醚菊酯对日本囊对虾肝胰腺细胞 DNA 损伤效应的研究

刘 波,陈宇锋,郑惠东,许贻斌,郑盛华,钟硕良

(福建省水产研究所,福建 厦门 361013)

摘要:为检测中国近海海洋环境中菊酯类农药等污染物对日本囊对虾(Marsupenaeus japonicas)的基因 毒性及其危害程度,作者首次使用醚菊酯对日本囊对虾进行毒理实验,将日本囊对虾分为 6 组进行不 同剂量的处理,采用彗星实验分析技术对处理培育 25 d的日本囊对虾 DNA 损伤情况进行检测,并通过 Comet Score 1.5 分析软件对实验图谱进行拖尾率、尾长、彗尾 DNA 相对含量、尾距、Olive 距等 DNA 损伤指标的统计分析,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。实验结果发现,与空白对照组相比,日 本囊对虾各实验处理组肝胰腺细胞 DNA 均有不同程度的损伤且各检测指标均有显著性差异(P<0.01), 各检测指标与处理浓度表现出良好的剂量效应关系,随着处理浓度递增,各检测指标都呈规律性的增 长趋势。回归分析和相关系数表明:各检测指标与处理浓度具有高度的相关性,多项式回归方程 (P<0.05)和多元回归方程(P<0.005)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醚菊 酯处理浓度和处理时间。

关键词: 日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicas*); 醚菊酯; DNA 损伤; 彗星实验 中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)11-0029-06 doi: 10.11759/hykx20131122002

彗星实验又称单细胞凝胶电泳(Single Cell Eletrophoresis, SCGE), 最早由 Ostling 等^[1]于 1984 年提 出,根据电泳后 DNA 的拖尾长度定量检测真核细胞 中的 DNA 损伤程度。后经其他学者不断改进、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^[2-4]。 目前, SCGE 主要应用于哺乳动物淋巴细胞 DNA 损 伤等研究领域^[5-7],在水生生物细胞损伤的研究方面 报道较少、现有研究可见 SCGE 检测真鲷(Pagrosomus major)血细胞 DNA 损伤及扇贝血淋巴细胞 DNA 损伤等报道^[8-9]。醚菊酯作为常用的醚类农药, 兼具了拟除虫菊酯类农药的优点,是20世纪70年代 迅速发展起来的新型农药、具有高效、低毒、低残留 等环境安全性的优点^[10]。近年来、由于菊酯类农药的 广泛应用和人类活动的不断增加、其代谢产物在食 品和水环境中的影响日益严重。醚菊酯在环境和生 物样品中的残留及分布表现为明显的接触性特点。 这与拟除虫菊酯类农药的残留特点相似。其对养殖 生物遗传物质的基因毒性进一步引起人们的担忧。 但是,有关醚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[11-12]、国内外 关于醚菊酯基因毒性的研究报道较少。

日本囊对虾是中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, 醚菊酯是否对日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicas*) 肝胰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。作者通过彗星实验技术研究醚菊 酯对日本囊对虾肝胰腺细胞 DNA 的损伤特征,探讨 了醚菊酯对日本囊对虾的遗传毒性机制,为中国沿 海水产养殖环境的污染监测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

醚菊酯为广州植物龙生物技术有限公司产品; 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、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄ 等常规

收稿日期: 2013-11-22; 修回日期: 2014-06-05

基金项目: 国家海洋局海洋公益性行业科研专项(201005012)

作者简介:刘波(1980-),男,湖南邵阳人,助理研究员,硕士,主要 从事海洋渔业生态与遗传育种研究.电话: 13666099731, E-mail: liubo8090@aliyun.com

药品均为国产分析纯试剂,上海生物工程有限公司 产品。

实验用玻片为美国 Cell Biolabs 公司产品, 超净 工作台为苏州智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

实验用日本囊对虾购自福建省水产研究所大径 中试基地附近的农贸市场,平均体长(11.36±0.93)cm, 平均体质量(10.72±2.70)g。在水泥池中暂养一周,每 天定时定量投喂对虾配合饲料,挑选健康无病、附肢 齐全无外伤且规格统一的对虾作为实验用虾。

1.3 处理方法

急性毒性实验表明、日本囊对虾的死亡率与醚 菊酯的浓度显著性正相关(P<0.01),具有明显的浓度-效应和时间-效应关系、醚菊酯对日本囊对虾 24、48 和 96 h 半致死浓度(LC₅₀)分别为 1.88×10⁻³、1.30×10⁻³ 和 0.76×10⁻³ mg/L。根据 LC₅₀ 值和特伦堡(Tumbel) 安全浓度计算公式(SC=48 h LC₅₀×0.3/(24h LC₅₀÷ $48h \ LC_{50}^2$),综合考虑近海海水中醚菊酯低浓度水 平因素、设定亚急性毒性实验的处理浓度、将日本 囊对虾分为6组进行不同剂量的处理,设置1个空白 对照组,5个实验处理组(1.5×10⁻⁵, 0.3×10⁻⁴, 0.9×10⁻⁴, 1.8×10⁻⁴, 3.6×10⁻⁴ mg/L), 每组 30 尾日本囊对虾。在 1 m² 的水泥池内用沙滤海水微充气正常培育, 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)℃、盐度(30.00±0.02)。每日更换实 验用水,重新设置醚菊酯的相应处理浓度,保证实 验期间处理浓度一致。各实验处理组在持续处理 25 d 后随机采集3尾日本囊对虾,放入冰盒备用。

1.4 细胞悬液制备

剪取各实验处理组日本囊对虾肝胰腺组织 0.2~0.5 g至1.5 mL灭菌离心管内,各实验处理组设 置为3组平行,加入4℃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,3000 r/min 离心2 min 后弃上清,用4℃预冷的0.01 mol/L PBS 缓冲液重悬细胞,调节细胞浓度为 1×10⁵ 个/mL,镜 检观察细胞活性后待用。

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^[13]。

1.5.1 制片

将彗星分析试剂盒的低熔点琼脂糖凝胶在 90~95℃水浴锅内加热溶解20min,再转入37℃水浴 锅冷却20min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75µL混合液均匀涂抹于彗 星分析玻片上,将玻片置于4℃冰箱避光固化15min。

1.5.2 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, pH10.0)中, 置于 4℃冰箱避光裂解 30~ 60 min。裂解完毕后用蒸馏水小心的冲洗玻片,将清洗 后的玻片放入预冷的碱性液(0.3 mol/L NaOH, 1 m mol/L EDTA, pH>13)中, 置于 4℃冰箱避光解旋 30 min。

1.5.3 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/cm,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。将玻片取出完全空干,每个处理滴加 100 uL 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 验处理组 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、尾距和 Olive 距等 参数评价日本囊对虾 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%、尾距=尾 长×彗尾 DNA 相对含量×100%、Olive 距=头尾部中 心间距×彗尾 DNA 相对含量×100%。应用 Excel 软件 及 SPSS16.0 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 醚菊酯处理对日本囊对虾肝胰腺细胞 DNA 的影响

醚菊酯对日本囊对虾 24h 和 48h 半致死浓度

(LC₅₀)分别为 1.88×10^{-3} mg/L 和 1.30×10^{-3} mg/L, 根 据 LC₅₀ 值和特伦堡(Tumbel)安全浓度计算公式 (SC=48 h LC₅₀ × $0.3/(24h \text{ LC}_{50} \div 48h \text{ LC}_{50})^2$)计算得出 其安全浓度为 0.19×10^{-3} mg/L。在此基础上对各实验 组进行处理,各实验组经荧光染料染色后在荧光显 微镜下观察,随机采集 180 个细胞进行统计分析,空 白对照组的肝胰腺细胞 DNA 结构紧密,染色后呈圆 形荧光团,无拖尾现象;各实验处理组损伤细胞 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。随着处理浓度的增加,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 为醚菊酯不同处理浓度对日本囊对虾肝胰腺细

胞 DNA 损伤的单细胞凝胶电泳彗星图像。表 1 是醚 菊酯不同处理浓度对日本囊对虾肝胰腺细胞 DNA 损 伤的彗星实验统计分析结果,该实验结果表明,不 同实验处理组的拖尾率、彗星尾长、彗尾 DNA 相对 含量、尾距和 Olive 距与空白对照组之间的差异具有 统计学意义(P<0.01),差异极显著。实验数据显示对 照组受损细胞极少,拖尾率仅为 5.06%±0.87%,彗尾 DNA 相对含量、尾距和 Olive 距都接近 0,细胞没有 发生 DNA 断裂形成彗星图像; $1.5 \times 10^{-5} \sim 3.6 \times 10^{-4}$ mg/L 醚菊酯处理 25 d 后各指标值相应增加,且当处理剂 量为 3.6×10^{-4} mg/L 时,各指标值迅速显著增加,说 明日本囊对虾肝胰腺细胞对醚菊酯毒性存在较为敏 感的阈值范围。



图 1 醚菊酯不同处理浓度对日本囊对虾肝胰腺细胞 DNA 损伤的彗星图像

Fig.1 The comet assay images of DNA damage in hepatopancreas cells of *Marsupenaeus japonicas* exposed to different concentrations of ethofenprox

1-1.空白对照组; 1-2.处理浓度 1.5×10⁻⁵ mg/L 组;1-3.处理浓度 0.3×10⁻⁴ mg/L 组; 1-4.处理浓度 0.9×10⁻⁴ mg/L 组;1-5.处理浓度 1.8×10⁻⁴ mg/L 组; 1-6.处理浓度 3.6×10⁻⁴ mg/L 组

1-1. control group; 1-2. 1.5×10^{-5} mg/L exposure concentration; 1-3. 0.3×10^{-4} mg/L exposure concentration; 1-4. 0.9×10^{-4} mg/L exposure concentration; 1-5. 1.8×10^{-4} mg/L exposure concentration; 1-6. 3.6×10^{-4} mg/L exposure concentration

表 1 醚菊酯不同处理浓度对日本囊对虾肝胰腺细胞 DNA 损伤的彗星实验指标数据

Tab.1 The parameters of DNA damage in hepatopancreas cells of Marsupenaeus japonicas exposed to different concentrations of ethofenprox using comet assay method

处理浓度	拖尾率	彗星尾长	彗尾 DNA 相对	尾距	Olive 距
(mg/L)	(%)	(µm)	含量(%)	(% × µm)	$(\% \times \mu m)$
0	5.06 ± 0.87	$3.92{\pm}0.76$	< 0.001	< 0.001	< 0.001
1.5×10^{-5}	24.39±2.39*	13.10±2.02 *	1.34±0.48 *	0.19±0.07 *	0.16±0.09 *
0.3×10^{-4}	27.28±3.51 *	16.19±2.13 *	2.72±0.71 *	0.48±0.16 *	0.41±0.13 *
0.9×10^{-4}	33.13±4.07 *	22.29±2.97 *	4.22±0.93 *	0.94±0.29 *	0.91±0.27 *
1.8×10^{-4}	41.17±4.43 *	29.34±5.81 *	9.67±1.18 *	2.97±0.38 *	2.12±0.36 *
3.6×10^{-4}	77.16±8.62 * *	42.64±8.46 * *	26.24±2.47 * *	12.63±2.13 * *	10.16±2.28 * *

注: *. 与空白对照组相比(P<0.01); **. 3.6×10⁻⁴ mg/L 实验处理组与其他实验处理组相比(P<0.01)

2.2 日本囊对虾肝胰腺细胞 DNA 损伤各项 实验指标与醚菊酯处理浓度的回归分析

表 1 的实验结果表明, 各实验指标数据随着处 理浓度的变化显著增加, 呈现一定的剂量效应关系, 各实验指标与处理浓度之间存在较好的相关性。经 彗星分析软件 Comet Score 1.5 得到的各项实验指标 与醚菊酯处理浓度进行线性、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 >0.99)最高, 各项实验指标的回归方程如表 2 所示。醚菊酯处理 浓度与彗星尾长、Olive 距、彗尾 DNA 相对含量和 拖尾率等参数的多元回归方程为 Y=-0.256 + 0.122 X_1 + 0.11 X_2 - 0.0255 X_3 - 0.044 X_4 (P<0.005),其中 Y表示醚 菊酯处理浓度, X_1 表示彗星尾长, X_2 表示 Olive 距, X_3 表示彗尾 DNA 相对含量, X_4 表示拖尾率,回归方程 相关极显著。

表 2 醚菊酯不同处理浓度对日本囊对虾肝胰腺细胞 DNA 损伤各实验指标的回归方程

Tab.2The regression equation of parameters of DNA damage in hepatopancreas cells of Marsupenaeus japonicas exposed to different concentrations of ethofenprox

实验指标	回归方程	相关系数	P 值	
拖尾率	$y = 32.148x^3 - 87.757x^2 + 82.546x + 6.0212$	0.9373	< 0.05	
彗星尾长	$y = 9.4359x^3 - 27.362x^2 + 36.151x + 4.4188$	0.9855	< 0.05	
彗尾 DNA 含量	$y = 7.8424x^3 - 14.512x^2 + 10.837x - 0.1845$	0.9035	< 0.05	
尾距	$y = 4.8021x^3 - 8.7336x^2 + 4.6217x - 0.1844$	0.8411	< 0.05	
Olive 距	$y = 4.194x^3 - 8.0407x^2 + 4.4338x - 0.1998$	0.8333	< 0.05	

注: y 为各实验指标, x 为醚菊酯处理浓度

3 讨论与结论

醚菊酯作为一种广泛使用的菊酯类农药、通过 作用神经轴突、抑制相应神经功能发挥灭杀作用^[14]、 菊酯类农药在遗传物质基因毒性的作用机制方面研 究还不多、有研究报道表明、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[15-17]。作者选用拖尾率、彗星 尾长、彗尾 DNA 相对含量、尾距和 Olive 距等国内 外各彗星图像分析软件使用的标准指标、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。实验结果表明、实验选择的处理时间 和浓度在彗星实验检测阈值范围内^[18]、随着处理浓 度的增加、肝胰腺细胞 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、说明上述检测指标在 本实验条件下能较客观地反映 DNA 损伤程度、具有 良好的代表性。这与 Hellman 等^[19]的报道一致:在一 定的阈值范围内、彗星尾长、彗尾 DNA 相对含量、 尾距和 Olive 距等指标的分析结果比较可信。各检测 指标数据表明、醚菊酯对日本囊对虾肝胰腺细胞 DNA 作用较为敏感,处理浓度在较低水平 1.5×10⁻⁵ mg/L 时,实验处理组与空白对照组相比各检测指标就表 现出显著性差异(P<0.01),而当处理浓度达到 3.6× 10⁻⁴ mg/L,超过安全浓度 1.9×10⁻⁴ mg/L(根据特伦堡 Tumbel 安全浓度公式计算得出)时,DNA 损伤显著加 剧,该实验处理组与其他各实验处理组相比各检测 指标都表现出显著性差异(P<0.01),说明日本囊对 虾肝胰腺细胞对醚菊酯毒性存在高速反应的阈值 范围。

由于人类农业生产活动的广泛开展、其长期持 续用药导致近海海域生态环境低浓度长时间污染, 造成养殖生物鱼、虾、贝的长期暴露、因此、为了全 面评价醚菊酯在近海海域生态环境中的影响因子, 作者对实验各检测指标进行回归分析和相关分析, 数据分析表明各检测指标与处理浓度之间存在高度 的相关性, 且各指标的相关系数均有统计学意义, 表现出显著性差异(P<0.05),几何参数彗星尾长是较 为直接的可靠指标, 而尾距和 Olive 距则更能全面地 反映处理浓度对肝胰腺组织细胞 DNA 的损伤程度。 在处理浓度与彗星尾长、尾距、Olive 距、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,处理浓度对尾距和 Olive 距的影响作用类似,但 Olive 距的回归方程显著性更高(P<0.005)、尾距表现 为排除的变量。多元回归方程表明、对于日本囊对虾 肝胰腺组织而言、最好的检测参数是彗星尾长和 Olive 距, 即产生影响最显著的因素。本实验在对各 指标分别建立一元回归方程的基础上,又通过 SPSS 软件进行聚类和判定分析,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,并拟通过多元回归方程有 效地推断醚菊酯处理浓度和处理时间,为评估菊酯 类农药等污染物对近海海域生态环境的影响奠定基础。

DNA 损伤可以导致各种类型的突变,包括潜在 长期的致癌效应和致畸效应等^[20],作者以日本囊对 虾肝胰腺细胞为研究对象,采用标准的彗星实验分 析方法对醚菊酯的遗传毒性进行检测、证明醚菊酯 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、这种潜在长期 的危害会严重影响近海海域水生生物种质资源、造 成种质衰退、种群数量减少等问题。我们认为, 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, 这与其他文献的 观点一致^[21]。研究发现、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:

- 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] 姜树林,孙殿军,赵新华,等.用微量全血彗星试验 观察砷中毒病区人群 DNA 损伤[J].中国地方病学杂

志, 2004, 23(1): 22-24.

- [6] 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[J].中国法医 学杂志,2007,22(3):23-26.
- [7] 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[J].白求恩医科大学学报,1999, 25(5):564-567.
- [8] 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[J].
 农业环境科学学报,2006,25(6):1446-1449.
- [9] 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[J].中国 海洋大学学报,2006,36(增刊): 39-42.
- [10] 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[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(8):
 705-707.
- [11] 吴建平,卢春,王英,等. 拟除虫菊酯对大鼠中枢谷 氨酸和 γ-氨基丁酸递质影响的免疫组织化学研究[J].
 南京医科大学学报, 1999, 19(6): 450-453.
- [12] 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[J]. 中华劳动卫生职业病 杂志, 2001, 19(4): 274-277.
- [13] 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.
- [14] 白玫. 醚菊酯的毒性、作用机制及代谢[J]. 农药, 1989, 28(4): 37.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.

- [18] 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[J].云南民族大学 学报,2010,19(6):400-403.
- [19] 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.

- [20] 宋文华, 裴亚托, 刘强, 等. 单细胞凝胶电泳检测除 虫脲光解产物对小鼠肝脏 DNA 损伤研究[J]. 农业环 境科学学报, 2007, 26(4): 1482-1486.
- [21] 夏世钧,吴中亮.分子毒理学基础[M].武汉:湖北 科学技术出版社,2001.

The research on DNA damage in hepatopancreas cells of *Marsupenaeus japonicas* exposed to ethofenprox

LIU Bo, CHEN Yu-feng, ZHENG Hui-dong, XU Yi-bin, ZHENG Sheng-hua, ZHONG Shuo-liang

(Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China)

Received: Nov., 22, 2013 Key words: *Marsupenaeus japonicas*; ethofenprox; DNA damage; comet assay

Abstract: In order to analyze the genotoxicity of *Marsupenaeus japonicas* caused by the pollutant of pyrethroid pesticides in the coastal sea of China, here, we applied ethofenprox in toxicological experiment on *M. japonicas* for the first time. In our study, *M. japonicas* were divided into six groups and exposed to different concentrations of ethofenprox for 25 days. DNA damage in hepatopancreas cells of *M. japonicas* was evaluated with comet assay. 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 parameters after comparing with SPSS 16.0 and constructed the multiple- dimensional regression equation. The results show that DNA damage in hepatopancreas cells was observed in all exposed groups and the parameters of each exposed group were significantly different from the control group (P<0.01). There was a dose-effect relationship between ethofenprox and DNA damage in hepatopancreas cells, which increased regularly with the exposure concentrations. The regression analysis and coefficient indicated that all DNA damage parameters were highly relevant to the exposed concentrations. The one-dimensional regression equation (P<0.05) and multiple-dimensional regression equation (P<0.05) had significant statistic meaning, which might be an effective way to estimate the exposed concentration and time of ethofenprox.

(本文编辑:谭雪静)