한국산업위생학회지 제14권 제3호(2004년 12월)
J Korean Soc Occup Environ Hyg 2004;14(3):203-212

트리클로로에틸렌이 흰쥐의 태반 기능과 발생에 미치는 영향

강정학[1)] · 이채관 · 문덕환‡ · 손병철 · 김대환 · 이창희 · 김휘동 · 김정원 · 김종은 · 이채언

인제대학교 산업의학연구소 · 부산백병원 산업의학과 · 인제대학교 대학원 의학과[1)]

Effects of Trichloroethylene on the Placental Function and Reproduction in Rat

Jeong-Hak Kang[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

Institute of Industrial Medicine & Department of Occupational and Environmental Medicine, Busan Paik Hospital, Inje University
Department of Medicine, Graduate School, Inje University[1)]

This study aimed at investigating the toxic effects of trichloroethylene (TCE) on the placental function and reproduction in rat. For these study placental prolactin-growth hormone (PRL-GH) family gene expression, placental trophoblast cell frequency and reproductive data were analyzed. Pregnancy of the Sprague-Dawley rats were checked by the presence of the copulatory plug or sperm in the vaginal smear and defined as the pregnant day (PD) 0. The pregnant rats were divided into the three groups. The control group was intraperitoneally injected with sesame oil. The remaining groups were injected with 100 or 500mg/kg B.W/day of TCE resuspended with sesame oil from PD 7-11 or 16-20. Rats were sacrificed at PD 11 and 20. mRNA levels of PRL-GH family and Pit-1a, b isotype genes were analyzed by Northern blot hybridization and Reverse transcription-polymerase chain reaction. Hormone concentration was analyzed by radioimmunoassay. Frequency of placental trophoblast cells were observed by histochemical study. Reproductive data such as placental and fetal weights pregnancy period, and litter size were surveyed at PD 20 and after birth. Statistical analysis was carried out by the SAS program (version 8.1).

mRNA levels of PRL-GH family genes such as placental lactogens and placental prolactin like proteins were reduced by TCE administration. mRNA level of Pit-1a, b isotype genes that induce the expression of PRL-GH family genes were also reduced by TCE administration. Placental lactogen Ⅱ concentration in the placenta, fetus and maternal blood were decreased by TCE administration. Exposure to a high dose of TCE reduced the frequency of the spongiotrophoblast cell in junction zone. Reproductive data such as placental and fetal weights, litter size were reduced, and pregnancy period was extended in the TCE exposed group than control. These data suggested that TCE disrupts the ordered functions of placenta and these effects lead to the reproductive disorder in rat.

Key Words : Trichloroethylene, Pit-1 gene, placenta, PRL-GH family gene, reproduction.

접수일 : 2004년 5월 24일, 채택일 : 2004년 12월 16일
* 이 연구는 2003년도 인제대학교 부설연구소 연구비 지원에 의한 것임.
‡ 교신저자 : 문덕환 (부산시 진구 개금동 인제대학교 의과대학 산업의학과,
Tel : 051-890-6745, E-mail : iimmdh@inje.ac.kr)

Ⅰ. 서 론

트리클로로에틸렌은 할로겐화탄화수소의 대표적인 물질로서 산업장에서 금속기기 부품의 탈유지 세정제, 일반 용제, 도료의 희석 및 제거제, 영화 필름의 세정제, 렌즈 유리 세척제 등의 용도로 사용된다(김창엽 등, 1989). 인체로의 흡수는 주로 증기 상태로 확산되어 호흡기로 흡수되거나 피부를 통해 흡수되며, 흡수된 트리클로로에틸렌은 중추신경계 억제 작용, 간 손상, 심혈관계 손상 등을 초래하며(Boyes 등, 2000), 대사 과정을 거쳐 트리클롤롤아세틱산과 트리클롤롤에탄올로 전환되어 요를 통해 배설된다(Smith, 1966; Mitchell, 1969; Barret 등, 1987). 산업화에 따라 가임 연령의 여성 근로자수가 증가되어 유기용제 폭로가 여성근로자들의 생식기능에 미치는 영향에 관한 연구는 국내외적으로 산업의학의 중요한 연구 분야 중 하나이다(Rom, 1998). 많은 역학적 연구에서 유기용제 폭로가 자연 유산의 위험성을 증가시킨다는 보고가 있으며(McDonald 등, 1988; Lindbohm 등, 1990; Lipscomb 등, 1991), 특히 트리클로로에틸렌(Windham 등, 1991), 테트라클로로에틸(Kyyronen 등, 1989; Windham 등, 1991), 톨루엔(Lipscomb 등, 1991), 자이렌(Taskinen 등 1994), aliphatic hydrocarbon (Lipscomb 등, 1991; Windham 등, 1991)등의 폭로와 연관된다고 보고 되었다. 그리고 트리클로로에틸렌, 테트라클로로에틸렌, 톨루엔 등은 생리장애와도 관계된다는 제한된 증거들이 있다(Zielhuis 등, 1989; Danielsson, 1990; Ng 등, 1992).

태반은 포유동물의 발생에 특이적인 기관으로써 임신 초기에 형성되어 출산시까지 존재하며 흰쥐의 경우 크게 두 부위, 즉 junctional zone과 labyrinth zone으로 나누어진다. 주요 구성 세포 종은 glycogen, syncytial, spongiotrophoblast, trophoblast giant 세포 등 4종으로 구분된다. 임신 기간 동안 흰쥐 태반의 spongiotrophoblast와 trophoblast giant 세포에서는 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 임신 기간 동안 fetus와 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, 1991; 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 발현 조절인자로 작용한다(Lee 등, 1998; 1999).

지금까지의 역학적 연구와 생체 실험적 연구를 토대로 인체의 생식 독성 물질을 분류한 Nordic criteria에 의하면 트리클로로에틸렌은 임상적 증거는 있으나 동물실험에서의 자료가 부족하거나 연구 상의 편견이나 자료 불충분 등의 이유로 인체에 생식 독성이 있다고 분류할 수 없는 물질인 3군에 포함된다(Danielsson, 1990). 그러나 트리클로로에틸렌, 톨루엔 등 유기용제의 장기 폭로가 뇌하수체 호르몬의 정상적인 유리를 저해하며, 시상하부-뇌하수체-생식소 축의 기능에 영향을 미친다는 다수의 연구가 있었다(이채언 등, 1995; 김대환 등, 1998; Zielhuis 등, 1989; Svensson 등, 1992). 특히 김대환 등(1998)은 트리클로로에틸렌 등의 유기용제가 흰쥐 뇌하수체의 gonadotropin releasing hormone 수용체 유전자와 뇌하수체 호르몬 유전자의 발현 조절 인자인 Pit-1a, b isotype 유전자의 발현을 억제함으로서 시상하부-뇌하수체-생식소 축에 영향을 미친다고 보고하였다(김대환 등, 1998). 그러나 이들 유기용제가 포유동물 발생에 특이적 기관인 태반의 기능에 미치는 영향에 관한 연구는 보고 된 바 없으며, 생식에 미치는 영향에 관한 연구도 부족한 실정이다. 이 연구는 트리클로로에틸렌에 노출된 흰쥐에서 태반의 PRL-GH군 호르몬 유전자발현과 이 유전자들의 발현조절인자로 알려진 Pit-1 a, b 유전자의 발현, 그리고 발생학적 자료를 조사하여 트리클로로에틸렌이 흰쥐의 태반기능과 생식에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

Ⅱ. 연구 재료 및 방법

1. 실험동물 관리 및 트리클로로에틸렌 투여

1) 실험 동물관리

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 copulatory plug 또는 vaginal smear에 의해 정자가 관찰된 날을 임신 0일로 설정하였다. 실험동물은 인제대학교 동물사육실 운영규칙에 따라 관리하였다.

2) 트리클로로에틸렌 투여

트리클로로에틸렌(Sigma, 99.%)은 참고문헌(Torrason 등, 1999)을 참고하여 sesame oil(0.5ml)과 혼합하여 임신이 확인된 흰쥐에 복강 주사하였고, 대조군은 동량의 sesame oil을 주사하였다. 실험군은 대조군, 100mg/kg body weight(BW 투여군, 500mg/kg BW 투여군의 3군이었다. 실험에 사용된 임신된 흰쥐는 태반의 PRL-GH군 유전자 분석, litter size 및 태

반의 무게검량과 조직학적 분석에 10마리, 임신기간과 infant의 체중검량 등에 10 마리였다. 주사 시간은 오전 10시였고 투여 기간은 일부는 PL-I 유전자 분석을 위하여 임신 7일부터 11일 까지, 그리고 기타 유전자 분석, 태반과 infant의 무게 검량, 조직학적 분석을 위하여 임신 16일부터 20일 까지였다. 임신 11일과 20일에 각각 실험 군별로 3마리와 7마리씩 도살하여 태반과 fetus의 뇌를 적출 하였다. 적응, 교배 및 임신유도, 트리클로로에틸렌투여, 도살, 발생학적 자료조사 등의 사육일정은 Fig 1과 같다.

2. 실험 방법

1) 혈중 총삼염화물 분석

총삼염화물은 자외선 분광광도기(UV spectrophotometry)를 이용한 알카리 피리딘법으로 분석하였다.

2) RNA 추출

적출된 시료에 Tri-Reagent (Sigma, 1.0 ㎖/0.1 g tissue)를 가한 후 homogenizer (Ingenieurbüro Co.)를 사용하여 얼음에 시험관을 담은 상태로 약 30초간 마쇄하였다. 마쇄액이 담긴 시험관에 동량의 chloroform을 넣고 실온에서 15분간 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 260nm. 와 280nm. 에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, 280nm. 에 대한 260nm. 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 합성 할 수 있는 primer를 아래와 같이 제작하였다. Sense primer 5'-tgtagttgccaacc-tttcacctcgg-3', antisense primer 5'-ccagcaga-ggttggtgcagg-3'. 정량을 위하여 total RNA의 양(0.1 μg, 0.5 μg, 1.0 μg)과 합성 반복회수(15회, 20회, 25회, 30회)에 따라 유효범위(0.5 μg, 25 회 합성)를 확인하였다. 추출된 total RNA 0.5 μg을 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 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)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 (1×10^9 cpm/㎖)를 첨가하여 60℃에서 18시간 동안 hybridization하였다.

Hybridization buffer의 조성은 50% deionized formamide, 5X SSC (1X SSC : 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate), 5X Denhardt's solution (1 X Denhardt's solution : 0.01 % polyvinyl pyrrolidone, 0.01 % Ficoll and 0.01 % BSA), 0.1% SDS, 2 mg/㎖ salmon sperm DNA 이다. Hybridization 후 비 특이적인 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 [α-^{32}P] dCTP (Amersham)를 사용하여 합성하였다. 합성된 cDNA probe를 Nick column (Pharmacia Co.)으로 정제하고, SET buffer (0.1% SDS, 1mM EDTA, 10mM Tris, 10mM dithiothreitol)로 추출하였다. cDNA probe의 활성은 1×10^9 cpm/μg 이상으로 하였다. 감광된 필름은 X-ray 필름 자동 현상기(RG II, Fuji Co.)를 사용하여 현상한 후 Kodak Digital Camera와 ID Image Analysis program을 사용하여 분석하였다.

5) 혈액, fetus, PL-Iv, II 농도 분석

태반과 fetus의 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 검사 (Histological study)

임신 20일에 적출된 흰쥐 태반을 15㎖의 perfusion buffer(phosphate- buffered saline, 4% paraformaldehyde)로 4℃에서 2시간 처리한 후 파라핀 용액으로 고형화하였다. 파라핀 블록을 820 Histocut Rotary Microtome을 이용하여 6μm 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

태반의 무게와 litter size는 임신 20일에

Table 1. Mean total trichloro-compound concentration in maternal urine according to the trichloroethylene exposure status

mean±S.D (mg/L)

Pregnancy day	Control	Exposed group	
		100mg/kg BW	500mg/kg BW
Day 7-11 (n=3)	< [a] LOD	[b] 523.8±118.2	[b]c 1092.2±181.8
Day 16-20 (n=7)	< LOD	[b] 512.1±105.2	[bc] 1026.4±175.5

[a] Limit of Detection
[b] and [c] indicate the significantly difference ($p<0.05$) compared with the control and 100mg exposed group, respectively.
p value was calculated by Mann-Whitney (U) test.

제왕절개 하여 조사하였으며, infant의 체중은 출산 직후, 출산 1주 후, 출산 4주 후에 각각 측정하여 대조군과 비교하였다. 임신 기간은 합사 후 자궁 내 점액질(vaginal smear)에서 정자가 관찰된 날과 출산일을 기준하였다.

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.

Ⅲ. 결 과

1. 요중 총삼염화물 농도

임신 11일에 도살된 대조군의 요중 총삼염화물의 평균농도는 검출한계이하, 100mg 투여군은 523.8mg/ℓ, 500mg 투여군은 1092.2mg/ℓ로 조사되어 투여 농도에 비례하여 통계적으로 유의하게 증가되었다($p<0.05$). 임신 20일에 도살한 경우도 대조군의 요중 총삼염화물의 평균농도는 검출한계이하, 100mg 투여군은 512.1mg/ℓ, 500mg 투여군 1026.4 mg/ℓ로 조사되어 투여 농도에 비례하여 통계적으로 유의하게 증가되었다($p<0.05$)(Table 1).

2. PRL-GH군과 Pit-Ia, b isotype 유전자 발현 분석

PL-I 유전자의 발현은 대조군에 비해 트리클로로에틸렌 투여군에서 투여량에 비례하여 감소되었으며, 500mg 투여군에서는 통계적으로 유의하였다($p<0.05$). PL-Iv 유전자의 발현은 변화가 없었다. PL-II 유전자의 발현은 트리클로로에틸렌 투여량에 비례하여 감소되었으며 500mg 투여군에서는 통계적 유의하였다(Fig.2).

PPLP-A와 B 유전자의 발현은 대조군에 비해 트리클로로에틸렌 투여군에서 투여량에 비례하여 감소되었으며 PLP-B의 경우 500mg 투여군에서 통계적으로 유의하였다($p<0.05$). PLP-C 유전자의 발현도 트리클로로에틸렌 투여량에 비례하여 감소되었으며 500mg 투여군의 경우 통계적 유의하였다($p<0.05$). PLP-Cv 유전자의 발현은 100mg 투여군에서는 변화가 없었으나 500mg 투여군에서 통계적 유의하게 감소되었다($p<0.05$). PLP-D 유전자의 발현도 PLP-Cv와 같은 경향이었다. dPRP 유전자의 발현은 100mg과 500mg 투여군 모두 통계적 유의하게 감소되었다($p<0.05$)(Fig.3). PRL-GH군 호르몬 유전자의 발현유도인자로 알려진 Pit-1a, b isotype 유전자의 발현은 a, b 모두 트리클로로에틸렌 투여 농도에 비례하여 감소하였으며, 500mg 투여군에서는 통계적으로 유의하였다($p<0.05$) (Fig.4).

3. 태반, fetus, 모체혈액의 PL-Iv, Ⅱ 농도

임신 19일에 조사된 PL-Iv, PL-II의 평균 농도는 태반과 모체에서 높고 배아에서 상대적으로 낮았다. 폭로 상태에 따른 태반의 평균 PL-Iv과 PL-II 농도는 대조군 1358.8 μg/g과 318.6 μg/g, 100mg 투여군 1338.0 μg/g 및 284.2 μg/g, 500mg 투여군 1286.2 μg/g 및 273.6 μg/g으로 조사되어 PL-II는 폭로량에 비례하여 유의하게 감소되었으나 PL-Iv는 변화가 없었다. 배아와 모체의 경우도 태반과 유사하였다(Table 2).

4. 태반의 조직학적 관찰

트리클로로에틸렌 100mg 투여군 흰쥐

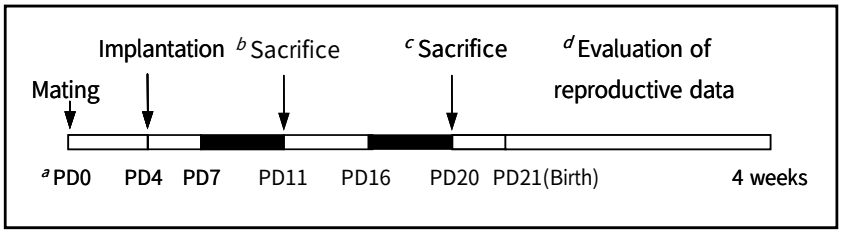

Fig. 1. Schematic representation showing the sequence of experiment.
White and black bar indicate the period from mating to 4 weeks after birth. [a] Pregnant day. [b] Analysis of total trichloro-compound in urine and Northern blot hybridization (PL-I). [c] Analysis of total trichloro-compound in urine,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

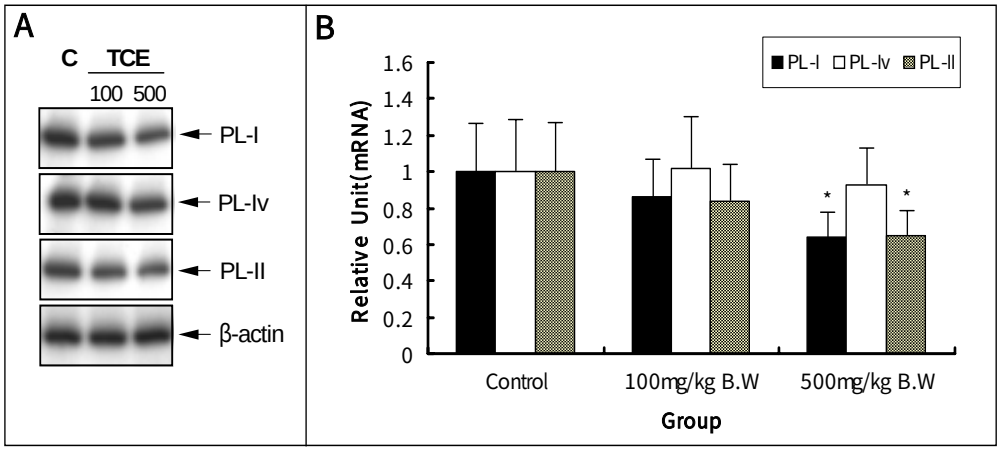

Fig 2. Effects of trichloroethylene on the expression of PL-I, Iv, II genes in the rat placenta.

(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. β-actin was hybridized to certified the equal loading of total RNA. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of trichloroethylene injection. C: control. (B) Northern signals were quantified by ID Image Analysis program. PL-I, Iv, II signals were normalized by β-actin 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 significant difference (p<0.05) compared with the control.

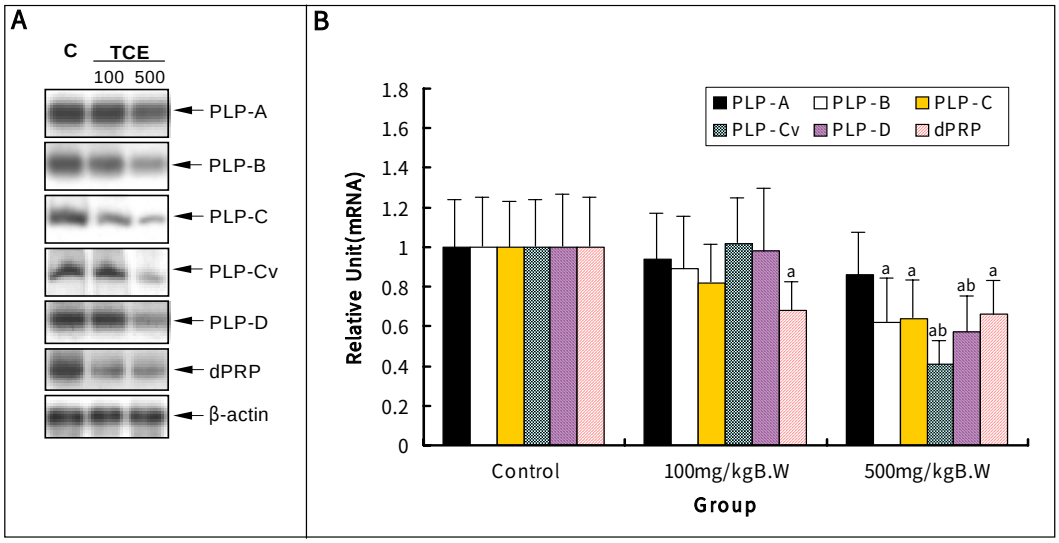

Fig 3. Effects of trichloroethylene on expression of PLP-A, B, C, Cv, D and dPRP genes in the rat placenta.

(A) Northern blot analysis of PLP-A, B, C, Cv, D and dPRP genes. Total RNAs (15 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. β-actin was hybridized to certified the equal loading of total RNA. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of trichloroethylene injection. C: control. (B) Northern signals were quantified by ID Image Analysis program. PLP-A, B, C, Cv, D, dPRP signals were normalized by β-actin and expressed the relative unit of C value as 1.0. Experiments were repeated three times and individual values were expressed mean ± S.D. a and b on the bar indicate significant difference (p<0.05) compared with the control and 100mg exposed group, respectively.

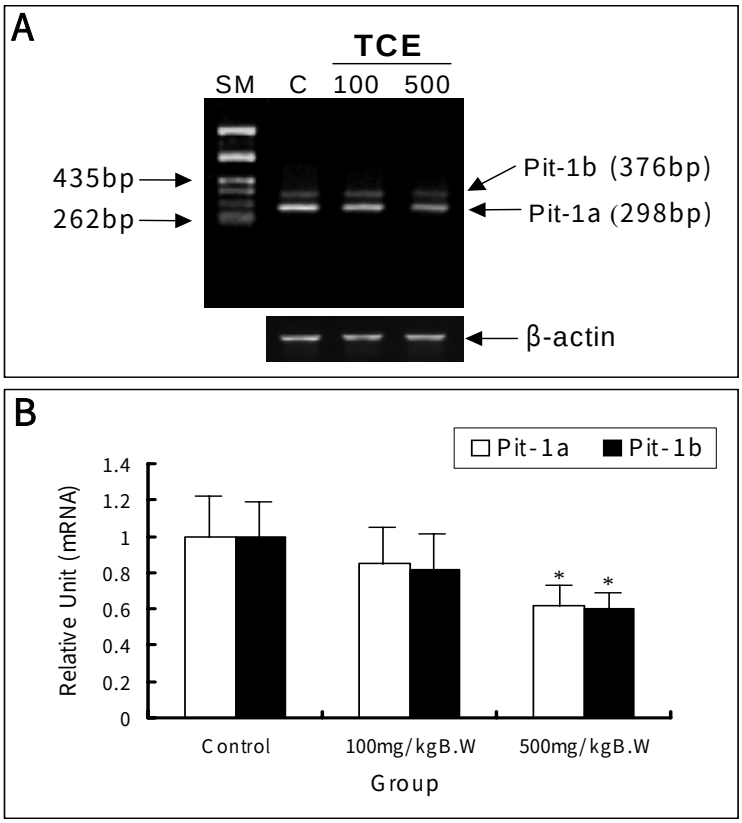

Fig 4. Effects of trichloroethylene on expression of Pit-1a and b isotype gene in the rat placenta.

(A) Reverse transcribed and amplified cDNAs were fractionated on an 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Arabic numbers on the lanes indicate the dose of trichloroethylene injection. SM: size marker, C: control. (B) Signals were quantified by ID Image Analysis program. Pit-1a, b signals were normalized by β -actin 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 significant difference (p<0.05) compared with the control.

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

mean±S.D

	Organ	Control	Exposed group	
			100mg/kg BW	500mg/kg BW
PL-Iv	Placenta (μg/g)	1358.8±369.4	1338.0±422.1	1286.2±492.1
	Fetus (μg/g)	33.9±2.4	31.5±8.2	28.1±7.05.
	Maternal blood (μg/mℓ)	1103.6±280.3	1114.8±435.2	1098.2±512.9
PL-II	Placenta (μg/g)	318.6±49.1	284.2±52.1	[a] 273.6±45.8
	Fetus (μg/g)	320.5±48.7	292.8±53.1	[a] 281.5±43.2
	Maternal blood (μg/mℓ)	225.8±45.2	210.5±49.9	195.2±39.8

These values originated from 7 pregnant rats in each group.

[a] indicates the significantly difference (p<0.05) compared with the control.

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

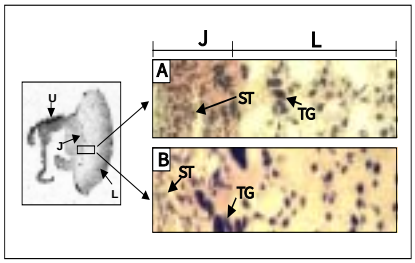

Fig 5. Effect of trichloroethylene on the histochemical feature of developing rat placenta.

Perfused placental tissues with Bouin's fix solution were embedded in paraffin, sectioned at 6 μm and counter-stained with methylene blue. (A) Microphotographs (X 400 reproduced at 90%) of the control group, (B) trichloroethylene 500mg exposed group. J: junctional zone, L: labyrinth zone, U: uterus, ST: nucleus of methyl눋 blue stained spongiotrophoblast cell; TG: nucleus of methyl blue stained trophoblast giant cell.

태반에서는 특이할 만한 조직학적 변화를 발견할 수 없었다. 그러나 500mg 투여군에서는 junctional zone에서 spongiotrophoblast 세포의 빈도가 감소되었다. Labyrinth zone은 두군 간의 차이가 없었다(Fig.5).

5. 발생학적 자료(Reproductive data)

임신 20일에 조사된 트리클로로에틸렌 폭로 상태에 따른 태반의 평균무게는 대조군 0.64g, 100mg 투여군 0.60 g, 500mg 투여군 0.55g로 폭로량에 비례하여 감소하였으며 500mg 투여군은 통계적으로 유의하였다($p<0.05$). 출산 직후, 출산 1주 후, 출산 4주 후에 각각 측정한 infant의 평균 체중은 출산 직후와 출산 1주 후에는 트리클로로에틸렌 투여량에 비례하여 통계적으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 그러나 출산 4주 후에는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다. 트리클로로에틸렌 폭로 상태에 따른 평균 임신 기간은 폭로량에 비례하여 증가하였으며, 500mg 투여군과 대조군은 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$). litter size는 대조군 13.41 마리, 100mg 투여군 11.16 마리, 500mg 투여군에서 11.06 마리로 조사되어 폭로군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$) (Table 3).

Ⅳ. 고 찰

임신된 흰쥐에 대한 트리클로로에틸렌 투여는 태반과 fetus의 무게 및 임신 기간에 영향을 미쳤다. 태반과 fetus의 무게는 대조군에 비해 감소되었으며, 임신 기간은 길어졌다. 이러한 결과들은 트리클로로에틸렌 투여에 의한 태반, fetus의 성장 지연, 체중 감소 등을 보고한 연구의 결과와 유사하였다(Healy 등, 1982; Saillenfait 등, 1995). 이 연구에서는 트리클로로에틸렌 투여에 의한 발생 장해에 관하여 보다 기초적인 원인을 연구하기 위해 트리클로로에틸렌 투여가 태반의 PRL-GH군 유전자들 발현에 미치는 영향을 분자생물학적 방법으로 조사하였다. 연구 결과에 의하면 트리클로로에틸렌은 PL-I, II, PLP-C, Cv, D, dPRP 유전자의 발현을 통계적으로 유의한 수준으로 억제하였으며, 그 외 PRL-GH군 유전자들의 발현도 억제하였다. 그리고 fetus와 태반 그리고 모체의 혈액에서 PL-Iv와 PL-II 호르몬의 농도 또한 유전자 분석 결과와 일치하였는데 이러한 결과들로 보아 트리클로로에틸렌은 전사(transcription)단계에서 PRL-GH군 호르몬 유전자의 발현을 억제하는 것으로 판단된다. PRL-GH군 유전자들은 서론에서 기술한 바와 같이 착상 전 자궁 내막 세포의 분화 및 태반 세포의 분화, 임신 유지, 스테로이드 호르몬 분비 조절, 배아성장, 모체와의 생리적 조절등 발생 전과정에 걸쳐 중요한 역할을 한다(Lee 등, 1999). 트리클로로에틸렌에 의하여 유전자 발현이 억제된 유전자들의 주요한 기능을 살펴보면 PL-I은 프로게스테론의 분비를 촉진시키고 황체의 기능을 유지시킨다고 알려져 있다(Galosy와 Talamantes, 1995; Thordarson 등, 1997). 또한 프로게스테론에 의하여 유전자 발현이 억제되어 임신 기간 동안 PL-I과 프로게스테론은 길항관계를 나타낸다(Yamaguchi 등, 1992). PL-II 또한 프로게스테론 분비를 촉진하며(Thordarson 등, 1997), 에스트로겐 수용체 α, β 유전자의 발현을 촉진(Telleria 등, 1998)시키는 등 스테로이드 호르몬 대사에 관여한다. 그리고 모체의 유선 발생을 유도한다(Forsyth, 1994). PLP-A는 배아의 착상 부위에서 natural killer(NK)세포에 반응하여

Table 3. Reproductive data according to the trichloroethylene exposure status

mean±S.D

Parameter		Control	100mg/kg BW	500mg/kg BW
Placental weight (g)		0.64±0.07	0.60±0.09	[a]0.55±0.17
Infant weight (g)	After birth	3.15±0.34	[a] 2.61±0.43	[a]2.41± 0.40
	1 week after birth	8.96±0.43	[a] 7.62±0.97	[a]7.46±1.02
	4 weeks after birth	86.3±9.01	81.90±9.28	82.5±10.24
Pregnancy period		21.05±0.72	21.20±0.83	[ab]22.63±0.97
Litter size		13.41±2.31	[a]11.16±2.58	[a]11.06±2.97

Placental weight and litter size 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 the control and 100 mg exposed group, respectively.
p value was calculated by Mann-Whitney (U) test.

NK세포의 활성에 관여한다고 알려져있다(Muller 등,1999; Ma와 Linzer, 2000). dPRP 유전자는 deciduom세포의 분화를 유도하고(Orwig 등, 1997) 태반성장에 관여한다(Rasmussen 등.1997). PLP-C, Cv 유전자는 임신 후반기에 태반의 성장 및 모체와의 생리 조절에 관여한다(Conliffe 등, 1995). 이러한 사실들로 보아 트리클로로에틸렌 투여에 의한 태반의 PRL-GH군 호르몬 유전자의 발현 억제 및 이에 따른 호르몬 농도 감소는 스테로이드 호르몬 대사, 모체와의 생리적 조절을 교란시킴으로서 태반과 fetus의 성장억제, 임신기간 연장, litter size를 감소 등 발생이상의 주요한 원인으로 판단된다.

Pit-1유전자의 발현조절인자로는 신경전달 물질인 도파민, 멜라토닌과 스테로이드 호르몬인 에스트로겐 등이 알려져 있는데 태반에서도 이 물질들이 Pit-1a, b isotype 유전자의 발현 조절 인자로 알려져 있다(Lee 등, 1998; 1999). 사람과 흰쥐 등에서 유기용제는 스테로이드 호르몬, 도파민 및 기타 내분비계 물질 분비에 영향을 미치며, 신경 내분비계 교란 등의 세포 외부 환경 변화는 직.간접적으로 Pit-1 유전자의 발현에 영향을 미친다고 알려져 있다. 김대환 등(1998)은 트리클로로에틸렌, 톨루엔, 자이렌 등이 흰쥐의 뇌하수체에서 Pit-1 유전자의 발현을 억제하며 그 원인으로 유기용제에 의한 도파민 등의 신경 내분 비계 물질의 분비교란들의 간접적 영향을 주요 원인으로 지목하였다(김대환 등, 1998). Manfred 등(1998)은 트리클로로에틸렌의 생체 대사 과정에서 도파민계 신경독성물질(dopaminergic neurotixin)과 분자 구조가 매우 유사하고, 도파민계의 신경독성을 나타내는 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-carboline (TaClo)이 생성되며, 실험동물을 통한 연구에서 TaClo는 세로토닌, 도파민 등의 농도를 증가 시킨다고 보고하였다(Manfred 등, 1998). 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)과 이 연구의 결과들로 보아 트리클로로에틸렌 폭로에 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.

이 연구의 제한점으로 트리클로로에텔렌 투여 방법을 inhalation chamber를 사용한 호흡기 노출이 아닌 복강에 직접 주사한 것, 그리고 그 투여량이 요를 통해 분석한 총삼염화물의 농도가 인체에의 노출기준(NIOSH)을 초과하는 것으로 보아 이 연구의 결과를 사람에 적용하기에는 적합하지 못하다는 점을 들 수 있다. 그러나 이 연구에서 조사한 트리클로로에틸렌 투여와 Pit-1 a,b, 그리고 PRL-GH군 유전자의 발현 및 태반세포의 조직학적 관찰에 관한 결과들은 선행된 연구 결과들을 통하여 알려진 트리클로로에틸렌 및 기타 유기용제에 의한 실험동물의 발생 장해에 관하여 분자생물학적 연구방법을 통하여 보다 근본적인 자료를 제시하였다는 점에서 의미가 있다고 생각된다.

V. 결 론

트리클로로에틸렌이 흰쥐의 태반기능과 발생에 미치는 영향을 연구하기 위하여 트리클로로에틸렌을 투여한 후 태반의 PRL-GH군과 Pit-1 유전자의 발현, 세포분화, 발생학적 자료들을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

트리클로로에틸렌 투여는 흰쥐 태반의 PRL-GH군 유전자 발현을 억제하였으며, PRL-GH군 유전자의 발현 유도 인자인 Pit-1a, b isotype 유전자의 발현도 억제하였다. 그리고 태반, 배아 및 모체의 혈중 PL-II 농도를 감소시켰다. 트리클로로에틸렌 투여는 태반과 fetus의 무게, litter size를 감소시켰으며 임신 기간을 연장시켰다. 이러한 결과들로 보아 트리클로로에틸렌은 흰쥐의 태반기능과 발생장해 요인으로 작용한다.

REFERENCES

김대환, 이헌, 이채관, 강대성, 김정호 등. 톨루엔, 자이렌, 트리클로로에틸렌 투여가 흰쥐 시상하부와 뇌하수체의 GnRH, GnRH receptor, Pit-1 유전자 발현에 미치는 영향. 대한산업의학회지 1998;10:267-282.

김창엽, 정진호, 김양호, 박두용, 백남원. 탈지작업 근로자의 trichloroethylene 폭로에 관한 조사. 한국의 산업의학 1989;28:127-137.

이채언, 이종태, 정의화, 손혜숙, 문덕환 등. 톨루엔을 포함한 유기용제의 직업적 폭로로 인한 신경내분비계 영향. 대한산업의학회지 1995;7(2):362-374.

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;80:2021-2026.

Barret I, Garrel S, Danel V, Debru JL. Chronic trichloroethylene intoxication new approch by trigeminal-evoked potentials?. Arch Env Health 1987; 42:297-302.

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;50:267-275.

Boyes WK, Bushnell PJ, Crofton KM, Evans M, Simmons JE. Neurotoxic and pharmacokinetic responses to trichloroethylene as a function of exposure scenario. Environ Health Perspect 2000;108:317-322.

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.

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;127:2665-2672.

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: 5009-5019.

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; 266:1605-1610.

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;266:23027-23032.

Duckworthml, Kirk KL, Friesen HG. Isolation and identification of a cDNA clone of rat placental lactogen II. J Biol Chem 1986a;261:10871-10878.

Duckworthml, Peden LM, Friesen HG. Isolation of a novel prolactin-like cDNA clone from developing rat placenta. J Biol Chem 1986b;261: 10879-10884.

Forsyth IA. Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. Exp Clin Endocrinol 1994; 102:244-251.

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.

Haugen BR, Wood WM, Gordon DF, Ridgway EC. A thyrotrope-specific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin beta promoter. J Biol Chem 1993;268:20818-20824.

Healy TE, Poole TR, Hopper A. Rat fetal development and maternal exposure to trichloroethylene 100 p.p.m. Br J Anaesth 1982;54:337-341.

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: 519-529.

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: 3849-3855.

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.

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;68:1031-1040.

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;7:710-714.

Kyyronen P, Taskinen H, Lindbohmml, 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.

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;8:205-211.

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;9:646-651.

Lindbohmml, 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.

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;347:528-533.

Manfred G, Ai-Ying X, Christin H, Jing L, Ralf G et al. 1-Trichloromethyl-1,2,3,4 -tetrahydro-β-carboline increases extracellular serotonin and stimulates hydroxyl radical production in rats. Neuroscience Letters 1998;257:17-20.

McDonald AD, McDonald JC, Armstrong B, Cherrynm. , Cote R et al. Fetal death and work in pregnancy. Br J Ind Med 1988 Mar;45(3):148-157.

Mitchell ABS, Parsons-Smith BG. Trichloroethylene neuropathy. Br Med J 1969;1:422-423.

Niall HD, Hoganml, 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;68:866-870.

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.

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. 1993;268:3316-3342.

Rom WN. Environmental and Occupational Medicine. 3rd ed. Boston: Little Brown and Company; 1998. p. 223-244.

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

Saillenfait AM, Langonne I, Sabate JP. Developmental toxicity of trichloroethylene, tetrachloroethylene and four of their metabolites in rat whole embryo culture. Arch Toxicol 1995;70: 71-82.

Smith GF. Trichloroethylene. Br J Ind Med 1966;23:249-262.

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

Taskinen H, Kyyronen P, Hemminki K, Hoikkala M, Lajunen K et al. Laboratory work and pregnancy outcome. J Occup Med 1994;36: 311-319.

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;139:2432-2442.

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: 3236-3241.

Torrason M, Clark J, Dankovic D, Mathias P, Skagga S et al. Oxidative stress and DNA damage in Fischer rats following acute exposure to trichloroethylene or perchloroethylene. Toxicology 1999: 138;43-53.

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.

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;130:2897-2905.

Zielhuis GA, Gijsen R, van der Guiden JWD. Menstrual disorders among dry-cleaning workers. Scand J Work Environ Health 1989;15:238-244.