

- [13] Lin H F, Hsieh M J, Hsi Y T, et al. Celastrol-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma is associated with the activation of the death receptor and the mitochondrial pathway[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2): 1683-1690.
- [14] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [15] Wang W H, Yeh C F, Lan M Y. The role of nasopharyngectomy in the management of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2022, 30(1): 3-12.
- [16] 陈红, 王维, 李配富, 等. 养阴祛邪法治疗鼻咽癌放疗后口干症的效果[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(10): 130-133.
- [17] 喻风, 王林林. 中医药治疗鼻咽癌研究进展[J]. *中医耳鼻喉杂志*, 2019, 9(2): 99-101.
- [18] 李小江, 邬明歆, 孔凡铭, 等. 中药有效成分抗肿瘤活性及作用机制研究进展[J]. *中草药*, 2020, 51(9): 2587-2592.
- [19] Chan K M, Cheng C H, Lee C F, et al. Potential anticancer effect of celastrol on hepatocellular carcinoma by suppressing CXCR4-related signal and impeding tumor growth *in vivo* [J]. *Arch Med Res*, 2020, 51(4): 297-302.
- [20] Lin F Z, Wang S C, Hsi Y T, et al. Celastrol induces vincristine multidrug resistance oral cancer cell apoptosis by targeting JNK1/2 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2019, 15(54): 1-8.
- [21] 齐康, 李洋, 李雪冰, 等. IKK $\beta$ 在人肺腺癌细胞株 A549 及其耐药细胞株 A549/DDP 中的表达和意义[J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(5): 363-368.
- [22] 李媛媛, 李忠尧, 毕悦, 等. NF- $\kappa$ B 介导的神经炎症在脑膜癌病中的研究[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2020, 28(1): 28-32.
- [23] Zhou X J, Lu H T, Li F J, et al. MicroRNA-429 inhibits neuroblastoma cell proliferation, migration and invasion *via* the NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 13(25): 5.

## 黄精枸杞胶囊延缓秀丽隐杆线虫衰老作用研究

何园<sup>1,2,3,4</sup>, 李自强<sup>1,2,3,4</sup>, 马淑梅<sup>2,3,4</sup>, 龙钢<sup>5</sup>, 刘莉<sup>2,3,4\*</sup>

(1. 上海工程技术大学化学化工学院, 上海 201620; 2. 中国医药工业研究总院药理评价研究中心, 上海 200437; 3. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务平台, 上海 200437; 4. 上海医药工业研究院创新药物与制药工艺国家重点实验室, 上海 200437; 5. 第四军医大学西京医院中医科, 陕西 西安 710032)

**摘要:** 目的 以秀丽隐杆线虫为模式生物, 探讨黄精枸杞胶囊的抗衰老活性。方法 将野生型 N2 秀丽隐杆线虫同步化处理后分为对照组和药物干预组, 观察黄精枸杞胶囊对秀丽隐杆线虫寿命、应激抵御能力、生殖能力、咽部泵送能力和运动能力的影响, 同时对抗氧化相关指标超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 进行检测, 考察对突变体线虫 TJ356 *DAF-16* 基因核转位和对线虫 AM141 多聚谷氨酰胺 (polyQ) 聚集的影响。结果 黄精枸杞胶囊能显著延长野生型秀丽隐杆线虫的寿命, 增强其抗氧化应激和热应激、咽部泵送和运动能力, 提高秀丽隐杆线虫体内 SOD 活性并降低其体内 MDA 水平, 但对其生殖能力无明显影响; 可促进 TJ356 线虫体内 *DAF-16* 的核转位, 抑制 polyQ 在 AM141 线虫体壁细胞中聚集。结论 黄精枸杞胶囊能延长线虫的健康寿命, 其作用机制可能与通过调控 *DAF-16*/*FOXO* 通路, 增强应激抵御能力有关。

**关键词:** 秀丽隐杆线虫; 抗衰老; 核转位; 多聚谷氨酰胺

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)01-0309-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.01.053

随着现代社会环境变化和人口老龄化加剧, 癌症、神经退行性疾病、肿瘤、心脑血管等发病率也随之增长。衰老被认为是导致这些疾病的主要因素<sup>[1]</sup>。因此, 抗衰老逐渐成为研究热点。研究表明, 药物治疗或基因干预可能延长寿命, 也可能推迟与衰老有关疾病的发病, 从而促进健康。因此, 对延缓衰老过程和预防衰老相关疾病的需求日

益增加。

中药作为传统医学的重要组成部分, 历史源远流长, 其医学功效和预防作用一直备受关注<sup>[2-3]</sup>。现代药理学研究表明, 许多中药具有抗衰老作用<sup>[4]</sup>。地黄可以抑制过氧化氢诱导的大鼠肾脂质过氧化及红细胞溶血, 通过清除自由基的产生, 抑制脂质过氧化, 延缓细胞衰老<sup>[5]</sup>; 红参能够通

收稿日期: 2023-01-30

基金项目: 上海市生物物质成药性评价专业技术服务平台 (18DZ2290900)

作者简介: 何园 (1994—), 男, 硕士生, 从事中药药理研究。Tel: 18895339846, E-mail: heyuan1105@126.com

\* 通信作者: 刘莉 (1968—), 女, 研究员, 从事中药药理研究。Tel: 15926128956, E-mail: liulisipi@foxmail.com

过激活 AMP 蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 来保护细胞免受铁诱导的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和线粒体损伤<sup>[6]</sup>。黄精枸杞胶囊由熟地黄 (*Rehmanniae Radix Praeparata*)、枸杞子 (*Fructus Lycii*)、黄精 (*Polygonati Rhizoma*)、女贞子 (*Fructus Ligustri Lucidi*) 和西洋参 (*Panax Quinquefolii Radix*) 组成, 具有提高免疫、缓解疲劳的作用, 拟开发成为抗衰老的复方药物。

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis Elegans*) 生命周期为 14~21 d, 通体透明, 基因组成明确, 拥有人类基因组的 60%~80% 同源基因, 是研究寿命周期的良好模式动物<sup>[7-8]</sup>。本实验利用秀丽隐杆线虫研究黄精枸杞胶囊的抗衰老作用及对寿命健康延长的可及性。

## 1 材料

1.1 试剂与药物 野生型 N2 秀丽隐杆线虫株、TJ356 株、AM141 株、大肠杆菌 *E. coli* OP50 均购自美国线虫中心。胡桃醌 (批号 H861192) 购自北京华威锐科化工有限公司; 蛋白胍 (批号 20190324)、琼脂 (批号 20190130) 及其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。黄精枸杞胶囊 (批号 21030401) 购自苏州科豪生物制品有限公司, 由熟地黄、枸杞子、黄精、女贞子、西洋参组成, 经粉碎、辐照灭菌 (<sup>60</sup>Co, 5 kGy)、提取 (西洋参、女贞子用 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 8 倍量、1.5 h; 熟地黄、枸杞子、黄精煎煮 2 次, 每次 8 倍量水、1.5 h, 过滤, 合并滤液)、浓缩、真空干燥 (60 °C)、制粒、装囊、包装等工艺制成, 规格 0.42 g/粒。

1.2 仪器 KB115 型生化培养箱 (德国 Binder 公司); GI54DWS 型全自动高压灭菌锅 (50 L, 美国 Zealway 公司); Legend Micro 21R 型离心机、Variskan Flash 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Eppendorf 5810R 型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); XP105DR 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); NIB-100 型倒置生物显微镜 (宁波永新光学股份有限公司); ECLipse Ti 型荧光倒置显微镜 [尼康仪器 (上海) 有限公司]。

## 2 方法

2.1 含黄精枸杞胶囊的 NGM 培养基配制 称取黄精枸杞胶囊适量, 加入 55 °C 恒温孵育线虫生长培养基 (NGM) 中, 摇匀后浇板, 制成质量浓度分别为 0.25、0.5、1 mg/mL 的培养基, 作为黄精枸杞胶囊低、中、高剂量组; 对照组为不含黄精枸杞胶囊的 NGM 培养基; 4 °C 保存。

2.2 秀丽隐杆线虫培养、同步化 线虫培养于 20 °C、涂有 OP50 的 NGM 培养基中, 将处于产卵高峰期的线虫 N2 用 M9 缓冲液冲洗至 EP 管, 静置 3 min, 弃上清获得线虫沉淀。利用 Bleach 液漂白法对线虫进行同步化处理<sup>[9]</sup>。

2.3 秀丽隐杆线虫寿命实验 按“2.2”项下方法获得同步化的线虫, 分为对照组和给药组, 将同期化的 L4 期线虫分别转移到含有不同质量浓度的黄精枸杞胶囊的 NGM 培养基中, 每组 50 条线虫, 置于 20 °C 培养。生存期每隔 1 d 评

估 1 次, 直至死亡。当线虫对铂金线筛的触碰没有反应时, 判定为死亡<sup>[10]</sup> (培养皿边缘或覆盖在培养皿上直到培养皿干燥或在琼脂中钻洞的线虫被排除在外)。

2.4 秀丽隐杆线虫应激实验及生殖实验 按“2.2”项下方法制备线虫, 于 L4 期将线虫转移到 NGM 培养基上, 培养 5 d 后用 M9 缓冲液冲洗, 除去 OP50 和黄精枸杞胶囊。

热应激: 取上述线虫各 50 条, 转移至新的 NGM 培养基上, 置于 35 °C 培养箱中, 每隔 1 h 统计线虫死亡量, 直至所有线虫死亡<sup>[11]</sup>。

氧化应激: 取上述线虫各 50 只, 转移至含胡桃醌 (浓度 250 μmol/L) 的 NGM 培养皿中, 每隔 24 h 统计死亡数并记录, 直至所有线虫死亡<sup>[12]</sup>。

生殖能力: 分组及处理方法同“2.1”项, 于 L4 期将线虫转移至涂有 *E. coli* OP50 的 NGM 平皿上, 每皿 1 条, 于成年第 1 天将线虫转移至新的培养皿上, 计数前一培养皿上的虫卵数目, 连续 5 d, 比较给药组和对照组的平均排卵数目。

2.5 秀丽隐杆线虫咽泵速率实验 按“2.2”项下方法获得同步化线虫。在整个生殖期间, 每天将成虫转移至新的 NGM 培养皿中。在成年期第 5、10 天在体视镜下观察线虫咽泵 30 s, 评价咽部的泵血活动, 作为老化过程中肌肉损伤的衡量指标。

2.6 秀丽隐杆线虫身体弯曲试验 按“2.2”项下方法获得同步化线虫。在整个生殖期间, 每天将成虫转移至新的 NGM 培养皿中。在成年期第 5、10 天记录线虫运动 30 s 时所产生的正弦曲线数<sup>[13]</sup>。

2.7 秀丽隐杆线虫超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 水平测定 按“2.2”项下方法制备线虫, 于 L3 期将线虫转移到含/不含黄精枸杞胶囊黄精枸杞胶囊的 NGM 板上, 每组平行 3 次。培养 5 d 后, 收集线虫至离心管, M9 缓冲液冲洗 3 次, 除去 OP50 和黄精枸杞胶囊, 加入 500 μL PBS, 于液氮中反复冻融 3 次, 4 °C 离心取上清液, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平通过商用试剂盒 (南京建成生物工程研究所有限公司) 测定。

2.8 DAF-16 亚细胞定位实验 将 TJ356 线虫同质化, 收集虫卵至 S-培养基中, 于 L1 期进行分组, 药物作用 5 d 后转移线虫至 2% 琼脂糖垫上, 用 10 mmol/L 叠氮化钠麻醉, 荧光显微镜下观察并拍照。

2.9 多聚谷氨酸 (polyQ) 荧光定量实验 AM141 秀丽线虫是在其 *unc-54* 基因上转入了融合 GFP 的 40 个多聚谷氨酸长度的 polyQ 重复片段 (polyQ) 构建而成, 由于 *unc-54* 基因在秀丽线虫肌球蛋白重链上表达, 如果 polyQ 在其中表达则会导致 polyQ 在体壁肌肉层聚集。将同步化的 AM141 线虫加到含药平皿中, 20 °C 培养 5 d, 转移线虫至 2% 琼脂糖垫上, 10 mmol/L 叠氮化钠麻醉, 荧光显微镜下统计线 AM141 周身的荧光点数。

2.10 统计学分析 通过 GraphPad Prism 6.0 软件进行处理, 数据表示为 Mean±SEM。t-test 检测寿命实验中, 比较

的显著性是通过 Log-rank (Mantel-Cox) 检验来计算的, 而其他测定的比较是通过 Student's t-test 来确定的。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽线虫寿命的影响 如图 1 所示, 黄精枸杞胶囊对秀丽线虫寿命有一定的延长作用, 并且呈剂量依赖性。黄精枸杞胶囊中、高剂量组处理的 N2 秀丽隐杆线虫平均寿命分别提高了 14.76%、20.64% (图 1、表 1), 说明黄精枸杞胶囊具有潜在的抗衰老作用。

表 1 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽隐杆线虫寿命的影响 (Mean±SEM)

组别	平均寿命/d	延长率	最大寿命/d	线虫数/条
对照组	17.68±0.61	-	24	50
黄精枸杞胶囊低剂量组	18.80±0.70	6.33%	26	50
黄精枸杞胶囊中剂量组	20.29±0.61**	14.76%	28	48
黄精枸杞胶囊高剂量组	21.33±0.69**	20.64%	28	48

注: 与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

3.2 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽隐杆线虫应激能力的影响 从成虫第 1 天开始, 用不同质量浓度的黄精枸杞胶囊预处理 5 d, 发现其对胡桃醌 (250  $\mu\text{mol/L}$ ) 诱导的氧化应激具有保护作用 (图 2a~2b)。对照组平均存活时间为 2.98 d, 黄精枸杞胶囊低剂量组平均存活时间为 3.18 d ( $P > 0.05$ ), 中剂量组为 3.48 d ( $P < 0.05$ ), 高剂量组为 4.02 d ( $P <$

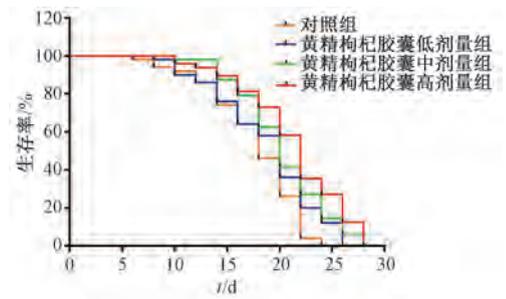
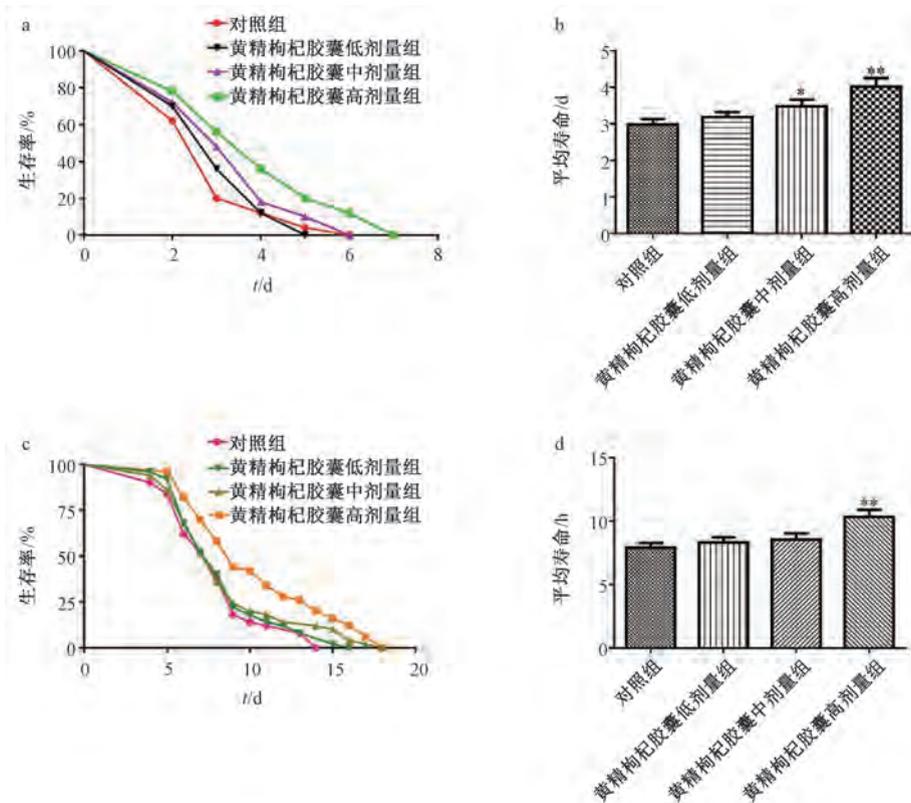


图 1 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽隐杆线虫寿命的影响

0.01)。在氧化应激状态下, 黄精枸杞胶囊高剂量组平均存活时间与对照组相比延长了 34.89%。

对照组平均存活时间为 7.90 h, 黄精枸杞胶囊低剂量组平均存活时间为 8.32 h ( $P > 0.05$ ), 中剂量组为 8.54 h ( $P > 0.05$ ), 高剂量组为 10.34 h ( $P < 0.01$ ), 与对照组相比延长了 30.88% (图 2c~2d)。



注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 2 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽隐杆线虫应激能力的影响 ( $n = 50$ )

### 3.3 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽隐杆线虫生殖能力的影响

如图3所示,与对照组比较,黄精枸杞胶囊各剂量组均未影响线虫的产卵率 ( $P>0.05$ ),说明黄精枸杞胶囊诱导的寿命延长并不依赖生殖信号通路。

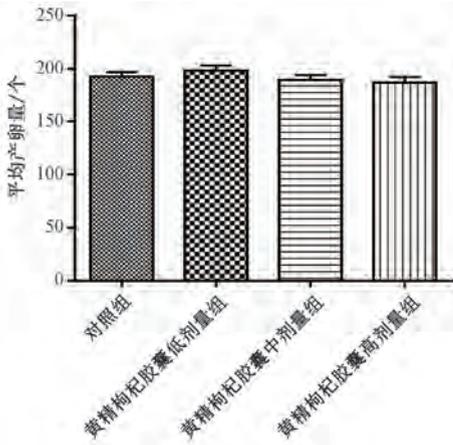


图3 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽隐杆线虫生殖能力的影响 ( $n=50$ )

### 3.4 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽隐杆线虫健康寿命的影响

秀丽隐杆线虫在成年期第5、10天的咽泵速率和身体弯曲频率被记录,并显示出差异,与对照组比较,黄精枸杞高剂量组线虫咽泵速率、身体弯曲频率升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) (图4),表明在黄精枸杞胶囊高剂量作用下,随着年龄增长,肌肉功能得到了更好的保护。

### 3.5 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽线虫超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平的影响

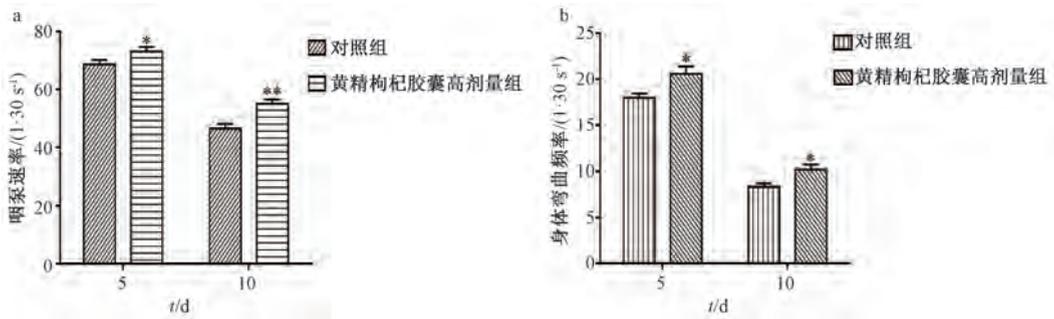
黄精枸杞胶囊高剂量处理线虫5d后,与对照组比较,可提高线虫体内 SOD 活性 ( $P<0.05$ ),降低体内 MDA 水平 ( $P<0.01$ ) (图5)。

### 3.6 黄精枸杞胶囊对 TJ356 线虫 DAF-16 核定位的影响

与对照组比较,经黄精枸杞胶囊高剂量处理的虫体荧光强度增强,细胞核内 DAF-16::GFP 颗粒数量增加 ( $P<0.01$ ) (图6),说明黄精枸杞胶囊高剂量处理提高了 DAF-16 水平,并刺激了其核转位。

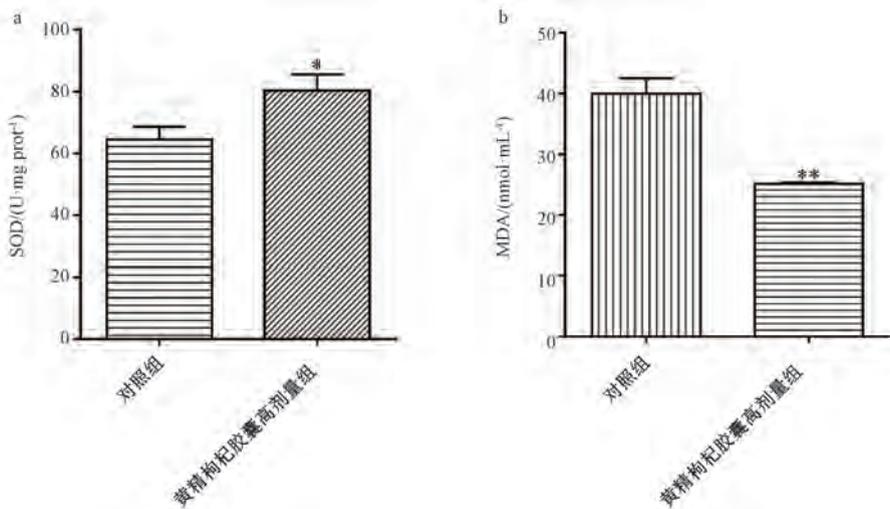
### 3.7 黄精枸杞胶囊对 AM141 线虫 PolyQ 的影响

对照组 AM141 线虫在第5天体壁细胞中的荧光聚集点为  $(39.53 \pm 2.94)$  个,黄精枸杞胶囊低、中、高剂量组的线虫其体壁



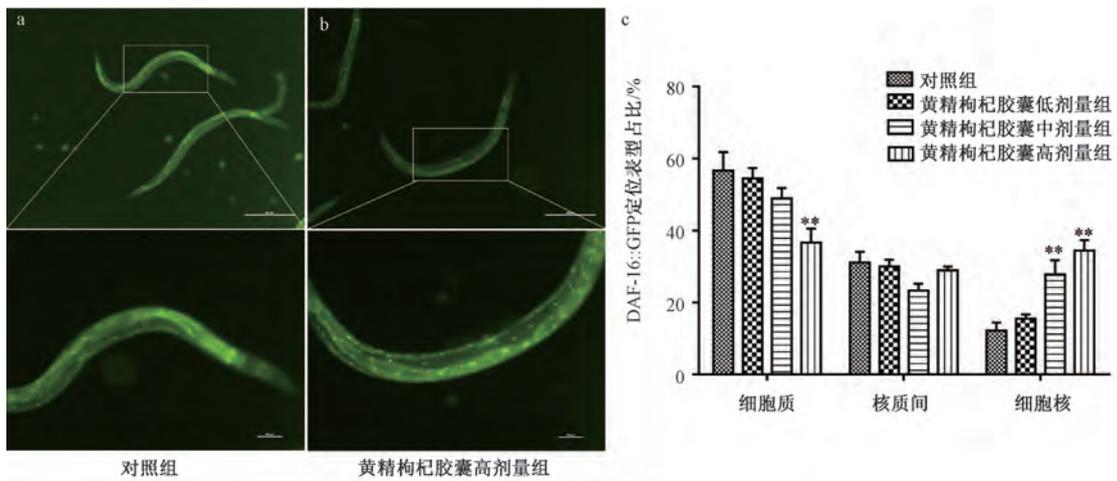
注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图4 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽隐杆线虫健康寿命的影响 ( $n=30$ )



注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图5 黄精枸杞胶囊对 N2 秀丽线虫超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平的影响 ( $n=300$ )

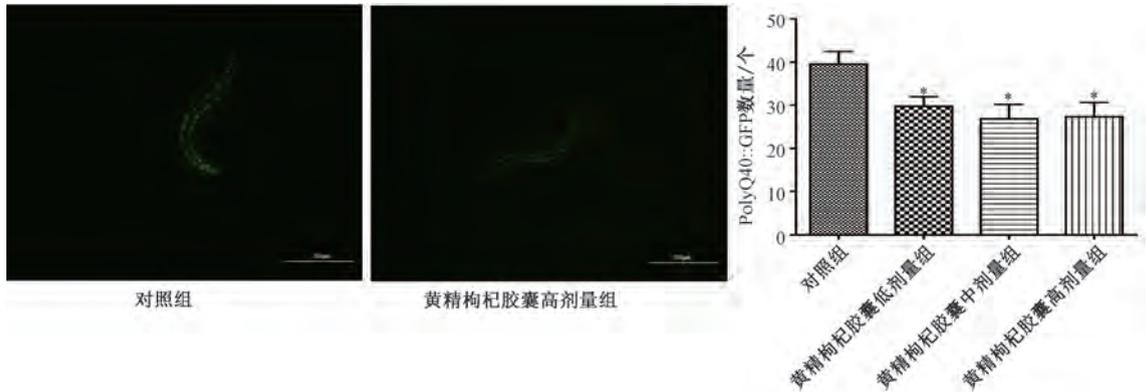


注：与对照组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ 。

图6 黄精枸杞胶囊对 TJ356 线虫 DAF-16 核定位的影响 ( $n = 30$ )

细胞中的荧光聚集点分别为  $(29.72 \pm 2.27)$ 、 $(26.85 \pm 3.33)$ 、 $(27.30 \pm 3.32)$  个，表明黄精枸杞胶囊各剂量组线虫 polyQ40::

GFP 数量减少 ( $P < 0.05$ ) (图 7)，提示它对 AM141 线虫 polyQ 的聚集有一定的抑制作用。



注：与对照组比较，\*  $P < 0.05$ 。

图7 黄精枸杞胶囊对 AM141 线虫 PolyQ 的影响 ( $n = 30$ )

#### 4 讨论

衰老是所有生物固有的生理过程，会导致细胞保护和生理功能逐步下降。本实验利用寿命较短的模式生物线虫，研究黄精枸杞胶囊对线虫寿命和相关衰老指标的影响。研究发现，黄精枸杞胶囊可延长线虫的平均寿命，黄精枸杞胶囊中、高剂量组的 N2 线虫寿命分别提高了 14.76%、20.64%；对于同质化后生长至相同生命时期的 N2 线虫，黄精枸杞胶囊高剂量组处理后，其咽泵频率与身体弯曲频率高于对照组。有研究表明，压力应激抵抗能力的提高与生物体寿命延长有关；本实验发现，对于胡桃醌诱导氧化应激损伤，黄精枸杞胶囊中、高剂量组可提高 N2 线虫抗氧化应激能力及存活率；在热应激条件下，黄精枸杞胶囊高剂量处理的 N2 线虫的抗热应激能力提升。

为进一步了解黄精枸杞胶囊发挥抗衰老作用的潜在机制，本实验对黄精枸杞胶囊处理的 N2 线虫的超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平进行检测。研究表明，黄精枸杞胶囊可以诱导 SOD 活性升高，从而消除氧自

由基，同时显著降低体内 MDA 水平。总 SOD 活性升高提示了转录因子 DAF-16 可能参与了此过程。DAF-16 是秀丽隐杆线虫 FOXO 转录因子的同源基因，其靶基因主要参与抗逆性、代谢和寿命<sup>[14-15]</sup>。本实验用黄精枸杞胶囊处理突变体线虫 TJ356 后发现，黄精枸杞胶囊提高了 TJ356 线虫细胞核内 DAF-16 的水平，并刺激其核转位，说明转录因子 DAF-16 参与了黄精枸杞胶囊的抗氧化作用。

然而，寿命的延长并不一定是健康期的延长，健康期是指生命中没有疾病的时期<sup>[16]</sup>。如果仅仅是延长了虚弱期，那么延长寿命是不可取的，因为在虚弱期，易患上与衰老相关疾病<sup>[17-18]</sup>。神经退行性疾病在老年人中更为普遍，并极大地损害生活质量<sup>[19]</sup>。最近研究表明，蛋白动态失衡不仅是经退行性疾病发生和发展的重要因素，也是衰老的主要特征，寿命调节相关信号是联系衰老、蛋白动态平衡以及神经退行性疾病这三者的重要桥梁<sup>[20-21]</sup>。因此，本实验通过黄精枸杞胶囊处理表达 polyQ40 的突变体线虫 AM141。结果表明，黄精枸杞胶囊可抑制 AM141 体壁细胞

中 polyQ 蛋白的聚集,说明黄精枸杞胶囊是通过减缓多聚谷氨酰胺的聚集起到神经保护作用的。

综上所述,黄精枸杞胶囊抗氧化活性显著。该胶囊可能通过调控 DAF-16/FOXO 通路增强线虫的抗逆性。此外,该胶囊可抗衰老、延长寿命并减弱衰老标志,如与年龄相关的肌肉功能下降、polyQ40 聚集体的形成。为支持黄精枸杞胶囊的广泛使用,其生物活性和毒理学特征还需进一步研究。

#### 参考文献:

[ 1 ] Niccoli T, Partridge L. Ageing as a risk factor for disease [ J ]. *Curr Biol*, 2012, 22( 17 ): R741-R752.

[ 2 ] Liu J, Peng L, Huang W H, et al. Balancing between aging and cancer: molecular genetics meets traditional Chinese medicine [ J ]. *J Cell Biochem*, 2017, 118( 9 ): 2581-2586.

[ 3 ] Hsu Y C, Chiu C J, Wray L A, et al. Impact of traditional Chinese medicine on age trajectories of health: evidence from the Taiwan longitudinal study on aging [ J ]. *J Am Geriatr Soc*, 2015, 63( 2 ): 351-357.

[ 4 ] Wan F Q, Zhi D J, Liu D L, et al. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by several traditional Chinese medicine formulas [ J ]. *Biogerontology*, 2014, 15( 4 ): 377-387.

[ 5 ] 麻 锐, 丁瑞恒, 廖蕴华. 不同浓度地黄对大鼠肾组织抗氧化作用的研究 [ J ]. *内科*, 2012, 7( 3 ): 220-223.

[ 6 ] Dong G Z, Jang E J, Kang S H, et al. Red ginseng abrogates oxidative stress via mitochondria protection mediated by LKB1-AMPK pathway [ J ]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13: 64.

[ 7 ] Guarente L, Kenyon C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms [ J ]. *Nature*, 2000, 408( 6809 ): 255-262.

[ 8 ] Gershon H, Gershon D. *Caenorhabditis elegans*—a paradigm for aging research: advantages and limitations [ J ]. *Mech Ageing Dev*, 2002, 123: 261-274.

[ 9 ] Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans* [ R ]. 2006.

[ 10 ] Solis G M, Petrascheck M. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates [ J ]. *J Vis Exp*, 2011( 49 ):

2496-2496.

[ 11 ] Cañuelo A, Gilbert-López B, Pacheco-Liñán P, et al. Tyrosol, a main phenol present in extra virgin olive oil, increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* [ J ]. *Mech Ageing Dev*, 2012, 133( 8 ): 563-574.

[ 12 ] Aithal B K, Kumar M R, Rao B N, et al. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells [ J ]. *Cell Biol Int*, 2009, 33( 10 ): 1039-1049.

[ 13 ] Ruan Q L, Qiao Y, Zhao Y L, et al. Beneficial effects of *Glycyrrhizae radix* extract in preventing oxidative damage and extending the lifespan of *Caenorhabditis elegans* [ J ]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 177: 101-110.

[ 14 ] Sun X J, Chen W D, Wang Y D. DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity [ J ]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 548.

[ 15 ] Chen A T, Guo C F, Itani O A, et al. Longevity genes revealed by integrative analysis of isoform-specific daf-16/FoxO mutants of *Caenorhabditis elegans* [ J ]. *Genetics*, 2015, 201 ( 2 ): 613-629.

[ 16 ] Bansal A, Zhu L J, Yen K, et al. Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112( 3 ): E277-E286.

[ 17 ] Douglas P M, Dillin A. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration [ J ]. *J Cell Biol*, 2010, 190( 5 ): 719-729.

[ 18 ] Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation [ J ]. *Nature*, 2016, 539( 7628 ): 180-186.

[ 19 ] Caldwell K A, Willicott C W, Caldwell G A. Modeling neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* [ J ]. *Dis Model Mech*, 2020, 13( 10 ): dmm046110.

[ 20 ] Liang J J H, McKinnon I A, Rankin C H. The contribution of *C. elegans* neurogenetics to understanding neurodegenerative diseases [ J ]. *J Neurogenet*, 2020, 34( 3-4 ): 527-548.

[ 21 ] Calahorra F, Ruiz-Rubio M. *Caenorhabditis elegans* as an experimental tool for the study of complex neurological diseases: Parkinson's disease, Alzheimer's disease and autism spectrum disorder [ J ]. *Invert Neurosci*, 2011, 11( 2 ): 73-83.