

评述与展望

Review and Progress

线虫在药物开发中的研究进展及在鉴别鹿茸活性成分上的应用

杜方舟¹ 李春义^{1,2*}

¹ 中国农业科学院特产研究所, 特种经济动物分子生物学国家重点实验室, 长春, 130112; ² 长春科技学院, 长春, 130022

* 通信作者, lichunyi1959@163.com

摘 要 秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)是生命科学研究中的重要模式生物之一, 由于其身体结构简单和寿命周期短暂等优势被用来研究整个生命过程不同阶段的分子调节机制, 在药物开发领域也发挥了重要作用。因此本综述对秀丽隐杆线虫在药物开发方面的应用及研究进展进行了简要综述。鹿茸作为中国的传统名贵中药, 在上千年里大多以粗提物的形式加以应用, 鹿茸的具体活性成分及其相关药理作用一直有待于系统研究, 由于线虫作为优秀的模式生物操作简单易于观察, 可以较方便的对各成分进行效果鉴定, 因此本综述对线虫在鉴别鹿茸活性成分中的潜在应用价值进行了探讨。

关键词 秀丽隐杆线虫, 抗衰老, 疾病, 药物开发, 鹿茸活性成分

Progress in *C. elegans* Model Development for Drug Discovery, and Possible Application on Identification of Active Compounds of Velvet Antlers

Du Fangzhou¹ Li Chunyi^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Special Economical Animal Molecular Biology, Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun, 130112; ² Changchun Sci-Tech University, Changchun, 130022

* Corresponding author, lichunyi1959@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.038.003521

Abstract *C. elegans* is one of the most important model organisms in life science research *C. elegans*. Because of its simple body structure and short life cycle, it can be used to study the molecular regulation mechanism of the different stages of the whole life process. *C. elegans* has played an important role in drug development. Therefore, this review discussed the application and research progress of *C. elegans* in drug development as a brief summary. As a traditional Chinese precious medicine, deer velvet antlers have been used in the form of crude extracts in the past millennia. The specific active ingredients of deer antlers and its related pharmacological effects have yet to be systematically studied. Since *C. elegans* as the excellent model organisms are easy to be observed and operated, thus the effects of each component can be identified more readily. So in this review, we also discussed the potential application of *C. elegans* in the identification of active ingredients of deer velvet antlers.

Keywords *C. elegans*, Anti-aging, Drug discovery, Antler, Active compounds

20 世纪 60 年代, 想要在高等动物中开展涉及到细胞分化和器官发育的基础研究困难重重, 分子遗传学的奠基人之一 Brenner (1974) 选择了遗传上可控又比较简单的多细胞生物—秀丽隐杆线虫(线虫), 在

神经发育领域展开研究, 并做出了突出的贡献。近年来, 人们对线虫的研究日益深入, 线虫已经成为生命科学领域的重要模式生物, 并在药物开发过程中发挥巨大作用。

基金项目 本研究由中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610342016003)和吉林省科技厅项目(20170101003JC)共同资助

引用格式 :Du F.Z., and Li C.Y., 2019, Progress in *C. elegans* model development for drug discovery, and possible application on identification of active compounds of velvet antlers, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 38 (8): 3521-3526 (杜方舟, 李春义, 2019, 线虫在药物开发中的研究进展及在鉴别鹿茸活性成分上的应用, 基因组学与应用生物学, 38(8): 3521-3526)

1 线虫在药物开发研究中的发展

药物开发一直是科研工作者的一个重要研究方向,而药物开发和药物作用靶点的识别是紧密相关的两个方面,将这两方面结合起来目的是为了有效地改善人类的病理状态。秀丽隐杆线虫作为一种简单的模式生物为简化药物开发和药物靶点识别提供了非常好的平台。秀丽隐杆线虫作为一种遗传易处理的多细胞生物,已经有四十多年的研究历史,它已经成功地被用作模型来解决生物学多个领域的基础问题,包括发育、神经生物学和衰老。科研工作者已经完成了线虫的全基因组测序,其中60%~80%的基因同人类基因具有同源性(Harris et al., 2004), Wormbase (<http://www.wormbase.org/0>)上提供了线虫相关的丰富信息,包括有关基因的结构、微阵列数据、线虫突变株及RNAi表型、蛋白质间的相互作用以及大量突变和转基因菌株等,使线虫广泛应用于疾病研究和药物开发研究中。另外,可以通过喂食线虫表达双链RNA(dsRNA)的大肠杆菌对线虫进行RNA干扰(RNAi)来实现特定基因的沉默。线虫通体透明使得荧光可以直接观察,从而实现实时监测(Ewbank and Zugasti, 2011)。

线虫中最早的药物开发实验是在制备平板过程中将化合物加入琼脂实现的(Brenner, 1974)。该方法所需劳动强度大,另外会消耗大量化合物,尽管该方法有这些缺点,但一直沿用至今。随后液体培养得到了利用,线虫在药物开发及靶点识别上的应用发生了里程碑的变化,逐步实现了高通量筛选。

线虫作为药物开发的模型,在观察手段和检测方式上也发生了巨大的变化。据报道Kwok等(2006)首次利用线虫进行大规模药物筛选,使用琼脂固体板培养的方法,通过评价线虫的生长、致死、不协调运动和其他形态缺陷表型来判定化合物的生物活性,通过这种方法,共鉴定了308个活性化合物。Lehner等(2006)开发了全液体培养的流程,因此可以在96孔板中利用线虫进行药物高通量筛选,全液体培养的工作流程可以使用自动处理程序和自动化成像平台来进行检测,节省大量人力物力。Moy等(2006)使用粪肠球菌感染线虫模型筛选新型的抗菌化合物,通过液体筛选的方法对6000种合成化合物和1136种天然产物提取物进行了筛选,其中16种化合物和9种提取物能够提高线虫生存能力。Leung等(2013)报道了依赖于线虫中的荧光进行超高通量药物筛选(uHTS)的1536孔流程,研究人员利用转基

因线虫模型筛选*skn-1*的小分子抑制剂,*skn-1*是同应激相关的转录因子并同多种寄生虫的药物抗性相关,因此*skn-1*的小分子抑制剂可以用于治疗影响世界三分之一人口的寄生虫感染。Leung等(2011)通过检测荧光强度来鉴定*skn-1*的靶点*gst-4::GFP*的表达量变化,在364000种化合物中筛选出了125种*skn-1*的特异性抑制剂,利用线虫进行药物筛选和开发的方式正在不断地发展和进步,所涉及的疾病类型也越来越广泛,以下将对线虫在不同疾病中的药物开发进行具体阐述。

2 在抗衰老药物开发中的应用

衰老是生物体不可避免且不可逆的生理趋势,它和老年病的发生紧密相关,因此延缓衰老在一定程度上可以减少老年病的发病率,如阿尔兹海默病、

型糖尿病、冠心病等(Kylie et al., 2015)。线虫作为第一个完成全基因组测序的多细胞生物,因其非寄生、生命周期短、通体透明易于观察、培养方式简单、易于大规模培养,信号通路高度保守等优势被应用于抗衰老的分子机制及抗衰老药物筛选研究中(游牧和胡云虎, 2016)。在线虫中首次鉴定了多种调控衰老进程的遗传、药理及环境因素,这些因素同时与年龄相关疾病的发生和发展有关,在调节人类寿命方面发挥至关重要的作用(Torgovnick et al., 2013)。由于衰老相关的信号通路,例如,胰岛素/IGF-1信号通路(insulin/IGF-1 signaling, IIS)、线粒体信号通路等在线虫与人类之间具有高度保守性,因此延长线虫生命周期的每一种干预措施都可能揭示出对人类寿命产生积极影响的相关策略(Johnson, 2013)。例如,Lima等(2014)对仙人掌的15种提取物进行研究,结果显示其中4种提取物Uy1、Uy15、Ar1和Br15都能不通程度的延长线虫的生命周期,同时利用TJ356(DAF-16::GFP)转基因线虫株研究DAF-16的核质转运情况,结果显示能够延长线虫寿命的仙人掌提取物也能够促进DAF-16由细胞质向细胞核的转移,从而激活下游信号通路发挥抗衰老作用。DAF-16作为线虫中重要的转录因子,同人体内的FoxO同源,因此在人体内促进FOXO由细胞质向细胞核转运同样能够激活下游一些信号通路,发挥抗衰老作用(Murshid et al., 2013)。

中药作为中国的传统药用动植物,具有很高的应用价值和开发前景,目前秀丽隐杆线虫已被广泛应用于中药研究和开发中。Liu等(2013)利用线虫研究发现侧柏种子的正丁醇提取物(BSPO)具有抗衰老

的作用,BSPO 能通过减少 ROS 的累积、上调抗性相关蛋白 GST-4 和 HSP-16.2 的表达量以及减少脂褐质的含量发挥抗衰老作用。鹿茸作为名贵且滋补效果明确的传统中药,一直具有很大的开发价值,关利新等(1996, 中国林副特产, (3): 9-10)研究发现,鹿茸的乙醇浸出物能够显著提高老龄鼠血清的 SOD 活性与降低 LPO 浓度,发挥抗衰老的作用;刘瑜等(2010)认为,鹿茸的 70%乙醇提取物能够增强糖尿病小鼠的抗氧化能力,从而发挥抗衰老的作用。关于鹿茸提取物抗衰老的研究大多仍限制在粗提物范围内,且尚无利用线虫模型研究鹿茸活性成分的相关报道。线虫生命周期短、通体透明易于观察而且操作简单,因此可以利用线虫模型对分离的鹿茸提取物各组分进行效果验证,筛选出抗衰老效果显著的鹿茸活性成分。

3 线虫在抗癌药物开发中的应用

许多生物体都具有应激反应途径,其中的重要组分同人类复杂疾病途径中的参与组分具有同源性,因此利用线虫模型可以对复杂人类疾病的遗传和分子机制进行研究(Rodriguez et al., 2013)。线虫体内有很多与人体内类似的信号通路,其中包括与肿瘤发生和发展紧密相关的一些信号通路,例如与细胞增殖分化相关的 Ras 信号通路、Wnt 信号通路和 Notch 信号通路(Stylianou et al., 2006; Nico et al., 2006)等,例如,在线虫中 POP-1 同性腺干细胞中的 Wnt 具有相似的基因表型,也与成神经细胞的迁移相关,并且能在胚胎发育早期调节 Wnt 的转录靶点(Ravindranath and Cadigan, 2016),因此建立起线虫的肿瘤相关模型,并应用于抗肿瘤药物开发的研究中。

此外,表皮生长因子受体(EGFR)是治疗癌症的重要靶点,EGFR 酪氨酸激酶抑制剂,如吉非替尼和厄洛替尼,已被开发为靶向抗肺癌药物。吉非替尼和厄洛替尼对 L858R 突变的非小细胞肺癌效果显著,但 T790M-L858R 双突变时则对药物出现抗性。秀丽隐杆线虫中 EGFR 的同源物 LET-23 及其下游信号传导途径已被广泛研究以期通过线虫对人类保守的调控机制进行深入探索。Bae 等(2012)构建了嵌合表达 LET-23::hEGFR-TK 蛋白的转基因秀丽隐杆线虫,可用于新型抗癌药物的突变特异性筛选。利用该模型线虫也可以对鹿茸的抗癌活性成分进行鉴定。二甲双胍也可以用于癌症的预防和治疗,但具体作用机制尚不明确,Wu 等(2016)通过对线虫的遗传筛选发现了两个二甲双胍的应答元件 NPC 和 ACAD10,

这两个应答元件进化上非常保守,因此该研究阐明了二甲双胍杀死癌细胞的一种机制以及潜在的抗癌靶点。Chiorazzi 等(2013)认为细胞死亡是正常的生理过程,当这个过程发生异常时细胞不再死亡,将会导致恶性肿瘤的发生,同时他发现在线虫中,CED-9/BCL2 是抗细胞凋亡的因子,DRE-1 同 CED-9 结合导致 CED-9 失活促进细胞凋亡,FBXO10 是人体内 DRE-1 的同源物,可以与 BCL2 结合促进其降解,引起细胞凋亡,当 FBXO10 突变失活或低水平表达时,会导致弥漫性 B 细胞淋巴瘤的发生,FBXO10 可能作为人体内抗 B 细胞淋巴瘤的靶点用于癌症的药物开发。

鹿茸提取物在抗癌作用方面也已经有所研究,例如,Hu 等(2015)研究显示,鹿茸中的一种单体肽能抑制大鼠乳腺癌细胞的增值,并抑制端粒酶活性,从而发挥抗癌作用。Tang 等(2015)对梅花鹿鹿茸分区段进行了成分提取,其中 T-DVA 能下调前列腺特异性抗原的表达并抑制前列腺癌细胞的转移,但具体发挥作用的成分尚不明确。因此可以利用线虫模型对各成分的作用效果进行前期的功能验证,鉴定分离出效果显著的成分,为鹿茸在抗癌药物开发领域提供科学依据。

4 线虫在抗 型糖尿病药物开发中的应用

目前, 型糖尿病的研究模型有动物模型、细胞水平的模型和分子水平的模型。在这 3 种 型糖尿病研究模型中,自发性糖尿病动物模型能准确反映糖尿病的病理特点,但实验周期长,不能做大规模或高通量的实验。对于细胞和分子水平的模型,虽然高效快速,但不能完整模拟生命体的生命活动。而线虫全基因组中 60%~80%的基因具有人类同源性(Harris et al., 2004),并且其突变株可以快速地应用到 型糖尿病的研究中。胰岛素超家族基因广泛存在于脊椎动物和非脊椎动物中,在线虫中 *daf-2* 基因能够编码同哺乳动物同源的胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factors, IGFs)受体家族(Kimura et al., 1997),因此利用 *daf-2* 基因突变株就可以构建 型糖尿病模型,DevGen 公司已于 2001 年申请了此模型的专利。杨宇凯(2011)利用上述的 型糖尿病模型,筛选研究了中药复方在 型糖尿病治疗中的作用,取得了比较好的结果,为中药复方在治疗人 型糖尿病方面的应用提供基础,也为利用线虫模型筛选更多的抗 型糖尿病药物提供基础,比如为开发鹿茸在此方面的应用潜力提供依据。

5 线虫在肥胖研究中的应用

脂肪酸转运蛋白在细胞质膜内转运长链脂肪酸,人具有6种脂肪酸转运蛋白,其中五种在小鼠体内具有同源物,在线虫中有两种脂肪酸转运蛋白(CeFATPa和CeFATPb)同高等动物具有同源性(Hirsch et al., 1998)。已有研究表明,CeFATPb在人类COS细胞中的过表达将增加脂肪沉积,从而鉴定了其同源性(Zheng and Greenway, 2012)。Suh等(2007)发现,脂肪基因(*Adp*)在进化上非常保守,在线虫(*Y73E7A*)、果蝇(*adp*)和小鼠(*Wdtd1*)上都具有抗肥胖的作用,他利用RNAi的方法使线虫的*Y73E7A*基因沉默导致线虫脂肪增多,验证了*Adp*抗肥胖的能力,我们可以利用线虫模型,将*Adp*基因作为抗肥胖药物的筛选靶点从而实现更多的抗肥胖药物及保健品的开发,探索鹿茸中抗肥胖作用的活性成分。

6 线虫在抗阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)药物开发中的应用

目前治疗AD的药物为乙酰胆碱酯酶抑制剂和NMDA受体拮抗剂两类,但它们仅能缓解症状,不能实现彻底根治AD的目的。现在大部分治疗AD的实验都利用哺乳动物模型,但是受时间和所需动物数量的限制,哺乳动物模型不适合用于药物开发的初期研究。而哺乳动物神经元细胞又缺乏生物体中的复杂性,不能有效地预测和评价药物的安全性和有效性,因此越来越多的人开始尝试利用秀丽隐杆线虫进行药物开发的初期筛选及研究。 $A\beta$ 沉积形成的老年斑和Tau蛋白异常磷酸化形成的神经纤维缠结是AD的主要病理特征,现在有多种Tau和 $A\beta$ 类毒性的线虫研究模型,可以较简便的观察地AD的这两个主要成分与AD病理之间的关联(Lublin and Link, 2013)。在1995年,Link通过转基因的方法构建了线虫的 $A\beta$ 模型,可用来研究AD的毒理作用, $A\beta$ 对基因表达的影响(Sashidhara et al., 2014; Hassan et al., 2015)和探究药物抗AD的疗效及机制。由于AD的发病机理复杂,具体机制尚不明确,另外一些药物具有副作用,所以近年来抗AD的药物开发研究热点已经逐渐转移到天然产物上来。银杏提取物EGb761开启了植物提取物抗AD研究的热潮,EGb761对神经系统的保护作用可能与抗氧化、清除脂质自由基等作用相关(Boveris et al., 2007)。蔓越莓提取物在线虫中能够通过HSF-1提高蛋白质内稳态从而达到抵抗 $A\beta$ 毒性的作用(Guo et al., 2015)。红藻的乙

醇提取物(CCE)处理转基因线虫CL4176后,明显延缓 $A\beta$ 1-42引起的线虫瘫痪表型,CCE主要是通过减少 $A\beta$ 的种类,提高应激相关基因的表达以及减少ROS的含量来发挥抗 $A\beta$ 毒性作用的(Sangha et al., 2015)。

鹿组织的提取物在抗阿尔兹海默病等神经变性疾病方面也可能发挥一定作用。Kim等(2014)发现鹿骨提取物(DBE)能减少谷氨酸盐引起的HT-22细胞的死亡,抑制过氧化氢及淀粉样蛋白 $A\beta$ 1-42引起的细胞毒性,这表示DBE在神经变性疾病及抵抗氧化应激方面能发挥一定作用。该研究也为鹿茸在神经变性疾病上的研究提供了基础和新的思路,接下来我们将利用线虫的阿尔兹海默病模型对鹿茸提取物及其具体的成分进行相关探索和药物开发。此外,Cui等(2017)研究发现移植了人脐带间充质干细胞的AD模型小鼠的认知能力增强,这种增强是通过减少氧化应激及促进海马区神经发生实现的。鹿茸干细胞作为鹿茸发生和再生的基础,同样具备干细胞的特征,所以接下来我们也将针对鹿茸干细胞在AD方面的作用展开研究。

7 展望

研究人员对鹿茸及鹿茸提取物已经进行了大量的探索,大多仍限制在粗提物的范围,因此关于鹿茸活性成分的鉴定有待于深入、系统地研究,但是由于缺乏快捷、简便和有效的模型,鹿茸的活性成分鉴别以及药物开发还有很长的一段路要走,比如在神经系统退行性疾病、萎缩性胃炎、肝癌、肺癌等方面。而线虫作为优秀的模式生物,操作简单易于观察,60%~70%的基因同人类高度同源,可以广泛应用于鹿茸的活性成分鉴别及疾病药物开发的初级阶段。

线虫作为最好的生物研究模型之一,在过去30年里已被广泛应用于生长发育、代谢、行为和衰老的研究当中,在药学研究及新药开发领域发挥了至关重要的作用。不可否认,作为生物模型,线虫仍存在一定的不足,比如没有获得性免疫、呼吸系统、心脏等,但线虫模型可以为体外研究和体内研究架起一座桥梁,为新药开发增加一个新的有效途径,也为鹿茸的活性成分鉴别以及鹿茸的药物开发的初级阶段提供了全新的手段和方式。

作者贡献

杜方舟和李春义负责文章的构思、综述的设计和论文初稿的写作,李春义负责文章的审校与修改。

两位作者均阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610342016003)和吉林省科技厅项目(20170-101003JC)共同资助。

参考文献

- Bae Y.K., Sung J.Y., Kim Y.N., Kim S., Hong K.M., Kim H.T., Choi M.S., Kwon J.Y., and Shim J., 2012, An *in vivo* *C. elegans* model system for screening EGFR-inhibiting anti-cancer drugs, PLoS One, 7(9): e42441
- Boveris A.D., Galleano M., and Puntarulo S., 2007, *In vivo* supplementation with *Ginkgo biloba* protects membranes against lipid peroxidation, Phytotherapy Research, 21(8): 735-740
- Brenner S., 1974, The genetics of *Caenorhabditis elegans*, Genetics, 77(1): 71-94
- Chiorazzi M., Rui L.X., Yang Y.D., Ceribelli M., Tishbi N., Maurer C.W., Ranuncolo S.M., Zhao H., Xu W., Chan W.C., Jaffe E.S., Gascoyne R.D., Campo E., Rosenwald A., Ott G., Delabie J., Rimsza L.M., Shaham S., and Staudt L.M., 2013, Related F-box proteins control cell death in *Caenorhabditis elegans* and human lymphoma, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110(10): 3943
- Cui Y, Ma S, Zhang C, Cao W, Liu M, Li D, Lv P, Xing Q, Qu R, Yao N. 2017. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis, Behavioural Brain Research 320: 291-301
- Ewbank J.J., and Zugasti O., 2011, *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery, Disease Models & Mechanisms, 4(3): 300
- Guo H., Cao M., Zou S., Ye B., and Dong Y.Q., 2015, Cranberry extract standardized for proanthocyanidins alleviates β -amyloid peptide toxicity by improving proteostasis through HSF-1 in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease, J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci., 71(12): 1564-1573
- Harris T.W., Chen N., Cunningham F., Tello-Ruiz M., Antoshechkin I., Bastiani C., Bieri T., Blasiar D., Bradnam K., Chan J., Chen C.K., Chen W.J., Davis P., Kenny E., Kishore R., Lawson D., Lee R., Muller H.M., Nakamura C., Ozersky P., Petcherski A., Rogers A., Sabo A., Schwarz E.M., Van Auken K., Wang Q., Durbin R., Spieth J., Sternberg P.W., and Stein L.D., 2004, WormBase: a multi-species resource for nematode biology and genomics, Nucleic Acids Res., 32 (D): 411-417
- Hassan W.M., Dostal V., Huemann B.N., Yerg J.E., and Link C. D., 2015, Identifying $A\beta$ -specific pathogenic mechanisms using a nematode model of alzheimer's disease, Neurobiol. Aging, 36(2): 857-866
- Hirsch D., Stahl A., and Lodish H.F., 1998, A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(15): 8625-8629
- Hu W., Qi L., Tian Y.H., Hu R., Wu L., and Meng X.Y., 2015, Studies on the purification of polypeptide from sika antler plate and activities of antitumor, BMC Complement. Altern. Med., 15(1): 1-8
- Johnson T.E., 2013, 25 years after *age-1*: Genes, interventions and the revolution in aging research, Exp. Gerontol., 48(7): 640
- Kim C.R., Jeon H.L., Shin S.K., Kim H.J., Ahn C.W., Jung S.U., Park S.H., and Kim M.R., 2014, Neuroprotective action of deer bone extract against glutamate or $A\beta_{1-42}$ -induced oxidative stress in mouse hippocampal cells, J. Med. Food, 17(2): 226-235
- Kimura K.D., Tissenbaum H.A., Liu Y., and Ruvkun G., 1997, An insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*, Science, 277(5328): 942-946
- Kwok T.C.Y., Ricker N., Fraser R., Chan A.W., Burns A., Stanley E.F., Mccourt P., Cutler S.R., and Roy P.J., 2006, A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist, Nature, 441(7089): 91-95
- Kylie H., Geert S., and Kammenga J.E., 2015, *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO transcription factor and its mammalian homologs associate with age-related disease, Experimental Gerontology, 72: 1-7
- Lehner B., Tischler J., and Fraser A.G., 2006, RNAi screens in *Caenorhabditis elegans* in a 96-well liquid format and their application to the systematic identification of genetic interactions, Nature Protocols, 1(3): 1617-1620
- Leung C.K., Wang Y., Malany S., Deonaraine A., Nguyen K., Vasile S., and Choe K.P., 2013, An ultra high-throughput, whole-animal screen for small molecule modulators of a specific genetic pathway in *Caenorhabditis elegans*, PLoS One, 8(4): e62166
- Leung C.K., Deonaraine A., Strange K., and Choe K.P., 2011, High-throughput screening and biosensing with fluorescent *C. elegans* strains, J. Vis. Exp., (51): e2745
- Lima M.E., Colpo A.C., Salgueiro W.G., Sardinha G.E., Avila D. S., and Folmer V., 2014, *Ilex paraguariensis* extract increases lifespan and protects against the toxic effects caused by paraquat in *Caenorhabditis elegans*, Int. J. Environ. Res. Public Health, 11(10): 10091
- Liu H.B., Liang F.Y., Su W.W., Wang N., Lv M.L., Li P.B., Pei Z., Zhang Y., Xie X.Q., Wang L.R., and Wang Y.G., 2013, Lifespan extension by n-butanol extract from seed of *Platycodon*

- ladus orientalis* in *Caenorhabditis elegans*, J. Ethnopharmacol., 147(2): 366
- Liu Y., Wang Z.Y., and Zhou L.P., 2010, Anti-hyperglycemic and anti-aging effects of deer antler velvet extract on diabetic mice induced by alloxan, Dongbei Linye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Forestry University), 38(5): 97-98 (刘瑜, 王振宇, 周丽萍, 2010, 鹿茸提取物对糖尿病小鼠血糖及衰老的影响, 东北林业大学学报, 38(5): 97-98)
- Lublin A., and Link C., 2013, Alzheimer's Disease Drug Discovery: *In-vivo* screening using *C. elegans* as a model for β -amyloid peptide-induced toxicity, Drug Discov. Today Technol., 10(1): e115-e119
- Moy T.I., Ball A.R., Anklesaria Z., Casadei G., Lewis K., and Ausubel F.M., 2006, Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(27): 10414-10419
- Murshid A., Eguchi T., and Calderwood S.K., 2013, Stress proteins in aging and life span, Int. J. Hyperthermia, 29(5): 442-447
- Nico J., Michel J., and Tim P., 2006, The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery, Investigational New Drugs, 24(4): 263-280
- Ravindranath A.J., and Cadigan K.M., 2016, The role of the C-Clamp in Wnt-related colorectal cancers, Cancers, 8(8): 74
- Rodriguez M., Snoek L.B., De B.M., and Kammenga J.E., 2013, Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging, Trends in Genetics, 29(6): 367-374
- Sangha J.S., Wally O., Banskota A.H., Stefanova R., Hafting J.T., Critchley A.T. and Prithiviraj B., 2015, A cultivated form of a red seaweed (*Chondrus crispus*), suppresses β -amyloid-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans*, Mar. Drugs, 13(10): 6407-6424
- Sashidhara K.V., Modukuri R.K., Jadiya P., Dodda R.P., Kumar M., Sridhar B., Kumar V., Haque R., Siddiqi M.I., and Nazir A., 2014, Benzofuran-chalcone hybrids as potential multifunctional agents against Alzheimer's disease: synthesis and *in vivo* studies with transgenic *Caenorhabditis elegans*, Chem. Med. Chem., 46(18): 2671-2684
- Stylianou S., Collu G.M., Clarke R.B., and Brennan K., 2006, Aberrant activation of Notch signalling in human breast cancer, Cancer Res., 8(S2): 1517-1525
- Suh J.M., Zeve D., McKay R., Seo J., Salo Z., Li R., Wang M., and Graff J.M., 2007, Adipose is a conserved dosage-sensitive antiobesity gene, Cell Metab., 6(3): 195-207
- Tang Y.J., Jeon B.T., Wang Y.M., Choi E.J., Kim Y.S., Hwang J. W., Park Pyo Jam, Sang H.M., and Kim E.K., 2015, First evidence that sika deer (*Cervus nippon*) velvet antler extract suppresses migration of human prostate cancer cells, Korean J. Food Sci. Anim. Resour., 35(4): 507-514
- Torgovnick A., Schiavi A., Maglioni S., and Ventura N., 2013, Healthy aging: what can we learn from *Caenorhabditis elegans*? Z. Gerontol. Geriatr., 46(7): 623-628
- Wu L., Zhou B., Oshirorapley N., Li M., Paulo J.A., Webster C. M., Mou F., Kacergis M.C., Talkowski M.E., Carr C.E., Gygi S.P., Zheng B., and Soukas A.A., 2016, An ancient, unified mechanism for metformin growth inhibition in *C. elegans* and cancer, Cell, 167(7): 1705-1718
- Yang Y.K., 2011, Using *Caenorhabditis elegans* to construct type 2 diabetes mellitus model and its application in traditional Chinese medicine, Thesis for M.S., Lanzhou University, Supervisor: Li H.Y., pp.43 (杨宇凯, 2011, 秀丽隐杆线虫 型糖尿病模型的建立及在中药复方筛选中的应用, 硕士学位论文, 兰州大学, 导师: 李红玉, pp.43)
- You M., and Hu Y.H., 2016, Advances in researches on the anti-aging of *Caenorhabditis elegans*, Zhongguo Meirong Yixue Zazhi (Chinese Journal of Aesthetic Medicine), 25(2): 104-107 (游牧, 胡云虎, 2016, 秀丽隐杆线虫在抗衰老领域应用的研究进展, 中国美容医学杂志, 25(2): 104-107)
- Zheng J., and Greenway F.L., 2012, *Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research, Int. J. Obes., 36(2): 186