

## 랫드에 미치는 Permethrin의 발생독성에 관한 연구

윤효정 · 정문호<sup>†</sup>

서울대학교 보건대학원 환경보건학과

## Effect of Permethrin on Embryonic Developments in Rats

Hyojung Yoon · Moonho Chung<sup>†</sup>

Department of Environmental Public Health, School of Public Health,

Seoul National University, Seoul 110-744, Korea

(Received June 3, 2005; Accepted July 15, 2005)

### ABSTRACT

Permethrin, a synthetic pyrethroid insecticide, has been widely used to protect domestic animals and the public health, as well as in agriculture against a variety of pests, which provides potential for environmental exposure. Permethrin is classified as possible human carcinogen and endocrine disrupting chemical by many international authorities. However, its developmental effects have been rarely studied. This study investigated the effects of permethrin during embryogenesis. Developmental toxicity of permethrin was evaluated using short-term *in vitro* battery system. Gestation day 9.5 rat embryos (organogenesis) were cultured with permethrin (0.1, 0.4 and 0.8 mg/ml) for 48 hours using whole embryo culture system. All the treatments exhibited significant decreases in the total morphological score. Permethrin induced significant growth retardation and the developmental abnormality at doses of 0.4 and 0.8 mg/ml. Moreover, the DNA and protein contents of embryos decreased in dose-dependent manner. These observations suggest that permethrin contributes to toxicity on embryonic developments in rats.

**Keywords:** permethrin, rat, organogenesis, developmental toxicity, whole embryo culture

### I. 서 론

Pyrethroid계 살충제는 유기인계와 유기염소계 등 기존의 살충제에 비하여 살충효과는 크고 포유동물에게는 독성이 적어 전 세계적으로 그 사용이 증가추세에 있어 환경은 물론, 인간에게도 노출 가능성이 증가하고 있다.<sup>1)</sup> 그 중 permethrin은 대표적인 type I의 pyrethroid계 살충제로 다른 pyrethroid계 화합물과 비해 자외선에도 매우 안정하고 특히, 바퀴벌레와 머릿니에게서 높은 내성을 보이게 되었다.<sup>2)</sup> Permethrin은 물고기와 양서류에 상대적으로 높은 독성을 가지고 있으며,<sup>3,4)</sup> 포유류에서는 즉시 가수분해되기 때문에 급성 독성은 없다.<sup>5)</sup> 그러나 일시적인 피부, 눈, 호흡기관의 염증과 알러지 반응에 대한 많은 보고가 있다.<sup>6)</sup> 마우스에게서 폐암과 간암을 유발하였다는 연구 결과에 근

거하여 미국 Environmental Protection Agency(U.S. EPA)는 permethrin을 발암성 물질(possible human carcinogen)로 분류하고 있고<sup>6)</sup> 일본노동후생성과 세계생태보전기금(World Wildlife Fund)에서 내분비계장애 물질로 분류되어져 있다. 내분비계 장애물질로 알려진 물질의 대부분은 산업용, 농업용 화학물질이 차지하고 있으며,<sup>7)</sup> 최근의 연구결과에서도 고농도의 농약을 사용하는 사람들에게 불임, 수정능력 저하, 태아의 사망, 선천적 기형 등과 같은 위험성이 증가하고 있다.<sup>8-11)</sup>

Chen 등이 permethrin의 에스트로겐 활성을 검색한 결과, 사람유방암세포주인 MCF-7 세포의 증식을 유도하였으며 [<sup>3</sup>H]estradiol의 에스트로겐 수용체에 대한 결합을 감소시켰다.<sup>12)</sup> 또한 [<sup>3</sup>H]methyltrienolone의 fibroblast 안드로젠성 수용체의 결합을 저해하고<sup>13)</sup> 마우스의 만성 노출시 고환의 무게를 감소시켰다.<sup>14)</sup> 이와 같이 세포 및 분자생물학적 수준에서 permethrin의 내분비계 교란에 관한 연구는 여러 건 보고되었지만, 배아의 주요기관 형성기에 나타날 수 있는 영향에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

<sup>†</sup>Corresponding author : Department of Environmental Public Health, School of Public Health, Seoul National University  
Tel: 82-2-740-8881, Fax: 82-2-3672-1140  
E-mail : chungmh@snu.ac.kr

본 연구는 랫드의 임신 중 주요기관 형성기(organo-genesis)에 permethrin을 노출 시킨 후 permethrin이 배자의 발달 상태 및 각 기관의 발달에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해서 New 등이 1970년대에 소개한 *in vitro* 단기발생독성시험법 중 하나인 전배자 배양법(Whole embryo culture method)을 사용하였다.<sup>15)</sup> 임신 9.5일(headfold stage)된 랫드 자궁으로부터 적출한 배자를 48시간 배양하여 배자발달 정도를 관찰하는데, 이 시기는 외부 화학물질을 대사할 수 있는 alcohol dehydrogenase, acetaldehyde dehydrogenase와 같은 효소를 가지고 있지 않기 때문에 직접적인 화학물질의 영향을 평가할 수 있다는 장점이 있다.<sup>16)</sup> 따라서 이 시험법은 배자의 발생독성(embryotoxic potential) 여부를 규명하는데 유용하게 이용되고 있다.

## II. 재료 및 연구 방법

### 1. 실험재료 및 실험동물

본 실험에 사용된 permethrin(96.6% purity, mixture of *cis* 24.8% and *trans* 71.8%)은 Riedel-de Haën (Germany)에서 구입하였다. Tyrode 용액, dimethylsulfoxide (DMSO) 등은 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 국립독성연구원의 barrier 시설 내에서 사육된 Sprague-Dawley(SD)계 5주령 랫드를 수령하여 순화시켜 사용하였다. 사육온도는 23±2°C, 상대습도 55±5%, 명암은 1일 12시간(오전 6시~오후 6시)씩 교대로 하였다.

### 2. 실험 방법

교배일 오후 4시에서 6시 사이에 암컷과 수컷을 교배시킨 후 다음날 아침 질전(vaginal plug)을 확인하거나 질도말법으로 정자가 확인된 날을 임신 0일로 정하였다. 임신 9.5일(gestation day 9.5; GD 9.5)령의 SD계 랫드를 오후 1시부터 3시 사이에 경추탈구시켜 도살한 다음 자궁을 적출하여 멸균된 tyrode 용액이 담긴 petri dish로 옮겼다. 자궁체로부터 수태산물을 제거한 다음 forceps를 이용하여 자궁벽을 절개하여 배자가 들어있는 탈락막(decidua)을 분리시켰다. 입체현미경하에서 탈락막을 조심스럽게 제거하여 배자(embryo)를 분리하고 배자의 Reichert's membrane을 미세한 Watchmaker's forceps를 사용하여 조심스럽게 제거하였다. 적출된 배자를 배양병(방금 원심분리한 혈청) 3 ml이 담겨있는 배양병에 3마리씩 넣어 permethrin은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 최종 농도가 각각 0.1, 0.4, 0.8 mg/ml이 되도록 하고 대조

군(control), 용매대조군(Vehicle control), 처리군으로 하여 전배자 배양시스템(Ikemoto Co. Japan)에서 48시간 동안 배양하였다. 이때 기계의 회전속도는 25 rpm이었으며, 배양기내 온도는 37±0.5°C를 유지하고 가스공급은 혼합제조된 가스((주)동화가스)를 150 ml/min으로 주입하였다. 처음 17시간은 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>의 조성으로 그 후에는 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 75% N<sub>2</sub>에서 7시간 동안 공급하였으며 이후 40% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 55% N<sub>2</sub>에서 24시간 동안 배양하였다. 총 48시간 동안 배양한 후, 대조군, 용매대조군 및 처리군의 배자를 tyrode 용액이 들어있는 petri dish에 스포이드를 사용하여 옮긴 후, 입체현미경하에서 관찰하여 배자의 성장 및 발달 정도를 평가하였다. G. Van Maele-Fabry 등의 배자독성 평가 방법(embryo scoring system)에 따라 각 배자의 성장 및 발달 상태를 scoring 하였다.<sup>17)</sup> 배자를 phosphate buffered saline(PBS) 용액에서 세척한 후, 3마리씩 한 tube에 채취하여 총 단백질량과 총 DNA량을 측정하였다. 단백질량은 BCA protein assay kit(Pierce, USA)를, DNA 함량은 DNAzol(Molecular Research Center, Inc.)을 사용하여 분리한 다음 spectrophotometer를 사용하여 정량하였다.

### 3. 통계학적 분석

본 연구의 결과는 SPSS 10.0 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 통계처리는 일원분산분석(ANOVA) 검정을 실시하여 유의성이 인정된 경우, Tukey 또는 Dunnet의 test를 사용하여 대조군과 각 처리군간의 다중비교를 실시하였다. 통계학적 유의성은 0.05(\*) 또는 0.01(\*\*) 수준에서 평가하였다.

## III. 결과 및 고찰

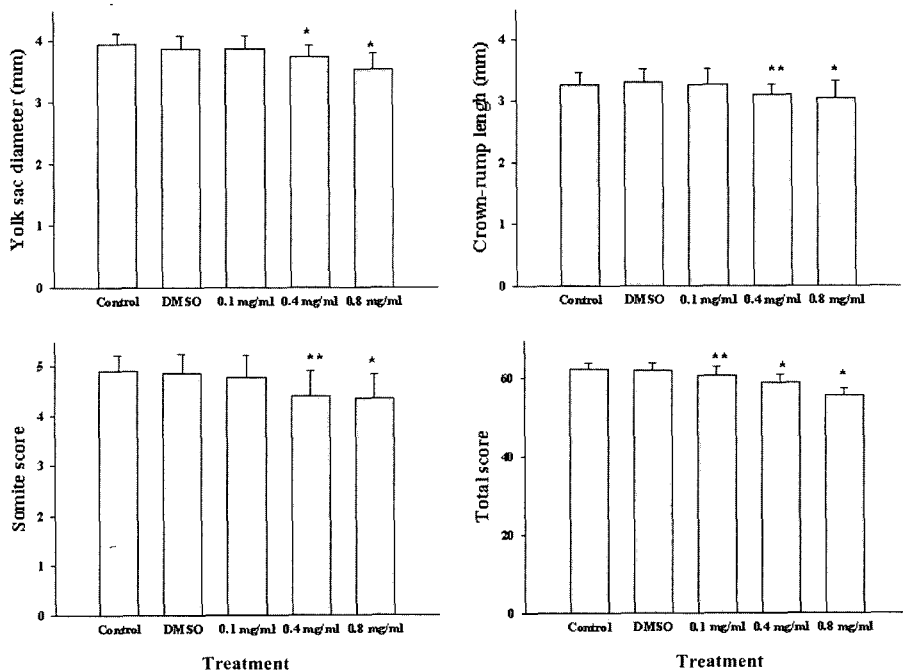
### 1. 배자 성장 및 발생 평가

임신 9.5일 랫드에서 분리한 배자에 permethrin을 DMSO에 녹여 최종 농도가 각각 0.1, 0.4, 0.8 mg/ml이 되도록 처리하고 방금 원심분리한(IC) 혈청에서 48시간 배양 후 배자의 기형정도와 형태학적인 변화를 평가하였다. 기관형성기 동안 permethrin에 의한 배자의 형태학적인 특징의 변화를 Table 1에 나타내었다. Permethrin 0.4~0.8 mg/ml을 첨가한 배지에서 배양한 배자들을 대조군과 비교해 볼 때, 배자의 성장 지연(growth retardation)과 발생 기형(developmental abnormality)의 발생이 유의하게 증가함을 볼 수 있다. 게다가 모든 농도에서 total morphological score가 유의적으로 감소하는 경향이 보이고 있다(Figs. 1, 2).

**Table 1.** Effects of Permethrin on growth and development of GD 9.5 rat embryos exposed *in vitro*

Dose (mg/ml)	Control	DMSO	Permethrin		
			0.1 mg/ml	0.4 mg/ml	0.8 mg/ml
Yolk sac diameter(mm)	3.96±0.16	3.87±0.22	3.88±0.21	3.74±0.19**	3.53±0.26**
Crown-rump length(mm)	3.28±0.17	3.30±0.21	3.27±0.25	3.10±0.17*	3.05±0.28**
Head length(mm)	1.72±0.08	1.71±0.12	1.69±0.13	1.60±0.13**	1.57±0.11**
Yolk sac circulatory system	4.30±0.25	4.28±0.26	4.23±0.38	4.20±0.30	4.18±0.37
Allantois	2.90±0.21	2.85±0.29	2.73±0.38	2.60±0.31**	2.48±0.34**
Flexion	4.95±0.15	4.93±0.18	4.93±0.25	4.85±0.24	4.70±0.34**
Heart	3.88±0.22	3.85±0.24	3.73±0.30	3.70±0.25	3.70±0.34
Caudal neural tube	4.93±0.18	4.90±0.21	4.68±0.34	4.60±0.48*	4.35±0.46**
Hind brain	4.88±0.22	4.83±0.25	4.80±0.25	4.63±0.28*	4.55±0.32**
Mid brain	4.75±0.26	4.73±0.26	4.68±0.29	4.50±0.23*	4.43±0.37**
Fore brain	4.93±0.18	4.95±0.15	4.88±0.22	4.70±0.30*	4.65±0.37**
Otic system	4.68±0.41	4.65±0.29	4.45±0.36	4.43±0.29	4.38±0.36*
Optic system	4.58±0.29	4.60±0.31	4.55±0.22	4.40±0.26	4.30±0.30**
Olfactory system	1.13±0.22	1.10±0.21	1.00±0.23	0.90±0.21**	0.88±0.22**
Branchial bars	3.55±0.22	3.53±0.30	3.53±0.26	3.38±0.28	3.28±0.30**
Maxillary process	2.15±0.24	2.18±0.25	2.03±0.20	1.95±0.22*	1.88±0.28**
Mandibular process	2.58±0.29	2.43±0.29	2.43±0.29	2.28±0.30**	2.20±0.25**
Fore limb	2.15±0.24	2.18±0.25	2.13±0.28	2.15±0.29	2.08±0.34
Hind limb	1.28±0.26	1.25±0.25	1.25±0.26	1.13±0.28	1.05±0.32*
Somites	4.90±0.31	4.85±0.37	4.75±0.44	4.40±0.50*	4.35±0.49**
TOTAL SCORE	62.5±1.34	62.1±1.73	60.7±2.21*	58.8±2.06**	55.5±1.93**

Each value represents mean ± SD (N=20), \*p<0.05, \*\*p<0.01.



**Fig. 1.** Embryonic growth and development in the presence of permethrin. Error bars indicate standard deviations (SDs). \*p<0.05, \*\*p<0.01.

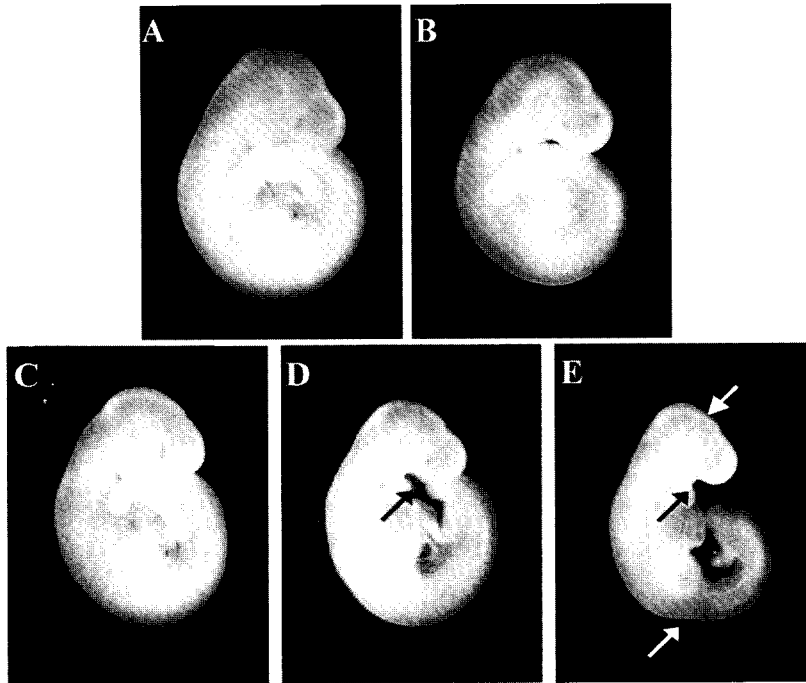


Fig. 2. Morphological appearance of GD 9.5 rat embryos cultured for 48 hr in medium containing permethrin. Lateral view of (A) control embryos showing normal morphology; (B) Vehicle control (DMSO); Embryos treated with (C) 0.1 mg/ml permethrin, (D) 0.4 mg/ml permethrin, and (E) 0.8 mg/ml permethrin.

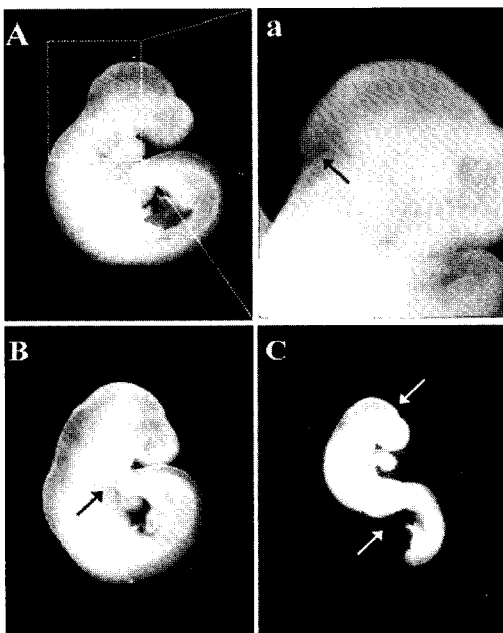


Fig. 3. Severe growth retardation and a variety of malformations including (A, a) non-closure of the anterior neural tube, (B) the posterior neural tube and (C) splayed hindlimb.

Yolk sac diameter, crown-rump length, head length, somite number와 total score는 성장에 관련된 변수들 (parameter)이다. 고농도의 permethrin을 처리한 군에서는 optic system과 뇌의 일부가 발달하지 않은 배자도 일부 관찰되었다. 또한, 배자의 꼬리 부위가 안쪽으로 말리지 않고 바깥으로 벌어지거나 꼬리의 신경관이 완전히 닫히지 않은 상태도 흔히 관찰되었다(Fig. 3). 이는 랫드 배자의 경우 기관형성기(organogenesis)인 9.5 일경에서 10.5일 사이에 neural plate가 닫히는 점에서 permethrin이 신경독성 가능성이 있음을 의미한다.

Permethrin을 비롯한 pyrethroid 계 살충제는 물고기와 양서류에 상대적으로 높은 독성을 가지고 있다.<sup>3,4)</sup> Greulich는 *R. arvalis*의 각각의 발생단계에 cypermethrin을 노출시켰을 때, egg를 둘러싸고 있는 젤리막(jelly coat)이 cypermethrin의 흡수를 방어하지 못하여 부화성공률을 유의적으로 감소시키고 배자의 꼬임, 뒤틀림, 기형 등이 관찰되었다고 보고하였다.<sup>18)</sup> Deltamethrin은 *cyprinus carpio L*의 부화율을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 고농도의 처리군에서 post-implantation의 손상이 관찰되었다.<sup>19)</sup> Esfenvalerate와 permethrin은 송사리(*oryzias latipes*)의 수정, 부화성공률에 영향을 미치고 부레 팽창을 야기하였다.<sup>20,21)</sup> Zebra fish에 deltamethrin

**Table 2.** Effect of Permethrin on protein and DNA contents in the cultured embryos

Treatment	Control	DMSO	Permethrin		
			0.1 mg/ml	0.4 mg/ml	0.8 mg/ml
DNA ( $\mu\text{g}/\text{embryo}$ )	39.40 $\pm$ 1.55	35.38 $\pm$ 7.03	28.00 $\pm$ 6.68*	24.00 $\pm$ 1.46**	21.79 $\pm$ 4.99**
Protein ( $\mu\text{g}/\text{embryo}$ )	138.27 $\pm$ 10.11	122.34 $\pm$ 11.57	116.37 $\pm$ 15.94*	104.19 $\pm$ 16.207**	93.49 $\pm$ 7.442**

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

을 노출시킨 결과, 부화율의 감소와 기형발생이 증가하였다.<sup>22)</sup> 또한 랫드를 이용하여 최기형성시험을 해본 결과, 임신 6일부터 15일(GD 6~15) 동안 deltamethrin에 노출되었을 때 태아의 성장지연과, 폐의 저형성증, 신장비대, 태반 무게의 증가가 관찰되었다.<sup>23)</sup> 말라리아의 매개모기를 퇴치하기 위한 spray의 한 성분인 icon은 임신한 랫드에 자궁내의 착상 수, 태아 사망 등의 영향을 미쳤으나, 기형발생은 없었다고 보고하였다.<sup>24)</sup> 이런 결과를 종합해 볼 때, pyrethroid계 살충제는 다른 농약에 비해 상대적으로 안정하기는 하지만, 임신된 동물에 사용할 때에는 태아의 영향을 고려해야 한다.

## 2. 총 단백질과 DNA량 측정

총 단백질과 DNA 함량은 embryo의 protein과 DNA 생합성의 저해로 발생 지연(growth retardation)을 유도하였는가를 확인하기 위하여 측정한다. Table 2는 대조군과 permethrin을 노출시킨 배자의 단백질과 DNA 양의 변화를 보여준다. Permethrin을 노출시킨 배자의 경우 protein과 DNA level이 농도 의존적으로 감소하고 있는 경향을 보여 주고 있다. 기존의 연구에서도 농약에 노출된 양서류의 DNA와 RNA 양이 유의적으로 감소되었는데, 생리학적인 균형을 맞추기 위해 농약을 무독화시키는데 에너지를 사용하기 때문에 성장과 발생 지연을 야기한 것으로 결론을 내렸다.<sup>25,26)</sup>

## IV. 결 론

Permethrin은 pyrethroid계 살충제로 실내의 해충제거를 위해 전세계적으로 널리 사용되고 있어 인체노출 가능성이 제기되고 있으나 이들 물질에 대한 발생 독성 연구는 매우 미흡한 실정이다. 본 연구는 permethrin이 기관형성기(GD 9.5일)에 노출에 따른 배자의 발달에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. Yolk sac diameter, crown-rump length, somite score, total score는 성장지연(growth retardation)과 관련되어 있는 parameter들로서 0.4 mg/ml과 0.8 mg/ml의 처리군에서 배자의 발달에 손상이 나타나기 시작하였고 모든 처리군에서 total score가 유의적으로 감소하

였다.

2. 고농도의 처리군에서 배자의 꼬리 부위가 바깥으로 벌어지거나 꼬리 신경관이 닫혀있지 않은 배자들도 관찰되었다.

3. Permethrin에 의한 단백질과 DNA 생합성 저해를 알아보기 위해 총 단백질과 DNA 함량을 측정한 결과 모든 처리군에서 농도 의존적으로 감소하고 있음이 관찰되었다.

## 참고문헌

- Garey, J. and Wolff, M. S. : Estrogenic and antiprogesterone activities of pyrethroid insecticides. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **251**, 855-859, 1998.
- World Health Organization (WHO) : Permethrin. Environmental Health Criteria 94. Geneva, Switzerland: World Health Organization, United Nations Environment Programme, and International Labor Organization. p.64, 1990.
- Clark, J. R., Goodman, L., Borthwick, P., Patrick, M. J., Cripe, G. M., Moody, P. M., Moore, J. C. and Lores, E. M. : Toxicity of pyrethroids to marine invertebrates and fish: a literature review and test results with sediment-sorbed chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**, 393-401, 1989.
- Smith, T. M. and Stratton, G. W. : Effects of synthetic pyrethroid insecticides on non-target organisms. *Residue Rev.*, **97**, 93-120, 1986.
- Extension Toxicology Network (ETN) : Permethrin. Pesticide Information Profiles. <http://ace.orst.edu/cgi-bin/mfs/01/pips/permethim.htm>, 1996.
- U.S. EPA : Office of Pesticide Programs list of chemicals evaluated for carcinogenic potential. Memo from W.L. Burnman, HED, to HED branch chiefs. Washington, DC. February 19, 1997.
- 김은주 : 내분비 교란성 DEHP의 항-에스트로젠 활성에 관한 연구. *한국환경위생학회지*, **29**(2), 7-15, 2003.
- Greenlee, A. R., Arbuckle, T. E. and Chyou, P. H. : Risk factors for female infertility in an agricultural region. *Epidemiology*, **14**, 429-436, 2003.
- Tielemans, E., van Kooij, R., te Velde, E. R., Burdorf, A. and Heederik, D. : Pesticide exposure and decreased fertilisation rates *in vitro*. *Lancet*, **354**, 484-485, 1999.
- Saxena, M. C., Siddiqui, M. K., Agarwal, V. and Kuuty, D. : A comparison of organochlorine insecticide contents in specimens of maternal blood, placenta and

- umbilical-cord blood from stillborn and live-born cases. *J. Toxicol. Env. Health*, **11**, 71-79, 1983.
11. Bell, E. M., Hertz-Picciotto, I. and Beaumont, J. J. : A case-control study of pesticides and fetal death due to congenital anomalies. *Epidemiology*, **12**, 148-156, 2001.
  12. Chen, H., Xiao, J., Hu, G., Zhou, J., Xiao, H. and Wang, X. : Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J. Toxicol. Env. Health A*, **65**, 1419-35, 2002.
  13. Eil, C. and Nisula, B. C. : The binding properties of pyrethroids to human skin fibroblast androgen receptors and to sex hormone binding globulin. *J. Steroid Biochem.*, **35**, 409-414, 1990.
  14. U.S. EPA : Office of Pesticide Programs. Health Effects Division. Permethrin. Washington D.C., June 24, 1997.
  15. New, D. A. : Whole-embryo culture and study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.*, **53**, 81-122, 1978.
  16. Carney, E. W., Liberacki, A. B., Bartels, M. J. and Breslin, W. J. : Identification of roximate toxicant for ethylene glycol developmental toxicity using rat whole embryo culture. *Teratology*, **53**, 38-46, 1996.
  17. Maele-Fabry, G. V., Delhaise, F. and Picard, J. J. : Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos. *Toxicol. In vitro*, **4**, 149-156, 1990.
  18. Greulich, K. and Pflugmacher, S. : Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquat. Toxicol.*, **65**, 329-336, 2003.
  19. Koprucu, K. and Aydin, R. : The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Pestic. Biochem. Phys.*, **80**, 47-53, 2004.
  20. Wernera, I., Geista, B. J., Okihiroa, M., Rosenkranza, P. and Hintonc, E. D. : Effects of dietary exposure to the pyrethroid pesticide esfenvalerate on medaka (*Oryzias latipes*). *Mar. Environ. Res.*, **54**, 609-614, 2002.
  21. Gonzalez-Doncel, M., Pena, E., Barrueco, C. and Hinton, D. E. : Stage sensitivity of medaka (*Oryzias latipes*) eggs and embryos to permethrin. *Aquat. Toxicol.*, **62**, 255-268, 2003.
  22. Gorge, G. and Nagel, R. : Toxicity of lindane, atrazine, and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*rachydanio rerio*). *Ecotox. Environ. Safe*, **20**, 246-255, 1990.
  23. Abdel-Khaik, M. M. Hanafy, M. S. and Abdel-Aziz, M. I. : Studies on the teratogenic effect of deltamethrin in rats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, **100**, 142-143, 1993.
  24. Ra tnassoriya, W. D., Ratnayake, S. S. and Jayatunga, Y. N. : Effect of icon, a pyrethroid insecticide on early pregnancy of rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, **22**, 523-533, 2003.
  25. Allran, J. W. and Karasov, W. H. : Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from post-hatch through metamorphosis. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, 2850-2855, 2000.
  26. Diana, S. G., Resetarits, W. J., Schaeffer, D. J., Beckmen, K. B. and Beasley, V. R. : Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, 2961-2967, 2000.