

납노출지표와 적혈구내 protein kinase C 활성도의 연관성

순천향대학교 의과대학 예방의학교실

황규윤 · 황보영 · 안현철 · 김용배 · 리갑수 · 이성수 · 안규동 · 이병국

— Abstract —

Associations between Lead Exposure and Dose and Protein Kinase C Activation in Erythrocytes Among Lead Workers

Kyu-Yoon Hwang, Young Hwangbo, Hyun-Cheol Ahn, Yong-Bae Kim, Gap-Soo Lee, Sung-Soo Lee, Kyu-Dong Ahn, Byung-Kook Lee

Department of Preventive Medicine, School of Medicine, Soonchunhyang University

Objectives : Protein kinase C(PKC), a calcium and phospholipid dependent enzyme, is activated by lead *in vitro* at picomolar concentrations. However, the effect of lead on PKC has never been studied in a human population. The purpose of the study was to evaluate whether lead exposure was associated with PKC mediated-phosphorylation in erythrocytes among lead workers.

Methods : Two hundred and twelve lead workers were studied. To determine the levels of phosphorylation *in vivo*, an *in vitro* back phosphorylation technique was used by adding PKC and γ -32P to preparations of erythrocyte membranes. We measured back phosphorylations of erythrocyte membrane proteins, spectrin, and 52 kDa and 48 kDa, as an indirect measure of PKC activation *in vivo*.

Results : The mean(SD) age and exposure duration was 39.1(10.0) years and 8.1(6.5) years, respectively. Tibial lead ranged from 0.8 to 290.8 μ g Pb/g bone mineral with a mean(SD) of 34.4(35.2) μ g Pb/g bone mineral. The means(SD) of back phosphorylation levels of the three proteins were 540.7(304.1), 198.6(78.2), and 247.7(83.3) photostimulated luminescence units(PSL), respectively, by phosphoimager. After adjustment for potential confounding factors, tibial lead and exposure duration were significantly and inversely associated with back phosphorylation levels. One unit of increase in tibial lead(1 μ g Pb/g bone mineral) is associated with a decline in spectrin, band 4.9 52 kDa, and band 4.9 48 kDa back phosphorylation levels by 1.4(p<0.05), 0.34(p<0.05), and 0.47(p<0.01), respectively. However, there were no associations between the back phosphorylation levels and either blood lead or ZPP levels.

Conclusions : These findings suggest that the PKC activity in erythrocytes is increased by chronic lead exposure and that erythrocyte membrane protein phosphorylation may be a biomarker of lead exposure.

Key Words : Lead, Tibial lead, Protein kinase C, Biomarker, Back phosphorylation

<접수일 : 2001년 7월 2일, 채택일 : 2001년 8월 18일>

교신저자 : 황 규 윤 (Tel : 041-570-2483) E-mail : drhwang@sch.ac.kr

* 본 연구는 순천향대학교 학술조성연구비(1999)로 지원받아 수행되었음.

서 론

납 독성의 기전은 칼슘과 관련된 과정과 관련되어 있다. 납과 칼슘의 상호작용 및 납 독성과의 관련성은 이미 잘 알려져 있으며(Goldstein과 Ar, 1983; Bressler와 Goldstein, 1991). 효소학적 분석에서도 극소량의 납이 칼슘의 역할을 대치하여 칼슘과 인지질 의존형 인산화 효소인 protein kinase C(이하 PKC)의 활성도를 증가시킨다(Markovac와 Goldstein, 1988). 납농도가 50 nM 수준에서 쥐의 미성숙 뇌혈관 내피세포 및 뇌세포의 PKC- α 가 세포질에서 세포막으로 이동하고(Lattera 등, 1992), 100 nM 수준에서 납은 PKC를 활성화시킨 후 뇌 해마의 신경 발달을 저해하므로(Kern과 Audesirk, 1995) 많은 신경 발달 과정은 PKC의 활성도에 의하여 조정된다고 하였다(Routhenberg, 1991).

한편 칼슘 의존형 PKC 유전자는 중추 및 말초신경계에 풍부하고(Huang 등, 1989), 인체 적혈구에도 존재하므로(Palfrey와 Waseem, 1985) PKC의 활성도 평가에 적혈구를 다른 조직 대신에 이용할 수 있다. 따라서 인체 적혈구 PKC를 활성화함으로써 세포막 단백질의 인산화(phosphorylation)가 됨을 증명하였다(Belloni-Olivi 등, 1996). 또한 최근 Chen 등(1997)은 쥐의 해마에서 세포질에서 세포막으로 PKC가 이동하고 이것이 PKC 활성화로 인산화를 유발하며, 결과적으로 반복적인 학습체능 능력저하와 관련되었다고 하였다.

그러나 PKC와 납과의 관련성 연구는 *in vitro*와 동물모델에 한정되었다(Cory-Slechta 등, 1997; Chen 등, 1997). 따라서 본 연구는 직업적으로 납에 노출되는 근로자에서 적혈구 세포막의 인산화를 통하여 납이 PKC 활성도와 관련되어 있는지를 알아보고자 하였다. 적혈구 세포막을 선택한 이유는 적혈구내 PKC가 함유되어 있고 인산화를 위한 지질이 있으며 손쉽게 이용할 수 있기 때문이다. *In vitro*에서 PKC를 첨가하여 측정된 후인산화 수준은 *in vivo*에서의 인산화 수준과 역관계가 있을 것이다. 그러므로 체내에서 납에 의하여 이미 PKC가 활성화되었다면 *in vitro*에서 PKC를 첨가하여도 인산화 수준은 낮을 것으로 간접적으로 PKC의 활성도 여부

를 확인할 수 있다. 본 연구에서는 *in vitro* 후인산화(back phosphorylation) 반응을 이용하여 *in vivo* PKC 관련된 인산화 수준을 추정하고자 한다.

대상 및 방법

1. 연구대상

630명의 납 노출 근로자 및 135명의 대조군을 대상으로 납에 의한 건강조사가 4년간의 전향조사로 1997년부터 시행하였는데(Schwartz 등, 2001), 본 연구에서는 이중 1998년 4월부터 7월 사이에 4개의 납 축전지회사에서 연속적으로 연구에 참여한 근로자 212명을 분석하였다. 남자 근로자는 156명, 여자 근로자는 56명이었으며, 이들 모두로부터 연구 참여 동의를 받았다.

2. 자료수집

모든 연구 대상자는 표준화된 설문지를 이용하여 일반적 특성, 과거력, 직업력 등의 정보를 받았고, 10 ml 정맥혈을 이용하여 적혈구세포를 분리한 후 보존액과 함께 -70 °C에 보관하였다. 경골내 납 농도는 ¹⁰⁹Cd X-ray 형광기법을 이용하여 분석하였다. 납 노출과 관련된 자료 및 분석방법은 이미 상세히 기술한 바 있다(Schwartz 등, 2001).

3. 실험분석

1) 적혈구 세포막 처리방법

정맥혈을 헤파린 진공관에 넣은 후 20분간 1,000 ×g에서 원심분리후 혈장과 Buffy coat를 제거하였고, 적혈구와 동일 양의 식염수를 이용하여 3회 세척하였다. 세척된 적혈구는 저농도 글리세롤(28 % glycerol, 3 % mannitol, 0.65 % NaCl)을 이용한 급속 냉동법으로 저장하였다(Rowe 등, 1968). 냉동된 적혈구에서 세포막을 분리하기 위하여 20 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 넣어 삼투압성 용혈후 순수한 적혈구 막을 얻었다(Dodge 등, 1963). 혈색소가 없는 투명한 적혈구막만을 얻기 위하여 4 °C에서 20,000 ×g에서 40분간 원심분리 후 상층액을 제거 후 동일 buffer로 동일 상태로 4~5 회 반복 세척하였다. 적혈구막내의 단백질 정량은 Bradford 방법을 이용하였다(Bradford, 1976).

Table 1. Characteristics of 212 lead exposed subjects

Variable	Male(n=156)	Female(n=56)	P-value*
Age, year, mean(SD)	36.3(10.0)	47.0(6.7)	<0.01
Exposure duration, year, mean(SD)	8.8(7.5)	6.2(11.2)	<0.01
Weight, kg, mean(SD)	62.2(8.7)	57.3(9.0)	<0.01
Height, cm, mean(SD)	167.2(6.2)	153.6(4.5)	<0.01
Blood lead, $\mu\text{g}/\text{dl}$, mean(SD)	32.0(13.0)	19.8(9.2)	<0.01
ZPP, $\mu\text{g}/\text{dl}$, mean(SD)	68.7(47.8)	72.1(29.8)	0.61
Tibial lead, μg Pb/g bone mineral, mean(SD)	37.8(39.6)	25.5(14.7)	0.03
Spectrin phosphorylation, PSL, mean(SD)	537.6(316.0)	549.4(270.1)	0.80
Band 4.9(52 kDa) phosphorylation, PSL, mean(SD)	192.3(73.7)	216.2(87.6)	0.05
Band 4.9(48 kDa) phosphorylation, PSL, mean(SD)	238.8(82.4)	253.6(85.3)	0.26

* calculated by student's t-test for continuous variables or chi-square test for categorical variables

Table 2. Pearson's correlation matrix of selected study variables

Variable	Age	BMI	Blood lead	ZPP	Tibia lead	Exposure Duration	Spectrin 52 kDa	8 kDa
BMI	0.24***							
Blood lead	0.07	-0.09						
ZPP	0.33***	-0.04	0.50***					
Tibia lead	0.23***	0.10	0.45***	0.31***				
Exposure Duration	0.47***	0.01	0.29**	0.20**	0.57***			
Spectrin	-0.13	0.04	-0.07	-0.12 ⁺	-0.19**	-0.22***		
52 kDa	-0.10	0.05	-0.07	-0.11	-0.21**	-0.24***	0.49***	
48 kDa	-0.11	0.01	-0.07	-0.13 ⁺	-0.24***	-0.24***	0.64***	0.89***

+ p<0.1, * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.01

2) 후인산화 반응

In vitro 후인산화(back phosphorylation) 반응 기법을 이용하여 납 노출이 적혈구 세포막 단백질의 인산화와 관련 여부를 확인하였다. 예비 실험의 결과에서 상대분자량이 240, 230, 82, 52와 48 kDa가 인산화됨을 확인하였다. 240과 230 kDa는 α 와 β spectrin과 그리고 52와 48 kDa는 band 4.9와 일치하였으며 모든 시료에서 이들의 인산화 수준을 측정할 수 있었다. 후인산화 반응은 칼슘과 인지질 등의 조요소가 있는 상태에서 이루어졌다. 처리된 각 세포막 단백질은 0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 희석하였다. 질소 가스하에서 건조된 L- α phosphatidyl serine(PS) (Avanti Polar Lipids Inc., BSP-578)은 Tris/HCl(pH 7.4)를 이용하여 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 만들었다. 시료는 0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 적혈구막 단백질, 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ PS, 12mM CaCl₂, 30 mM dithiothreitol

등을 동일한 용량으로 섞어 준비하였다. γ -³²P(NEN, Boston)는 45 mM MgCl₂/150 μM ATP 용액을 이용하여 0.08 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ 이 되도록 하였으며, PKC(Sigma, USA)는 시료당 0.1 unit를 사용하였다. 따라서 최종 반응은 1 μg 세포막 단백질, 0.1 unit PKC, 2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ γ -P³²으로 하였다. 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응후 acetone으로 중지시켰고 20,000 \times g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 제거 후 30 μl sodium dodecyle sulfate(SDS) buffer로 녹인 후 3분간 100 $^{\circ}\text{C}$ 로 가열하였다. 반응된 시료는 7.5 % SDS-PAGE에서 전기영동시킨 후 0.005 % Coomassie Brilliant Blue 용액(40 % methanol, 7 % acetic acid)으로 염색시킨후 gel이 투명할 때까지 탈색용액(5 % methanol, 7 % acetic acid)으로 탈색시켰다. 탈색된 gel은 dual sheet 방법(Matsudaira와 Burgess, 1978)으로 건조시킨 후 imaging plate(Fuji, BAS-III)에

Table 3. Results of linear regression modeling of back phosphorylation levels, comparing lead exposure and dose variables, controlling for confounding variables(age and sex)

Variable		Regression results			
Dependent	Independent	adjusted β coefficient	SE of β	P-value	Model R ²
Spectrin phosphorylation, PSL	Model 1: Blood lead, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	-0.10	1.69	0.56	0.164
	Model 2: ZPP, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	-0.40	0.47	0.40	0.164
	Model 3: Tibial lead, $\mu\text{g Pb/g}$	-1.40	0.59	0.02	0.184
	Model 4: Exposure duration, year	-11.15	3.88	<0.01	0.193
52 kDa phosphorylation, PSL	Model 1: Blood lead, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.28	0.46	0.54	0.075
	Model 2: ZPP, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	-0.09	0.13	0.49	0.075
	Model 3: Tibial lead, $\mu\text{g Pb/g}$	-0.34	0.16	0.04	0.093
	Model 4: Exposure duration, year	-2.19	1.06	0.04	0.092
48 kDa phosphorylation, PSL	Model 1: Blood lead, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.06	0.49	0.91	0.059
	Model 2: ZPP, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	-0.15	0.14	0.26	0.065
	Model 3: Tibial lead, $\mu\text{g Pb/g}$	-0.47	0.17	<0.01	0.093
	Model 4: Exposure duration, year	-2.88	1.13	0.01	0.088

30분간 노출시켜 필름에 감광하도록 하였으며, 이 필름은 Bio-imaging analyzer(Fusi BAS 2500, MAc Bas version 2.5)로 γ -³²P에서 나온 방사능을 photostimulated luminescence(PSL)로 정량화 하였다.

4. 통계분석

분석의 주목적은 적혈구 세포막내 단백질의 인산화 정도를 예측할 수 있는 납노출 지표를 확인하는 것이다. 예측인자로 혈중 납, 혈중 zinc protoporphyrin, 경골중 납, 노출 기간을 이용하였고 연령, 성별, 음주 및 흡연 여부, 비만지수, 혈색소 등의 변수와의 관계도 알아보았다. 자료분석을 위한 통계는 Stata(Stata Release 5, College station, USA) 프로그램을 이용하였다. 다중회귀분석을 이용하여 각 3가지 단백질 인산화 수준과의 관련성을 확인하였으며 최종 모델은 동일한 혼란변수를 포함하도록 하였다. 유의수준은 5 %로 정의하여 통계적인 유의성을 검정하였다.

결 과

조사대상자의 남녀간 비교에서 여자는 남자보다 유의하게 높은 연령과 짧은 근무기간을 보였고 (p<0.01), 흡연자는 없었으며 음주자도 유의하게 적

었다. 혈중 납농도와 경골중 납농도는 여자에서 유의하게 낮았으나 ZPP는 차이를 보이지 않았다 (p>0.05). 후인산화 수준은 모든 세포막 단백질에서 남녀간 특이한 차이를 보이지 않았다. 납 노출 수준은 큰 변이를 보여 혈중 납은 5.4에서 69.3 $\mu\text{g}/\text{dl}$, 경골중 납은 0.8에서 290.8 $\mu\text{g Pb/g}$ bone mineral, ZPP는 26에서 386 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 을 나타내었다. Spectrin 단백질의 후인산화 수준은 29.5에서 1737 PSL로 평균(SD)은 540.7(304.1) PSL, band 4.9 52 kDa는 31.2에서 502.1 PSL로 평균(SD)은 198.6(78.2) PSL, band 4.9 48 kDa는 35.8에서 576.5 PSL로 평균(SD)은 247.7(83.3) PSL로 개 인간 변이성이 매우 넓었다(Table 1).

납 노출 지표들간은 유의한 상관성을 보였고 (p<0.01) 특히 경골중 납농도는 근무기간과 가장 높은 직선형을 나타내었다(r=0.57, p<0.001). 후인산화 수준은 혈중 납농도와 상관성을 나타내지 못하였고 ZPP와는 경계성 수준의 역상관성을 보였으며 (p<0.1), 경골중 납농도와 노출기간과는 유의한 역상관관계를 나타내었다(p<0.05). 각 단백질의 후인산화 수준간에는 높은 양상관성을 보였다(p<0.001) (Table 2).

납 노출 지표(혈중 납, ZPP, 경골중 납, 노출기간)를 각 독립변수로 정한 회귀분석을 이용한 관련성 분석에서 경골중 납과 노출기간은 모든 단백질에

서 후인산화의 유의한 예측변수로 작용하였다. 흡연, 음주, 비만지수, 혈색소 등은 중요한 혼란변수로 작용하지 않았지만, 연령은 유의한 예측변수로 작용하였다. 최종 모델인 성별과 연령을 통제한 중회귀 분석에서도 모든 적혈구막내 단백질의 PKC 의존형 인산화 수준과 유의한 관련성을 보인 경우는 경골중 납과 납 노출기간이었으나 설명력은 다소 낮았다 (Table 3).

고 찰

본 연구는 직업적으로 납이 노출되는 근로자에서 납 노출 수준과 적혈구막 단백질의 후인산화 수준과의 연관성을 평가하고자 여러 납 노출 지표와 3가지 세포막 단백질을 이용하여 관련성을 알아보았다. Spectrin과 band 4.9 52 kDa와 48 kDa를 기질로 이용하여 *in vitro*에서 PKC에 의한 후인산화 수준을 측정함으로써 간접적으로 납에 의한 PKC 활성도를 평가하였다. 많은 실험적 연구에서도 납에 노출되면 PKC가 활성화되어 인산화 과정을 변화시키는 것으로 알려져 있고 이들 연구는 납 노출의 지표로 납 농도를 이용하였으나(Kern 등, 1995; Cory-Slechta 등, 1997), 본 연구에서의 혈중 납 농도는 인산화 수준을 예측하지는 못하였으나 골중 납농도 및 노출기간과 관련된 것으로 나타났다. 혈중 납 농도는 장기 노출을 나타내지 않고 최근의 외부 노출 및 내부 노출 원인인 골중에 축적된 납의 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Hu 등, 1998), 본 결과에서도 PKC의 활성도에 영향을 미치는 지표는 장기 노출 및 축적을 나타내는 골중 납 농도 및 노출 기간이었다. 납은 주로 골에 축적되고 반감기는 10~27년 정도로 축적된 체내 부하량을 나타낸다(Rabinowitz, 1991; Gehardsson 등, 1993). 노출 기간이 경골중 납 농도와 높은 상관성을 보인 이유는 연구대상자의 근속기간이 비교적 길고 직업적 노출이기 때문일 것이다.

최근 동물실험에서 납은 학습과 관련된 PKC에 영향을 주는 것으로 보고하였고(Chen 등, 1997), 배양된 인체 뇌신경세포에서 PKC에 의한 신경변성은 PKC 활성물질인 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)의 노출기간과 관련된다고 보고하였다(Mattson, 1991). 따라서 PKC의 변동은 학습장

에 및 납 독성과 연관되고 이것은 급성적인 노출보다는 만성적인 노출에 의한 것으로 볼 수 있다.

본 연구에서는 연령을 제외한 다른 변수들은 본 연구의 가설에 영향을 미치지 못하였고 유의한 설명변수의 역할을 하지 않았다. 본 연구는 단면적인 관련성만을 보았기 때문에 납 노출과 단백질 인산화의 변화를 보지는 못하였고, 다른 가능성 있는 혼란변수를 확인하지는 못하였다. 또한 후인산화 분석 기법은 간접적인 PKC 활성도를 보기 때문에 직접적인 PKC 활성도를 측정할 수 있는 기법을 이용하여야 한다는 제한점을 갖고 있다.

결론적으로 장기적으로 납 노출이 되는 인체에서 만성적 노출은 PKC 활성도와 관련이 될 것이고, 만성적 납 노출 지표로는 경골중 납 및 노출 기간이 PKC 활성도에 중요한 독립적 예측인자로 이용될 수 있을 것이다. 납은, 어린이는 물론 성인에서도 신경행동학적 장애를 일으키는 원인으로 잘 알려져 있고(Bellinger 등, 1991; Chia 등, 1997), PKC를 활성화시키며(Markovac와 Goldstein, 1988), PKC는 신경 신호전달과 시냅스 과정에 중요한 요인으로 알려져 있는 점(Routtenberg, 1991)을 고려한다면, 납의 신경독성은 부분적으로 PKC 활성도의 변화와 관련된 기전을 갖을 것이다. 이러한 가설을 확인하기 위하여는 PKC의 활성도와 신경행동학적 기능과의 관련성을 평가하는 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

요 약

목적 : Protein kinase C는 칼슘-인지질 의존형 인산화 효소로 *in vitro*에서 납에 의하여 활성화되지만, 납에 노출된 인체내에서 그 영향을 평가한 경우는 없다. 본 연구의 목적은 납에 직업적으로 노출되는 근로자를 대상으로 납 노출이 적혈구막의 단백질내에서 PKC 활성화에 의한 인산화 수준에 영향을 주는지 알아보려고 하였다.

방법 : 1998년부터 국내 납 근로자를 대상으로 납에 의한 건강 영향조사가 4년간의 코호트 연구로 실행하였다. 1차년도에 630명의 납 근로자와 135명의 대조군이 조사되었고 이들중 본 연구에서는 직업적 노출이 되는 사업장에 근무하는 212명의 근로자를 대상하였다. 156명의 남자와 56명의 여자 근로자를

대상으로 인구학적, 과거병력, 직업력 등을 구조화된 설문과 면접으로 조사되었고 납 노출 평가는 혈중 납농도 및 ZPP, 경골중 납농도를 측정하였다. PKC의 활성도는 적혈구막 단백질내 PKC 의존형 인산화 수준으로 평가하였다. 적혈구막 단백질인 spectrin과 band 4.9의 후인산화수준을 측정하여 각 납 노출지표(혈중 납, ZPP, 경골중 납, 노출기간)와의 관련성은 다중회귀분석을 이용하였다.

결과 : 조사대상자의 평균(SD) 연령은 39.1(10.0)세, 근무기간은 8.1(6.5)년 이었으며, 경골중 납농도는 범위가 0.8에서 290.8 μg Pb/g bone mineral로 평균(SD) 34.4(35.2) μg Pb/g bone mineral이었다. 적혈구막 단백질의 후인산화수준은 개인간 변이가 매우 컸으며, spectrin은 평균(SD) 540.7(304.1), band 4.9 52kDa는 198.6(78.2), 48 kDa는 247.7(83.3) PSL이었다. 경골중 납농도와 노출 기간은 이들 후인산화 수준과 역상관성을 보였으나($p < 0.05$), 혈중 납 농도와 ZPP는 상관성이 없었다($p > 0.05$). 가능성 있는 혼란변수를 통제한 상태에서도 경골중 납 농도와 노출기간은 이들 후인산화수준과 유의한 회귀계수를 나타내었다.

결론 : 만성적 납 노출에 의하여 적혈구내 PKC 활성도는 영향을 받아 증가되어있는 것으로 평가되어 적혈구막 단백질의 인산화수준은 납의 노출지표로 이용될 수 있을 것이다. 납의 신경독성은 부분적으로 PKC의 활성도와 관련되어 있을 기전을 배제하기 어렵기 때문에 PKC 활성도와 신경행동학적 기능과의 관련성 평가가 진행되어야 할 것이다.

참고문헌

Bellinger D, Sloman J, Leviton A, Rabinowitz M, Needleman HL, Waternaux C. Low-level lead exposure and children's cognitive function in the preschool years. *Pediatrics* 1991;87:219-27.
 Belloni-Olivi L, Annadata M, Goldstein GW, Bressler JP. Phosphorylation of membrane proteins in erythrocytes treated with lead. *Biochemical Journal* 1996;315:401-6.
 Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* 1976;72:248-54.

Bressler JP, Goldstein GW. Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochemical Pharmacology* 1991;41:479-84.
 Chen HH, Ma T, Paul IA, Spencer JL, Ho IK. Developmental lead exposure and two-way active avoidance training alter the distribution of protein kinase C activity in the rat hippocampus. *Neurochemical Research* 1997;22:1119-25.
 Chia SE, Chia HP, Ong CN, Jeyaratnam J. Cumulative blood lead and neurobehavioral test performance. *Neurotoxicology* 1997;18:793-804.
 Cory-Slechta DA, Garcia-Osuna M, Greenamyre JT. Lead-induced changes in NMDA receptor complex binding: correlations with learning accuracy and with sensitivity to learning impairments caused by MK-801 and NMDA administration. *Behavioral Brain Research* 1997;85:161-74.
 Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives Biochemical Biophysics* 1963;100:119-30.
 Gehardsson L, Attewell R, Chettle DR. In vivo measurements of lead in bone in long-term exposed lead smelter workers. *Archives of Environmental Health* 1993;48:147-56.
 Goldstein GW, Ar D. Lead activates calmodulin sensitive processes. *Life Sciences* 1983;33:1001-6.
 Huang KP, Huang FL, Nakabayashi H, Yoshida Y. Roles of protein kinase C isozymes in cellular regulation. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 1989;255:21-8.
 Hu H, Rabinowitz M, Smith D. Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: Conceptual paradigms. *Environmental Health Perspectives* 1998;106:1-8.
 Kern M, Audesirk G. Inorganic lead may inhibit neurite development in cultured rat hippocampal neurons through hyperphosphorylation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1995;134:111-23.
 Lattera J, Bressler JP, Indurri RR, Belloni-Olivi L, Goldstein GW. Inhibition of astroglia-induced endothelial differentiation by inorganic lead: a role for protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:10748-52.
 Long GJ, Rosen JF, Schanne FA. Lead activation of protein kinase C from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:834-7.

- Markovac J, Goldstein GW. Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* 1988;334:71-3.
- Matsudaira PT, Burgress DR. SDS microtab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 1978;87:386-96.
- Mattson MP. Evidence for the involvement of protein kinase C in neurodegenerative changes in cultured human cortical neurons. *Experimental Neurology* 1991;112:95-103.
- Palfrey HC, Waseem A. Protein kinase C in the human erythrocyte. Translocation to the plasma membrane and phosphorylation of band 4.1 and 4.9 and other membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1985;260:1621-9.
- Rabinowitz MB, Bellinger D, Leviton A, Wang JD. Lead levels among various deciduous tooth types. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1991;47:602-8.
- Routtenberg A. A tale of two contingent protein kinase C activators: both neutral and acidic lipids regulate synaptic plasticity and information storage. *Progress in Brain Research* 1991;89:249-61.
- Rowe W, Eyster E, Kellner A. Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion: A low glycerol-rapid freeze procedure. *Cryobiology* 1968;5:119-28.
- Schwartz BS, Lee BK, Lee GS, Stewart WF, Lee SS et al. Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid-chelatable lead, and tibia lead with neurobehavioral test scores in south Korean lead workers. *American Journal of Epidemiology* 2001;153:453-64.