

## 氰戊菊酯对菲律宾蛤仔染毒后消化腺细胞的彗星实验分析

刘 波\*, 许贻斌, 郑惠东, 陈宇锋, 郑盛华, 钟硕良

(福建省水产研究所, 福建 厦门 361013)

**摘要:** 为检测氰戊菊酯对菲律宾蛤仔染毒培育 25 d 后消化腺细胞 DNA 的损伤情况, 将菲律宾蛤仔分为 6 组进行不同剂量染毒, 采用彗星实验技术进行 DNA 损伤分析, 并通过 Comet Score 1.5 分析软件对拖尾率、尾长、彗尾 DNA 相对含量、尾矩、Olive 矩等 DNA 损伤指标进行统计。在对各指标分别建立一元回归方程的基础上, 又通过 SPSS 软件进行判定分析, 筛选影响作用更大的检测指标, 建立了多参数的多元回归方程。结果显示, 与空白对照组相比, 菲律宾蛤仔各染毒组消化腺细胞 DNA 均有不同程度的损伤且各检测指标均有显著性差异, 对照组受损细胞极少, 拖尾率仅为  $8.06\% \pm 1.94\%$ , 彗尾 DNA 相对含量、尾矩和 Olive 矩都接近 0,  $0.0675 \sim 1.0800$  mg/L 染毒实验组各指标值显著增加。研究表明, 各检测指标与染毒浓度表现出良好的剂量效应关系, 随着染毒浓度递增, 各检测指标都呈规律性地增长趋势, 具有高度的相关性, 多项式回归方程和多元回归方程均有显著性的统计学意义, 通过多元回归方程可以有效地推断氰戊菊酯染毒浓度和染毒时间。

**关键词:** 菲律宾蛤仔; 氰戊菊酯; DNA 损伤; 彗星实验

**中图分类号:** R 994.6; S 917.4

**文献标志码:** A

彗星实验又称单细胞凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis, SCGE), 是由细胞核沉淀和光环测试等检测技术演化而来, 最早由 Ostling 等<sup>[1]</sup>于 1984 年提出, 可根据电泳后 DNA 的拖尾长度定量检测真核细胞中 DNA 损伤程度。后经 Olive 等<sup>[2]</sup>和 Singh 等<sup>[3]</sup>不断改进, 使 SCGE 敏感性大大提高, 不仅可以检测到 DNA 双链和单链断裂, 还能检测到 DNA 的碱性不稳定结构<sup>[4]</sup>。由于 SCGE 具有快速、检测谱宽、灵敏性高等优点, 其应用日益广泛。目前, SCGE 主要应用于哺乳动物的血细胞<sup>[5]</sup>, 尤其是淋巴细胞的 DNA 损伤研究方面<sup>[6]</sup>, 以小鼠为研究对象的各种组织细胞 DNA 损伤有较多涉及<sup>[7-8]</sup>。但是, SCGE 在水产养殖生物中的研究不多, 现仅有 SCGE 检测真鲷血细胞 DNA 损伤<sup>[9]</sup>及扇贝血淋巴细胞 DNA 损伤<sup>[10]</sup>等的报道。氰戊菊酯 (fenvalerate) 作为常用的菊酯类农药, 是 20 世纪 70 年代迅速发展起来的新型农药<sup>[11]</sup>, 近年来由于

菊酯类农药的广泛应用, 近岸海域养殖环境污染日益严重, 海洋污染物对养殖生物遗传物质的基因毒性越发起人们的担忧<sup>[12-13]</sup>。有关氰戊菊酯等菊酯类农药的相关研究主要集中在神经毒性和环境内分泌干扰方面<sup>[14-15]</sup>, 国内外关于氰戊菊酯遗传基因毒性的研究报道较少。

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 是我国沿海地区水产养殖重要经济种类之一, 在海水养殖生物中具有良好的代表性, 对海洋环境中的有机污染物具有很强的生物富集作用, 是一种重要的指示生物<sup>[16]</sup>。氰戊菊酯是否对菲律宾蛤仔消化腺细胞具有遗传毒性作用而引起 DNA 损伤, 国内外尚未见报道。本实验通过彗星实验研究氰戊菊酯对菲律宾蛤仔染毒后消化腺细胞 DNA 的损伤特征, 为我国沿海重要经济水产养殖品种的污染预警提供一种新的技术手段, 并为氰戊菊酯遗传毒性作用机制的深入研究和管理决策提供科学依据。

收稿日期: 2013-05-21

修回日期: 2014-03-16

资助项目: 国家海洋局海洋公益性行业科研专项 (201005012)

通信作者: 刘 波, E-mail: liubo8090@aliyun.com

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

氰戊菊酯由上海悦联化工有限公司生产;低熔点琼脂糖凝胶、绿色荧光 DNA 染料、EDTA 溶液(0.5 mol/L)、10 × 细胞裂解液(0.1 mol/L Tris, 10% 肌氨酸钠, 10% Triton X-100)为美国 CELL BIOLABS 公司产品; NaCl、NaOH、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>等常规药品均为国产分析纯试剂,购自厦门绿茵试剂玻仪有限公司。

实验用玻片为美国 Cell Biolabs 公司产品,超净工作台为苏州智净净化设备有限公司的 SW-CJ-1D 型,电热恒温水浴锅为上海精宏公司的 DK-S26 型,电泳仪为美国 Thermo 公司的 EC250-90 型,水平电泳槽为北京君意公司的 JY-SP-E 型,荧光显微镜为德国 Leica 公司的 DM5500 B 型。

### 1.2 实验动物

实验用菲律宾蛤仔购自福建省水产研究所大径中试基地附近的农贸市场,平均壳长(29.66 ± 3.17) mm,平均体质量(12.32 ± 1.87) g。在水泥池中暂养一周,挑选健康无病、无外伤且规格统一的菲律宾蛤仔作为实验用贝。

### 1.3 染毒处理方法

急性毒性实验表明,菲律宾蛤仔的死亡率与氰戊菊酯的浓度成显著性正相关( $P < 0.01$ ),具有明显的浓度—效应和时间—效应关系,氰戊菊酯对菲律宾蛤仔 24、48 和 96 h 半致死浓度(LC<sub>50</sub>)分别为 13.7、3.59 和 2.09 mg/L。根据 LC<sub>50</sub>值和特伦堡(Tumbel)安全浓度计算公式设定亚急性毒性实验的染毒浓度,将菲律宾蛤仔分为 6 组进行不同剂量染毒,设置一个空白对照组,5 个染毒实验组(0.067 5、0.135 0、0.270 0、0.540 0 和 1.080 0 mg/L),每组 30 粒菲律宾蛤仔。

在 1 m<sup>2</sup> 的水泥池内用沙滤海水微充气培育,实验过程中海水溶解氧(5.62 ± 0.18) mg/L、pH(8.06 ± 0.08)、水温(18.36 ± 0.26) °C、盐度(30.00 ± 0.02)。为避免氰戊菊酯染毒作用随时间不断降低,每日更换实验用水,以确保各实验组氰戊菊酯染毒浓度的稳定。各实验组在持续染毒 25 d 后随机采集 3 粒菲律宾蛤仔,放入冰盒备用。

### 1.4 细胞悬液制备

剪取各实验组菲律宾蛤仔消化腺组织 0.2 ~

0.5 g 至 1.5 mL 灭菌离心管内,各实验组设置 3 组平行,加入 4 °C 预冷的 0.01 mol/L PBS 缓冲液(含 0.02 mol/L EDTA)1 mL,冰浴捣碎组织悬浮细胞,悬浮液静置 5 min 后转入新的离心管,3 000 r/min 离心 2 min 后弃上清液,用 4 °C 预冷的 0.01 mol/L PBS 缓冲液重悬细胞,调节细胞浓度为 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL,镜检观察细胞活性后备用。

### 1.5 彗星实验方法

按照 Cell Biolabs 公司的彗星分析试剂盒实验步骤进行单细胞凝胶电泳分析<sup>[17]</sup>。

**制片** 将彗星分析试剂盒的低熔点琼脂糖凝胶在 90 ~ 95 °C 水浴锅内加热溶解 20 min,再转入 37 °C 水浴锅冷却 20 min 备用。细胞悬液与低熔点琼脂糖凝胶按 1:10 的比例混合,迅速吸取 75 μL 混合液均匀涂抹于彗星分析玻片上,将玻片置于 4 °C 冰箱避光固化 15 min。

**裂解和解旋** 将玻片放入预冷的细胞裂解液(2.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L EDTA, 0.01 mol/L Tris, 1% 肌氨酸钠, 1% Triton X-100, pH 10.0)中,置于 4 °C 冰箱避光裂解 30 ~ 60 min。裂解完毕后用蒸馏水小心地冲洗玻片,将清洗后的玻片放入预冷的碱性液(0.3 mol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA, pH > 13)中,置于 4 °C 冰箱避光解旋 30 min。

**电泳和染色** 将玻片小心地移入水平电泳槽,倒入预冷的碱性电泳缓冲液(0.3 mol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA, pH > 13),在电压 1 V、电流 300 mA 的条件下电泳 15 ~ 30 min。电泳结束后轻轻移出玻片,用预冷的蒸馏水浸泡 2 min,重复两次洗去多余碱,再用 70% 酒精浸泡固化 5 min。将玻片取出完全控干,每个处理滴加 100 μL 的绿色荧光 DNA 染料,室温避光染色 15 min。

### 1.6 图像分析和数据处理

通过荧光显微镜观察玻片,并进行显微摄影,每个处理采集 60 个细胞进行拍照和数据分析,各实验组 3 个平行共统计 180 个细胞。图像用彗星分析软件 Comet Score 1.5 进行分析,采用拖尾率、彗星尾长、彗尾 DNA 相对含量、尾矩和 Olive 矩等参数评价菲律宾蛤仔 DNA 的损伤程度。其中拖尾率 = 拖尾细胞数/观察细胞数 × 100%、彗尾 DNA 相对含量 = 尾部 DNA 含量/细胞总 DNA 含量 × 100%、尾矩 = 尾长 × 彗尾 DNA 相对含量 × 100%、Olive 矩 = 头尾部中心间距 × 彗尾 DNA 相对含量 × 100%。应用 Excel 软件及 SPSS 16.0 软

件对所获得的数据进行单因素方差分析,检验显著性并计算出回归方程。

## 2 结果

### 2.1 氰戊菊酯染毒对菲律宾蛤仔消化腺细胞 DNA 的影响

荧光显微镜镜检发现,空白对照组的消化腺细胞 DNA 结构紧密,染色后呈圆形荧光团,无拖尾现象;各染毒实验组损伤细胞 DNA 的断裂碎片在电场中离开核 DNA 向阳极迁移,染色后形成彗星状拖尾。随着染毒浓度的增加,细胞核 DNA 损伤越严重,断裂的碎片或碱变性片段就越

多,彗星尾长相应增加,尾部荧光强度也相应增强(图 1)。不同染毒实验组的拖尾率、彗星尾长、彗尾 DNA 相对含量、尾矩和 Olive 矩与空白对照组之间的差异极显著( $P < 0.01$ )(表 1)。对照组受损细胞极少,拖尾率仅为  $8.06\% \pm 1.94\%$ ,彗尾 DNA 相对含量、尾矩和 Olive 矩都接近 0,细胞没有发生 DNA 断裂形成彗星图像;0.067 5 ~ 0.270 0 mg/L 氰戊菊酯染毒 25 d 后各指标值相应增加。此外,当染毒剂量为 0.540 0 mg/L 时,各指标值迅速增加,表明氰戊菊酯对菲律宾蛤仔消化腺细胞的毒性作用可能存在较为敏感的阈值范围。

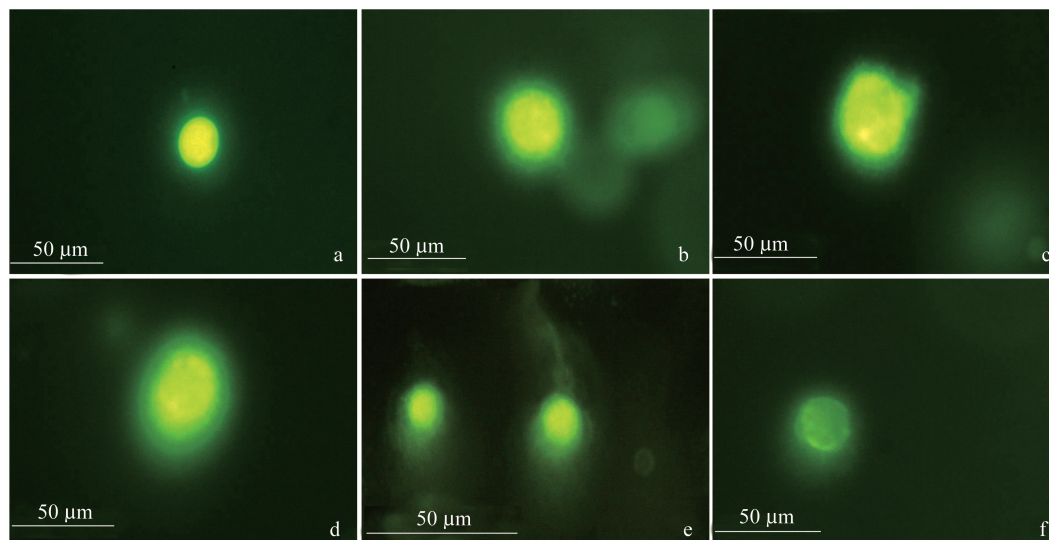


图 1 氰戊菊酯不同染毒浓度对菲律宾蛤仔消化腺细胞 DNA 损伤的彗星图像

a. 空白对照组; b. 染毒浓度 0.067 5 mg/L 组; c. 染毒浓度 0.135 0 mg/L 组; d. 染毒浓度 0.270 0 mg/L 组; e. 染毒浓度 0.540 0 mg/L 组; f. 染毒浓度 1.080 0 mg/L 组

Fig. 1 The comet assay images of DNA damage in digestive glands cells of *R. philippinarum* exposed to different concentrations of fenvalerate

a. control group; b. 0.067 5 mg/L exposure concentration; c. 0.135 0 mg/L exposure concentration; d. 0.270 0 mg/L exposure concentration; e. 0.540 0 mg/L exposure concentration; f. 1.080 0 mg/L exposure concentration

表 1 氰戊菊酯不同染毒浓度对菲律宾蛤仔消化腺细胞 DNA 损伤的彗星实验指标数据  
Tab. 1 The parameters of DNA damage in digestive glands cells of *R. philippinarum* exposed to different concentrations of fenvalerate with comet assay method

染毒浓度/(mg/L) exposure concentration	拖尾率/% tail rate	彗星尾长/ $\mu\text{m}$ tail length	彗尾 DNA 相对含量/% percentage of tail DNA	尾矩/(%· $\mu\text{m}$ ) tail moment	Olive 矩/(%· $\mu\text{m}$ ) olive moment
0	$8.06 \pm 1.94$	$5.36 \pm 0.81$	<0.001	<0.001	<0.001
0.067 5	$15.28 \pm 2.39^*$	$7.92 \pm 1.14^*$	$0.13 \pm 0.04^*$	$0.013 \pm 0.01^*$	$0.011 \pm 0.004^*$
0.135 0	$19.39 \pm 3.37^*$	$7.23 \pm 1.27^*$	$0.37 \pm 0.12^*$	$0.029 \pm 0.01^*$	$0.021 \pm 0.01^*$
0.270 0	$47.22 \pm 4.96^*$	$24.37 \pm 3.41^*$	$9.53 \pm 1.49^*$	$2.47 \pm 0.63^*$	$1.72 \pm 0.48^*$
0.540 0	$54.17 \pm 6.57^*$	$26.87 \pm 3.73^*$	$23.16 \pm 2.51^*$	$6.45 \pm 1.14^*$	$5.03 \pm 1.16^*$
1.080 0	$73.06 \pm 8.21^*$	$34.12 \pm 5.19^*$	$39.22 \pm 3.72^*$	$13.79 \pm 2.61^*$	$11.34 \pm 2.12^*$

注: \* 表示与空白对照组相比( $P < 0.01$ )

Notes: \* represented that each exposed group comparing to control group( $P < 0.01$ )

## 2.2 菲律宾蛤仔消化腺细胞 DNA 损伤各项实验指标与氰戊菊酯染毒浓度的回归分析

各实验指标数据随着染毒浓度的变化不断增加,呈现一定的剂量效应关系,各实验指标与染毒浓度之间存在较好的相关性(表1)。经彗星分析软件 Comet Score 1.5 计算得到的各项实验指标与氰戊菊酯染毒浓度进行线性、多项式和指数拟合回归分析后,其多项式回归分析拟合度( $R^2 >$

0.92)最高(表2)。氰戊菊酯染毒浓度与彗星尾长、Olive 矩、彗尾 DNA 相对含量和拖尾率等参数的多元回归方程为  $Y = 0.008\ 65 + 0.068\ 3X_1 + 0.015\ 4X_2 - 0.023\ 7X_3 - 0.000\ 55X_4$  ( $P < 0.02$ ), 其中  $Y$  表示氰戊菊酯染毒浓度,  $X_1$  表示 Olive 矩,  $X_2$  表示拖尾率,  $X_3$  表示彗星尾长,  $X_4$  表示彗尾 DNA 相对含量,回归方程具有统计学意义。

表2 氰戊菊酯不同染毒浓度对菲律宾蛤仔消化腺细胞 DNA 损伤各实验指标的回归方程  
Tab.2 The regression equation of each parameters of DNA damage in digestive glands cells of *R. philippinarum* exposed to different concentrations of fenvalerate

实验指标 parameters	回归方程 regression equation	相关系数 correlation coefficient	P 值 P-value
拖尾率 tail rate	$y = 100.71x^3 - 220.95x^2 + 184x + 5.079\ 9$	0.934 0	<0.01
彗星尾长 tail length	$y = 23.95x^3 - 70.999x^2 + 77.116x + 3.389\ 1$	0.902 8	<0.05
彗尾 DNA 含量 percentage of tail DNA	$y = -78.488x^3 + 112.34x^2 + 7.140\ 3x - 0.678\ 7$	0.988 3	<0.01
尾矩 tail moment	$y = -18.543x^3 + 30.88x^2 + 1.200\ 6x - 0.173\ 6$	0.994 4	<0.01
Olive 矩 olive moment	$y = -15.29x^3 + 26.582x^2 - 0.293\ 7x - 0.091\ 8$	0.993 3	<0.01

注:  $y$  为各实验指标,  $x$  为氰戊菊酯染毒浓度

Notes:  $y$  is the DNA damage parameter;  $x$  is the exposure concentration of fenvalerate

## 3 讨论

氰戊菊酯等菊酯类农药在遗传物质毒性作用机制方面的研究还不多,有研究表明,菊酯类农药在各种动物实验中可导致血细胞、骨髓细胞、肝肠等组织细胞遗传毒性作用,产生 DNA 双链、单链断裂和姐妹染色单体交换等现象<sup>[18-20]</sup>,推测菊酯类农药造成 DNA 损伤的主要途径是通过自由基活化,与 DNA 的无嘌呤位点结合形成碱性不稳定位点,最终 DNA 链在碱性条件下发生断裂<sup>[21]</sup>。由于人类农业生产活动的广泛开展,其长期使用药导致近岸海域生态环境低浓度长时间污染,造成浅海及滩涂养殖生物如鱼、虾、贝等长期暴露。因此,为了全面评价氰戊菊酯在近岸海域生态环境中对水生生物的影响,本研究在氰戊菊酯对菲律宾蛤仔急性毒性实验的基础上,最终确定 24、48 和 96 h 半致死浓度(LC<sub>50</sub>),并通过 LC<sub>50</sub> 值和特伦堡(Tumbel)安全浓度计算公式筛选出 0.067 5 ~ 1.080 0 mg/L 等 5 个浓度梯度的长时间暴露染毒实验条件,最终的实验结果验证了筛选出的染毒浓度在彗星实验检测阈值范围内<sup>[22]</sup>。

本实验选用拖尾率、彗星尾长、彗尾 DNA 相对含量、尾矩和 Olive 矩等国内外各彗星图像分析软件使用的标准指标<sup>[23]</sup>,应用 Comet Score 1.5 彗星图像分析软件对各指标进行精确的测定分析。研

究发现,随着染毒浓度的增加,消化腺细胞 DNA 超螺旋结构越松散,断裂点越多, DNA 碎片越小,向阳极迁移的彗星尾部 DNA 片段越多,检测指标都呈渐进的规律性趋势,表现出良好的剂量效应关系,说明上述检测指标能够客观地反映 DNA 损伤程度,具有良好的代表性。这与文献报道的研究结果一致:在一定的阈值范围内,彗星尾长、彗尾 DNA 相对含量、尾矩和 Olive 矩等指标的分析结果比较可信<sup>[24]</sup>。实验表明,各染毒实验组与空白对照组相比各检测指标都表现出显著性差异( $P < 0.01$ ),但是,氰戊菊酯染毒浓度在较低水平 0.067 5 ~ 0.135 0 mg/L 时,两个实验组之间的彗星尾长、尾矩和 Olive 矩等指标差异不显著( $P > 0.05$ ),而当氰戊菊酯染毒浓度在较高水平 0.270 0 mg/L 以上时,菲律宾蛤仔消化腺细胞 DNA 损伤显著增加,各实验组之间的检测指标都表现出显著差异( $P < 0.01$ ),这一实验现象表明菲律宾蛤仔消化腺细胞对氰戊菊酯毒性存在高速反应的阈值范围。

各检测指标的回归分析和相关系数表明,各检测指标与染毒浓度之间存在高度的相关性,且各指标的相关系数均有统计学意义( $P < 0.05$ )。几何参数彗星尾长是较为直接的可靠指标,而尾矩和 Olive 矩则更能全面地反映染毒浓度对消化腺细胞 DNA 的损伤程度。在染毒浓度与彗星尾长、尾矩、Olive 矩、彗尾 DNA 相对含量和拖尾率等参数的多



元回归分析过程中发现,染毒浓度对尾矩和 Olive 矩的影响作用类似,但 Olive 矩的回归方程显著性更高( $P < 0.02$ ),尾矩表现为排除的变量。多元回归方程表明,对菲律宾蛤仔消化腺组织产生影响最显著的因素是 Olive 矩和彗星尾长。本实验在对各指标分别建立一元回归方程的基础上,通过 SPSS 软件进行聚类判定分析,筛选影响因子更大的检测指标,建立了多参数的多元回归方程,进行全面的 DNA 损伤变化规律研究。

菊酯类农药常常含有一些毒性代谢物的前体物,缓慢的生物降解率和亲脂性特征使其在生态环境中持续存在,最终对生态环境造成普遍而长期的污染<sup>[25]</sup>。在评估菊酯类农药等污染物的排放、泄漏等因素对近岸海域生态产生长期、持续的影响过程中,应用本研究提供的消化腺 DNA 变化与染毒浓度之间呈多项式关系的回归方程,就可以有效地推断染毒浓度和染毒时间,为水生生物的遗传毒性效应和毒性作用机制提供一种客观、有效、精确的评估方法和参考依据。

DNA 损伤可以导致各种类型的突变,包括潜在的长期的致癌效应和致畸效应等<sup>[26]</sup>,本实验以菲律宾蛤仔消化腺细胞为研究对象,采用标准的彗星实验分析方法对氰戊菊酯的遗传毒性进行检测,证明氰戊菊酯对沿海地区水产养殖生物的致突变、致癌、致畸等危害作用应该引起人们的足够重视,这种长期的潜在危害会严重影响近岸海域水生生物的种质资源,造成种质衰退、种群数量减少等问题。实验发现,单细胞凝胶电泳彗星实验可以在细胞分子水平直接反映出生态环境污染对水生生物的影响,通过对 DNA 损伤的评估,这一技术手段有望成为监测近海菊酯类农药等污染物对水生生物基因毒性的新方法,在该研究领域具有广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells [ J ]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984, 123(1) : 291 - 298.
- [ 2 ] Olive P L, Banath J P, Durand R E. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet" assay [ J ]. *Radiation Research*, 1990, 122(1) : 86 - 94.
- [ 3 ] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells [ J ]. *Experimental Cell Research*, 1988, 175(1) : 184 - 191.
- [ 4 ] Lee R F, Steinert S. Use of the single cell gel electrophoresis comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals [ J ]. *Mutation Research*, 2003, 544(1) : 43 - 64.
- [ 5 ] Jiang S L, Sun D J, Zhao X H, *et al.* DNA damage of drop whole blood specimen from endemic arsenism population by comet assay [ J ]. *Chinese Journal of Endemiology*, 2004, 23(1) : 22 - 24. [姜树林, 孙殿军, 赵新华, 等. 微量全血彗星试验观察砷中毒病区人群 DNA 损伤. *中国地方病学杂志*, 2004, 23(1) : 22 - 24. ]
- [ 6 ] Zheng J L, Li X N, Zhang X D, *et al.* An experimental study on time-dependent degradation of DNA in lymphocytes in the human bloodstain by single-cell gel electrophoresis [ J ]. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 2007, 22(3) : 23 - 26. [郑吉龙, 李晓娜, 张晓东, 等. 应用单细胞凝胶电泳测定人血痕淋巴细胞降解的实验研究. *中国法医学杂志*, 2007, 22(3) : 23 - 26. ]
- [ 7 ] Chen D, Liu S Z, Liu S Z, Liu J M, *et al.* Effect of low dose radiation on apoptosis in mouse spleen [ J ]. *Journal of Norman Bethune University of Medical Science*, 1999, 25(5) : 564 - 567. [陈东, 刘树铮, 刘佳梅, 等. 低剂量电离辐射对小鼠脾脏细胞凋亡的影响. *白求恩医科大学学报*, 1999, 25(5) : 564 - 567. ]
- [ 8 ] Agarwal D K, Chauhan L K, Gupta S K, *et al.* Cytogenetic effects of deltamethrin on rat bone marrow [ J ]. *Mutation Research*, 1994, 311(1) : 133 - 138.
- [ 9 ] Wang C G, Li Y H, Lin Z Y, *et al.* DNA damage in blood cells of *Pagrosomus major* exposed to benzo [ a ] pyrene (BaP) by the comet assay [ J ]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(6) : 1446 - 1449. [王春光, 李裕红, 林志勇, 等. 苯并 [ a ] 芘对真鲷 (*Pagrosomus major*) 血细胞 DNA 损伤的彗星实验研究. *农业环境科学学报*, 2006, 25(6) : 1446 - 1449. ]
- [ 10 ] Wei D, Li Z Y, Fu M Z, *et al.* The effect of nonylphenol on DNA damage in scallop hemolymph cells detected by single-cell gel electrophoresis [ J ]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36 (suppl. 2) : 39 - 42. [卫东, 李正炎, 傅明珠, 等. 用单细胞凝胶电泳技术检测壬基酚对扇贝血淋巴细胞的 DNA 损伤. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2006, 36(增刊 2) : 39 - 42. ]
- [ 11 ] Tong J W, Wang Y. Effect of cypermethrin and

- deltamethrin on DNA damage in lymphocytes in male mice[J]. *Journal of Environment and Health*, 2008, 25(8): 705 - 707. [佟俊旺, 王颖. 氯氰菊酯和溴氰菊酯对雄性小鼠淋巴细胞 DNA 的损伤. *环境与健康杂志*, 2008, 25(8): 705 - 707.]
- [12] Liu Y, Zheng G J, Yu H, *et al.* Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediments and mussel tissues from Hong Kong marine waters[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50(11): 1173 - 1184.
- [13] Yang Y L, Pan J, Li Y, *et al.* Persistent organic pollutant polychlorinated naphthalenes and polybrominated diphenyl ether [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(21): 2244 - 2251. [杨永亮, 潘静, 李悦, 等. 青岛近岸沉积物中持久性有机污染物多氯萘和多溴联苯醚. *科学通报*, 2003, 48(21): 2244 - 2251.]
- [14] Wu J P, Lu C, Wang Y, *et al.* Immunohistochemical study on the effects of pyrethroids on glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid in rat central nervous system [J]. *Acta Universitatis medicinalis Nanjing*, 1999, 19(6): 450 - 453. [吴建平, 卢春, 王英, 等. 拟除虫菊酯对大鼠中枢谷氨酸和  $\gamma$ -氨基丁酸递质影响的免疫组织化学研究. *南京医科大学学报*, 1999, 19(6): 450 - 453.]
- [15] Chen H U, Wang X R, Xiao J G, *et al.* Research on the estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides[J]. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 2001, 19(4): 274 - 277. [陈海燕, 王心如, 肖继皋, 等. 有机磷与拟除虫菊酯农药的拟雌激素活性研究. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2001, 19(4): 274 - 277.]
- [16] Xu C Q, Pan L Q, Wang L. Effects of tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) on metabolic enzymes and DNA damage in tissue of *Ruditapes philippinarum* [J]. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(5): 653 - 658. [四溴联苯醚(BDE-47)对菲律宾蛤仔组织解毒代谢酶活力与 DNA 损伤的影响. *海洋环境科学*, 2011, 30(5): 653 - 658.]
- [17] De Boeck M, Touil N, De Visscher G, *et al.* Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis [J]. *Mutation Research*, 2000, 469(2): 181 - 197.
- [18] Mitchelmore C L, Chipman J K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring[J]. *Mutation Research*, 1998, 399(2): 135 - 147.
- [19] Mukhopadhyay I, Chowdhuri D K, Bajpayee M, *et al.* Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay[J]. *Mutagenesis*, 2004, 19(2): 85 - 90.
- [20] Chauhan L K, Agarwal D K, Sundararaman V. *In vivo* induction of sister chromatid exchange in mouse bone marrow following oral exposure to commercial formulations of alpha-cyano pyrethroids [J]. *Toxicology Letters*, 1997, 93(3): 153 - 157.
- [21] Xia S J, Wu Z L. *Molecular toxicology* [M]. Wuhan: Hubei Science & Technology Press, 2001. [夏世钧, 吴中亮. *分子毒理学基础*. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2001.]
- [22] Xiong H J, Ma Y, Wang L, Tang S M. UV radiation-induced DNA damage in oyster cells measured by single cell gel electrophoresis[J]. *Journal of Yunnan Nationalities University: Natural Sciences Edition*, 2010, 19(6): 400 - 403. [熊何健, 马英, 汪琳, 等. 紫外辐射诱导牡蛎细胞 DNA 损伤的单细胞凝胶电泳检测. *云南民族大学学报*, 2010, 19(6): 400 - 403.]
- [23] Chen Y, Wang L, Wang Z J. Development and application of comet assay for detecting genotoxic substances in environmental samples [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(4): 673 - 678. [陈颖, 王磊, 王子健. 用彗星实验技术检测环境遗传毒性物质. *土壤学报*, 2006, 43(4): 673 - 678.]
- [24] Hellman B, Vaghef H, Bostrom B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay [J]. *Mutation Research*, 1995, 336(2): 123 - 131.
- [25] Huff J, Boyd J, Barrett J C. *Cellular and molecular mechanisms of hormonal carcinogenesis: Environmental influences* [M]. New York: Wiley-Liss, 1996.
- [26] Song W H, Pei Y T, Liu Q, *et al.* Investigation on DNA damage induced by the photolysis product of diflubenzuron in mice liver using single cell gel electrophoresis [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(4): 1482 - 1486. [宋文华, 裴亚托, 刘强, 等. 单细胞凝胶电泳检测除虫脒光解产物对小鼠肝脏 DNA 损伤研究. *农业环境科学学报*, 2007, 26(4): 1482 - 1486.]

## The analysis of digestive glands cells of *Ruditapes philippinarum* exposed to fenvalerate with comet assay method

LIU Bo<sup>\*</sup>, XU Yibin, ZHENG Huidong, CHEN Yufeng, ZHENG Shenghua, ZHONG Shuoliang  
(Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China)

**Abstract:** In order to detect the DNA damage in digestive glands cells of *Ruditapes philippinarum* exposed to different concentrations of fenvalerate for 25 days respectively, *R. philippinarum* were divided into six groups and evaluated with comet assay method. The DNA damage parameters such as the comet rate, the tail length, the percentage of tail DNA, the tail moment and the olive moment were statistically analyzed by Comet Score 1.5. On the basis of one-dimensional regression equation we selected greater influenced fly parameters after comparing with SPSS 16.0 and constructed the multiple-dimensional regression equation. The results showed that DNA damages in digestive glands cells of all exposed groups were observed and the parameters of each exposed group were significantly different from the control group ( $P < 0.01$ ). The DNA damage in digestive glands cells of control group was minimal. The tail rate of control group was  $8.06\% \pm 1.94\%$ , the percentage of tail DNA, tail moment and olive moment were nearly 0. The value of each parameter of all experimental groups with exposure concentration from 0.067 5 mg/L to 1.080 0 mg/L was significantly increased. Our research indicated that there was a dose-effect relationship between fenvalerate and DNA damage in digestive glands cells, which increased regularly with the exposure concentrations. All DNA damage parameters were highly relevant to the exposure concentrations. The one-dimensional regression equation ( $P < 0.05$ ) and multiple-dimensional regression equation ( $P < 0.02$ ) had significant statistic meaning, which might be an effective way to estimate the exposure concentration and time of fenvalerate. Our research provided new methods and clues to analyze the genotoxicity of aquatic species caused by the pollutant of pyrethroid pesticides in the coastal sea of China, which could be broadly applied.

**Key words:** *Ruditapes philippinarum*; fenvalerate; DNA damage; comet assay

**Corresponding author:** LIU Bo. E-mail: liubo8090@aliyun.com