

## 초산납 투여에 의한 흰쥐 간 손상의 전자현미경적 변화

계명대학교 의과대학 병리학교실 및 의과학연구소

장은숙·오진석

### Ultrastructural Changes of Lead Acetate Induced Liver Injury in Rats

Eun Sook Chang, M.D. and Jin Seok Oh, M.D.

Department of Pathology, Institute for Medical Science  
Keimyung University School of Medicine

To evaluate the ultrastructural changes and the mechanism causing liver injury by lead, light and electron microscopic(LM and EM) examination using Timm sulphide silver method(TSM) was done. Sprague-Dawley rats were divided into a control and 3 experimental groups. The experimental groups were orally administered 0.5% lead acetate(LA). Group 1 received a one time dose of 10 ml of LA by gastric intubation. Groups 2 and 3 continuously received LA instead of drinking water. The control group was composed of 3 rats in each group which did not receive any treatment. Rats of group 1, 2 and 3 and control were sacrificed at  $\frac{1}{2}$ , 1,  $1\frac{1}{2}$  hours, 2 days, and at 1, 2, 4, 6 and 8 weeks later, except group 3. Before sacrifice, they were perfused with 0.1% sodium sulphide and 2.5% glutaraldehyde through the abdominal aorta for TSM. The liver was taken for LM and EM examinations. Blood lead concentration began to increase from the 2nd day up to  $3.29 \mu\text{g/ml}$  at 2nd week, and the urinary  $\delta$ -ALA level showed a steady increase from the 2nd day. LM and EM examination of liver revealed that absorbed lead granules in group 1 were transported into sinusoidal spaces, Kupffer cells, and the hepatocytes within 1 hour and then disappeared  $\frac{1}{2}$  hour thereafter. In group 2 deposited lead was found in the hepatocytic cytosol bound to mitochondria. That in turn inhibited mitochondrial respiration with resultant mitochondrial swelling at the 1st week and thereafter at 6th week myelin figure formation and condensation of mitochondria, and peroxisomes were increased at 8th week.

Based on these results it can be concluded that a transient intake of sublethal dose of LA is biotransformed completely by periportal hepatocytes within  $1\frac{1}{2}$  hours, but excessively accumulated lead can induce liver cell injury due to lipid peroxidation of membrane by direct toxic effect of lead and by products of lipid peroxidation. We postulate that lead acetate triggers presumably primarily mitochondrial membrane injury and then other organellar changes may play a role in disturbance of a network of interacting of key events capable of causing cell death. (Korean J Pathol 1996; 30: 184~198)

**Key Words:** Lead acetate, Rat liver, Mitochondrial swelling, Lipid peroxidation

## 서 론

산업화후 중금속의 환경오염은 심각하게 되었고 중금속중에서 납은 그 사용이 급증하여 어디서나 발견되며 자동차의 배기중에서 가장 흔한 중금속이 납이다<sup>1</sup>. 공업화된 도시의 공장에서 배출되는 매연 또한 대기부유납(air born lead)의 급속한 증가가 그 원인이 되고 있다. 그외 납으로 오염된 먼지, 오염된 환경에서 자란식물, 토양, 식물뿌리, 물 그리고 신문지, 페인트, 축전지제조, 납광산, 제련소 등 납의 근원을 들 수 있다<sup>2,3</sup>. 또 드물게는 한약제 복용 후 납중독이 발생하는 경우도 있다<sup>4</sup>. 무기납염은 섭취 혹은 호흡을 통해서 흡수되고 유기납염은 피부를 통해서도 흡수될 수 있다. 납의 위장관 흡수는 섭취한 양의 약 10%이며 소아에서 50%이고 폐를 통한 흡수는  $1 \mu\text{m}$  이하 입자들이 폐포에 도달하면 혈중으로 흡수된다. 일반적으로 위장관을 통한 흡수와 비교할때 호흡기를 통한 흡수가 높고 피부를 통한 것이 낮다.

납은 소량으로 장기간 흡수되면 누적된 독성효과를 나타낼 수 있다<sup>5</sup>. 안정된 상태에서 섭취된 납의 5~10%가 혈중에 발견되며 이 분획의 95%는 급속히 적혈구 및 혈장과 결합하여 평형을 유지하고 신장을 통해 배설된다. 혈중납의 일부는 조직내로 확산되어 간, 신, 뇌, 골수등에 분포되고 이 분포된 납의 양은 직접 그 독작용과 관계가 있다. 그러나 예외적으로 뼈, 이빨, 손톱, 머리카락등에 분포된 납은 비교적 불활성이고 해롭지 않는데 뼈에서는 납이 견고하게 lead phosphate hydroxide로 결합하기 때문이다<sup>6</sup>.

유기납에 노출된 후 주된 납의 축적은 간과 신장에 일어나며, 간에서는 tetraalkyl Pb가 주로 cytochrome P-450 의존성 oxidative dealkylation에 의해 trialkyl Pb 및 무기 Pb로 전환하는 대사가 일어나며, 이 trialkyl Pb가 뇌에 운송되면 신경독성 효과를 일으킨다<sup>7</sup>. 이와 같이 납에 대한 연구는 주로 신경계<sup>8~10</sup>, 신장<sup>11~14</sup>, 조혈계<sup>15~17</sup>의 장애에 대해서 이루어져 왔으나, 실험적 목적으로 납에 노출시킨 돼지<sup>18</sup>, 쥐<sup>19~21</sup>, 물고기<sup>22</sup>, 거위<sup>23</sup>등에서 간의 변화에 대한 보고들이 있기는 하나 흡수과정의 설명과 함께 상세한 미세구조변화를 기술한 보고는 없다.

이 연구는 흰쥐에서 초산납을 투여한 후 Timm에 의해 제시된 sulphide silver 방법<sup>24,25</sup>을 사용하여 간에 납이 축적되는 과정을 살펴볼과 아울러 경시적으로 납이 간에 미치는 상해와 그 발생기전을 알아

본 연구로서 납이 축적된 간조직을 광학 및 전자현미경적으로 관찰하여 그 성적을 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

체중 250 g 내외의 Sprague-Dawley종 숫컷 흰쥐를 일정기간 사육하여 환경에 적응시킨 후 건강한 쥐 66마리를 골라서 실험재료로 하여 다음과 같이 실험하였다.

### 2. 실험방법

실험은 대조군과 3군의 실험군으로 나누어서 시행하였다.

1) 초산납투여 방법: 0.5% 초산납(lead acetate, trihydrate( $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 수용액을 조제하여 이 수용액을 임의로 1회 먹이고 또는 계속 자율적으로 마시게 하였다.

실험 1군: 0.5% 초산납 수용액 10 ml를 임의로 1회 위내 경구 삽입한 관을 통해 먹인 후 30분, 60분, 90분 후 도살하여 Timm sulphide silver기법<sup>21,22</sup>을 이용하기 위해서  $\text{Na}_2\text{S}$ 로 관류하였다(9마리). 각각 채취한 투과전자현미경용으로 포매된 간조직을  $1 \mu\text{m}$  두께로 잘라 toluidin blue로 대조염색하여 광학현미경 관찰에 사용하였다.

실험 2군: 0.5% 초산납 수용액을 물대용으로 계속 마시게하고 2일, 1, 2, 4, 6, 8주 후 도살하여  $\text{Na}_2\text{S}$ 로 관류하였다(24 마리).

실험 3군: 실험 2군과 같이 0.5% 초산납 수용액을 투여한 후 같은 시기에 혈액을 복부대동맥에서 채취하고 광학 및 투과전자현미경 검사를 위해 도살하였다. 이때  $\text{Na}_2\text{S}$ 는 관류하지 않았으며, 일부 간조직은 동결절편을 만들기 위해 냉동보관 하였다(24 마리).

대조군: 위의 각군의 대조로 아무 처치를 하지 않은 흰쥐를 같은 방법으로 도살하였다(9 마리).

2) 혈중 납 농도의 측정: 도관을 통해 채취한 혈액을 Stahr<sup>26</sup>가 제시한 방법에 따라 inductively coupled plasma(ICP)로 측정하였다.

3) 요중  $\delta$ -aminolevulinic acid(ALA)의 측정: Wada 등<sup>27</sup>의 방법에 따라 대사 케이지로 채취한 요 2 ml에 20% acetic acid 2.0 ml을 정확히 가한 다음 여기에 n-butanol 8.0 ml을 가하여 흔들어 혼합하고 약 5분간 방치한 후 상층액을 스포이드로 제거하고 하층액을 두개의 시험관에 각각 0.5 ml씩을 취하였다. 그중 1개에는 1.0 M phosphate buffer(PB, pH 6.8) 1.5

ml을 가하고 또 다른 한개에는 1/20 v/v ethyl acetate(in PB, (pH 6.8)) 1.5 ml을 가하여 끓는 물에서 10분간 가온하였다. 냉각 후 Erlich 시약 2.0 ml을 가하여 10분간 반응시킨 후 여기에  $\text{CHCl}_3$  4.0 ml을 가하고 잘 혼합한 다음 5분 후에  $\text{CHCl}_3$  층을 취하여 560 nm 파장에서 비색 정량 하였으며 그치는 미리 정량해 두었던 creatinine치로 보정하였다.

#### 4) Timm sulphide silver 기법을 이용한 관찰

(1) Sulphide의 공급: 흰쥐를 ether 마취하에 복부 정중선을 따라 절개한 후 복부대동맥 분지점에 도관을 혈류의 역방향으로 삽입하여 결찰하였고 도관을 통해 5000 IU/ml 헤파린 0.3 ml을 주입하였다. 혈액을 채취한 후 횡격막을 열고 흉부 대동맥을 결찰하였다. Danscher와 Zimmer<sup>24</sup>가 제시한 방법에 따라 이미 삽입된 도관을 통하여 0.1% sodium sulfide용액(in 0.1 M PB, pH 7.4) 5 ml을 주입한 후 2.5% glutaraldehyde(GA)용액(in 0.1 M PB, pH 7.4)을 3분 동안 약 100 ml를 주입하였고 다시 0.1% sodium sulfide 용액 250 ml를 약 7분 동안에 주입하였다. 관류를 마친 후 간조직을 채취하여 광학현미경 및 전자현미경적 관찰을 위한 시료로 제공하였다.

(2) 광학현미경적 관찰: 채취된 간 조직을 2.5% GA 용액으로 2시간 동안 고정한 후 계열 에탄올로 탈수하고 연질 파라핀으로 45°C에서 침투 및 포매를 실시하였다. 두께 4  $\mu\text{m}$ 의 절편을 유리슬라이드에 부착시켜 탈파라핀 및 함수과정을 거친 다음 0.5% 젤라틴을 피복한 후 현상 하였으며 증류수로 세척한 다음 methylene blue로 염색하였다. 또 냉동 절편을 만들어 Oil red O 염색을 하였다.

(3) 투과전자현미경적 관찰: 실험 1군에서 채취된 간조직을 1×1×4 mm의 크기로 세절하여 2.5% GA 용액으로 1~4°C에서 2시간 동안 고정한 후 0.1 M PB로 세척한 다음 계열 에탄올로 탈수과정을 거친 후 propylene oxide(PO)로 치환하였다. Luft방법<sup>28</sup>에 의해 poly/Bed<sup>®</sup> 812 Resin으로 포매하여 37°C에서 12시간, 45°C에서 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1  $\mu\text{m}$  두께로 박절하여 현상한 다음 toluidine blue로 염색하여 관찰부위를 선택하였다. Sorvall MT 5000형 초박절기에 Dupont diamond 칼을 부착하여 회백색(40~60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 제작하여 nickel grid에 부착한 다음 Watson<sup>29</sup>과 Reynolds<sup>30</sup>에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

(4) 현상: 광학현미경 관찰과 투과전자현미경적 관찰시 이미 시료내에 존재하는 납을 가시화하기 위

해 Danscher와 Zimmer가 제시한 현상방법<sup>24</sup>을 따랐으며 사용한 현상액은 gum arabic용액, citrate완충액, 환원제와 은용액을 각각 60 : 10 : 15 : 15의 비율로 섞어서 사용하였다. 광학현미경적 관찰을 위해 유리슬라이드에 부착된 시료에 현상액을 떨어뜨린 후 암실에서 26°C에 1시간 동안 방치하였으며, 투과전자현미경을 위해 시료가 부착된 그리드를 현상액 속에 침수시킨 후 26°C 암실에서 1시간 동안 방치하였다. Gum arabic 용액은 crystalline gum arabic 1 kg을 2 liter의 증류수에 녹여 5일간 방치한 후 거즈로 걸러서 사용하였으며 citrate 완충액은 22.5 g의 citric acid와 23.5 g의 sodium citrate를 100 ml의 증류수에 녹여서 사용하였다. 환원제로서는 0.85 g의 hydroquinone을 15 ml의 증류수에 녹여서 사용하였으며, 은용액은 0.11 g의 silver lactate를 15 ml의 증류수에 녹여서 사용하였다. 은용액은 현상직전에 나머지 용액들과 섞어서 사용하였고 암실에서 26°C를 유지하면서 1시간 동안 방치하였다.

5) 투과전자현미경적 관찰: 실험 3군에서 채취한 간조직을 실험 1군에서 행한 Timm sulphide silver 기법 이용한 투과전자현미경적 방법과 같으나 다만 포매 조직을 현상 하지 않는 점만 다르다.

## 성 적

### 1. 혈중 납 농도

전 실험기간 동안 대조군은 평균 0.92  $\mu\text{g/ml}$ 이었고 3군은 초산납 투여 2주째에 평균 3.29  $\mu\text{g/ml}$ 으로 최고치를 나타내다가 그 이후는 대체로 유사하게 증가된 농도를 유지하였다(Fig. 1).

### 2. 요중 $\delta$ -aminolevulinic acid(ALA)치

대조군은 9.8 mg/mg creatinine이었고 초산납을 투여한 군은 1주째에 대조군에 비해 현저히 증가되었고 2주째에서는 31.7 mg/mg creatinine로 감소되었다가 8주째에는 71.7 mg/mg creatinine으로 다시 증가되었다(Fig. 2).

### 3. 광학현미경적 소견

1) 대조군: 대조군에서 간 조직은 간삭이 정상적으로 잘 유지되어 있고 간세포들은 풍부한 호산성 세포질과 1개의 핵을 가지고 있었다. Kupffer세포들은 잘 유지되어 있는 동양혈관의 가장자리에 위치하였고 종말간세포는 정상적으로 제 위치에 존재했다.

2) 실험군:

실험 1군(Timm반응 후); 0.5% 초산납 수용액 10 ml를 1회 주여한 후 30분에 문맥역 주위에서부터 종말간세정맥 주위까지 미만성으로 동양구조와 이

에 의한 산세포의 변두리를 따라 강하게 반응하는 가지화된 납이 검은 청색의 입자들로 나타났고(Fig. 3a) 60분에는 이런 반응이 거의 다 없어지고 대신 Kupffer 세포들에서 강하게 나타났으며(Fig. 3b) 90분

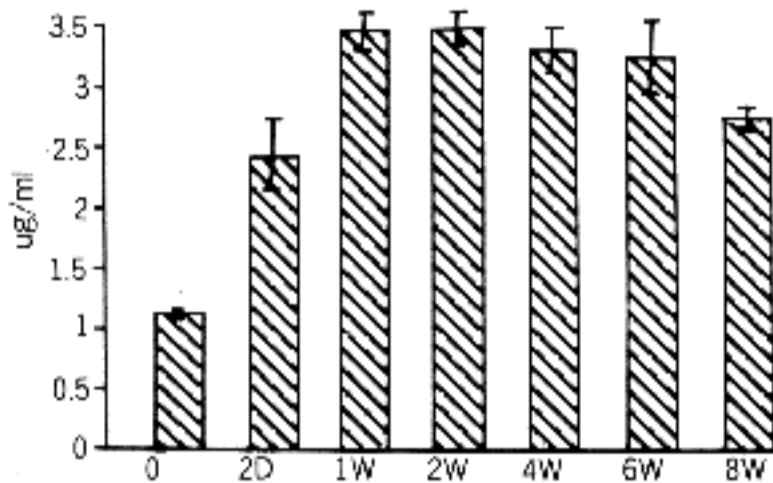


Fig. 1. Blood lead level after administration of 0.5% lead acetate in group 3. D: day, W: week.

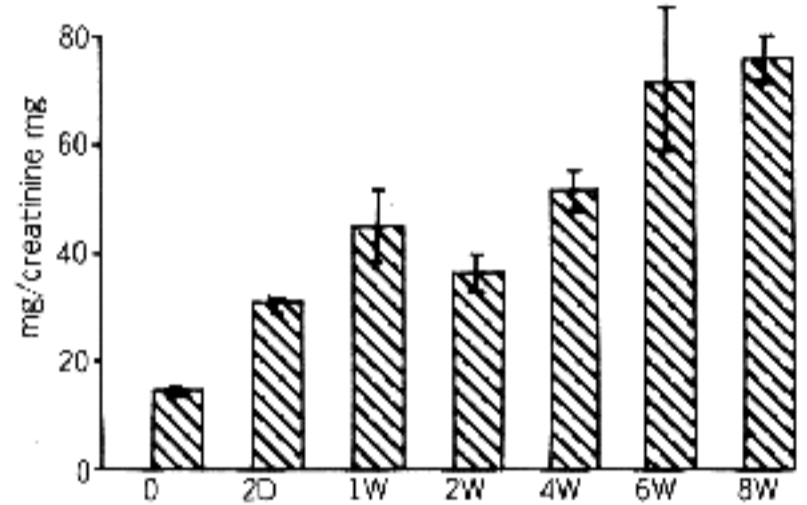


Fig. 2. Urine delta-aminolevulinic acid level after administration of 0.5% lead acetate in group 3. D: day, W: week

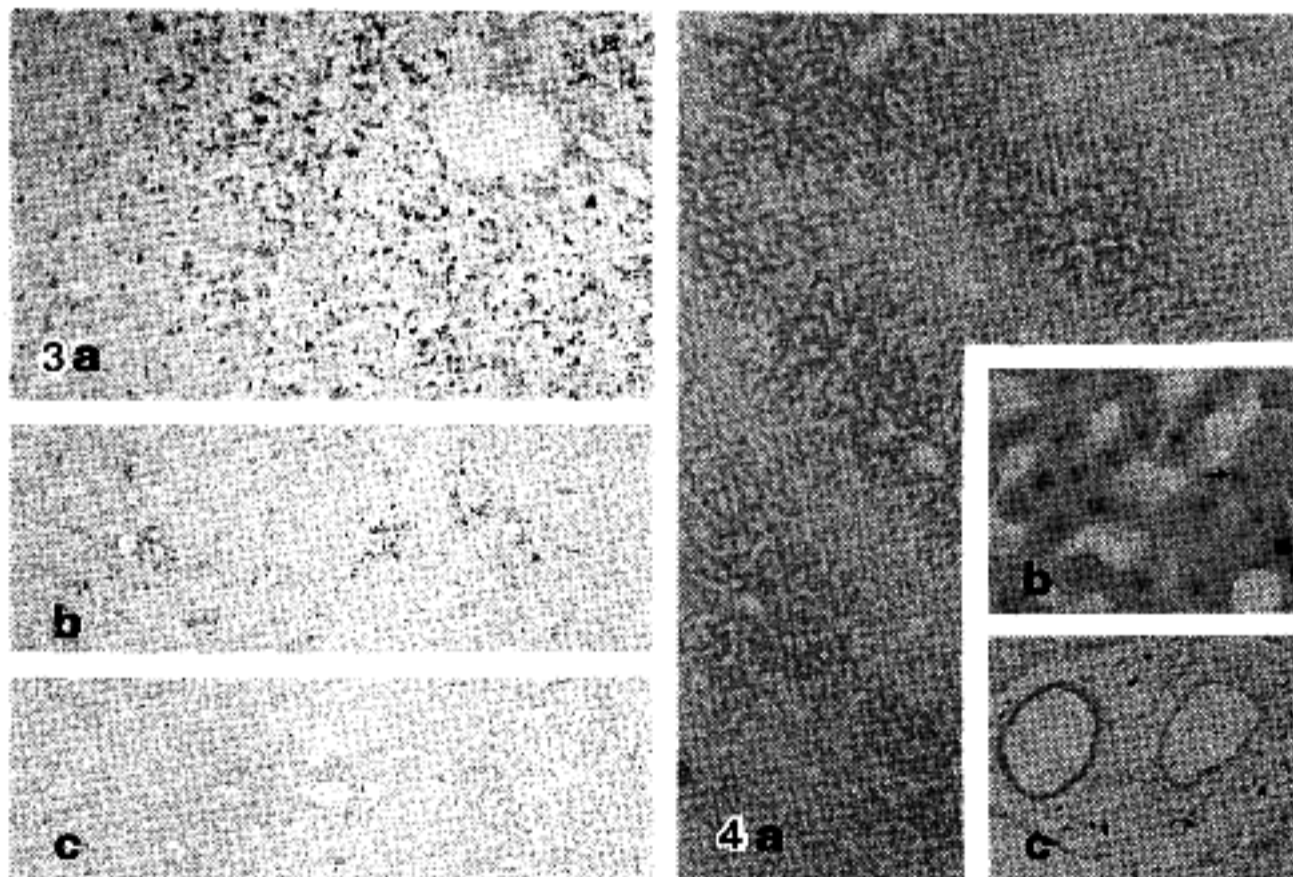
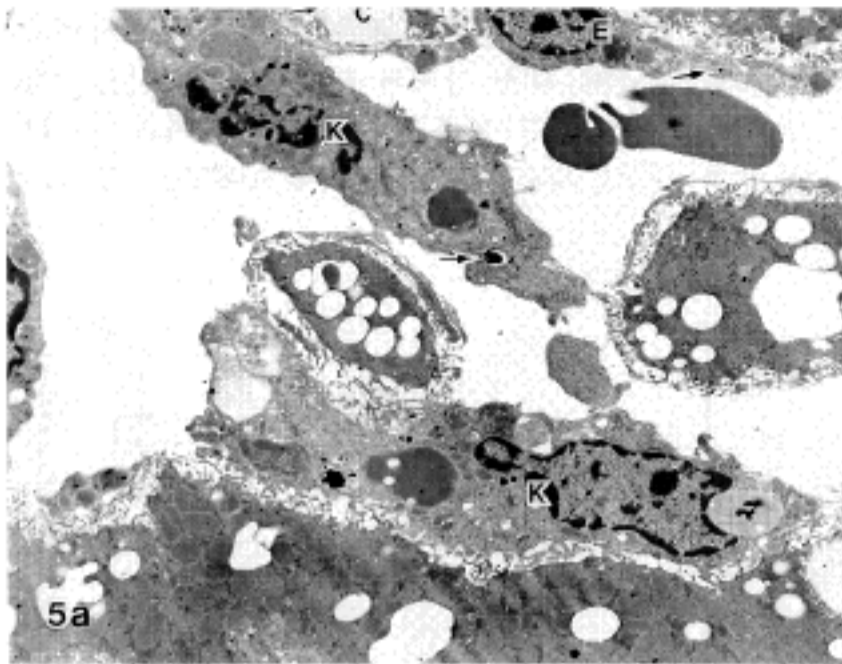
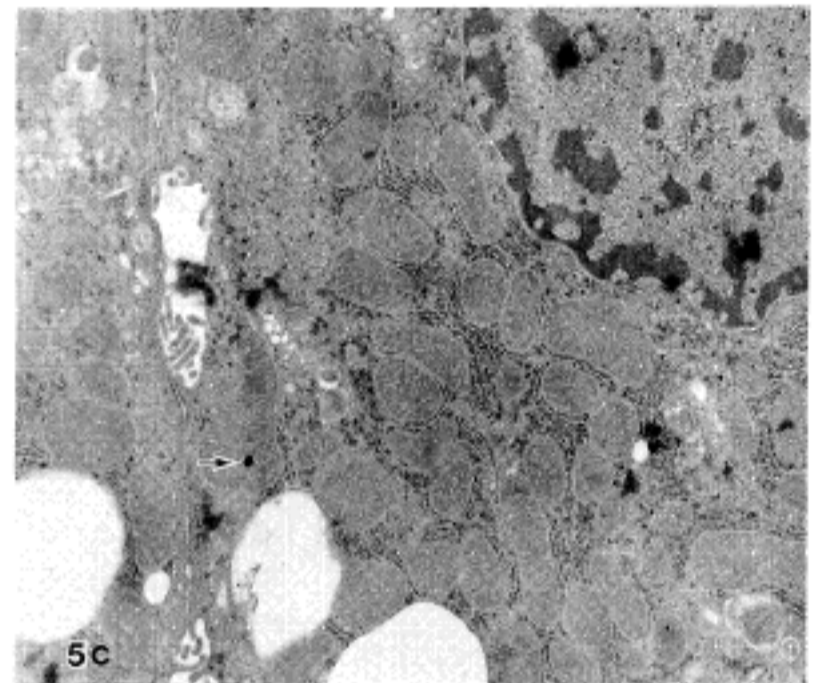
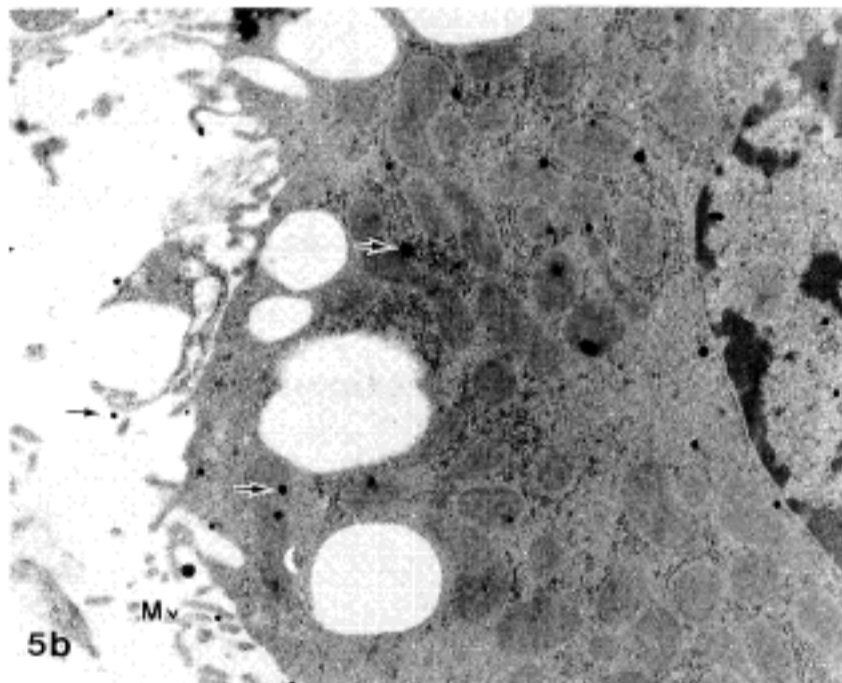


Fig. 3. Group 1. a) 1/2 hr after administration of 0.5% lead acetate(AL). Lead granules in sinusoidal spaces around the portal areas spread to periphery. Lead granules are strongly reactive. b) 1 hr later lead granules are present only in Kupffer cells. c) 1 1/2 hrs later, no reactive lead granules are seen(Semithin sections with toluidin blue stain with Timm sulphid silver method, ×100).

Fig. 4. Group 2. 2 days after continuous AL. a) Strong reaction around portal areas, brown stained cytoplasm and deep brown stained nucleus of hepatocytes. b) Lead granules(arrow) are visible. c) Portal vein and hepatic vein were reactive but bile ductule is nonreactive(Paraffin sections with methylene blue stain with Timm sulphid silver method, ×100). Abbreviation as in Fig. 3.



Key for Abbreviation	
BC: Bile canaliculus	M: Microvilli of sinusoidal border
C: Collagen	N: Nucleus
E: Endothelial cell	P: Peroxisome
K: Kupffer cell	RER: Rough endoplasmic reticulum
L: Lipid	
Ly: Secondary lysosome	
MF: Myelin figure	
M: Mitochondria	



**Fig. 5.** Group 1. a) 1/2 hr after AL. Lead granules(arrow) are in sinusoid, Kupffer cells(K), endothelial cell(E), collagen(C) and hepatocytes(×6,800). b) 1 hr later. Lead granules(arrow) in sinusoidal space and in hepatocyte mitochondria, nucleus and cytosol (×20,400). c) 1 1/2 hrs later only a few lead granules(arrow) are remained(Timm sulphid silver, ×17,000).

**Table 1.** Light and electron microscopic findings of rat liver by Timm sulphide silver reaction after administration of 0.5% lead acetate

Group	Light microscopy	Electron microscopy
1	1/2 hr Lead granule deposits along sinusoid in portal areas spreading to periphery	Lead granules in sinusoid, cytoplasm of Kupffer cell, endothelial cell, and collagen bundle
	1 hr Deposits in Kupffer cells	Deposits in cytosol and nucleus of hepatocyte
	1 1/2 hrs No deposit	Scarce
2	48 hrs Deposits in hepatocytes around portal areas	Deposits in cytosol, mitochondria, lysosome and nucleus, esp. nucleolus

Group 1: Administration of a one time dose of 10 ml of 0.5% lead acetate.  
 Group 2: Continuous administration of 0.5% lead acetate instead of water.

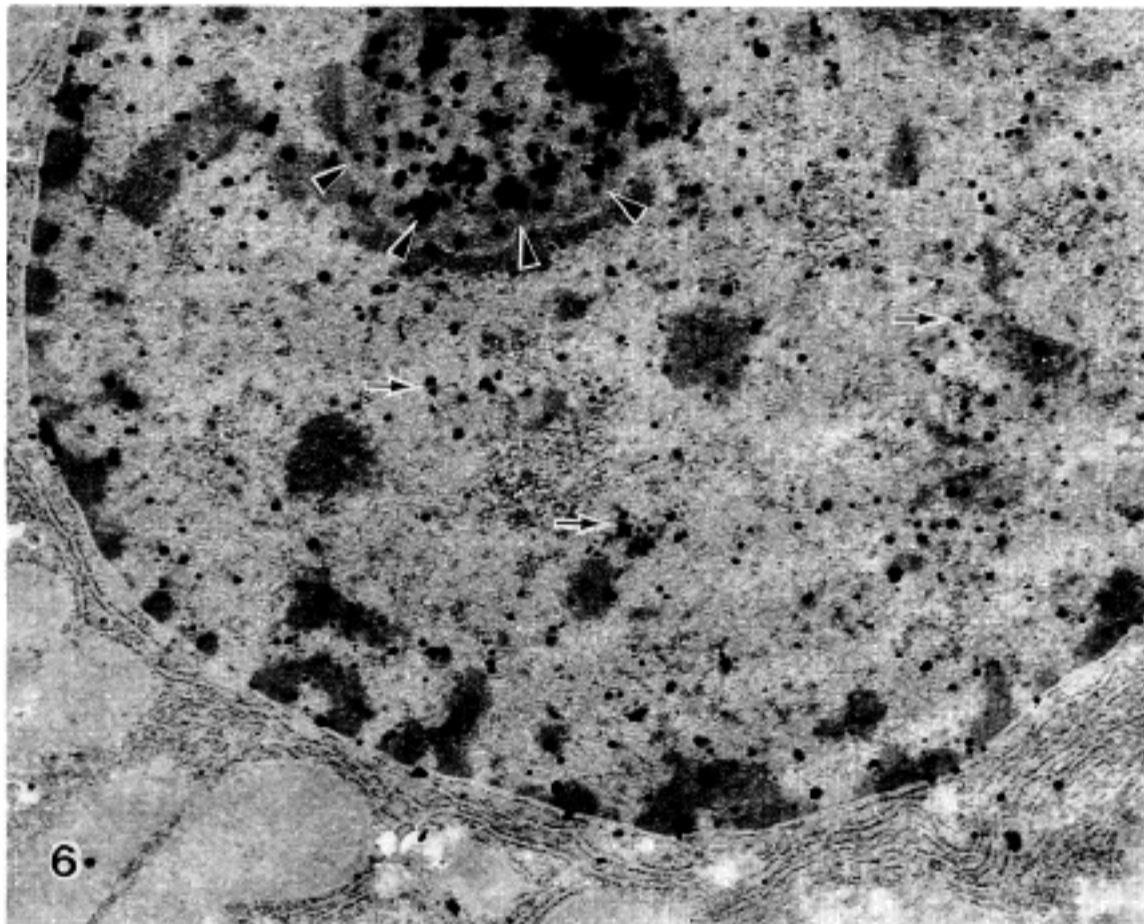


Fig. 6. Group 2. 2 days after continuous AL. Lead granules are in cytoplasm and nucleus (arrow) with dense aggregation (arrow head) in nucleolus (Timm sulphid silver,  $\times 20,400$ ).

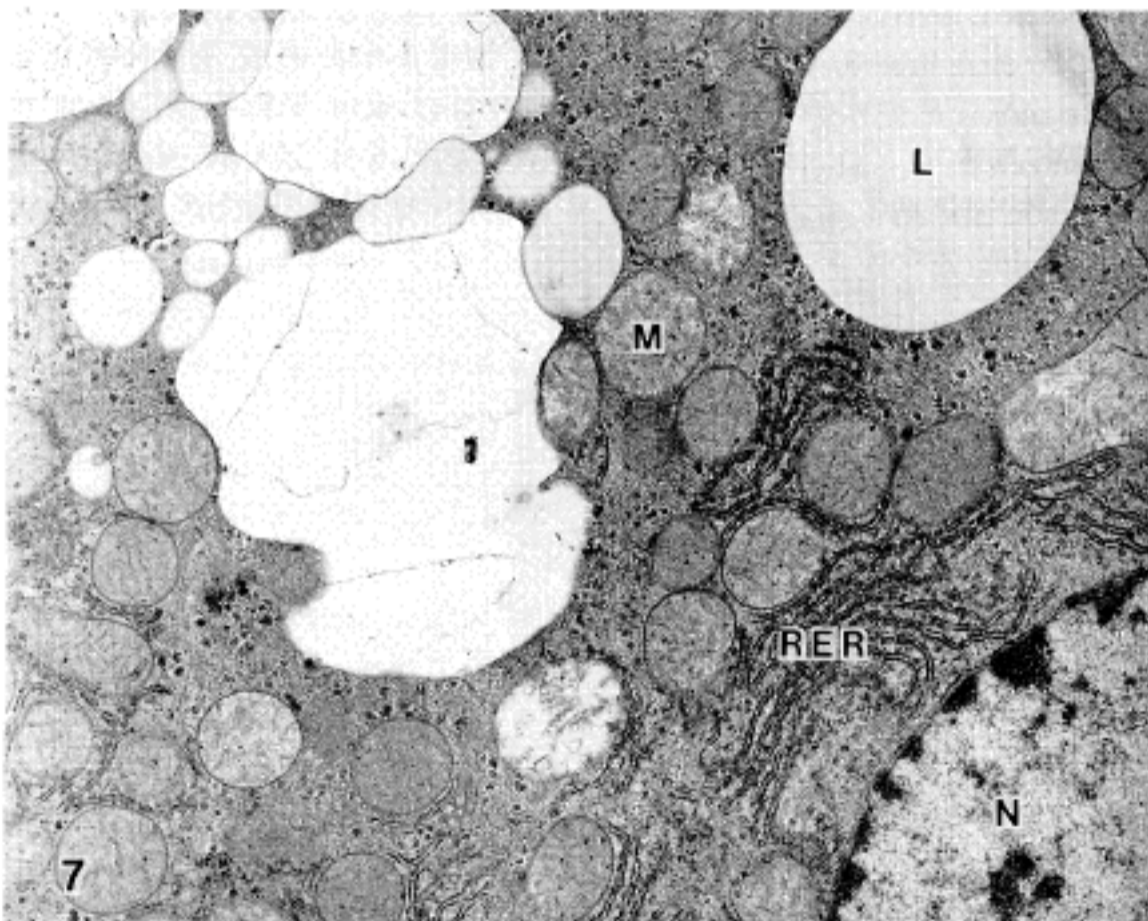


Fig. 7. Group 3. 1 week after AL. Fused large and small lipid droplets (L) and some swollen mitochondria (M) ( $\times 13,600$ ).

에는 거의 반응이 나타나지 않았다 (Fig. 3c, Table 1).

**실험 2군** (Timm 반응 후): 0.5% 초산납 수용액을 계속 투여 2일째에는 가시화된 납과립들이 문맥역 주위에 강하게 반응하여 진한 갈색으로 나타나고 주위 미세혈관 말단부로 멀어지면서 점차 약하게

반응하여 세포질이 연한 갈색으로 (Fig. 4a), 그러나 간세포의 핵들은 검은 갈색으로 뚜렷하게 착색되었다 (Fig. 4b). 문맥역내에 있는 혈관들은 반응했으나 담소관은 무반응이었다 (Fig. 4c, Table 1).

**실험 3군**: 0.5% 초산납 수용액 계속 투여 2일째에

작은 지방적이 미만성으로 나타났고 특히 그 정도가 문맥주위부와 중간대 부위에 심하였고 2중 핵을 가진 간세포들이 문맥삼분기 가까이에서 관찰되었다. 간세포질내의 작은 지방적이 빨간색으로 Oil red O에 염색되었다. 1주째 동양혈관 확장과 울혈이 관찰되었고 군데군데 간세포질의 진한 호산성 변화가 보였다. 4주째 문맥삼분기에 림프구와 형질세포의 경한 침윤이 보였다. 6주째 초점성으로 간세포의 핵이 없어진 것이 보이기 시작했다. 8주째 간세포의 경계가 불분명하고 세포질이 정상보다 크고 불균일한 과립상으로 균등하지 않고 또 피사세포도 나타났다.

4. 투과전자현미경적 소견

1) 대조군: 모든 대조군은 정상적인 간세포를 보이며 간세포의 세포질은 핵을 이중막으로 둘러싸고 미만성으로 편재한 미토콘드리아와 RER과 SER의 망상을 가지고 있었고 대개의 RER는 핵막과 세포막에 평행하였으며 주로 세포질의 중앙부위에 위치하고 있었고 반면 SER은 변연부에 있었으며 풍부한 당원 과립이 있었다. 약간의 리소솜이 있었고 Kupffer 세포는 납작하였다.

2) 실험군

실험 1군(Timm반응 후); 0.5% 초산납 수용액 10 ml 1회 투여하고 30분 후에 동양구조내와 Kupffer세

포, 내피세포, 간세포의 세포질에서 그리고 인접 교원섬유속내에서 고전자밀도 과립들이 관찰되고(Fig. 5a), 60분 후에는 간세포질과 핵안에서도 보였다(Fig. 5b). 90분 후에는 그 수가 격감하여 거의 알아보기가 어려울 정도로 간혹 보였다(Fig. 5c, Table 1).

실험 2군(Timm반응 후); 0.5% 초산납 수용액을 계속 마시게 한 쥐에서는 2일째에 역시 문맥역 부위 간세포에서 고전자밀도 과립이 미토콘드리아, 리소솜, RER등에서 체계없이 미만성으로 흩어져서 보였고, 핵안에는 그 수가 현저히 증가했는데 특별히 핵소체안에 밀집하여 나타났다(Fig. 6, Table 1).

실험 3군: 0.5% 초산납 수용액 계속 투여 2일째에서 지방변성이 뚜렷하였고 미토콘드리아의 모양이 지방적에 의하여 압박받아 변형된 것이 있었다. 1주째에는 지방변성은 감소하였으나 지방적 크기가 커진 곳도 보였고 미토콘드리아 종창이 간혹 보이기 시작하고(Fig. 7) SER의 증식이 보였다. 2주째에는 어떤 세포에서는 심한 미토콘드리아의 종창(Fig. 8), 또 다른 세포에서는 밀집 및 변형이 보였고 SER와 Kupffer 세포의 증가와 간혹 지방적이 보였다. 4주째에도 아령모양, 물방울 모양등 기괴한 모양의 미토콘드리아가 보이고 밀집하거나 서로 융합하여 거대 미토콘드리아를 형성하는 것이 보였다. SER증식 및 확장, 당원감소, 리소솜의 증가 그리고 세포질이 용해된 부위도 보였다. 6주째에는 미만성으로 더 많은

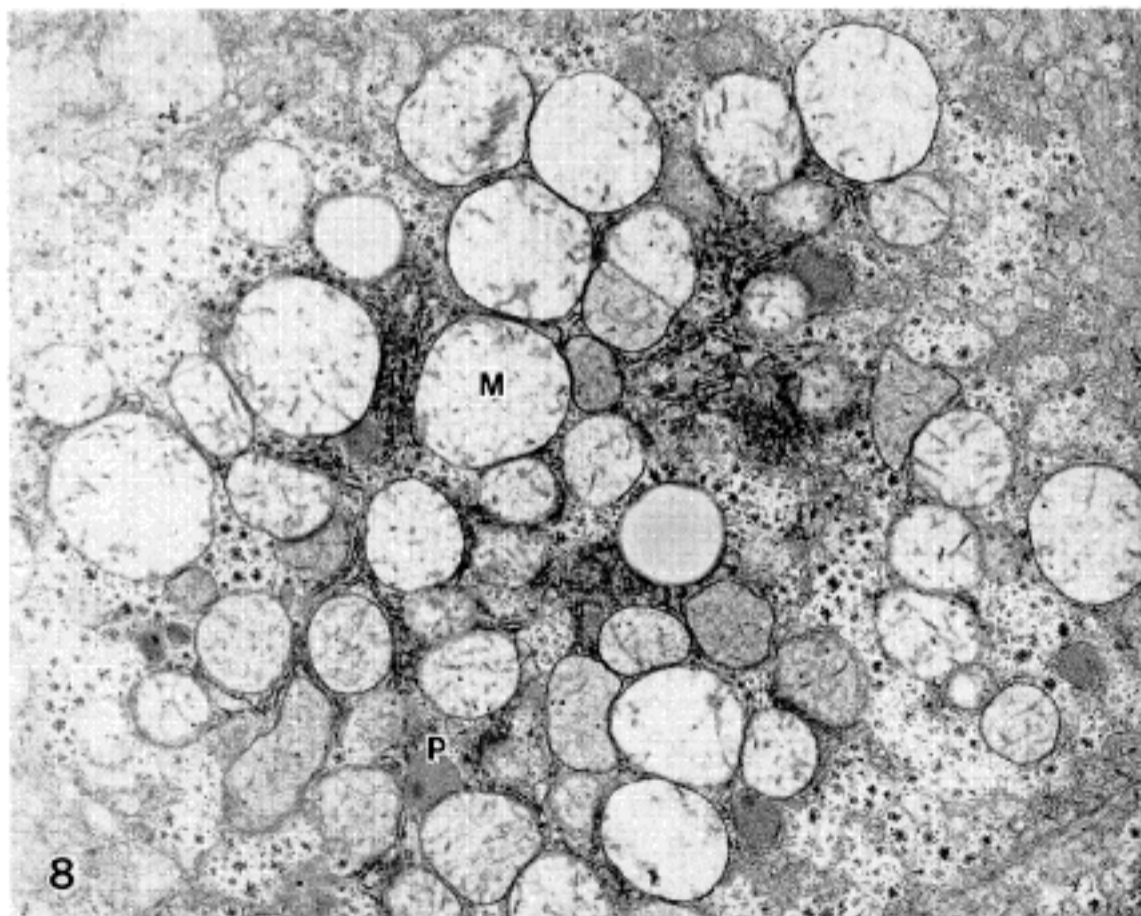


Fig. 8. 2 weeks after AL. Marked swelling of mitochondria(M) and some peroxisomes(P)(×13,600).

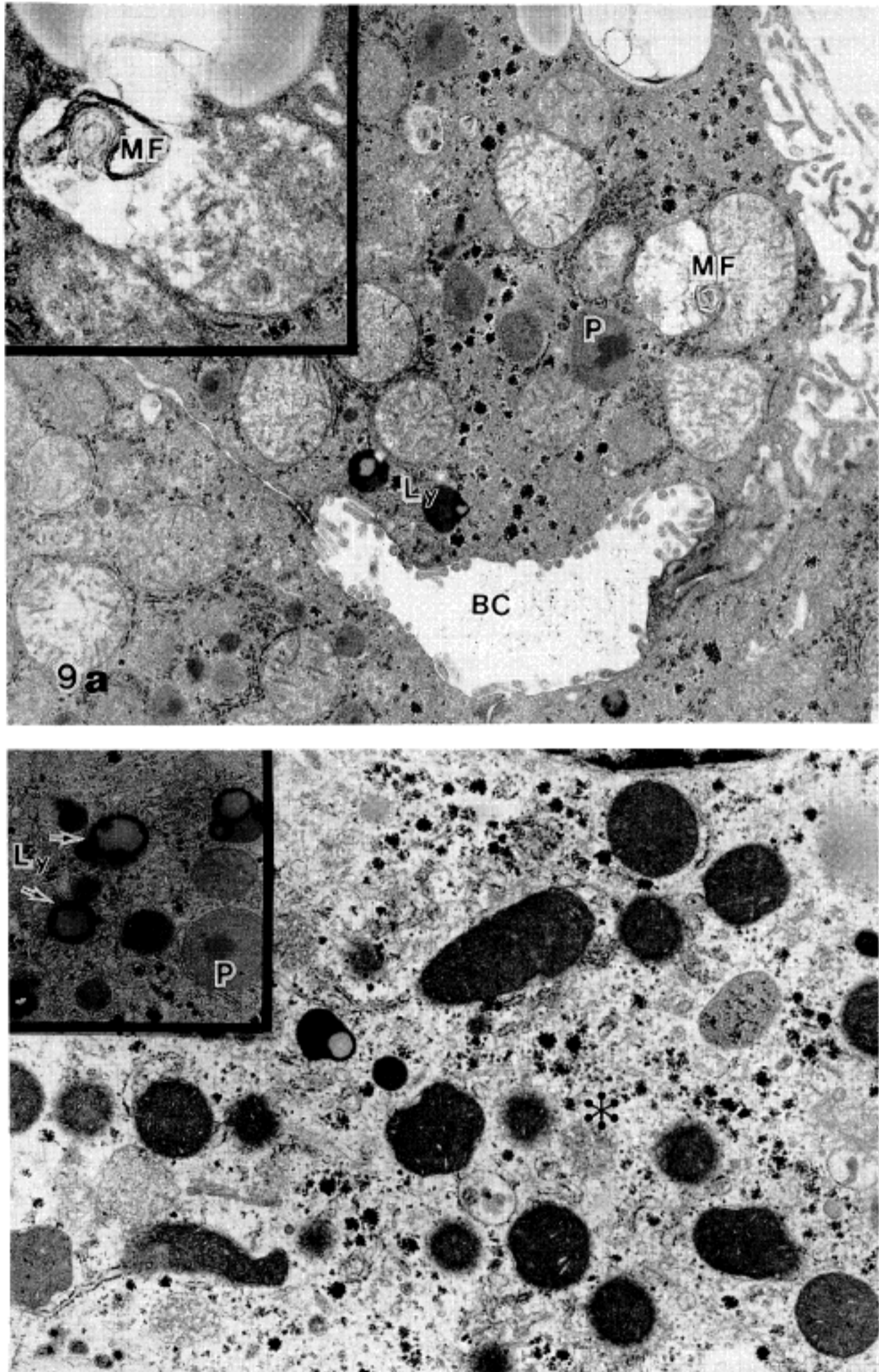


Fig. 9. a) 8 weeks after AL. Markedly swollen mitochondria, myelin-figure, secondary lysosomes and increased peroxisom (P)( $\times 13,600$ )(inset; myelin figure (MF)( $\times 29,000$ )). b) condensed mitochondria with disorganized cytosolic organelle\*(inset; increased secondary lysosomes(Ly) and peroxisomes(P)( $\times 17,000$ )).



Table 2. Electron microscopic findings of rat liver injury after oral administration of 0.5% lead acetate

	2d	1w	2w	4w	6w	8w
Kupffer cell activity	++	++	++	++	++	++
Fatty metamorphosis	++	++	+	+	+	+
Mitochondria						
transformation	+	+	++	+++	+++	+++
swelling	-	+	+++	+	+++	+++
SER						
increase	-	+	+	+	+	-
dilatation of cisternae	+	+	+	++	-	-
RER						
decrease	-	-	+	+	++	+++
Lysosome						
secondary lysosome	-	-	+	+	+++	+++
residual body	-	-	+	+	++	+++
Peroxisome						
increase	-	+	++	++	+++	+++
Nucleus						
clumping of chromatin	-	-	-	-	+	++

d: day, w: week, -: absent, +: mild, ++: moderate, +++: marked

간세포에서 종창된 미토콘드리아와 또 간혹 간질이 농축된 변성된 미토콘드리아도 보였다. 수초모양, 잔류체와 peroxisome과 2차 리소솜의 수의 증가, 세포질이 용해되고 소기관의 흔적만이 보이는 곳도 있었다. 약간의 간세포에서 지방적이 보였다. 8주째에도 여전히 많은 수의 종창된 미토콘드리아와 퇴행성 병화가 일어난 미토콘드리아에서 미엘린상(myelin figure)의 형성이 보였고(Fig. 9a) 또 수많은 농축된 미토콘드리아와 그 주위에 용해되어가는 소기관들과 글라이코겐 입자의 감소가 보였고 반면 2차 리소솜, 잔류체, 그리고 저명한 core를 가진 peroxisome들의 증가도 보였다(Fig. 9b). 핵은 대조군에 비해 핵내 염색체의 뭉친것(clumping)이 중심부와 핵막에 인접해서 보였다. 많은 잔류체를 함유한 Kupffer세포들이 보였다.

## 고 찰

Timm sulphide silver방법<sup>24,25</sup>을 이용해서 납이 간내로 수송되는 과정을 가시화하여 관찰하였다. 우선 실험 1군에서 광학현미경상 초산납 수용액 1회 투여 후 30분에는 문맥역 주위에서부터 시작하여 종말간세정맥 주위로 퍼져가는 미만성 반응을 보였고

특히 문맥역 근처 동양구조내와 이와 면한 간세포 변두리에는 강한 반응을 보였다. 60분에는 위에서 본 반응은 없어졌으나 Kupffer세포의 세포질내에 강한 반응을 보였고, 90분에는 간세포나 Kupffer세포에도 거의 반응이 없었다. 투과전자현미경상에서도 역시 30분에 동양구조에 Kupffer세포, 내피세포 및 인접 간세포들의 세포질과 또 인접 교원섬유속내에 고전자밀도 과립이 관찰되었고, 60분에는 간세포질과 핵안에서 관찰되었으나, 90분에는 그 수가 격감하여 발견하기 어려울 정도이었다. 고전자밀도로 가시화된 납과립들이 세포내 특정 소기관에 국한되지 않고 미만성으로 관찰되었으며 GERL(Golgi-Endoplasmic Reticulum-Lysosome)체계를 따라 단계적으로 관찰되지도 않았고 또 이 납입자들이 어떤 세포막에 에워쌓이거나 또는 포음세포내에 들어있지 않은 것으로 보아 과거 연구자들<sup>31,32</sup>의 추론과 마찬가지로 이는 세포내이입이나 포음세포작용에 의한 것이 아니고 수동적 확산과 능동적 수송에 의해서 세포내로 이행된 것이라고 생각한다. 경구투여 된 납은 십이지장의 흡수세포를 통해 흡수되어 혈장내에서 lead-binding protein과 결합하며<sup>33</sup> 이것에 의해 납이 간세포막을 통과하여 간세포에 들어가면 납은 metallothionein 합성을 유발하는데<sup>34</sup> 이는 cystein이

풍부한 금속결합단백으로서 아치사랑의 중금속을 투여한 동물의 간, 신장 그외 조직에서 합성된다<sup>35,36</sup>.

실험 1군에서 1회 초산납을 투여한 후 90분에 거의 납입자가 없어진 것은 hepatic lead-metallothionein의 형성과 동시에 다른 납 민감성 세포구성 성분과 작용하여 납을 일부 배설 시키는 것으로 간주되며 이는 일과성으로 나타나 90분내에 완전히 분해되었기 때문으로 생각되고 주로 문맥역 주위 간세포들에서 반응이 나타난 것으로 간주된다. Kupffer 세포안의 납입자는 막에 에워싸인 것과 그렇지 않은 것의 두 종류가 관찰되었는데 이는 간세포에서와 달리 탐식작용에 의한 세포내 이입과 수동적 확산으로 이루어진 것이라고 생각된다. 그리고 내피세포안의 납입자는 에워싸인 막이 없어서 수동적 확산에 의한 것으로 간주되었다. 실험 2군에서 계속 투여 2일째에 혈중 납 농도가 대조군과 비교하여 2배 이상 증가한 상태에서 납입자들은 간세포질 주로 미토콘드리아, 리소솜 ER에서 그리고 핵에서도 관찰되었는데 이는 Mistry<sup>37,38</sup>의 추론에서와 같이 세포질내의 lead-binding protein이 납을 핵안으로 이동시킨 것으로 생각된다. 납이 간세포막을 통과하여 세포질에 들어가면 능동적 수송과정에 의해서도 소기관내로 운송되어 축적되며<sup>39</sup> 이는 calcium이 운송되는 과정과 동일하다고<sup>40</sup> 한다. Ikebuchi<sup>41</sup>은 초산납을 쥐의 복강내에 아치사랑을 주입한 후 간에서 Pb-metallothionein-like protein(Pb-BP)과 Zn-thionein(Zn-BP)이 동시에 생성되는 것을 입증하고 초산납이 이들의 합성을 유발시켰다고 강력히 주장했으며 Pb-BP는 간의 세포질내 납과 우선적으로 결합한다고 했다. 납이 Pb-BP와의 결합은 간 세포질내 납의 약 60%로 계산되었고 또 간내 납의 1/3은 세포질내에, 나머지 2/3은 미립자 결합형(particulate-bound form)으로 존재한다<sup>41</sup>고 했다. 어떤 세포에서는 핵안에 유난히 납입자가 핵소체로 생각되는 곳에 밀집되어 있었는데 이는 핵내 봉입체를 형성하려는 전구조집인 것으로 생각된다.

본 실험에서 사용한 쥐에서 동시에 시행한 신장의 전자현미경 검사에서 근위 신세뇨관 상피세포에서 핵내 봉입체가 발견되었는데<sup>42</sup>(논문게재를 위해 교정중) 간세포에서는 발견되지 않았다. Falandysz<sup>43</sup>가 소를 대상으로한 연구에서 동일 중량의 간, 신장, 근육에서 납의 함량을 검색한 결과 각각 그 함량치가 조직 Kg당 160  $\mu$ g, 210  $\mu$ g, 40  $\mu$ g으로써 간의 납 함량이 신장의 것보다 월등히 적었다고 했다. 또 Nehru and Kaushal<sup>44</sup>은 쥐에 초산납을 경구투여 후 간, 신장, 혈액에서 납의 함량을 각기 다른 시간

대에 측정하였는데 투여후 8주에는 각각  $14.32 \pm 2.56 \mu$ g/g tissue,  $27.60 \pm 2.46 \mu$ g/g tissue,  $51.35 \pm 5.12 \mu$ g/100 ml로 측정되어 간내 함량이 신장의 것보다 낮았다고 했다. 이런 장기별 함량의 차이가 본 실험에서 신세뇨관상피세포에서 생긴 핵내 봉입체가 간세포에서는 안생긴 이유로 생각되며 아마도 더 장기간 투여하여 간내 납의 함량이 더 증가되면 생길 것으로 추정된다. 흥미있는 현상은 2일째에 문맥역의 문맥삼분기에서 간동맥과 간문정맥은 Timm반응 하였으나 담소관은 무반응 이었다. 이들 혈관을 구성하는 내피세포에서 고전자밀도의 납입자들이 투과전자현미경상 관찰되었는데 이는 납이 내피세포들에 작용하여 내피세포기능 억제효과를 나타냄과 동시에 내피세포에 손상을 주어서 투과성의 증가를 유발하여 내피세포내로 납의 유입을 증가시켰기 때문에 생긴 현상이 아닌가 생각되며 이는 Kaji등<sup>45</sup>이 납이 내피세포의 기능을 억제한다고, 또 납이 내피세포에 투과성을 상승시킨다<sup>46,47</sup>는 보고들과 부합하다고 본다. 그러나 담소관에서의 Timm 반응에 반응하지 않은 현상이 생긴것은 그때까지 담소관을 통해서 배설되는 납 입자가 없고 아울러 담소관 상피세포가 손상을 받지 않았기 때문에 나타난 현상이라고 본다.

실험 3군에서 2일째에 소포성 지질축적이 관찰되었는데 이는 Ito등<sup>48</sup>와 Skoczyńska등<sup>49</sup>가 그들의 연구 결과에서 소량의 납 투여가 지질과산화와 직접 관계가 있다고 보고한 바와 일치한다고 본다. Hoffmann등<sup>20</sup>과 Karmakar등<sup>28</sup>의 보고에서 지방적 축적은 소장 흡수불량으로 인한 영양실조가 그 원인이라<sup>8</sup>고 설명했다. 그러나 이는 소장의 흡수장애로 인한 속발적인 변화이기 보다는 초산납 투여 2일째에 간세포에 축적된(Fig. 6) 납이 지질과산화를 증가시키고 이로 인해 자가촉매 작용이 미세포체막에 퍼져서 가역적 막 손상을 일으키고 따라서 RER에 손상을 주어 polysome탈락이 생기고 아울러 lipid acceptor protein의 합성이 감소하여 지방적이 출현<sup>52</sup>한 것이라고 생각된다. 한편 계속 투여 후 2일째에 미토콘드리아의 변형이 나타나기 시작했고 그후 1주일째에는 미토콘드리아의 종창을 나타내었다. 이는 납이 미토콘드리아의 내막과 기질에 함유된 호흡효소를 포함한 여러 효소들의 sulfhydryl group과의 결합<sup>37</sup>으로 인한 효소불활성화에 의해 미토콘드리아의 산화적 인산화기능의 억제로 세포막의 Na pump 기능의 저하로 미토콘드리아 기질내로 심한  $Ca^{2+}$  유입이 일어나고  $H^+$ 에 대한 막의 투과성이 항진되며 또 한편 증가된  $\delta$ -ALA의 자동산화 과정에서 생성되어

증가된 산소 free radical이 원형질막과 소기관막내 지질의 과산화를 일으켜서 미토콘드리아막에 손상을 주어 극심한 종창을 초래했다고 본다. Sabbioni와 Marafante<sup>33</sup>는 납에 노출된 쥐의 간세포 미토콘드리아에서 적재된 납의 대부분이 호흡효소를 함유한 내막과 기질 둘 다에 분포되어 있음을 발견했다. White<sup>34</sup>는 개에게 lead carbonate를 경구투여한 실험에서 납의 1차적 영향은 미토콘드리아 효소에 미치는 것이라 했으며 ER효소들에는 어떤 영향을 미치는지는 확실치 않다고 했다.

본 실험에서 미토콘드리아의 종창은 투여 1주일에 나타나기 시작하여 2주째에 심해졌으며 또 미토콘드리아 모양의 변형은 투여 1일에 이미 대조군과 비교하여 약간 서로 붙는 경향을 보였는데 시간이 경과함에 따라 더 현저하게 나타나서 4주째는 서로 융합하여 거대 미토콘드리아를 형성하고 그 모양이 아령모양, 반달모양, 엽편연 모양 등 변형이 다양했고 이는 종창된 미토콘드리아가 많을수록 더욱 심해졌다. 그러나 Watrach<sup>18</sup>가 보고한 것 같은 밀집된 parallel arrays of lamellar formations을 함유한 거대 미토콘드리아는 관찰되지 않았다. 이는 알코올 같은 다른 약물에 의해서도 생긴다는 보고<sup>55</sup>가 있는 만큼 이는 납독성에 의한 특징적인 변화는 아니라고 생각된다. 6주에는 농축된 미토콘드리아가 보였는데 배경의 세포질의 변화와 같이 퇴행성 변화로 제거되어 가는 과정에서 생긴 것으로 본다. 4주째에 리소솜이 현저히 증가한것이 관찰되었다. 리소솜은 다수의 단백분해 효소를 가지고 있는 세포질내 소체로서, 단백분해 효소들은 조면세포질내세망에서 만들어지고 골지 복합체에서 농축되어 1차 리소솜(primary lysosome)이 형성된다. 1차 리소솜은 소화될 물질과 융합하여 2차 리소솜이 되는데 2차 리소솜에는 세포밖으로 부터 유입된 이물질을 소화처리하는 heterophagosome과 손상된 세포내 소기관을 소화처리하는 autophagosome등 2가지의 종류가 있다. 본 실험에서 투여 2주에 2차 리소솜의 수가 증가하기 시작하여, 시간이 갈수록 증가하여 8주에는 급격히 증가하였다. 이는 1주째부터 발생한 미토콘드리아의 손상으로 세포내 소기관의 파손된 잔재들을 제거하기 위한 현상으로 해석되며 시간이 경과할수록 증가한 것은 당연한 현상이라고 생각된다. 또 잔류체도 2주째 부터 나타나기 시작하여 8주에는 그 수가 제일 많이 증가하였다. Peroxisome이 1주째 부터 증가하기 시작하여 6주에는 급격히 증가함을 보였다. Peroxisome은 알코올이나 그의 혈중에 독성분자가 들어오면 해독하는 기능이 있고 또 과량의 과산화

수소가 세포내 축적될 때 catalase가 H<sub>2</sub>O로 전환시키며 또  $\beta$  oxidation에 의해 지방산 분자를 산화시키는 중요한 기능이 있다. 이런 기능이 있는 peroxisome은 초산납에 의해 상해가 생기는 간세포에서 증가하는 것은 상해를 최소화하려는 반응으로 본다. Peroxisome내에 core가 뚜렷이 관찰되었는데 이는 urate oxidase 효소라고 이미 밝혀져 있다<sup>56,32</sup>.

SER의 확장은 2일째에 나타나기 시작하여 4주에 더 뚜렷이 나타났다가 없어졌고 SER의 증가는 1주째부터 나타나기 시작하여 6주까지 계속되었다. 간세포에서 SER은 지단백질 입자들을 생산하는 장소이고 지단백질의 지질성분을 합성하는 효소가 SER의 막 안에 위치하며 또한 지용성 약물이나 대사에 의해서 생성된 여러가지 생체이물질(xenobiotics)을 생체전환(biotransformation)<sup>57</sup>하기 위한 일련의 반응을 촉매하는 효소들도 함유되어 있다. 특히 cytochrome P-450 의존 효소들은 세포막내 독성 수준까지 축적될 수 있는 수용성 약물이나 대사물이 세포에서 나가 소변으로 배설되게끔 하는 일부 반응을 촉매한다<sup>32</sup>. 6주째까지 SER이 증가되고 그 후에 감소한 것은 납이 직접 cytochrome P-450에 억제적으로 작용한 결과일 것으로 생각된다. Hoffmann의<sup>20</sup>의 보고에서도 SER의 확장증식이 초산납 정맥 주사후 6시간 후에 나타났고 RER은 극히 양이 적었다고 했다.

본 실험에서도 RER은 2주째부터 감소하여 투여 8주 후에는 현저히 감소하였다. 간독성 상해에서 SER는 확대되는데 반해서 RER cisternae는 현저히 탈과립 되거나 없어지는 경우도 보고<sup>56</sup>되어 있다. SER 증식은 납의 작용에 의해 다량 생성된 생체이물질을 생체전환 시키기 위해 일어난 현상이라 생각되며, RER 감소 내지 소실은 다른 중금속 중독시에도 일어나는 소견<sup>58</sup>이나 분명하게 추론하기는 어렵다. 핵 염색체의 뭉친것은 6주에 나타났는데 이는 세포상해의 경과중 미토콘드리아 종창과 더불어 가역적 상해의 일부로 생각된다.

산소 free radical은 막의 지질과산화를 촉진시킨다<sup>59</sup>. 즉 막지질의 불포화 acyl기를 과산화 시켜 지질 과산화물을 생성케하고 이는 산소 free radical과 함께 연속적으로 다른 불포화 지방산을 과산화시켜 결과적으로 광범위한 막 지질의 과산화로, 세포 소기관과 세포의 손상을 초래케한다. 또한 산소 free radical은 효소 단백질 중의 sulfhydryl기들 간의 가교결합을 촉진시킴과 아울러 산화적 수정(oxidative modification)을 시킴으로서 효소들이 비가역적으로 불활성화됨과 동시에 분해된다. 한편 산소 free radical은 RNA 및 DNA에 산화적 손상을 주어 염기

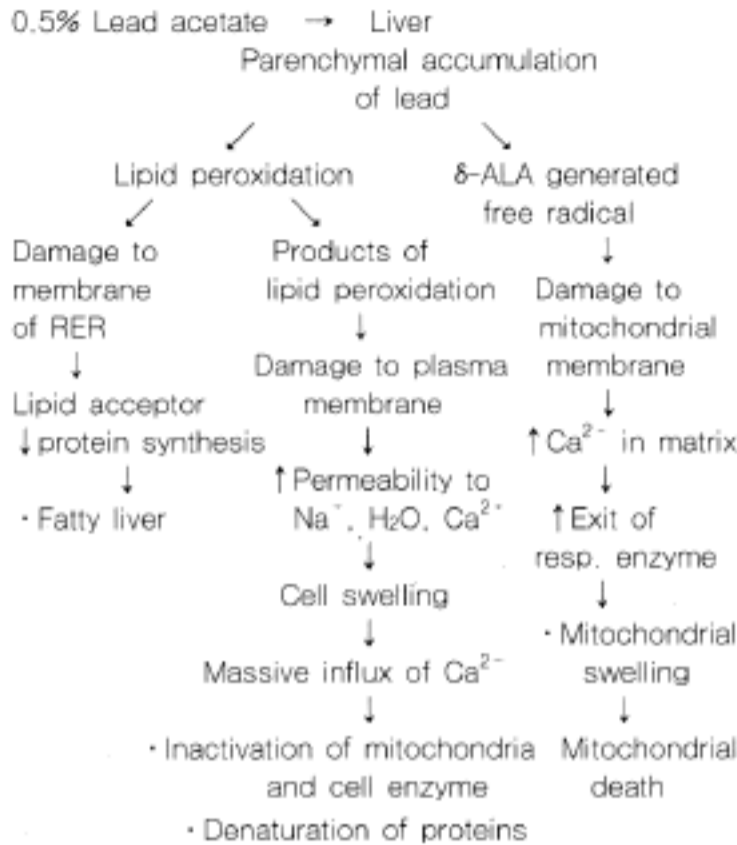


Fig. 10. Possible pathogenesis of lead acetate induced liver injury.

의 변형과 유리를 유도하고 특히 DNA쇄를 절단 시키게 된다<sup>60</sup>. 이와 같은 일련의 반응들이 계속되면 결국 세포는 죽음에 이르게 된다. 납을 투여 했을때도 산소 free radical이 발생되고 직접적으로 지질과 산화를 시킨다는 보고<sup>50,61</sup>가 있고 보면 납의 독성 기전도 산소 free radical에 의한 세포상해가 또한 주된 기전의 하나가 아닌가 생각된다.

이상 본 실험의 결과 및 추론과 타 연구자들의 추론을 종합해 볼 때 납을 일과성으로 아치사량 이하 섭취 했을때는 간 자체의 생체이물질 생체전환에 의해 간에서 제거되지만, 소량이라도 계속 섭취하여 누적되면 간 상해를 일으키게 된다고 생각한다. 납이 간세포에 손상을 주는 기전은 납이 직접 지질과산화를 증진시키고 이와 함께 δ-ALA의 자동산화 과정에서 생성된 산소 free radical에 의한 막의 지질과산화로 인하여 세포질막과 소기관 막에 상해를 일으키게 되는 것<sup>51</sup>이라 할 수 있으며, 특히 납 투여시는 미토콘드리아가 1차적으로 가장 강하게 공격받는 것<sup>62</sup>으로 보이며 동시에 Popper and Keppeler<sup>63</sup>가 주장한 소위 상호작용하는 중요대사들의 조직망의 장애도 같이 생겨서 일련의 변화가 발생하여 결국 비가역적 간세포 손상이 생긴다고 본다(Fig. 10).

## 결 론

납이 간에 축적되는 과정과 또 전자현미경적 변화 및 그 기전을 알아보기 위하여 이 연구를 시도하였다. 실험 1군은 0.5% 초산납 수용액 10 ml를 1회 경구 투여하여 30분 간격으로 도살하고 실험 2군은 수시로 마시게하여 2일, 1, 2, 4, 6, 8주 후에 도살한 후 1군과 같이 Timm sulphide silver 기법을 이용하여 납 입자의 간내에서의 이동을 경시적으로 관찰하고, 실험 3군은 2군과 동일한 방법으로 0.5% 초산납 수용액을 먹인 후 같은 시간대에 도살하여 혈액을 채취하고 통상적인 광학 및 투과전자현미경적 검사를 하였다. 이렇게하여 얻은 성적을 요약하면 다음과 같다.

1) 1군에서 1회 투여된 초산납은 30분 후 문맥역 주위의 동양구조내에서 그 후에는 Kupffer 세포안으로 이동하여 양성 반응이 나타났으며, 90분 후에는 거의 무반응 이었다.

2) 계속 투여한 2군에서는 2일째에 문맥역 주위에서 강하게 반응하고 변연부위로 연하게 퍼져 나가 간세포질과 핵안에 고전자밀도 과립이 다수 나타났으며

3) 한편 3군은 같은 시기에 전자현미경상 지방적을 보이기 시작하였고, 미토콘드리아의 변형과 종창이 관찰되기 시작하여 계속 존재하였다. 4주째에 거대미토콘드리아를 6주째에는 농축된 미토콘드리아를 보였다. 리소솜은 4주째에 증가하기 시작하여 6주째에 2차 리소솜의 증가를 보였고 8주째에는 잔류체도 증가하였다.

4) 혈중 납 농도는 2주째에 평균 3.29 μg/ml(대조군 0.92)로 최고치를 나타냈고

5) 요중 δ-ALA는 2주째에 31.7 mg/mg creatinine(대조군 9.8)였다가 8주째에는 증가하여 71.7 mg/mg creatinine로 나타났다.

이상과 같이 납을 일과성으로 아치사량이하 섭취 했을때는 생체이물질 생체전환에 의해 문맥역 주위의 간세포에서 주로 제거되지만, 소량이라도 계속 섭취하여 누적되면 간 상해를 일으켰다. 납에 의한 간세포 손상 기전은 납이 직접 지질과산화를 증진시키고 이로 인하여 세포질막과 소기관막에 상해를 일으키게 되는 것이라고 보며 특히 이때 미토콘드리아가 1차적으로 가장 강하게 공격받는 것으로 보이며 이와 동시에 간의 상호작용하는 중요대사들의 조직망의 장애로 인해 일련의 변화가 생겨 간세포의 비가역성 상해에까지 이르게 된다고 본다.

## 참 고 문 헌

1. Ashe WF. Robert arthur Kehoe, MD. Arch Environ Health 1966; 13: 138-42.
2. Revich BA. Lead in hair and urine of children and adults from industrialized areas. Arch Environ Health 1994; 49: 59-62.
3. Waldron HA. Occupational Health Practice. 3rd ed., London, Butterworths, 1989, pp46-66.
4. 남문석, 정준표, 이홍우, 오재열, 박효진, 이관식, 이상인, 박인서, 이안나, 송경순. 복통으로 내원한 Behcet병 환자에서 진단된 연중독 1예. 대한 소화기병학회지 1994; 26: 399-404.
5. Harrison PR, Matson WR, Winchester JW. Atmos. Environ. 5, 613. Cited in Hasan MZ, Seth TD, Sharma R(1974). Determination of cadmium, cobalt, copper, lead, manganese, nickel, and zinc in animal feed by atomic absorption spectrophotometry. Chemosphere 1971; 5: 241-6.
6. Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS. Harrison's Principles of Internal Medicine, ed 13. New York, McGraw-Hill Book, 1994, Vol. 2, pp2463-4.
7. Hayes AW. Principles and Methods of Toxicology. ed 2, New York, Raven Press, 1989, pp94-6.
8. Chisolm JJ. The continuing hazard of lead exposure and its effects in children. Neurotoxicology 1984; 5: 23-42.
9. Needleman HL, Bellinger D. The health effects of low level exposure to lead. Ann Rev Public Health 1991; 12: 111-40.
10. Baghurst PA, McMichael AJ, Wigg NR, Vimpani GV, Robertson EF, Roberts RJ, Tong SL. Environmental exposure to lead and children's intelligence at the age of seven years: the port pirie cohort study. New Engl J Med 1992; 327: 1279-84.
11. Cramer K, Goyer RA, Jagenburg R, Wilson MH. Renal ultrastructure, renal function and parameters of lead toxicity in workers with different periods of lead exposure. Br J Ind Med 1974; 31: 113-27.
12. Murakami M, Kawamura R, Nishii S, Katsunuma H. Early appearance and localization of intranuclear inclusions in the segments of renal proximal tubules of rats following ingestion of lead. Br J Exp Pathol 1983; 64: 144-55.
13. Revis NW, Shaw J, Bull R. A comparative study of lead nephrotoxicity and tissue deposition between rats, mice, and pigeons exposed to drinking water containing 2, 20 or 200 ppm lead. J Am College Toxicol 1983; 2: 155-63.
14. Nolan CV, Shaikh ZA. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. Toxicology 1992; 73: 127-46
15. Monteiro HP, Abdalla DS, Arcuri AS, Bechara EJ. Oxygen toxicity related to exposure to lead. Clin Chem 1985; 31: 1673-6.
16. Pagliuca A, Mufti GJ, Baldwin D, Leatas AN, Wallis RM, Bellingham AJ. Lead poisoning: Clinical, biochemical and hematological aspects of a recent outbreak. J Clin Pathol 1990; 43: 277-81.
17. Tomczok WS, Tomczok J, Matysiak N. Effect of acute lead intoxication on the ultrastructure of neutrophils in the peripheral blood of the rat. Exp Pathol 1991; 43: 149-54.
18. Watrach AM. Degeneration of mitochondria in lead poisoning. Ultrastruct Res 1964; 10: 177-81.
19. Grzybek H, Jonek J, Kochanska D, Panz B. Submicroscopic changes in various organs under the influence of lead acetate poisoning. Acta Med Pol 1971; XII: 235-9.
20. Hoffmann EO, Trejo RA, Luzio NRD, Lamberty J. Ultrastructural alterations of liver and spleen following acute lead administration in rats. Exp Mol Pathol 1972; 17: 159-70.
21. Karmakar N, Saxena R, Anand S. Histopathological changes induced in rat tissues by oral intake of lead acetate. Environ Res 1986; 41: 23-8.
22. Franchini A, Barbanti E, Fantin AMB. Effects of lead on hepatocyte ultrastructure in carassius carassius(L.) Var. auratus. Tissues & Cell 1991; 23: 893-901.
23. Ochiai K, Jin K, Goryo M, Tsuzuki T, Itakura C. Pathomorphologic findings of lead poisoning in white-fronted geese(anser albifrons). Vet Pathol 1993; 30: 522-8.
24. Dancher G, Zimmer J. An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biologic tissue. Histochemistry 1978; 55: 27-41.
25. Danscher G. Histochemical demonstration of heavy metals. Histochemistry 1981; 71: 1-16.
26. Stahr HM. Analytical methods in toxicology, New York, John Wiley & Sons, 1991, pp 55-7.
27. Wada O, Toyokawa K, Urata G, Yano Y, Nakao K. A simple method for the quantitative analysis of urinary delta-aminolevulinic acid to evaluate lead absorption. Br J Ind Med 1969; 26: 240-3.

28. Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 409-17.
29. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 1958; 6: 475-9.
30. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17: 208-12.
31. DeMichele SJ. Nutrition of lead. *Comp Biochem Physiol* 1984; 78A: 401-8.
32. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell*. ed 3., New York, Garland Publishing, 1994, pp486-623.
33. Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA. *The Cell Biology and Pathology*, ed 2. New York, Raven Press, 1988, pp525-31.
34. Andersen RD, Winter WP, Maher JJ, Bernstein IA. Turnover of metallothioneins in rat liver. *Biochem J* 1978; 174: 327-8.
35. Church HJ, Day JP, Braithwaite RA, Brown SS. Binding of lead to metallothionein-like protein in human erythrocytes. *J Inorg Biochem* 1993; 49: 55-68.
36. Zelazowski AJ, Piotrowski JK. Mercury-binding, copper-zinc proteins from rat kidney. Amino acid composition, molecular weight and metal content. *Biochim Biophys Acta* 1980; 625: 89-99.
37. Mistry P, Lucier GW, Fowler BA. High affinity lead-binding proteins from rat kidney cytosol mediate cell-free nuclear translocation of lead. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 462-9.
38. Mistry P, Matri C, Fowler BA. Influence of metal ions on renal cytosolic lead-binding proteins and nuclear uptake of lead in kidney. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 711-3.
39. Bull RJ. Lead and energy metabolism, in Singhal RL and Thomas JA(eds), *Lead Toxicity*, Baltimore, Urban and Schwarzenberg, 1980, p119.
40. Saris N, Akerman KEO. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. *Curr Top Bioenerget* 1980; 10: 103-79.
41. Ikebuchi H, Teshima R, Suzuki K, Terao T, Yamane Y. Simultaneous induction of Pb-metallothionein-like protein and Zn-thionein in the liver of rats given lead acetate. *Biochem J* 1986; 233: 541-6.
42. Kim SP. Ultrastructural changes in rat kidney after lead acetate administration. Thesis for degree of Master of Public health of Graduate School of Keimyung University, 1994, p17-9.
43. Falandysz J. Some toxic and essential trace metals in cattle from the northern part of Poland. *Sci Total Environ* 1993; 136: 177-91.
44. Nehru B, Kaushal S. Alterations in the hepatic enzymes following experimental lead poisoning. *Biol Tract Element Res* 1993; 38: 27-34.
45. Kaji T, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H. Inhibitory effect of lead on the release of tissue plasminogen activator from human vascular endothelial cells in culture. *Toxicology* 1992; 73: 219-27.
46. Weerasuriya A, Curran GL, Poduslo JF. Physiological changes in the sciatic nerve endoneurium of lead-intoxicated rats: a model of endoneurial homeostasis. *Brain Research* 1990; 517: 1-6.
47. Press MF. Lead induced permeability changes in immature vessels of the developing cerebellar microcirculation. *Acta Neuropathol* 1985; 67: 86-95.
48. Ito Y, Niiya I, Kurita H, Shima S, Sarai S. Serum lipid peroxide level and blood superoxide dismutase activity in workers with occupational exposure to lead. *Int Arch Occup Environ Health* 1985; 56: 119-27.
49. Skoczyńska A, Smolik R, Jeleń M. Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Arch Toxicol* 1993; 67: 200-4.
50. Monteiro HP, Abdalla DSP, Augusto O, Bechara E. Free radical generation during  $\delta$ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. *Arch Biochem Biophys* 1989; 271: 206-16.
51. Hermes-Lima M, Valle VGR, Vercesi AE, Bechara E. Damage to rat liver mitochondria promoted by  $\delta$ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim Biophys Acta* 1991b; 1056: 57-63.
52. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins pathologic basis of diseases*, 4th ed. W.B. Saunders Company 1994, pp4-14.
53. Sabbioni E, Marafante E. Identification of lead-binding components in rat liver: in vivo study. *Chem Biol Interact* 1976; 15: 1-20.
54. White DL. Histochemical and histological effects of lead on the liver and kidney of the dog. *Br J Exp Pathol* 1977; 58: 101-12.
55. Chang ES. Ultrastructural morphogenesis of mitochondria in alcoholic liver. *Acta Pathol Jpn* 1987; 37: 213-24.
56. Tolbert NE, Essner E. Microbodies: Peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol* 1981; 91: 271S-83S.
57. Matsumori H, Matsumoto T, Ishikawa H. Acute toxic

- effects of paraquat on ultrastructure of rat liver. *Acta Pathol Jpn* 1984; 34: 507-18.
58. Degawa M, Arai H, Miura S, Hashimoto Y. Preferential inhibitions of hepatic P450IA2 expression and induction by lead nitrate in the rat. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1091-4.
59. Tribble DL, Aw TY, Jones DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* 1987; 7: 377-87.
60. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. ed 5. Philadelphia, WB Saunders, 1994, pp4-14.
61. Monteiro HP, Bechara EJH, Abdulla DSP. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol Cell Biochem* 1991; 103: 73-83.
62. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108: 252-75.
63. Popper H, Keppler D. Networks of interacting mechanisms of hepatocellular degeneration and death. *Prog Liver Dis* 1986; 8: 209-35.
-