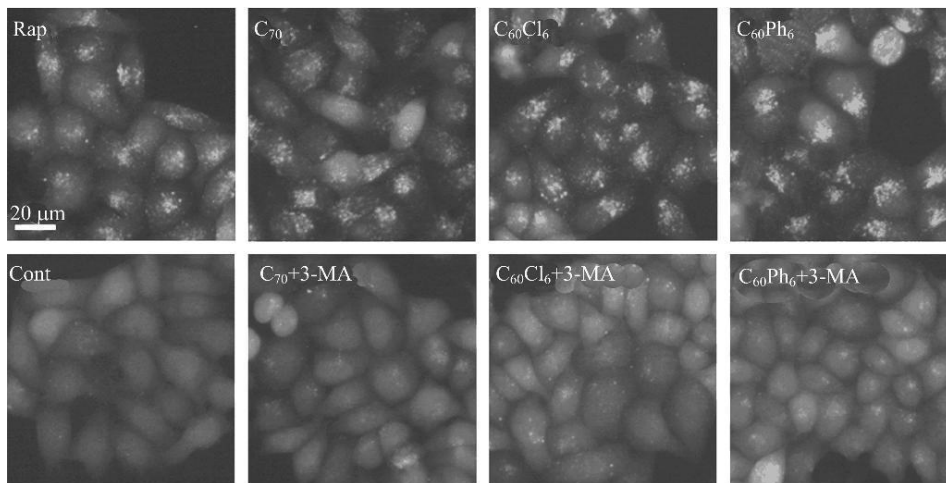


图 4 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 诱导 HeLa 细胞产生 LC³ 点状聚集

Fig. 4 Nano-C₇₀, C₆₀Cl₆ and C₆₀Ph₆ induced GFP-LC³ dot formation in HeLa cells

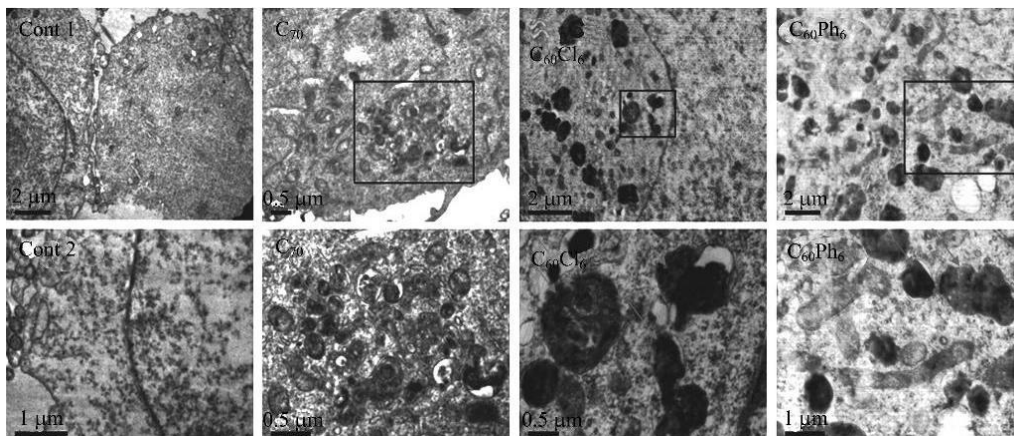


图 5 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 处理 HeLa 细胞的超薄切片电镜图片

Fig. 5 TEM images of nano-C₇₀, C₆₀Cl₆ and C₆₀Ph₆-treated HeLa cells

2.2.2 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 处理的细胞超薄切片的透射电子显微镜鉴定

透射电子显微镜下超微结构的形态学检测是自噬检测的金标准.细胞超薄切片的电镜结果显示,浓度分别为 0.5 mg/L, 5 mg/L, 1 mg/L 的纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 处理 HeLa 细胞 24 h 后的超微结构中出现大量类似脂褐质的难以降解的自噬溶酶体结构(图 5).大量结构遭到破坏的自噬溶酶体的出现证明纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 会引发功能损伤性的自噬现象.

2.2.3 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 处理 HeLa 细胞的蛋白免疫印迹检测

另外,LC³ 蛋白(自噬标志蛋白)在自噬发生时,会募集到自噬体的膜上并和膜上的乙醇胺结合,在

电泳时就会看到蛋白分子量的变化(由 18 kD 转化为 16 kD)。在图 6 中我们可以看到,用浓度分别为 0.5 mg/L, 5 mg/L, 1 mg/L 的纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 处理 24 h 后的细胞, LC3-II (16 kD) 明显增多并伴随着 LC3-I (18 kD) 的减少。以上这些结果强有力地说明了在 HeLa 细胞中, 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 可以引起细胞自噬的发生。

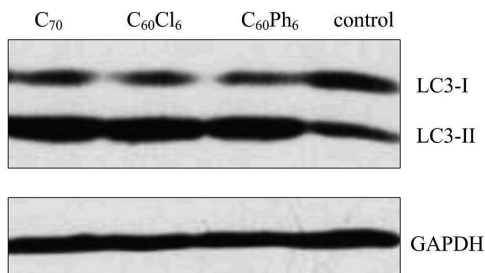


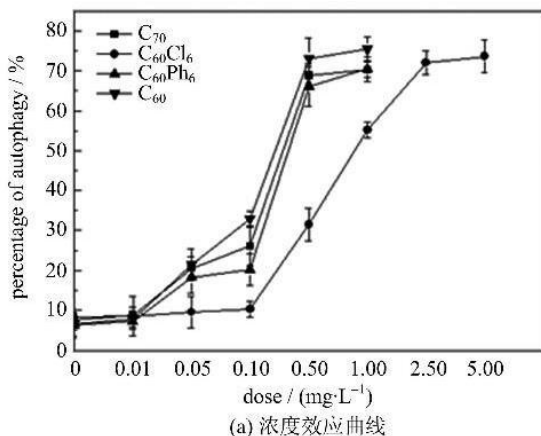
图 6 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 处理 HeLa 细胞的免疫印迹试验

Fig. 6 Western Blotting of nano-C₇₀, C₆₀Cl₆ and C₆₀Ph₆-treated HeLa cells

2.3 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 以及 C₆₀ 诱导细胞自噬效果的比较

2.3.1 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 以及 C₆₀ 诱导自噬的浓度效应曲线

将三种物质与之前已经进行初步研究的纳米 C₆₀ 同时比较。纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 以及 C₆₀ 引起 GFP-LC3 点状聚集的产生具有浓度依赖性, 随着纳米材料浓度的增加, 发生自噬的细胞数目明显增加, 如图 7(a)。通过比较发现, 处理 24 h 后的细胞, C₇₀ 和 C₆₀Ph₆ 在溶液浓度达到 0.1 mg/L 的时候开始出现 GFP-LC3 的点状聚集, 到 1 mg/L 时达



(a) 浓度效应曲线

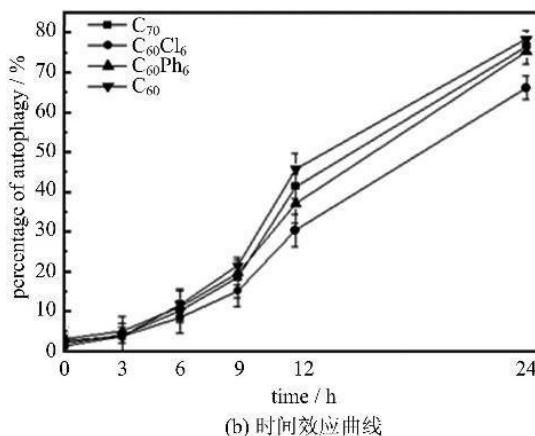
到最大值, 此时浓度再升高会产生细胞毒性, 导致 HeLa 细胞变圆死亡。而纳米 C₆₀Cl₆ 的作用相对较弱, 在 0.5 mg/L 浓度时出现点状聚集, 到 5 mg/L 以后才开始导致细胞的死亡。然而, 与 C₆₀ 比较结果显示, 相同浓度下, 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 均没有 C₆₀ 引起细胞自噬的效果明显, 其中 C₆₀Cl₆ 与 C₆₀ 相比有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 C₇₀ 和 C₆₀Ph₆ 无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3.2 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 诱导自噬的时间效应曲线

同时, 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 引起的 GFP-LC3 点状聚集也具有时间依赖性, 随着时间进程的增加, 发生自噬的细胞数目明显增加, 如图 7(b)。结果表明, 2 mg/L 的几种材料处理细胞后, 纳米 C₇₀ 和 C₆₀Ph₆ 产生点状聚集的程度相当, 在 24 h 处出现最大值, 之后细胞死亡增多, 自噬比例相对减少 (24 h 后的数据未引用), 而 C₆₀Cl₆ 要滞后约 2 h。同样, C₆₀ 在引起细胞自噬的时间进程上也有一定的优势, 相同时间下导致细胞自噬的数目较多, 但是并无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

自噬性细胞死亡被认为是细胞程序性死亡的执行方式之一^[15], 同时持续性的活化本底水平的自噬过程对于细胞内质量控制以及维持细胞自身稳定性都非常重要, 在生理学和病理学上都扮演了举足轻重的角色。研究发现, 在应用各种化疗药物治疗后, 癌细胞中的自噬水平常常提高^[16-18]。而我们的前期工作也显示, 纳米富勒烯 C₆₀ 这种物质除了具有细胞毒性以外, 还能够通过调节自噬途径来增加化疗



(b) 时间效应曲线

图 7 纳米 C₇₀, C₆₀Cl₆ 和 C₆₀Ph₆ 诱导细胞自噬的浓度效应和时间效应曲线

Fig. 7 Dose effect and time course of nano-C₇₀, C₆₀Cl₆ and C₆₀Ph₆-induced autophagy

药物的敏感性从而杀死癌细胞,成为一种潜在的化疗作用辅助因子.

然而,由于 C_{60} 封闭性的超对称结构,其表面的疏水性使之不能很好地参与各种生物大分子的相互作用,其独特的理化性质在生物医药领域的应用受到了很大限制.因此,我们选择电磁性方面表现出色的纳米 C_{70} ,以及表面修饰了不同基团、是多种化学反应中间体的纳米 $C_{60}Cl_6$ 和 $C_{60}Ph_6$ ^[19],将它们转化成水溶性的纳米晶体,探索它们诱导癌症细胞产生自噬的作用.初步结果表明,纳米 C_{70} , $C_{60}Cl_6$ 和 $C_{60}Ph_6$ 均能够诱导一定程度的自噬现象,电镜图片中有明显自噬溶酶体包裹的黑色团块,显示材料可能通过吞噬作用进入细胞发挥作用.有研究结果显示, $[C_{60}(C(COOH)_2)_2]_n$ 能够通过网格蛋白介导的内吞作用进入溶酶体^[20],纳米 C_{70} , $C_{60}Cl_6$ 和 $C_{60}Ph_6$ 是否也通过类似的途径进入细胞,还有待于进一步的验证.

通过对比发现,纳米 C_{70} , $C_{60}Cl_6$ 和 $C_{60}Ph_6$ 晶体溶液均具有导致宫颈癌 HeLa 细胞自噬的现象,其中 C_{70} 的效果最明显.随着浓度和时间的增加,细胞会产生不同程度的自噬溶酶体的聚集,当超过一定浓度时,会产生毒性导致细胞的死亡.而 $C_{60}Cl_6$ 的作用最弱,需要更高的浓度才能产生与其他两者相对应的效果.这可能与极性基团 Cl 的引入有关,增强其与细胞内其他分子作用的同时,也提高其本身的化学活性.而在过去的研究中,卤化富勒烯也一直被证实参与各种有机反应,并作为很多反应过程的中间体,因此纳米 $C_{60}Cl_6$ 在进入细胞后在结构上可能有所改变,以致影响了诱导细胞自噬的作用,具体的机理还需要通过进一步的实验进行研究.然而,与之前已经进行初步研究的 C_{60} 相比,纳米 C_{70} , $C_{60}Cl_6$ 和 $C_{60}Ph_6$ 的作用效果并不比 C_{60} 强烈,可能是由于结构和所连基团的不同,导致晶体材料在进入细胞后与不同的生物大分子产生作用,具体的作用机理和途径还有待于进一步的研究.

总之,三种材料的研究结果,初步暗示纳米家族及其衍生物可能在诱导细胞自噬方面存在普遍性.现在有研究认为,癌细胞自噬能够产生三种效应:促进死亡,促进存活,或者无明显作用^[21].依据不同细胞种类,三种情况都有可能发生^[22].一些证据表明,某些试剂^[23]或特定培养条件下导致的自噬主要起保护作用,甚至在凋亡缺陷^[24]或凋亡被抑制的肿瘤细胞中也是如此^[25].那么,纳米 C_{70} , $C_{60}Cl_6$ 和

$C_{60}Ph_6$ 在低浓度下引起自噬、高浓度下导致细胞死亡的现象,是否暗示它们可能首先促进或维持肿瘤细胞的活性,达到一定限度时才会引起肿瘤细胞死亡?这种自噬是否起到了一定的保护作用,是否也能像 C_{60} 一样促进化疗药物杀死癌症细胞?由于自噬与凋亡关系的研究至今仍不是特别透彻,这一系列的问题现在还有待于进一步的研究.

参考文献 (References)

- [1] Kopitz J, Kisen G O, Gordon P B, et al. Nonselective autophagy of cytosolic enzyme by isolated rat hepatocytes [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1990, 111: 941-953.
- [2] Shintani T, Klionsky D J. Autophagy in health and disease: A double-edged sword [J]. *Science* 2004, 306: 990-995.
- [3] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. [J] *Oncogene*, 2004, 23: 2 891-2 906.
- [4] Larsen K E, Sulzer D. Autophagy in neurons: A review [J]. *Histol Histopathol*, 2002, 17: 897-908.
- [5] Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, et al. Autophagy defends cells against invading group a Streptococcus [J]. *Science*, 2004, 306: 1 037-1 040.
- [6] Ros T D, Prato M. Medicinal chemistry with fullerenes and fullerene derivatives [J]. *Chem Commun*, 1999(8): 663-669.
- [7] Boutorin A S, Tokuyama H, Takasugi M, et al. Fullerene-oligonucleotide conjugates: Photoinduced sequence-specific DNA cleavage [J]. *Angewandte Chemie International edition in English*, 1994, 33: 2 462-2 465.
- [8] Sijbesma R, Srdanov G, Wudl F, et al. Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1993, 115: 6 510-6 512.
- [9] Nakanishi W, Isobe H, JINNO S, et al. Development of Transfection Method Based on the Programming of Cationic Fullerene Association [J]. *Nippon Kagakkai Koen Yokoshu*, 2004, 84(2): 1 130.
- [10] Harhaji L, Isakovic A, Raicevic N, et al. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 568: 89-98.
- [11] Zhang Q, Yang W, Man N, et al. Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C_{60} nanocrystal [J]. *Autophagy*, 2009, 5(8): 1 107-1 117.

- [12] Fortner J D, Lyon D Y, Sayes C M, et al. C₆₀ in water: Nanocrystal formation and microbial response [J]. *Environ Sci Tech*, 2005, 39: 4 307-4 316.
- [13] Troshina O A, Troshin P A, Peregudov A S, et al. Chlorofullerene C₆₀Cl₆: A precursor for straightforward preparation of highly water-soluble polycarboxylic fullerene derivatives active against HIV [J]. *Org Biomol Chem*, 2007, 5: 2 783-2 791.
- [14] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19: 5 720-5 728.
- [15] Schweichel J U, Merker H J. Morphology of various types of cell death in prenatal tissues [J]. *Teratology*, 1973, 7: 253-266.
- [16] Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 726-734.
- [17] Levine B. Cell biology: Autophagy and cancer [J]. *Nature*, 2007, 446: 745-747.
- [18] Amaravadi R K, Thompson C B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 7 271-7 279.
- [19] Coheur P F, Comil J, Dos Santos D A, et al. Photophysical properties of C₆₀Cl₆, C₆₀Ph₅Cl and C₆₀Ph₅H [J]. *Synthetic Metals*, 1999, 103: 2 407-2 410.
- [20] Li Wei, Chen Chunying, Ye Chang, et al. The translocation of fullerene nanoparticles into lysosome via the pathway of clathrin-mediated endocytosis [J]. *Nanotechnology*, 2008, 19: 145102, doi: 10.1088/0957-4484/19/14/145102.
- [21] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: An innocent convict? [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115: 2 679-2 688.
- [22] Ding W X, Ni H M, Gao W, et al. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 4 702-4 710.
- [23] Wang Y, Singh R, Massey A C, et al. Loss of macroautophagy promotes or prevents fibroblast apoptosis depending on the death stimulus [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 4 766-4 777.
- [24] Han J, Hou W, Goldstein L A, et al. Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 19 665-19 677.
- [25] Wu Y T, Tan H L, Huang Q, et al. Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death [J]. *Autophagy*, 2008, 4: 457-466.