

기수산물벼룩 *Diaphanosoma celebensis*의 미세플라스틱 노출에 따른 크기 의존적 Cytochrome P450 유전자의 발현 양상

전민정 · 유제원 · 이영미*

상명대학교 융합공과대학 생명공학전공

Size-dependent Transcriptional Modulation of Genes Involved in Cytochrome P450 Family in the Brackish Water Flea *Diaphanosoma celebensis* Exposed to Polystyrene Beads

Min Jeong Jeon, Je-Won Yoo, Young-Mi Lee*

Department of Biotechnology, College of Convergence Engineering, Sangmyung University, Seoul 03016, Korea

Corresponding Author

Young-Mi Lee

Department of Biotechnology, College of Convergence Engineering, Sangmyung University, Seoul 03016, Korea
 E-mail : ymlee70@smu.ac.kr

Received : July 25, 2023

Revised : August 05, 2023

Accepted : September 13, 2023

플라스틱은 전세계적으로 사용량이 증가함에 따라 해양 환경으로 유입되는 플라스틱 쓰레기의 양도 꾸준히 증가하고 있으며, 미세플라스틱은 해양 생물에 의해 섭취되어 소화관에 축적됨에 따라 성장과 생식에 유해한 영향을 미친다. Cytochrome P450 (CYP)는 환경 오염물질을 대사하는 해독효소로 알려져 있으나 지각류에서는 그 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 기수산 물벼룩 *Diaphanosoma celebensis*에서 clan 2, 3, 4에 각각 속하는 CYP 유전자 9종(clan 2: *CYP370A4*, *CYP370C5*; clan 3: *CYP350A1*, *CYP350C5*, *CYP361A1*; clan 4: *CYP4AN-like*, *CYP4AP2*, *CYP4AP3*, *CYP4C33-like1*)의 서열에 대해 진화적으로 보존된 서열의 유사도를 분석하고 계통분석을 실시하였다. 또한 3종류의 서로 다른 크기의 polystyrene beads (0.05-, 0.5-, 6- μ m PS beads; 0.1, 1, and 10 mg/L)에 48시간 노출된 기수산 물벼룩에서 이들 9종의 CYP 유전자의 발현을 real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)로 분석하였다. 결과적으로 기수산 물벼룩 CYP 유전자는 모두 진화적으로 보존된 motif를 가지고 있으며 계통분석 결과 각각 clan 2, 3, 4에 속하는 것으로 확인되었다. 이는 기능적으로 보존되어 있음을 의미한다. CYP 유전자 중 clan 2에 속하는 *CYP370C5*와 clan 3에 속하는 *CYP360A1*, 그리고 clan 4에서는 *CYP4C122* 유전자의 발현이 0.05- μ m PS beads에 노출되었을 때 유의하게 증가하는 양상을 보였으며, 이는 이들 유전자가 PS 대사에 관여한다는 것을 의미한다. 본 연구는 미세플라스틱이 해양 무척추 동물에 미치는 생물 영향을 분자적 수준에서 이해하는데 도움이 될 것이다.

As plastic usage increases globally, the amount of plastic waste entering the marine environment is steadily rising. Microplastics, in particular, can be ingested by marine organisms and accumulated in their digestive tracts, causing harmful effects on their growth and reproduction. Cytochrome P450 (CYP) enzymes are known to metabolize various environmental pollutants as detoxification enzymes, but their role in crustaceans is not well understood. In this study, sequences of nine CYP genes (*CYP370A4*, *CYP370C5* from clan 2; *CYP350A1*, *CYP350C5*, *CYP361A1* from clan 3; *CYP4AN-like*, *CYP4AP2*, *CYP4AP3*, *CYP4C33-like1* from clan 4) were analyzed using conserved domains in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. Additionally, after exposure to three different sizes of polystyrene beads (0.05-, 0.5-, 6- μ m PS beads; 0.1, 1, and 10 mg/L) for 48 hours, the expression of these nine CYP genes were investigated using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that all CYP genes possessed conserved motifs, indicating that *D. celebensis* CYP has evolutionarily conserved functions. Among these CYP genes, the expression of *CYP370C5*, *CYP360A1*, and *CYP4C122* showed a significant increase after exposure to 0.05- μ m PS beads, suggesting their involvement in PS metabolism. This research will contribute to understanding the molecular mode of actions of microplastics on marine invertebrates.

Keywords: Cytochrome P450(시토크롬 P450), Polystyrene(폴리스티렌), Microplastic(미세플라스틱), Gene expression(유전자 발현), Water flea(물벼룩)

서론

전 세계적으로 플라스틱 사용량이 증가하면서 다양한 경로를 통해 해양 환경 내로 유입되는 플라스틱 쓰레기의 양도 꾸준히 증가하고 있다(Hale et al., 2020). 이러한 플라스틱 쓰레기는 자외선, 파도, 염분도 등과 같은 해양의 물리화학적 요인과 미생물과 같은 생물학적 요인에 의해 미세플라스틱(MP, 5 mm 이하)과 나노플라스틱(NP, 0.1 μm 이하)로 분해된다(Birch et al., 2020). 먹이와 유사한 크기로 분해된 미세플라스틱은 여과 섭식을 하는 해양 생물들에 의해 섭취될 수 있으며, 섭취된 미세플라스틱은 소화관 내 축적되어 먹이사슬을 따라 더 높은 영양 단계의 생물에게 전달될 수 있다(Nelms et al., 2018). 미세플라스틱은 난분해성 물질로서 생물체의 소화관에 축적되어 먹이섭식 장애, 에너지 대사 불균형을 유발할 뿐 아니라 지속적으로 소화관을 자극하여 염증 및 조직 손상을 유발하고 나아가 생식 독성, 산화스트레스 등 다양한 독성을 나타낸다고 보고된 바 있다(Jeong et al., 2016; Qiao et al., 2019; Sikdokur et al., 2020; Bai et al., 2021). 특히 해독 작용은 미세플라스틱 노출에 의해 조절되는 대표적인 분자 경로로 알려져 있으며, 선행 연구들은 미세플라스틱에 노출된 해양 생물에서 1상, 2상, 및 3상 해독효소들의 유전자 발현 및 효소 활성이 변화되며 해독 능력이 감소될 수 있음 보고하였다(Jeong et al., 2018; Zhang et al., 2020b; Zhang et al., 2021).

Cytochrome P450 (CYP)은 다양한 환경오염물질의 대사에 관여하는 해독효소로 지속성 유기오염물질의 생물 영향을 평가하는 분자적 마커로 활용되어 왔다(Santana et al., 2018; Snyder, 2000; Wu et al., 2019). 포유류에서 7개의 주요 CYP family 중 CYP1, 2, 3은 간에서 주로 해독을 담당하는 것으로 알려져 있으며, 나머지 그룹은 steroidogenesis에 관여한다고 알려져 있다(Nelson et al., 2004). 지각류(Cladocera)의 경우 genome 분석을 통해 4개의 CYP family (CYP2, 3, 4, and mitochondrial)로 구분되며 각 clan에 속하는 유전자 종류 및 genome 내 배열 구조에 대해 보고된 바 있으나(Baldwin et al., 2009; Lee et al., 2019; Kim et al., 2021), CYP 유전자의 기능에 대한 연구는 상대적으로 부족하다. 더욱이 최근에 미세플라스틱에 노출된 수생 생물에서 CYP 유전자 발현과 CYP 효소 활성의 변화를 보고한 바 있으나, 소형 해양 무척추 생물에서 미세플라스틱이 CYP 효소에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡한 상황이다. 따라서 미세플라스틱에 의한 해양 생물의 독성 기전을 이해하기 위하여 미세플라스틱이 해양 무척추 생물에 미치는 영향에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 한다(Shi et al., 2020; Wu et al., 2019; Zhang et al., 2019).

기수산 물벼룩(*Diaphanosoma celebensis*; Crustacea, Cladocera, Sidae)은 광염성을 나타내며 배양이 용이하고 짧은 생활사(~14 일)를 갖고 단성생식(Parthenogenesis)을 하는 종으로 다양한 오염물질에 대한 해양 생태계 위해성 평가를 위한 모델 생물 종으로 활용되어 왔다(Bae et al., 2018; In et al., 2019; Yoo et al., 2021a;

Cho et al., 2022). 또한 1차 소비자로서 치어의 먹이 생물이 이용되기 때문에 체내 축적이 쉬운 오염물질을 먹이사슬을 통해 상위 단계로 전달할 수 있다는 측면에서 해양 생태계 내에서 중요한 위치를 담당하고 있다. 선행 연구를 통해 기수산 물벼룩이 미세플라스틱을 섭취할 수 있으며, 미세플라스틱이 기수산 물벼룩의 항산화 시스템, 생식 및 에너지 대사 등에 영향을 미칠 수 있음을 보고한 바 있어, 미세플라스틱이 생태 위해성 평가를 위한 모델 생물로서 장점을 가진다(Cho et al., 2022; Yoo et al., 2021b, 2022; Jeon et al., 2023).

선행 연구에 따르면 플라스틱의 독성은 크기에 의해 결정될 수 있으며, 크기가 작을수록 소화관 내에 오래 남아있으며, 세포막을 통과하여 체내로 흡수가 가능함에 따라 생물에 미치는 독성 영향이 더 크게 나타나는 것으로 알려져 있다(Jeong et al., 2016; Yoo et al., 2021b). 따라서 본 연구에서는 크기 별 미세플라스틱의 노출이 소형 해양 무척추 생물의 해독 작용에 미치는 영향을 확인하고자 하였으며, 이를 위해 기수산 물벼룩의 clan 2, 3, 4에 속하는 9개 cytochrome P450 (CYP) 유전자 서열의 특성을 분석하고, 서로 다른 크기의 미세플라스틱(polystyrene beads, PS beads)에 48시간 노출된 기수산 물벼룩에서 CYP 유전자 발현의 변화를 확인하고자 한다. 본 연구는 해양 동물성 플랑크톤에 대한 미세플라스틱의 분자적 수준에서의 생물 영향 기전을 이해하는데 도움이 될 것이다.

재료 및 방법

1. 시험생물

기수산 물벼룩(*D. celebensis*)의 배양은 인공 해수염(Instant Ocean, Aquarium system, France)을 이용하여 15 practical salinity unit (psu)의 염도의 인공해수를 제조하여 배양수로 사용하였다. 생물 배양기에서 수온 25°C, 광주기 12 h:12 h (light:dark)를 유지하여 배양하였고, 먹이원으로 해양 녹조류 *Tetraselmis suecica* (1.0~2.0 $\times 10^7$ cells/L)를 매일 공급하였다.

2. 시험물질

세 종류의 크기별 PS beads (0.05, 0.5 및 6 μm -직경)는 Polyscience (Warrington, PA, USA)에서 구매하여 실험에 사용하였다. 플라스틱의 크기와 형태는 주사 전자 현미경(scanning electron microscope, SEM; Apreo S Hivac, PEI, USA; JSM-5600LV, Tokyo, Japan)과 입도분석기(zeta-potential & particle size analyzer, ELSZ-1000, Osaka, Japan)를 통해 확인하였다(Yoo et al., 2021b).

3. 노출시험

노출 그룹 당 200마리의 기수산 물벼룩이 사용되었으며, 0.1, 1 및 10 mg/L 농도의 PS beads (0.05-, 0.5- 및 6- μ m 직경)에 48시간 노출되었다. 노출 농도는 급성독성시험 결과를 토대로 아치사 농도를 결정하여 사용하였다(Yoo et al., 2021b). 해수 내 PS bead의 분산을 위해 tween 20을 사용하였고, 최종 농도 0.0001% (v/v)가 되도록 첨가하였으며, 고른 분산을 위해 노출 전 sonication (20 kHz, 90% amp, 10 min)을 진행하였다.

4. 유전자 서열 분석

기수산 물벼룩의 CYP 유전자 9종(clan 2: *CYP370A4*, *CYP370C5*; clan 3: *CYP350A1*, *CYP361A1*, *CYP350C5*; clan 4: *CYP4AN-like*, *CYP4AP2*, *CYP4AP3*, *CYP4C33-like1*)의 서열 정보는 기수산 물벼룩 transcriptome database(상명대학교 분자독성학 연구실)에서 가져

와 NCBI의 BlastX searching을 통해 확인하였다. Conserved domain은 NCBI Conserved Domain Search를 통해 확인하였고 Tian et al. (2021)와 Han et al. (2019)의 논문을 참고하였다. Phylogenetic tree는 conserved domain의 아미노산 서열을 이용하여 Mega ver. 11을 이용하여 clustalW로 alignment한 후 neighbor-joining method (bootstrap value = 10,000)로 분석하여 얻었다.

5. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

PS beads에 48시간 노출 후 기수산 물벼룩은 1.5 mL microtube로 옮겨 500 μ L의 TRIzol 용액(Thermo Fisher Scientific Inc., USA)을 이용해 균질화 하였고, 이후 제조사의 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. Total RNA의 순도 및 농도는 NanoDrop (MaestroNano Pro, NaestroGen Inc., Taiwan)과 agarose gel electrophoresis를 통해 확인하였다. cDNA는 500 ng의 RNA로부터 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo Co., Osaka, Japan)를 사용하여 합성하였다.

Table 1. Primer set used in this study

CYP classification	Gene (GenBank accession No.)	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)
Clan 2	<i>CYP370A4</i> (MT799303.1)	F: GCAGGAAGAATTGGATGTCG R: CAGAACCGCCTCAGTGAC	85
	<i>CYP370C5</i> (MT799311.1)	F: GGAGCACTTCCTGGATGAC R: CCCAGACAAGATCGTTTCC	84
Clan 3	<i>CYP360A1</i> (MT799278.1)	F: CAACTGCTACGACACTGACC R: CTCACATCGCCATACTGCTC	112
	<i>CYP360A5</i> (MT799282.1)	F: GTCACCGTGCCGATTATG R: GAAGCCGAAAGACAAGAAGC	132
	<i>CYP361A1</i> (MT799289.1)	F: GATCGGGCAGTATCACATC R: CGAAGTGAAAGGTTTCAGG	98
Clan 4	<i>CYP4AN-like</i> (MT799250.1)	F: CGGTGCCCAACATCAAACG R: CTCCAGCGGGTCGGTAAAC	134
	<i>CYP4AP2</i> (MT799252.1)	F: CGCAAGTCTATGCCAATCC R: GCACTAAAGGGTATGTACGC	97
	<i>CYP4AP3</i> (MT799253.1)	F: CCCGAGTTGAAGTATCTGG R: CCCAGTTGAACCTTGTTC	102
	<i>CYP4C33-like1</i> (MT799267.1)	F: GATCCTGACCGTTTCCTAGC R: CGACATGGAATCGGCGTAG	154
	<i>Dc_EF-1b</i> (MH636295)	F: CGGCTGTGTCGT TGAAGA R: GGCAATGTCCAC ACTCTG	93

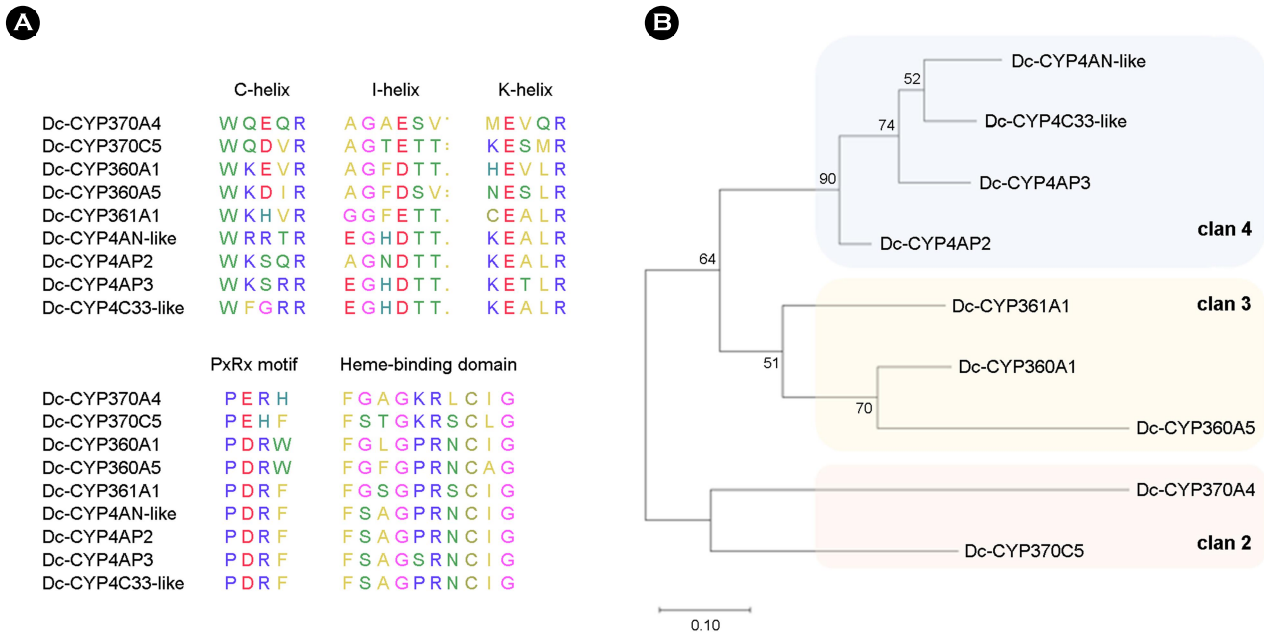


Fig. 1. (A) Conserved domains identified in the nine cytochrome P450 from *Diaphanosoma celebensis*. (B) Phylogenetic relationship of nine cytochrome P450s belonging to clan 2, 3, and 4 from *Diaphanosoma celebensis*. The Neighbor-joining tree was constructed using Mega ver. 11.

6. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

유전자 발현은 SYBR Master Mix (KAPA Bioassay System, USA)를 사용하여 CFX Connect Thermal Cycler (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)에서 분석하였다. 유전자 증폭에 사용한 primer 정보는 Table 1에 나타났다. qRT-PCR의 반응은 95°C에서 15초 변성 후, 95°C에서 10분과 60°C에서 1분씩 총 30 cycle을 진행하였고, 샘플 당 3회 반복하여 진행되었다. 타겟 유전자의 상대적 발현은 housekeeping 유전자인 *EF-1b*를 이용하여 보정하였으며, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001)에 의해 계산되었다.

7. 통계분석

해독효소 CYP 유전자의 발현은 SigmaPlot version 12.0 소프트웨어(Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 평균(mean) ± 표준편차 (standard deviation, SD)로 표시하였다. 그룹 간 통계적 유의성은 SPSS version 23.0 소프트웨어를 이용하여(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) one-way analysis of variance (one-way ANOVA)로 비교하였다. 통계분석에서 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

결과 및 고찰

1. CYP 유전자 서열의 특성 분석

기수산 물벼룩 transcriptome database에서 clan 2, 3, 4에 속하는 총 24개의 CYP 유전자를 확인하여 예비실험을 통해 미세플라스틱 노출에 반응을 보이는 유전자 총 9개를 선별하였다(data not shown). 해당 유전자는 BlastX를 통해 동정하였고, Kim 등 (2021)에 의해 보고된 바에 따라 각각 clan 2 (CYP370A4, CYP370C5), clan 3 (CYP360A1, CYP360A5, CYP361A1), clan 4 (CYP4AN-like, CYP4AP2, CYP4AP3, CYP4C33-like1)에 속하는 것으로 확인되었다.

CYP 단백질은 원핵 생물과 진핵 생물 모두에서 잘 보존되어 있으며 내부 유래 뿐 아니라 외부에서 기인한 화합물의 생체 내 변화(biotransformation)에 관여하는 Phase I에 해당하는 해독효소이다. 따라서 생물마다 많은 종류의 CYP 효소를 가지고 있는데 최근 Kim 등 (2021)이 genome 분석을 실시한 결과 *D. celebensis*에서 70개의 CYP 유전자를 보고한 바 있다. 본 연구에서는 CYP clan 2-4에 속하는 유전자 총 9개에 대해 conserved domain search를 진행한 결과 진화적으로 잘 보존된 서열을 가지고 있는데 N-terminal을 기준으로 C-helix (WxxR), K-helix (ExxR), I-helix (xGxD/ET), PxRx motif (PxRx), 그리고 heme-binding domain (FxxGxRxCxG) 등 순서대로 배열되어 있었다(Fig. 1A). CYP는 hemeprotein으로 중심에 Fe^{2+} 를 가지고 있어 산소나 일산화 탄소를 Fe에 결합시킴으로

써 기질을 산화시키는 monooxygenase의 종류 중 하나이다. 따라서 heme-binding domain은 NADPH 의존적인 전자전달에 관여하는 부위로 다른 domain보다 CYP 유전자 간에 높은 유사도를 보이며 요각류(Han et al., 2015; Han et al., 2017), Pacific oyster (Tian et al., 2021), 지각류(Wu et al., 2019) 등 다양한 해양 무척추 동물에서 보고되고 있다. 특히 FxxGxRxCxG 중 마지막 세 개의 잔기에 해당하는 CxG 양상 중 가장 빈번하게 나타나는 형태는 ClG, CLG, 그리고 CPG로 보고된 바 있는데, 기수산 물벼룩에서도 ClG와 CLG가 주로 확인되었다. 이들 마지막 세 잔기 중 가운데 잔기의 변화가 CYP 기능에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 잘 알려진 바 없지만 이러한 차이가 CYP의 구조, 활성, 그리고 기질 특이성을 결정하는데 중요한 역할을 담당할 것으로 추정하고 있다 (Syed and Mashale, 2014). 또 다른 domain인 PxRx motif와 K-helix domain은 각각 heme pocket의 구조 형성과 CYPs의 구조의 안정화에 중요한 역할을 한다(Cordova et al., 2017). I-helix domain은 산소가 결합하는 영역으로 알려져 있으며 보존된 threonine (T) 잔기가 산소 활성화에 기여하는 것으로 보고된 바 있다(Chen et al., 2014; Tian et al., 2021). 기수산 물벼룩의 CYP 유전자에서 잘 보존된 서열의 존재는 진화적으로 보존된 CYP 효소의 기능을 나타낼 것이라 판단할 수 있다.

이들 보존된 서열 간의 identity를 비교한 결과 clan 4에 속하는 유전자들 사이의 유사도가 80~86%로 가장 높았으며, clan 3 (60~73%), clan 2 (53%) 순으로 나타났으며 clan 간의 유사도는 46~70% 정도로 나타났었다(data not shown). 보존된 서열 간에 계통 분석을 실시한 결과 각 clan에 속하는 종류별로 cluster를 형성하는 것으로 나타났었다(Fig. 1B). 이는 Han과 Lee (2021)이 보고한 기수산 물벼룩 CYP 전체 유전자 서열을 비교한 계통분석의 결과와 동일하였다. 전체 서열 간의 유사도가 clan 간에 15~21%로 상당히 낮음에도 불구하고 계통분석의 결과가 동일한 양상을 보이는 것은 conserved domain의 높은 유사도 때문인 것으로 보인다.

2. 미세플라스틱 노출에 따른 CYP 유전자 발현의 변화

이전의 많은 연구를 통해 척추 동물에서는 CYP1에 속하는 효소가 해독 기능에 관여한다고 알려져 있으나 탈피 동물에서는 CYP clan 2, 3, 그리고 4가 외부 유래 오염물질의 대사에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Snyder, 2000). 그러나 미세플라스틱이 환경 내 emerging pollutants로 알려져 있음에도 불구하고 CYP 유전자에 대한 영향은 수서 생물에서 잘 알려져 있지 않다(Table 2).

Table 2. Previous studies on the effects of microplastics upon cytochrome P450 family gene in aquatic organisms

Plastic	Size	Concentration	Duration	Species	CYP P450 activity / gene expression	References
Polystyrene	75 nm	0.1 mg/L	21 days	<i>Daphnia pulex</i>	<i>CYP370B</i> (+), <i>CYP4C3A</i> (+)	Wu et al. (2019)
		0.5 mg/L			<i>CYP370B</i> (+), <i>CYP4C3X</i> (+), <i>CYP4C3A</i> (+), <i>CYP4AN1</i> (+)	
		1 mg/L			<i>CYP4AN1</i> (-)	
		2 mg/L			<i>CYP4C3X</i> (+)	
Polystyrene	500 nm 30 µm	0.29 mg/L	14 days	<i>Tegillarca granosa</i>	<i>CYP1A1</i> (-)	Shi et al. (2020)
		0.29 mg/L			<i>CYP1A1</i> (-)	
Polystyrene	500 nm	0.26 mg/L	28 days	<i>Tegillarca granosa</i>	<i>CYP1A2</i> (-), <i>CYP1U1</i> (+)	Zhou et al. (2020)
Polyethylene	45~250 µm	110 particles/L	96 h	<i>Danio rerio</i>	<i>CYP1A</i> (+)	Mak et al. (2019)
Aminated polystyrene	1 µm	20 µg/L	7 days	<i>Oryzias melastigma</i>	<i>CYP1A</i> (-)	Zhang et al. (2021)
Polyethylene	> 90 µm	0.1 µg/L	20 days	<i>Danio rerio</i>	<i>CYP2p8</i> (+)	Limonta et al. (2021)
Polyethylene terephthalate	> 150 µm	5 mg/L	96 h	<i>Danio rerio</i>	<i>CYP1A</i> (-)	Hanachi et al. (2021)
		10 mg/L			<i>CYP1A</i> (-)	
Polyvinyl chloride	2 µm	2.05 mg/L	4, 7, 14, & 21 days	<i>Daphnia magna</i>	<i>CYP31A</i> (+), <i>CYP360A8</i> (+)	Liu et al. (2022)

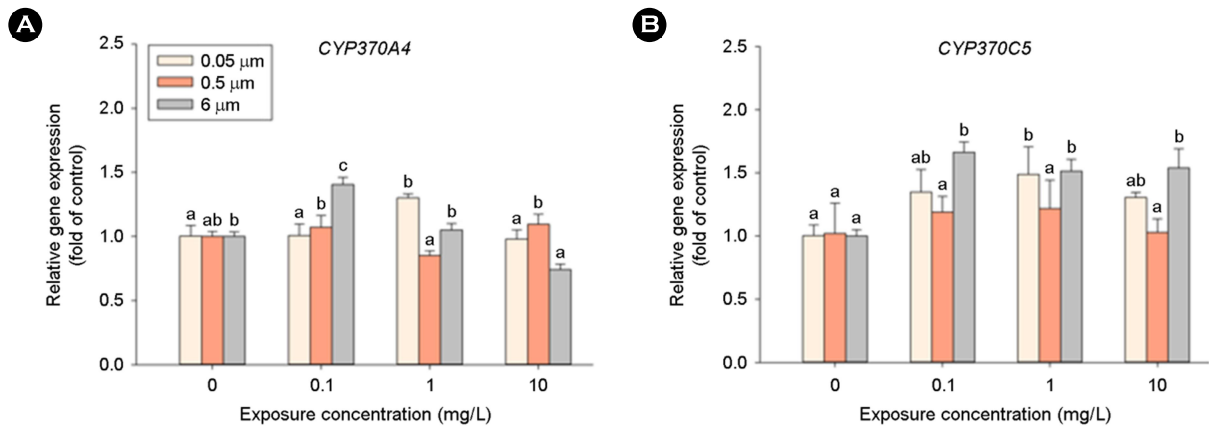


Fig. 2. Relative gene expression of (A) *CYP370A4* and (B) *CYP370C5* belonging to cytochrome P450 clan 2 in *Diaphanosoma celebensis* exposed to different sized PS (0.05-, 0.5-, and 6- μ m) for 48 h. Different letter on the bar indicates significant difference between exposure concentration using one-way ANOVA ($p < 0.05$).

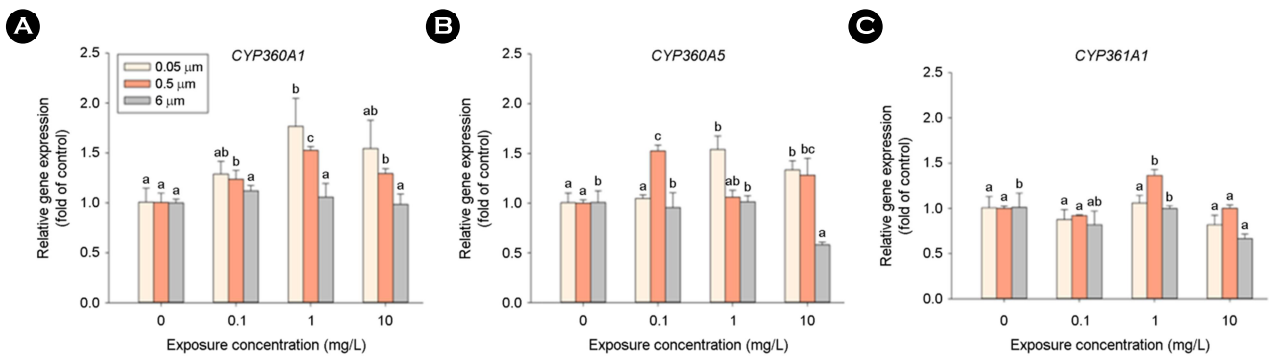


Fig. 3. Relative gene expression of (A) *CYP360A1*, (B) *CYP360A5*, and (C) *CYP361A1* belonging to cytochrome P450 clan 3 in *Diaphanosoma celebensis* exposed to different sized PS (0.05-, 0.5-, and 6- μ m) for 48 h. Different letter on the bar indicates significant difference between exposure concentration using one-way ANOVA ($p < 0.05$).

본 연구에서는 기수산 물벼룩에 서로 다른 크기의 PS beads를 농도별로 48시간 노출한 후 9개의 CYP 유전자의 발현 변화를 측정하였다. Clan 2에 속하는 유전자 *CYP370A4*는 0.1 mg/L의 0.05- μ m와 1 mg/L의 6- μ m에 노출된 그룹에서 유의하게 증가하는 양상을 보였으며(Fig. 2A), *CYP370C5*는 0.05-와 6- μ m에 노출된 그룹의 모든 농도에서 유의하게 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2B). 또한 clan 3에 속하는 *CYP360A1*, *CYP360A5*, 그리고 *CYP361A1* 유전자의 발현을 분석한 결과 *CYP360A1* 유전자의 발현이 1과 10 mg/L의 0.05-와 0.5- μ m PS에 노출한 그룹에서 농도 의존적으로 유의하게 증가하는 양상을 보였다(Fig. 3A). *CYP360A5*의 경우 1과 10 mg/L의 0.05- μ m에 노출했을 때 유전자 발현이 유의하게 증가하였고, 0.1 mg/L의 0.5- μ m PS에서도 증가했으나 농도 의존적 양상을 보이지는 않았다(Fig. 3B). 한편 *CYP361A1* 유전자의 발현은 1 mg/L의 0.5- μ m PS에 노출했을 때 유의하게 증가했으나 역시 농도 의

존적인 양상을 보이지는 않았다(Fig. 3C). CYP family는 다양한 오염물질에 대한 해독 과정에 관여하는 1상 해독효소로서 다양한 유기오염물질 노출된 생물에서 이들의 해독 과정을 조절한다는 것이 요약류(PAHs, Han et al., 2017), 윤충류(WAF, Won et al., 2016), 그리고 *Daphnia* (Paraquat, Religia et al., 2021) 등에서 알려져 있다. 선행 연구들에 따르면, clan 2에 속하는 *Daphnia magna*의 *CYP370A13* 유전자는 acetaminophen 노출에 농도 의존적으로 증가되는 양상을 보여 해독에 중요한 기능을 하는 것으로 보고하였다(Kim et al., 2018). 본 연구의 결과와 유사하게 포유류를 이용한 선행 연구에서 styrene monomer에 노출된 쥐 *Rattus norvegicus*에서 clan 2에 속하는 *CYP2B1*의 유전자 발현 및 단백질 합성이 유의하게 증가하는 것을 보고하였으며(Hirasawa et al., 2005), PS NP에 노출된 *Daphnia pulex*의 *CYP370B* 유전자의 발현도 낮은 농도에서 유의하게 증가하는 양상을 보였다(Wu et al.,

2019). 또한 Liu 등 (2022)은 2 μm polyvinyl chloride (PVC) MP에 노출된 *D. magna*에서 clan 3 및 clan MT에 속하는 *CYP360A8* 및 *CYP314* 유전자의 발현이 증가됨을 보고하였으며, 증가된 이들 유전자의 발현이 MP의 해독 과정에 중요한 역할을 할 수 있을 것이라 주장하였다.

이러한 선행 연구들의 결과를 미루어 볼 때 본 연구의 결과에서 증가된 clan 2 및 clan 3의 *CYP* 유전자 발현이 PS 대사에 이들 유전자가 중요한 기능을 가질 수 있음을 의미한다. 특히 기수산 물벼룩에서 *CYP370C5*는 유전자 중복이 많이 관찰되어 물질의 해독 과정에서 중요한 역할을 담당할 것으로 추정되고 있으며 (Kim et al., 2021), 이는 증가된 *CYP* 유전자의 발현이 PS 대사에 중요한 기능을 가진다는 해석을 뒷받침한다. 그럼에도 불구하고 증가한 *CYP* 유전자의 발현이 PS 대사와 직접적으로 관련되어 있는지를 확인하기 위해서 체내 PS 대사물질의 분석 등 추가적인 연구가 필요하다.

한편 *CYP370* family는 곤충에서 전구물질인 methyl farnesoate (MF)로부터 juvenile hormone을 합성하는 경로에 관여하는 *CYP15*

와 가까운 유연관계를 나타내는 것 보고된 바 있다(Helvig et al., 2004). 지각류에서 MF는 수컷의 성 결정에 중요한 역할을 함으로써 단성생식 능력과 관련이 있다고 알려져 있다(Rider et al., 2005). 그러나 MF가 juvenile hormone 경로의 최종 산물로서 알려져 있기 때문에 지각류의 steroidogenesis 경로에서 *CYP370A* subfamily의 역할은 추가적인 연구가 필요하다(Baldwin et al., 2009).

특히 Kim 등 (2021)은 *CYP370C* subfamily가 지각류 중 기수산 물벼룩에서만 발견된 것과 관련하여 이들 유전자군이 다른 물벼룩 류와 달리 완전 단성생식만 하는 기수산 물벼룩의 생식 방법과 깊은 관련이 있을 것으로 제시한 바 있다. 본 연구진의 기존 연구에 따르면 PS에 노출된 기수산 물벼룩에서 탈피호소 경로와 juvenile hormone 경로의 유전자의 발현 변화와 함께 생식지표의 변화를 보고한 바 있다(Cho et al., 2022). 따라서 본 연구에서 PS 노출에 따른 *CYP370C* 유전자 발현의 변화는 이러한 생식독성과도 관련이 있을 가능성이 있다.

Clan 4에 속하는 *CYP* 유전자들은 주로 내부 유래 지방산이나 steroids의 대사에 관여하며 외부 유래 물질의 해독 뿐 아니라 염

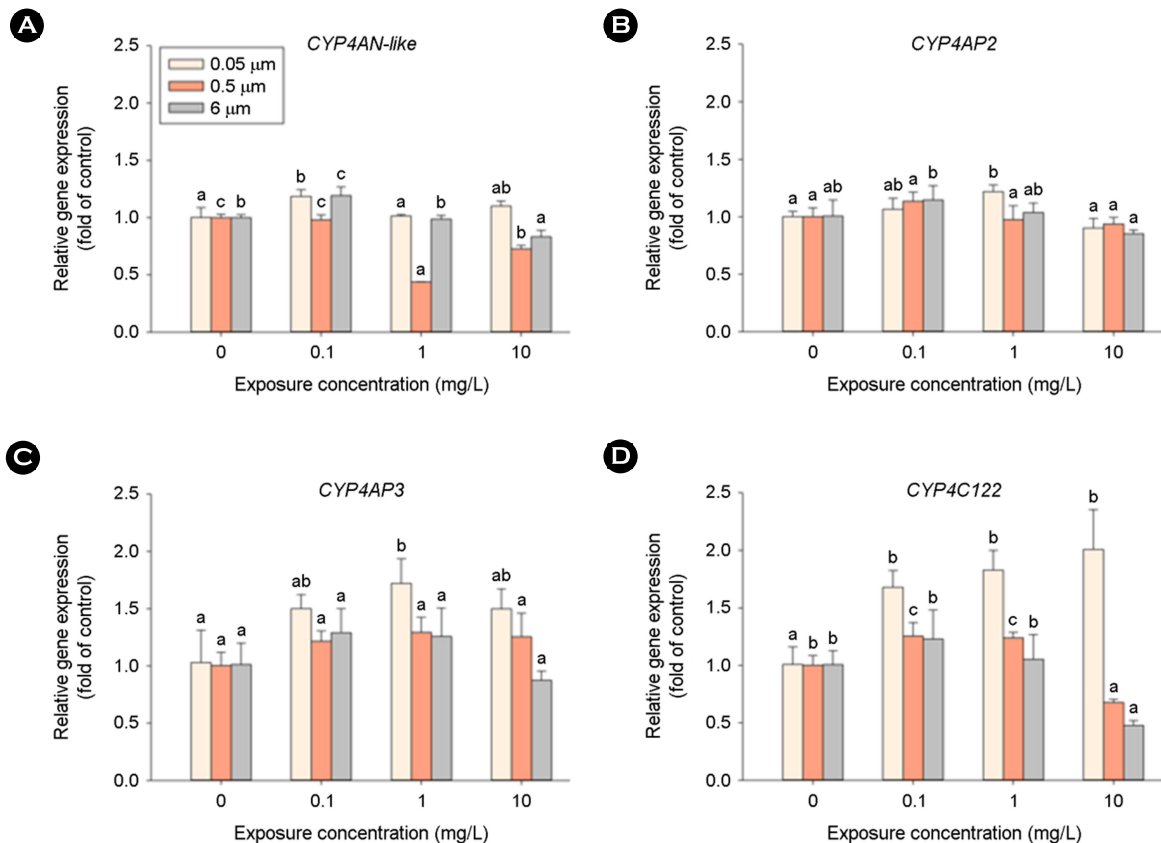


Fig. 4. Relative gene expression of (A) *CYP4AN-like*, (B) *CYP4AP2*, (C) *CYP4AP3* and (D) *CYP4C122* belonging to cytochrome P450 clan 4 in *Diaphanosoma celebensis* exposed to different sized PS (0.05-, 0.5-, and 6- μm) for 48 h. Different letters on the bar indicates significant difference between exposure concentration using one-way ANOVA ($p < 0.05$).

증반응, 호르몬 합성 및 에너지 대사 등 체내에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Snyder, 1998; Hardwick, 2008). 특히 이들 그룹에 속하는 CYP 유전자는 무척추 동물에서 벤조피렌, 비스페놀, 트리부틸주석 등과 같은 오염물질의 대사에서 중요한 역할을 하며(Martínez-Paz et al., 2012; Li et al., 2019), 척추 동물의 CYP1A와 같은 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Chen et al., 2012). 본 연구에서는 cln 4에 속하는 4개의 유전자를 분석한 결과 0.05- μm PS에 노출 시 *CYPAC122*와 *CYP4AP3* 유전자의 발현이 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보였으나 다른 2개의 유전자에서는 특별한 양상을 나타내지 않았다(Fig. 4). *Daphnia pulex*에 PS NP를 21일간 노출 후 4종의 *CYP370B*, *CYP4AN1*, *CYP4C33*, *CYP4C34* 유전자의 발현이 증가되었다(Wu et al., 2019). 이들의 연구에서 CYP4에 속하는 효소가 NP 노출에 대해 낮은 농도에서 증가하는 반면, 높은 농도에서는 감소하는 경향을 보인 것처럼, 본 연구의 결과에서도 0.05- μm 와 0.5- μm PS 노출 시 CYP4 family에 속하는 유전자들의 발현 패턴이 유사하게 나타났다. Wu 등 (2019)은 높은 농도에서 *CYP370A*와 *CYP4* superfamily에 속하는 유전자 발현의 감소가 NP에 의한 독성 효과의 결과라고 제시하였다.

한편 미세플라스틱에 노출된 생물에서 나타나는 CYP 효소 활성의 다양한 변화는 미세플라스틱의 해독에 중요한 CYP의 역할을 뿐만 아니라 MP로부터 유도된 산화스트레스의 또는 에너지 대사의 장애의 결과일 수 있다. 윤충류와 기수산 물벼룩에서 이미 보고된 바와 같이 PS beads는 활성산소를 유도할 수 있으며(Jeong et al., 2016; Yoo et al., 2021b), 제거되지 않은 활성산소는 지질 산화를 유도하고(Yoo et al., 2021b), 세포 내 효소를 공격하여 기능을 상실하게 할 수 있어 항산화 효소의 활성이 저하될 수 있고, 지질 산화로 인해 리소좀의 막이나 CYP가 결합되어 있는 소포체를 손상시켜 CYP 활성을 변화시킬 수 있다(Ding et al., 2018; Yoo et al., 2021b). 한편 곤충에서 MP와 달리 NP는 소포체 부근까지 침투할 수 있어서 CYP 효소의 기능을 억제할 수 있다는 것이 보고된 바 있다(Fröhlich et al., 2010). 기수산 물벼룩에서도 0.05- μm NP에 노출 시 0.5- 및 6- μm MP가 장관에만 머물러 있던 것과 달리 몸 전체에 퍼지는 양상을 통해 NP의 세포 투과성을 보고하였으며(Yoo et al., 2021b), 이는 *D. magna*와 요각류 *Paracyclops nana*에서도 제시된 바 있다(Cui et al., 2017; Jeong et al., 2017). 미세플라스틱 노출에 의해 CYP 활성이 억제되면 자유 라디칼 중간 산물을 생산하게 되고 이는 미토콘드리아를 통한 산화적 스트레스를 유발함으로써 세포독성을 유발할 수 있게 된다(Anbumani and Kakkar, 2018).

또한 미세플라스틱의 독성 기전과 관련하여 생화학적 변화 이외에 물리적으로 장내 미세플라스틱의 축적으로 막 손상을 유발하면서 먹이 섭취를 방해함으로써 에너지 대사에 영향을 미칠 수 있음을 보고한 바 있다(Anbumani and Kakkar, 2018; Zhang et al., 2023). 본 연구진의 기존 연구에 따르면 기수산 물벼룩에 PS를 노출했을 때 에너지 대사에 영향을 미치며(Jeon et al., 2023), 대사체

분석 결과 대사 경로에도 경로 특이적으로 영향을 나타냈다(Yoo et al., 2022). 이와 관련하여 Zhang 등 (2020a)은 이러한 대사 상의 항상성의 변화가 대사관련 유전자의 발현을 억제할 수 있다고 제시한 바 있으며, 본 연구에서 PS NMP 노출 후 지방산과 steroid 호르몬 합성과 관련된 cln 4의 CYP 유전자의 발현 변화는 PS NMP 노출로 인해 유도된 기수산 물벼룩의 에너지 대사 장애의 결과일 수 있다. 그러나 Table 2에서 보는 바와 같이 미세플라스틱 노출에 따른 CYP 효소 활성 및 유전자 발현 변화와 관련하여 플라스틱의 노출 시간 및 생물에 따라 서로 다른 결과를 나타내고 있다. 이는 다양한 플라스틱에 대해 보다 다양한 생물에서의 CYP 효소의 기능에 대한 연구가 필요하다는 것을 보여주는 결과이다.

결론적으로 본 연구에서는 기수산 물벼룩의 CYP 유전자가 진화적으로 잘 보존되어 있으며 PS beads의 노출에 대해 서로 다른 발현 양상을 나타냄에 따라 플라스틱 대사에 관여한다는 것을 확인하였다. 특히 *CYP370C5*, *CYP360A1*, 그리고 *CYPAC122* 유전자가 플라스틱 노출에 민감하게 반응하는 것으로 나타나 PS 대사에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보이나 해독, 에너지 대사, 생식 등과 관련된 CYP 유전자들의 다양한 생리화학적 기능을 고려할 때, 이들 유전자의 기능에 대해서는 추가 연구가 필요하다. 본 연구는 미세플라스틱이 해양 무척추 동물에 미치는 생물 영향을 분자 수준에서 이해하는데 도움이 될 것이다.

참고문헌

- Anbumani S, Kakkar P. 2018. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environ Sci Pollut Res* 25: 14373-14396.
- Bae C, Kim RO, Kim JS, et al. 2018. Acute Toxicity and Modulation of an Antioxidant Defence System in the Brackish Water Flea *Diaphanosoma celebensis* Exposed to Cadmium and Copper. *Toxicol Environ Health Sci* 10: 186-193.
- Bai Z, Wang N, Wang M. 2021. Effects of microplastics on marine copepods. *Ecotoxicol Environ Saf* 217: 112243.
- Baldwin WS, Marko PB, Nelson DR. 2009. The cytochrome P450 (CYP) gene superfamily in *Daphnia pulex*. *BMC Genomics* 10: 169.
- Birch QT, Potter PM, Pinto PX, et al. 2020. Sources, transport, measurement and impact of nano and microplastics in urban watersheds. *Rev Environ Sci Biotechnol* 19: 275-336.
- Chen H, Wu B, Nelson DR, Wu K, Liu C. 2014. Computational Identification and Systematic Classification of Novel Cytochrome P450 Genes in *Salvia miltiorrhiza*. *PLoS ONE* 9: e115149.
- Chen X, Zhou Y, Yang D, Zhao H, Wang L, Yuan X. 2012. CYP4

- mRNA expression in marine polychaete *Perinereis aibuhitensis* in response to petroleum hydrocarbon and deltamethrin. *Mar Pollut Bull* 64: 1782-1788.
- Cho H, Jeong CB, Lee YM. 2022. Modulation of ecdysteroid and juvenile hormone signaling pathways by bisphenol analogues and polystyrene beads in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol* 262: 109462.
- Cordova P, Gonzalez AM, Nelson DR, Gutierrez MS, Baeza M, Cifuentes V, Alcaino J. 2017. Characterization of the cytochrome P450 monooxygenase genes (P450ome) from the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Genomics* 18: 540.
- Cui R, Kim SW, An Y-J. 2017. Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean *Daphnia galeata*. *Sci Rep* 7: 12095.
- Ding J, Zhang S, Razanajatovo RM, Zou H, Zhu W. 2018. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ Pollut* 238: 1-9.
- Fröhlich E, Kueznik T, Samberger C, Roblegg E, Wrighton C, Pieber TR. 2010. Size-dependent effects of nanoparticles on the activity of cytochrome P450 isoenzymes. *Toxicol Appl Pharmacol* 242: 326-332.
- Hale RC, Seeley ME, La Guardia MJ, Mai L, Zeng EY. 2020. A Global Perspective on Microplastics. *J Geophys Res Oceans* 125: e2018JC014719.
- Han J, Kim DH, Kim, H-S, Nelson DR, Lee J-S. 2017. Genome-wide identification of 52 cytochrome P450 (CYP) genes in the copepod *Tigriopus japonicus* and their B[α]P-induced expression patterns. *Comp Biochem Physiol Part D: Genomics Proteomics* 23: 49-57.
- Han J, Lee KW. 2021. Identification and response of cytochrome P450 genes in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis* after exposure to benzo[α]pyrene and heavy metals. *Mol Biol Rep* 48: 657-664.
- Han J, Won EJ, Kim HS, Nelson DR, Lee SJ, Park HG, Lee JS. 2015. Identification of the Full 46 Cytochrome P450 (CYP) Complement and Modulation of CYP Expression in Response to Water-Accommodated Fractions of Crude Oil in the Cyclopoid Copepod *Paracyclopsina nana*. *Environ Sci Technol* 49: 6982-6992.
- Han J, Park JC, Hagiwara A, Park HG, Lee JS. 2019. Identification of the full 26 cytochrome P450 (CYP) genes and analysis of their expression in response to benzo[α]pyrene in the marine rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Comp Biochem Physiol Part D: Genomics Proteomics* 29: 185-192.
- Hanachi P, Kazemi S, Zivary S, Karbalaie S, Ghadami SA. 2021. The effect of polyethylene terephthalate and abamectin on oxidative damages and expression of *vtg* and *cyp1a* genes in juvenile zebrafish. *Environ Nanotechnol Monit Manag* 16: 100565.
- Hardwick JP. 2008. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochem Pharmacol* 75: 2263-2275.
- Helvig C, Koener JF, Unnithan GC, Feyereisen R. 2004. CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4024-4029.
- Hirasawa F, Kawagoe M, Arany S, Koizumi Y, Ueno Y, Sugiyama T. 2005. Styrene monomer primarily induces CYP2B1 mRNA in rat liver. *Xenobiotica* 35: 1089-1099.
- In S, Yoon HW, Yoo JW, Cho H, Kim RO, Lee YM. 2019. Acute toxicity of bisphenol A and its structural analogues and transcriptional modulation of the ecdysone-mediated pathway in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 179: 310-317.
- Jeon MJ, Yoo JW, Lee KW, Won EJ, Lee YM. 2023. Microplastics disrupt energy metabolism in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicology & Pharmacology* 271: 109680.
- Jeong CB, Kang HM, Lee MC, Kim DH, Han J, Hwang DS, Souissi S, Lee SJ, Shin KH, Park HG, Lee JS. 2017. Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopsina nana*. *Sci Rep* 7: 41323.
- Jeong CB, Kang HM, Lee YH, Kim MS, Lee JS, Seo JS, Wang M, Lee JS. 2018. Nanoplastic Ingestion Enhances Toxicity of Persistent Organic Pollutants (POPs) in the Monogonont Rotifer *Brachionus koreanus* via Multixenobiotic Resistance (MXR) Disruption. *Environ Sci Technol* 52: 11411-11418.
- Jeong CB, Won EJ, Kang HM, Lee MC, Hwang DS, Hwang UK, Zhou B, Souissi S, Lee SJ, Lee JS. 2016. Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p-JNK and p-p38 Activation in the Monogonont Rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environ Sci Technol* 50: 8849-8857.
- Kim DH, Choi BS, Kang HM, Park JC, Kim MS, Hagiwara A, Lee JS. 2021. The genome of the marine water flea *Diaphanosoma celebensis*. Identification of phase I, II, and III detoxification

- genes and potential applications in marine molecular ecotoxicology. *Comp Biochem Physiol Part D: Genomics Proteomics* 37: 100787.
- Kim RO, Jo MA, Song J, Kim IC, Yoon S, Kim WK. 2018. Novel approach for evaluating pharmaceuticals toxicity using *Daphnia* model: analysis of the mode of cytochrome P450-generated metabolite action after acetaminophen exposure. *Aquat Toxicol* 196: 35-42.
- Lee BY, Choi BS, Kim MS, Park JC, Jeong CB, Han J, Lee JS. 2019. The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*. A potential use for freshwater molecular ecotoxicology. *Aquat Toxicol* 210: 69-84.
- Li W, Zhao H, Ba F, Li S, Sun X, Yang D, Zhou Y. 2019. mRNA expression of CYP4 in marine polychaete *Marphysa sanguinea* in response to benzo[α]pyrene. *Acta Oceanol Sin* 38: 46-53
- Limonta G, Mancina A, Abelli L, Fossi MC, Caliani I, Panti C. 2021. Effects of microplastics on head kidney gene expression and enzymatic biomarkers in adult zebrafish. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicology & Pharmacology* 245: 109037.
- Liu Y, Zhang J, Zhao H, Cai J, Sultan Y, Fang H, Zhang B, Ma J. 2022. Effects of polyvinyl chloride microplastics on reproduction, oxidative stress and reproduction and detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicology & Pharmacology* 254: 109269.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25: 402-408.
- Mak CW, Yeung KCF, Chan KM. 2019. Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish. *Ecotoxicol Environ Saf* 182: 109442.
- Martínez-Paz P, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2012. Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicology & Pharmacology* 155: 333-343.
- Nelms SE, Galloway TS, Godley BJ, Jarvis DS, Lindeque PK. 2018. Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environ Pollut* 238: 999-1007.
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. 2004. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 14: 1-18.
- Qiao R, Sheng C, Lu Y, Zhang Y, Ren H, Lemos B. 2019. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Sci Total Environ* 662: 246-253.
- Religia P, Nguyen ND, Nong QD, Matsuura T, Kato Y, Watanabe H. 2021. Mutation of the Cytochrome P450 CYP360A8 Gene Increases Sensitivity to Paraquat in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 40: 1279-1288.
- Rider CV, Gorr TA, Olmstead AW, Wasilak BA, LeBlanc GA. 2005. Stress signaling: coregulation of hemoglobin and male sex determination through a terpenoid signaling pathway in a crustacean. *J Exp Biol* 208: 15-23.
- Santana MS, Sandrini-Neto L, Neto FF, Ribeiro CAO, Di Domenico M, Prodocimo MM. 2018. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. *Environ Pollut* 242: 449-461.
- Shi W, Han Y, Sun S, Tang Y, Zhou W, Du X, Liu G. 2020. Immunotoxicities of microplastics and sertraline, alone and in combination, to a bivalve species: size-dependent interaction and potential toxication mechanism. *J Hazard Mater* 396: 122603.
- Sikdokur E, Belivermiş M, Sezer N, Pekmez M, Bulan ÖK, Kılıç Ö. 2020. Effects of microplastics and mercury on manila clam *Ruditapes philippinarum*. Feeding rate, immunomodulation, histopathology and oxidative stress. *Environ Pollut* 262: 114247.
- Snyder MJ. 1998. Cytochrome P450 Enzymes Belonging to the CYP4 Family from Marine Invertebrates. *BBRC* 249: 187-190.
- Snyder MJ. 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquat Toxicol* 48: 529-547.
- Syed K, Mashele SS. 2014. Comparative analysis of P450 signature motifs EXXR and CXG in the large and diverse kingdom of fungi: identification of evolutionarily conserved amino acid patterns characteristic of P450 family. *PLoS One* 9: e95616.
- Tian J, Jiao Z, Fu H, Qi L, Li Q, Liu N, Liu S. 2021. Genome-wide identification and expression profiling revealed tissue-specific inducible expression of cytochrome P450s conferring cadmium tolerance in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquac Rep* 19: 100582.
- Won EJ, Kim RO, Kang HM, Kim HS, Hwang DS, Han J, Lee YH, Hwang UK, Zhou B, Lee SJ, Lee JS. 2016. Adverse Effects, Expression of the Bk-CYP3045C1 Gene, and Activation of the ERK Signaling Pathway in the Water Accommodated Fraction-Exposed Rotifer. *Environ Sci Technol* 50: 6025-6035.

- Wu D, Liu Z, Cai M, Jiao Y, Li Y, Chen Q, Zhao Y. 2019. Molecular characterisation of cytochrome P450 enzymes in waterflea (*Daphnia pulex*) and their expression regulation by polystyrene nanoplastics. *Aquat Toxicol* 217: 105350.
- Yoo JW, Cho H, Lee KW, Won EJ, Lee YM. 2021a. Combined effects of heavy metals (Cd, As, and Pb): Comparative study using conceptual models and the antioxidant responses in the brackish water flea. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicology & Pharmacology* 239: 108863.
- Yoo JW, Cho H, Jeon MJ, Jeong CB, Jung JH, Lee YM. 2021b. Effects of polystyrene in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*: Size-dependent acute toxicity, ingestion, egestion, and antioxidant response. *Aquat Toxicol* 235: 105821.
- Yoo JW, Bae HJ, Jeon MJ, Jeong TY, Lee YM. 2022. Metabolomic analysis of combined exposure to microplastics and methylmercury in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. *Environ Geochem Health* doi: 10.1007/s10653-022-01435-1.
- Zhang J, He Y, Yan X, Qu C, Li J, Zhao S, Wang X, Guo B, Liu H, Qi P. 2019. Two novel CYP3A isoforms in marine mussel *Mytilus coruscus*: identification and response to cadmium and benzo[α]pyrene. *Aquat Toxicol* 214: 105239.
- Zhang S, Wu H, Hou J. 2023. Progress on the Effects of Microplastics on Aquatic Crustaceans: A Review. *Int J Mol Sci* 24: 5523.
- Zhang W, Liu Z, Tang S, Li D, Jiang Q, Zhang T. 2020a. Transcriptional response provides insights into the effect of chronic polystyrene nanoplastic exposure on *Daphnia pulex*. *Chemosphere* 238: 124563.
- Zhang X, Wang X, Yan B. 2021. Single and combined effects of phenanthrene and polystyrene microplastics on oxidative stress of the clam (*Macraa veneriformis*). *Sci Total Environ* 771: 144728.
- Zhang YT, Chen M, He S, Fang C, Chen M, Li D, Wu D, Chernick M, Hinton DE, Bo J, Xie L, Mu J. 2020b. Microplastics decrease the toxicity of triphenyl phosphate (TPhP) in the marine medaka (*Oryzias melastigma*) larvae. *Sci Total Environ* 763: 143040.
- Zhou W, Han Y, Tang Y, Shi W, Du X, Sun S, Liu G. 2020. Microplastics aggravate the bioaccumulation of two waterborne veterinary antibiotics in an edible bivalve species: potential mechanisms and implications for human health. *Environ Sci Technol* 54: 8115-8122.