

VHL抑制剂对鱼藤酮所致帕金森病秀丽隐杆线虫模型的影响

查倩, 高向东, 陈松*

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 211198)

摘要 为了研究VHL(von Hippel-Lindau)抑制剂对帕金森病(Parkinson's disease, PD)秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*, 简称线虫)模型的影响, 采用鱼藤酮诱导PD线虫模型, 并使用VHL抑制剂VH298进行干预。以不同浓度的鱼藤酮对转基因线虫 *zcls9*; *otIs181* 进行诱导损伤, 考察线虫死亡、多巴胺能神经元退化和线粒体未折叠蛋白反应(mitochondrial unfolded protein response, mito-UPR)情况; 采用不同浓度的VH298干预PD线虫模型, 考察线虫死亡和多巴胺能神经元退化情况, 同时对线虫运动行为如头部摆动频率、身体弯曲频率以及觅食行为进行分析。结果显示: 不同浓度的鱼藤酮对转基因线虫 *zcls9*; *otIs181* 具有不同程度的致死毒性和神经毒性, 并且引起线虫 mito-UPR 异常; VH298能够减少鱼藤酮所致PD线虫模型的异常死亡和多巴胺能神经元退化情况, 同时能够缓解线虫模型头部摆动频率、身体弯曲频率和觅食行为异常情况。实验结果提示, 鱼藤酮可通过诱导转基因线虫 *zcls9*; *otIs181* 线粒体损伤, 破坏线粒体稳态, 进而导致多巴胺能神经元退化及线虫死亡; VHL抑制剂VH298能改善鱼藤酮所致PD线虫模型死亡现象, 并且VHL抑制剂VH298通过减少多巴胺能神经元退化, 进而缓解PD线虫模型运动行为异常情况。

关键词 VHL抑制剂; VH298; 帕金森病; 秀丽隐杆线虫; 鱼藤酮; 多巴胺能神经元

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2021)03-0346-06

doi: 10. 11665/j. issn. 1000-5048. 20210312

引用本文 查倩, 高向东, 陈松. VHL抑制剂对鱼藤酮所致帕金森病秀丽隐杆线虫模型的影响[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(3): 346 - 351.

Cite this article as: ZHA Qian, GAO Xiangdong, CHEN Song. Effects of VHL inhibitor on rotenone-induced *Caenorhabditis elegans* model of Parkinson's disease[J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(3): 346 - 351.

Effects of VHL inhibitor on rotenone-induced *Caenorhabditis elegans* model of Parkinson's disease

ZHA Qian, GAO Xiangdong, CHEN Song*

Jiangsu Key Laboratory of Drugability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract To investigate the effects of VHL (von Hippel-Lindau) inhibitor on *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) model of Parkinson's disease (PD), *C. elegans* were exposed to rotenone and treated with VHL inhibitor VH298. The death, dopaminergic neurodegeneration and mitochondrial unfolded protein response (mito-UPR) of transgenic strains with the markers *zcls9* and *otIs181* exposed to different concentrations of rotenone were investigated. The death, dopaminergic neurodegeneration, and changes of behaviors including head thrashes, body bends and foraging behavior of *C. elegans* model of PD treated with different concentrations of VH298 were explored. The results showed that different concentrations of rotenone can lead to the death, dopaminergic neurodegeneration and abnormal mito-UPR of transgenic nematodes with *zcls9*; *otIs181*, while the VHL inhibitor can decrease the death rate and alleviate dopaminergic neurodegeneration of rotenone-induced *C. elegans* model of PD. The VHL inhibitor can also attenuate the behavioral abnormalities of head thrashes, body bends and foraging behavior of *C. elegans* model. These results suggest that rotenone may cause mitochondrial damage in the transgenic nematodes with *zcls9*; *otIs181*, and then destroy mitochondrial homeostasis, thereby resulting in dopaminergic neurode-

收稿日期 2021-01-16 * 通信作者 Tel: 025-86185396 E-mail: ChenS@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81673435, No. 81872850, No. 82073755)

generation and death of the nematodes. The VHL inhibitor VH298 may promote the survival of rotenone-induced *C. elegans* model of PD, and alleviate dopaminergic neurodegeneration, thereby improving the behavioral abnormalities of *C. elegans* model of PD.

Key words VHL inhibitor; VH298; Parkinson's disease; *Caenorhabditis elegans*; rotenone; dopaminergic neuron

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81673435, No. 81872850, No. 82073755)

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种与年龄相关的神经退行性疾病,目前全球有600多万患者,随着世界人口老龄化加剧,PD患者数量将逐年增加^[1]。PD与线粒体质量控制途径的异常调节密切相关,线粒体未折叠蛋白反应(mitochondrial unfolded protein response, mito-UPR)作为线粒体质量控制机制之一,激活的mito-UPR途径能够促进细胞存活和受损的细胞器恢复,但mito-UPR的长时间过度激活会导致缺陷的线粒体异常积累,从而破坏线粒体稳态平衡^[2-3]。秀丽隐杆线虫作为神经生物学研究的理想模式生物,其神经网络简单,仅有302个神经元,共4对多巴胺能神经元,其中头部有2对CEPs(cephalic neurons)和1对ADEs(anterior deirid neurons),尾部有1对PDEs(posterior deirid neurons)。由于线虫身体透明,荧光蛋白可以在活体线虫中可视化,可直接观察神经元中目的蛋白的表达情况^[4]。同时,线虫基因组是第一个被完全测序的多细胞生物的基因组,据统计,60%~80%的人类致病基因在线虫基因组中具有直系同源物^[5-7]。目前,已建立的线虫帕金森病模型包括表达 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)或富含亮氨酸的重复激酶2(leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2)的转基因线虫,以及*PRKN/pdr-1*、*PINK1/pink-1*、*DJ-1/djr-1.1/djr-1.2*和*ATP13A2/catp-6*缺失的线虫模型等^[8-9]。此外,有研究表明,神经毒素如鱼藤酮、1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)和6-羟基多巴胺(6-OHDA)可诱导线虫线粒体DNA损伤,导致线虫多巴胺能神经元退化^[10-11]。线虫PD模型均能表现出多种表型缺陷,包括多巴胺能神经元的丢失,多巴胺依赖性行为异常等^[12]。

本课题组于前期研究中建立了转基因线虫*zcls9; otls181*,发现线粒体复合体I亚基NDUF7突变导致ADE多巴胺能神经元特异性退化,出现PD样症状,同时基于该线虫模型,进一步研究发现线虫VHL-1功能缺失能显著缓解ADE多巴胺能神经元退化情况^[13]。在此研究基础上,本研究采用鱼藤

酮建立PD线虫模型,分析VHL抑制剂对PD线虫模型神经元退化及行为学异常的影响。

1 材 料

1.1 试剂与溶液

鱼藤酮(纯度:98.12%)、VHL抑制剂VH298(纯度:99.83%,美国MCE公司);胆固醇(上海麦克林生化科技有限公司);琼脂粉、酵母粉、蛋白胨(美国Oxoid公司);柠檬酸钾(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);次氯酸钠溶液(国药集团化学试剂有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

NGM培养基、M9溶液、S培养基、LB液体培养基、线虫裂解液等溶液按照文献^[14]进行配制。

1.2 仪 器

高速冷冻离心机、低温培养箱(美国Thermo公司);体视显微镜、荧光体视显微镜(日本Nikon公司);倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);高压灭菌锅(日本Panasonic公司)。

1.3 动 物

线虫品系:转基因线虫*zcls9; otls181*(本课题组前期构建^[13])。

1.4 菌 株

尿嘧啶缺陷型OP50大肠埃希菌(福建上源生物科学技术有限公司)。

2 方 法

2.1 线虫培养

将线虫接种于涂布有尿嘧啶缺陷型OP50大肠埃希菌的线虫固体生长培养基(NGM培养基)平板上,于20℃低温培养箱中培养^[15]。

2.2 线虫同步化处理

使用M9溶液1 mL将处于产卵期的线虫从直径为6 cm的NGM平板上冲洗下来,加至1.5 mL EP管中,2 000 r/min离心30 s,吸除上清液700 μ L,再加入线虫裂解液700 μ L,混匀5 min左右,4 000 r/min离心30 s,吸上清液至管内剩余液体约

100 μL , 再加入 M9 溶液 900 μL , 轻吹混匀, 重复清洗 3 次后, 4 000 r/min 离心 30 s, 吸除上清液 900 μL , 轻吹混匀剩下的虫卵溶液, 吸至未接种 OP50 大肠埃希菌的 NGM 平板上, 放置 20 $^{\circ}\text{C}$ 低温培养箱培养, 次日即可得到 L1 期线虫幼虫。

2.3 鱼藤酮暴露试验及线虫死亡和多巴胺能神经元退化情况分析

将同步化处理得到的 L1 期线虫接种至涂布有 OP50 大肠埃希菌的 NGM 培养基上, 放置低温培养箱生长 1 d 后进行实验。鱼藤酮诱导 PD 线虫模型试验采用 96 孔板进行, 每孔溶液终体积为 100 μL , 设置鱼藤酮最终浓度为 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0 $\mu\text{mol/L}$ 共 6 组, 每组 4 个孔, 用 S 培养基重悬 OP50 大肠埃希菌, 保证每孔加入 10 mg/ μL OP50 大肠埃希菌 5 μL , 之后加入含有 20 ~ 30 只幼虫的 S 培养基 10 μL , 次日观察并记录各组线虫死亡情况, 并且观察各组生长至 L4 期线虫的多巴胺能神经元退化情况。对于判断线虫是否死亡, 在体视显微镜下观察, 当线虫身体呈现僵直状态且无运动行为时, 用铂丝针刺刺激其身体, 无反应的线虫则视为死亡。对于观察线虫多巴胺能神经元退化情况或 mito-UPR 情况, 滴 25 mmol/L 左旋咪唑溶液 5 μL 于含有 3% 琼脂糖垫的载玻片上, 将处理后的线虫放置溶液中进行麻醉, 之后将盖玻片轻轻压住线虫, 于荧光体视显微镜或荧光倒置显微镜下观察头部 ADE 多巴胺能神经元退化情况或 mito-UPR 激活情况。对于判断线虫 ADE 多巴胺能神经元是否退化, 在正常情况下, 线虫头部 ADE 多巴胺能神经元 mCherry 红色荧光斑点清晰可见, 而当暴露于一定浓度的鱼藤酮后, 线虫 ADE 多巴胺能神经元 mCherry 红色荧光斑点缺失则视为 ADE 多巴胺能神经元退化。在正常情况下, 线虫虫体 GFP 绿色荧光微弱, 而当 mito-UPR 激活后, 线虫虫体 GFP 绿色荧光明显增强。

2.4 抑制剂 VH298 干预 PD 线虫模型试验

抑制剂干预试验采用 96 孔板进行, 每孔溶液终体积 100 μL , 每孔 20 ~ 30 只 L1 期幼虫, 设置抑制剂 VH298 终浓度为 400, 200, 100 $\mu\text{mol/L}$ 进行提前干预, 每组 4 个孔, 1 d 后使用 M9 溶液清洗线虫 3 次, 再将线虫加入新鲜配制的含有鱼藤酮和不同浓度 VH298 的 96 孔板中进行共孵育, 1 d 后使用 M9 溶液清洗线虫 3 次, 将线虫转移至 NGM 培养基

上进行各项指标分析。观察线虫死亡和多巴胺能神经元退化情况的方法, 参见“2.3”项。

2.5 线虫运动行为指标的测定^[16-17]

2.5.1 头部摆动频率分析 抑制剂 VH298 干预 PD 线虫模型参见“2.4”项。在未接种 OP50 大肠埃希菌的 NGM 培养基上滴加 M9 溶液 80 μL , 用铂丝针挑取处理后的线虫置于 M9 溶液中, 待其恢复 1 min 后, 在体视显微镜下观察并记录线虫在 1 min 内头部摆动的次数(线虫头部从一侧摆向另一侧又摆回来的次数)。

2.5.2 身体弯曲频率分析 抑制剂 VH298 干预 PD 线虫模型见“2.4”项。用铂丝针挑取处理后的线虫于未接种 OP50 大肠埃希菌的 NGM 培养基上, 待其恢复 1 min 后, 在体视显微镜下观察并记录其在 30 s 内身体弯曲的次数(线虫在爬行过程中沿着身体长轴方向上 1 个波长变化作为 1 次身体弯曲)。

2.6 线虫觅食行为的分析^[16]

抑制剂 VH298 干预 PD 线虫模型见“2.4”项。在直径为 9 cm 的未接种 OP50 大肠埃希菌的 NGM 培养基中央滴加大肠埃希菌 OP50 菌液 5 μL , 形成直径为 1 cm 的圆形菌苔, 将线虫放入距离培养皿中心位置 4 cm 处, 每个培养皿放置 20 条。分别记录 4, 12, 24 h 后接触菌落的线虫数, 计算接触菌落线虫占线虫总数的比例。

2.7 统计分析

实验数据采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行分析, 各项指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Two-Way ANOVA 检验对线虫觅食行为数据进行分析, 采用 One-Way ANOVA 检验对其他数据进行分析, $P < 0.05$ 时表明差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度鱼藤酮导致转基因线虫 *zcls9*; *otIs181* 死亡率变化

本研究选用带有 *zcls9* 和 *otIs181* 两个遗传标记的转基因线虫, 其中 *zcls9*[*hsp-60p* :: *GFP*] 用于监测线虫 mito-UPR, *otIs181*[*dat-1p* :: *mCherry* + *ttx-3p* :: *mCherry*] 用于标记 4 对多巴胺能神经元和 1 对非多巴胺能神经元 AIY。转基因线虫 *zcls9*; *otIs181* 同步化处理后生长 2 d, 采用不同浓度的鱼藤酮损伤线虫, 次日在体视显微镜下观察并记录各组线虫死亡情况。结果如图 1 所示, 低剂量鱼藤酮处理线虫 1 d

即可导致线虫死亡,当鱼藤酮浓度上升至4.0和8.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,线虫死亡率分别为49.24%和88.14%。以上结果说明,鱼藤酮能导致转基因线虫 *zcls9; otIs181* 死亡,并且呈现一定的浓度依赖性。

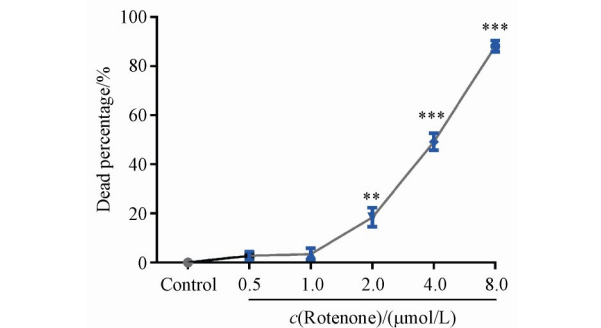


Figure 1 Evaluation of death in *C. elegans* strain with *zcls9; otIs181* with exposure to different concentrations of rotenone ($\bar{x} \pm s, n = 20 - 30$)
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

3.2 不同浓度鱼藤酮导致转基因线虫 *zcls9; otIs181* 多巴胺能神经元退化情况

转基因线虫 *zcls9; otIs181* 同步化处理后生长2 d,采用不同浓度的鱼藤酮损伤线虫,1 d后在荧光体视显微镜下观察并记录各组L4期线虫多巴胺能神经元退化和 mito-UPR 激活情况。结果如图2所示,与对照组相比,0.5、1.0和2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的鱼藤酮损伤组线虫 ADE 退化率分别为27.87%、29.17%和39.71%,鱼藤酮浓度上升至4.0和8.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,线虫 ADE 退化率分别为84.17%和93.16%。以上结果说明,鱼藤酮能导致转基因线虫 *zcls9; otIs181* 的多巴胺能神经元退化,且与对照组相比,鱼藤酮损伤组线虫 mito-UPR 均被激活,说明鱼藤酮可能通过诱导转基因线虫 *zcls9; otIs181* 线粒体损伤,破坏线粒体稳态,进而导致多巴胺能神经元退化及线虫死亡。

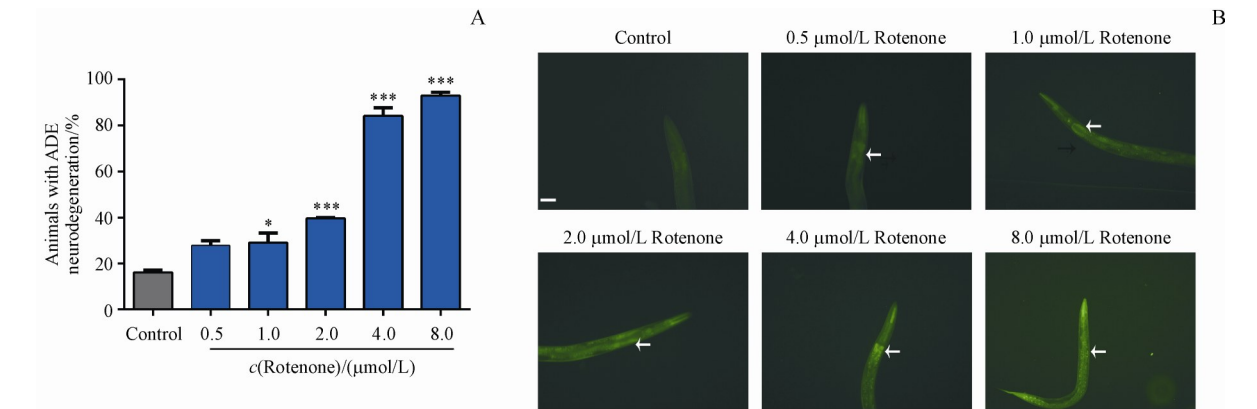


Figure 2 Evaluation of neurons and mito-UPR in *C. elegans* strain with *zcls9; otIs181* with exposure to different concentrations of rotenone ($\bar{x} \pm s, n = 20 - 30$)
A: Quantitative analysis of ADE neurodegeneration; B: Representative fluorescence images showing mito-UPR (arrows)(Scale bar: 100 μm)
* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group

3.3 VHL抑制剂对PD线虫模型存活情况的影响

采用不同浓度的VHL抑制剂VH298(400,200和100 $\mu\text{mol/L}$)进行提前干预,次日采用终浓度为2.0 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮与不同浓度的VH298共同孵育线虫,1 d后在体视显微镜下观察并记录各组线虫死亡情况。结果如图3所示,与模型组相比,100,200和400 $\mu\text{mol/L}$ 的VH298均能在一定程度上降低2.0 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮诱导的线虫死亡率,说明VHL抑制剂能够缓解鱼藤酮导致线虫模型的死亡。

3.4 VHL抑制剂对PD线虫模型多巴胺能神经元退化情况的影响

首先采用不同浓度的VHL抑制剂VH298

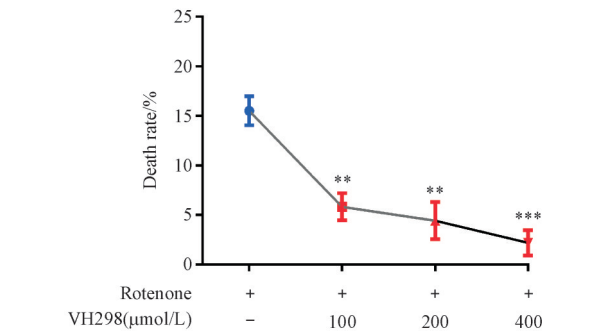


Figure 3 Effects of VHL inhibitor VH298 on death in *C. elegans* strain with *zcls9; otIs181* with exposure to 2.0 $\mu\text{mol/L}$ rotenone ($\bar{x} \pm s, n = 20 - 30$)
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs rotenone group

(400, 200 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 进行提前干预, 次日采用终浓度为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮与不同浓度的 VH298 共同孵育线虫, 1 d 后在体视显微镜下观察并记录各组 L4 期线虫多巴胺能神经元退化情况。结果如

图 4 所示, 与模型组相比, 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 VH298 有效缓解鱼藤酮诱导的 ADE 神经元退化情况, 说明 VHL 抑制剂对鱼藤酮所致线虫模型具有一定的多巴胺能神经元保护作用。

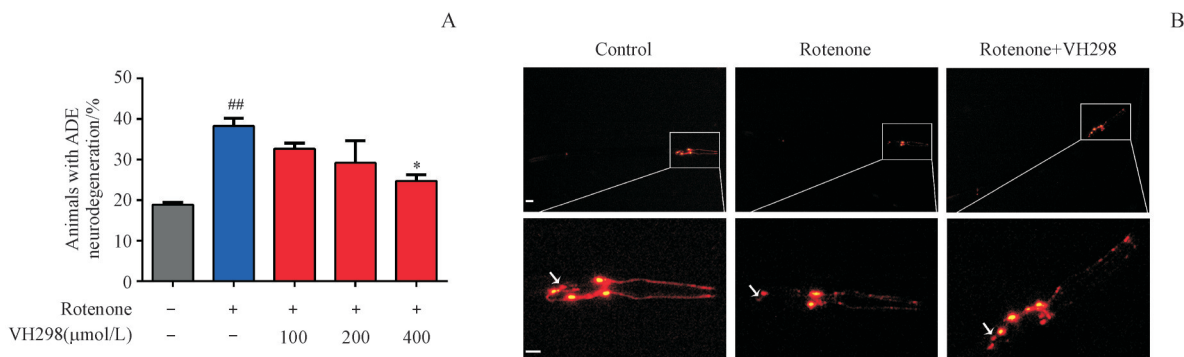


Figure 4 Effects of VHL inhibitor on neurons in *C. elegans* strain with *zcIs9; otIs181* with exposure to 2.0 $\mu\text{mol/L}$ rotenone ($\bar{x} \pm s, n = 20 - 30$)

A: Quantitative analysis of ADE neurodegeneration; B: Representative whole-body fluorescence images (Upper column; scale bar: 200 μm) and enlarged images (Lower column; scale bar: 50 μm) showing ADE neurons (arrows) in *zcIs9; otIs181* animals

^{*} $P < 0.05$ vs rotenone group; ^{##} $P < 0.01$ vs control group

3.5 VHL抑制剂对PD线虫模型运动能力的影响

采用 VHL 抑制剂 VH298 (400, 200 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 和鱼藤酮 (2.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理线虫, 体视显微镜下观察 L4 期线虫头部摆动、身体弯曲情况。

结果如图 5 所示, VH298 能在一定程度上缓解鱼藤酮导致的线虫头部摆动频率和身体弯曲频率异常情况, 说明 VHL 抑制剂能够减少鱼藤酮所致 PD 线虫模型的行为学异常。

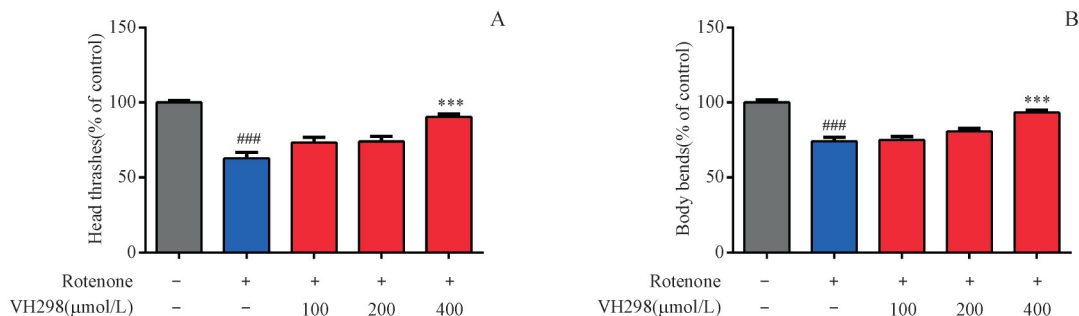


Figure 5 Effects of VHL inhibitor VH298 on head thrashes and body bends in *C. elegans* strain with *zcIs9; otIs181* with exposure to 2.0 $\mu\text{mol/L}$ rotenone ($\bar{x} \pm s, n = 20 - 30$)

A: Quantitative analysis of head thrashes; B: Quantitative analysis of body bends

^{***} $P < 0.001$ vs rotenone group; ^{###} $P < 0.001$ vs control group

3.6 VHL抑制剂对PD线虫模型觅食行为的影响

采用 VHL 抑制剂 VH298 (400, 200 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 和鱼藤酮 (2.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理线虫, 体视显微镜下观察线虫觅食情况。结果如图 6 所示, 与模型组相比, VH298 处理后线虫的菌落接触率在 4, 12 和 24 h 均有一定程度的增加, 其中 400 $\mu\text{mol/L}$ VH298 处理后线虫的菌落接触率在 12 和 24 h 时显著增加。以上结果说明, VHL 抑制剂能改善鱼藤酮所致 PD 线虫模型的觅食行为异常情况。

4 讨论

本研究采用神经毒性剂鱼藤酮处理转基因线虫 *zcIs9; otIs181*, 该转基因线虫出现异常死亡、神经元异常退化以及异常激活 mito-UPR 的情况, 模拟了类 PD 样症状如多巴胺能神经元丢失和运动障碍; 通过 VHL 抑制剂 VH298 干预 PD 线虫模型, 发现 VH298 能促进 PD 线虫模型存活, 缓解 ADE 多巴胺能神经元退化情况, 并且改善 PD 线虫模型运动

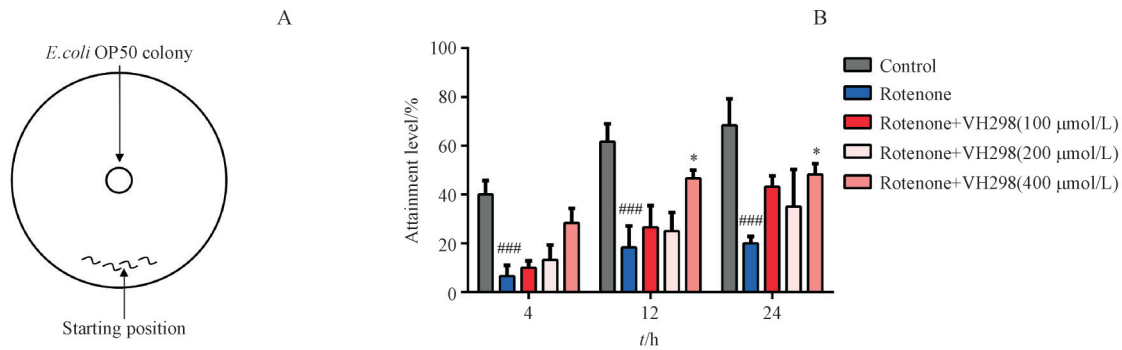


Figure 6 Effects of VHL inhibitor on foraging behavior in *C. elegans* strain with *zcls9; otIs181* with exposure to 2.0 $\mu\text{mol/L}$ rotenone ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

A: Diagram of foraging behavior; B: Quantitative analysis of attainment level

* $P < 0.05$ vs rotenone group; ### $P < 0.001$ vs control group

障碍如头部摆动频率和身体弯曲频率以及多巴胺依赖性行为如觅食行为异常等情况。综上,鱼藤酮可能通过引起转基因线虫 *zcls9; otIs181* 线粒体损伤,导致线粒体稳态失衡,进而诱发线虫异常死亡及神经元退化;VHL抑制剂VH298能减少鱼藤酮导致的转基因线虫 *zcls9; otIs181* 异常死亡;可通过保护多巴胺能神经元进而改善由多巴胺能神经元丢失所导致的运动行为异常和觅食行为异常。本研究为VHL抑制剂治疗帕金森病奠定了一定的理论基础。

References

- [1] Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and treatment of parkinson disease: a review[J]. *JAMA*, 2020, **323**(6):548-560.
- [2] Martinez BA, Petersen DA, Gaeta AL, et al. Dysregulation of the mitochondrial unfolded protein response induces non-apoptotic dopaminergic neurodegeneration in *C. elegans* models of Parkinson's disease[J]. *J Neurosci*, 2017, **37** (46): 11085-11100.
- [3] Runkel ED, Liu S, Baumeister R, et al. Surveillance-activated defenses block the ROS-induced mitochondrial unfolded protein response[J]. *PLoS Genet*, 2013, **9**(3):e1003346.
- [4] Schmidt E, Seifert M, Baumeister R. *Caenorhabditis elegans* as a model system for Parkinson's disease[J]. *Neurodegener Dis*, 2007, **4**(2/3):199-217.
- [5] Shaye DD, Greenwald I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs[J]. *PLoS One*, 2011, **6** (5): e20085.
- [6] Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, **5** (5):387-398.
- [7] Culetto E, Sattelle DB. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, **9**(6):869-877.
- [8] Harrington AJ, Hamamichi S, Caldwell GA, et al. *C. elegans* as a model organism to investigate molecular pathways involved with Parkinson's disease[J]. *Dev Dyn*, 2010, **239** (5): 1282-1295.
- [9] Li J, Le WD. Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Exp Neurol*, 2013, **250**:94-103.
- [10] González-Hunt CP, Leung MC, Bodhicharla RK, et al. Exposure to mitochondrial genotoxins and dopaminergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* [J]. *PLoS One*, 2014, **9** (12): e114459.
- [11] Lehtonen Š, Jaronen M, Vehviläinen P, et al. Inhibition of excessive oxidative protein folding is protective in MPP(+) toxicity-induced Parkinson's disease models[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, **25**(8):485-497.
- [12] Cooper JF, Dues DJ, Spielbauer KK, et al. Delaying aging is neuroprotective in Parkinson's disease: a genetic analysis in *C. elegans* models[J]. *NPJ Parkinsons Dis*, 2015, **1**:15022.
- [13] Chen S, Luo S, Zhang Z, et al. VHL-1 inactivation and mitochondrial antioxidants rescue *C. elegans* dopaminergic neurodegeneration[J]. *Protein Cell*, 2019, **10**(8):610-614.
- [14] Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans* [J]. *WormBook*, 2006, **11**:1-11.
- [15] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, **77**(1):71-94.
- [16] Cao X, Wang X, Chen H, et al. Neurotoxicity of nonylphenol exposure on *Caenorhabditis elegans* induced by reactive oxidative species and disturbance synthesis of serotonin [J]. *Environ Pollut*, 2019, **244**:947-957.
- [17] Tsai CW, Tsai RT, Liu SP, et al. Neuroprotective effects of betulin in pharmacological and transgenic *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease [J]. *Cell Transplant*, 2017, **26** (12):1903-1918.