实验研究
Experiment

环境相关浓度的睾酮对秀丽线虫的生殖毒性作用

马令怡[1,2]，李维溪[1,2]，尹洁晨[1,2]，朱光灿[1]，刘冉[1]

1. 东南大学公共卫生学院环境医学工程教育部重点实验室，江苏 南京 210009
2. 生态环境部南京环境科学研究所，国家环境保护农药环境评价与污染控制重点实验室，江苏 南京 210042

摘要：

[背景] 睾酮是一种重要的雄激素，由于人类生产生活活动造成它在环境中的不同程度暴露，可能影响生态环境中多种生物的生殖能力。

[目的] 以秀丽隐杆线虫为模式生物，探讨环境相关浓度的睾酮的生殖毒性作用。

[方法] 根据睾酮在环境中实际暴露水平选取有代表性的环境相关质量浓度（简称为浓度，1 ng·L^{-1}、10 ng·L^{-1}、100 ng·L^{-1}、1 μg·L^{-1}、10 μg·L^{-1}）作为本研究的暴露浓度，将同步化的L1期野生型N2线虫暴露于不同浓度的睾酮及M9溶剂（对照组）中，20℃下恒温培养染毒48 h。观察各组生殖毒性指标，包括后代数目、世代时间、性腺发育阶段、畸形现象、生殖细胞数目。

[结果] 野生型N2秀丽隐杆线虫自L1期暴露于睾酮48 h后，与对照组（219.70±27.99）相比，10 ng·L^{-1}~10 μg·L^{-1}组后代数目减少（分别为186.90±19.68，P=0.009；182.60±25.33，P=0.003；178.20±14.46，P=0.001；159.20±28.64，P<0.001）（F=7.24，P<0.001）；10 μg·L^{-1}组与对照组相比后代数目减少了27.5%。与对照组［（71.85±3.49）h］相比，100 ng·L^{-1}组［（81.70±6.26）h，P=0.001］、1 μg·L^{-1}组［（79.28±4.83）h，P=0.015］、10 μg·L^{-1}组［（79.54±3.92）h，P=0.011］世代时间延长（F=3.97，P=0.005）；100 ng·L^{-1}组世代时间延长最多，为9.85 h。对性腺发育阶段的观察发现，随染毒浓度的增高，性腺发育逐渐受到抑制，各个剂量组中的成虫比例从对照组的（63.82±16.37）%逐渐下降至（53.95±1.03）%、（41.39±8.57）%、（26.79±1.31）%、（20.16±1.94）%、（8.00±2.03）%。在100 ng·L^{-1}及以上染毒组线虫中观察到畸形现象，包括排卵孔畸形、子宫内卵未受精、虫袋、性腺发育异常。与对照组（249.40±23.09）相比，10 ng·L^{-1}~10 μg·L^{-1}组生殖细胞数目减少［分别为（224.50±28.48，P=0.048）、（215.20±27.28，P=0.005）、（194.30±26.78，P<0.001）、（181.80±19.45，P<0.001）］（F=10.64，P<0.001）；10 μg·L^{-1}组生殖细胞数目较对照组减少了27.1%。

[结论] 环境相关浓度的雄激素睾酮可以导致秀丽线虫后代数目减少、世代时间延长、性腺发育迟缓，这些作用可能与性腺中生殖细胞的减少有关。

关键词：睾酮；秀丽隐杆线虫；生殖毒性；性腺发育迟缓；生殖细胞减少

Reproductive toxicity of environmentally relevant concentrations of testosterone on *Caenorhabditis elegans*

MA Lingyi[1,2], LI Weixi[1,2], YIN Jiechen[1,2], ZHU Guangcan[1], LIU Ran[1] (1.Key Laboratory of Environmental Medicine of Engineering and Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China; 2.Key Laboratory of Pesticide Environmental Assessment and Pollution Control, Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing, Jiangsu 210042, China)

Abstract:

[Background] Testosterone is an important androgen. However, human production and living activities have led to its exposure to varying degrees in the environment, which may affect the reproductive ability of many organisms in the ecological environment.

[Objective] *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is used as a model organism to investigate the reproductive toxicity of testosterone at environmentally relevant concentrations.

[Methods] According to the actual concentration of testosterone in the environment, synchronized L1-stage wild-type N2 nematodes were exposed to representative environmentally relevant concentrations (1 ng·L^{-1}, 10 ng·L^{-1}, 100 ng·L^{-1}, 1 μg·L^{-1}, 10 μg·L^{-1}) of testosterone and M9 solvent (control) at 20℃ for 48 h. Brood size, generation time, gonadal development stage, malformation, and the number of germ cells were observed among the groups.

[Results] After the wild-type N2 *C. elegans* being exposed to testosterone for 48 h in the L1 stage,

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20581

基金项目
江苏省域城乡统筹供水技术集成与综合示范项目（2014ZX07405002）；江苏省研究生科研与实践创新计划项目（SJCX20_0060）；中央高校基本科研业务费专项资金资助（3225002106D）

作者简介
马令怡（1995—），女，硕士生；
E-mail：220183471@seu.edu.cn

通信作者
刘冉，E-mail：ranliu@seu.edu.cn

伦理审批 不需要
利益冲突 无申报
收稿日期 2021-02-25
录用日期 2021-06-17

文章编号 2095-9982(2021)08-0910-05
中图分类号 R123.1
文献标志码 A

▸引用
马令怡，李维溪，尹洁晨，等.环境相关浓度的睾酮对秀丽线虫的生殖毒性作用［J］.环境与职业医学，2021，38（8）：910-914.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20581

Funding
This study was funded.

Correspondence to
LIU Ran, E-mail: ranliu@seu.edu.cn

Ethics approval Not required
Competing interests None declared
Received 2021-02-25
Accepted 2021-06-17

▸To cite
MA Lingyi, LI Weixi, YIN Jiechen, et al. Reproductive toxicity of environmentally relevant concentrations of testosterone on *Caenorhabditis elegans*[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(8): 910-914.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20581

compared with the control group (219.70±27.99), the brood sizes of *C. elegans* were significantly decreased in the 10 ng·L^{-1} to 10 μg·L^{-1} groups (186.90±19.68, P=0.009; 182.60±25.33, P=0.003; 178.20±14.46, P=0.001; 159.20±28.64, P<0.001, respectively) (F=7.24, P<0.001), and in the 10 μg·L^{-1} group the brood size decreased by 27.5%. Compared with the control group [(71.85±3.49) h], the generation time was significantly prolonged in the 100 ng·L^{-1} group [(81.70±6.26) h, P=0.001], 1 μg·L^{-1} group [(79.28±4.83) h, P=0.015], and 10 μg·L^{-1} group [(79.54±3.92) h, P=0.011] (F=3.97, P=0.005), and was longest in the 100 ng·L^{-1} group where the generation time was prolonged by 9.85 h. In terms of gonadal development stage, as the concentration of testosterone increased, the development of gonads was gradually inhibited, and the proportion of adult worms to total nematodes gradually decreased from (63.82±16.37) % in the control group to (53.95±1.03) %, (41.39±8.57) %, (26.79±1.31) %, (20.16±1.94) %, and (8.00±2.03) % in each dose group, respectively. Malformations were observed in the 100 ng·L^{-1} group and above, including ovulation hole malformation, unfertilized eggs in uterus, a bag of worm, and abnormal gonadal development. Compared with the control group (249.40±23.09), the numbers of germ cells were significantly declined in the 10 ng·L^{-1} to 10 μg·L^{-1} groups (224.50±28.48, P=0.048; 215.20±27.28, P=0.005; 194.30±26.78, P<0.001; 181.80±19.45, P<0.001, respectively) (F=10.64, P<0.001), and in the 10 μg·L^{-1} group the number of germ cells decreased by 27.1%.

[Conclusion] Androgen testosterone at environmentally relevant concentrations can lead to decreased brood size, prolonged generation time, and delayed gonadal development of *C. elegans*. These effects may be related to the decrease of germ cells.

Keywords: testosterone; *Caenorhabditis elegans*; reproductive toxicity; delayed gonadal development; decrease of germ cells

环境内分泌干扰物（endocrine disrupting chemicals，EDCs）污染是全球最严重的环境问题之一，与人类的生殖障碍、发育异常、一些免疫系统和神经系统疾病有关，健康风险和生态危害极大[1]。环境雄激素是一类典型的EDCs，主要来源于禽畜粪尿及造纸厂废水的排放，其中睾酮是一种生物体内含量最高、活性最高的重要天然雄激素[2]，在很多国家和地区的多种环境介质中都有其检出、报道。Vulliet等[3]在法国某地区地表水样中检测出睾酮的质量浓度（简称浓度）范围是2.8~6.0 ng·L^{-1}。Finlay-Moore等[4]在美国佐治亚州地表径流水中检出睾酮浓度为15~125 ng·L^{-1}，牧场径流水中检出睾酮浓度为10~1 840 ng·L^{-1}。研究表明，长期暴露于含0.31~2.48 mg·L^{-1}睾酮的水体中，大型水蚤产卵率降低，生殖能力下降[5]。现有研究已经发现，高浓度的睾酮暴露可以对水生生物产生生殖毒性，但是环境相关浓度的睾酮对生态环境中生物生殖毒性的影响尚不明确，因此，本研究以秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*，*C. elegans*）为模式生物，探讨环境相关浓度的雄激素睾酮是否具有生殖毒性作用。

线虫是土壤食物链中的低营养级生物，土壤线虫可维持生态系统的物质循环和能量流动，在生态系统中具有重要地位。秀丽隐杆线虫是一种优秀的实验室研究模式动物[6]，身体透明，显微镜下可直接观察线虫体内生殖系统和配子发生过程，易于检测表型变化，体型微小，具有完整的生殖系统，生殖力强，每条野生型雌雄同体线虫可产约200~300条后代，可大量繁殖，易于获取和饲养，生长周期快，实验周期短。野生型的雌雄同体个体产卵孵化后，经历4个幼虫期（L1、L2、L3、L4）和1个成虫期（Adult）。仅需28 h即可自孵化后发育为成虫进入产卵期，集中产卵3 d后即可完成全生命周期毒理学检测实验。秀丽线虫属于非寄生线虫，对实验室人员无害，且实验所需设备低廉、成本低。秀丽线虫遗传背景清晰，基因组中约40%的基因在人基因组中有同源基因，提示应用秀丽线虫进行毒理学实验研究可在一定程度上反映外源化学物可能导致的对人体的损害。

文献显示睾酮在不同环境水体中浓度范围变化较大[4]，本研究在环境浓度基础上进行有限外推，以秀丽线虫作为模式生物，研究后代数目、世代时间、性腺发育阶段、生殖细胞数目等反映生殖毒性的敏感效应终点，以预测环境中的睾酮的潜在风险性。

1 材料与方法

1.1 秀丽线虫虫株与培养方法

野生型（N2）秀丽线虫虫株购于美国明尼苏达大学线虫遗传中心（Caenorhabditis Genetic Center，CGC）。线虫培养于涂布有大肠杆菌（OP50）菌液的线虫生长培养基（nematode growth media，NGM），生化培养箱中20°C恒温培养。

1.2 主要试剂与仪器

睾酮（中国南京晚晴化玻仪器有限公司，中国，纯度≥98%），二脒基苯基吲哚（DAPI，Sigma-Aldrich，美国），Olympus SZ61体视显微镜、Olympus BX41生物荧光显微镜（Olympus，日本）。

M9溶液的配置：氯化钠2.5 g、磷酸氢二钠3 g、磷酸二氢钾1.5 g，加蒸馏水定容到500 mL，高压灭菌结束后加入1 mol·L^{-1}的硫酸镁0.5 mL，摇匀冷却至室温备用。

1.3 实验方法

1.3.1 染毒剂量设定 根据文献中显示的睾酮在地表水和部分牧场径流水中的浓度[4]，本研究设定环境相

关浓度（1 ng·L^{-1}、10 ng·L^{-1}、100 ng·L^{-1}、1 μg·L^{-1}、10 μg·L^{-1}）。

1.3.2 染毒方法 将睾酮溶解于DMSO中，配制成1 g·L^{-1}的储备液，然后用无菌M9溶液稀释成所需染毒浓度，设定浓度组分别为1 ng·L^{-1}、10 ng·L^{-1}、100 ng·L^{-1}、1 μg·L^{-1}、10 μg·L^{-1}，并以M9溶液为对照组。染毒培养皿（规格35 mm）中提前1 d滴加40 μL OP50菌液并涂抹均匀，过夜培养。加入200 μL染毒液，于超净工作台中晾干。将同步化后孵化的L1幼虫虫液2 500×*g*离心1 min，每个染毒培养皿加入10 μL虫液染毒48 h。

1.3.3 后代数目计数 培养皿中央滴加2.5 μL OP50菌液，染毒结束后挑取单条线虫分别置于新培养皿中。每隔24 h转一次培养皿，直至其不再产卵为止，观察记录每条线虫的后代数目，每组记录10条线虫。

1.3.4 世代时间的测定 培养皿中央滴加2.5 μL OP50菌液，染毒结束后挑取单条线虫分别至新培养皿中。观察线虫成虫产第一个卵的时间，此时刻记为*t*1，继续观察该卵发育长成成虫后产出第一个卵的时间，此时刻记为*t*2，*t*2–*t*1即为线虫的世代时间，每组记录8条线虫。

1.3.5 性腺发育阶段及畸形现象的测定 性腺发育阶段的测定参考Craig等[7]的研究，各阶段分别以L1/L2、L2/L3、Late L3/L4、Late L4和Adult表示。染毒结束后的线虫用M9溶液冲洗3次，0.025 mmol·L^{-1}盐酸左旋咪唑麻醉，显微镜下观察记录每条线虫的性腺发育阶段及畸形现象并拍照，每组记录100条线虫。

1.3.6 生殖细胞计数 染毒结束后将线虫用M9溶液从培养皿上清洗下来，转移至无毒的涂布有OP50的培养皿中，继续培养4 h。于载玻片上预先滴加1滴M9溶液，挑取30条线虫到载玻片上，滴加90%乙醇并于超净工作台中晾干，重复滴加3次。滴加20 μL DAPI工作液染色，注意避光。染色后盖上盖玻片，于荧光显微镜下选择蓝色荧光，观察、拍照并计数生殖细胞数，每组记录10条线虫。

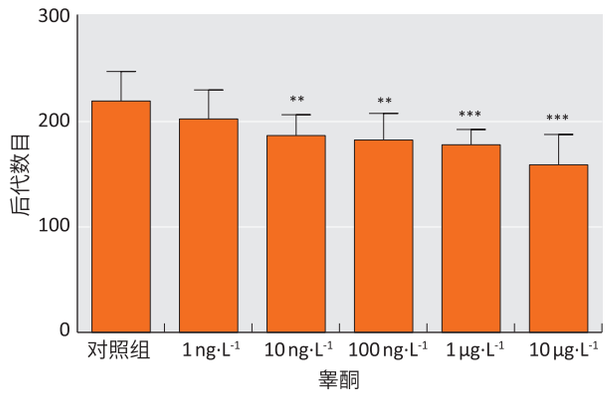
1.4 统计学分析

实验数据利用IBM SPSS 20软件处理，成组的计量资料皆服从正态分布，且各组间方差齐性，组间比较采用单因素方差分析，剂量组与对照组的两两比较采用Dunnett-*t*检验，检验水准为α=0.05。

2 结果

2.1 后代数目

N2秀丽线虫自L1期暴露于睾酮48 h后，10 ng·L^{-1}及以上浓度4组的后代数目分别为（186.90±19.68）（*P*=0.009）、（182.60±25.33）（*P*=0.003）、（178.20±14.46）（*P*=0.001）、（159.20±28.64）（*P*<0.001），较对照组（219.70±27.99）减少，组间差异具有统计学意义（*F*=7.24，*P*<0.001）；且随着染毒浓度不断增高，后代数目呈逐渐下降的趋势（*r*=–0.455，*P*<0.001），最高剂量组后代数目减少了27.5%（图1）。



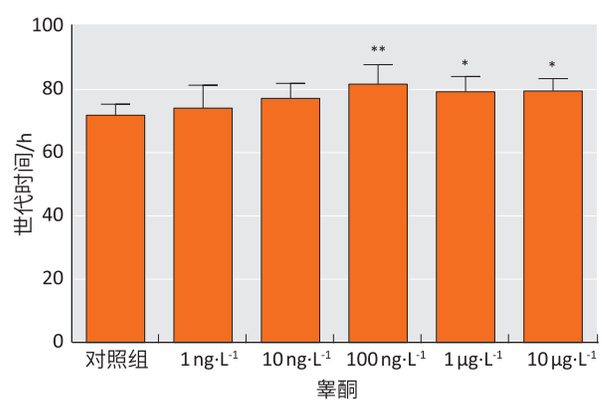
[注] 与对照组相比，**：*P*<0.01，***：*P* ⩽ 0.001。

图1 睾酮暴露48 h后N2秀丽线虫的后代数目（$\bar{x}\pm s$，*n*=10）

Figure 1 Brood size of *C. elegans* N2 after testosterone exposure for 48 h ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

2.2 世代时间

N2秀丽线虫自L1期暴露于睾酮48 h后，与对照组［（71.85±3.49）h］相比，100 ng·L^{-1}组［（81.70±6.26）h，*P*=0.001］、1 μg·L^{-1}组［（79.28±4.83）h，*P*=0.015］、10 μg·L^{-1}组［（79.54±3.92）h，*P*=0.011］世代时间延长，组间差异具有统计学意义（*F*=3.97，*P*=0.005）；100 ng·L^{-1}组世代时间延长最多，为9.85 h（图2）。



[注] 与对照组相比，*：*P*<0.05，**：*P*=0.001。

图2 睾酮暴露48 h后N2秀丽线虫的世代时间（$\bar{x}\pm s$，*n*=8）

Figure 2 Generation time of *C. elegans* N2 after testosterone exposure for 48 h ($\bar{x}\pm s$, *n*=8)

2.3 性腺发育阶段

如图3所示，N2秀丽线虫自L1期暴露于睾酮48 h后，随染毒浓度的增高，性腺发育逐渐受到抑制，

成虫的比例从对照组的（63.82±16.37）%逐渐下降至（53.95±1.03）%、（41.39±8.57）%、（26.79± 1.31）%、（20.16±1.94）%、（8.00±2.03）%。

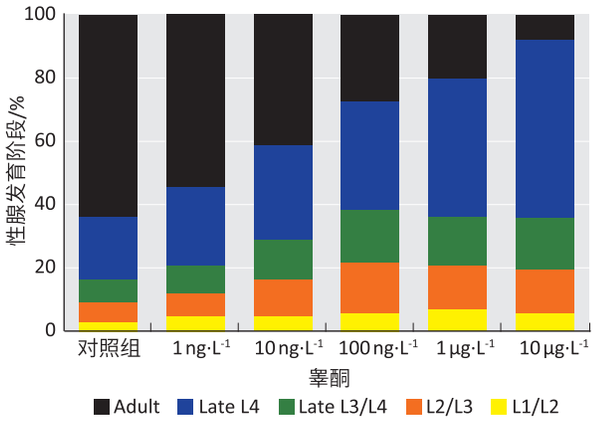
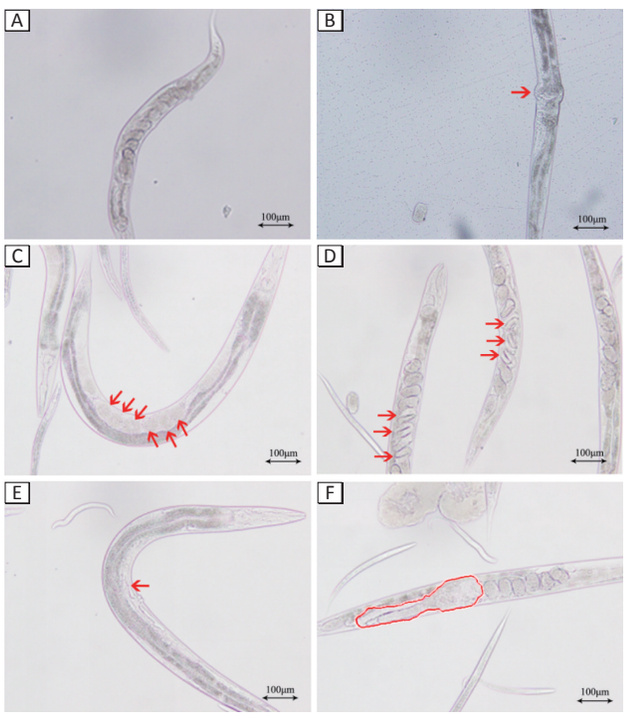


图3 睾酮暴露48 h后N2秀丽线虫的性腺发育阶段

Figure 3 Gonadal development stages of *C. elegans* N2 after testosterone exposure for 48 h

2.4 畸形现象

如图4所示，N2秀丽线虫自L1期暴露于睾酮48 h后，100 ng·L^{-1}及以上染毒组线虫观察到畸形现象，如排卵孔畸形（图4B）、子宫内卵未受精（图4C）、虫袋（图4D）、性腺发育异常（图4E、F）。



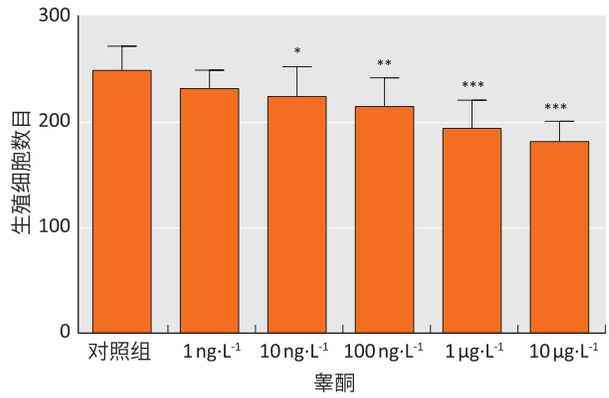
[注] A：正常线虫形态；B：排卵孔畸形（1 μg·L^{-1}）；C：子宫内卵未受精（10 μg·L^{-1}）；D：虫袋（10 μg·L^{-1}）；E：性腺发育异常（100 ng·L^{-1}）；F：性腺发育异常（100 ng·L^{-1}）。图中红色箭头所指、红色圈内均为畸形现象。

图4 睾酮暴露48 h后N2秀丽线虫的畸形现象（×200）

Figure 4 Malformations of *C. elegans* N2 after testosterone exposure for 48 h (×200)

2.5 生殖细胞数目

N2秀丽线虫自L1期暴露于睾酮48 h后，与对照组（249.40±23.09）相比，10 ng·L^{-1}~10 μg·L^{-1}组［分别为（224.50±28.48，P=0.048）、（215.20±27.28，P=0.005）、（194.30±26.78，P<0.001）、（181.80±19.45，P<0.001）］生殖细胞数目减少，组间差异具有统计学意义（F=10.64，P<0.001）；且随着染毒浓度不断增高，生殖细胞数目呈逐渐下降的趋势（r=-0.518，P<0.001），10 μg·L^{-1}剂量组与对照组相比生殖细胞数目减少了27.1%（图5）。



[注] 与对照组相比，*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.001。

图5 睾酮暴露48 h后N2秀丽线虫的生殖细胞数目（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Figure 5 Germ cell numbers of *C. elegans* N2 after testosterone exposure for 48 h ($\bar{x}\pm s$, n=10)

3 讨论

秀丽隐杆线虫是一种较为成熟的无脊椎模式动物，其生殖系统对外源性激素类物质具有一定的敏感性，可通过体内实验检测化学物的生殖毒性效应。因此，本研究探讨了环境相关浓度的睾酮对模式生物秀丽隐杆线虫的生殖毒性，发现其性腺发育延缓、后代数目和生殖细胞数目下降等改变。

实验结果表明，相比于世代时间，秀丽隐杆线虫对于雄激素睾酮诱导的后代数目下降更为敏感，且呈现线性趋势。这一结果与对大山雀（*Parus major*）的研究结果类似，皮下植入（0.6±0.015）mg睾酮的雌性大山雀孵化体温降低，进而导致孵化时间延长，卵和雏鸟的数量减少[8]。尽管在哺乳动物实验中，睾酮暴露并未导致其后代数量减少（可能由于暴露浓度较低），但在妊娠第16~19天皮下注射3 mg睾酮的大鼠，其后代生殖功能明显受到影响[9]。

在秀丽隐杆线虫中，性腺发育发生在四个幼虫阶段（L1、L2、L3和L4），直至成虫期发育为成熟的性腺。性腺发育障碍被认为是各种生殖缺陷形成的原因[10]。本研究发现，环境相关浓度的雄激素睾酮暴露可导致严

重的性腺发育迟缓，在10 μg·L^{-1}组，92%的线虫性腺无法发育成熟。不仅如此，染毒组线虫还出现畸形现象，表明睾酮还具有导致秀丽线虫生殖系统畸形的能力。

N2雌雄同体线虫从L4后期时开始在性腺中生成精子，产生约300个精子后停止，随后开始产生卵子，与自身产生的精子受精形成受精卵[11-12]。性腺的发育是在生殖细胞的增殖和分化过程中形成的，性腺中生殖细胞的发育影响子代的形成，生殖细胞数是评价外源化学物生殖毒性的重要指标之一。本研究发现，睾酮暴露可导致秀丽线虫生殖细胞数目减少，与性腺发育迟缓的趋势相一致，且其减少的比例与后代数目减少的比例大致相同。因此可以推测，环境相关浓度的睾酮诱导的后代数目减少可能与性腺中生殖细胞数目的减少有关。产生这种效应的机制可能与秀丽线虫体内一系列核激素受体（nuclear hormone receptors，NHRs）有关，其中nhr-69是与人雄激素受体（androgen receptor，AR）同源的睾丸激素受体，睾酮可能通过与nhr-69结合从而使性腺发育推迟[13]，影响性腺中生殖细胞的增殖分化，继而造成后代数目的下降。

综上所述，环境中的睾酮可能影响秀丽线虫生殖能力。秀丽线虫作为一种优秀的实验室模式动物，其后代数目、成虫率、生殖细胞数目等指标可作为筛选环境雄激素类物质的敏感生物标志，未来可利用秀丽线虫建立识别环境雄激素类物质的体内实验方法，并为建立环境激素的高通量快速筛选系统做准备。然而，除雄激素外，真实环境中存在不同种类和浓度的其他EDCs及各类活性物质，其在生物体内外可能产生的相互作用均是未知的，本实验仅针对睾酮这一代表性雄激素进行了研究，后续实验可采集环境样品进行测试，以分析EDCs可能造成的生态影响。

参考文献

[1] YILMAZ B，TEREKECI H，SANDAL S，et al. Endocrine disrupting chemicals：exposure，effects on human health，mechanism of action，models for testing and strategies for prevention [J]. Rev Endocr Metab Disord，2020，21（1）：127-147.

[2] 韩伟，李艳霞，杨明，等. 环境雄激素的危害、来源与环境行为 [J]. 生态学报，2010，30（6）：1594-1603.
HAN W，LI Y X，YANG M，et al. Effects sources and behaviors of environmental androgens [J]. Acta Ecol Sin，2010，30（6）：1594-1603.

[3] VULLIET E，WIEST L，BAUDOT R，et al. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng·L-1 levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A，2008，1210（1）：84-91.

[4] FINLAY-MOORE O，HARTEL P G，CABRERA M L. 17β-estradiol and testosterone in soil and runoff from grasslands amended with broiler litter [J]. J Environ Qual，2000，29（5）：1604-1611.

[5] BARBOSA I R，NOGUEIRA A J，SOARES A M. Acute and chronic effects of testosterone and 4-hydroxyandrostenedione to the crustacean *Daphnia magna* [J]. Ecotoxicol Environ Saf，2008，71（3）：757-764.

[6] ROH J Y，SIM S J，YI J，et al. Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics [J]. Environ Sci Technol，2009，43（10）：3933-3940.

[7] CRAIG A L，MOSER S C，BAILLY A P，et al. Methods for studying the DNA damage response in the *Caenorhabdatis elegans* germ line [J]. Methods Cell Biol，2012，107：321-352.

[8] DE JONG B，LENS L，AMININASAB S M，et al. Effects of experimentally sustained elevated testosterone on incubation behaviour and reproductive success in female great tits（*Parus major*）[J]. Gen Comp Endocrinol，2016，230-231：38-47.

[9] TEHRANI F R，NOROOZZADEH M，ZAHEDIASL S，et al. Prenatal testosterone exposure worsen the reproductive performance of male rat at adulthood [J]. PLoS One，2013，8（8）：e71705.

[10] WILHELM D，PALMER S，KOOPMAN P. Sex determination and gonadal development in mammals [J]. Physiol Rev，2007，87（1）：1-28.

[11] JEONG J，KIM H，CHOI J. In silico molecular docking and in vivo validation with *Caenorhabditis elegans* to discover molecular initiating events in adverse outcome pathway framework：case study on endocrine-disrupting chemicals with estrogen and androgen receptors [J]. Int J Mol Sci，2019，20（5）：1209.

[12] MENDELSKI M N，DÖLLING R，FELLER F M，et al. Steroids originating from bacterial bile acid degradation affect *Caenorhabditis elegans* and indicate potential risks for the fauna of manured soils [J]. Sci Rep，2019，9（1）：11120.

[13] ANGELES-ALBORES D，LEIGHTON D H，TSOU T，et al. The *Caenorhabditis elegans* female- like state：decoupling the transcriptomic effects of aging and sperm status [J]. G3（Bethesda），2017，7（9）：2969-2977.

（英文编辑：汪源；责任编辑：丁瑾瑜）