대한산업의학회지 제 16 권 제 3 호 (2004년 9월)
Korean J Occup Environ Med, 2004;16(3):236-249

카드뮴이 흰쥐의 태반 기능과 발생에 미치는 영향

인제대학교 산업의학연구소 · 부산백병원 산업의학과 · 대우조선해양(주) 보건관리실[1],
인제대학교 의과대학 예방의학교실[2]

안진홍 · 고광수[1] · 이채관 · 문덕환 · 손병철 · 김대환
이창희 · 김휘동 · 김정원 · 김종은 · 전진호[2] · 이채언

— **Abstract** —

Effects of Cadmium on Placental Function and Reproduction in Rats

Jin-Hong Ahn, Kwang-Soo Ko[1], Chae-Kwan Lee, Deog-Hwan Moon, Byung-Chul Son, Dae-Hwan Kim,
Chang-Hee Lee, Hwi-Dong Kim, Jung-Won Kim, Jong-Eun Kim, Jin-Ho Chun[2], Chae-Un Lee

Institute of Industrial Medicine & Department of Occupational and Environmental Medicine,
Busan Paik Hospital, Inje University · Health Care Office, DaeWoo Shipbuilding Marine Engineering[1]
Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Inje University[2]

Objectives: This study investigated the toxic effects of cadmium on placental function and reproduction in rats. For this study, the mRNA levels of the placental prolactin-growth hormone (PRL-GH) gene family, placental trophoblast cell frequemcy and reproductive data were analyzed.

Methods: Pregnant F344 Fisher rats (200 g±23 g) were intraperitoneally injected with 0, 0.5, and 5.0 mg/kg B.W/day of cadmium (CdCl2) dissolved in saline from days 7-11 or 16-20 of pregnancy, and were sacrificed at days 11 or 20, respectively. The mRNA levels were analyzed by Northern blot hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction. The hormone concentration was analyzed by radioimmunoassay and the frequemcy of the placental trophoblast cells was observed by histochemical study. Reproductive data were surveyed at day 20 of the pregnancy and after the births. Statistical analysis was carried out using the SAS program (version 8.1).

Results: The mRNA levels of the PRL-GH gene family were reduced dose dependently by cadmium. The mRNA levels of Pit-1a and -b isotype genes were also reduced by cadmium. The hormone concentration of PL-Iv and -II was decreased by cadmium. During the second half of pregnancy (days 11-21), a high dose of cadmium exposure significantly reduced the frequency of spongiotrophoblast and trophoblast giant cells that secrete the PRL-GH hormones. In the last stage of pregnancy (day 20), a high dose of cadmium exposure induced the apoptosis of spon-

<접수일: 2004년 5월 27일, 채택일: 2004년 7월 5일>
교신저자: 문 덕 환 (Tel: 051-890-6741) E-mail: iimmdh@inje.ac.kr

* 이 연구는 2003년도 인제대학교 학술연구조성비 지원에 의한 것임.

giotrophoblast cells in the junctional zone of the placenta. Reproductive data such as placental and infant weight, number of live fetuses were decreased, and number of resorptions and dead fetuses, post-implantation loss were increased significantly in the cadmium exposed group compared with the control.

Conclusions: Cadmium disrupts the functions of the placenta and these effects leads to reproductive disorders in rats.

Key Words: Cadmium, Placenta, PRL-GH family gene, Pit-1, Reproduction

서 론

카드뮴은 합금, 안료(도료), 전지 등의 생산 공정에서 다양하게 사용되는 중금속으로서 생체에 흡입되면 체내의 축적 경로를 거쳐 폐, 신장, 생식소 등에서 독성을 나타낸다. 카드뮴은 흰쥐의 정소에서 intestinal tube 세포 및 정원세포, 정모세포에 유독하며(Gazdzik, 1984; Tam과 Liu, 1985), 혈중 테스토스테론의 감소(Laskey와 Phelps, 1991) 및 생식소 성장 장해를 일으킨다(Gazdzik, 1984; Gouveia, 1988). 그리고 저 농도에서도 장기간 노출되면 정소와 전립선 기능장애를 유발하고(Waalkes 등, 1988), 신장과 흉선의 피질에서는 apoptosis와 괴저를 유발한다(Yamada 등, 1981; Tanimoto 등, 1993; Fujimaki 등, 2000). 사람의 경우에도 직업적인 카드뮴 노출 근로자의 경우 신장, 간, 폐, 정소 등에서 기능 장애를 일으킨다(Kaufmann과 Hopker, 1984; Baker 등 2001).

태반은 포유동물의 발생에 특이적인 기관으로서 임신 초기에 형성되어 출산 까지 존재하며 흰쥐의 경우 크게 두 부위, 즉 이음구역(junctional zone)과 미로구역(labyrinth zone)으로 나누어진다. 주요 구성 세포 종은 글리코겐, syncytial, spongiotrophoblast(이하 ST), trophoblast giant(이하 TG) 세포 등 4종으로 구분된다. 임신기간 동안 흰쥐 태반의 ST와 TG세포에서는 placental lactogen(이하 PL)-I, Iv(I variant), II(Duckworth 등, 1986a; Deb 등, 1991a; Robertson 등, 1994)와 prolactin like protein(이하 PLP)-A, B, C, Cr Cv, D(Duckworth 등, 1986b; Croze 등, 1990; Deb 등, 1991b; Dai 등, 1996; Iwatsuki 등, 1996)등의 다양한 단백질성 호르몬들이 분비되며, 임신 초기에는 decidual prolactin-related protein(이하 dPRP)(Roby 등, 1993)이 분비된다. 이 호르몬들은 임신기간 동안 태자와 태반의 성장, 모체와의 생리조절 등 발생에 중요한 역할을 한다. 이 태반 호르몬들은 뇌하수체의 프로락틴 및 성장 호르몬과 유전자 염기 서열, 단백질 구조 및 기능이 유사하기 때문에 공동 조상의 단백질에서 기원한 것으로 알려져 프로락틴-성장호르몬(이하 PRL-GH)군으로 불린다(Niall 등, 1971; Forsyth, 1997). Pit-1 유전자는 뇌하수체에서 처음 발견된 transacting factor로서 (Ingraham 등, 1988; Karin 등, 1990) Pit-1a, b, T의 3 가지 isotype이 존재하며 각각 뇌하수체의 lactotroph 세포의 프로락틴, somatotroph 세포의 성장호르몬, thyrotroph 세포의 갑상선호르몬 자극호르몬(TSH) 등의 유전자 발현을 유도한다(Bodner와 Karin, 1987; Li 등, 1990; Haugen 등, 1993; Ruvkun과 Finney, 1991). Bamberger 등(1995)과 Lee 등(1996)의 연구에 의하면 Pit-1a, b isotype 유전자는 사람과 흰쥐의 태반에서도 발현되며, PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현조절 인자로 작용한다(Lee 등, 1998; 1999).

최근 본 연구진은 흰쥐를 이용한 실험연구를 통하여 6가크롬에 의한 태반기능과 발생장해에 관하여 보고한 바 있으며(이 헌 등, 2004) 이 연구에서는 선행연구와 유사한 연구체계로 카드뮴이 흰쥐의 태반기능과 발생에 미치는 영향을 연구하고자 하였다. 카드뮴은 사람과 흰쥐의 시상하부와 뇌하수체에서 신경 내분비계 신호전달물질과 호르몬 분비를 교란시키며, 특히 프로락틴의 분비를 억제한다고 알려졌다(Lafuente 등, 1997; 1999; 2000a; Esquifino 등, 2001). 그러나 임신기간 동안 뇌하수체와 유사한 호르몬 분비체계를 유지하는 태반에서 카드뮴이

PRL-GH군 호르몬 분비에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 보고 된 바 없다. 임신기간 동안 태반에서의 중금속 대사는 중금속 결합 단백질인 metallothionein (MT)에 의해 조절되는데(Fleet 등, 1990; Solis-Heredia 등, 2000),태반에서 MT가 분비되는 주요 세포가 ST, TG세포 등 PRL-GH군 호르몬을 분비하는 세포들과 일치된다(Goyer 등, 1992). 이러한 연구결과와 태반의 기능과 태자발생에서의 PRL-GH군 호르몬의 역할에 관한 연구결과 등으로 보아 카드뮴이 태반세포의 분화와 PRL-GH군 호르몬 분비에 미치는 영향에 관한 연구는 카드뮴에 의한 흰쥐의 발생장해에 관한 기초 자료를 제공할 수 있을 것이다.

대상 및 방법

1. 실험동물 관리 및 카드뮴 투여

1) 실험 동물관리

실험동물은 15주령의 F344 fisher 흰쥐를 사용하였으며, 조절된 온도(24℃~26℃)와 광조건(명기 14시간, 암기 10시간)에서 사육하였다. 임신된 흰쥐를 얻기 위하여 암컷과 수컷을 합사(1:1)하여 임신을 유도한 후 copulatory plug 또는 자궁내 점액질(vaginal smear)에서 정자가 관찰된 날을 임신 0일로 설정하였다. 실험동물은 인제대학교 동물사육실 운영규칙에 따라 관리하였다.

2) 카드뮴 투여

카드뮴(CdCl2, Sigma)은 생리식염수에 녹인 후 복강주사 하였으며 대조군은 0.5 ml의 생리식염수를 주사하였다. 실험군은 카드뮴이 흰쥐의 발생에 미치는 영향에 관한 연구자료(Liu 등, 2001; Brzoska 등 2003)를 참고하여 대조군, 0.5 mg/kg body weight (BW) 투여군, 5.0 mg/kg BW 투여군으로 구분하여 일부는 임신 7일부터 11일까지, 일부는 임신 16일부터 20일까지 주사하였다.

3) 사육 및 도살일정

카드뮴 농도 분석 및 PL-I 유전자 발현 분석을 위하여 각 실험군 당 3 마리씩의 흰쥐를 임신 11일에 도살하였으며(n=3×3=9), 카드뮴 농도 분석, 태반 호르몬 농도 및 유전자 발현 분석, apoptosis, 조직학적 분석을 위한 슬라이드 제작과 발생학적 자료를 조사하기 위해 각 실험군 당 7 마리씩의 흰쥐를 임신 20일에 도살하였다(n=7×3=21). 그리고 태자의 무게, 임신기간을 조사하기 위해 각 실험군 당 10 마리씩(n=10×3=30) 사용하였다. 적응, 교배 및 임신유도, 카드뮴 투여, 도살일정은 Fig. 1과 같다.

2. 연구 방법

1) 카드뮴 농도 분석

모체의 혈액은 도살 후 즉시 채취하였다. 태반, 태자는 적출 후 생리식염수로 씻고 3M 종이로 수분을 제거한 후 정량하였다. 정량 후 HNO_3/ HCL_4(6:4) 용액과 반응시켜 조직을 분해하여 백색 침전물을 획득하였다. 이 침전물을 적정량의 0.1 N HNO_3 용액에 녹인 후 원자흡광광도계(Automic absorption spectrometer)로 정량하였다.

2) RNA 추출

적출된 시료에 Tri-Reagent (Sigma, 1.0 ml/0.1 g tissue)를 가한 후 homogenizer (Ingenieurburo Co.)를 사용하여 얼음에 시험관을 담은 상태로 약 30초간 마쇄하였다. 마쇄액이 담긴 시험관에 동량의 chloroform을 넣고 실온에서 15분

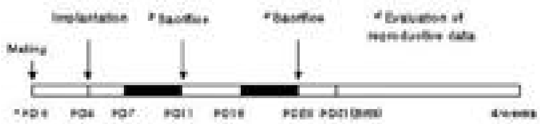

Fig. 1. Schematic representation showing the sequence of experiment. White and black bar indicate the period from mating to 4 weeks after birth. [a]Pregnant day. [b]Analysis of cadmium concentration and northern blot hybridization (PL-I). [c]Analysis of cadmium concentration, Northern blot hybridization (PL-Iv, II, PLP-A, B, C, Cv, D, dPRP), RT-PCR, radioimmunoassay (PL-Iv, II), Histochemical study and survey of reproductive data. [d]Measurement infant body weight. Black areas indicate the period of cadmium injection.

간 방치 후, 4℃, 13,500 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 새 시험관에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 넣고 실온에서 10분간 방치 후, 다시 4℃, 13,500 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상층액을 제거하고 남겨진 침전물을 75% 에탄올로 2회 세척한 후 실온에서 10분 동안 건조하여 diethyl pyrocarbonate 처리된 멸균수에 녹였다. 추출된 total RNA는 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, 280 nm에 대한 260 nm 흡광도의 비율이 1.6~2.0인 것들을 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 및 Northern blot hybridization에 사용하였다.

3) RT-PCR

Pit-1a, b isotype 유전자의 발현을 조사하기 위하여 Pit-1a, b isotype을 동시에 합성할 수 있는 primer를 아래와 같이 제작하였다. Sense primer 5'-tgtagttgccaacctttcacctcgg-3', antisense primer 5'-ccagcagaggttggtgcagg-3'. 정량을 위하여 total RNA의 양(0.1 ㎍, 0.5 ㎍, 1.0 ㎍)과 합성 반복 회수(15회, 20회, 25회, 30회)에 따라 유효 범위(0.5 ㎍, 25 회 합성)를 확인하였다. 추출된 total RNA 0.5 ㎍을 200 unit의 Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase와 37℃에서 1시간 동안 반응시켜 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA를 10 units의 Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus)와 합성된 primer 및 dNTP 등과 혼합한 후 25 회 반응(95℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 1분)시켰다. 증폭된 cDNA 절편들은 fmol PCR sequencing system (Promega)을 이용하여 염기 서열을 분석하였다. 유전자의 발현은 1% agarose gel로 전기 영동한 후 Kodak Digital Camera(Eastman Kodak Co.)와 ID Image Analysis program(Eastman Kodak Co.)을 사용하여 분석하였다.

4) Northern blot hybridization

Total RNA를 1% agarose/2.2 M formaldehyde gel에서 50 V로 3시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후 total RNA를 transfer kit (Trans Vac, Hoefer Co.)를 이용하여 nylon paper (Schleicher & Schull)로 옮긴 후, vacuum oven에서 80℃로 2시간 동안 건조하였다. Total RNA가 부착된 nylon membrane을 hybridization buffer로 60℃에서 2시간 동안 prehybridization한 후 합성된 cDNA probe (1× 109 cpm/ml)를 첨가하여 60℃에서 18시간 동안 hybridization하였다. Hybridization buffer의 조성은 50% deionized formamide, 5X SSC (1XSSC: 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate), 5X Denhardt's solution (1X Denhardt's solution: 0.01% polyvinyl pyrrolidone, 0.01% Ficoll and 0.01% BSA), 0.1% SDS, 2 mg/ml salmon sperm DNA 이다. Hybridization 후 비특이적인 결합을 제거하기 위하여 nylon membrane을 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 55℃에서 3회 세척한 뒤 X-ray film (Kodak XO Mat)으로 1~4일간 감광시켰다. 사용된 probe는 RT-PCR로 합성 후 염기서열을 확인한 각 유전자의 절편을 주형으로 Oligolabelling Kit (Pharmacia Co.)와 [α32P] dCTP (Amersham)를 사용하여 합성하였다. 합성된 cDNA probe를 Nick column (Pharmacia Co.)으로 정제하고, SET buffer (0.1% SDS, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 mM dithiothreitol)로 추출하였다. cDNA probe의 활성은 1× 109 cpm/㎍ 이상으로 하였다. 감광된 필름은 X-ray 필름 자동 현상기(RGII, Fuji Co.)를 사용하여 현상한 후 Kodak Digital Camera와 ID Image Analysis program을 사용하여 분석하였다.

5) 태반, 태자, 모체 혈액의 PL-Iv, II 농도 분석

태반과 태자의 혈액(n=30)은 적출 후 유리섬유가 내장된 시험관으로 원심 분리(1200 rpm, clinical table-top)하여 채취하였다. 호르몬 농도치의 일중 변화를 감안하여 오후 1시로 시료 채취 시간을 고정하였으며, 채취한 혈액에서 혈장을 분리하여 -70℃에 보관하였고, PL-Iv와 PL-II의 농도는 방사성 면역측정법(radioimmunoassay)으로 분석하였다.

6) 조직학적 관찰

임신 20일에 적출된 흰쥐 태반을 15 ml의 perfusion buffer (phosphate- buffered saline, 4% paraformaldehyde)로 4℃에서 2시간 처리한 후 파라핀 용액으로 고형화하였다. 파라핀 블록을 820 Histocut Rotary Microtome을 이용하여 6 μm 두께로 절단한 뒤 Digital Tissue Float을 이용하여 주름을 펴고 Slide warmer 위에서 유리 슬라이드에 부착시켰다. 탈 파라핀 과정에는 Coplin jar를 이용하였으며 핵은 methylene blue로 염색하였다. 제작된 조직 슬라이드는 광학현미경으로 관찰 후 사진 촬영하였다.

7) 염색체 (Chromosomal DNA) 추출

적출된 태반 조직에 0.2 ml의 homogenization buffer (0.1 M sodium chloride, 0.01 M EDTA (pH 8.0), 0.3 M Tris-Hcl (pH 8.0), 0.2 M sucrose)를 가하여 피펫으로 현탁시켰다. 균질액에 10% SDS 12.5 ㎕를 가하여 섞어 준 뒤 65 ℃에서 30분간 가열하고, 8 M potassium acetate 35 ㎕를 가한 후 얼음에 방치하였다. 10분간 원심분리(4℃, 14000 rpm)한 후 상층액을 다른 시험관에 옮긴 후 동량의 phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1, V:V:V)을 첨가하여 현탁시키고 원심 분리하여 상층액을 옮긴 후 2.5 Vol.의 100% 에탄올을 가하고 원심 분리하여 침전물을 50 ㎕의 1X TE buffer (10 mM Tris-Hcl, 1 mM EDTA (pH 8.0)에 녹였다. 1 ㎕의 DNase free RNase (500 ㎍/ml)를 첨가하여 37℃에서 60분간 반응 시켰다. 동량의 phenol: chloroform: isoamylalcohol용액으로 시료를 재 추출한 후 상층액에 0.1 Vol.의 3 M sodium acetate와 2.5 Vol.의 냉각된 100% 에탄올을 가하여 -70℃에서 최소 60분 이상 침전시켰다. 4℃, 12,000 rpm으로 45분 간 원심 분리 DNA를 회수하고 70% 에탄올로 세척한 후 건조하여 25 ㎕의 멸균수에 녹였다. UV-spectrophotomer (260 nm)로 흡광도를 측정하여 정량한 후 약 3 ㎍을 2% agarose gel에서 60 V로 90분간 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색 후 Kodak Digital Camera로 사진 촬영하였다.

8) 발생학적 자료(Reproductive data)

태반의 무게, 황체의 수, 착상된 수정란의 수, 흡수 또는 사망한 태자의 수, 생존한 태자의 수, 착상 전·후의 수정란 소실률 등의 자료는 임신 20일에 각 실험군당 7마리씩 제왕절개(cesarean section)하여 조사하였으며, 임신기간은 합사 후 자궁 내 점액질(vaginal smear)에서 정자가 관찰된 날과 출산일을 기준하여 각 실험군 별로 10마리씩 조사하였다. 태자의 무게는 자연분만 한 10마리에 따른 태자에 대하여 출산 직후, 출산 1주 후, 출산 4주 후에 각각 측정하여 대조군과 비교하였다. 발생학적 자료는 조수헌 등(1986)과 Ema 등(2000)의 논문을 참고하여 litter를 단위로 조사하였다.

3. 자료 분석

자료 분석은 SAS 프로그램(version 8.1)을 이용하여 연속자료의 두 군간 비교는 Mann-Whitney (U) test를, 세 군 이상 간 비교는 Kruskall-Wallis test를 시행하였다.

결 과

1. 태반, 태자, 모체 혈액의 카드뮴 농도

노출 상태에 따른 태반과 배아, 모체 혈액의 평균 카드뮴 농도는 임신 11일의 경우 대조군은 0.031 μg/g, 0.001 ㎍/g, 0.021 ㎍/ml, 0.5 mg 투여군은 6.32 ㎍/g, 0.21 ㎍/g, 3.28 ㎍/ml, 5.0 mg 투여군은 24.21 ㎍/g, 0.56 ㎍/g, 18.42 ㎍/ml 으로 조사되어 노출량에 비례하여 유의하게 증가하였다 ($p<0.05$). 임신 20일의 경우에도 임신 11일에 비해 카드뮴 농도는 높았으나 비슷한 경향이었다. 평균 카드뮴 농도는 태반, 모체 혈액, 태자 순이었다 (Table 1).

2. PRL-GH군과 Pit-Ia,b isotype 유전자 발현

PL-I 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 카드뮴 0.5 mg 투여군에서 14%, 5.0 mg 투여군에서는 16%가 감소되었다. PL-Iv 유전자의 발현도 0.5 mg 투여군에서는 8%, 5.0 mg 투여군에서는 18% 감소되었다. PL-II 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 0.5 mg 투여군에서 5%, 5.0 mg 투여군에서 48% 감소되었으며 5 mg 투여군은 통계적으로 유의

하였다(p<0.05)(Fig. 2). PLP-A 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 카드뮴 투여군에서 투여량에 비례하여 0.5 mg 투여군에서는 11%, 5.0 mg 투여군에서는 15% 감소되었다. PLP-B 유전자의 발현은 대조군과 비교하여 0.5 mg 투여군에서 8%, 5.0 mg 투여군에서 47% 감소되었으며 5 mg 투여군의 감소는 통계적으로 유의하였다(p<0.05). PLP-C 유전자의 발현은 0.5 mg 투여군에서 24 %, 5.0 mg 투여군에서 28% 감소하고, PLP-Cv 유전자의 발현은 0.5 mg 투여군에서 18%, 5.0 mg 투여군에서

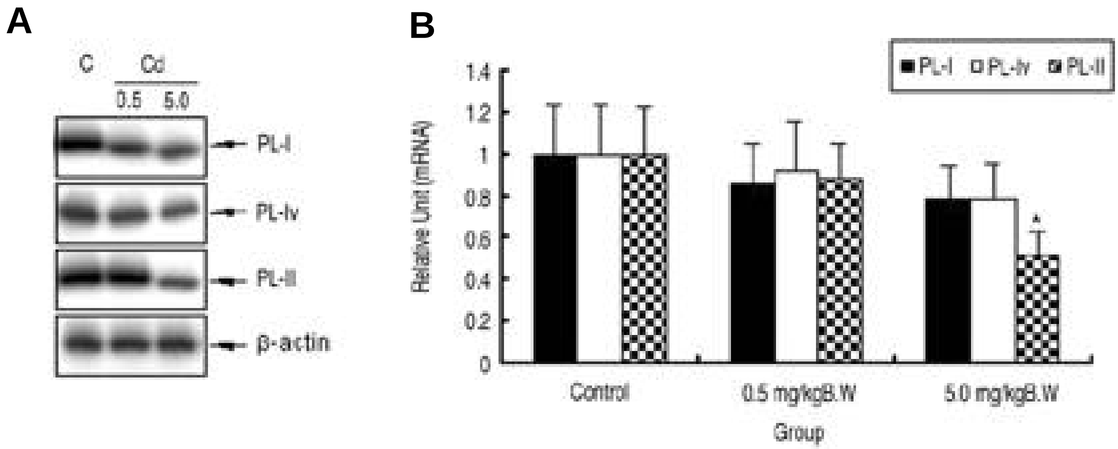

Fig. 2. Effects of cadmium on expression of PL-I, Iv, II genes in the rat placenta. (**A**) Northern blot analysis of PL-I, Iv and PL-II genes. Total RNAs (15 μg) were fractionated on an 1% formaldehyde agarose gel, transferred to nylon paper and hybridized with ^{32}P-labeled PL-I or Iv or II cDNA probe. βactin was hybridized to certified the equal loading of total RNA. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of cadmium injection. C: control. (**B**) Northern signals were quantified by ID Image Analysis program. PL-I, Iv, II signals were normalized by βactin and expressed the relative unit of C value as 1.0. Experiments were repeated three times and individual values were expressed mean ± S.D. Star (*) on the bar indicates the significantly difference (p<0.05) compared with control.

Table 1. Mean cadmium concentration in rat placenta, fetus, maternal blood according to the cadmium exposure status

mean±S.D.

Parameter	Control		0.5 mg/kg BW		5.0 mg/kg BW	
	PD* 11	PD 19	PD 11	PD 19	PD 11	PD 19
Placenta (μg/g)	0.031±0.004	0.033±0.004	†6.32±0.56	†9.75±0.97	†‡24.21±2.86	†‡67.62±8.20
Fetus (μg/g)	0.001±0.001	0.001±0.001	†0.21±0.03	†0.42±0.05	†‡0.56±0.61	†‡0.62±0.07
Maternal blood (μg/ml)	0.021±0.003	0.021±0.003	†3.28±0.46	†6.02±0.62	†‡18.42±2.05	†‡35.25±4.32

* Pregnant day
The values of PD11 and PD20 originated from 3 and 7 pregnant rats in each group.
† and ‡ indicate the significantly difference (p<0.05) compared with control and 5.0 mg exposed groups.
p value was calculated by Mann-Whitney(U) test.

19% 감소하였다. PLP-D 유전자의 발현은 0.5 mg 투여군에서 8%, 5.0 mg 투여군에서 22% 감소하였다. dPRP 유전자의 발현은 0.5 mg 투여군에서 7%, 5.0 mg 투여군에서 53% 감소하였으며 5 mg 투여군의 감소는 통계적으로 유의하였다 (p<0.05)(Fig. 3). PRL-GH군 호르몬 유전자의

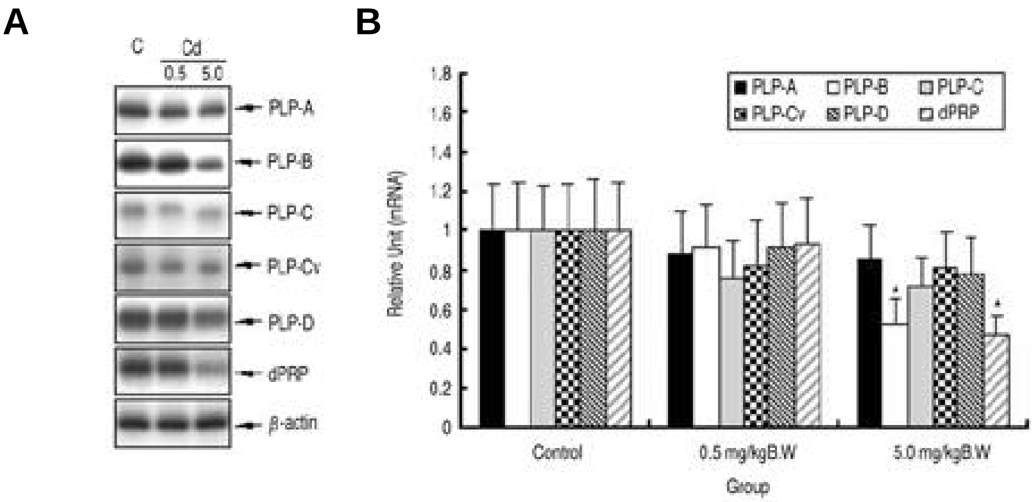

Fig. 3. Effects of cadmium on expression of PLP-A, B, C, Cv, D and dPRP genes in the rat placenta. (**A**) Northern blot analysis of PLP-A, B, C, Cv, D and dPRP genes. Total RNAs (15 ㎍) were fractionated on an 1% formaldehyde agarose gel, transferred to nylon paper and hybridized with ^{32}P-labeled PLP-A or B or C or Cv or D or dPRP probe. βactin was hybridized to certified the equal loading of total RNA. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of cadmium injection. C: control. (**B**) Northern signals were quantified by ID Image Analysis program. PLP-A, B, C, Cv, D, dPRP signals were normalized by βactin and expressed the relative unit of C value as 1.0. Experiments were repeated three times and individual values were expressed mean ± S.D. Stars (*) on the bar indicate the significantly difference (p<0.05) compared with control.

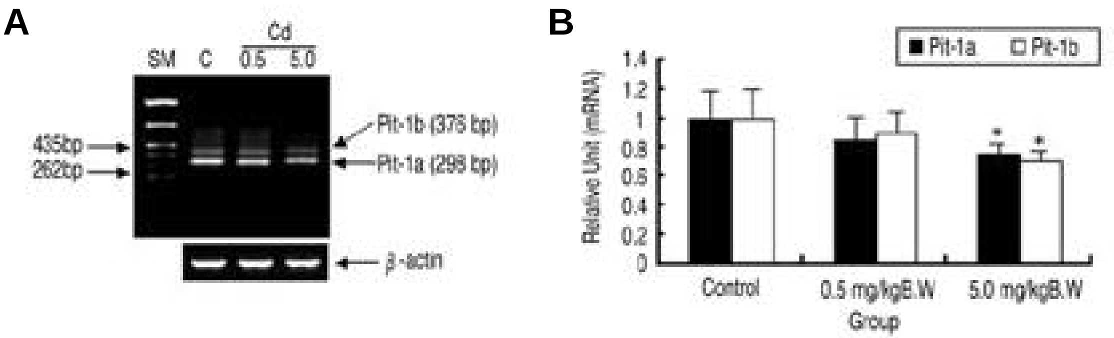

Fig. 4. Effects of cadmium on expression of Pit-1a and b isotype gene in the rat placenta. (**A**) Reverse transcribed and amplified Pit-1a, b cDNAs were fractionated on an 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of cadmium injection. C: control. (**B**) Signals were quantified by ID Image Analysis program. Pit-1a, b signals were normalized by βactin and expressed the relative unit of C value as 1.0. Experiments were repeated three times and individual values are expressed mean ± S.D. Stars (*) on the bar indicate the significantly difference (p<0.05) compared with control.

발현유도인자로 알려진 Pit-1a, b isotype 유전자의 발현은 카드뮴 투여 농도에 비례하여 0.5 mg 투여군에서는 각각 15%와 10%, 그리고 5.0 mg 투여군에서 각각 24%와 30% 감소하였으며 5.0 mg 투여군은 통계적으로 유의하였다($p<0.05$)(Fig. 4).

3. 태반, 배아 및 모체의 혈중 PL-Iv, II 농도

임신 20일에 조사된 카드뮴 노출 상태에 따른 태반의 평균 PL-II 농도는 카드뮴 노출량에 비례하여 유의하게 감소되었으며 5.0 mg 투여군은 통계적으로 유의하였다($p<0.05$). PL-Iv는 5.0 mg 투여군에서 대조군에 비해 감소되었으나 통계적 유의성은 없었다. 태자의 경우 PL-II는 카드뮴 노출량에 비례하여 유의하게 감소되었으며($p<0.05$), PL-Iv도 5.0 mg 투여군에서 통계적 유의하게 감소되었다. 모체 혈액의 경우 PL-II는 태자와 유사하였으나 Pl-Iv는 유의한 변화가 없었다(Table 2).

4. 태반의 조직학적 관찰

카드뮴 0.5 mg 투여군의 흰쥐 태반에서는 특이할 만한 조직학적 변화를 발견할 수 없었으나 5.0 mg 투여군에서는 태반의 구성 세포 종들의 빈도에 변화를 보였다. 이음구역에서 PRL-GH군 호르몬을 분비하는 주요 구성 세포 종인 ST세포의 빈도가 대조군(Fig. 5A)과 비교하여 투여군(Fig. 5B)에서 현저히 감소되었으며, 이음구역과 미로구역에 걸쳐 TG세포의 빈도도 투여군에서 감소되었다. 그리고 부분적으로 apoptosis에 의해 핵막이 소실된 세포들이 관찰 되었다(Fig. 5C).

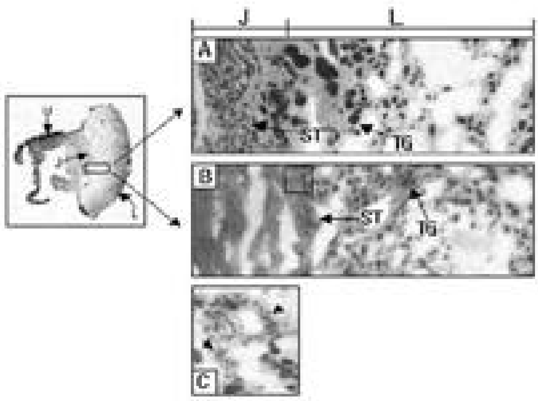

Fig. 5. Effect of cadmium on the histochemical feature of developing rat placenta. Perfused placental tissues with Bouin's fix solution were embedded in paraffin, sectioned at 6 μm and counter-stained with methyl blue. (**A**) Microphotographs (X 400 reproduced at 70%) of control group, (**B**) cadmium 5.0 mg exposed group. (**C**) Apoptotic cells of spongiotrophoblast cell boxed in (**B**) (X 1000 reproduced 95%). J: junctional zone, L: labyrinth zone, U: uterus, ST: nucleus of methyl blue stained spongiotrophoblast cell; TG: nucleus of methyl blue stained trophoblast giant cell.

Table 2. Mean serum PL-Iv and PL-II levels in rat placental, fetal and maternal blood according to the cadmium exposure status

mean±S.D.

Parameter		Control	0.5 mg/kg BW	5.0 mg/kg BW
Placenta (μg/g)	PL-Iv	1358.8±369.4	1385.8±132.8	1198.5±226.2
	PL-II	318.6±49.1	296.2±25.6	*†202.6±27.8
Fetus	PL-Iv	33.9±4.4	29.7±3.4	*27.4±4.3
	PL-II	320.5±28.7	*287.2±25.2	*†208.5±52.3
Maternalblood (μg/ml)	PL-Iv	1103.6±180.3	1024.2±124.8	989.5±82.8
	PL-II	225.8±25.2	*185.4±23.2	*†139.1±17.8

These values originated from 7 pregnant rats in each group.
* and † indicate the significantly difference ($p<0.05$) compared with control and 5.0 mg exposed groups.
p value was calculated by Mann-Whitney (U) test.

5. 카드뮴 투여가 태반 세포의 apoptosis에 미치는 영향

임신 19일된 태반에서 apoptosis를 확인하기 위해 염색체를 추출한 후 DNA 절편 유.무를 관찰한 결과 0.5 mg 투여군에서 20 kb-4.2 kb 크기의 DNA 절편이 관찰되었다. 그리고 5.0 mg 투여군에서는 apoptosis에 의해 유도되는 4.0 kb 이하의 저분자 DNA 절편들이 관찰되었다. 이러한 결과로 보아 카드뮴 투여는 흰쥐 태반 세포의 apoptosis를 유도하였다 (Fig. 6).

6. 발생학적 자료

카드뮴 노출 상태에 따른 태반의 평균 무게는 대조군 0.64 g, 0.5 mg 투여군 0.55 g, 5.0 mg 투여군 0.51 g 으로 조사되어 카드뮴 노출량에 비례하여 통계적으로 유의하게 감소하였다(p<0.05). 출산 직후, 출산 1주 후, 출산 4주 후에 조사된 태자의 평균 체중은 출산 직후에는 노출군에서 노출량에 비례하여 유의하게 감소하였으나(p<0.05) 출산 1주 후, 출산 4주 후에는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다. 황체의 수, 착상된 수정란의 수, 그리고 수정란의 착상 전 소실(pre-implantation loss)은 대조군과 카드뮴 투여군 간에 차이가 없었다. 그러나 착상 후 흡수 또는 사망한 태자의 수(No. of resorptions and dead fetuses)와 이에 따른 착상

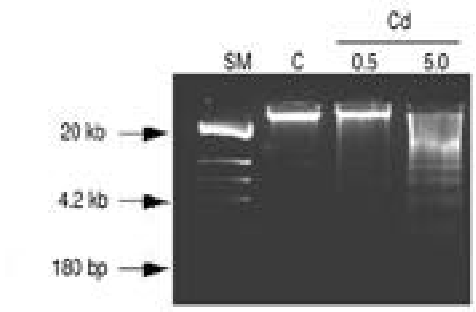

Fig 6. Effect of cadmium on the apoptotic DNA fragmentation in the rat placenta. Electrophoretic analysis showing the fragmentation pattern of genomic DNA isolated from cadmium exposed rat placenta. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of cadmium exposure. C: control, SM: size marker.

Table 3. Reproductive data according to the cadmium exposure status mean±S.D.

Parameter		Control	0.5 mg/kg BW	5.0 mg/kg BW
Placental weight (GD20, g)		0.64±0.07 (n=94)	*0.55±0.10 (n=58)	*0.51±0.11 (n=36)
	Afterbirth (A.B)	3.15±0.34 (n=135)	*2.52±0.43 (n=80)	*2.43±0.42 (n=50)
Infant weight (g)	1 week A.B	8.96±0.73 (n=127)	8.67±0.82 (n=76)	8.45±0.95 (n=44)
	4 weeks A.B	86.31±9.01 (n=112)	86.25±11.21 (n=65)	83.88±11.55 (n=37)
No. corpora lutea		14.42±3.62	14.74±3.70	14.61±3.65
No. of implantations		14.10±3.36	14.21±3.32	14.17±3.34
No. resorptions & dead fetuses		0.69±0.24	*5.97±3.03	*9.05±4.17
No. of live fetuses		13.41±3.31	*8.24±2.62	*†5.12±1.28
Pre-implantiation loss (%)		2.22	3.60	3.01
Post-implantation loss (%)		4.89	*42.01	*†63.86
Pregnancy period(day)		21.05±0.72	21.22±0.93	21.45±1.21

Statistical analysis of reproductive data was carried out by using the litter as a unit except the placental and infant weight.
Pregnancy period originated from 10 litters and other values originated from 7 litters in each group.
* and † indicate the significantly difference (p<0.05) compared with control and 5.0 mg exposed groups.
p value was calculated by Mann-Whitney (U) test.

후 소실(post-implantation loss)은 대조군에 비해 카드뮴 투여군에서 유의하게 증가되었으며($p<0.05$), 생존한 태자의 수는 카드뮴 노출에 비례하여 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 카드뮴 노출 상태에 따른 평균 임신기간은 노출량에 비례하여 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다(Table 3).

고 찰

이 연구에서 카드뮴은 태반과 태자의 무게를 감소시켰고, litter size를 감소시켰는데 이러한 결과는 선행된 연구와도 일치하였다(Eklund 등, 2001). 이 연구에서는 카드뮴 투여에 의한 흰쥐의 발생장해에 관하여 보다 기초적인 원인을 연구하기 위해 카드뮴에 노출된 흰쥐의 태반에서 PRL-GH군 유전자들 발현을 분자생물학적 방법으로 연구하였다. 연구결과에 의하면 카드뮴은 PL-II, PLP-B, dPRP 유전자의 발현을 유의한 수준으로 억제하였으며 기타 유전자들의 발현도 억제하였다. 또한 태자와 태반 그리고 모체의 혈액에서 PL-Iv와 II의 농도도 감소시켰다. 이들 호르몬에 관한 연구에 의하면 PL-II는 프로게스테론 분비를 촉진하며(Forsyth, 1994; Galosy와 Talamantes 1995; Thordarson 등, 1997), 에스트로겐 수용체 α, β 유전자의 발현을 유도(Telleria, 1998)하는 등 스테로이드 호르몬 대사에 관여한다. 그리고 모체의 유선 발생을 유도한다(Galosy와 Talamantes 1995). PLP-B와 dPRP 유전자는 탈락막세포의 분화를 유도하고 태반 형성에 관여한다(Cohick 등, 1997; Orwig 등, 1997). 그 외 PRL-GH군 호르몬들도 태반의 성장 및 모체와의 생리 조절에 관여한다. 이러한 연구 결과들로 보아 카드뮴에 의한 이들 호르몬 유전자의 발현 억제와 이에 따른 호르몬분비 감소는 태반의 형성 및 성장을 저해하고, 스테로이드 호르몬 대사와 모체와의 생리적 조절 등 태반의 고유한 기능을 교란시키는 원인으로 작용할 것이다. 이 연구에서 조사된 발생학적 자료들 중 카드뮴 노출전의 자료들, 즉 황체의 수, 착상된 수정란의 수, 착상전 수정란 소실률 등은 대조군과 실험군간에 차이가 없었다. 그러나 카드뮴 노출 후의 자료들 즉, 태반과 태자의 무게, 흡수 또는 사망한 태자의 수, 착상 후 소실률 등은 대조군에 비해 카드뮴 노출군에서 유의한 변화를 나타내었으며 이것은 카드뮴에 의한 영향으로 판단된다. 그리고 카드뮴에 의한 PL-II, PLP-B, dPRP 등의 PRL-GH군 호르몬 분비 감소가 주요 원인으로 작용하였을 것이다. PLP-B와 dPRP 유전자는 탈락막세포의 분화를 유도하고 태반 형성에 관여 하는데 카드뮴에 의한 이들 호르몬 분비감소는 태반무게의 감소요인으로 작용하였을 것이다. 또한 에스트로겐과 프로게스테론은 임신유지에 결정적인 역할을 하는데(Pashen과 Allen, 1979; Spencer와 Bazer, 2002; Henson, 1998; Albrecht 등, 2000), 카드뮴에 의한 PL-II 분비억제는 스테로이드 호르몬 대사를 교란시켜 흡수 또는 사망한 태아의 수 증가, 착상 후 소실률 증가의 원인으로 작용하였을 것이다. 카드뮴에 의한 스테로이드 호르몬 분비 억제는 콜레스테롤 대사 과정의 LDL 수용체와도 연관되는데, 카드뮴은 태반의 ST세포의 LDL수용체 유전자 발현을 억제함으로서 에스트로겐과 프로게스테론의 합성을 억제한다(Piasek와 Laskey, 1994; Jolibois 등, 1999). 에스트로겐은 Pit-1 유전자의 발현 유도인자이며 태반에서의 Pit-1유전자 발현은 에스트로겐에 의존적이다(Lee 등, 1996). 따라서 카드뮴에 의한 스테로이드 분비억제는 Pit-1과 PRL-GH군 호르몬 유전자로 이어지는 태반에서의 PTL-GH군 호르몬 분비를 교란시킬 것이다.

스테로이드 호르몬 이외에 카드뮴의 독성기작과 관련되어 Pit-1과 PRL-GH군 호르몬 유전자 발현에 영향을 미치는 요인으로 도파민, 멜라토닌(Ingraham 등, 1988; Elsholtz 등, 1991; Lee 등, 1999)등이 알려져 있다. 이 분야는 비교적 많은 연구가 되었는데 카드뮴은 사람과 흰쥐의 시상하부와 뇌하수체에서 도파민과 세로토닌 등의 신경내분비계 신호전달물질들과 호르몬 분비를 교란시키며, 특히 도파민의 분비를 교란시킨다(Elsholtz 등, 1991; Lafuente 등, 1997; Lafuente와 Esquifino, 1999; Lafuente 등, 2000a; 2000b; Esquifino 등, 2001). 태반에서도 다양한 종류의 도파민 수용체들이 존재하고(Kim 등, 1997; Kim 등 2001) 도파민이 흰쥐 태반에서 Pit-1 유전자의 발현을 억제한다는 사실(Lee 등, 1998; 1999)들로 보아 카드뮴에 의한 도파민 등의 신경 내분 비계 물질의 분비교란은 태반의 Pit-1a, b isotype 유전자의 발현을 억제하여 연쇄적으로 태반의 PRL-GH군

유전자 발현에도 영향을 미쳤을 것이다.

카드뮴은 생체의 필수 중금속에 속하지 않으나 임신 동안 태반에서의 카드뮴 대사는 기타 중금속들과 마찬가지로 중금속 결합 단백질인 metallothionein (MT)에 의해 조절된다(Coyle 등, 2001). Lau 등(1998)의 연구에 의하면 임신 중 카드뮴 노출은 태반에서의 MT 유전자 발현을 증가시키고 MT는 카드뮴의 태반 통과를 억제한다(Goyer 등, 1992; Lau 등, 1998). 이러한 연구의 결과는 이 연구의 배아, 태반, 모체 혈액의 카드뮴 농도 분석 결과와도 일치한다. 그리고 태반에서 MT가 발현되는 주요 세포 종이 ST, TG 등 PRL-GH군 유전자를 분비하는 세포들인 사실(Lau 등, 1998)을 감안할 때 MT에 의한 카드뮴 대사는 ST와 TG세포의 카드뮴 축적 및 apoptosis의 원인이 될 수 있다. 이 연구에서도 임신 말기에 카드뮴이 투여된 흰쥐 태반에 대한 조직학적 관찰결과의 ST와 TG세포의 apoptosis를 확인할 수 있었다.

이 연구의 제한점으로는 카드뮴 투여량이 태자, 태반 및 혈액의 카드뮴 농도분석 결과로 보아 사람에 적용하기에는 적합하지 못한 고농도이었다는 점을 들 수 있다. 그러나 이 연구에서 조사한 Pit-1과 PRL-GH군 유전자의 발현, 조직학적 관찰과 apoptosis에 관한 결과들은 카드뮴에 의한 발생장해 기전을 연구하는데 보다 기초적인 자료로 활용될 수 있을 것이다.

요 약

목적: 이 연구는 카드뮴이 흰쥐의 태반 기능과 태자의 발생에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

방법: 실험동물은 15주령의 임신된 F344 Fisher 흰쥐(200±23 g)를 사용하였다. 카드뮴($CdCl_2$)은 생리식염수에 녹인 후 0.5 mg/kg BW와 5.0 mg/kg BW의 농도로 임신 7-11일, 16-20일 동안 복강주사하였다. 대조군은 동일한 조건으로 생리식염수를 주사하였다. 유전자 발현은 Northern blot hybridization과 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법으로 조사하였으며, 호르몬 농도는 방사선면역측정법으로, 태반세포의 빈도는 조직병리학적 소견으로 관찰하였으며, 발생학적 자료는 임신 20일에 제왕절개하여 조사하였다. 자료의 통계적 분석에는 SAS (version 8.1)를 사용하였다.

결과: 카드뮴은 흰쥐태반에서 PRL-GH군 유전자의 발현을 억제하였으며, 이군 유전자들의 전사조절 인자인 Pit-1a, b 유전자의 발현도 억제하였다. 카드뮴은 PRL-GH군의 placental lactogen Iv와 II 호르몬의 농도를 감소시켰다. 고농도 투여군(5.0 mg/kg BW) 태반의 junctional zone에서 PRL-GH군 호르몬을 분비하는 spongiotrophoblast세포의 빈도가 감소되었으며, 부분적인 apoptosis가 관찰되었다. 카드뮴은 태반과 태자의 무게를 감소시켰으며, 수정란의 착상 후 소실을 증가시켜 태자의 수를 감소시켰다.

결론: 임신 중 카드뮴 노출은 태반의 기능을 교란시켜 발생의 장해요인으로 작용한다.

참고문헌

이 헌, 전진호, 문덕환, 이채언, 강성구 등. 6가크롬 폭로가 랫트의 태반기능과 출산에 미치는 영향. 예방의학회지 2004;37:157-65.

조수헌, 최장석, 윤덕로. 일산화탄소중독 수태백서의 자궁내 착상위치가 태자의 발육에 미치는 영향. 예방의학회지 1986;19:123-9.

Albrecht ED, Aberdeen GW, Pepe GJ. The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000 Feb;182(2):432-8.

Baker JR, Satarug S, Reilly PE, Edwards RJ, Ariyoshi N et al. Relationships between non-occupational cadmium exposure and expression of nine cytochrome P450 forms in human liver and kidney cortex samples. Biochem Pharmacol 2001;62:713-21.

Bamberger AM, Bamberger CM, Pu LP, Puy LA, Loh YP et al. Expression of pit-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta. J Clin Endocrinol Metab 1995;80:2021-6.

Brzoska MM, Moniuszko-jakoniuk J, Sawicki B. Liver and kideny function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. Alcohol Alcohol 2003;38:2-10.

Bodner M, Karin M. A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of

nonexpressing cells. Cell 1987;50:267-75.
Cohick CB, Xu L, Soares MJ. Prolactin-like protein-B: heterologous expression and characterization of placental and decidual species. J Endocrinol 1997;152:291-302.
Coyle P, Hubert CA, Philcox JC, Rofe AM. Importance of storage conditions for the stability of zinc- and cadmium-induced metallothionein. Biol Trace Elem Res 2001;81:269-78.
Croze F, Kennedy TG, Schroedter IC, Friesen HG. Expression of rat prolactin-like protein B in deciduoma of pseudopregnant rat and in decidua during early pregnancy. Endocrinology 1990;127:2665-72.
Dai G, Liu B, Szpirer C, Levan G, Kwok SC et al. Prolactin-like protein-C variant: complementary deoxyribonucleic acid, unique six exon gene structure, and trophoblast cell-specific expression. Endocrinology 1996;137:5009-19.
Deb S, Faria TN, Roby KF, Larsen D, Kwok SC et al. Identification and characterization of a new member of the prolactin family, placental lactogen-I variant. J Biol Chem 1991a;266:1605-10.
Deb S, Roby KF, Faria TN, Szpirer C, Levan G et al. Molecular cloning and characterization of prolactin-like protein C complementary deoxyribonucleic acid. J Biol Chem 1991b;266:23027-32.
Duckworth ML, Kirk KL, Friesen HG. Isolation and identification of a cDNA clone of rat placental lactogen II. J Biol Chem 1986a;261:10871-8.
Duckworth ML, Peden LM, Friesen HG. Isolation of a novel prolactin-like cDNA clone from developing rat placenta. J Biol Chem 1986b;261:10879-84.
Eklund G, Grawe KP, Oskarsson A. Bioavailability of cadmium from infant diets in newborn rats. Arch Toxicol 2001;75:522-30.
Elsholtz HP, Lew AM, Albert PR, Sundmark VC. Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. J Biol Chem 1991;266:22919-25.
Ema M, Harazono A. Adverse effects of dibutyltin dichloride on initiation and maintenance of rat pregnancy. Reprod Toxicol 2000;14:451-6.
Esquifino AI, Seara R, Fernandez-Rey E, Lafuente A. Alternate cadmium exposure differentially affects the content of gamma-aminobutyric acid (GABA) and taurine within the hypothalamus, median eminence, striatum and prefrontal cortex of male rats. Arch Toxicol 2001;75:127-33.
Fleet JC, Golemboski KA, Dietert RR, Andrews GK, McCormick CC. Induction of hepatic metallothionein by intraperitoneal metal injection: an associated inflammatory response. Am J Physiol 1990; 258: 926-33.
Forsyth IA. Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. Exp Clin Endocrinol 1994;102:244-51.
Forsyth I. Prolactin, growth hormones, and placental lactogens: an historical perspective. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1997;2:3-6.
Fujimaki H, Ishido M, Nohara K. Induction of apoptosis in mouse thymocytes by cadmium. Toxicol Lett 2000;115:99-105.
Galosy SS, Talamantes F. Luteotropic actions of placental lactogens at midpregnancy in the mouse. Endocrinology 1995;136:3993-4003.
Gazdzik T. Morphological and cytochemical differentiation of the rat testis under physiological conditions and after administration of toxic doses of cadmium chloride. Med Pr 1984;35:169-76.
Gouveia MA. The testes in cadmium intoxication: morphological and vascular aspects. Andrologia 1988;20:225-31.
Goyer RA, Haust MD, Cherian MG. Cellular localization of metallothionein in human term placenta. Placenta 1992;13:349-55.
Haugen BR, Wood WM, Gordon DF, Ridgway EC. A thyrotrope-specific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin beta promoter. J Biol Chem 1993;268:20818-24.
Henson MC. Pregnancy maintenance and the regulation of placental progesterone biosynthesis in the baboon. Hum Reprod Update 1998;4:389-405.
Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE et al. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. Cell 1988;55:519-29.
Iwatsuki K, Shinozaki M, Hattori N, Hirasawa K, Itagaki S et al. Molecular cloning and char-

acterization of a new member of the rat placental prolactin (PRL) family, PRL-like protein D (PLP-D). Endocrinology 1996;137:3849-55.

Jolibois LS Jr, Shi W, George WJ, Henson MC, Anderson MB. Cadmium accumulation and effects on progesterone release by cultured human trophoblast cells. Reprod Toxicol 1999;13:215-21.

Karin M, Theill L, Castrillo JL, McCormick A, Brady H. Tissue-specific expression of the growth hormone gene and its control by growth hormone factor-1. Recent Prog Horm Res 1990;46:43-57.

Kaufmann I, Hopker WW, Deutsch-Diescher OG, Seitz HK, Gotz R et al. Liver damage caused by chronic cadmium poisoning. Leber Magen Darm 1984;14:103-6.

Kim HJ, Koh PO, Kang SS, Paik WY, Choi WS. The localization of dopamine D2 receptor mRNA in the human placenta and the anti-angiogenic effect of apomorphine in the chorioallantoic membrane. Life Sci 2001;68:1031-40.

Kim MO, Kim JH, Choi WS, Lee BH, Cho GJ et al. Colocalization of dopamine D1 and D2 receptor mRNAs in rat placenta. Mol Cells 1997; 7:710-4.

Lafuente A, Blanco A, Marquez N, Alvarez-Demanuel E, Esquifino AI. Effects of acute and subchronic cadmium administration on pituitary hormone secretion in rat. Rev Esp Fisiol 1997;53:265-9.

Lafuente A, Esquifino AI. Cadmium effects on hypothalamic activity and pituitary hormone secretion in the male. Toxicol Lett 1999;110:209-18.

Lafuente A, Marquez N, Pazo D, Esquifino AI. Effects of subchronic alternating cadmium exposure on dopamine turnover and plasma levels of prolactin, GH and ACTH. Biometals 2000a; 13:47-55.

Lafuente A, Marquez N, Perez-Lorenzo M, Pazo D, Esquifino AI. Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic-pituitary- testicular axis function in the rat. Food Chem Toxicol 2000b;38:913-23.

Laskey JW, Phelps PV. Effect of cadmium and other metal cations on in vitro Leydig cell testosterone production. Toxicol Appl Pharmacol 1991;108:296-306.

Lau JC, Joseph MG, Cherian MG. Role of placental metallothionein in maternal to fetal transfer of cadmium in genetically altered mice. Toxicology 1998;127:167-78.

Lee BJ, Jeong JK, Kim JH, Kang SG, Kim MO et al. Local expression of a POU family transcription factor, Pit-1, in the rat placenta. Mol Cell Endocrinol 1996;118:9-14.

Lee CK, Kang HS, Lee BJ, Kang HM, Choi WS et al. Effects of dopamine and estrogen on the regulation of Pit-1 alpha, Pit-1 beta, and PL-II gene expression in the rat placenta. Mol Cells 1998;8:205-11.

Lee CK, Kang HS, Lee BJ, Kang HM, Choi WS et al. Effects of dopamine and melatonin on the regulation of the PIT-1 isotype, placental growth hormone and lactogen gene expressions in the rat placenta. Mol Cells 1999;9:646-51.

Li S, Crenshaw EB 3rd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW et al. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. Nature 1990;347:528-33.

Liu J, Corton C, Dix DJ, Liu Y, Waalkes P et al. Genetic background but not metallothionein phenotype dictates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. Toxicol Appl Pharmacol 2001;176:1-9.

Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum IY, Greenwood FC. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. Proc Natl Acad Sci 1971;68:866-70.

Pashen RL, Allen WR. The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. J Reprod Fertil Suppl 1979;27:499-509.

Orwig KE, Dai G, Rasmussen CA, Soares MJ. Decidual/trophoblast prolactin-related protein: characterization of gene structure and cell-specific expression. Endocrinology 1997;138:2491-500.

Piasek M, Laskey JW. Acute cadmium exposure and ovarian steroidogenesis in cycling and pregnant rats. Reprod Toxicol 1994;8:495-507.

Robertson MC, Cosby H, Fresnoza A, Cattini PA, Shiu RP et al. Expression, purification, and characterization of recombinant rat placental lactogen-I: a comparison with the native hormone. Endocrinology 1994;134:393-400.

Roby KF, Deb S, Gibori G, Szpirer C, Levan G et al. Decidual prolactin-related protein. Identification, molecular cloning, and characterization. J Biol Chem 1993; 268:3136-42.

Ruvkun G, Finney M. Regulation of transcription and cell identity by POU domain proteins. Cell 1991;64:475-8.

Solis-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B, Sierra-Santoyo A, Hernandez JM, Brambila E et al. Albores A. Chromium increases pancreatic metallothionein in the rat. Toxicology 2000;142:111-7.

Spencer TE, Bazer FW. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. Front Biosci 2002;7:1879-98.

Tam PP, Liu WK. Gonadal development and fertility of mice treated prenatally with cadmium during the early organogenesis stages. Teratology 1985;32:453-62.

Tanimoto A, Hamada T, Koide O. Cell death and regeneration of renal proximal tubular cells in rats with subchronic cadmium intoxication. Toxicol Pathol 1993;21:341-52.

Telleria CM, Zhong L, Deb S, Srivastava RK, Park KS et al. Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. Endocrinology 1998;139:2432-42.

Thordarson G, Galosy S, Gudmundsson GO, Newcomer B, Sridaran R et al. Interaction of mouse placental lactogens and androgens in regulating progesterone release in cultured mouse luteal cells. Endocrinology 1997;138:3236-41.

Waalkes MP, Rhem S, Riggs CW, Bare RM, Devor DE et al. Cadmium carcinogenesis in the male wister (CrI:(WI)BR) rats:dose-response analysis of tumor induction in the prostate and at the injection site. Cancer Res (USA) 1988;48:4656-63.

Yamada YK, Shimizu F, Kawamura R, Kubota K. Thymic atrophy in mice induced by cadmium administration. Toxicol Lett 1981;8:49-55.