Original Article

폴리에틸렌 미세플라스틱의 임신 마우스 위내투여에 따른 모체 및 신생아 독성평가

송영민 , 김창열*

대구가톨릭대학교 의료보건산업대학원 화학물질독성평가학과

Toxicities Demonstrated in Dams and Neonates following Intragastric Intubation of Polyethylene Microplastics to Pregnant Mice

YoungMin Song and ChangYul Kim*

Department of Toxicity Assessment, Graduate School of Medical and Health Industry, Daegu Catholic University

ABSTRACT

Background: Plastic particles less than 5 mm in diameter (microplastics) are well-known for causing various toxicities such as lung inflammation, oxidative stress, genotoxicity, and reproductive toxicity. As microplastics become smaller, they can move across cell membranes, the placenta, and the blood-brain barrier.

Objectives: We evaluated the toxicities of polyethylene microplastics (PE-PMs) in dams and neonates through intragastric intubation of pregnant ICR mice.

Methods: Low concentrations (0.01 mg/mouse/day) and high concentrations (0.1 mg/mouse/day) of polyethylene microplastics were administered from the ninth day of pregnancy to postnatal day seven. The control group was administered with distilled water. On the day of sacrifice, the weight of dams and neonates and the organ weight of neonates was measured. Further, acetylcholinesterase levels and glutathione peroxidase levels were evaluated by using a blood sample obtained on the sacrifice day.

Results: No significant difference in the number of neonates was found, but the body weight gain of dams was seen to be lower in the low-dose group. On the other hand, we observed a consecutively declining trend in the weight gain and organ weight of neonates among the high-, control, and low-dose groups. Meanwhile, the serum acetylcholinesterase and glutathione peroxidase level were higher in the low-dose group compared to the control group. Further, the dose-dependent accumulation of microplastics in the organs of neonates revealed the transport of plastic particles from dams to their offspring.

Conclusions: Although the exact mechanism of toxicity caused by microplastics could not be confirmed, it was validated that exposure to microplastics during pregnancy and lactation causes its migration between generations and accumulation throughout the body. Hence, it is necessary to evaluate the systemic toxicity of microplastics and assessment of co-morbidities such as second-generation toxicity, neurotoxicity, and depression following long-term exposure.

Key words: Microplastic, neurotoxicity, oxidative stress, polyethylene, second-generation toxicity

Received August 11, 2021

Revised September 27, 2021

Accepted September 29, 2021

Highlights:

- Polyethylene microplastic (PE-MPs) are passed through the placenta and/or breast milk.
- PE-MPs induced changes in body/organ weight, AChE activity and GSH-Px activity.
- PE-MPs can be detected in different organs of dams and neonates following intra-gastric administration.

*Corresponding author:

Department of Toxicity Assessment, Graduate School of Medical and Health Industry, Daegu Catholic University, Hayang-ro 13-13, Hayang-Eup, Gyeongsan 38430, Republic of Korea

Tel: +82-53-850-3630

Fax: +82-53-359-7480

E-mail: cykim0813@cu.ac.kr

I. 서 론

직경 5 mm 이하 입자를 가지는 미세플라스틱(Microplastics, MPs)에는 화장품, 치약, 농업용 연마제, 세제, 자외선 차단제 및 벡터 약물 등에 사용되는 플라스틱 형태의 1차 플라스틱(Primary MPs) 형태와 자외선, 기계적 마모 및 생물학적 분

해로 인한 플라스틱 물체의 파편화로 생긴 2차 플라스틱(Secondary MPs)의 형태로, 바람을 타거나 강 또는 해류에 의해 토양환경이나 수생환경에 도달하게 되어 해를 미치게 된다.¹⁾ 또한, 우리 일상 환경에서도 미세플라스틱은 의류, 가구, 교통오염, 폐기물 조각, 건조된 비료 등에서도 노출 가능하며 특히, 일부 연구에서는 미세플라스틱이 작업 환경에 존재하는 것도 보

고되었다.^{2,3)}

폐기되거나 생활환경에 버려진 미세플라스틱은 크기가 작아 하수처리시설에 걸리지 않고 바다와 강으로 그대로 유입된다.⁴⁾ 매년 바다로 유입되는 950만톤의 플라스틱 쓰레기 중 미세플라스틱은 약 15~31%를 차지해 수생환경을 파괴하며 물고기, 바다거북, 갑각류 등의 해양생물이 먹이로 오인하여 섭취함으로써 수생생물에 악영향을 미친다.^{5,6)} 이렇게 미세플라스틱에 노출된 수생생물은 먹이사슬을 통해 결국 사람이 직접 섭취하게 되며 그 결과로 폐 염증, 유전독성, 생식독성 등을 유발할 수 있으며 접촉 및 흡입으로도 노출될 수 있다는 독성보고서의 보고도 있다.^{7,8)}

미세플라스틱 크기가 $\leq 20 \mu\text{m}$ 는 장기(Organs)에 들어갈 수 있으며, $1\sim 10 \mu\text{m}$ 미세플라스틱은 세포막, 혈액-뇌 장벽 및 태반을 통과하여 다음 세대로 전달될 수 있다.⁹⁾ 이렇게 장기에 축적된 폴리에틸렌 미세플라스틱(Polyethylene microplastics, PE-MPs)은 제브라 피쉬의 생식력 감소와 신경독성 및 비정상적인 행동을 유발할 수 있으며,¹⁰⁾ 폴리스타일렌 미세플라스틱(Polystyrene microplastics, PS-MPs)에 노출된 Wistar 랫드는 내분비 장애와 생식독성을 유발하고, 혈액-고환 장벽을 통과해 고환 위축 및 퇴행성 정자 기형과 DNA 손상을 유발시킬 수 있다.¹¹⁾ BALB/c 생쥐에서도 테스토스테론, 젖산탈수효소(Lactate dehydrogenase, LDH)의 활성을 감소시켜 Wistar 랫드와 유사한 결과를 확인 할 수 있으며, 호기성 대사 방해, 산화적 스트레스, 다양한 환경적 스트레스와 염증성 사이토카인에 의해 활성화되는 p38 MAPKs 인자들을 활성화시킨다.¹²⁾ 또한 PE-MPs와 PS-MPs에 노출된 인간세포주(HeLa human glioma cell)를 이용한 미세플라스틱 시험에서도 세포생존력에는 영향을 미치지 않지만 강한 산화적 스트레스를 유발하는 것을 확인하였다.¹³⁾ 미세플라스틱은 본래의 독성 외에도 카드뮴, 수은 및 기타 미량의 금속의 독성물질과 상호작용하는 것으로 알려져 있다. 미세플라스틱은 해양환경에 존재하는 수은 축적에 영향을 미쳐 유럽피언 농어(European sea bass)의 에너지 대사와 관련된 효소 활성에 영향을 미친다.¹⁴⁾ 이러한 미세플라스틱은 잠재적으로 살아있는 유기체 형태로써 오염물질을 전달하는 매개체 역할수행과 인체의 효과적인 흡수와 독성을 향상시켜 건강 영향에 더 나쁜 결과를 만들어 낸다.^{4,15)}

대부분의 미세플라스틱 연구는 수중 생물에 미치는 독성 영향에 초점을 맞추어 진행되었으며 현재는 설치류와 같은 포유류를 이용한 미세플라스틱 노출 연구 및 사람 세포주를 이용해 미세플라스틱의 독성평가를 진행하고 있다.^{16,17)} 최근에는 경구를 통해 노출된 미세플라스틱으로 인한 영향과 소화계의 축적 정도, 대사 장애 등의 결과를 바탕으로 임신 개체에 노출 시켜 신생자에 미치는 영향을 평가하는 연구가 진행되었다.¹⁸⁾ 하지만 임신 및 수유기간 동안 실험동물에 미세플라스틱을 위내투여 후 조직 축적 및 추가 독성에 대한 데이터는 매우 제한적이

며, 임신 및 수유 중인 쥐에 노출된 후 다음 세대의 부작용 연구결과는 많이 부족하다.

따라서 본 연구는 한국의 강물 및 하천 어류에서 발견되는 가장 흔한 플라스틱 유형 중 하나로 보고된 PE-MPs¹⁹⁾를 임신한 ICR 마우스에 위내투여하여 임신과 수유기간 노출에 따른 어미와 신생자의 영향을 평가하고자 하였다.

II. 연구 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 임신 6일차 암컷 ICR 마우스는 (주)코아텍(평택, 대한민국)에서 구입하였다. 실험동물의 입수시 몸무게는 $27.0\sim 31.7 \text{ g}$ 으로 입수 후 3일간의 순화기간을 가졌으며, 이후 육안적으로 이상이 없으며 체중이 비슷한 개체를 무작위로 용매투여대조군, 저농도 PE-MPs군, 고농도 PE-MPs군으로 각 군당 3마리로 나누었다. 군 분리 후, 투여를 진행하는 과정에서 저농도 PE-MPs의 한 개체가 임신이 되지 않았다는 것이 확인되어 연구에서 제외하였다. 사육 환경은 온도 $22\pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50\pm 20\%$, 조도 $150\sim 300 \text{ Lux}$, 환기 횟수 $10\sim 20$ 회/시간, 조명 명암 1회/12시간, 암모니아 농도 20 ppm 이하, 소음 60 dB 이하의 조건으로 실험기간 동안 모든 동물의 사료와 음수는 자유 급여시켰다. 본 연구는 실험기간 동안 실험동물 윤리적 측면을 고려하여 개별 사육하였고, 출산용 깔짚을 충분히 깔아주어 개체의 스트레스를 최소화하였다. 동물실험은 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하였으며, 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 제IACUC-2019-021호) 후 실시되었다.

2. 시험물질 및 투여

시험물질은 Fluorescent Red Polyethylene Microspheres (Cat. No: UVPMS-BR-0.995, Cospheric, Santa Barbara, California, USA)으로 직경은 $10\sim 45 \mu\text{m}$ 이며, 밀도는 0.995 g/cc 소수성 미세플라스틱이다. 해당 시험물질은 입수 후 용기를 aluminum foil로 감싸 차광된 상태로 암실에 보관하여 형광 손실을 방지하였다. 저농도 PE-MPs ($0.01 \text{ mg/mouse/day}$), 고농도 PE-MPs (0.1 mg/mouse/day)를 3차 증류수에 현탁시켜 투여하였고 용매투여 대조군은 3차 증류수만 투여하였다. 투여 기간은 임신 기간과 출산 후 기간으로 나누어 진행되었다. 임신기간 중 투여는 임신 9일차부터 13일차까지 5일간 진행하고, 2일 휴식하였다. 휴식 후 임신 16일차부터 17일차까지 2일간 투여하여 총 7회 투여하였다. 출산 후 투여는 출산 당일출산 0일차라고 할 때, 출산 1일차부터 5일차까지 총 5회 투여하였다. 시험물질은 당일 조제하여 투여하였고, PE-MPs의 균일한 현탁을 위해 투여 직전 30분 동안 sonicator를 이용해 균질화하였다. 투여용량 설정은 미세플라스틱을 이용한 위내투여실험 선행연구

구를 참고하였다.²⁰⁾

3. 체중 및 장기 무게 측정

어미 개체의 체중 측정은 투여 1일차(Gestational day 9; GD9), 투여 5일차(Gestational day 13; GD13), 출산 후 1일차(Postnatal day 1; PND1), 부검일(Postnatal day 7; PND7)에 측정하였다. 신생자 개체의 체중 측정은 출산 후 1일차와 부검일에 진행되었다.

4. Acetylcholinesterase Activity 및 Glutathione Peroxidase Activity 분석

혈청에서 Acetylcholinesterase (AChE) level (Acetylcholinesterase Assay Kit, ab138871, abcam, Cambridge, MA, USA)와 Glutathione Peroxidase (GSH-Px) level (Glutathione Peroxidase Assay Kit, ab102530, abcam, Cambridge, MA, USA)을 kit를 사용해 측정하였다. 희생부검 시 어미 개체와 신생자의 심장채혈을 통해 혈액을 채취하였으며, 혈액은 원심분리(4,000 rpm, 4°C, 30 min)하여 혈청을 분리 한 후 분석 전까지 냉동(-20°C) 보관하였다. AChE 및 GSH-Px 수준을 분석하기 위해서 혈청을 각각 1/100 배 및 1/10으로 희석하였고, microplate reader (Victor3, PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 570 nm 및 340 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. 장기 내 미세플라스틱 계수

임신기간 및 모유 수유 중 위내투여 된 미세플라스틱이 태반과 모유를 통해 신생자로 이동하는지 확인하기 위해 PND7에 어미와 신생자를 부검하였다. 어미 개체를 부검하여 뇌, 간, 폐, 장(5 mL homogenization buffer/organ), 난소, 신장, 가슴샘, 심장, 위, 비장(2 mL homogenization buffer/organ)을 50 mL의 polystyrene tube에서 homogenization 하였다. 신생자의 경우 간, 폐, 장(0.5 mL homogenization buffer/organ), 뇌, 가슴샘, 심장, 위, 비장, 신장(0.2 mL homogenization buffer/organ)을 1.5 mL e-tube에서 homogenization 하였다. 원심분리(3,000 rpm, 1 min) 후 모든 상등액은 냉장(4°C) 보관하였다. 분리된 상등액을 hemocytometer에 각 10 µL를 주입하여 450~490 nm filter의 형광현미경(Axiolab, Zeiss, Germany)을 사용하였다. 장기별 PE-MPs 총 갯수는 전체 homogenization buffer volume을 고려하여 보정 계산되었다. 상등액 내 PE-MPs를 불순물과 구별하기 위해 homogenization buffer에 PE-MPs를 현탁 시켜 표준물질 조제 후 관찰하여 크기와 모양, 색 등을 미리 파악하였고 장기 상등액을 이용하여 기포, micelle 등을 관찰하여 실제 PE-MPs 입자와 구분 작업을 사전에 충분히 숙지하였다. 본 실험에서 사용한 homogenization buffer (pH 8.0)는 20 mM Tris (Tris(hydroxymethyl aminomethane)), 100 mM NaCl, 2 mM NA₂EDTA (sodium ethylenediaminetetra-acetate)

1% Ipepal CA-630을 혼합하여 조제하였다.

6. 통계분석

통계처리는 SPSS 19.0K (SPSS Inc., USA) 프로그램을 이용하여 대조군과 시험군의 유의성을 검증하였다. 유의성 검증은 one-way ANOVA test를 실시하였고 군 간의 사후 검증은 Scheffe test와 Dunnett test를 사용하였다. 정규성을 만족하지 못할 경우 Mann-Whitney U-test를 통하여 대조군과의 유의성을 검증하였다. 모든 결과값은 평균±표준오차(Standard Error, SE)로 나타냈다. 유의수준은 p-value<0.05에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 미세플라스틱 투여에 따른 체중 및 장기 무게 변화

임신기간 및 수유기간 동안 어미의 체중 증가는 Table 1과 같다. 임신기간 동안 미세플라스틱 투여에 따른 어미 개체들의 체중 증가는 군간 유의미한 차이를 보이지 않았다. 다만, 출산 후 수유기간 동안 측정된 체중 증체에서 어미-용매투여대조군(6.2±1.1 g)에 비해 어미-저농도 PE-MPs군(1.1±2.7 g) 및 어미-고농도 PE-MPs군(3.0±1.4 g)으로 어미-용매투여대조군에 비해 각각 1/6 및 1/2 수준으로 낮은 증체를 보였다.

신생자의 경우, 태어난 1일차(PD1)와 희생부검(PD7) 당시 실시한 몸무게 변화 차이에서 신생자-용매투여대조군(2.6±0.1 g)의 체중 증체 수준에 비해 신생자-저농도 PE-MPs군(1.7±0.1 g)에서 유의하게 낮은 증체량을 나타냈다. 신생자-고농도 PE-MPs군(2.7±0.1 g)으로 신생자-용매 투여대조군과 차이가

Table 1. Body weight gains (g) of dams and neonates

	Group		
	Control	Low dose PE-MPs	High dose PE-MPs
Dams (D)			
Gestational period	9.2±1.2	8.7±0.6	7.6±1.4
Lactational period	6.2±1.1	1.1±2.7	3.0±1.4
Neonates (N)			
PND 1 to PND 7	2.6±0.1	1.7±0.1*	2.7±0.1

Body weight of dams were measured on the days of first and fifth microplastics administration (D-Control: 0 mg/mouse/administration, D-Low dose Polyethylene microplastic (PE-MPs): 0.01 mg/mouse/administration, D-High dose PE-MPs: 0.1 mg/mouse/administration) during gestational period, and the PND1 and 7 during lactational period. Body weight of neonates was measured at PND1 and 7. Number of animals were 3, 2, 3 for dams and 29, 17, 26 for neonates of Control, Low dose PE-MPs and High dose PE-MPs group, respectively. Data are expressed as means±standard error. *p<0.05, compared to the N-Control (neonates of D-Control) and N-High Dose PE-MPs (neonates of D-High dose PE-MPs).

Table 2. Organ weights (mg) of neonates

Organ	Group		
	N-Control (n=11)	N-Low dose PE-MPs (n=9)	N-High dose PE-MPs (n=11)
Kidney (L)	22.7±1.2	19.4±0.6	27.7±1.9*
Kidney (R)	23.1±1.5	19.7±0.7	28.9±2.0*
Thymus	17.6±2.4	11.1±0.9 [†]	21.2±1.4
Lung	92.5±5.7	81.1±2.9	103.0±4.0 [§]
Heart	22.6±1.3	19.1±1.6	26.3±1.0 [§]
Spleen	21.4±2.1	14.6±0.7 [†]	25.7±2.1
Brain	221.5±7.3	218.3±7.0	243.9±8.1
Liver	134.4±10.5	110.5±7.2 [†]	159.1±8.7
Stomach	31.4±1.5	22.7±1.2 [†]	29.6±1.3
Intestine	207.1±10.4	185.2±8.0	238.8±8.2 [§]

Organ weight of neonates were measured at the time of sacrifice, PND7. Data are expressed as means±standard error.

N-Control, neonates of D-Control; N-High dose PE-MPs, neonates of D-High dose PE-MPs; N-Low dose PE-MPs, neonates of D-Low dose PE-MPs. Statistically significant differences ($p<0.05$): *compared to N-Control and N-Low Dose PE-MPs; [†]compared to N-Control and N-High Dose PE-MPs; [§]compared to N-Low Dose PE-MPs.

없었다(Table 2).

신생자가 태어난 후 7일 뒤 희생부검을 실시한 후 각 장기별 무게를 측정하였다(Table 2). 신생자-용매투여대조군에 비해 신생자-저농도 PE-MPs군에서 각 장기별 절대무게가 감소되는 경향을 보였으며, 가슴샘(Thymus), 비장(Spleen), 위(Stomach)는 유의하게 감소하였다. 신생자-고농도 PE-MPs군은 신생자-용매투여대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며 좌·우 신장(Kidney)은 통계적으로 유의하게 증가하였다. 또한, 신생자-저농도 PE-MPs군과 신생자-고농도 PE-MPs군은 뇌(Brain)를 제외하고 모든 장기에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

2. 혈청 내 Acetylcholinesterase 및 Glutathione Peroxidase 수준 변화

미세플라스틱의 투여에 따른 신경독성을 확인하기 위해 희생부검 시 얻은 혈청을 사용하여 AChE 수준을 측정하였다. 어미-저농도 PE-MPs ($37,245\pm1,685$ mU/mL)군은 어미-용매투여대조군($27,422\pm1,167$ mU/mL)군에 비해 유의하게 증가하였다. 또한 신생자-용매투여대조군($15,127\pm131$ mU/mL)에

Fig. 1. Serum levels of acetylcholinesterase of (A) Dams (B) neonates and Glutathione Peroxidase of (C) Dams (D) neonates. Data are expressed as means±standard error from 2 dams and 9 neonates in low dose PE-MPs and 3 dams with 11 neonates of each control and high dose PE-MPs. * $p<0.05$

비해 신생자-저농도 PE-MPs ($17,719 \pm 1,928$ mU/mL)는 증가하였으나 통계적 차이는 없었다. 어미 및 신생자-고농도 PE-MPs는 각각 $28,215 \pm 2,696$ mU/mL 및 $14,660 \pm 686$ mU/mL를 나타냈다(Fig. 1A, 1B).

또한 미세플라스틱 투여에 따른 산화적 스트레스를 확인하기 위해 혈청 중 GSH-Px 수준을 측정하였다. GSH-Px 수준은 어미-용매투여대조군(629 ± 36 nmol/ μ L) 및 신생자-용매투여대조군(982 ± 27 nmol/ μ L)에 비해 어미-저농도 PE-MPs군(908 ± 449 nmol/ μ L)과 신생자-저농도 PE-MPs군($1,096 \pm 11$ nmol/ μ L)에서 증가하는 경향을 보였으며, 어미 및 신생자-고농도 PE-MPs는 715 ± 131 nmol/ μ L 및 935 ± 43 nmol/ μ L를 보였다(Fig. 1C, 1D).

3. 장기 내 미세플라스틱 계수

희생부검시 어미와 신생자들의 각 장기에서 나온 미세플라스틱의 계수를 측정하였다. 어미의 경우 가슴샘, 심장, 뇌를 제외한 모든 장기에서 PE-MPs가 발견되었다(Table 3). 신생자-저농도 PE-MPs군은 심장과 장에서 PE-MPs는 관찰되지 않았으며, 좌측 신장(8.0 ± 4.9 개), 가슴샘(8.0 ± 8.0 개), 비장(12.0 ± 8.0 개), 뇌(4.0 ± 4.0 개), 장(80.0 ± 25.5 개)에서 관찰되었다. 신생자-고농도 PE-MPs군은 뇌에서는 발견되지 않았으나, 좌측 신장(3.3 ± 3.3 개), 우측 신장(6.7 ± 4.2 개), 가슴샘(3.3 ± 3.3 개), 폐(16.7 ± 10.5 개), 심장(3.3 ± 3.3 개), 비장(10.0 ± 6.8 개), 위(6.7 ± 4.2 개), 장(50.0 ± 18.3 개)에서 관찰되었다(Table 4).

Table 3. Numbers of PE-MPs in tissue homogenates from each dam at PND7

Organs	Group	
	D-Low dose PE-MPs (n=1)	D-High dose PE-MPs (n=2)
Brain, thymus, heart	ND	ND, ND
Ovary	Left	200
	Right	ND
Kidney	Left	ND
	Right	ND
Lung	ND	200, 600
Liver	ND	ND, ND
Spleen	ND	500, 500
Stomach	ND	200, ND
Intestine	200	ND, ND
	ND	ND, 200
	ND	500, 500

No PE-MPs were detected in D-Control; Brain, liver, lung (including thyroid and parathyroid glands), and intestine from dams were homogenized with 5 mL of buffer while thymus, heart, ovaries, kidneys, spleen, and stomach were homogenized with 2 mL of buffer.

IV. 고 찰

본 연구는 실험동물을 사용해 PE-MPs에 직접 노출된 ICR 어미 마우스와 그 자손에 대한 미세플라스틱의 위해성을 평가하고자 하였다. 다만, 이번 연구에 사용된 임신한 ICR 마우스의 수가 적고, 본 연구에서 해당 미세플라스틱 투여를 임신 후 기인 임신 14~15일차 2일간 투여하지 않았던 점은 본 연구 방법 설계의 제한점이라 여겨질 수 있지만, 태반과 모유 수유가 다음 세대로 노출될 수 있는 중요한 경로 중 하나로 인식할 수 있으며, PE-MPs의 노출이 다음 세대에 세대 간 영향을 유발할 수 있다는 것을 확인하였다.

본 연구에서 노출된 PE-MPs는 첫 번째 세대 자손의 생존에 영향을 미치지 않았다. 이번 연구결과는 임신 기간부터 출산 후 21일까지 암컷 마우스에 5 μ m PS-MPs를 음용수의 형태로 100 또는 1,000 μ g/L로 섭취 및 10~45 μ m PE-MPs를 6 또는 60 μ g을 12회 기관내 점적(Intratracheal instillation) 한 연구결과에서도 새끼의 생존율과 성비에 영향을 미치지 않는다는 이전 연구와 일치하였다.^{18,21)} 다만, 또 다른 이전연구에서는 2~6 μ m PS-MPs (0.023 mg/L)의 생활환경에서 해양생물인 굴을 자라게 하였을 때 대조군에 비해 난모세포의 수(-38%), 직경(-5%), 정자의 속도(-23%) 및 번식력(-41%)를 감소²²⁾시켰으며, BALB/c 수컷 생쥐에 5~5.9 μ m의 PS-MPs를 노출시켰을 때 웅성세포(male cell)와 테스토스테론에 영향을 주어 번식력 손상을 유발한다는 보고가 있다.¹²⁾ 이는 부모가 동시에 미세플라스틱 노출되었을 때 자손에게 일어나는 영향으로 볼 수 있어 어미개체만 미세플라스틱 노출만 시킨 본 연구와는 다른 결과였

Table 4. Numbers of PE-MPs in tissue homogenates from each neonate at PND7

Organ	Group	
	Low dose PE-MPs (n=5)	High dose PE-MPs (n=6)
Kidney	Left	ND, 20, 20, ND, ND
	Right	ND, ND, ND, ND, ND
Thymus	40, ND, ND, ND, ND	20, ND, ND, ND, ND, ND
Lung	ND, ND, ND, ND, ND	50, ND, ND, 50, ND, ND
Heart	ND, ND, ND, ND, ND	ND, ND, ND, ND, 20, ND
Spleen	40, ND, ND, ND, ND	ND, ND, ND, ND, 20, 40
Brain	ND, 20, ND, ND, ND	ND, ND, ND, ND, ND, ND
Stomach	ND, ND, ND, ND, ND	ND, ND, ND, 10, 20, ND
Intestine	ND, 100, 100, 150, 100	ND, 50, 50, 100, ND, 100

No PE-MPs were detected in N-Control; Lung (including thyroid and parathyroid glands), and intestine from dams were homogenized with 0.5 mL of buffer while kidneys, thymus, heart, spleen, brain and stomach, spleen, kidneys, and ovaries were homogenized with 0.2 mL of buffer.

다. 또한, 시험물질 투여에 따른 체중 변화는 독성을 예측할 수 있는 가장 기본적인 지표로 활용²³⁾할 수 있는데, 출산 후 1일에서부터 희생부검까지 어미-저농도 PE-MPs와 어미-고농도 PE-MPs는 용매투여대조군에 비해 체중 증체가 이루어지지 못하였다. 미세플라스틱은 입을 통해 식도, 위, 장으로 들어가기 때문에 소화기관에서의 미세플라스틱 독성효과는 분명하게 나타나게 된다. 소화기관에 노출된 미세플라스틱은 장내 세균총의 장애를 일으키며, 프로바이오틱스와 병원성 박테리아의 비율을 파괴할 수 있고 장 점액 분비를 줄이고 장 점막상피를 손상을 유발해 궁극적으로 장 장벽을 파괴하기도 하며 지방산 및 아미노산 대사 장애를 유발하여 지질 침착을 유발할 수 있다.²⁴⁾ 이런 이유로 어미 개체의 체중 증체에 영향을 받았을 것이며, 신생자 체중 증체에서 신생자-저농도 PE-MPs가 낮은 증가율을 보여 어미의 영양 상태에 따라 신생자의 영양 상태에도 영향을 미칠 수 있다는 것을 보여주고 있으며, 장기 무게에서도 신생자-저농도 PE-MPs의 장기절대 무게가 신생자-용매투여군에 비해 작게 나가는 것을 확인할 수 있었다. 반면 신생자-고농도 PE-MPs는 신생자-용매투여대조군 및 저농도 PE-MPs에 비해 장기의 절대 무게가 많이 나오는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 신생자-저농도 PE-MPs와 비교해 뇌를 제외한 모든 장기에서 통계적으로 유의한 증가가 있었다. 이런 결과는 미세플라스틱 노출농도에 따라 영향이 다르게 나타날 수 있고 축적된 미세플라스틱 노출이 다양한 영향을 미칠 가능성을 암시할 수 있다. 이는 PE-MPs를 ICR 생쥐에 임신기간 동안 노출된 어미와 자손에 대한 체중 변화에 관한다는 기존의 연구와 일치²⁵⁾하는 것을 보여주고 있어 부모의 미세플라스틱 노출에 따른 독성, 임신 개체의 마리 수 선정, 투여방법 및 투여기간 설정 등 다양한 영향을 묘사하는데 좋은 준비자료로 활용할 수 있을 것이다.

물고기를 이용한 많은 연구에서 폴리에틸렌 마이크로 및 나노플라스틱의 신경독성에 대해 보고하였으며, AChE 활성은 수생생물에서 신경독성을 보기위한 대표적인 인자 중 하나이다.²⁶⁾ AChE는 시냅스 틈에서 아세틸콜린(Acetylcholine)의 가수분해를 촉매하여 그 작용을 종결시키는 콜린성 신경전달의 중요한 구성 요소이다. 인간이 섭취하는 물고기에 PE-MPs 노출시켰을 때 노출되지 않은 물고기에 비해 뇌, 아가미 및 등 근육에서 지질 과산화 수준의 유의한 증가와 뇌에서 AChE 활성이 증가하는 것을 확인하였고,²⁷⁾ 산화적 스트레스와 염증은 AChE 수준을 증가시킬 수 있다. 제브라피쉬 유충을 이용해 PE-MPs (10 μ m, 5~500 μ g/L)를 10일 동안 노출시켰을 때 장에서 PE-MPs가 발견되었고 뇌에서는 관찰되지 않았지만 AChE를 포함해 성장과 유전자 발현에 최소한의 영향을 끼친다는 연구결과가 있다.²⁸⁾ 위 결과처럼 본 연구에서도 AChE 수준이 저농도의 어미 및 자손에서 증가하는 결과를 확인할 수 있었다. 또한 미세플라스틱의 노출은 산화적 스트레스를 증가시키는 것으로

알려져 있다. 따라서 산화적 스트레스에 대항하는 역할을 하는 중요한 효소²⁹⁾인 GSH-Px의 수준 또한 어미 및 신생자 저농도 PE-MPs에서 증가 되는 경향을 보였다. 이는, 미세플라스틱 노출로 생성된 산화적 스트레스에 대항하기 위해 항산화 효소 중 하나인 GSH-Px가 증가한 것으로 보여진다. 다만, 어미-신생자 고농도 PE-MPs는 용매투여대조군과 차이가 없었다. 본 연구에 사용한 PE-MPs는 10~45 μ m 크기의 형광 염료와 결합된 미세플라스틱으로 상업적으로 사용하고, 사용된 미세플라스틱 직경은 장기에 침투하거나 세포막과 태반을 통과할 수 있는 것으로 알려져 있으며⁹⁾ 실제 생활환경에 노출되는 미세플라스틱의 직경은 다양하게 존재하기 때문에 본 연구에 사용하였다. 투여 시 sonicator를 이용해 균질화하였지만 다양한 크기가 존재하여 군간 투여된 미세플라스틱 직경 크기는 차이가 있을 수 밖에 없다. 실제 본 연구에서 장기에 축적된 미세플라스틱의 크기가 차이가 있고 직경에 따른 독성의 영향이 다르게 나타나는 기존의 연구결과에서 본 연구의 저농도 PE-MPs와 고농도 PE-MPs 사이의 독성영향 차이는 분명 존재할 것으로 보여진다. 이에 따라 미세플라스틱 노출이 신경독성과 산화 스트레스를 유발하는 여러 연구결과에 따라 미세플라스틱의 직경에 따른 독성영향평가를 확인해 볼 필요성이 있다. 또한, 사람을 대상으로 한 다른 연구에서 중증의 우울증 환자들에서 높은 AChE 활성이 이루어진 연구결과³⁰⁾에 따라 우울증과 관련된 불안유사행동시험, 관련 바이오마커들을 활용해 실험을 진행해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

어미와 신생자의 장기 내 미세플라스틱은 대부분 장기에서 관찰되었고, 고농도 PE-MPs에서 다양한 장기에 노출되었다는 것을 확인하였다. 특히, PE-MPs는 위내투여 하였을 때 직경이 5 μ m의 경우 소화기관(Gut)>신장>간 순으로 축적이 되었으며, 20 μ m의 경우 신장>소화기관>간 순으로 축적이 된다.²⁰⁾ 비록 간에서 미세플라스틱이 관찰되지 않았으나 다양한 기관에서 미세플라스틱이 관찰되는 것을 확인하였고 신생자의 경우 다른 외부환경에 노출되지 않았으며, 음식 섭취를 어미의 수유를 통해서만 섭취되었다는 것을 본다면 신생자의 미세플라스틱 축적은 어미의 태반이나 모유수유로만 자손에게 전달된 것을 확인할 수 있다. 또한, 민물고기(Red tilapia)의 뇌에서 70~90 μ m PS-MPs가 축적되고, 10 μ m 또는 그 이하 크기의 미세플라스틱은 혈액-뇌 장벽을 통과하는 연구보고가 있다.²⁴⁾ 반면에 20 nm PS-나노플라스틱을 제브라 피쉬 난황에 투여하였을 때 혈액-뇌 장벽이 아닌 난황에 존재하는 미세플라스틱에 의해 뇌에 축적이 될 수 있다는 연구결과도 있어,²⁴⁾ 본 연구의 신생자의 뇌에서 발견된 PE-MPs가 혈액-뇌 장벽을 통과해 축적되었는지 혹은 신생자 발달 초기 단계에 혈액-뇌 장벽이 확립되기 전에 뇌에 축적이 된 것인지는 추가 실험이 필요할 것으로 사료된다. 다만, 신생자 여러 장기의 PE-MPs 존재는 신생자 성장에 영향을 주어 이후, 신생자를 대상으로 하는 신경독성, 생식독

성, 유전독성, 2세대 전달 등을 다양한 실험들을 활용해 미세플라스틱 독성을 평가할 수 있을 것이다.

본 연구의 결과로 미세플라스틱의 정확한 독성발현은 확인할 수는 없었다. 일반적으로 마우스에 관찰되는 미세플라스틱 독성 정도는 물고기에서 관찰되는 것보다 적게 나타날 수 있다. 물고기의 경우 플라스틱의 섭취와 축적이 장과 아가미 등 여러 경로를 통해 노출되지만, 마우스는 위장(Gastrointestinal)경로를 통해 섭취를 제한하기 때문이다.³¹⁾ 하지만 본 연구결과에 따라 미세플라스틱 노출이 태반과 모유수유를 통해 세대 간 전달할 수 있다는 것을 보여주었고, 여러 기관에 분포된 미세플라스틱의 특성에 따라 전신에 대한 영향평가를 진행할 필요성이 있음을 시사한다. 또한, 미세플라스틱의 독성영향은 급성보다 만성에서 많이 나타나는 점을 감안 할 때 미세플라스틱의 장기간 노출 영향 평가와 신경독성, 유전독성, 생식독성, 발달독성으로 유발되는 다양한 질환과 연계한 평가가 필요하며 이러한 결과를 활용해 미세플라스틱의 독성문제를 제대로 인식하고 추후 해결방안을 모색할 필요성이 있다.

V. 결 론

임신 및 출산후 기간 동안 PE-MPs를 위내투여 후 어미 개체와 신생자 개체에서 나타나는 영향을 확인하고자 하였다. PE-MPs 위내투여에 따라 신생자-용매대조군에 비해 저농도 PE-MPs에서 체중 증체가 유의하게 감소하였고, 신생자-고농도 PE-MPs의 장기 절대무게는 용매대조군에 비해 증가되었다. 신경독성과 산화적스트레스의 정도를 확인하기 위해 측정 한 AChE 및 GSH-Px 수준은 용매대조군에 비해 저농도 PE-MPs에서 증가하는 경향을 보였다. 또한, 세대 간 미세플라스틱의 이동을 확인하기 위해 신생자의 장기 내 축적된 미세플라스틱은 대부분의 장기에서 발견되었고 고농도-PE MPs에서 더 많은 미세플라스틱이 발견되었다. 다만, 본 연구에 사용된 어미개체의 수, PE-MPs의 직경, 투여기간 설정 등의 제한성은 있지만 본 연구의 결과가 태반과 모유수유를 통해 PE-MPs 노출이 세대 간 전달로 인해 독성영향을 검증하는 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국화학물질관리협회 화학물질 안전관리 전문 인력 양성 사업의 지원을 받아 수행되었음.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Abbasi S, Keshavarzi B, Moore F, Turner A, Kelly FJ, Dominguez AO, et al. Distribution and potential health impacts of microplastics and microrubbers in air and street dusts from Asaluyeh County, Iran. *Environ Pollut*. 2019; 244: 153-164.
- Dris R, Gasperi J, Saad M, Mirande C, Tassin B. Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment? *Mar Pollut Bull*. 2016; 104(1-2): 290-293.
- Woodall LC, Gwinnett C, Packer M, Thompson RC, Robinson LF, Paterson GL. Using a forensic science approach to minimize environmental contamination and to identify microfibrils in marine sediments. *Mar Pollut Bull*. 2015; 95(1): 40-46.
- Napper IE, Bakir A, Rowland SJ, Thompson RC. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Mar Pollut Bull*. 2015; 99(1-2): 178-185.
- Huerta Lwanga E, Gertsen H, Gooren H, Peters P, Salánki T, van der Ploeg M, et al. Microplastics in the terrestrial ecosystem: implications for lumbricus terrestris (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environ Sci Technol*. 2016; 50(5): 2685-2691.
- Anbumani S, Kakkar P. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018; 25(15): 14373-14396.
- Wright SL, Kelly FJ. Plastic and human health: a micro issue? *Environ Sci Technol*. 2017; 51(12): 6634-6647.
- Gasperi J, Wright SL, Dris R, Collard F, Mandin C, Guerrouache M, et al. Microplastics in air: are we breathing it in? *Curr Opin Environ Sci Health*. 2018; 1: 1-5.
- von Moos N, Burkhardt-Holm P, Köhler A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ Sci Technol*. 2012; 46(20): 11327-11335.
- Mak CW, Ching-Fong Yeung K, Chan KM. Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019; 182: 109442.
- Amereh F, Babaei M, Eslami A, Fazelipour S, Rafiee M. The emerging risk of exposure to nano(micro)plastics on endocrine disturbance and reproductive toxicity: from a hypothetical scenario to a global public health challenge. *Environ Pollut*. 2020; 261: 114158.
- Xie X, Deng T, Duan J, Xie J, Yuan J, Chen M. Exposure to polystyrene microplastics causes reproductive toxicity through oxidative stress and activation of the p38 MAPK signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020; 190: 110133.
- Schirrinzi GF, Pérez-Pomeda I, Sanchís J, Rossini C, Farré M, Barceló D. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environ Res*. 2017; 159: 579-587.
- Barboza LGA, Vieira LR, Branco V, Figueiredo N, Carvalho F, Carvalho C, et al. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquat Toxicol*. 2018; 195: 49-57.
- Yang W, Gao X, Wu Y, Wan L, Tan L, Yuan S, et al. The combined toxicity influence of microplastics and nonylphenol on microalgae

- Chlorella pyrenoidosa*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020; 195: 110484.
16. Digka N, Tsangaris C, Torre M, Anastasopoulou A, Zeri C. Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Mar Pollut Bull*. 2018; 135: 30-40.
 17. Watts AJ, Lewis C, Goodhead RM, Beckett SJ, Moger J, Tyler CR, et al. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. *Environ Sci Technol*. 2014; 48(15): 8823-8830.
 18. Luo T, Wang C, Pan Z, Jin C, Fu Z, Jin Y. Maternal polystyrene microplastic exposure during gestation and lactation altered metabolic homeostasis in the dams and their F1 and F2 offspring. *Environ Sci Technol*. 2019; 53(18): 10978-10992.
 19. Park TJ, Lee SH, Lee MS, Lee JK, Lee SH, Zoh KD. Occurrence of microplastics in the Han River and riverine fish in South Korea. *Sci Total Environ*. 2020; 708: 134535.
 20. Deng Y, Zhang Y, Lemos B, Ren H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci Rep*. 2017; 7: 46687.
 21. Han YH, Song YM, Kim GW, Ha CS, Lee JS, Kim MH, et al. No prominent toxicity of polyethylene microplastics observed in neonatal mice following intratracheal instillation to dams during gestational and neonatal period. *Toxicol Res*. 2021; 37: 443-450.
 22. Sussarellu R, Suquet M, Thomas Y, Lambert C, Fabioux C, Pernet ME, et al. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(9): 2430-2435.
 23. Lee YB, Kim GW, Song YM, Han YH, Ha CS, Lee JS, et al. Preventive effect of garlic administration on respiratory toxicity induced through intratracheal instillation of fine dust (PM10) in rats. *J Environ Health Sci*. 2020; 46(6): 667-675.
 24. Guerrera MC, Aragona M, Porcino C, Fazio F, Laurà R, Levanti M, et al. Micro and nano plastics distribution in fish as model organisms: histopathology, blood response and bioaccumulation in different organs. *Appl Sci*. 2021; 11(13): 5768.
 25. Park EJ, Han JS, Park EJ, Seong E, Lee GH, Kim DW, et al. Repeated-oral dose toxicity of polyethylene microplastics and the possible implications on reproduction and development of the next generation. *Toxicol Lett*. 2020; 324: 75-85.
 26. Durieux ED, Farver TB, Fitzgerald PS, Eder KJ, Ostrach DJ. Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiol Biochem*. 2011; 37(1): 21-29.
 27. Barboza LGA, Lopes C, Oliveira P, Bessa F, Otero V, Henriques B, et al. Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Sci Total Environ*. 2020; 717: 134625.
 28. Prüst M, Meijer J, Westerink RHS. The plastic brain: neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Part Fibre Toxicol*. 2020; 17(1): 24.
 29. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973; 179(4073): 588-590.
 30. Tiwari SC, Siddiqui JS, Tuteja N, Lal N, Trivedi JK, Bahuguna LM. Serum acetylcholinesterase activity in psychiatric patients. *Indian J Psychiatry*. 1982; 24(3): 291-294.
 31. Yong CQY, Valiyaveetil S, Tang BL. Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(5): 1509.

〈저자정보〉

송영민(대학원생), 김창열(교수)