

Toluene, Xylene, Trichloroethylene 투여가 흰쥐의 시상하부와 뇌하수체의 GnRH, GnRH Receptor, Pit-1 유전자 발현에 미치는 영향

인제대학교 의과대학 예방의학교실, 인제대학교 김해산업보건센터*, 전북대학교 의과대학 예방의학교실**

김대환 · 이 현 · 이채관* · 강대성* · 김정호 · 이종태 · 전진호 · 이채언 · 기노석**

— Abstract —

Effects of Toluene, Xylene and Trichloroethylene on the Regulation of GnRH, GnRH Receptor and Pit-1 Gene Expression in Male Rat Hypothalamus and Pituitary

Dae-Hwan Kim, Hun Lee, Chae-Kwan Lee*, Dae-Sung Kang*, Jung-Ho Kim,
Jong-Tae Lee, Jin-Ho Chun, Chae-Un Lee, No-Suk Ki**

*Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Inje University
Kimhae Industrial Health Center, Inje University*, Department of Preventive Medicine,
College of Medicine, Chonbuk University***

The workplace exposure of chemicals has steadily increased, therefore the concern for subsequent effect on reproductive outcome has been an important issue in occupational medicine. In previous studies, higher rates of spontaneous abortion, reduced fertility and menstrual disorder among women, and an impairment of sperm quantity and quality among men have been associated with a wide variety of chemical agents.

This study was conducted to evaluate the effects of toluene, xylene and trichloroethylene(TCE) injection on the mRNA levels of GnRH, GnRH receptor and Pit-1 genes in male rats hypothalamus and pituitary and the effects on the plasma levels of FSH, LH, prolactin and testosterone. Sprague-Dawley male rats were divided into five groups of five each according to concentration of toluene, xylene and TCE. The rats were injected subcutaneously to 0, 50, 100, 200, 400 mg/kg body weight/day of toluene, xylene and TCE, respectively for 6 days. Rat brains were excised and hypothalamus and pituitary were

* 본 논문은 1995년도 인제연구장학재단의 연구비 보조에 의한 것임.

separated. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and RNase protection assay(RPA) were used to evaluate the GnRH, GnRH receptor and Pit-1 mRNA levels. Plasma concentrations of FSH, LH, prolactin and testosterone were assayed by radioimmunoassay(RIA).

The results were as follows;

1. GnRH, GnRH receptor and Pit-1 mRNA levels in toluene and xylene injected groups, and GnRH receptor mRNA levels in TCE injected group were lowered dose-dependently. Especially, GnRH receptor and Pit-1 mRNA levels in 200 mg/kg of toluene injected group, and GnRH, GnRH receptor and Pit-1 mRNA levels in 400 mg/kg of toluene injected group were significantly lower than control group($p < 0.05$). GnRH receptor and Pit-1 mRNA levels in 400 mg/kg of xylene injected group, and GnRH receptor mRNA levels in 400 mg/kg of TCE injected group were significantly lower than control group($p < 0.05$).

2. The plasma levels of prolactin and testosterone in 400 mg/kg of toluene injected group, and LH in 100, 200 and 400 mg/kg of xylene injected group, and testosterone in 400 mg/kg of TCE injected group were significantly lower than control group($p < 0.05$).

In conclusion, we speculated that toluene and xylene affected reproductive system secondarily through hypothalamus-pituitary axis, and TCE affected directly through steroidogenesis. And we recommended that further study for assessment of the reproductive toxicity of mixed organic solvent exposures should be conducted.

Key Words : Toluene, Xylene and Trichloroethylene, GnRH, GnRH receptor, Pit-1

서 론

유기용제는 산업장에서 널리 사용되고 있으며, 근로자들의 유기용제 폭로기회는 점차 증가하고 있다(Landrigan, 1990). 따라서 유기용제 폭로로 인한 인체영향에 관한 연구가 비교적 활발하게 이루어져 지난 20여 년 동안의 연구는 주로 유기용제의 만성적 폭로로 인한 신경계 독성작용, 발암성, 돌연 변이성 및 기형발생에 관한 연구 등에 초점을 맞추어 많은 연구가 이루어져 왔다(Browman, 1982; Sorsa 등, 1982; Rom, 1992; Zenz, 1994).

최근 가입 연령의 여성 근로자 수가 증가됨에 따라 산업장 근로자들의 유기용제 폭로에 의한 생식기계 영향이 산업의학 분야에서 중요한 관심사로 대두되고 있으며, 최근 10여 년 간 남성과 여성 모두에서 화학물질의 폭로가 생식기계에 미치는 효과에 대해 많은 연구가 있었다(Rom, 1992).

전세계적으로 화학물질 사용의 증가는 남성에서 정액의 양과 질적인 저하를 초래하였으며, 동물실험에서도 정자형성과정(spermatogenesis)에 다양한 영향을 준다고 보고되었다(Carlsen 등, 1992). 인체의 정액생성 양은 동물보다 적고, 형태학적 이상

은 생쥐보다 많은 것으로 나타났다. 이러한 이유는 자세히 밝혀지지 않았지만 내분비적 영향이 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 유해물질에 대한 직업적 또는 환경적 폭로도 인체의 정액생성에 영향을 미치는 것 같다. 지금까지 알려진 정액생성에 영향을 미치는 직업적 폭로물질은 농약(dibromochloropropane, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid), 방사선(전리방사선, 초음파), 열, 중금속(납, 수은), ethylene glycol ethers, estrogens, trinitrotoluene 등이 있다(Lahdetie, 1995).

많은 역학적 연구에서 유기용제 폭로가 자연유산의 위험성을 증가시킨다는 보고가 있으며(McDonald 등, 1988; Lindbohm 등, 1990; Lipscomb 등, 1991), 특히 tetrachloroethylene(Kyyronen 등, 1989; Windham 등, 1991), trichloroethylene(Windham 등, 1991), toluene(Lindbohm 등, 1990; Ng 등, 1992b; Taskinen 등, 1994), xylene(Taskinen 등, 1994), aliphatic hydrocarbon(Lindbohm 등, 1990; Windham 등, 1991) 등의 폭로와 연관이 된다고 하였다. 또한 styrene의 고농도 폭로는 프로락틴(prolactin) 증가와 관련되며, 고프로락틴혈증(hyperprolactinemia)이 생리기능과 관계 있다고

하였다(Brown, 1991). Tetrachloroethylene (Zielhuis 등, 1989), trichloroethylene (Danielsson, 1990), toluene(Ng 등, 1992a) 등도 생리 장애와 관계된다는 제한된 증거들이 있다.

우리 나라에서는 1995년 모 전자부품회사에서 2-bromopropane이 함유된 유기용제를 사용한 근로자들에서 무월경과 정자감소증이 보고된 바 있으며(Park 등, 1997), 동물실험에서 난소기능부전 및 고환독성이 보고되었다(Kamijima 등, 1997; Ichihara 등, 1997).

지금까지 화학물질로 인한 생식기계 독성에 관한 연구는 직업적 또는 환경적 요인이 인체에 미치는 영향보다는 동물실험을 통해 주로 이루어져 왔고 동물실험에서 생식기계 독성이 있다고 해도 인체에 외삽하는 문제에 논란이 있었다. 이러한 이유로 생식독성 물질의 정확한 작용기전은 잘 알려져 있지 않았다(Zenz, 1994). 그러나 Svensson 등의 연구에서 toluene의 장기 폭포가 뇌하수체 호르몬의 정상적인 유리를 저해하고 있음을 관찰하여 뇌의 시상하부-뇌하수체 축(hypothalamus-pituitary axis)에 영향을 미치는 물질로 추정하였다(Svensson 등, 1992a; 이채연 등, 1995).

모든 척추동물은 시상하부-뇌하수체-생식소를 축으로 하는 생식 내분비 조절에 의해 생식활동이 조절된다. 즉, 시상하부에서 분비되는 생식소 자극분비 호르몬(gonadotropin-releasing hormone: GnRH)은 뇌하수체 전엽을 자극하여 황체형성 호르몬(luteinizing hormone: LH)과 여포자극 호르몬(follicle-stimulating hormone: FSH)을 합성, 분비시키며 이들 뇌하수체 호르몬은 혈관계를 통하여 생식소에 작용하여 각종 생리기능을 조절한다(Moore, 1987; 1990). 분비된 GnRH는 다양한 생리적 변화에 따라 맥동성으로 뇌하수체 전엽으로 이동하여 GnRH receptor와 결합하여 gonadotropin의 생합성과 분비를 조절한다(Kaiser 등, 1997). 생식소내의 조직들은 뇌하수체 호르몬들의 자극으로 여러 종류의 성 스테로이드 호르몬을 비롯한 생식소내인자들을 생성하여 생식세포의 형성과 발달, 생식, 생리 기능이 원활하게 이루어지도록 한다(Nagahama, 1987; Kwon 등, 1994).

Pit-1은 뇌하수체에서 특이적으로 발현되는 trans-acting factor로써 프로락틴과 성장호르몬 유전자 발

현에 관여한다(He 등, 1989; Ingraham 등, 1990; Ruvkun 등, 1991; Castrillo 등, 1991). 이 유전자 산물은 DNA에 대하여 결합능력을 가진 homeo-domain과 POU-specific domain을 가지며(DeRobertis 등, 1989; Rosenfeld 등, 1990), 전반부에는 프로락틴과 성장 호르몬 유전자의 promoter 부위에 대하여 활성을 지닌 transactivating domain이 존재한다. 따라서 Pit-1 유전자는 뇌하수체의 lactotroph와 somatotroph에서 프로락틴과 성장 호르몬 유전자의 발현에 필수적인 역할을 한다.

인체에 생식독성을 나타내는 물질을 지금까지의 임상적 연구와 실험적 연구를 종합하여 Nordic criteria를 제정하였는데(Taskinen, 1995), 연구상의 편견이나 자료의 불충분, 임상적 증거는 있으나 동물실험에서의 자료가 부족하여 인체에 생식독성이 있다고 분류하기 어려운 물질로 toluene, xylene, trichloroethylene(TCE) 등이 포함된다. 따라서 본 연구에서는 이들 toluene, xylene 및 TCE를 투여한 후 시상하부-뇌하수체-생식소 축으로 이루어진 생식기계에 대한 기전의 일부를 밝혀 보기 위해 FSH, LH, prolactin, testosterone 등의 호르몬 분비에 관여하는 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현양상을 동물실험을 통해 평가하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 유기용제 투여

체중이 250-300 g인 Sprague-Dawley 계 수컷을 실험대상으로 실험시작 일주일 전부터 사육장내 환경을 온도 22-25°C, 습도 57-60%, 12시간씩의 명암 주기하에서 적응시켰다. 실험동물은 toluene(Sigma, 99.8%), xylene(Sigma Aldrich, 98%), TCE(Aldrich, 99%)를 농도별로 5군(0, 50, 100, 200, 400 mg/kg body weight)으로 구분하여 각 군별로 5마리의 흰쥐에 동량의 sesame oil(Sigma)과 함께 각각 6일간 피하 주사하였다. 24시간 후 도살하여 호르몬 분석을 위하여 혈액을 채취한 후 혈장을 분리하였고 시상하부와 뇌하수체를 적출하여 -70°C에 보관하였다.

2. Total RNA 추출

Total RNA는 guanidium isocyanate phe-

nol-chloroform 방법(Chomczynski 등, 1987)으로 추출하였으며, 이 때 total RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처리한 증류수에 녹여 그 농도를 측정 한 후 70% ethanol에서 -70°C에 보관하였다. 추출된 RNA는 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 mRNA 양을 분석하기 위하여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 및 RNase protection assay(RPA)에 사용하였다.

3. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

투여된 유기용제에 의한 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현 억제효과의 유무를 확인하기 위하여 추출된 시상하부와 뇌하수체의 total RNA 중 400 mg/kg 군에 대하여 RT-PCR을 시행하였다.

각 유전자의 primer는 GnRH 유전자의 경우 sense primer(5'-TCCAG CCAGCACTG-3'), antisense primer(5'-GGGCCAGTGCATTA-3')를 합성하였으며, GnRH receptor 유전자의 경우 sense primer(5'-TGATTAG CCTGGACC-GCTCC-3'), antisense primer(5'-CAGCACA-AGTGGTTG GGTAG-3')를 합성하였다. Pit-1의 경우 sense primer(5'-TGTGGGAA TGAG-TTGCCAACCTTTCACCTCGG-3'), antisense primer(5'-CCAGC AGAGGTTGGTGCAGG-3')를 합성하였다. 각각 사용된 total RNA의 양을 보정하기 위하여 β -actin 유전자의 sense primer(5'-CCAAGGCCAA CCGCGAGAAGATGAC-3')와 antisense primer(5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3')를 합성하였다.

추출된 total RNA 1 μ g을 Moloney Murine Leukemia Virus(MMLV) RNase H reverse transcriptase(Promega)를 이용하여 역전사시킨 후 Taq polymerase(Promega)를 이용하여 cDNA 조각을 증폭시켰다. RT-PCR 조건은 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 30회 반복하였다. 합성된 cDNA는 1% agarose gel에서 전기영동하였으며, ethidium bromide로 염색한 후 ultraviolet illuminator로 확인하였다.

3. RNase Protection Assay(RPA)

합성한 primer를 이용한 RT-PCR을 통하여 증폭된 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 cDNA를 정제한 후 pGEM-T vector(Promega)에 subcloning하였다. Subcloning된 cDNA를 주형으로 α -[³²P]-UTP로 표지된 antisense RNA probe를 합성하였다(Ambion: In Vitro transcription Kit). 합성된 antisense RNA probe는 DNase I을 이용하여 주형 DNA를 제거한 다음, 6% acrylamide gel로 전기영동한 후 감광된 X-ray film을 이용하여 elution buffer(0.5 M NH₄OAC, 1 mM EDTA, 0.1% SDS)에서 추출하였다. 추출된 RNA probe는 scintillation counter를 이용하여 CPM을 측정하였다. 2~8×10⁴ CPM의 cRNA probe를 추출된 5 μ g total RNA로 섞은 다음 yeast RNA(5 μ g)를 가한 후 ammonium acetate(NH₄OAC)와 2.5배의 ethanol을 가하여 침전시켰다. 침전된 혼합물을 원심 분리하여 획득(1,500 rpm×15 min at 4°C), 건조하여(5 min, 상온) 20 μ l의 hybridization buffer(80% deionized formamide, 100 mM sodium citrate pH 6.4, 300 mM sodium acetate pH 6.4, 1 mM EDTA)에 녹인 다음(90°C, 3~4 min), 42°C~45°C에서 16시간 반응시켰다. 반응 후 200 μ l의 RNase A solution을 가한 후 37°C에서 30분간 반응시켜 single stranded RNA를 제거하였다. 300 μ l의 RNase inactivation and precipitation buffer(Ambion)를 가하여 RNase로 부터 보호된 RNA를 획득한 후 denaturing gel loading buffer(95% formamide, 0.05% xylene cyanol, 0.025% bromophenol blue, 0.5 mM EDTA, 0.025% SDS)에 녹였다. 획득된 RNA는 90°C에서 3~4분간 처리한 후 5% denaturing acrylamide gel(8% urea)에서 전기영동한 후 gel dryer로 건조시킨 후 X-ray film으로 감광하여 scanning densitometry(LKB-Bromma, USA)로 측정하였다.

4. Radioimmunoassay(RIA)

도살된 수컷 흰쥐의 혈액에서 혈장을 분리하여 -70°C에 보관한 후 혈중 FSH, LH, prolactin 및 testosterone의 분석은 radioimmunoassay

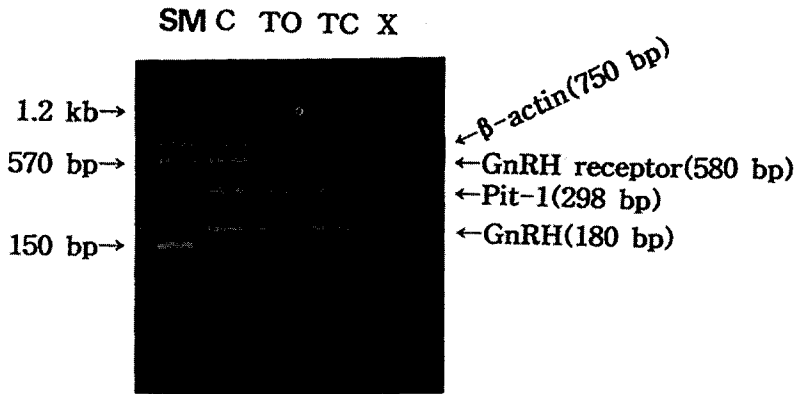


Fig. 1. RT-PCR of GnRH, GnRH receptor, Pit-1 cDNA in toluene, xylene, TCE injected male rat hypothalamus and pituitary. Total RNA (1 μ g) purified from 400 mg/kg injected groups was reverse-transcribed using the Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) RNase H reverse transcriptase (Promega) and amplified for 30 cycles using Taq DNA polymerase (Promega). C: control, TO: 400 mg/kg toluene injected group, TC: 400 mg/kg TCE injected group, X: 400 mg/kg xylene injected group, SM: size marker.

(RIA) 방법으로 시행하였으며 전남대학교 호르몬연구센터에 의뢰하여 분석하였다.

5. 자료의 통계적 분석

자료의 분석과 통계적 검정은 SAS 프로그램 (version 6.11)을 이용하였다. 결과는 평균±표준편차로 표시하였으며 측정자료들의 대조군에 대한 각 군 간의 차이를 비교하기 위하여 Wilcoxon rank sum test를 실시하였다.

연구결과

1. RT-PCR을 이용한 GnRH, GnRH receptor, Pit-1 cDNA 합성 및 subcloning

합성한 primer를 이용한 RT-PCR을 시행한 결과 GnRH의 경우 180 bp, GnRH receptor의 경우 580 bp, Pit-1의 경우 298 bp의 cDNA가 합성되었다 (Fig. 1). 이 결과는 primer 제작시 인용한 자료 (Gene Bank)와 일치된다.

2. Toluene, xylene, TCE 투여가 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현에 미치는 영향

Fig. 1의 결과를 토대로 toluene, xylene, TCE

를 농도별로 5군 (0, 50, 100, 200, 400 mg/kg body weight/day)으로 구분하여 각 군별로 5마리의 흰쥐에 6일간 피하 주사한 후 시상하부와 뇌하수체를 적출하여 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 mRNA의 양적인 변화를 RPA 방법으로 대조군과 비교하여 분석하였다.

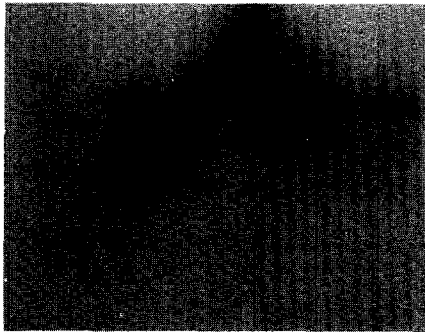
1) 농도별 toluene 투여가 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현에 미치는 영향

Toluene 투여군에서 투여량이 증가함에 따라 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 mRNA 양이 감소하는 경향을 나타내었다. GnRH mRNA는 200 mg/kg 투여군에서 부터, GnRH receptor와 Pit-1 mRNA는 100 mg/kg 투여군에서 부터 감소 효과를 나타내었다. 특히 200mg/kg 투여군에서 GnRH receptor와 Pit-1 mRNA가, 400 mg/kg 투여군에서는 GnRH, GnRH receptor와 Pit-1 mRNA가 대조군에 비하여 유의한 감소 ($p < 0.05$)를 보였다 (Fig. 2, 3).

2) 농도별 xylene 투여가 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현에 미치는 영향

Xylene 투여군에서 투여량이 증가함에 따라

UD C 50 100 200 400(mg/kg B.W.)



←β-actin(750 bp)
←GnRH receptor(580 bp)
←Pit-1(298 bp)
←GnRH(180 bp)

Fig. 2. Inhibitory effects of serially diluted toluene injection on the levels of GnRH, GnRH receptor, Pit-1 mRNA in male rat hypothalamus and pituitary. Total RNA (5 μg) was hybridized with ³²P-labeled antisense cRNA probes using the RPA method. ³²P-labeled β-actin cRNA probe was hybridized with each antisense probes to certify equal amount of loaded total RNA. C: control, UD: undigested antisense, 50, 100, 200, 400: amount of injected toluene.

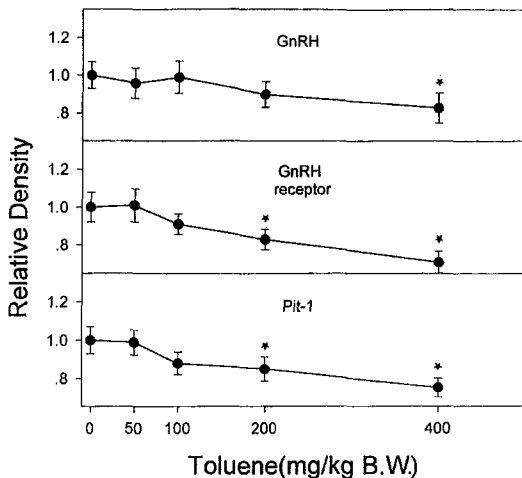


Fig. 3. Relative changes of GnRH, GnRH receptor and Pit-1 mRNA levels expressed by the relative densities of Fig. 2. Relative units were adjusted by comparative aberration of β-actin bands and expressed as each control bands over the value of 1.0. Experiments were repeated five times and quantified by scanning densitometry.

* : p<0.05 compared to control group.

GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 mRNA 양이 감소하는 경향을 나타내었다. GnRH와 GnRH receptor mRNA는 100 mg/kg 투여군에서 부터, Pit-1 mRNA는 200 mg/kg 투여군에서 부터 감소 효과를 나타내었으며, 특히 400 mg/kg 투여군에서 GnRH receptor와 Pit-1 mRNA가 대조군에 비하여 유의한 감소(p<0.05)를 보였다(Fig. 4, 5).

3) 농도별 TCE 투여가 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현에 미치는 영향

TCE 투여군에서 GnRH와 Pit-1 mRNA 양은 대조군에 비하여 뚜렷한 변화를 보이지 않았으며, GnRH receptor mRNA는 100 mg/kg 투여군에서 부터 감소효과를 나타내었으며, 특히 400mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 차이(p<0.05)를 보였다(Fig. 6, 7).

3. Toluene, xylene, TCE 투여에 의한 혈중 FSH, LH, prolactin 및 testosterone 농도의 변화

Toluene, xylene, TCE를 농도별로 5군(0, 50, 100, 200, 400 mg/kg body weight/day)으로 구

C 50 100 200 400(mg/kg B.W.)

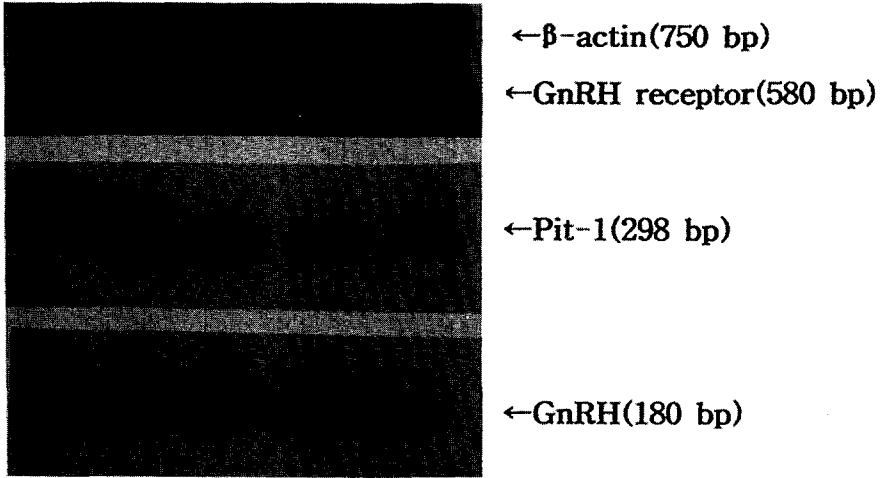


Fig. 4. Inhibitory effects of serially diluted xylene injection on the levels of GnRH, GnRH receptor, Pit-1 mRNA in male rat hypothalamus and pituitary. Total RNA (5 μ g) was hybridized with 32 P-labeled antisense cRNA probes using the RPA method. 32 P-labeled β -actin cRNA probe was hybridized with each antisense probes to certify equal amount of loaded total RNA. C: control, UD: undigested antisense, 50, 100, 200, 400: amount of injected xylene.

분하여 각 군별로 5마리의 흰쥐에 toluene, xylene, TCE를 6일간 피하 주사한 후 혈장을 분리한 다음 RIA 방법으로 FSH, LH, prolactin 및 testosterone 농도를 분석하였다.

1) 농도별 toluene 투여에 의한 FSH, LH, prolactin 및 testosterone 농도의 변화

Toluene 투여군에서 FSH는 대조군과 비교하여 뚜렷한 변화가 없었고, LH는 200 mg/kg 투여군에서부터 감소효과가 나타났으나 대조군에 비하여 유의한 차이는 없었다. Prolactin과 testosterone은 100 mg/kg 투여군에서부터 모두 감소효과가 나타났으며, 특히 400 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 감소($p < 0.05$)를 나타내었다(Fig. 8).

2) 농도별 xylene 투여에 의한 FSH, LH, prolactin 및 testosterone 농도의 변화

Xylene 투여군에 FSH는 대조군과 비교하여 뚜렷한 변화가 없었고, LH는 100 mg/kg 투여군에서부터 감소효과가 나타났으며, 특히 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 감소

($p < 0.05$)를 나타내었다. Prolactin은 100 mg/kg 투여군에서부터, testosterone은 200 mg/kg 투여군에서부터 감소효과가 나타났으나 대조군에 비하여 유의한 차이는 없었다(Fig. 9).

3) 농도별 TCE 투여에 의한 FSH, LH, prolactin 및 testosterone 농도의 변화

TCE 투여군에서 FSH, LH, prolactin은 대조군과 비교하여 뚜렷한 변화가 없었고, testosterone은 200 mg/kg 투여군에서부터 감소효과가 나타났으며, 특히 400 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 감소($p < 0.05$)를 보였다(Fig. 10).

고 찰

세계적으로 화학물질의 생산능력은 지난 40여 년간 약 350배 증가되어 6만여 개의 순수 화학물질과 2백만 개의 혼합화학물질로 상업화되어 생산되고 있다. 또한 매년 500-1,000개 정도의 새로운 화학물질이 개발되고 있어 우리생활에 광범위하게 이용되고 있다. 그러므로 이러한 유해화학물질의 폭로에

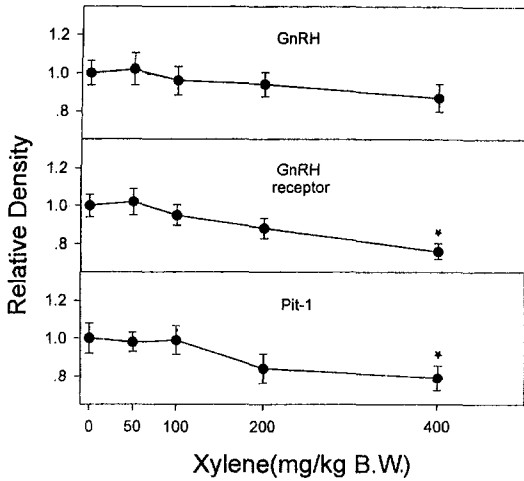


Fig. 5. Relative changes of GnRH, GnRH receptor and Pit-1 mRNA levels expressed by the relative densities of Fig. 4. Relative units were adjusted by comparative aberration of β -actin bands and expressed as each control bands over the value of 1.0. Experiments were repeated five times and quantified by scanning densitometry.
* : $p < 0.05$ compared to control group.

의한 위험은 산업장 뿐만 아니라 가정을 포함한 지역사회의 각종 환경에서도 집중되고 있는 실정이다 (Landrigan, 1990; Rall, 1990).

지난 30여 년 간 가임 연령의 여성근로자 수가 급증하고 있는 것이 세계적인 추세이며, 이에 따라 화학물질에 폭로된 여성 근로자들에서 생리불순, 자연유산, 불임, 선천성 기형, 저체중아 출산 등이 보고되었고, 남성생식기계에 대한 관심은 많이 간과되어 왔으나 최근에 성욕저하, 발기부전, 고환위축, 정액의 양 및 질적 저하 등이 보고되어 왔다(Raffle 등, 1994).

지금까지의 역학적 연구와 실험적인 연구를 토대로 하여 인체의 생식독성 물질을 분류한 Nordic criteria에 의하면, 1A 군은 인체 생식독성이 있는 물질 (toxic to human reproduction)로 우연과 편견이 합리적으로 배제된 역학적 연구에서 밝혀진 물질로 dibromochloropropane(DBCP)가 있고, 1B 군은 인체 생식독성의 가능성이 있는 물질 (possibly toxic to human reproduction)로 역학적 연구에서 우연과 편견의 배제가 불확실하고 실험연구의 증거가 있거나 인체에서 생식독성에 관한 case report 나 독성 자료가 있는 물질로 2-ethoxyethanol, n-

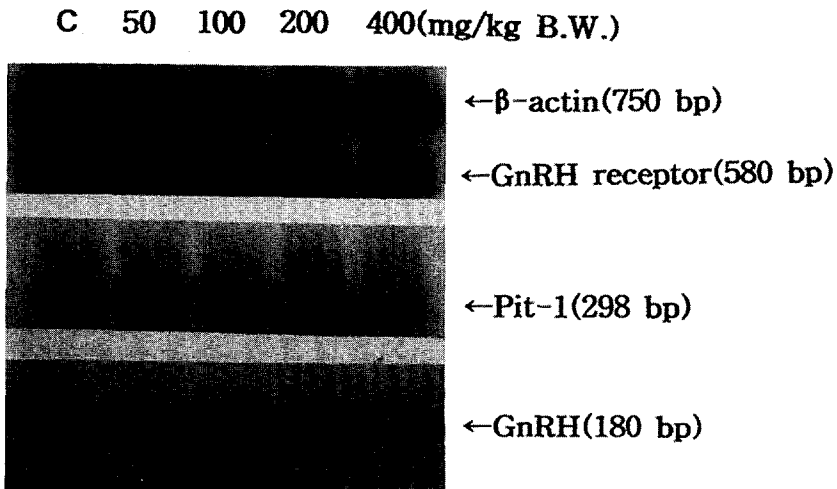


Fig. 6. Inhibitory effects of serially diluted TCE injection on GnRH, GnRH receptor, Pit-1 mRNA levels in male rat hypothalamus and pituitary. 5 μ g of total RNA was hybridized with 32 P-labeled antisense cRNA probe using the RPA method. 32 P-labeled β -actin cRNA probe was hybridized with each antisense probes to certify equal amount of loaded total RNA. C: control, UD: undigested antisense, 50, 100, 200, 400: amount of injected TCE.

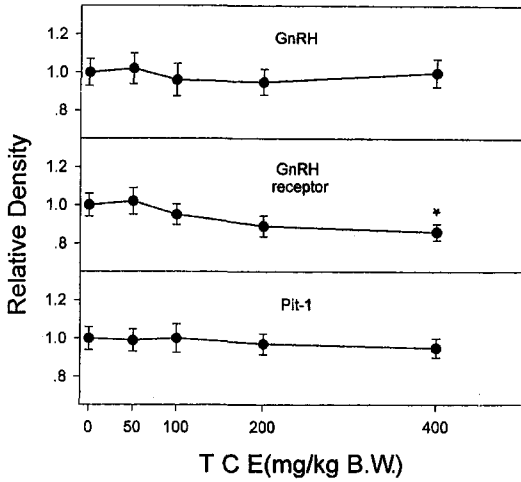


Fig. 7. Relative changes of GnRH, GnRH receptor and Pit-1 mRNA levels expressed by the relative densities of Fig. 6. Relative units were adjusted by comparative aberration of β -actin bands and expressed as each control bands over the value of 1.0. Experiments were repeated five times and quantified by scanning densitometry.

* : $p < 0.05$ compared to control group.

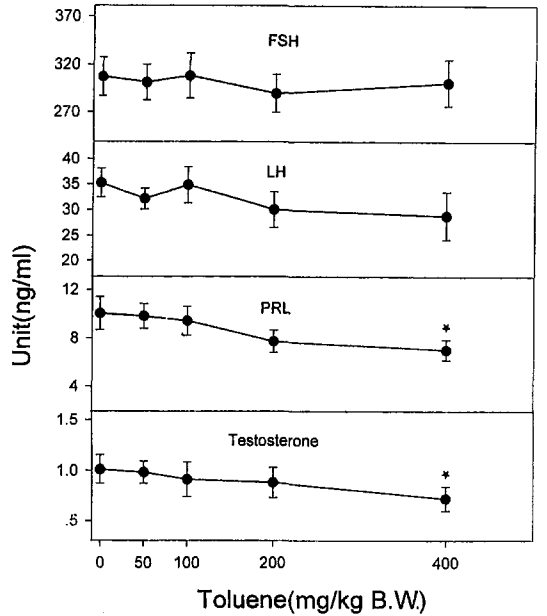


Fig. 8. The profiles of FSH, LH, prolactin and testosterone levels of serially diluted toluene injected male rats plasma. Experiments were repeated five times.

* : $p < 0.05$ compared to control group.

hexane, 2-methoxyethanol이 포함되며, 2군은 인체 생식독성의 가능성이 있는 물질 (possibly toxic to human reproduction)로 한가지 종의 동물실험에서 독성이 밝혀졌거나 역학적 연구에서 우연이나 편견이 합리적으로 배제되지 않은 물질로 tetrachloroethylene을 포함하고, 3군은 인체에 생식독성이 있다고 분류할 수 없는 물질 (not classifiable as to its reproductive toxicity to humans)로 임상적 증거는 있으나 동물실험에서의 자료가 부족하거나 연구상의 편견이나 자료의 불충분으로 우연이나 편견이 합리적으로 배제될 수 없어서 의견의 일치가 어려운 경우이며 toluene, trichloroethylene, xylene, 1,1,1-trichloroethane, styrene을 제시하였다.

그러나 역학적 연구에서 근로자들이 몇 가지 유기용제에 동시에 폭로되거나 혼합유기용제에 폭로되는 반면, 동물실험에서는 한 번에 한가지 화학물질로 수행되므로 기준의 적용에 어려움이 있다. 이상적인 분류는 혼합적 폭로시 생식독성 평가가 이루어져야 한다 (Taskinen, 1995).

본 연구에서는 Nordic criteria에서 3군으로 분류된 물질 중 toluene, trichloroethylene, xylene을 흰쥐에 피하 주사한 후 시상하부와 뇌하수체에서 생식 호르몬의 분비를 조절하는 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

시상하부-뇌하수체-생식소 축 (hypothalamus-pituitary-gonad axis)은 생식호르몬을 일차적으로 조절하는 중추이며, barbiturate, narcotics, marijuana 등은 이 조절중추를 억제함으로써 생식기능의 장애를 유발할 수 있다. 그 결과로 인한 gonadotropin과 prolactin 양의 변화는 불임, 성욕저하 등의 성기능에 장애를 초래하며, 동물실험에서는 암컷에서 자궁주기, 배란 및 임신능력을 억제하고 수컷에서 testosterone 분비를 억제하여 spermatogenesis 억제를 관찰할 수 있었다 (Smith, 1983).

Andersson 등 (1980, 1983)은 동물실험에서 toluene 등의 유기용제들은 시상하부에서 adrena-

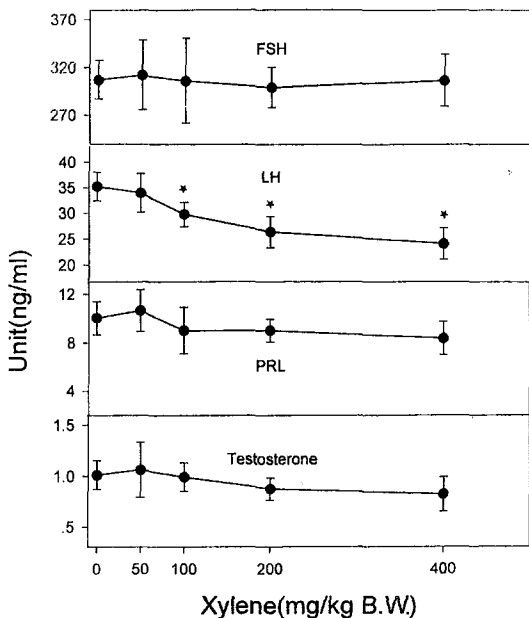


Fig. 9. The profiles of FSH, LH, prolactin and testosterone levels of serially diluted xylene injected male rats plasma. Experiments were repeated five times.

* : $p < 0.05$ compared to control group.

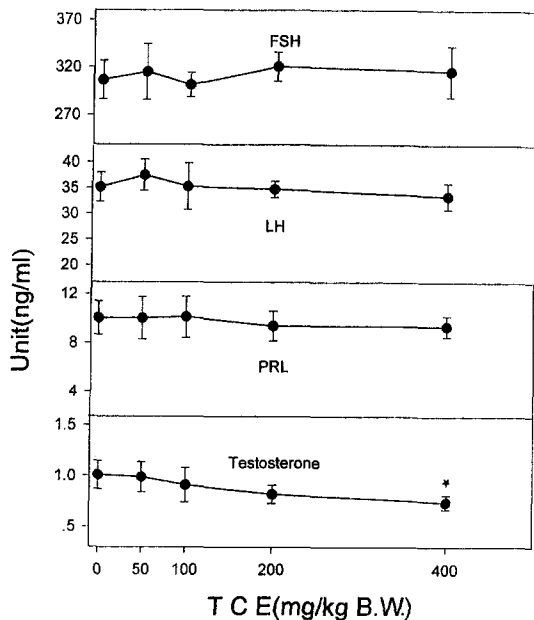


Fig. 10. The profiles of FSH, LH, prolactin and testosterone levels of serially diluted TCE injected male rats plasma. Experiments were repeated five times.

* : $p < 0.05$ compared to control group.

line, noradrenaline, dopamine의 양에 영향을 미치며, 이러한 신경전달물질들이 LH, FSH, prolactin과 TSH의 분비조절에 중요한 역할을 한다고 하였다. Prolactin 분비는 주로 뇌하수체와 용기누두의 dopamine에 의해 억제됨으로써 조절되며 (Fuxe 등, 1969; Hokfelt 등, 1972), 남성에서 dopamine이 LH와 FSH의 분비를 억제하며 (Leblanc 등, 1976; Huseman 등, 1980), 동물 실험에서 noradrenaline과 adrenaline이 LH와 FSH의 분비를 자극한다는 보고가 있었다 (Rubinstein 등, 1970; Drouva 등, 1976). 또한 Andersson 등(1981)은 toluene, o-xylene, p-xylene 및 ethylbenzene에 아급성 폭로된 수컷 쥐에서 뇌하수체와 용기누두에서 dopamine과 noradrenaline의 양이 증가하여 prolactin 분비가 감소한다고 설명하였다. 이러한 연구결과는 만일 어떤 유기용제나 그 대사산물이 주로 dopamine-like activity를 나타낸다면 혈청 FSH, LH와 prolactin이 감소될 것임을 의미한다. 본 연구에서도 toluene, xylene

투여군에서 투여량이 증가함에 따라 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 mRNA 양이 감소하는 경향을 나타내었고, TCE 투여군에서는 투여량에 비례하여 GnRH receptor mRNA 양이 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 toluene 200, 400 mg/kg과 xylene 400 mg/kg 투여군에서 GnRH receptor와 Pit-1 mRNA가, TCE 400 mg/kg 투여군에서 GnRH receptor mRNA 양이 유의한 감소를 보였다 (Fig. 2, 3, 4, 5). 그 결과 toluene과 xylene 투여군에서 혈청 LH와 prolactin의 양이 감소되는 경향을 보였고 (Fig. 8, 9), LH 양의 감소는 GnRH 및 GnRH receptor mRNA 양의 감소가 그 원인으로 생각된다. Toluene에 의한 prolactin의 감소는 Pit-1 유전자 발현억제에 의한 것과 Anderson 등(1980)이 보고한 toluene에 의한 dopamine 증가 효과와 직접적으로 연관되는 것으로 생각된다. Prolactin은 뇌하수체 전엽의 lactotroph cell에서 분비되며 prolactin 유전자 발현은 Pit-1 단백질에 의존적이다. Pit-1은 뇌하수체에서 발현되는

transacting factor로써 cyclic AMP에 의존적이다. 그리고 Pit-1 유전자의 발현에는 dopamine이 세포내 cyclic AMP의 농도를 감소시킴으로써 강력한 억제자로 작용한다(Elsholtz 등, 1991).

Mutti 등(1984a)은 도끼를 대상으로 한 styrene의 아급성 폭로로 인한 영향에 관한 연구에서 styrene의 폭로는 선조체 및 용기누두에서 dopamine 계의 고갈(striatal and tuberoinfundibular dopamine depletion) 원인이 된다고 보고하였다. 그리고 styrene에 직업적으로 폭로된 근로자들을 대상으로 한 연구에서 prolactin의 분비가 2배 이상 증가되는 것을 관찰하므로써 동물실험과 일치되는 결과를 얻었다고 보고하였으며, 이는 tuberoinfundibular dopaminergic system이 blood-brain barrier를 통과한 유기용제의 대사산물의 표적이 됨으로서 신경내분비계에 영향을 미치는 것으로 설명하였다(Mutti 등, 1984b; Arfini 등, 1987). 즉, 유기용제의 대사산물이 reactive carbonylic group을 가질 경우 dopamine과 비효소적으로 축합반응을 일으켜 dopamine 고갈이 되는 것으로 연구자들은 설명하였고, 생체의 실험에서 몇 가지 유기용제들은 그 대사산물이 dopamine과 축합하여 tetrahydroisoquinoline을 형성하는 것을 관찰하였는데, 즉 ethylene glycol derivatives는 glyoxylic acid를, chlorinated hydrocarbon류는 trichloroacetaldehyde를, 그리고 ethylbenzene, styrene 및 vinyltoluene은 phenylglyoxylic acid를 생체전환 과정에서 중간대사산물로 형성하고, 이렇게 형성된 glyoxylic acid와 phenylglyoxylic acid는 dopamine과 축합반응을 일으켜 tetrahydroisoquinoline을 형성함으로써 dopamine 고갈의 원인이 되어 중추신경계의 독성학적 영향에 중요한 역할을 담당하는 것으로 설명하고 있다(WHO, 1985; Mutti 등, 1987).

그러나 최근 toluene 폭로가 뇌하수체 기능을 조절하는 용기누두 도파민계 활동(tuberoinfundibular dopaminergic activity)과 신경 화학적 기전(neurochemical mechanism)에 장애를 일으킨다고 보고한 Svensson 등(1992a, 1992b)의 연구 결과에 의하면, toluene의 환경폭로 정도가 스웨덴의 허용기준인 80 ppm 이하의 작업장에서 근무하는 남성 근로자들에서 FSH, LH 및 testosterone 농

도가 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. Prolactin의 경우 혈중 toluene 농도와 역상관 관계를 나타내는 성적을 보고하여 toluene이나 이의 대사산물이 주로 dopamine-like activity를 하므로써 혈청 FSH, LH 및 prolactin의 혈중 농도가 감소하였고, toluene이 시상하부-뇌하수체 축에 영향을 미쳐 이차적으로 testosterone 분비가 감소한 것으로 보고하였다. 생식소 호르몬을 포함한 스테로이드 호르몬의 합성은 미토콘드리아 내막에 존재하는 다양한 종류의 효소 및 단백질들에 의하여 이루어지는데 Hanssen 등(1985)은 toluene에 의한 수컷 흰쥐에서의 혈중 testosterone 농도 감소와 함께 간세포 미토콘드리아 내막조직에서의 cytochrome P450을 비롯한 기타 효소활성의 변화를 보고한 바 있다. 최근의 연구결과에 따르면 스테로이드 호르몬의 합성에 필요한 콜레스테롤을 미토콘드리아 내막으로 유입시키는데 필수적인 STAR 단백질(steroidogenic acute regulatory protein)이 생식소 세포의 미토콘드리아에서 확인되었다(David 등, 1996). 이 STAR 단백질 역시 cytochrome P450과 마찬가지로 미토콘드리아 내막에 존재하며, 따라서 STAR 단백질의 기능도 toluene, xylene, TCE 등의 유기용제에 의하여 저해될 가능성이 높으며, 그 결과 생식소에서 스테로이드 호르몬 합성도 감소될 것이다. 본 연구의 결과에서 toluene, xylene 투여군에서 투여량이 증가함에 따라 GnRH 및 GnRH receptor mRNA의 양이 감소하는 경향을 나타내었으며, 그 결과 testosterone 분비에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 그러나 TCE 투여군에는 대조군과 비교하여 GnRH mRNA와 FSH, LH의 양이 뚜렷하게 감소되지 않았으나 혈중 testosterone의 양은 투여량에 비례하여 감소 효과를 보였다(Fig. 10). 그 원인은 투여된 TCE에 의한 미토콘드리아 내막의 STAR 단백질 활성 억제효과에 기인할 가능성이 있다. 그리고 toluene, xylene을 비롯한 기타 생식소의 스테로이드 호르몬 분비에 영향을 미치는 유기용제들에서도 시상하부와 뇌하수체에서의 GnRH, GnRH receptor에 대한 억제효과와 함께 생식소 세포의 STAR 단백질에 대한 활성의 억제효과가 복합적으로 작용하여 생식소의 스테로이드 호르몬 분비를 억제할 가능성이 있다고 생각된다.

이상과 같이 유기용제에 의한 생식소 호르몬 분비 억제효과는 시상하부와 뇌하수체에서의 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현 억제효과 이외에도 생식소 세포의 STAR 단백질의 활성을 포함한 생식소 세포에 대한 직접적인 호르몬 분비 억제효과에 관한 추가적인 연구도 이루어져야 하며, 실제로 산업장 근로자들은 단일 유기용제 보다는 주로 혼합 유기용제나 몇가지 유기용제에 동시에 폭로되므로 향후 이에 대한 생식독성 평가를 병행해야 할 필요성이 있다.

결 론

Toluene, xylene 및 trichloroethylene(TCE) 이 시상하부와 뇌하수체의 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현 및 생식기계에 작용하는 호르몬들의 변화양상을 알아보고자 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐에 각 물질의 투여 농도에 따라 0, 50, 100, 200, 400 mg/kg/day로 구분하여 각 군별로 5마리씩 6일간 피하주사한 후 시상하부와 뇌하수체를 적출하여 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 mRNA 양을 RT-PCR 및 RPA 방법으로 측정하였으며, FSH, LH, prolactin 및 testosterone은 RIA 방법으로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현양상은 toluene과 xylene 투여군에서 투여량이 증가함에 따라 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 mRNA 양이 감소하는 경향을 나타내었고, TCE 투여군에서는 투여량이 증가함에 따라 GnRH receptor mRNA 양이 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 toluene의 경우 200 mg/kg 투여군에서는 GnRH receptor와 Pit-1 mRNA가, 400 mg/kg 투여군에서는 GnRH, GnRH receptor와 Pit-1 mRNA 양이 대조군에 비하여 유의한 감소 ($p < 0.05$)를 보였으며, xylene 400 mg/kg 투여군에서 GnRH receptor와 Pit-1 mRNA가, TCE 400 mg/kg 투여군에서는 GnRH receptor mRNA 양이 대조군에 비하여 유의한 감소 ($p < 0.05$)를 보였다.
2. 생식기계에 작용하는 호르몬들의 변화양상은

toluene 400 mg/kg 투여군에서 prolactin과 testosterone이, xylene 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서 LH가, TCE 400 mg/kg 투여군에서는 testosterone이 대조군에 비하여 유의한 감소 ($p < 0.05$)를 보였다.

결론적으로 toluene과 xylene은 시상하부와 뇌하수체에서 생식 내분비를 조절하는 GnRH, GnRH receptor 및 Pit-1 유전자 발현을 억제함으로써 뇌하수체 호르몬의 정상적인 분비를 저해하고 있음이 관찰되어 이들 물질들이 시상하부-뇌하수체 축(hypothalamus-pituitary axis)에 작용하여 이차적으로 생식기계에 영향을 미치는 것으로 생각되며, TCE의 경우 GnRH, Pit-1 mRNA 및 FSH, LH 양의 뚜렷한 변화없이 혈중 testosterone 농도가 감소한 것은 steroidogenesis 과정에 대한 직접적인 영향으로 생각된다. 그러나 실제로 산업장 근로자들은 단일 유기용제 보다는 주로 혼합 유기용제나 몇가지 유기용제에 동시에 폭로되므로 향후 이에 대한 생식독성 평가를 병행해야 할 필요성이 있다.

인용문헌

- 이재연, 이종태, 정의화, 손혜숙, 문덕환, 진진호, 강정학, 이창희, 김희동, 김종한, 정귀옥. 톨루엔을 포함한 유기용제의 직업적 폭로로 인한 신경내분비계 영향. 대한산업의학회지. 1995;7(2):362-374.
- Andersson K, Fuxe K, Toftgard R, Nilsen OG, Eneroth P, Gustaffsson JA. Toluene-induced activation of certain hypothalamic and median eminence catecholamine nerve terminal systems of the male rat and its effects on anterior pituitary hormone secretion. *Toxicol Lett.* 1980;5:393-398.
- Andersson K, Fuxe K, Toftgard R, Nilsen OG, Eneroth P, Gustaffsson JA. Production of discrete changes in dopamine and noradrenalin levels and turnover in various parts of the rat brain following exposure to xylene, o-, m-, and p-xylene and ethylbenzene. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1981;60:535-548.
- Andersson K, Nilsen OG, Toftgard R, Eneroth P. Increased amine turnover in several hypothalamic noradrenalin nerve terminal systems and changes in prolactin secretion in male rat by exposure to various concentrations of toluene.

- NeuroToxicology. 1983;4(4):43-56.
- Arfini G, Mutti A, Vescovi P, Ferroni C, Ferrari M, Giaroli C, Passeri M, Franchini I. Impaired dopaminergic modulation of pituitary secretion in workers occupationally exposed to styrene: Further evidence from PRL response to TRH stimulation. *J Occ Med.* 1987;29:826-830.
- Browman MC. Handbook of carcinogens and hazardous substances. New York: Marcel Dekker Inc., 1982.
- Brown NA. Reproductive and developmental toxicity of styrene. *Reprod Toxicol.* 1991;5:3-29.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992;305:609-613.
- Castrillo J, Theill LE and Karin M. Function of the homeo-domain protein GHF-1 in pituitary cell proliferation. *Science.* 1991;253: 197.
- Chomczynski P and Sacchi N. Single-step methods of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
- 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.
- David HT, Wang XJ, Keyes PL, Kostyo JL, Stocco DM. Expression of the Steroidogenic Acute Regulatory protein in the corpus luteum of the rabbit: Dependence upon the luteotropic hormones, Estradiol-17. *Biology of Reproduction.* 1996;55:868-875.
- DeRobertis EM, Oliver G and Wright CV. Determination of Axial polarity in the vertebrate embryo: Homeodomain proteins and homeogenetic induction. *Cell.* 1989;57:189-191.
- Drouva SV, Gallo R. Catecholamine involvement in the episodic leutenizing hormone release in adult ovariectomized rats. *Endocrinology.* 1976;99:651-658.
- Elsholtz HP, Lew AM, Albert PR and Sundmark VC. Inhibitory control of prolactin and Pit-1 promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. *J Biol Chem.* 1991;266:22919-22925.
- Fuxe K, Hokfelt T. Catecholamines in the hypothalamus and the pituitary gland. In Ganong WF, Martini L(eds): "Frontiers in Neuroendocrinology." New York: Oxford University Press, 1969: 47-96.
- Hansson T, Pettersson BM, Eneroth P, Gustafsson JA. Neonatal exposure to toluene: Effects on the development of liver microsomal cytochrome P450 and serum hormone levels in the rat. *Toxicology (Netherlands).* 1985;37:39-50.
- He X, Treacy MN, Simmons DM, Ingraham HA, Swanson LW, Voss JW, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG. Expression of large family of POU-domain regulatory genes in the mammalian brain development. *Nature.* 1989;340:35.
- Hokfelt T, Fuxe K. Effects of prolactin ergot alkaloids on the tubero-infundibular dopamine(DA) neurons. *Neuroendocrinology.* 1972;9:100-112.
- Husman CA, Kugler JA, Schneider IG. The mechanism of dopaminergic suppression of gonadotropin secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51:209-214.
- Ichihara G, Asaeda N, Kumazawa T, Tagawa Y, Kamijima M, Yu X, Kondo H, Nakajima T, Kitoh J, Moon YH, Hisanaga N, Takeuchi Y. Testicular and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane, a substitute for ozone layer-depleting chlorofluorocarbons. *J Occup Health.* 1997; 39:57-63.
- Ingraham HA, Flynn SE, Voss JW, Albert VR, Kapiloff MS, Wilson L and Rosenfeld MG. The POU-specific domain of pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA bindings and DNA- development pit-1-pit-1 interaction. *Cell.* 1990;61:1021.
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone(GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid level in vitro. *Endocrinology.* 1997;138(3):1224-1231.
- Kamijima M, Ichihara G, Kitoh J, Tsukamura H, Maeda K, Yu X, Xie Z, Nakajima T, Asaeda N, Hisanaga N and Takeuchi Y. Ovarian toxicity of 2-bromopropane in the non-pregnant female rat. *J Occup Health.* 1997;39:144-149.
- Kwon HB and Ahn RS. Relative roles of theca and granulosa cells in ovarian follicular steroidogenesis in the amphibian, *Rana nigromaculata.* *Gen Comp Endocrinol.* 1994:207-214.

- 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;43:346-351.
- Lahdetie J. Occupation- and exposure-related studies on human sperm. *J Occup Environ Med.* 1995;8:922-930.
- Landrigan PJ. Prevention of toxic environmental illness in twenty-first century. *Environmental Health Perspectives.* 1990;86:197-199.
- Leblanc H, Lachelin G, Abu-Fadil S, Yen S. Effects of dopamine infusion on pituitary hormone secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1976;43:668.
- Lindbohm ML, Taskinen H, Sallmen M, Hemminki K. Spontaneous abortions among women exposed to organic solvents. *Am J Ind Med.* 1990;17:449-463.
- 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.
- McDonald AD, McDonald JC, Armstrong B, Cherry NM, Cote R, Lavoie J, Nolin AD, Robert D. Fetal death and work in pregnancy. *Br J Ind Med.* 1988;45:148-157.
- Moore FL. Regulation of reproductive behaviors. In: *Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles.* D. O. Norris and R. E. Jones, eds. Plenum Press, 1987; pp. 505-522.
- Moore FL. Reproductive endocrinology of amphibians. *Reproduction in mammalian vertebrates.* 1990;Chapter 6: 207-222.
- Mutti A, Falzoi M, Romanelli A, Franchini I. Regional alterations of brain catecholamines by styrene exposure in rabbits. *Arch Toxicol.* 1984a;55:173-177.
- Mutti A, Vescovi P, Fazoi M, Arfini G, Valenti G, Franchini I. Neuroendocrine effects of styrene on occupationally exposed workers. *Scand J Work Environ Health.* 1984b;10:225-228.
- Mutti A, Franchini I. Toxicity of metabolites to dopaminergic systems and the behavioral effects of organic solvents. *Br J Ind Med.* 1987;44:721-723.
- Nagahama Y. Gonadotropine action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zool. Sci.* 1987;4:209-222.
- Ng TP, Foo SC, Yoong T. Menstrual function in workers exposed to toluene. *Br J Ind Med.* 1992a;49:799-803.
- Ng TP, Foo SC, Yoong T. Risk of spontaneous abortion in workers exposed to toluene. *Br J Ind Med.* 1992b;49:804-808.
- Park JS, Kim YH, Park DW, Choi KS, Park SH, Moon YH. An outbreak of hematopoietic and reproductive disorders due to solvents containing 2-bromopropane in an electronic factory, South Korea; Epidemiological survey. *J Occup Health.* 1997;39:138-143.
- Raffle PAB, Lee WR, McCallum RI, Murray R. *Hunter's Disease of Occupations.* 2nd ed. Boston/Toronto, Little, Brown and Company, 1994;723-743.
- Rall D. Conference on environmental health in 21st century. *Environmental Health Perspectives.* 1990;86:175-176.
- Rom WN. *Environmental and Occupational Medicine.* Boston: Little Brown and company, 1992;147-170.
- Rosenfeld MG. POU-domain transcription factors: powerful developmental regulators. *Genes Dev.* 1991;5:897.
- Rosenfeld MG and Swanson LW. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Gene Dev.* 1990;4:495.
- Rubinstein L, Sawyer CH. Role of catecholamines in stimulating the release of pituitary ovulatory hormone(s) in the rat. *Endocrinology.* 1970;86:988-995.
- Ruvkun G and Finney M. Regulation of transcription and cell identity by POU-domain proteins. *Cell.* 1991;64:475.
- Sorsa M, Hemminki K, Vainio H. Biologic monitoring of exposure to chemical mutagens in the occupational environment. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis.* 1982;2:137-150.
- Svensson BG, Nise G, Erfurth EM, Nilsson A, Skerfving S. Hormone status in occupational toluene exposure. *Am J Ind Med.* 1992a;22:99-107.
- Svensson BG, Nise G, Erfurth EM, Olsson H. Neuroendocrine effects in printing workers exposed to toluene. *Br J Ind Med.* 1992b;49:402-408.

- Smith CG. Reproductive toxicity: Hypothalamic-pituitary mechanisms. *Am J Ind Med.* 1983;4:107-112.
- Taskinen H. Nordic criteria for reproductive toxicity, *J Occup Environ Med.* 1995;8:970-973.
- Taskinen H, Kyyronen P, Hemminki K, Hoikkala M, Lajunen K, Lindbohm ML. Laboratory work and pregnancy outcome. *J Occup Med.* 1994; 36:311-319.
- WHO. Environmental health 5(Organic solvents and the central nervous system). Copenhagen: WHO, 1985.
- Windham GC, Shusterman D, Swan SH, Fenster L, Eskenazi B. Exposure to organic solvents and adverse pregnancy outcome. *Am J Ind Med.* 1991;20:241-259.
- Zenz Carl. *Occupational Medicine.* 3rd ed. St. Louise, Mosby-Year Book Inc., 1994;pp. 836-874.
- Zielhuis GA, Gijsen R, van der Guiden JWD. Menstrual disorders among dry-cleaning workers. *Scand J Work Environ Health.* 1989;15:238.