

6가 크롬 폭로가 랫트의 태반 기능과 출산에 미치는 영향

이 현, 전진호¹⁾, 문덕환²⁾, 이채언²⁾, 강성구³⁾, 손병철⁴⁾, 김대환²⁾, 이창희⁵⁾, 김정원²⁾, 이채관²⁾

울산대학교 의과대학 산업·환경의학교실, 인제대학교 의과대학 예방의학교실¹⁾,
인제대학교 산업의학연구소·부산백병원 산업의학과²⁾, 인제대학교 의생명공대학 생명공학과³⁾

Effects of Chromium (VI) Exposure on the Placental Function and Reproduction in Rats

Heun Lee, Jin-Ho Chun¹⁾, Deog-Hwan Moon²⁾, Chae-Un Lee²⁾, Sung-Goo Kang³⁾,
Byung-Chul Son²⁾, Dae-Hwan Kim²⁾, Chang-Hee Lee²⁾, Jung-Won Kim²⁾, Chae-Kwan Lee²⁾

Department of Occupational and Environmental Medicine, College of Medicine, University of Ulsan
Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Inje University¹⁾
Institute of Industrial Medicine & Department of Occupational and
Environmental Medicine, Busan Paik Hospital, Inje University²⁾
School of Biotechnology and Biomedical Science, Inje University³⁾

Objectives : This study aimed to investigate the toxic effects of chromium (VI) on the placental function and reproduction in rats. For the study, the placental prolactin-growth hormone (PRL-GH) gene expression, placental trophoblast cell differentiation and reproductive data were analyzed.

Methods : The pregnancies of F344 Fisher rats were checked by the presence of a copulatory plug or sperm in the vaginal smear, which was defined as day 0 of the pregnancy. Pregnant rats were divided into the three groups. The control group was given tap water (chromium level < 0.001 ppm) and the remaining groups were given 250 or 750 ppm of chromium (VI) [as potassium dichromate], from day 7 to 19 of the pregnancy. Rats were sacrificed at days 11 and 20 of pregnancy. The mRNA levels of PRL-GH and Pit-1a and b isotype genes were analyzed by Northern blot hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The hormonal concentration was analyzed by radioimmunoassay, and the differentiation of placental trophoblast cells were observed by histochemical studies. Reproductive data, such as placental and fetal weights, pregnancy period, and litter size, were surveyed at day 20 of pregnancy and after birth. A statistical analysis was carried out using the SAS program

(version 8.1).

Results : The mRNA levels of the prolactin-growth hormone (PRL-GH) family of genes were dose dependently reduced by chromium exposure. The mRNA levels of Pit-1a and b isotype genes that induce the expression of the PRL-GH family of genes were also reduced by chromium exposure. The PRL-GH hormonal concentration in the rat placenta, fetus and maternal blood were decreased by chromium exposure. In the middle stage of pregnancy (day 11), a high dose of chromium suppressed the differentiation of spongiotrophoblast cells that secrete the PRL-GH hormones. In the last stage of pregnancy (day 20), a high dose of chromium induced apoptosis of placental cells. Reproductive data, such as placental and fetal weights, litter size, were reduced, but the pregnancy period was extended in the group exposed to chromium compared with the controls.

Conclusion : Chromium (VI) disrupts the ordered functions of the placenta, which leads to reproductive disorders in rats.

Korean J Prev Med 2004;37(2):2-10

Key Words: Chromium (VI), Placenta, PRL, Growth hormone, Reproduction

서론

태반은 포유동물의 발생 과정에서 임신 초기에 형성되어 출산 시까지 존재하는

특이적인 기관으로 랫트의 경우 junctional zone과 labyrinth zone으로 구분되며, glycogen, syncytial, spongiotrophoblast, trophoblast giant의 4 종류 세포

로 구성된다. 임신 기간 동안 랫트 태반의 spongiotrophoblast 세포와 trophoblast giant 세포에서는 뇌하수체의 프로락틴 및 성장호르몬과 유사한 placental lactogen군(이하 PL)의 PL-I, Iv(I variant), II [1-5] 와 prolactin like

접수 : 2003년 10월 1일, 채택 : 2004년 1월 26일

* 이 연구는 2002년도 인제대학교 학술연구조성비 지원에 의한 것임.

책임저자 : 전진호(부산광역시 부산진구 개금동 633-165, 전화: 051-890-6735; Fax:051-896-9373; E-mail: pmcjh@inje.ac.kr)

protein(이하 PLP)의 PLP-A, B, C, Cr Cv, D [6-10] 등의 호르몬이 분비되며, 임신 초기에는 decidua prolactin-related protein(이하 dPRP)이 분비된다 [11]. 이 태반 호르몬들은 착상에서부터 임신 전 과정 동안 fetus와 태반의 성장과 스테로이드 호르몬 분비 조절을 통한 모체와의 생리적 조절 등, 발생에 중요한 역할을 한다. 이 호르몬들은 뇌하수체의 프로락틴 및 성장 호르몬과 유전자 염기 서열, 단백질 구조와 기능 및 유전자 발현 기작이 유사하기 때문에 공동 조상의 단백질에서 기원한 것으로 알려져 prolactin-growth hormone (PRL-GH) 유전자 군으로 불린다 [12,13]. Pit-1 유전자는 뇌하수체에서 처음 발견된 transacting factor로서 [14,15] Pit-1a, b, T의 3가지 isotype이 존재하며 각각 뇌하수체의 lactotroph 세포의 프로락틴, somatotroph 세포의 성장 호르몬, thyrotroph 세포의 갑상선호르몬 자극호르몬(TSH) 등의 유전자 발현을 유도한다 [16-19]. Bamberger와 이 등의 연구에 의하면 Pit-1a, b 유전자는 사람과 랫트의 태반에서도 발현되며 [20,21], PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현조절인자로 작용한다 [22,23].

크롬은 생체 필수 중금속으로서 일반적으로 도금, 피혁 제조, 색소, 방부제, 약품 제조업 및 기타 공업에서 발생하며, 호흡기, 소화기 및 피부를 통하여 분진 및 흡입으로 인체에 흡수되어 간, 신장, 부갑상선 및 골수에 축적되며 주로 신장을 통하여 배출된다 [24]. 체내에 흡수된 크롬은 만성 중독으로 코, 폐 및 위장의 점막에 병변을 일으키고 피부 궤양, 습진, 담마진 등을 일으키며, 폐에서는 발암작용을 일으킨다고 알려져 있으며, 특히 6가 크롬의 독성이 강한 것으로 알려져 있다 [25,26]. 임신 동안 태반에서의 크롬 대사는 기타 중금속들과 마찬가지로 중금속 결합 단백질인 metallothionein (MT)에 의해 조절된다 [27,28]. 태반에서 MT가 분비되는 주요 세포 중이 spongiotrophoblast, trophoblast giant 등 PRL-GH군 호르몬을 분비하는 세포들이므로 [29] 크롬은 태반의

spongiotrophoblast, trophoblast giant 세포 기능에 영향을 미칠 수 있을 것이며, 또한 PRL-GH군 호르몬 분비에도 영향을 미칠 것이다. 최근의 크롬 독성에 관한 연구는 폐에서의 암세포 분화 [30], 폐포 및 임파구의 apoptosis [31-33], 그리고 과산화물 생성에 의한 뇌세포의 노화 촉진 [34,35] 등을 중심으로 활발히 진행되고 있다. 그리고 Kanojia 등 [36,37]은 임신 전 크롬에 폭로된 랫트의 교배 및 수정능력 감소와 fetus의 성장 및 골격이상을 보고한 바 있다. 그러나 크롬이 랫트의 태반에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 부족한 실정이며, 특히 태반의 세포분화와 PRL-GH군 호르몬 유전자 발현 등에 관한 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 이 연구에서는 6가 크롬 폭로가 랫트 태반의 기능과 출산에 미치는 영향을 연구하기 위하여 크롬에 폭로된 랫트 태반의 PRL-GH군 유전자 발현 및 호르몬 농도를 분석하고, trophoblast세포의 분화 및 사멸, 그리고 발생학적 자료를 조사하고자 하였다.

연구 재료 및 방법

1. 실험동물 관리 및 크롬투여

1) 실험동물 관리

15주령의 F344 Fisher 랫트(152g + 22g)를 사용하였으며, 온도조건은 24~26℃, 광 조건은 명기 14시간, 암기 10시간이었다. 임신된 랫트를 얻기 위하여 암, 수를 합사(1:1)하여 임신을 유도한 후 자궁 내 점액질(vaginal smear)에서 정자가 관찰된 날을 임신 0일로 하였다.

2) 크롬 투여

실험군은 6가 크롬이 랫트의 발생에 미치는 영향에 관한 연구자료^{23,24)}를 참고하여 대조군, 250 ppm 투여군, 75 ppm 투여군의 3군으로 구분하였으며, 크롬(potassium dichromate; 99.9% pure, Sigma)을 식수(크롬 농도 0.001 ppm 이하)에 녹인 후 임신 7일부터 19일까지 투여하였다. 크롬 농도 분석 및 PL-I 유전자 발현 분석을 위하여 각 실험군 당 4마리씩의 랫트를 임신 11일에 도살하였으며(n=4×3=12), 크롬 농도 분석, 태반 호르몬 농도 및 유전자 발현 분석, apoptosis, 조직학적 분석을 위한 슬라이드 제작과 태반 무게 측정 등을 위해 각 실험군 당 5마리씩의 랫트를 임신 19일에 도살하였다(n=5×3=15). 그리고 fetus의 체중 변화, 임신 기간 및 출산자수 평가를 위해 각 실험군 당 10마리씩(n=10×3=30) 사용하였다(Figure 1).

2. 연구 방법

1) 태반, fetus, 모체 혈액의 크롬 농도 분석

모체의 혈액은 도살시 K3EDTA bottle (Beliver Industrial Estate)로 채취하여 4℃에 보관하였다. 태반, fetus는 적출 후 생리식염수로 씻고 3M 종이로 수분을 제거한 후 정량하였다. HNO₃/HCl(6:4) 용액에 반응시켜 조직을 분해한 후 백색 침전물을 획득하였다. 이 침전물을 적정량의 0.1 N HNO₃ 용액에 녹인 후 원자흡광도계 (atomic absorption spectrometer)로 정량하였다.

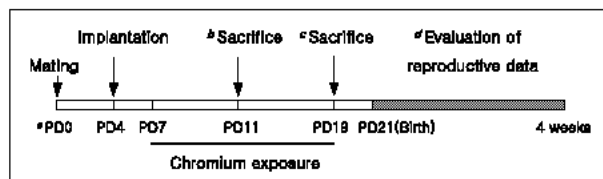


Fig. 1. Schematic representation showing the sequence of experiment.

White and colored areas indicate the periods of pregnancy and after birth. [†]Pregnant day. [‡]Analysis of chromium concentration and northern blot hybridization (PL-I). [§]Analysis of chromium concentration, Northern blot hybridization (PL-Iv, II, PLP-A, B, C, Cv, D, dPRP), RT-PCR, radioimmunoassay (PL-Iv, II), histochemical and apoptotic study, measure of placental weights. [¶]Measurement of litter size and fetus body weight.

2) RNA 추출

적출된 시료에 Tri-Reagent (Sigma, 0.1 g/ml)를 가한 후 homogenizer(Ingenieurburo Co.)를 사용하여 얼음에 시험관을 담은 상태로 약 30초간 마쇄하였다. 마쇄액이 담긴 시험관에 동량의 chloroform을 넣고 실온에서 15분간 방치 후, 4 °C, 13,500 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 새 시험관에 옮긴 후 동량의 isopro-panol을 넣고 실온에서 10분간 방치 후, 다시 4 °C, 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) RT-PCR

Pit-1a, b isotype 유전자의 발현을 조사하기 위하여 Pit-1a, b isotype을 동시에 합성할 수 있는 primer를 아래와 같이 제작하였다. Sense primer 5'-tgtagttgccaaccttt-cacctcgg-3', antisense primer 5'-ccagcagagg-ttggtcagg-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 유효 범위(0.5 µg, 25회 합성)를 확인하였다. 추출된 total RNA 0.15 µg을 200unit의 Moloney murine leukemia virus(MMLV) reverse transcriptase와 37 °C에서 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 30회 반응(95 °C 1분, 55 °C 1분, 72 °C 1분)시켰다. 증폭된 cDNA 절편들은 1% agarose gel로 전기 영동한 후 추출하여 pGEM-T Easy Vector (Promega)에 클로닝 하였다. 클로닝 된 유전자 절편들

은 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 전기 영동 하였다. 전기영동 후 total RNA를 transfer kit(Trans Vac, Hoefer Co.)를 이용하여 nylon membrane(Schleicher & Schull)으로 옮긴 후, vacuum oven에서 80 °C로 2시간 동안 건조하였다. Total RNA가 부착된 nylon membrane을 hybridization buffer로 60 °C에서 2시간 동안 prehybridization한 후 합성된 cDNA probe(1×10⁹ cpm/ml)를 첨가하여 60 °C에서 18시간 동안 hybridization하였다. Hybridization buffer의 조성은 50% deionized formamide, 5X SSC(1XSSC: 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate), 5X Denhardt's solution (1X Denhardt's solution: 0.01% polyvinyl pyrrolidone, 0.01% Ficoll and 0.01% BSA), 0.1% SDS, 2 mg/ml salmon sperm DNA이다. Hybridization 후 비특이적인 결합을 제거하기 위하여 nylon membrane을 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 55 °C에서 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 -³²P] dCTP (Amersham)를 사용하여 합성하였다. 합성된 cDNA probe를 Nick column (Pharmacia Co.)으로 정제하고, SET buffer (0.1% SDS, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 mM dithiothreitol)로 추출하였다. cDNA probe의 활성은 1×10⁹ cpm/µg 이상으로 하였다. 감광된 필름은 X-ray 필름 자동 현상기(RG II, Fuji Co.)를 사용하여 현상한 후 Kodak Digital Camera와 1D Image Analysis program을 사용하여 분석하였다.

5) 태반, fetus, 모체 혈액의 PL-Iv, II 농도 분석

태반과 fetus의 혈액(n=30)은 적출 후 유리섬유가 내장된 시험관으로 원심 분

리(1200 rpm, clinical table-top)하여 채취하였다. 호르몬 농도치의 일중 변화를 감안하여 오후 1시로 시료 채취 시간을 고정하였으며, 채취한 혈액에서 혈장을 분리하여 -70 °C에 보관하였고, PL-Iv와 PL-II의 농도는 방사성 면역측정법(radio-immunoassay)으로 분석하였다.

6) 조직학적 관찰(Histological study)

임신 19일에 적출된 흰쥐 태반을 15 ml의 perfusion buffer (phosphate-buffered saline, 4% paraformaldehyde)로 4 °C에서 2시간 처리한 후 파라핀 용액으로 고정화하였다. 파라핀 블록을 820 Histocut Rotary Microtome을 이용하여 6 µm 두께로 절단한 뒤 Digital Tissue Float을 이용하여 주름을 펴고 Slide warmer 위에서 유리 슬라이드에 부착시켰다. 탈 파라핀 과정에는 Coplin jar를 이용하였으며 핵은 methylen blue로 염색하였다. 제작된 조직 슬라이드는 light microscope로 관찰 후 사진 촬영하였다.

7) 염색체 (Chromosomal DNA) 추출

적출된 태반 조직에 0.2 ml의 homogenization buffer (0.1 M sodium chloride, 0.01 M EDTA (pH 8.0), 0.3 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 M sucrose)를 가하여 피펫으로 현탁시켰다. 균질액에 10% SDS 12.5 µl를 가하여 섞어 준 뒤 65 °C에서 30분간 가열하고, 8 M potassium acetate 35 µl를 가한 후 얼음에 방치하였다. 10분간 원심 분리(4 °C, 14000 rpm)한 후 상층액을 다른 시험관에 옮긴 후 동량의 phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1, V:V:V)을 첨가하여 현탁시키고 원심 분리하여 상층액을 옮긴 후 2.5 Vol.의 100% 에탄올을 가하고 원심 분리하여 침전물을 50 µl의 1X TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA(pH 8.0))에 녹였다. 1 µl의 DNase free RNase (500 µg/ml)를 첨가하여 37 °C에서 60분간 반응 시켰다. 동량의 phenol: chloroform: isoamylalcohol용액으로 시료를 재 추출한 후 상층액에 0.1 Vol.의 3 M sodium acetate와 2.5 Vol.의 냉각된 100% 에탄올을 가하여 -70 °C에서 최

소 60분 이상 침전시켰다. 4 °C, 12,000 rpm으로 45분 간 원심 분리 DNA를 회수 하고 70% 에탄올로 세척한 후 건조하여 25 µl의 멸균수에 녹였다. UV-spectrophotomer(260nm)로 흡광도를 측정, 정량한 후 약 3 µg을 2% agarose gel에서 60 V로 90분간 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

8) 발생학적 자료(Reproductive data) 조사

태반은 임신 19일에, fetus는 출산 직후, 출산 1주 후, 출산 4주 후에 각각 무게를 측정하여 대조군과 비교하였다. 임신 기간은 합사 후 자궁 내 점액질(vaginal smear)에서 정자가 관찰된 날과 출산일을 기준으로 하였다.

3. 자료 분석

자료 분석은 SAS 프로그램(version 6.12)을 이용하여 연속자료의 두 군간 비교는 Mann-Whitney (U) test를, 세 군 이상 간 비교는 Kruskal-Wallis test를 시행하였다.

연구결과

1. 태반, fetus, 모체 혈액의 크롬 농도

폭로 상태에 따른 태반과 fetus, 모체 혈액의 평균 크롬 농도는 임신 11일의 경우 대조군은 0.011 µg/g, 0.016 µg/g, 0.022 µg/ml, 250 ppm 투여군은 42.21 µg/g, 43.25 µg/g, 36.42 µg/ml, 750 ppm 투여군은 55.98 µg/g, 53.85 µg/g, 53.04 µg/ml으로 폭로량에 비례하여 유의하게 증가하였으며 (p<0.05), 이는 임신 19일의 경우에도 마찬가지이었다. fetus, 모체 혈액, 태반 간의 평균 크롬 농도 차이는 없었다 (Table 1).

2. PRL-GH군과 Pit-Ia,bisotype 유전자 발현 분석

PL-I 유전자의 발현은 크롬 투여군에서 대조군보다 감소되었으며 750 ppm 투여군의 감소는 통계적으로 유의하였다

(p<0.05). PL-Iv 유전자의 발현은 250 ppm 투여군에서는 거의 변화가 없었으나 750 ppm 투여군에서는 감소되었다. PL-II 유전자의 발현 또한 대조군에 비하여 감소되었으며 750 ppm 투여군의 감소는 통계적으로 유의하였다 (p<0.05)(Figure. 2). PLP-A 유전자의 발현은 크롬 투여군

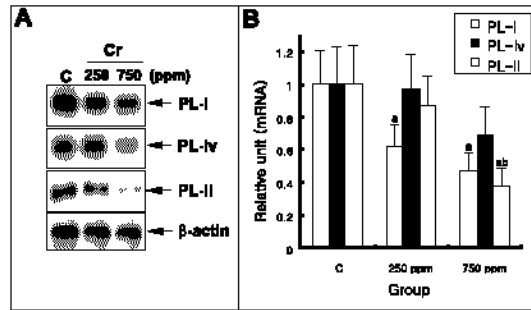


Fig. 2. Effects of chromium on expression of PL-I, IV, II genes in the rat placenta. (A) Northern blot analysis of PL-I, IV and PL-II genes. Total RNAs (15µg) were fractionated on an 1% formaldehyde agarose gel, transferred to nylon paper and hybridized with ³²P-labeled PL-I or IV or II cDNA probe. β-actin was hybridized to certified the equal loading of total RNA. (B) Northern signals were quantified by kodak photoprogram and relative units were calculated by the ratio of PL-I or IV or II/β-actin and expressed as relative unit over C values of 1.0. Experiments were repeated for three times and individual values are expressed mean ± S.D. a and b on the bar indicate the significantly difference (p < 0.05) compared with control and 250 ppm. Arabic numbers on the lanes indicate the concentration of chromium exposure. C: control.

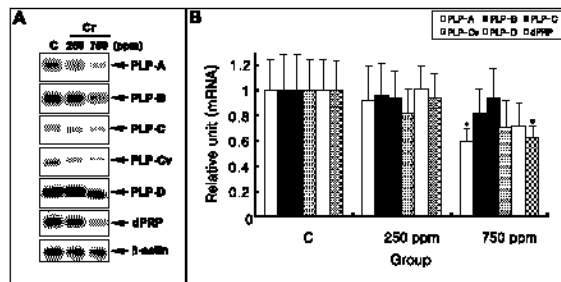


Fig. 3. Effects of chromium on expression of PLP-A, B, C, Cv, D and dPRP genes in the rat placenta. (A) Northern blot analysis of PLP-A, B, C, Cv, D and dPRP genes. Total RNAs (15µg) were fractionated on an 1% formaldehyde agarose gel, transferred to nylon paper and hybridized with ³²P-labeled PLP-A or B or C or Cv or D or dPRP probe. β-actin was hybridized to certified the equal loading of total RNA. (B) Northern signals were quantified by kodak photoprogram and relative units were calculated by the ratio of PLP-A or B or C or Cv or D or dPRP/β-actin and expressed as relative unit over C values of 1.0. Experiments were repeated for three times and individual values are expressed mean ± S.D. Stars (*) on the bar indicate the significantly difference (p < 0.05) compared with control. Arabic numbers on the lanes indicate the concentration of chromium administration. C: control.

Table 1. Mean chromium concentration in rat placenta, embryo, maternal blood according to the chromium exposure level

(mean ± S.D)

Parameter	Control		250 ppm		750 ppm	
	PD*11	PD 19	PD 11	PD 19	PD 11	PD 19
Placenta (µg / g)	0.011 ± 0.002	0.022 ± 0.002	42.21 ± 3.21 ^b	55.25 ± 4.52 ^b	55.98 ± 4.02 ^{bc}	110.55 ± 7.25 ^{bc}
Embryo (µg / g)	0.016 ± 0.001	0.014 ± 0.001	43.25 ± 3.20 ^b	53.92 ± 4.21 ^b	53.85 ± 4.28 ^{bc}	104.86 ± 8.32 ^{bc}
Maternal blood (µg / ml)	0.022 ± 0.003	0.019 ± 0.002	36.42 ± 2.25 ^b	54.42 ± 3.62 ^b	53.04 ± 4.26 ^{bc}	108.98 ± 7.57 ^{bc}

* Pregnant day

These values originated from 6 pregnant rats, 30 placentas and embryos in each group.

^b and ^c indicate the significantly difference (p < 0.05) compared with control and 250 ppm.

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

에서 대조군에 비하여 감소되었으며 750 ppm 투여군의 감소는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). PLP-B 유전자의 발현은 250 ppm 투여군에서는 거의 변화가 없었으나, 750 ppm 투여군에서 약간 감소되었다. PLP-C 유전자의 발현은 거의 변화가 없었으나, Cv 유전자의 발현은 크롬 투여량에 비례하여 감소되었다. PLP-D 유전자의 발현은 250 ppm 투여군에서는 변화가 없었으나 750 ppm 투여군에서 감소하였다. dPRP 유전자의 발현 또한 투여량에 비례하여 감소되었으며 750 ppm 투여군의 감소는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$)(Figure. 3). PRL-GH군 호르몬 유전자의 발현유도인자로 알려진 Pit-1a, b isotype의 발현은 25ppm 투여군에서는 변화가 없었으나 75ppm 투여군에서는 감소하였으며, Pit-1a의 감소는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$)(Figure. 4).

3 태반, fetus, 모체 혈액의 PL-Iv, II 호르몬 농도

폭로 농도에 따른 태반의 평균 PL-Iv 및 PL-II 농도는 대조군 1,358.8 $\mu\text{g/g}$ 및 318.6 $\mu\text{g/g}$, 250 ppm 투여군 1,087.2 $\mu\text{g/g}$ 및 228.9 $\mu\text{g/g}$, 750 ppm 투여군 818.5 $\mu\text{g/g}$ 및 195.4 $\mu\text{g/g}$ 로 조사되어 두 호르몬 모두 투여량에 비례하여 유의하게 감소하는 경향이었으며, fetus와 모체의 경우도 태반과 유사하였다 ($p < 0.05$)(Table 2).

4 태반의 조직학적 관찰

크롬 250 ppm 투여군의 랫트 태반에서는 특이할 만한 조직학적 변화를 발견할 수 없었으나 750 ppm 투여군에서는 태반의 체적과 구성 세포종의 빈도에 변화를 보였다. Junctional zone의 체적이 감소되었으며 PRL-GH군 호르몬을 분비하는 주요 구성 세포 종인 spongiotrophoblast 세포의 관찰빈도가 대조군과 비교하여 현격히 감소되었다. Labyrinth zone은 체적은 감소되었으나 spongiotrophoblast와 trophoblast giant 세포의 관찰빈도는 변화가 없었다 (Figure. 5).

5. Apoptosis

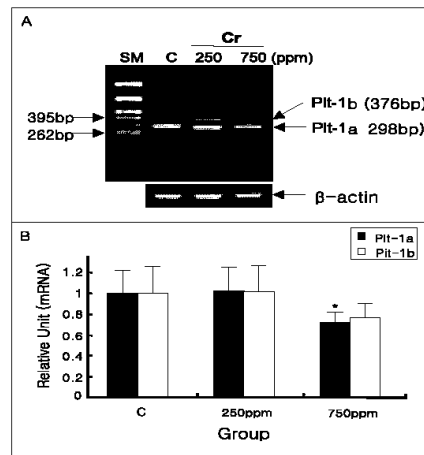


Fig. 4. Effects of chromium on expression of Pit-1a and b isotype gene in the rat placenta.

Reversetranscribed and amplified cDNAs were fractionated on an 1% agarose gel and stained with ethidium bromide (A). Signals were quantified by kodak photo-program and relative units were calculated by the ratio of Pit-1a or b/ β -actin and expressed as relative unit over C values of 1.0 (B). Experiments were repeated for three times and individual values are expressed mean \pm S.D. Star (*) on the bar indicate the significantly difference ($p < 0.05$) compared with control. Arabic numbers on the lanes indicate the concentration of chromium administration. C: control.

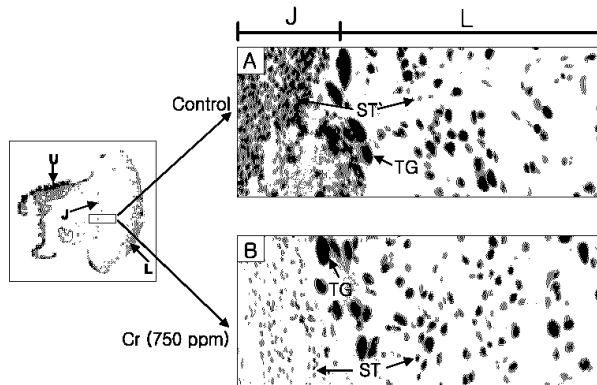


Fig. 5. Effect of chromium on the histochemical feature of developing rat placenta.

Perfused placental tissues with Bouin's fix solution were embedded in paraffin, sectioned at 6 μm and counter-stained with methyl blue. Microphotographs (X 400 reproduced at 70%) of control group (A), chromium 750ppm exposed group (B) and DCP (X 400 reproduced at 95%) (C). 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. AC: apoptotic cells

Table 2. Mean serum PL-Iv and PL-II levels in rat placenta, embryo and maternal blood according to the chromium exposure level

		(mean \pm S.D)		
Parameter		Control	250 ppm	750 ppm
Placenta ($\mu\text{g/g}$)	PL - Iv	1358.8 \pm 369.4	1087.2 \pm 255.6	818.5 \pm 310.7 ^a
	PL - II	318.6 \pm 49.1	228.9 \pm 57.9 ^a	195.4 \pm 46.6 ^a
Embryo ($\mu\text{g/g}$)	PL - Iv	33.9 \pm 2.4	22.7 \pm 6.8 ^a	16.6 \pm 5.8 ^{ab}
	PL - II	320.5 \pm 28.7	259.1 \pm 67.3 ^a	197.1 \pm 38.6 ^{ab}
Maternal blood ($\mu\text{g/ml}$)	PL - Iv	1103.6 \pm 280.3	832.1 \pm 368.2	638.8 \pm 312.6 ^a
	PL - II	225.8 \pm 45.2	154.0 \pm 57.4 ^a	116.8 \pm 25.1 ^{ab}

These values originated from 6 pregnant rats, 30 placentas and embryos in each group obtained at pregnant day 19. ^a and ^b indicate the significantly difference ($p < 0.05$) compared with control and 250 ppm. p value was calculated by Mann-Whitney(U) test.

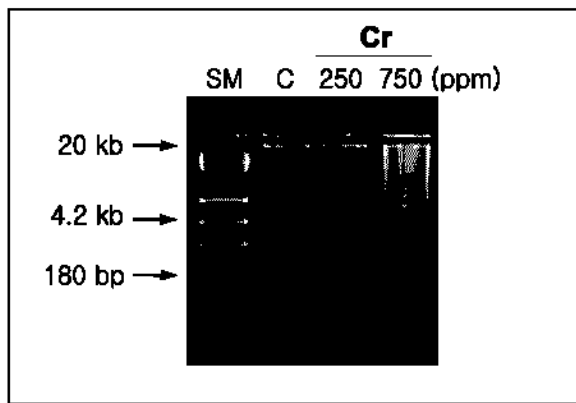


Fig. 6. Effect of chromium on the apoptotic DNA fragmentation in the rat placenta. Electrophoretic analysis showing the fragmentation pattern of genomic DNA isolated from chromium exposed rat placenta. Arabic numbers on the lanes indicate the concentration of chromium administration. C: control, SM: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

Table 3. NSAIDs classification by therapeutics and structure in this study

Parameter	Control	(mean ± S.D)		
		250 ppm	750 ppm	
Placental weight (g)	0.64 ± 0.07	0.57 ± 0.007 ^a	0.53 ± 0.12 ^{ab}	
Fetus weight (g)	After birth	3.15 ± 0.34	2.60 ± 0.42 ^a	2.62 ± 0.41 ^a
	1 week after birth	8.96 ± 0.43	8.01 ± 0.84 ^a	7.75 ± 0.92 ^a
Pregnancy period (day)	4 weeks after birth	86.31 ± 9.01	84.88 ± 9.12	83.98 ± 9.46
		21.05 ± 0.72	21.45 ± 0.74	21.97 ± 0.79
Litter size	13.41 ± 2.31	9.45 ± 3.28 ^a	7.25 ± 3.48 ^a	

These values originated from 6 pregnant rats, 30 placentas and embryos in each group obtained at pregnant day 19. ^a and ^b indicate the significantly difference (p < 0.05) compared with control and 250 ppm. p value was calculated by Mann-Whitney(U) test.

임신 19일된 태반에서 apoptosis를 확인하기 위해 염색체를 추출한 후 DNA 절편 유무를 관찰한 결과 250 ppm 투여군에서는 대조군과 비교하여 유의한 변화가 관찰되지 않았으나 750 ppm 투여군에서는 apoptosis에 의해 유도되는 4.0 kb 이하의 저분자 DNA 절편들이 관찰되었다. 이러한 결과로 보아 크롬 투여는 태반 세포의 apoptosis를 유도하였다 (Figure. 6).

6. 발생학적 자료(Reproductive data)

임신 19일에 조사된 크롬 폭로 상태에 따른 태반의 평균무게는 대조군 0.64 g, 250 ppm 투여군 0.57 g, 750 ppm 투여군 0.53 g로 폭로량에 비례하여 감소하였다. 출산 직후, 출산 1주 후, 출산 4주 후에 각각 측정된 fetus의 평균 체중은 출산 직후와 출산 1주 후에는 크롬 투여량에 비례하여 감소하는 경향이였다. 그러나 출산

4주 후에는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다. 크롬 폭로 상태에 따른 평균 임신 기간은 폭로량에 비례하여 증가하였다. 팻트 한 마리당 출산된 평균 fetus의 수(litter size)는 대조군 13.41마리, 250 ppm 투여군 9.45마리, 750 ppm 투여군에서 7.25마리로 폭로량에 비례하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (p<0.05) (Table 3).

고 찰

이 연구에서는 크롬 투여에 의한 태반 기능 및 fetus 발생 장애에 대한 보다 기초적인 원인을 규명하기 위해 태반에서 분비되는 PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현에 대한 크롬의 영향을 분자생물학적 방법으로 연구하였다. Northern blot hybridization 결과에 의하면 크롬은 PL-I, PL-II, PLP-A, dPRP 유전자의 발현을 유의한 수준으로 억제하였으며 기타 유전자들의 발현도 억제하였다. 또한 PRL-

GH군 호르몬 유전자들의 발현과 함께 fetus와 태반 그리고 모체의 혈액에서 PL-Iv, II호르몬의 농도를 분석 한 결과 fetus와 태반 그리고 모체의 혈액에서 PL-Iv, II의 농도도 유전자 분석 결과와 일치하여 크롬 투여군에서 감소되었다. PL-I은 프로게스테론의 분비를 촉진시키고 황체의 기능을 유지시킨다고 알려져 있다 [38, 39]. 또한 프로게스테론에 의하여 유전자 발현이 억제되어 임신 기간 동안 PL-I과 프로게스테론은 길항 관계를 나타낸다 [40]. PL-II 또한 프로게스테론 분비를 촉진하며 [38, 39, 41], 에스트로젠 수용체 α, β 유전자의 발현을 촉진시키는 등 스테로이드 호르몬 대사에 관여한다 [42]. 그리고 모체의 유선 발생을 유도한다 [39]. PL-Iv는 NB2 lymphoma 세포의 분화를 유도하며 tyrosine 인산화를 통해 STATs (signal transducers and activators of transcription)을 활성화시키는 JAK2 (Janus tyrosine kinase 2) 유전자의 발현을 유도한다 [43]. PLP-A는 fetus의 착상 부위에서 natural killer(NK)세포에 반응하여 NK세포의 활성을 억제한다고 알려져 있다 [44,45]. PLP-B는 deciduom세포의 분화를 유도하고 [12] dPRP 태반 형성에 관여한다 [46]. PLP-C와 Cv는 임신 후반기에 태반의 성장 및 모체와의 생리 조절에 관여한다 [8,47]. 이러한 연구 결과들로 보아 크롬 투여에 의한 이들 호르몬 유전자의 발현 억제 및 이에 따른 PRL-GH군 호르몬 농도 감소는 태반 세포의 분화, 스테로이드 호르몬 대사, 임신유지, 모체와의 생리적 조절 등의 태반기능에 대한 장해요인으로 작용할 것이다.

이 연구에서 확인된 크롬 투여에 의한 PRL-GH군 호르몬 농도 저하의 보다 구체적인 원인은 임신기간에 따라 3가지로 분류되는데 첫 번째로 임신중기(임신 7-14일)에 크롬에 의하여 태반세포의 분화를 유도하는 PL-Iv, PLP-B, C, Cv, dPRP 등의 호르몬 분비가 감소됨에 따라 태반을 구성하는 세포들의 분열이 유도되지 못하여 결과적으로 태반의 성장이 지연된 것을 들 수 있다. 두 번째로는 임신 후

기(임신 14-21일)에 크롬에 의한 PRL-GH군 호르몬 유전자의 발현억제이다. 그리고 이 과정에는 크롬에 의한 Pit-1 유전자의 발현 억제가 주요한 원인으로 작용하였을 것이다. Pit-1 유전자는 사람과 랫트의 뇌하수체와 태반에서 PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현유도인자로 작용하며 [20,22,23], 이 연구에서 대조군에 비하여 크롬에 폭로된 흰쥐의 태반에서 Pit-1 유전자의 발현이 억제됨을 확인하였다. 도파민과 멜라토닌 [22,23,48] 그리고 에스트로젠 등의 스테로이드 호르몬이 [21,23] 뇌하수체와 태반에서 Pit-1a, b isotype 유전자의 발현 조절 인자로 알려져 있다. 크롬에 의한 도파민 및 기타 내분비계물질 분비에 대한 영향은 오래 전부터 연구되어 왔는데, 크롬은 사람과 랫트의 시상하부와 뇌하수체에서 신경 내분비계 신호 전달 물질들과 호르몬 분비를 교란시키며, 특히 도파민 분비를 교란시킨다 [49-51]. 도파민을 포함한 신경내분비계 신호전달물질들은 Pit-1a, b isotype 유전자 및 프로락틴 유전자의 발현에 직, 간접적으로 관련되며 따라서 크롬 폭로에 의한 신경내분비계 물질분비의 교란은 Pit-1a, b isotype 유전자 등에 의해 유전자 발현이 조절되어 진다고 알려진 태반의 PRL-GH군 호르몬 유전자들의 발현에도 영향을 미쳤을 것이다. 세 번째 원인으로서는 임신 후기에 크롬축적에 의해 유도된 태반세포의 apoptosis에 의한 태반세포의 감소를 들 수 있다. Apoptosis의 원인 기작은 다양하고, apoptosis와 관련된 유전자들도 Bcl, Bad, Bak, Bax 등 다양하게 밝혀져 있다 [52-55]. 그러나 이 연구에서는 이들 apoptosis 관련 유전자들에 관한 실험은 수행하지 못하여 크롬에 의한 태반 세포의 apoptosis 유도 기작을 분자생물학적으로 설명하기는 어렵다. 다만 선행된 관련 분야의 연구 결과들로 미루어 보아 일반적인 apoptosis 유도 기작, 즉 glutathione과 단백질-sulphydryl group의 고갈로 인한 superoxide 이온과 hydroxyl radical 등의 증가와 이로 인한 지질의 과산화, 세포내 환경의 과산화 및 DNA와

세포막 파괴 유전자 발현의 교란 등이 주요 원인으로 작용하리라 추정된다 [56]. 기타 원인으로 크롬 대사는 기타 중금속들과 마찬가지로 중금속 결합 단백질인 metallothionein (MT)에 의해 조절되는데 [27,28], 태반에서 MT가 발현되는 주요 세포 중 이 spongiotrophoblast, trophoblast giant 등 PRL-GH군 호르몬을 분비하는 세포들인 점으로 보아 [29,57] MT에 의한 spongiotrophoblast, trophoblast giant 세포에서의 크롬 대사는 앞서 언급된 PRL-GH 유전자 발현 억제에 따른 태반 세포의 분화 억제 등 태반의 기능장해를 일으키는 원인이 될 수 있을 것이다. 그러나 MT는 태반세포에서 중금속에 의한 과산화물 생성억제 이전에 관여하여 apoptosis를 억제하는 [58, 59] 등 그 작용기전이 다양하므로 추후 보다 구체적인 연구가 필요하다.

이 연구에서 투여된 크롬의 양은 fetus, 태반, 모체 혈액의 농도를 감안할 때 인체에 노출될 가능성은 낮은 고농도이었다. 그리고 지금까지 연구된 크롬에 의한 사람의 태반 및 출산에 미치는 영향에 관한 자료는 미비한 실정이라서 태반의 크롬농도에 관한 일반인들의 자료 뿐 아니라 크롬 폭로 집단(지역)에서의 크롬 농도와 유산율, 태아의 체중 등의 발생학적 자료 또한 부족한 실정이다. 따라서 이 연구의 결과를 사람에게 적용하여 설명하기에는 많은 제한점이 있다. 다만 동물실험을 통한 연구 [36,37,60]에서 보고된 크롬 투여에 의한 유산율 증가, fetus 성장 지연 등을 설명할 수 있는 보다 근본적인 원인을 제시할 수는 있을 것이다. 이 연구에서 조사된 크롬에 의한 PRL-GH군 호르몬 분비 억제와 이에 따른 태반세포의 분화 억제, 그리고 apoptosis 유도는 유산과 fetus 성장 지연 등을 포함한 발생장해의 주요 원인으로 작용하였을 것이다.

결론

랫트에 크롬을 투여한 후 태반 세포의 PRL-GH군과 Pit-1 유전자의 발현,

apoptosis, 세포 분화, 발생학적 자료들을 관찰하여 크롬 투여가 랫트 태반의 기능과 발생에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 연구 결과 크롬 투여는 랫트 태반의 PRL-GH군 호르몬 유전자의 발현과, 이들 유전자의 발현 유도 인자인 Pit-1a, b isotype 유전자의 발현을 억제하였으며, 태반, fetus 및 모체 혈중의 PL-Iv, PL-II 농도를 감소시켰다. 고농도 투여군에서는 PRL-GH군 호르몬을 분비하는 spongiotrophoblast의 분화를 억제하고 apoptosis를 유도하였으며 fetus의 체중과 수를 감소시켰다. 이러한 결과들은 임신 중 크롬 폭로가 태반 기능을 교란시켜 발생의 장애요인으로 작용할 수 있음을 시사한다.

참고문헌

1. Robertson MC, Cosby H, Fresnoza A, Cattini PA, Shiu RP, Friesen HG. Expression, purification, and characterization of recombinant rat placental lactogen-I: a comparison with the native hormone. *Endocrinology* 1994; 134: 393-400
2. Deb S, Faria TN, Roby KF, Larsen D, Kwok SC, Talamantes F, Soares MJ. Identification and characterization of a new member of the prolactin family, placental lactogen-I variant. *J Biol Chem* 1991; 266: 1605-1610
3. Duckworth ML, Kirk KL, Friesen HG. Isolation and identification of a cDNA clone of rat placental lactogen II. *J Biol Chem* 1986; 261: 10871-10878
4. Campbell WJ, Deb D, Kwok SCM, Joslin JA, Soares MJ. Differential expression of placental lactogen-II and prolactin-like protein-A in the rat chorioallantoic placenta. *Endocrinology* 1989; 125: 1565-1574
5. Duckworth ML, Schroedter IC, Friesen HG. Cellular localization of rat placental lactogen II and rat prolactin-like proteins A and B by in situ hybridization. *Placenta* 1990; 11: 143-155
6. Duckworth ML, Peden LM, Friesen HG. Isolation of a novel prolactin-like cDNA clone from developing rat placenta. *J Biol Chem* 1986; 261: 10879-10884
7. 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
8. Deb S, Roby KF, Faria TN, Szpirer C, Levan G, Kwok SCM, Soares MJ. Molecular cloning and characterization of prolactin-like protein C complementary deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 1991; 266: 23027-23032
 9. Dai G, Liu B, Szpirer C, Levan G, Kwok SC, Soares MJ. Prolactin-like protein-C variant: complementary deoxyribonucleic acid, unique six exon gene structure, and trophoblast cell-specific expression. *Endocrinology* 1996; 137: 5009-5019
 10. Iwatsuki K, Shinozaki M, Hattori N, Hirasawa K, Itagaki S, Shiota K, Ogawa T. 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
 11. Roby KF, Deb S, Gibori G, Szpirer C, Levan G, Kwok SCM, Soares MJ. Decidual prolactin-related protein. *J Biol Chem* 1993; 268: 3136-3142
 12. Ishibashi K, Imai M. Identification of four new members of the rat prolactin/growth hormone gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 575-578
 13. Toft DJ, Linzer DI. Prolactin (PRL)-like protein J, a novel member of the PRL/growth hormone family, is exclusively expressed in maternal decidua. *Endocrinology* 1999; 140: 5095-5101
 14. Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 1988; 55: 519-529
 15. Karin M, Theill L, Castrillo JL, McCormick A, Brady H. Tissue-specific expression of the growth hormone gene and its control by growth hormone factor1. *Recent Prog Horm Res* 1990; 46: 43-57
 16. 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
 17. Ruvkun G, Finney M. Regulation of transcription and cell identity by POU domain proteins. *Cell* 1991; 64: 475-478
 18. 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
 19. Li S, Crenshaw EB 3rd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 1990; 347: 528-533
 20. Bamberger AM, Bamberger CM, Pu LP, Puy LA, Loh YP, Asa SL. Expression of pit-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2021-2026
 21. Lee BJ, Jeong JK, Kim JH, Kang SG, Kim MO, Choi WS. Local expression of a POU family transcription factor, Pit-1, in the rat placenta. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 118: 9-14
 22. Lee CK, Kang HS, Lee BJ, Kang HM, Choi WS, Kang SG. 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
 23. Lee CK, Kang HS, Lee BJ, Kang HM, Choi WS, Kang SG. 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
 24. Donaldson DL, Rennert OM. Chromium (III) metabolism by the kidney. *Ann Clin Lab Sci* 1981; 11: 377-385
 25. Ding M, Shi X, Castranova V, Vallyathan V. Predisposing factors in occupational lung cancer: inorganic minerals and chromium. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 129-138
 26. Gibb HJ, Lees PS, Pinsky PF, Rooney BC. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med* 2000; 38: 115-126
 27. Fleet JC, Golemboski KA, Dietert RR, Andrews GK, McCormick CC. Induction of hepatic metallothionein by intraperitoneal metal injection: an associated inflammatory response. *Am J Physiol* 1990; 258: 926-933
 28. Solis-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B, Sierra-Santoyo A, Hernandez JM, Brambila E, Cebrian ME, Albores A. Chromium increases pancreatic metallothionein in the rat. *Toxicology* 2000; 142: 111-117
 29. Goyer RA, Faust MD, Cherian MG. Cellular localization of metallothionein in human term placenta. *Placenta* 1992; 13: 349-355
 30. Cheng L, Sonntag DM, de Boer J, Dixon K. Chromium(VI)-induced mutagenesis in the lungs of big blue transgenic mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 239-249
 31. D'Agostini F, Izzotti A, Bennicelli C, Camoirano A, Tampa E, De Flora S. Induction of apoptosis in the lung but not in the liver of rats receiving intra-tracheal instillations of chromium(VI). *Carcinogenesis* 2002; 23: 587-593
 32. Pritchard DE, Ceryak S, Ha L, Fornisaglio JL, Hartman SK, O'Brien TJ, Patierno SR. Mechanism of apoptosis and determination of cellular fate in chromium(VI)-exposed populations of telomerase-immortalized human fibroblasts. *Cell Growth Differ* 2001; 12: 487-496
 33. Vasant C, Balamurugan K, Rajaram R, Ramasami T. Apoptosis of lymphocytes in the presence of Cr(V) complexes: role in Cr(VI)-induced toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 1354-1360
 34. Travacio M, Polo JM, Llesuy S. Chromium (VI) induces oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology* 2001; 162: 139-148
 35. Zhang Z, Leonard SS, Wang S, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. Cr (VI) induces cell growth arrest through hydrogen peroxide-mediated reactions. *Mol Cell Biochem* 2001; 222: 77-83
 36. Kanojia RK, Junaid M, Murthy RC. Chromium induced teratogenicity in female rat. *Toxicol Lett* 1996; 89: 207-213
 37. Kanojia RK, Junaid M, Murthy RC. Embryo and fetotoxicity of hexavalent chromium: a long-term study. *Toxicol Lett* 1998; 95: 165-172
 38. Thordarson G, Galosy S, Gudmundsson GO, Newcomer B, Sridaran R, Talamantes F. Interaction of mouse placental lactogens and androgens in regulating progesterone release in cultured mouse luteal cells. *Endocrinology* 1997; 138: 3236-3241
 39. Galosy SS, Talamantes F. Luteotropic actions of placental lactogens at midpregnancy in the mouse. *Endocrinology* 1995; 136: 3993-4003
 40. 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
41. Forsyth IA. Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102: 244-251
 42. Telleria CM, Zhong L, Deb S, Srivastava RK, Park KS, Sugino N, Park-Sarge OK, Gibori G. 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
 43. Cohick CB, Dai G, Xu L, Deb S, Kamei T, Levan G, Szpirer C, Szpirer J, Kwok SC, Soares MJ. Placental lactogen-I variant utilizes the prolactin receptor signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 116: 49-58
 44. Muller H, Liu B, Croy BA, Head JR, Hunt JS, Dai G, Soares MJ. Uterine natural killer cells are targets for a trophoblast cell-specific cytokine, prolactin-like protein A. *Endocrinology* 1999; 140: 2711-2720
 45. Ma GT, Linzer DI. GATA-2 restricts prolactin-like protein A expression to secondary trophoblast giant cells in the mouse. *Biol Reprod* 2000; 63: 570-574
 46. 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: 647-654
 47. Conliffe PR, Simmen RC, Buhl WC, Shiverick KT. Cloning of a novel rat placental prolactin-like protein C-related cDNA. *Mol Reprod Dev* 1995; 41: 167-176
 48. 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: 22919-22925
 49. Pattison DI, Davies MJ, Levina A, Dixon NE, Lay PA. Chromium(VI) reduction by catechol(amine)s results in DNA cleavage in vitro: relevance to chromium genotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 500-510
 50. Pattison DI, Lay PA, Davies MJ. EPR studies of chromium(V) intermediates generated via reduction of chromium(VI) by DOPA and related catecholamines: potential role for oxidized amino acids in chromium-induced cancers. *Inorg Chem* 2000; 39: 2729-2739
 51. Shaikin-Kestenbaum R, Caruso C, Berlyne GM. Effect of chromium on oxygen free radical metabolism, inhibition of superoxide dismutase and enhancement of 6-hydroxydopamine oxidation. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1991; 5: 197-201
 52. Matuszyk J, Kalas W, Cebrat M, Strzadala L. High expression of endogenous bcl-2 and bcl-xL in thymic lymphomas do not diminish their sensitivity to etoposide-induced apoptosis. *Anticancer Res* 2001; 21: 2677-2680
 53. Schimmer AD, Hedley DW, Pham NA, Chow S, Minden MD. BAD induces apoptosis in cells over-expressing Bcl-2 or Bcl-xL without loss of mitochondrial membrane potential. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 429-443
 54. Sundararajan R, Cuconati A, Nelson D, White E. Tumor Necrosis Factor-alpha Induces Bax-Bak Interaction and Apoptosis, Which Is Inhibited by Adenovirus E1B 19K. *J Biol Chem* 2001; 276: 45120-45127
 55. Huh WK, Gomez-Navarro J, Arafat WO, Xiang J, Mahasreshti PJ, Alvarez RD, Barnes MN, Curiel DT. Bax-induced apoptosis as a novel gene therapy approach for carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 370-377
 56. Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001; 20: 77-88
 57. Powlin SS, Keng PC, Miller RK. Toxicity of cadmium in human trophoblast cells (JAR choriocarcinoma): role of calmodulin and the calmodulin inhibitor, zaldaride maleate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 144: 225-234
 58. McAleer MF, Tuan RS. Metallothionein protects against severe oxidative stress-induced apoptosis of human trophoblastic cells. *In Vitro Mol Toxicol* 2001; 14: 219-231
 59. McAleer MF, Tuan RS. Metallothionein overexpression in human trophoblastic cells protects against cadmium-induced apoptosis. *In Vitro Mol Toxicol* 2001; 14: 25-42
 60. Junaid M, Murthy RC, Saxena DK. Embryotoxicity of orally administered chromium in mice: exposure during the period of organogenesis. *Toxicol Lett* 1966; 84: 143-148