

폴리에틸렌 미세플라스틱과 납의 복합노출에 따른 실험동물의 세포면역기능 조절 장애 평가

이경우 , 김창열*

대구가톨릭대학교 의료보건산업대학원 화학물질독성평가학과

Dysregulation of Cellular Immune Functions on Gastric Administration to Mixtures of Polyethylene Microplastics and Metallic Lead in Mice

Gyoungwoo Lee and Changyul Kim*

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

ABSTRACT

Background: The existing research results on the combined toxicity of these pollutants using mammals, such as rodents, are insufficient, especially in relation to changes in the immune system.

Objectives: This study aims at evaluating the cellular immune response to PE-MPs solely or when combined with Pb, which possess excellent adsorption capacity with PE-MPs and is commonly co-exposed in our daily lives.

Methods: The study investigated the cellular immune function of 9-week ICR mice with 28 days exposure to PE-MPs (2 mg/mouse/day) and Pb (0.1 mM in distilled water) individually and in combination. PE-MPs were administered via gastric intubation while the lead intake was conducted via the oral drinking water route. Cellular immunity was evaluated by analyzing the production for T_H1 cytokines namely, TNF- α and IFN- γ and T_H2 cytokines, IL-4 and IL-6 in culture supernatants from polyclonally activated splenic mononuclear cells ex vivo.

Results: Both the PE-MPs only and the PE-MPs+Pb exposure group revealed an increased T_H1 response with elevated TNF- α and IFN- γ levels and downregulated T_H2 response with low IL-4, and IL-6 production levels compared to the control group. Furthermore, an increased IFN- γ /IL-4 ratio was found in the PE-MPs only and PE-MPs+Pb exposure groups, which indicated the skewedness to T_H1 response. Meanwhile, reduced blood hemoglobin levels and increased levels of IL-4, the dominant T_H2 cytokine in the Pb-only exposure group, were observed.

Conclusions: Our current findings on the predominance of T_H1 immune response in the PE-MPs and PE-MPs+Pb groups suggest that PE-MPs could be responsible for the predominant induction of the cellular immune changes. This finding could be used as an important landmark in research related to T_H1 predominance, such as autoimmune diseases. It suggests that additional research on immune modulation using longer exposure durations or the same exposure route is required to elucidate stronger findings.

Key words: Cytokine, helper T cell type I and type II, inflammation, polyethylene microplastics and lead combine exposure

Received February 7, 2023

Revised February 15, 2023

Accepted February 15, 2023

Highlights:

- Polyethylene microplastics (PE-MPs) or lead (Pb) can change the parameters of blood.
- The PE-MPs only and PE-MPs+Pb exposure groups revealed an increased T_H1 response.
- Pb only exposure increased levels of IL-4 of the dominant T_H2 cytokine.

*Corresponding author:

Department of Toxicity Assessment, Graduate School of Medical and Health Industry, Daegu Catholic University, 13-13 Hayang-ro, Hayang-eup, Gyeongsan 38430, Republic of Korea
 Tel: +82-53-850-3630
 Fax: +82-53-359-7480
 E-mail: cykim0813@cu.ac.kr

1. 서론

우리 사회와 일상생활에서 존재하는 화학물질 수는 계속 증가하고 있으며 이에 따라 유해 물질에 대한 인체 노출과 질병

등의 건강위해 가능성이 증가하고 있다.¹⁾ 그 중 플라스틱은 제작과 변형이 쉽고 가벼우며 내구성이 좋고 경제성과 실용성 때문에 전 세계에서 포장재, 건설업, 자동차부품, 전기·전자제품, 생활 및 여가, 스포츠용품, 농자재 등 폭넓게 사용된다.²⁾ 대부

분 플라스틱은 분해되거나 사라지지 않아 환경에 축적되고 특히, 플라스틱 파쇄에 의해 발생하는 미세플라스틱(microplastics, MPs)에 의한 환경 오염과 인체 영향 문제가 새롭게 대두되면서 미세플라스틱 연구가 활발하게 진행되고 있다.³⁾

체내 미세플라스틱이 흡수되면 입자 분포에 따라 림프계 또는 순환계에 도달하여 간, 신장, 비장, 심장 및 뇌를 포함한 이차 기관에 잠재적으로 축적되어 면역계와 세포의 건강에 영향을 줄 수 있다.⁴⁾ 폴리에틸렌 미세플라스틱(polyethylene microplastics, PE-MPs) 및 폴리스타일렌 미세플라스틱(polystyrene microplastics, PS-MPs)은 인간 유래 대뇌세포 및 상피세포에 산화스트레스를 유발한다는 것이 입증되었으며,⁵⁾ 크기가 더 작은 미세플라스틱은 세포막, 혈액-뇌 장벽을 통과해 미세플라스틱으로 유도된 독성물질의 대사와 해독작용에 따른 생체이용률을 증가시켜 전신 독성을 유발할 수 있다.⁶⁾ 또한, PE-MPs는 balb/c 생쥐를 이용한 8주간 반복 독성 시험을 수행한 결과에서 위 손상과 염증을 촉진하였고,⁷⁾ 생쥐의 간, 신장, 내장에 축적되어 간에서 에너지 및 지질 대사 방해, 산화스트레스 유발 및 신경독성 등의 부작용을 일으키는 것으로 보고되었다.^{6,8,9)}

이러한 미세플라스틱은 생활환경에 분포된 납(lead, Pb), 구리(copper, Cu), 카드뮴(cadmium, Cd), 수은(mercury, Hg)과 같은 중금속 및 내분비계 장애 물질과 같은 다른 오염물질에 흡착되어 생태계에 노출될 수 있으며, 잠재적으로 살아있는 유기체 형태로 오염물질을 전달하는 매개체가 될 수도 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 흡착 정도를 좌우하는 것은 미세플라스틱 종류와 표면적 상태, 중금속의 농도, pH, 온도 등이며, 중금속의 경우 Pb>Cu>Cd 순서로 흡착 정도가 높았다.¹³⁻¹⁶⁾ 중금속이 흡착된 미세플라스틱은 먹이사슬을 통해 인체로 옮겨 체내 흡수와 독성을 높일 수 있다.

연성의 중금속으로 알려진 Pb는 유해성이 가장 많이 알려진 금속이다. Pb는 파괴되거나 소멸하지 않고 다른 물질로 변환되지 않는 특성이 있어, 혈액이나 뱃속에 축적되어 건강장해를 유발한다.¹⁷⁾ 특히, Pb는 신경계에 미치는 영향이 크며 장기간 Pb에 노출될 경우 인지 능력 장애를 일으킬 수 있다.¹⁸⁾ 어린이는 낮은 농도의 Pb 노출에도 민감하게 반응하여 변비, 복통, 구토, 체중감소 등의 소화기 증상과 두통, 피로, 무기력 및 과잉행동 그리고 지적 능력 장애 등을 일으킬 수 있음이 보고되었다.^{19,20)} 또한, 임산부의 Pb 노출은 유산 위험을 높이고, 성인 남성의 Pb 노출은 생식능력 저하를 유발시킬 수 있는 것으로 보고되었다.^{21,22)}

수많은 동물연구에서 나노 및 미세플라스틱 노출은 염증성 장 균형 손상, 장내 세포 불균형 및 면역세포 독성을 유발할 수 있음이 보고되었다. 또한, 미세플라스틱은 오염물질을 흡착하여 박테리아 병원균 성장을 촉진시킬 수 있는 것으로 알려졌다.²³⁾ 최근 PS-MPs (5 μm)와 Cd (10 μg/L)를 제브라피쉬에 복합노출 시 염증 및 산화스트레스를 유발하였으며,²⁴⁾ 농어(D.

labrax juveniles)에서는 MPs (1~5 μm)와 Hg (0.016 mg/L) 노출 시간과 아가미에서 산화스트레스를 일으켰다.¹⁰⁾ 잉어의 경우, PE-MPs와 Cd (2 mg/L)의 복합노출은 시너지 효과를 나타내며 혈액의 생화학적 변화를 유발하였다.²⁵⁾ 또한, MPs와 중금속의 복합노출은 미세조류 및 굴과 같은 수생생물에도 악영향을 미쳤다.²⁶⁾ 현재까지 연구들을 종합해 본 결과, 미세플라스틱과 중금속을 이용한 수생환경에서의 복합오염 연구는 많지만, 설치류와 같은 포유류를 이용한 미세플라스틱과 중금속 복합 독성연구는 부족하다. 특히, 미세플라스틱과 중금속 복합노출에 따른 면역 체계 평가는 미비하다.

대부분 미세플라스틱 일반적인 종류는 PE-MPs, PS-MPs 및 실리콘이다. 그 중 우리나라 한강 지류에서는 PE-MPs, 폴리테트라플루오로에틸렌 미세플라스틱(polytetra-fluoroethylene microplastics, PTFE-MPs), 폴리에스테르 미세플라스틱(polyester microplastics, PES-MPs)이 많이 발견되며, 한강에 서식하는 잉어, 붕어, 블루길 등의 생선에서 PE-MPs와 PTFE-MPs가 발견되었다.²⁷⁾ 따라서 본 연구는 우리나라에서 흔하게 발견되는 플라스틱 유형 중 하나인 PE-MPs와 흡착 능력이 뛰어나고 우리 실생활에 많이 노출되고 있는 Pb를 대상으로 하였다. ICR 생쥐의 위내 PE-MPs와 Pb의 단독 혹은 복합형태로 28일 연속으로 노출시킨 후, 희생 부검을 통해 혈액학적 변화와 신체 면역 조절의 중요한 역할을 담당하는 비장 단일세포의 T 림프구 활성화를 통해 생성되는 사이토카인 수준을 비교분석하여 세포면역 영향을 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 분류

본 실험은 감염, 내분비, 면역 등의 연구에 이용되는 ICR 생쥐를 사용하였다. (주)코아텍(Pyongtaek, Korea)에서 7주령 수컷을 구입하였으며, 입수 후 9일간 순화 기간을 가졌다. 체중이 비슷한 개체를 무작위로 선정하여 투여물질에 따라 용매투여 대조군(control), PE-MPs 단독노출군, Pb 단독노출군, PE-MPs+Pb 복합노출군으로 각 군당 6마리로 구성하였다. 사육환경은 온도 22±3°C, 상대습도 30~70%, 환기횟수 10~20 회/hr, 조명시간 12시간(08:00~20:00), 조도 150~300 Lux, 암모니아 농도 20 ppm 이하, 소음 60 dB 이하의 조건을 일정하게 유지하였다. 동물실험은 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하였으며, 동물실험윤리위원회의 승인(IACUC-2021-068호)을 받아 실시되었다.

2. 시험물질 및 투여

미세플라스틱은 0.74~4.99 μm Polyethylene Nanospheres (Cat. No: PENS-098, Cos-pheric LLC, Santa Barbara, CA, USA)로 밀도는 0.995 g/cc 소수성 미세플라스틱을 사용하였

다. PE-MPs는 개봉 후 냉장 보관하였으며, Pb의 경우는 Lead (II) acetate trihydrate (Cat. No: 467863, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였고, 개봉 후 상온 보관하였다. 투여 방법은 28일 동안 1일 1회 PE-MPs를 위내 투여하였으며 Pb는 28일 동안 음용수를 섭취하게 하였다. PE-MPs는 멸균증류수에 넣고 교반기를 이용하여 균질화시켰으며 선행연구를 참조하여 2 mg/mouse/day를 투여하였으며, Pb는 혈액에서 10~20 µg/dL의 Pb를 생성할 수 있는 0.1 mM 농도로 만든 음용수를 섭취하게 하였다.^{19,28,29)} 용매투여 대조군은 부형제인 멸균증류수를 위내 투여하였다.

3. 체중 측정

각 그룹의 실험동물을 투여개시일과 부검일에 전자저울(GF-3000, A&D Company, Seoul, Korea)을 사용하여 체중을 측정하였으며, 부검 전 체중에서 투여개시일 체중을 뺀 증체량(weight gain)을 구하여 각 개체별 체중 변화값을 확인하였다.

4. 혈액학적 분석

Isoflurane (HanaPhram, Seoul, Korea)으로 흡입마취한 뒤 개복하여 복대정맥에서 채혈한 혈액으로 자동혈액분석기(ADVIA 2120, Siemens, Germany)를 이용하여 백혈구, 헤모글로빈, 림프구, 단핵구, 호산구에 대한 정량적 분석을 측정하였다.

5. 비장 단일세포군(single cell suspension) 배양 및 T 림프구 활성화

부검 시 얻은 주요 면역 장기인 비장을 채취하여 멸균된 슬라이드글라스(Fisherbrand, Pittsburgh, PA, USA)를 이용하여 단일세포화하였다. 이후 RBC lysis buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 적혈구를 용해시키고, DPBS로 용해된 적혈구 등을 세척하였다. 단일세포화가 끝난 비장세포는 24-well plate에 culture RPMI-1640 (cRPMI)과 함께 0.5×10^6 cells/well로 배양하였다. cRPMI의 조성으로는 RPMI-1640 (Hyclone, Logan, UT, USA), 1 mM sodium pyruvate (BioWhittaker, Lonza, MD, USA), 1% sodium bicarbonate,

50 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 10% heated inactivated fetal bovine serum (FBS, Hyclone), 1% Penicillin-Streptomycin solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하였다. 단일화된 비장세포의 CD4⁺ T 림프구 활성화를 위해 immobilized anti-CD3e mAb ($5 \mu\text{g}/0.5 \times 10^6$ cells, purified NA/LE Hamster anti-mouse CD3e, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여 활성화하였다.

세포는 48시간 동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 4°C, 10,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 얻었고 분석하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

6. T 림프구 내 사이토카인 측정

T 림프구 활성화 배양액 내 존재하는 사이토카인 수준을 Sandwich Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay 방법으로 정량하였다. 각 지표를 확인하기 위한 Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α), InterLeukin-6 (IL-6), Interferon-gamma (IFN-γ), 및 InterLeukin-4 (IL-4) kit는 BD Biosciences 제품을 사용하였다. 96-well Immulon 4 plate (Dynex, Chantilly, VA, USA)에 non-specific binding을 위해 10% FBS-PBS로 blocking 하였으며, 배양액은 TNF-α는 1/3, IFN-γ는 1/30로 희석하고 IL-6 및 IL-4는 희석 없이 분석하였다. Epoch Microplate Spectrophotometer (Bio-Tek, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 570 nm 및 450 nm 파장에서 흡광도를 측정 후, Gen5 Data Analysis Software (Bio-Tek)를 통해 정량하였다.

7. 통계 분석

실험을 통해 얻은 모든 결과의 통계 처리는 Student's T test를 통해 용매투여 대조군과 시험군과의 유의성 검정을 하였다. 모든 결과값은 평균±표준오차(standard error, SE)로 나타났다. 유의수준은 p-value<0.05에서 검정하였다.

III. 결 과

1. 체중 변화

PE-MPs와 Pb의 단독노출군 및 PE-MPs+Pb 복합노출군의

Table 1. Body weight gains (g) of groups

Day	Group			
	Control	PE-MPs	Pb	PE-MPs+Pb
1st day (g)	36.02±0.81	36.05±0.68	36.59±0.53	36.85±0.65
Sacrificed day (g)	38.55±1.24	38.81±0.59	39.10±0.96	38.73±0.50
Weight gain (g)	2.53±0.44	2.75±0.42	2.51±0.66	1.87±0.62

Body weight of groups were measured on the days of first and twenty eighth administration (Control: 0 mg/mouse/administration, Polyethylene microplastic [PE-MPs]: 2 mg/mouse/administration, Pb: 0.1 mM in distilled water, PE-MPs+Pb: 2 mg/mouse/administration+0.1 mM in distilled water) during 4 weeks. Number of animals were 6 for each group, respectively. Data are expressed as means±standard error.

4주 노출 전후의 체중 변화를 확인하였다. 용매투여 대조군은 투여개시일부터 부검 전까지 2.53±0.44 g의 증가를 보였다. PE-MPs 단독노출군은 2.75±0.42 g, Pb 단독노출군은 2.51±0.66 g으로 용매투여 대조군과 차이가 없었으며, PE-MPs+Pb 혼합노출군은 1.87±0.62 g 증가로 용매투여 대조군 평균과 비교해 23% 감소된 수준이지만 통계적인 차이는 없었다(Table 1).

2. 혈액학적 분석 결과

PE-MPs와 Pb의 단독노출 및 PE-MPs+Pb의 복합노출에 따른 혈액학적 변화 검사 결과에서 백혈구수는 용매투여 대조군에서 3.84±0.66×10³/μL를 나타냈고 PE-MPs 단독노출군은 2.68±0.49×10³/μL로 용매투여 대조군 평균에 비해 30% 감소하였다. Pb 단독노출군 2.94±0.57×10³/μL, PE-MPs+Pb 복합노출군 2.96±0.60×10³/μL로 두 그룹 모두 약 23% 감소된 결과를 확인할 수 있었다. 헤모글로빈의 농도는 Pb의 단독노출에서 12.8±0.20 g/dL로 용매투여 대조군의 13.8±0.40 g/dL와 비교해 통계적으로 유의하게 감소하였다. 림프구 수준은 용매투여 대조군 2.36±0.37×10³/μL에 비해 PE-MPs 단독노출군 1.91±0.41×10³/μL, Pb 단독노출군 2.03±0.29×10³/μL, PE-MPs+Pb 복합노출군 1.92±0.45×10³/μL로 감소된 경향을 보였다. 호산구는 용매투여 대조군 4.98±0.80%를 나타냈으며 2.15±0.45%를 나타낸 PE-MPs+Pb 복합노출군은 용매투여 대조군과 비교해 통계적으로 유의하게 감소하였다(Table 2).

3. 비장세포 T 림프구 배양액을 이용한 사이토카인 분석 결과

비장 단일세포에서 T 림프구를 활성화한 배양액으로부터 염증성 사이토카인 수준을 분석하였다. TNF-α와 IL-6는 대표적인 친염증성 사이토카인으로 측정 결과 용매투여 대조군(TNF-α: 306.6±65.6 pg/mL, IL-6: 181.0±71.9 pg/mL)

과 Pb 단독노출군(TNF-α: 301.3±4.5 pg/mL, IL-6: 172.2±46.5 pg/mL)에서 그룹 간 차이는 없었다. 하지만 TNF-α는 PE-MPs 단독노출군에서 333.5±81.2 pg/mL, PE-MPs+Pb 복합노출군에서 366.3±27.3 pg/mL로 용매투여 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타냈으며, IL-6의 경우 PE-MPs 단독노출군에서 122.8±33.3 pg/mL, PE-MPs+Pb 복합노출군에서 133.6±36.6 pg/mL로 용매투여 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 1A, 1B).

IFN-γ는 보조 T 림프구 type 1 (Helper T lymphocyte type 1, T_H1)으로 분화를 유도하여 세포 안에서 바이러스 증식 방어 등 면역 반응과 관련되어 있으며 IL-4는 보조 T 림프구 type 2 (Helper T lymphocyte type 2, T_H2)로 분화를 유도하여 알러지와 염증 매개와 관련하는 역할로 알려져 있다. IFN-γ 측정된 결과에서 용매투여 대조군은 14,120±2,965 pg/mL를 보였으며, PE-MPs 단독노출군은 17,670±5,443 pg/mL 및 PE-MPs+Pb 복합노출군은 24,390±5,212 pg/mL로 용매투여 대조군 평균에 비해 각각 25%와 73% 증가를 보였다. Pb 단독노출군은 15,101±2,812 pg/mL의 수준이었다. IL-4 측정결과에서는, PE-MPs 단독노출군은 158.1±35.5 pg/mL 및 PE-MPs+Pb 복합노출군은 236.2±50.3 pg/mL로 용매투여 대조군 309.0±110.05 pg/mL로 감소되는 경향을 보였으며, Pb 단독노출군에서는 402.3±110.1 pg/mL였다(Fig. 1C, 1D).

4. 비장세포 배양액 내 IFN-γ/IL-4 ratio 평가

IFN-γ/IL-4 ratio는 T_H1 또는 T_H2 반응성에 대한 면역 편향성을 알 수 있는 면역지표이다. 그 결과, 용매투여 대조군(69.4±17.6)과 비교하여 PE-MPs 단독노출군(108.9±30.1)과 PE-MPs+Pb 복합노출군(115.6±26.8)으로 용매투여 대조군보다 높은 IFN-γ/IL-4 ratio가 관찰되었다. Pb 단독노출군은 68.6±28.4로 용매대조군과 비슷한 수준을 보였다(Fig. 2).

Table 2. Comparison of hematologic parameters

Indicator	Units	Group			
		Control	PE-MPs	Pb	PE-MPs+Pb
WBC	10 ³ /μL	3.84±0.66	2.68±0.49	2.94±0.57	2.96±0.60
HGB	g/dL	13.8±0.40	13.5±0.20	12.8±0.20*	13.0±0.40
LYM	10 ³ /μL	2.36±0.37	1.91±0.41	2.03±0.29	1.92±0.45
MONO	%	2.18±0.36	2.57±0.53	1.66±0.21	3.65±0.83
EOS	%	4.98±0.80	5.37±0.88	3.95±0.54	2.15±0.45*

Hematologic parameters of groups were measured on the sacrificed day (Control: 0 mg/mouse/administration, Polyethylene microplastic [PE-MPs]: 2 mg/mouse/administration, Pb: 0.1 mM in distilled water, PE-MPs+Pb: 2 mg/mouse/administration+0.1 mM in distilled water). Number of animals were 6 for each group, respectively. Data are expressed as means±standard error. *p<0.05, compared to the Control and Pb or PE-MPs+Pb.

WBC: white blood cells, HGB: hemoglobin, LYM: lymphocyte, MONO: monocyte, EOS: eosinophil.

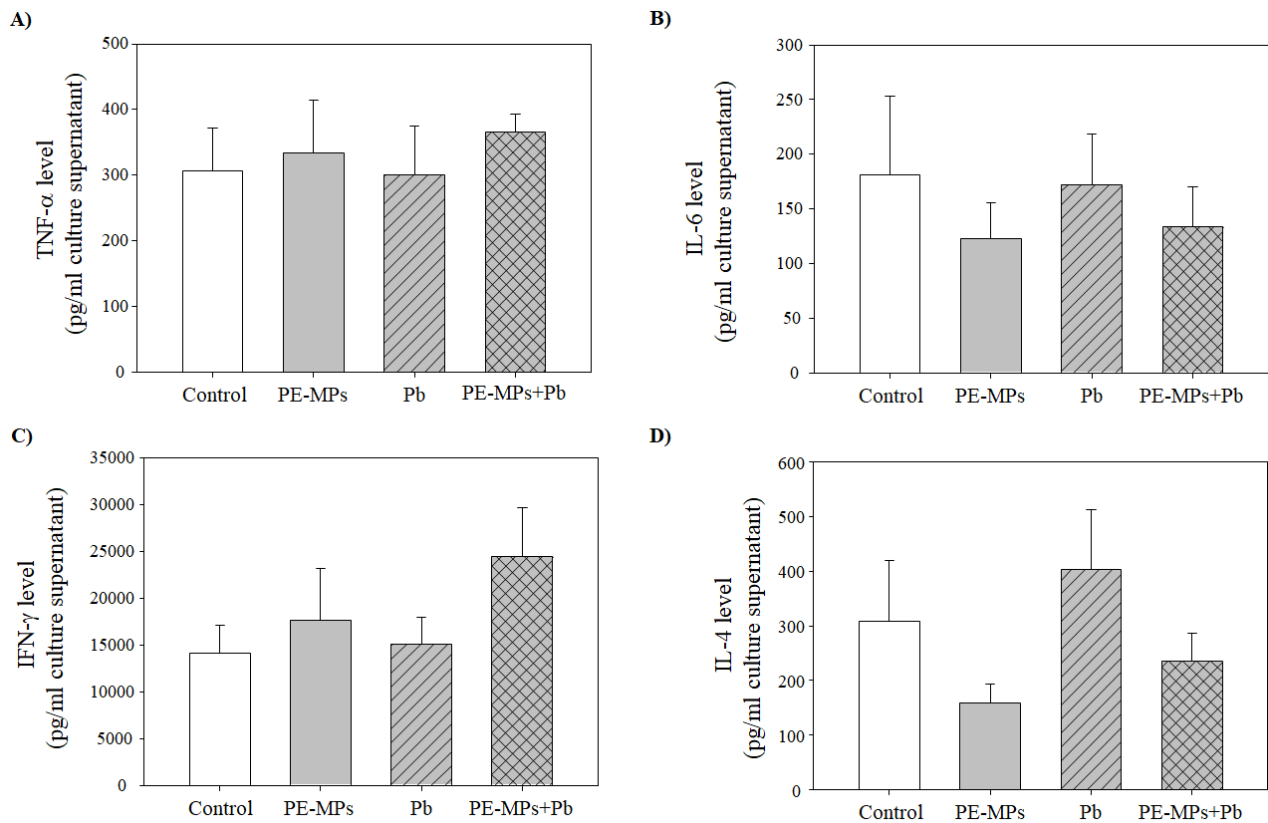


Fig. 1. Levels of cytokines produced in culture supernatant of ex vivo stimulated spleen. (Control: 0 mg/mouse/administration, Polyethylene microplastic [PE-MPs]: 2 mg/mouse/administration, Pb: 0.1 mM in distilled water, PE-MPs+Pb: 2 mg/mouse/administration+0.1 mM in distilled water). Number of animals were 6 for each group, respectively. Data are expressed as means±standard error.

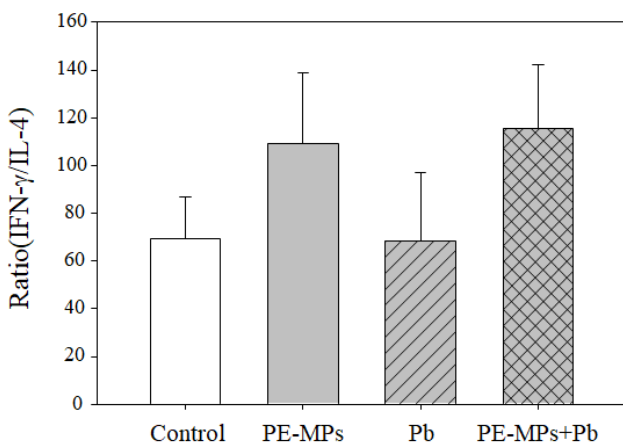


Fig. 2. The IFN- γ /IL-4 ratio was calculated by dividing the amount of IFN- γ by the amount of IL-4 in the same supernatant (Control: 0 mg/mouse/administration, Polyethylene microplastic [PE-MPs]: 2 mg/mouse/administration, Pb: 0.1 mM in distilled water, PE-MPs+Pb: 2 mg/mouse/administration+0.1 mM in distilled water). Number of animals were 6 for each group, respectively. Data are expressed as means±standard error.

IV. 고 찰

대부분 화학물질에 대한 위해성 평가는 개별 물질의 노출 수준을 파악하여 개별 잔류 허용 기준을 설정하는 데 활용되고 있다. 그러나 실생활에서 사람은 매일 다양한 노출 경로로 여러 화학물질에 동시에 노출되며 이와 같은 복합 화학물질은 여러 독성학적 상호작용으로 예상치 못한 위해영향을 유발할 수 있다. 따라서 본 연구는 PE-MPs 단독노출군, Pb 단독노출군, PE-MPs+Pb 복합노출군을 설정해 각 해당 물질 및 복합노출에 대한 독성영향 중 비장 단일세포의 T 림프구 활성화를 통해 생성된 사이토카인 수준을 비교분석하여 세포면역 영향을 평가하였다.

활성화된 CD4⁺ T 세포는 T_H1 세포와 T_H2 세포로 분화되어 체내 기초적인 면역기능을 담당하고 있다. 분화된 T_H1 세포와 T_H2 세포는 10년 이상의 연구결과를 통해 각각 고유한 사이토카인을 분비하는데, T_H1 세포는 TNF- α 와 IFN- γ 와 같은 염증성 사이토카인을 분비하며 생성된 사이토카인들은 류마티스 관절염, 인슐린 의존성 당뇨병, 자가면역 뇌염 등을 포함한 만성적 자가면역 질환을 특징으로 가지고 있다. 이와는 반대

로 T_H2 세포는 IL-4를 분비하여 박테리아 및 기생충과 같은 특정 세포의 병원체에 대한 보호를 하며 알러지와 같은 천식 반응에 관여한다.³⁰⁾ IL-6은 T_H2 세포의 분화를 유도하며 반면에 T_H1 세포의 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다.³¹⁾ 치군균야 바이러스(chikungunya virus)로 유도된 관절염 질환 C57BL/6J 마우스에 1 μm PS-MPs를 노출 시 상대적으로 T_H1 반응, 자연 살해세포 및 호중구를 상승시켰으며,³²⁾ 임신 8일차에서 출산 후 21일 동안 0.1 mM의 Pb에 노출된 balb/c 어미 생쥐와 500 ppm Pb에 임신기간 동안 노출된 Fisser 344 어미 랫드의 자손들은 면역 항상성을 교란시켜 T_H1 반응성보다 T_H2 반응성에 대한 불균형을 초래하는 것으로 보고되었다.^{33,34)} 본 연구에서 PE-MPs 단독노출군 및 PE-MPs+Pb 복합노출군은 T_H1 세포에 의해 분비되는 TNF- α 와 IFN- γ 의 수준을 높이고 T_H2 세포를 통해 분비되는 IL-4 수준을 감소시켰으며 면역편향성을 확인한 IFN- γ /IL-4 ratio에서도 PE-MPs에 의해 T_H1 반응이 높다는 것을 확인하여 이전 연구결과와 일치하는 것을 확인하였다.³²⁻³⁴⁾

T_H1/T_H2 는 서로 상호의존적으로 작용하기 때문에 T_H1/T_H2 불균형은 면역반응이 다르며 질병 또한 다르게 나타난다. 흑색종 환자의 경우 일반인에 비해 T_H1 의 IL-2와 IFN- γ 의 발현이 현저하게 낮았으며 T_H2 의 IL-4, IL-6의 수준이 상승하여 T_H1/T_H2 의 불균형이 되어있으며,³⁵⁾ 유방암 환자에서도 T_H2 사이토카인 상승과 T_H1 우성 반응을 보이는 환자는 더 높은 생존율과 더 낮은 암 재발률을 보였다.³⁶⁾ 본 연구결과에서 PE-MPs 단독노출군 및 PE-MPs+Pb 복합노출군의 결과는 Pb 노출과 상관없이 PE-MPs에 따라 사이토카인 결과가 나오는 것을 확인하여 28일 동안 실험동물 체내에서 PE-MPs와 Pb가 동시에 노출되었을 때 Pb보다 PE-MPs에 의한 면역 변화 반응이 먼저 일어나는 것으로 관측되었다. 위와 같은 결과는 미세플라스틱과 중금속의 복합노출 시 종양 혹은 알러지, 천식 질환과 관련 있는 T_H2 반응보다는 T_H1 우세반응과 관련 있는 염증성 자가면역질환 연구가 더 중요함을 시사한다. 또한, 추가연구를 통해 자가면역질환과 관련있는 T_H17 세포와 T_H17 세포에 의해 분비되는 IL-12, IL-17, IL-23 사이토카인의 연구도 필요할 것이다.³⁷⁾

Pb 단독노출군의 경우 T_H2 반응과 관련 있는 IL-4 수준만 증가하였으며 TNF- α , IFN- γ , IL-6의 수준은 용매투여 대조군과 차이를 확인할 수 없었다. 다만, 기존 연구에서 Pb는 초기 발달과정에서 독성효과를 발휘하며 어릴수록 Pb 노출에 더욱 민감하게 반응할 수 있다.^{33,34)} 따라서 본 연구에서 사용된 9주령부터 13주령까지 투여된 Pb 노출군은 상대적으로 독성 영향이 미비할 수 있다. 이번 연구에서 Pb 단독노출군과 PE-MPs+Pb 복합노출군의 혈중 Pb 농도를 분석하지 않았다. 혈액 중 Pb 농도가 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 일 때 헤모글로빈의 수치가 감소하고 빈혈 위험이 있다.³⁸⁾ Pb 단독노출군은 용매투여 대조군과 비교해 혈액 중 헤모글로빈 수준이 통계적으로 유의하게 감소하였고,

PE-MPs+Pb 복합노출군의 혈액 중 헤모글로빈 수준 또한 용매투여 대조군보다 낮은 수준임을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서 설정된 Pb의 0.1 mM의 농도는 적정하다고 보여진다. 독성을 예측할 수 있는 지표로 체중 변화를 활용할 수 있다.³⁹⁾ PE-MPs와 Pb의 단독노출에 따른 증체량은 용매투여 대조군과 차이가 없었으나, PE-MPs+Pb 복합노출군은 용매투여 대조군과 비교해 증체량이 감소되었다. 독성 세기를 단순비교하기 어렵지만, PE-MPs+Pb의 복합노출은 단독노출보다 체내 소화기관에 미치는 영향이 큰 것을 확인하였다. 다만, 정확한 독성평가를 위해 미세플라스틱과 중금속 복합노출 시 체중 변화를 유도할 수 있는 장내 장 균형 손상, 장내 세포 불균형, 프로바이오틱스 및 병원성 박테리아 구성 등의 연구가 필요하다.

본 연구결과로 PE-MPs와 Pb의 복합노출에 따른 유의한 면역반응은 확인할 수 없었다. 다만, 본 연구를 통해 PE-MPs는 T_H1 우세반응을 보이고 Pb는 T_H2 우세반응을 보였던 기존 연구와 같은 결과를 얻었으며, PE-MPs와 Pb가 복합노출되었을 때 PE-MPs의 면역변화 반응은 Pb보다 우세하게 일어나는 것을 확인하였다. 중금속이 흡착된 MPs는 중금속의 대체 노출 경로로 작용하여 중금속의 분포, 생체 축적 및 독성을 증가시킬 수 있으나,²⁶⁾ 본 연구는 PE-MPs에 Pb가 흡착된 형태로 동시에 노출시키지 않았다. 투여 방법의 경우, PE-MPs는 위내투여를 하였으며 Pb는 음용수에 녹여 실험동물에 노출시켰다. 실제 Pb 단독노출군처럼 음용수에 녹여 자연스러운 섭취가 좋은 방법일 수 있으나 PE-MPs의 소수성 특징으로 물에 녹지 않아 정확한 양의 투여를 위해 PE-MPs는 위내 투여 방법을 이용하였다. 또한, Pb의 정확한 투여량을 환산하기 위한 음수량 측정결과를 제시하지 못하였다. 이러한 제한점에도 불구하고 본 연구 자료는 추후 포유류의 이용한 미세플라스틱과 중금속 복합노출에 따른 T_H1 반응 및 T_H2 반응 관련 질환의 상관성 연구를 위한 하나의 근거자료로 사용할 수 있으며 더 나아가 다양한 복합노출의 독성평가 필요성에 대한 중요한 근거자료로 활용될 수 있을 것이다.

V. 결 론

28일 동안 PE-MPs와 Pb 각각을 단독노출 및 복합노출 시켰을 때 나타나는 세포면역 변화를 확인한 결과 PE-MPs 단독노출 및 PE-MPs+Pb 복합노출에서 T_H1 우세반응이 일어났다. 비록 PE-MPs에 Pb가 흡착된 상태로 노출되진 않았지만 위내 동시에 축적된 것을 고려하면, T_H2 우세반응을 유발하는 Pb 단독노출군에 비해 PE-MPs가 노출된 PE-MPs 단독노출 및 PE-MPs+Pb 복합노출 그룹에서 T_H1 우세반응이 유도된 것은 28일 동안 노출시 Pb보다 PE-MPs 반응이 더 우세하게 일어날 수 있음을 시사한다. 추후 미세플라스틱과 중금속 복합노출의 만성 독성평가의 추가연구 통한 비교분석은 필요하지만, 본 연구

의 결과는 미세플라스틱과 중금속 복합노출에 따른 T_{H1} 우세 반응을 검증할 위한 연구의 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

- Gaulton T, Hague C, Cole D, Thomas E, Duarte-Davidson R. Global event-based surveillance of chemical incidents. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2023; 33(1): 111-117.
- Doyle MJ, Watson W, Bowlin NM, Sheavly SB. Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific ocean. *Mar Environ Res.* 2011; 71(1): 41-52.
- Galafassi S, Nizzetto L, Volta P. Plastic sources: a survey across scientific and grey literature for their inventory and relative contribution to microplastics pollution in natural environments, with an emphasis on surface water. *Sci Total Environ.* 2019; 693: 133499.
- Turroni S, Wright S, Rampelli S, Brigidi P, Zinzani PL, Candela M. Microplastics shape the ecology of the human gastrointestinal intestinal tract. *Curr Opin Toxicol.* 2021; 28: 32-37.
- Schirinzi 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.
- Wright SL, Kelly FJ. Plastic and human health: a micro issue? *Environ Sci Technol.* 2017; 51(12): 6634-6647.
- Tong X, Li B, Li J, Li L, Zhang R, Du Y, et al. Polyethylene microplastics cooperate with *Helicobacter pylori* to promote gastric injury and inflammation in mice. *Chemosphere.* 2022; 288(Pt 2): 132579.
- Song YM, Kim CY. Toxicities demonstrated in dams and neonates following intragastric intubation of polyethylene microplastics to pregnant mice. *J Environ Health Sci.* 2021; 47(5): 446-453.
- 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.
- Barboza LGA, Vieira LR, Branco V, Carvalho C, Guilhermino L. Microplastics increase mercury bioconcentration in gills and bioaccumulation in the liver, and cause oxidative stress and damage in *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Sci Rep.* 2018; 8: 15655.
- Wen B, Jin SR, Chen ZZ, Gao JZ, Liu YN, Liu JH, et al. Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defence and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). *Environ Pollut.* 2018; 243(Pt A): 462-471.
- Yang Z, Zhu L, Liu J, Cheng Y, Waiho K, Chen A, et al. Polystyrene microplastics increase Pb bioaccumulation and health damage in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Sci Total Environ.* 2022; 829: 154586.
- Gao F, Li J, Sun C, Zhang L, Jiang F, Cao W, et al. Study on the capability and characteristics of heavy metals enriched on microplastics in marine environment. *Mar Pollut Bull.* 2019; 144: 61-67.
- Zhou Y, Yang Y, Liu G, He G, Liu W. Adsorption mechanism of cadmium on microplastics and their desorption behavior in sediment and gut environments: the roles of water pH, lead ions, natural organic matter and phenanthrene. *Water Res.* 2020; 184: 116209.
- Holmes LA, Turner A, Thompson RC. Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions. *Mar Chem.* 2014; 167: 25-32.
- Barus BS, Chen K, Cai M, Li R, Chen H, Li C, et al. Heavy metal adsorption and release on polystyrene particles at various salinities. *Front Mar Sci.* 2021; 8: 671802.
- Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: a review. *Interdiscip Toxicol.* 2015; 8(2): 55-64.
- Caito S, Aschner M. Developmental neurotoxicity of lead. *Adv Neurobiol.* 2017; 18: 3-12.
- Hauptman M, Bruccoleri R, Woolf AD. An update on childhood lead poisoning. *Clin Pediatr Emerg Med.* 2017; 18(3): 181-192.
- Santa Maria MP, Hill BD, Kline J. Lead (Pb) neurotoxicology and cognition. *Appl Neuropsychol Child.* 2019; 8(3): 272-293.
- Sokol RZ, Berman N. The effect of age of exposure on lead-induced testicular toxicity. *Toxicology.* 1991; 69(3): 269-278.
- Matović V, Buha A, Đukić-Čosić D, Bulat Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem Toxicol.* 2015; 78: 130-140.
- Hirt N, Body-Malapel M. Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Part Fibre Toxicol.* 2020; 17(1): 57.
- Lu K, Qiao R, An H, Zhang Y. Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 2018; 202: 514-520.
- Banaee M, Soltanian S, Sureda A, Gholamhosseini A, Haghi BN, Akhlaghi M, et al. Evaluation of single and combined effects of cadmium and micro-plastic particles on biochemical and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere.* 2019; 236: 124335.
- Liu S, Huang J, Zhang W, Shi L, Yi K, Yu H, et al. Microplastics as a vehicle of heavy metals in aquatic environments: a review of adsorption factors, mechanisms, and biological effects. *J Environ Manage.* 2022; 302(Pt A): 113995.
- 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.
- 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.
29. Snyder JE, Filipov NM, Parsons PJ, Lawrence DA. The efficiency of maternal transfer of lead and its influence on plasma IgE and splenic cellularity of mice. *Toxicol Sci.* 2000; 57(1): 87-94.
 30. Dong C, Flavell RA. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Res.* 2000; 2(3): 179-188.
 31. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol.* 2021; 33(3): 127-148.
 32. Rawle DJ, Dumenil T, Tang B, Bishop CR, Yan K, Le TT, et al. Microplastic consumption induces inflammatory signatures in the colon and prolongs a viral arthritis. *Sci Total Environ.* 2022; 809: 152212.
 33. Kasten-Jolly J, Heo Y, Lawrence DA. Impact of developmental lead exposure on splenic factors. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 247: 105-115.
 34. Miller TE, Golemboski KA, Ha RS, Bunn T, Sanders FS, Dietert RR. Developmental exposure to lead causes persistent immunotoxicity in Fischer 344 rats. *Toxicol Sci.* 1998; 42(2): 129-135.
 35. Jiang X, Guan S, Qiao Y, Li X, Xu Y, Yang L, et al. Effects of poly(I:C) and MF59 co-adjuvants on immunogenicity and efficacy of survivin polypeptide immunogen against melanoma. *J Cell Physiol.* 2018; 233(6): 4926-4934.
 36. Zhao X, Liu J, Ge S, Chen C, Li S, Wu X, et al. Saikosaponin A inhibits breast cancer by regulating Th1/Th2 balance. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 624.
 37. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005; 201(2): 233-240.
 38. Liu J, McCauley L, Yan C, Shen X, Pinto-Martin JA. Low blood lead levels and hemoglobin concentrations in preschool children in China. *Toxicol Environ Chem.* 2012; 94(2): 423-426.
 39. 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.

〈저자정보〉

이경우(대학원생), 김창열(교수)