대한산업의학회지 제 16 권 제 3 호 (2004년 9월)
Korean J Occup Environ Med, 2004;16(3):262-275

톨루엔이 흰쥐 태반의 PRL-GH군 유전자발현과 발생에 미치는 영향

대한산업보건협회[1], 인제대학교 산업의학연구소 · 부산백병원 산업의학과

최병수[1] · 이채관 · 문덕환 · 손병철 · 김대환
이창희 · 김휘동 · 김정원 · 김종은 · 이채언

— **Abstract** —

Effects of Toluene on the Expression of Placental PRL-GH Family Genes and Reproduction in the Rat

Byong-Soo Choe[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, Chae-Un Lee

Korean Industrial Health Association[1] , Institute of Industrial Medicine &
Department of Occupational and Environmental Medicine, Busan Paik Hospital, Inje University

Objectives: The purpose of this experimental study was to investigate the toxic effects of toluene on the placental functions and reproductionin the rat. In this study, the expression of placental prolactin-growth hormone (PRL-GH) and Pit-1 genes, the frequency of placental trophoblast cells, and the reproductive data were analyzed.

Methods: The pregnancy of the Sprague-Dawley rats (250±25 g) was determined by verifying the presence of the copulatory plug or sperm in the vaginal smear and the day on which this was observed was defined as pregnancy day 0. The pregnant rats were divided into three groups. The control group was intraperitoneally (ip) injected with sesame oil, and the other two groups were given either 150 or 750 mg/kg BW/day of toluene resuspended in sesame oil during pregnancy days 7-11 and 16-20. The rats from the three experimental groups were sacrificed on pregnancy days 11 and 20, respectively. The mRNA levels of the PRL-GH, Pit-1a and b isotype genes were analyzed by Northern blot hybridization and Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. The hormonal concentration was analyzed by Radioimmunoassay. The frequency of the placental trophoblast cells was determined by means of a histochemical study. Reproductive data, such as the placenta and infnat weight, pregnancy period and litter size were surveyed at pregnancy day 20 and after birth. Statistical analysis was carried out by means of the SAS program (version 8.1).

Results: The mRNA levels of the PRL-GH family genes were reduced in a linear fashion by exposure to toluene. The mRNA levels of the Pit-1a and b isotype genes, which induce the

<접수일: 2004년 5월 27일, 채택일: 2004년 7월 12일>
교신저자: 이 채 언 (Tel: 051-890-6745) E-mail: pmculee@inje.ac.kr

* 이 논문은 2003년도 인제대학교 학술연구조성비 지원에 의한 것임.

expression of the PRL-GH family genes, were also reduced by exposure to toluene. The placental lactogen Iv and II concentrations in the rat placenta, fetus and maternal blood were also decreased by exposure to toluene. During the last stage of gestation, exposure to a high dose of toluene reduced the frequency of the spongiotrophoblast cells that secrete the PRL-GH hormones. Reproductive data such as the placenta and infant weight, and litter size were reduced, and the pregnancy period was extended in the toluene exposed group as compared with the control group.

Conclusions: Toluene disrupts the PRL-GH hormone metabolism in the rat placenta and this leads to reproductive disorder.

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

서 론

산업화에 따른 산업장의 유기용제 사용량 증가와 근로자 및 일반인들의 유기용제 노출빈도가 증가됨에 따라 지난 20여 년 동안 유기용제 폭로가 인체에 미치는 영향에 관한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다(Landrigan 1990; Sorsa 등, 1982). 그리고 가임연령의 여성 근로자 수가 증가됨에 따라 유기용제 폭로가 여성근로자들의 생식기능에 미치는 영향이 산업 의학 분야에서 중요한 관심사로 대두되고 있다. 많은 역학적 연구에서 톨루엔, 테트라클로로에틸렌, 트리클로로에틸렌, 자이렌, 지방족탄화수소 등의 유기용제 폭로가 자연 유산의 위험성을 증가시킨다고 보고 되었다 (Kyyronen 등, 1989; Zielhuis 등, 1989; Lindbohm 등, 1990; Lipscomb 등, 1991; Windham 등, 1991; Ng 등, 1992). 그리고 톨루엔, 테트라클로로에틸렌, 트리클로로에틸렌 등은 생리 장애와도 관계된다는 제한된 증거들이 있다(Zielhuis 등, 1989; Danielsson, 1990; Ng 등, 1992).

톨루엔은 방향족 탄화수소의 대표적 물질로서 공업용 원재료로 이용되며, 기타 신나, 도료, 잉크, 접착제 등의 용도로 널리 사용되며, 산업장의 근로자들 뿐만 아니라 일반인들의 노출빈도도 높은 유기용제이다(유독위험물질편람 1998; 장성훈, 1995). 톨루엔의 인체로 흡수 경로는 주로 증기상태로 공기중에 확산되어 호흡기를 통하여 이루어지며, 액체상태나 가스 상태의 경우 피부로도 흡수되고, 흡수된 톨루엔은 중추신경장애 및 조혈기능장애를 비롯한 여러 신체장애를 일으킨다(이채언 등, 1995; 장성훈, 1995). 그리고 생체내 대사는 주로 간에서 이루어져 마뇨산 또는 o-크레졸로 전환된 후 요로 배설된다(Ogata, 1981; Truchon 등, 1996).

태반은 포유동물의 발생에 특이적인 기관으로써 임신 초기에 형성되어 출산시까지 존재하며 흰쥐의 경우 크게 두 부위, 즉 이음구역(junctional zone)과 미로구역(labyrinth zone)으로 나누어진다. 주요 구성 세포 종은 글리코겐, syncytial, spongiotrophoblast, trophoblast giant 세포 등 4종으로 구분된다. 임신 기간 동안 흰쥐 태반의 spongiotrophoblast, trophoblast giant 세포에서는 뇌하수체의 프로락틴, 성장 호르몬과 유사한 placental lactogen군(이하 PL)의 PL-I, Iv(I variant), II(Deb 등, 1991a; Duckworth 등, 1986a; 1986b; Robertson 등, 1994)와 prolactin like protein군(이하 PLP)의 PLP-A, B, C, Cr Cv, D(Croze 등, 1990; Dai 등, 1996; Deb 등, 1991b; Duckworth 등, 1986b; Iwatsuki 등, 1996)등의 다양한 단백질성 호르몬 유전자들이 발현되며, 임신 초기에는 decidual prolactin-related protein(이하 dPRP)(Roby 등, 1993)유전자가 발현된다. 이 태반 호르몬들은 수정란의 착상에서부터 임신 기간 동안 태아의 성장과 모체와의 생리조절 등 발생에 중요한 역할을 한다. 이 태반 호르몬들은 뇌하수체에서 분비되는 프로락틴 및 성장 호르몬과 유전자 염기 서열, 단백질 구조 및 기능이 유사하기 때문에 공동조상의 단백질에서 기원한 것으로 알려져 프로락틴-성장호르몬(prolactin-growth hormone: 이하 PRL-GH)군 유전자로 불린다

(Forsyth, 1997; Niall 등, 1971). Pit-1 유전자는 뇌하수체에서 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). Pit-1a, b 유전자는 사람과 흰쥐의 태반에서도 발현되며 (Bamberger 등, 1995; Lee 등, 1996), PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현조절인자로 작용한다 (Lee 등, 1998; 1999).

톨루엔의 생식독성에 관한 연구에 의하면 톨루엔을 포함한 유기용제의 장기 폭로가 뇌하수체 호르몬의 정상적인 유리를 저해하여 시상하부-뇌하수체 축에 영향을 미치는 물질로 추정하였으며(이채언 등, 1995; Svensson 등, 1992), 김대환 등은 톨루엔이 흰쥐 뇌하수체의 gonadotropin releasing hormone 수용체 유전자의 발현과 뇌하수체 호르몬 유전자의 발현 조절 인자인 Pit-1 유전자의 발현을 억제함으로서 시상하부-뇌하수체-생식소 축에 영향을 미침다고 보고하였다(김대환 등, 1998). 그러나 유기용제에 관한 역학적 연구와 생체 실험적 연구를 토대로 인체의 생식 독성 물질을 분류한 Nordic criteria에 의하면 톨루엔은 임상적 증거는 있으나 동물 실험에서의 자료가 부족하거나 연구상의 편견이나 자료 불충분 등의 이유로 인체에 생식 독성이 있다고 분류할 수 없는 물질인 3군에 포함하였다 (Danielsson, 1990). 따라서 이 분야의 연구는 보다 진보된 연구방법을 통한 객관적인 자료수집이 필요하며, 아울러 톨루엔이 포유동물 발생에 특이적 기관인 태반의 PRL-GH군 호르몬 유전자 발현과 spongiotrophoblast 세포 및 trophoblast giant 세포의 분화에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 보고된 바 없어 이에 관한 연구도 필요한 실정이다. 따라서 이 연구에서는 톨루엔을 투여한 흰쥐 태반의 PRL-GH군과 Pit-1 유전자의 발현, 그리고 세포분화와 발생학적 자료들을 조사하고자 하였다. 본 연구진은 흰쥐를 이용한 발생학적 모니터링방법을 이용하여 내분비계교란물질인 bisphenol A와 polychlorinated biphenyls(A1254), 카드뮴과 6가크롬 등의 중금속, 그리고 톨루엔과 트리클로로에틸렌 등의 유기용제가 태반의 PRL-GH군 호르몬유전자 발현과 태반세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였는데, 연구수행 과정에서 실험동물을 효율적으로 사용하기 위하여 각 유해인자들에 대한 대조 실험군을 공유하여 동시에 수행하였으며, A1254와 6가크롬에 관한 결과는 이미 보고한 바 있다(Lee 등, 2003; 이 헌 등, 2004).

대상 및 방법

1. 실험동물 관리 및 톨루엔 투여

1) 실험동물 관리

실험동물은 출생 후 15 주된 Sprague-Dawley 흰쥐(250±25 g)를 사용하였으며, 조절된 온도(24 ℃~26℃)와 광조건(명기 14시간, 암기 10시간)에서 사육하였다. 임신된 흰쥐를 얻기 위하여 암. 수를 합사(1:1)하여 임신을 유도한 후 자궁내 점액질에 의해 정자가 관찰된 날을 임신 0일로 설정하였다. 실험동물은 인제대학교 동물사육실 운영규칙에 따라 관리하였다.

2) 톨루엔 투여

톨루엔(Sigma-Aldrich, USA, 99.%)을 참기름(Sigma-Aldrich, 0.5 ml)과 섞은 뒤 임신이 확인된 흰쥐에 복강 주사하였고 대조군은 동량의 sesame oil을 주사하였다. 실험은 대조군과 톨루엔 150 mg/kg B.W. 투여군, 750 mg/kg B.W. 투여군 등 3군으로 구분하였다. 투여량은 no-observable-adverse-effect level(NOAEL) 및 lowest-observable-adverse-effect level (LOAEL)과 톨루엔에 의한 흰쥐의 발생독성 및 생물학적 모니터링에 관한 참고문헌의 자료를 참고하였다(Aikawa 등, 1988; Arito 등, 1985; Benignus 등, 1984; Gospe 등, 1994; Kondo 등, 1995). 태반의 PRL-GH군 유전자 발현 분석, 태반의 무게 검량 및 조직학적 분석에 10마리, 임신기간과 litter size(한 마리당 태자의 수), 그리고 체중검량 등을 조사하기 위하여 10 마리의 임신된 흰쥐를 사용하였다. 주사 시간은 오전 10시였고, 투여기간은 PL-I 유전자 발현 분석을 위하여 임신 7일부

터 11일까지, 그리고 나머지 유전자의 발현분석, 체중검량, 조직학적 분석을 위하여 임신 16일부터 20일까지였다. 임신 11일과 20일에 각각 실험 군별로 3 마리와 7 마리씩 도살하여 태반과 태자의 뇌를 적출 하였다. 적응, 교배 및 임신유도, 톨루엔 투여, 도살, 사육일정은 Fig. 1과 같다.

2. 실험 방법

1) 요 중 마뇨산 분석

요는 채취(오후 4시) 후 즉시 50% 메틸알콜과 1:9로 섞은 후 원심분리하여 침전물을 제거하고 고현상 액체크로마토그래피(HPLC, Gilson, France)를 사용하여 분석하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다.

2) RNA 추출

적출된 시료에 Tri-Reagent(Sigma, 0.1 g/ml)를 가한 후 homogenizer(Ingenieurbuero)사용하여 얼음에 시험관을 담은 상태로 약 30초간 마쇄하였다. 마쇄액이 담긴 시험관에 동량의 클로로포름을 넣고 실온에서 15분간 방치 후, 4℃, 13,500 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 새 시험관에 옮긴 후 동량의 이소프로판올을 넣고 실온에서 10 분간 방치 후, 다시 4℃, 13,500 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상층액을 제거하고 남겨진 침전물을 75% 에탄올로 2회 세척하였다. 이 침전물을 실온에서 10분 동안 건조한 후 적당량의 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 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 RT-PCR 및 Northern blot hybridization에 사용하였다.

3) 역전사 및 DNA 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

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 μg, 0.5 μg, 1.0 μg)과 합성 반복 회수(15회, 20회, 25회, 30회)에 따라 유

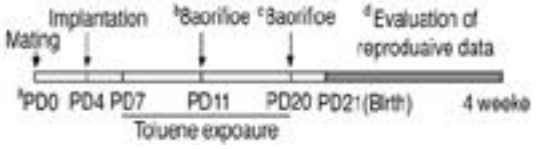

Fig. 1. Schematic representation showing the sequence of experiment. White and black bar indicate the period from mating to 4 weeks after birth. [a]Pregnant day. [b]Analysis of hippuric acid concentration and Northern blot hybridization (PL-I). [c]Analysis of hippuric acid concentration, Northern blot hybridization (PL-Iv, II, PLP-A, B, C, Cv, D, dPRP), RT-PCR, radioimmunoassay (PL-I, Iv, II), Histochemical study, measurement of placental weighs. [d]Measurement of litter size and fetus body weight.

Table 1. Instrumental parameters of high performance liquid chromatography

Parameters	Condition
Column	Nova-Pac®C_{18}, 3.9×150 mm, Waters
Temperature	30℃
Mobile phase	20 mM KH_2PO_4(pH 3.3)/acetonitrile = 90/10
Flow rate	0.8 ml/min
Pressure	1200 PSI
Detector	U.V
Wave length	225 nm

효 범위(0.5 ㎍, 25 회 합성)를 확인하였다. 추출된 total RNA 0.15 ㎍을 200 unit의 Moloney murine leukemia virus(MMLV) reverse transcriptase(Perkin-Elmer Cetus, USA)와 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 30 회 반응(95℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 1분)시켰다. 증폭된 cDNA 절편들은 1% agarose gel로 전기영동한 후 추출하여 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)에 클로닝 하였다. 클로닝 된 유전자 절편들은 fmol PCR sequencing system (Promega)을 이용하여 염기 서열을 분석하였다.

4) Northern blot hybridization

Total RNA를 1% agarose/2.2 M formaldehyde gel에서 50 V로 3시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 total RNA를 transfer kit (Trans Vac, Hoefer, USA)를 이용하여 nylon membrane (Schleicher & Schull)으로 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, 0.015 M sodium citrate), 5X Denhardt's solution(1X Denhardt's solution: 0.01% polyvinyl pyrrolidone, 0.01% Ficoll, 0.01% BSA), 0.1% SDS, 2 mg/ml salmon sperm DNA였다. Hybridization 후 비특이적인 결합을 제거하기 위하여 nylon membrane을 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 55℃에서 3회 세척한 뒤 X-ray film(XO Mat, Kodak, USA)으로 1~4일간 감광시켰다. 사용된 probe는 RT-PCR로 합성 후 염기서열을 확인한 각 유전자의 절편을 주형으로 Oligolabelling Kit(Pharmacia)와 [α32P] dCTP (Amersham-Pharmacia, USA)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 digital camera(Kodak)와 1D image analysis program을 사용하여 분석하였다.

5) 혈중 PL-I, Iv, II 호르몬 농도 분석

모체의 혈액은 도살 후 즉시 채취하였으며 태반과 태자의 혈액은 적출 후 유리섬유가 내장된 시험관으로 원심 분리(1200 rpm, clinical table-top)하여 채취하였다. 호르몬 농도치의 일중 변화를 감안하여 시료 채취 시간을 오후 1시로 고정하였으며, 채취한 혈액에서 혈장을 분리하여 -70℃에 보관하였다. PL-I, Iv와 PL-II 호르몬의 농도는 방사성면역측정법(radioimmunoassay)으로 분석하였다.

6) 조직학적 관찰(Histological study)

임신 19일에 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 Microtome(Bright, England)을 이용하여 6 ㎛ 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) 발생학적 자료(reproductive data) 조사

태반은 임신 20일에, 태자는 출산 직후, 출산 1주 후, 출산 4주 후에 각각 무게를 측정하여 대조군과 비교하였다. 임신 기간은 합사 후 자궁내 점액질에서 정자가 관찰된 날과 출산일을 기준으로 하였다.

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. 유의수준은 $p<0.05$로 설정하였다.

결 과

1. 요 중 마뇨산 농도

임신 중 톨루엔이 투여된 흰쥐의 요 중 마뇨산 농도를 분석한 결과는 Table 2와 같다. 임신 7일부터 11일까지 5일간 톨루엔을 투여한 경우, 150 mg 투여군의 농도는 1.98±0.28 g/g creatinine, 750 mg 투여군은 3.21±0.39 g/g creatinine으로 조사되어 톨루엔 투여 농도에 따라 직선적으로 유의하게 증가되었다($p<0.05$). 그리고 임신 15일부터 20일까지 투여한 경우도 150 mg 투여군은 2.52±0.31 g/g creatinine, 750 mg 투여군 5.85±0.64 g/g creatinine으로 조사되어 투여 농도에 따라 직선적으로 유의하게 증가되었다($p<0.05$). 대조군의 요 중 마뇨산 농도는 모두 검출 한계 이하(LOD<0.01 g/g creatinine)였다.

2. PRL-GH군과 Pit-1a,bisotype 유전자 발현 분석

PL-I 유전자의 발현은 톨루엔 150 mg 투여군에서는 변화가 없었으나 750 mg 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소되었다($p<0.05$). PL-Iv 유전자의 발현은 톨루엔 투여량에 따라 직선적으로 감소되었다(Fig. 2). PL-II 유전자의 발현 또한 톨루엔 투여량에 따라 직선적으로 감소되었으며 750 mg 투여군의 감소는 통계적으로 유의하였다($p<0.05$)(Fig. 2). PLP-A 유전자의 발현은 톨루엔 150 mg 투여군에서 변화가 없었으나 750 ppm 투여군은 유의하게 감소되었다($p<0.05$)(Fig. 3). PLP-B, C, Cv 유전자의 발현은 톨루엔 투여량에 따라 직선적으로 유의하게 감소되었다($p<0.05$)(Fig. 3). PLP-D 유전자의 발현은 톨루엔 150 mg 투여군에서 변화가 없었으나 750 ppm 투여군에서는 유의하게 감소되었다($p<0.05$)(Fig.3). dPRP 유전자의 발현은 톨루엔 투여량에 따라 직선적으로 유의하게 감소되었다($p<0.05$)(Fig. 3). PRL-GH군 호르몬 유전자의 발현유도인자로 알려진 Pit-1a, b isotype의 발현은 대조군에 비해 톨루엔 투여군에서 감소되었으며 Pit-1a의 경우 톨루엔 투여량에 따라 직선적으로 유의하게 감소되었다($p<0.05$)(Fig. 4).

3. 태반, 태자 및 모체의 혈중 PL-I, Iv, II 호르몬 농도

폭로 농도에 따른 태반의 평균 PL-I, Iv, II 호르몬의 농도는 대조군이 각각 859.4 ㎍/g, 1358.8 ㎍/g, 318.6 ㎍/g, 톨루엔 150 mg 투여군이 624.8 ㎍/g, 1338.0 ㎍/g, 301.2 ㎍/g이었고 750 mg 투여군이 456.2 ㎍/g, 1186.5 ㎍/g, 241.7 ㎍/g으로 조사되어 PL-I 과 II 호르몬의 농도는 톨루엔 투여량에 따라 직선적으로 유의하게 감소하는 경향이었다($p<0.05$). 태자와 모체의 경우도 태반과 유사한 결과를 보였다(Table 3).

Table 2. Mean hyppuric acid concentration in maternal urine according to the toluene dosage

mean±S.D (g/g creatinine)

Pregnant day	Control	Toluene injected group	
		150 mg/kg B.W.	750 mg/kg B.W.
Day 11	*ODL	†1.98±0.28	†‡3.21±0.39
Day 20	ODL	†2.52±0.29	†‡5.85±0.64

*Out of Detection Limit (0.01 g/g creatinine).

The values of day 11 and 20 originated from 3 and 7 pregnant rats in each group.

† and ‡ indicate the significantly difference ($p<0.05$) compared with control and 150 mg exposed groups.

p value was calculated by Mann-Whitney(U) test.

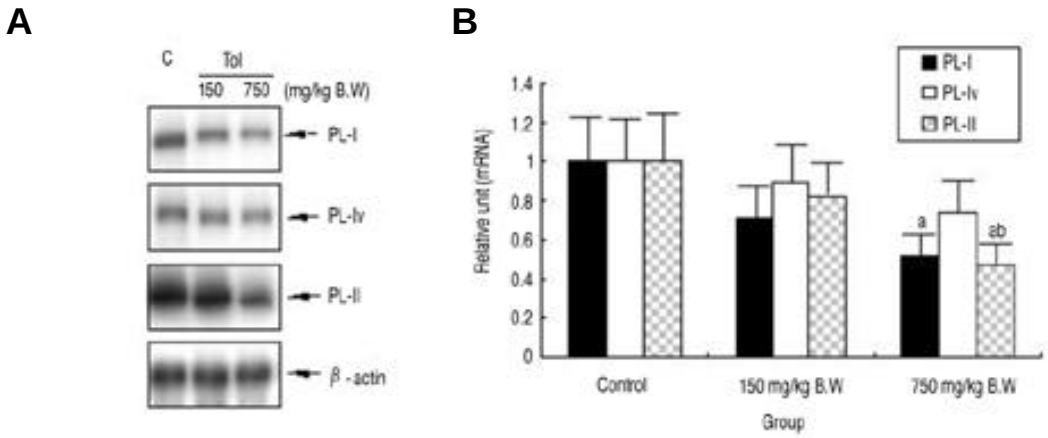

Fig. 2. Effects of toluene on the expression of PL-I, Iv, II genes in the rat placenta. (**A**) Northern blot analysis of PL-I, Iv and PL-II genes. Total RNAs (15 μg) were fractionated on an 1% formaldehyde agarose gel, transferred to nylon paper and hybridized with ^{32}P-labeled PL-I or Iv or II cDNA probe. βactin was hybridized to certified the equal loading of total RNA. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of toluene 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. a and b on the bar indicate the significantly difference ($p<0.05$) compared with control and 150 mg exposed groups.

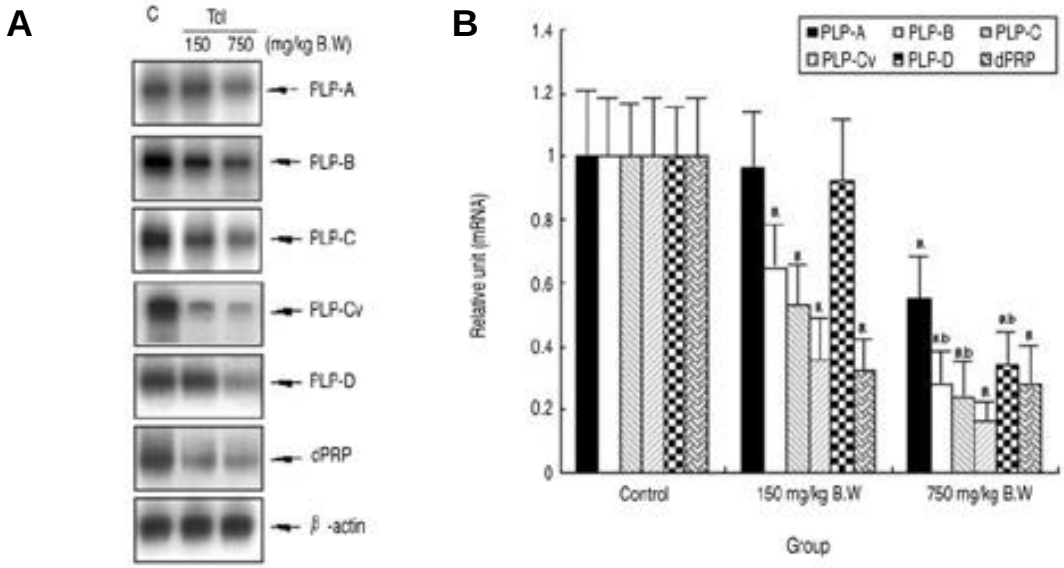

Fig. 3. Effects of toluene on the expression of PLP-A, B, C, Cv, D and dPRP genes in the rat placenta. (**A**) Northern blot analysis of PLP-A, B, C, Cv, D and dPRP genes. Total RNAs (15 μg) were fractionated on an 1% formaldehyde agarose gel, transferred to nylon paper and hybridized with ^{32}P-labeled 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 toluene 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. a and b on the bar indicate the significantly difference ($p<0.05$) compared with control and 150 mg exposed groups.

4. 태반의 조직학적 관찰

톨루엔 150 mg 투여군의 흰쥐 태반에서는 특이할 만한 조직학적 변화를 발견할 수 없었으나 750 mg 투여군에서는 태반의 체적과 구성 세포종의 빈도에 변화를 보였다. 이음구역(junctional zone)의 spongiotrophoblast 세포의 관찰빈도가 대조군과 비교하여 현격히 감소되었다. 미로구역(labyrinth zone)의 spongiotrophoblast와 trophoblast giant 세포의 관찰빈도는 변화가 없었다(Fig. 5).

5. 발생학적 자료(Reproductive data)

임신 20일에 조사된 톨루엔 폭로 상태에 따른 태

Table 3. Mean serum PL-I, Iv and II hormone levels in rat placental, embryonal and maternal blood according to the toluene dosage

mean±S.D.

Parameters		Control	Toluene injected group	
			150 mg/kg B.W.	750 mg/kg B.W.
Placenta	PL-I	859.4±211.2	*624.8±159.3	*†456.2±154.7
(μg/g)	PL-Iv	1358.8±369.4	1338.0±422.1	1186.5±482.5
	PL-II	318.6±49.1	301.2±52.7	*†241.7±62.7
Embryo	PL-I	-	-	-
(μg/g)	PL-Iv	33.9±2.4	32.4±5.3	30.8±6.2
	PL-II	320.5±28.7	312.2±39.2	*†281.1±40.9
Matenal blood	PL-I	466.2±117.0	*367.5±121.2	*327.8±135.4
(μg/ml)	PL-Iv	1103.6±280.3	1091.2±298.3	1071.6±328.7
	PL-II	225.8±45.2	217.1±47.2	*196.9±44.8

PL-I originated from 3 pregnant rats and PL-Iv, PL-II originated from 7 pregnant rats in each group.
a and b indicate the significantly difference ($p<0.05$) compared with control and 150 mg exposed groups.
p value was calculated by Mann-Whitney (U) test.

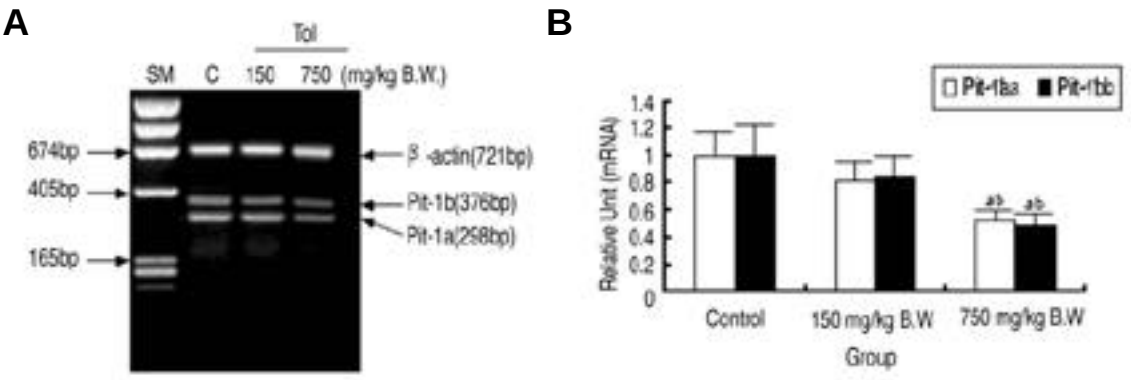

Fig. 4. Effects of toluene on the expression of Pit-1a and b isotype gene in the rat placenta. (**A**) Reversetranscribed and amplified cDNAs were fractionated on an 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of toluene injection. C: control. (**B**) 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. a and b on the bar indicate the significantly difference ($p<0.05$) compared with control and 150 mg exposed groups.

반의 평균무게는 대조군 0.64 g, 150 mg 투여군 0.61 g, 750 mg 투여군 0.56 g로 폭로량에 따라 직선적으로 감소하였다. 출산 직후, 출산 1주 후, 출산 4주 후에 각각 측정한 태자의 평균 체중은 출산 직후와 출산 1주 후에는 톨루엔 투여량에 따라 직선적으로 감소하는 경향이었다. 그러나 출산 4주 후에는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다.

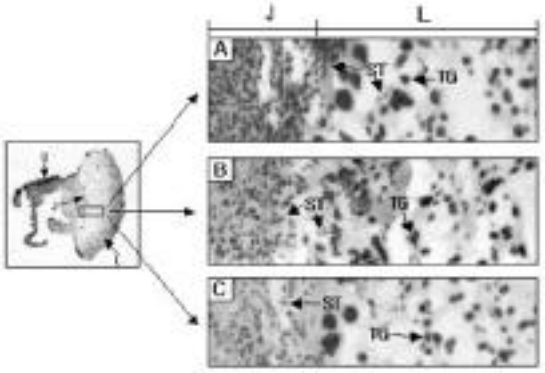

Fig. 5. Effect of toluene on the histochemical feature of developing rat placenta. Perfused placental tissues with Bouin's fix solution were embedded in paraffin, sectioned at 6 μm and counter-stained with methyl blue. (**A**) Microphotographs (X 400 reproduced at 70%) of control group. (**B**) 150 mg of toluene exposed group. (**C**) 750 mg of toluene exposed group. 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.

톨루엔 폭로상태에 따른 평균 임신 기간은 대조군 21.05일, 톨루엔 150 mg 투여군 21.26일, 750 mg 투여군 22.58일로 조사되어 톨루엔 750 mg 투여군에서 통계적으로 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 흰쥐 한 마리당 출산된 평균 태자의 수(litter size)는 대조군 13.41 마리, 150 mg 투여군 11.16 마리, 750 mg 투여군에서 11.04 마리로 조사되어 대조군에 비해 톨루엔 투여군 모두 통계적으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$)(Table 4).

고 찰

임신된 흰쥐에 대한 톨루엔 투여는 태반과 출산된 태자의 무게 및 임신 기간에 영향을 미쳤다. 태반과 태자의 무게는 대조군에 비해 감소되었으며, 임신 기간은 길어졌다. 이러한 결과들은 톨루엔 투여에 의한 태자의 성장 지연, 체중 감소 등을 보고한 선행 연구의 결과와 유사하였다(Ono 등, 1995; 1996). 이 연구에서는 톨루엔 투여에 의한 흰쥐태반의 기능 및 발생장해의 원인을 연구하기 위해 PRL-GH군 유전자들 발현을 조사하였다. 결과에 의하면 톨루엔은 흰쥐 태반의 PPL-I, II, PLP-B, C, Cv, D, dPRP 유전자의 발현을 억제하였다. 그리고 PL-I, Iv와 PL-II 호르몬의 농도를 감소시켰다. 이 태반 호르몬들의 기능에 관한 연구에 의하면 PL-I은 프로게스테론의 분비를 촉진시키고 황체의 기능을 유지시킨다고 알려져 있다(Galosy와 Talamantes, 1995; Thordarson 등, 1997). 또한 프로게스테론에 의하여 유전자 발현이 억제되어(Yamaguchi 등,

Table 4. Reproductive date according to the toluene dosage mean±S.D.

Parameter		Control	150 mg/kg B.W.	750 mg/kg B.W.
Placental weight (g)		0.64±0.07	0.61±0.09	0.56±0.17
	Afterbirth (A.B)	3.15±0.34	a2.62±0.42	ab2.44±0.40
Infant weight (g)	1 week A.B	8.96±0.43	a7.71±0.94	a7.49±1.01
	4 weeks A.B	86.3±9.01	84.74±9.02	83.51±10.24
Pregnancy period (days)		21.05±0.72	21.26±0.84	ab22.58±1.05
litter size		13.41±2.31	a11.16±2.58	a11.04±2.78

Placental weight originated from 7 pregnant rats and other values originated from 10 pregnant rats in each group.
a and b indicate the significantly difference ($p<0.05$) compared with control and 150 mg exposed groups.
p value was calculated by Mann-Whitney (U) test.

1992) 임신 기간 동안 PL-I과 프로게스테론은 길항 관계를 나타낸다. PL-II도 프로게스테론 분비를 촉진하며(Forsyth, 1994; Galosy와 Talamantes, 1995; Thordarson 등, 1997), 에스트로겐 수용체 α, β유전자의 발현을 촉진시키는 등 스테로이드 호르몬 대사에 관여한다(Telleria 등, 1998). 그리고 모체의 유선 발생을 유도한다(Forsyth, 1994). PLP-B와 dPRP는 deciduoma세포의 분화를 유도하고(Croze 등, 1990; Orwig 등, 1997) 태반 형성에도 관여한다(Rasmussen 등, 1997). PLP-C, Cv 유전자는 임신 후반기에 태반의 성장 및 모체와의 생리 조절에 관여한다(Conliffe 등, 1995). 톨루엔에 의한 PL-I과 II 분비억제는 스테로이드 호르몬 대사에 장애를 일으켜 스테로이드에 의존적인 태반의 세포 분화를 억제할 수 있으며, PLP-B와 dPRP 유전자 발현억제는 decidua 세포의 분화를 억제하고, PLP-C, Cv 유전자 발현억제는 태아와 모체와의 생리조절을 교란시키는 등 이 연구에서 조사한 PRL-GH군 호르몬에 관한 연구 결과는 선행연구들에서 보고 된 톨루엔에 의한 태반과 태자의 성장지연의 원인을 설명할 수 있는 자료로 생각된다.

김대환 등(1998)은 톨루엔에 폭로된 흰쥐의 뇌하수체에서 Pit-1 유전자의 발현이 억제됨을 보고한 바 있다. 그리고 이 연구에서는 태반에서도 톨루엔에 의해 Pit-1 유전자 발현이 억제됨을 확인하였다. 앞서 기술한 바와 같이 태반의 PRL-GH군 유전자의 발현은 Pit-1의 조절을 받는다(Lee 등, 1998; 1999). 따라서 톨루엔에 의한 Pit-1 유전자 발현 억제는 PRL-GH군 호르몬 분비감소로 이어져 결과적으로 태반과 태자의 성장을 지연시키는 주요 원인으로 작용하였을 것이다.

Pit-1 유전자 발현조절인자로 신경내분비계 물질인 도파민, 멜라토닌(Lee 등, 1998; 1999; Elsholtz 등, 1991)과 스테로이드 호르몬인 에스트로겐(Lee 등, 1996)등이 알려져 있다. 도파민은 Pit-1 유전자의 대표적인 발현 억제인자로 알려져 있는데, 몇몇 선행연구에서 톨루엔을 포함한 유기용제가 도파민 분비에 미치는 영향에 관한 보고가 있었다. Stengard 등(1994)은 1000-2000 ppm의 톨루엔에 2시간 노출된 흰쥐의 뇌에서 도파민의 농도가 증가됨을 보고하였고, Gerasimov 등(2002)도 톨루엔에 노출된 흰쥐의 뇌에서 도파민의 농도가 증가됨을 보고하였다. 그리고 Berenguer 등(2003)과 Wiaderna와 Tomas 등(2002)은 톨루엔이 도파민 대사와 관련된 효소의 활성을 억제하여 도파민을 포함한 신경내분비계의 물질분비를 교란시킴으로서 신경행동학적 이상을 초래한다고 보고하였다. 흰쥐의 태반에서도 다양한 종류의 도파민 수용체들의 존재가 보고 되었으며(Kim 등, 1997; Kim 등 2001), 따라서 이러한 연구결과들에 의하면 톨루엔에 의한 도파민 등의 신경 내분비계 물질의 분비교란은 태반의 Pit-1 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있다고 판단된다.

또 다른 PRL-GH군 호르몬 분비감소의 원인으로 톨루엔에 의한 태반의 trophoblast 세포 분화 억제를 들 수 있다. 톨루엔에 의한 trophoblast 세포 분화 억제의 직접적인 원인을 설명하기는 어려우나 고려할 만한 이론은 다음과 같다. 첫 번째는 톨루엔에 의한 난소의 스테로이드 호르몬 분비 억제를 들 수 있다. 임신기간 동안 난소에서는 다량의 에스트로겐과 프로게스테론이 분비되는데 톨루엔은 granulosa 세포 등 스테로이드 호르몬을 분비하는 주요 세포들의 활성을 억제한다(Tap 등, 1996). 이러한 억제효과가 에스트로겐을 포함한 스테로이드 호르몬 분비를 억제한다는 직접적인 자료는 아직 제시되지 않았으나 프로게스테론과 에스트로겐이 태반세포의 분화와 성장의 중요한 유도인자로 작용하기 때문에(Cronier 등, 1999) 톨루엔에 의한 PRL-GH 군 호르몬 분비감소의 한 가지 원인으로 추정할 수 있겠다. 두 번째로는 톨루엔의 PRL-GH군 호르몬 분비 억제로 인한 태반세포의 분화억제이다. PRL-GH 군 호르몬 중 특히 PL-II는 에스트로겐 대사와 밀접한 관계를 가지고(Telleria 등, 1998), 또한 PLP 호르몬들도 태반세포 분화 유도인자들이므로 톨루엔에 의한 이들 호르몬의 분비억제는 세포의 분열과 분화로 이어지는 발생의 고리를 교란시킬 것으로 생각된다. 따라서 이 연구에서 조사한 톨루엔에 의한 태반의 PRL-GH군 호르몬 및 Pit-1 유전자 발현에 관한 결과들은 톨루엔에 의한 인체 및 실험동물의 발생독성 연구에 도움이 되리라 생각된다.

이 연구의 제한점으로는 톨루엔 투여 방법을 inhalation chamber를 사용한 호흡기 노출이 아닌 복강에 직접 주사한 것과 톨루엔 투여를 위해 사용된 참기름이 교란변수로 작용할 가능성이 있다는 점

등이다. 참기름은 reactive oxygen species (ROS)의 생성을 감소시키는 등 Oxidative stress를 억제 한다고 알려져 있으나(Hus 등, 2004; Kaur 등, 2000) 그 효과는 톨루엔의 효과와는 상반되어 발생장애를 유발할 가능성은 극히 미약 하다. 그러나 톨루엔의 발생장애에 대하여 교란변수로는 작용할 가능성은 있다고 판단된다.

요 약

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

방법: 실험동물은 15주령의 임신된 Sprague-Dawley 흰쥐(250±25 g) 를 사용하였다. 실험군은 대조군과 톨루엔 150 mg/kg BW 투여군, 750 mg/kg BW 투여군 등 3군으로 구분하였으며, 톨루엔은 참기름과 섞은 뒤 복강주사하였다. 유전자 발현은 Northern blot hybridization과 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법으로 조사하였으며, 호르몬 농도는 방사선면역측정법으로, 태반세포의 빈도는 조직병리학적 소견으로 관찰하였으며, 발생학적 자료는 태반과 태자의 무게, 임신기간, 태자의 수 등을 조사하였다. 자료의 통계적 분석에는 SAS (version 8.1)를 사용하였다.

결과: 톨루엔은 투여농도에 비례하여 흰쥐 태반의 PRL-GH군 유전자 발현을 억제하였으며, 이군 유전자들의 전사조절인자인 Pit-1a, b 유전자의 발현도 억제하였다. 그리고 PRL-GH군의 placental lactogen I, Iv, II 호르몬의 농도를 감소시켰다. 톨루엔 750 mg 투여군 태반의 이음구역(junctional zone)은 PRL-GH군 호르몬을 분비하는 spongiotrophoblast 세포의 빈도가 감소되었다. 톨루엔은 태반과 태자의 무게를 감소시켰고 임신기간을 증가시켰으며 태자의 수를 감소시켰다.

결론: 임신 중 톨루엔 노출은 PRL-GH군 호르몬 분비를 교란시켜 흰쥐의 태반기능과 태자발생의 장해요인으로 작용한다.

참고문헌

김대환, 이헌, 이채관, 강대성, 김정호 등. 톨루엔, 자이렌, 트리클로로에틸렌 투여가 흰쥐 시상하부와 뇌하수체의 GnRH, GnRH receptor, Pit-1 유전자 발현에 미치는 영향. 대한산업의학회지 1998;10:267-82.

이채언, 이종태, 정의화, 손혜숙, 문덕환 등. 톨루엔을 포함한 유기용제의 직업적 폭로로 인한 신경내분비계 영향. 대한산업의학회지 1995;7:362-74.

이헌, 전진호, 문덕환, 이채언, 강성구 등. 6가 크롬 폭로가 랫트의 태반기능과 출산에 미치는 영향. 예방의학회지 2004;37:99-103.

장성훈. 톨루엔, 크실렌 폭로량과 생물학적 지표들과의 상관성 연구. 대한산업의학회지 1995;7:295-305

유독,위험물질 편람. 국립노동과학연구소. 1998:596-9.

Aikawa H, Momotani H, Shigeta S. Changes in blood toluene concentrations in rats under various kinds of exposure conditions and physical loads. Sangyo Igaku 1988;30:379-84.

Arito H, Tsuruta H, Nakagaki K, Tanaka S. Partial insomnia, hyperactivity and hyperdipsia induced by repeated administration of toluene in rats: their relation to brain monoamine metabolism. Toxicology 1985;37:99-110.

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.

Benignus VA, Muller KE, Barton CN, Bittikofer JA. Toluene blood level following subcutaneous injection of toluene in the rat. Environ Res 1984;33:441-53.

Berenguer P, Soulage C, Perrin D, Pequignot J, Abraini JH. Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats. Pharmacol Biochem Behav 2003;74:997-1003.

Bodner M, Karin M. A pituitary-specific transacting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. Cell 1987;50:267-75.

Conliffe PR, Simmen RC, Buhi WC, Shiverick KT. Cloning of a novel rat placental prolactin-like protein C-related cDNA. Mol Reprod Dev 1995;41:167-76.

Cronier L, Guibourdenche J, Niger C, Malassine A. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. Placenta 1999; 20: 669-76.

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.

Danielsson BR. Trichloroethylene: Summary and Evaluation of Effects on Reproduction. In Freij L(ed): "Effects on Reproduction of Tri- and Tetrachloroethylene. Kemi report 3/90." Nordic Council of Ministers. Stockholm: Print Graf, 1990:10-31.

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.

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.

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.

Galosy SS, Talamantes F. Luteotropic actions of placental lactogens at midpregnancy in the mouse. Endocrinology 1995;136:3993-4003.

Gerasimov MR, Schiffer WK, Marstellar D, Ferrieri R, Alexoff D et al. Toluene inhalation produces regionally specific changes in extracellular dopamine. Drug Alcohol Depend 2002;65:243-51.

Gospe SM Jr, Saeed DB, Zhou SS, Zeman FJ. The effects of high-dose toluene on embryonic development in the rat. Pediatr Res 1994;36:811-5.

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.

Hsu DZ, Liu MY. Sesame oil protects against lipopolysaccharide-stimulated oxidative stress in rats. Crit Care Med 2004;32:227-31.

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

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.

Kaur IP, Saini A. Sesamol exhibits antimutagenic activity against oxygen species mediated mutagenicity. Mutat Res 2000;470:71-6.

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.

Kondo H, Huang J, Ichihara G, Kamijima M, Saito I et al. Toluene induced nehavioral activation without affecting striatal dopamine metabolism in the rat: Behavioral and microdialysis studies. Pharmacol Biochem Behav 1995;51:97-101.

Kyyronen P, Taskinen H, Lindbohm ML, Hemminki K, Heinonen OP. Spontaneous abortions and congenital malformations among women exposed to tetrachloroethylene in dry cleaning. J Epidemiol Community Health 1989;43:346-51.

Landrigan PJ. Prevention of toxic environmental

illness in twenty-first century. Environ Health Perspect 1990;86:197-9.

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.

Lee CK, Lee CU, Kim JH, Son BC, Kim DH et al. Effects of Aroclor 1254 on the expression of rat placental PRL-family genes. Mol Cells 2003;15:114-21.

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.

Lindbohm ML, Taskinen H, Sallmen M, Hemminki K. Spontaneous abortions among women exposed to organic solvents. Am J Ind Med 1990;17:449-63.

Lipscomb JA, Fenster L, Wrensch M, Shusterman D, Swan S. Pregnancy outcomes in women potentially exposed to occupational solvents and women working in the electronics industry. J Occup Med 1991;33:597-604.

Ng TP, Foo SC, Yoong T. Menstrual function in workers exposed to toluene. Br J Ind Med 1992;49:799-803.

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.

Ogata M. Studies on the toxicity of toluene. Jpn J Ind Health 1981;23;3-9

Ono A, Sekita K, Ogawa Y, Hirose A, Suzuki S et al. Reproductive and developmental toxicity studies of toluene. II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats. J Environ Pathol Toxicol Oncol 1996;15:9-20.

Ono A, Sekita K, Ohno K, Hirose A, Ogawa Y et al. Reproductive and developmental toxicity studies of toluene. I. Teratogenicity study of inhalation exposure in pregnant rats. J Toxicol Sci 1995;20:109-34

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.

Rasmussen CA, Orwig KE, Vellucci S, Soares MJ. Dual expression of prolactin-related protein in decidua and trophoblast tissues during pregnancy in rats. Biol Reprod 1997;56:647-54.

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;268:3316-42.

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

Sorsa M, Hemminki K, Vainio H. Biologic monitoring of exposure to chemical mutagens in the occupational environment. Teratog Carcinog Mutagen 1982;2:137-50.

Stengard K, Hoglund G, Ungerstedt U. Extracellular dopamine levels within the striatum increase during inhalation exposure of toluene: a microdialysis study in awake, free moving rats. Toxicol Lett 1994; 71:245-55.

Svensson BG, Nise G, Erfurth EM, Nilsson A, Skerfving S. Hormone status in occupational toluene exposure. Am J Ind Med 1992; 22:99-107.

Tap O, Solmaz S, Polat S, Mete UO, Ozbilgin MK, Kaya M. The effect of toluene on the rat ovary: an ultrastructural study. J Submicrosc Cytol Pathol 1996;4:553-8.

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.

Truchon G, Tardif R, Brodeur J. Gas chromatographic determination of urinary o-cresol for the monitoring of toluene exposure. J Anal Toxicol 1996; 5:309-12.

Wiaderna D, Tomas T. Assessment of long-term neurotoxic effects of exposure to mesitylene (1,3,5-trimethylbenzene) based on the analysis of selected behavioral responses. Int J Occup Med Environ Health 2002;15:385-92.

Windham GC, Shusterman D, Swan SH, Fenster L, Eskenazi B. Exposure to organic solvents and adverse pregnancy outcome. Am J Ind Med 1991;20:241-59.

Yamaguchi M, Endo H, Thordarson G, Ogren L, Talamantes F. Modulation of mouse placental lactogen-I secretion in vitro: effects of progesterone and mouse placental lactogen-II. Endocrinology 1992;130:2897-905.

Zielhuis GA, Gijsen R, van der Guiden JWD. Menstrual disorders among dry-cleaning workers. Scand J Work Environ Health 1989;15:238-44.