

# Bleomycin이 처리된 사람 섬유아세포에서 극저주파 전자기장의 효과

조윤희, 김양지, 이중원, 김계은, 정해원  
 서울대학교 보건대학원

2008년 8월 28일 접수 / 2008년 9월 30일 1차수정 / 2008년 10월 2일 채택

극저주파 전자기장의 노출과 여러 암 발생과의 연관성을 구명하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있으나 아직도 결론을 내리기에 논란이 있다. 본 연구에서는 극저주파 전자기장이 소핵, 이수성 및 염색체 재배열과 같은 염색체 손상을 유도하는지 여부와 bleomycin (BLM)에 의해 유발된 염색체 손상 빈도를 증진시키는지 확인하기 위해 사람 섬유아세포에 BLM과 0.8 mT 세기의 극저주파 전자기장을 노출시킨 후 micronucleus - centromere 분석을 수행하였다. BLM의 농도에 따라 소핵, 이수성 및 염색체 재배열의 빈도가 유의하게 증가하였으며(p<0.05), 0.8 mT 세기의 극저주파 전자기장은 단독으로 사람 섬유아세포에 염색체 손상을 유도하지 않았으나, BLM에 의해 유발된 소핵과 이수성의 빈도를 유의하게 증가시켰다(p<0.05). 따라서 극저주파 전자기장은 단독으로 사람 섬유아세포에 유전독성을 일으키지 않으나 BLM에 의한 소핵과 이수성 빈도를 증폭하는 효과를 나타낸다.

중심어: 극저주파 전자기장, Bleomycin, 소핵, 이수성, 염색체 재배열

## 1. 서론

최근 들어 전기 및 전자기기의 사용이 증가됨에 따라 병원이나 산업체 등의 작업장이나 일반가정 그리고 환경으로부터 전자기장에 노출되는 기회가 증가되고 있다. 특히 상용전원인 50-60 Hz의 극저주파 전자기장(Extremely low frequency electromagnetic fields)이 소아암과 관련 있다는 Werthemer와 Lepper의 연구[1] 이후, 극저주파 전자기장이 각종 암 발생과 연관성이 있다는 역학 연구가 다수 보고 되었지만 2-6) 이와 상반된 연구 결과도 보고되고 있어[7-9] 아직도 결론을 내리기에는 논란의 소지가 있다.

몇몇의 실험 연구는 극저주파 전자기장이 단독으로 돌연변이를 유발하지 않지만 알려진 돌연변이원의 유전독성을 증가시킨다고 보고하였으며[10-12] 최근에 수행된 동물 연구에서도 극저주파 전자기장이 알려진 발암물질의 발암성을 증가시키는 것으로 보고하였다[13,14]. Walleczek 등[10]은 Chinese hamster ovary (CHO) 세포에 2 Gy의 감마선을 조사한 후 0.7 mT의 극저주파 전자기장을 조사한 결과 HPRT 점 돌연변이 빈도가 증가되었음을 보고하였으며 Cho와 Chung[11]도 0.8 mT의 극저주파 전자기장은 사람 림프구에 소핵과 자매 염색분체교환을 유발하지 않았으나

Benzo(a)pyren (B(a)P)과 함께 처리했을 때 B(a)P에 의한 소핵과 자매 염색분체교환 빈도를 증가시킨다고 보고하였다. 또한 melanoma 세포를 대상으로 한 연구에서도 전자기장은 Bleomycin (BLM)에 의해 유발된 HPRT 점 돌연변이의 빈도를 증가시킨다고 보고하였다[15]. 따라서 비교적 낮은 세기의 전자기장도 이온화 방사선, BLM, B(a)P 등 알려진 물리화학적 발암물질의 유전독성을 증진시키는 효과 즉, 극저주파 전자기장이 발암과정에서 조증진제(co-promotor)로 작용하는 것으로 확인되었으나 그와 상반된 연구결과도[16-18] 다수 보고 되어 극저주파 전자기장이 생체에 미치는 영향과 이에 대한 생물학적 기전은 아직까지 명확하게 알려진바 없다.

최근 들어 휴대 전화 등 고주파대 전자기장에 대한 연구는 활발히 이루어지고 있지만 상용전원인 60Hz의 극저주파대 전자기장이 생체에 미치는 영향에 대한 연구는 상대적으로 미비하게 이루어지고 있다. 극저주파대 전자기장은 생활 환경 속에서 언제나 노출되고 있으며, 흡연 등 여러 유해 화학물질 및 이온화 방사선 등의 물리적 요인과의 동시 노출도 일상적으로 일어나고 있기 때문에 극저주파 전자기장 자체의 유전독성은 물론 발암과정에서 전자기장의 증진효과 즉 조발암원성(co-carcinogenesis)은 전자기장의 노출 기준을 설정할 때 매우 중요한 의미를 지니게 된다.

따라서 본 연구에서는 0.8 mT의 극저주파 전자기장을 사람 섬유아세포에 단독 또는 이온화 방사선과 생체에 미치는 기전이 유사한 BLM 과 함께 노출시킨 후, 소핵과 이수성 및 염색체의 재배열과 같은 염색체 손상을 관찰하여 극저주파 전

책임저자: 정해원, chunghw@snu.ac.kr, 서울대학교 보건대학원  
 110-460 서울특별시 종로구 연건동 28번지

자기장의 유전독성에 대한 효과 및 조증진 효과(co-promoter effect)를 구명하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 세포배양 및 Bleomycin 처리

사람 섬유아 세포(CCD-986sk, 한국세포주은행)에 AminoMAX™-C100 보조첨가제가 포함된 AminoMAX™-C100 배지(Gibco, Grand Island, NY) 5 ml를 넣고 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 항온기에서 48 또는 72시간 배양하였다. 사람 섬유아 세포에 bleomycin (BLM, Fluka, Buchs, Switzerland)을 0, 0.2 또는 1 µg/ml의 농도로 3시간 처리하고 인산완충용액으로 두 번 세척한 후 세포에 새로운 배지를 첨가하여 배양하였다.

### 2.2 극저주파 전자기장 조사

Walleczek 등[10]이 제작한 것과 같이 아크릴에 자기와이어(NO.16)를 미터당 350번 감아 솔레노이드 코일(직경 0.15 m, 길이 0.3 m)을 제작하였다. 중심부의 자기장 분포는 Gaussmeter (model 4048; FW Bell, Orlando, FL)로 측정하여 자기장의 균일성을 확인하였다. 세포가 들어있는 배양 플라스크는 코일 중심부에 위치시켜 중심부로부터의 길이가 5 cm 이내로 되게 하여 97%의 균일성을 유지시켰으며 전자기장 노출군과 비노출군간의 배양 온도 차이가 없음을 확인하였다(37 ± 0.5 °C).

### 2.3 소핵 및 염색체 이상 표본작성

BLM이 전 처리된 세포와 전 처리되지 않은 세포를 항온기에서 배양하면서 0.8 mT 전자기장에 계속 노출시켰다. 이때 소핵 표본을 만들기 위해서는 cytochalasin B (1.5 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO)를 수확 28시간 전에 처리하였으며 염색체 표본을 작성하기 위해서는 수확 3시간 전에 colcemid (2 × 10<sup>-7</sup> M, Sigma)를 처리하였다. 배양 후 트립신이 처리된 세포를 플라스크 바닥에서 떼어내어 저장액(0.075 M KCl)으로 처리한 후 Carnoy's 고정액(methanol:acetic acid = 3:1)으로 고정하였다.

### 2.4 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

#### 2.4.1 슬라이드 준비

준비된 슬라이드를 2× Saline-Sodium Citrate (SSC, Amresco, Solon, OH) 용액에 37°C에서 15분씩 2번 방치한 후 상온의 70%, 85%, 100% 에탄올에 연속적으로 각각 2분씩 탈수 시켰다. 탈수된 슬라이드는 73 ± 1°C에서 5분간 70% 포름아마이드 / 2× SSC 용액에서 변성(Denaturation)시킨 후 -20°C의 70%, 85%, 100% 에탄올에서 연속적으로 2분씩 거친 후 상온에서 건조하였다.

#### 2.4.2 DNA probe 준비 및 혼성화

간기세포를 대상으로 수행하는 interphase FISH에는 Spectrum Orange가 표지된 1번과 Spectrum Green으로 표지된 4번 염색체 probe (Chromosome Enumeration Probe (CEP),

Vysis, Downer Grove, IL)를 이용하였으며 증기 염색체를 대상으로 수행하는 metaphase FISH에는 1, 2, 4 염색체가 동시에 Spectrum Orange로 표지된 probe (Whole Chromosome Painting (WCP), Vysis)를 이용하였다.

#### 2.4.2.1 Interphase FISH

1번 염색체 probe 1 µl, 4번 염색체 probe 1 µl와 CEP 혼성화 완충액 7 µl 그리고 증류수 1 µl를 섞어 만든 혼성화 혼합물을 어두운 상태에서 73°C에서 5분간 변성시킨 후, 혼성화시키기 전까지 45-50°C의 slide warmer에 놓아두었다. 준비된 소핵 슬라이드에 혼성화 혼합물 10 µl를 점적한 후, 22 mm × 50 mm cover glass를 덮고 그 가장자리에 rubber cement를 씌워 수분증발을 막았다. 그리고 수분이 유지되는 습윤상자 (Humidity box)에 넣어 42°C의 배양기에서 16시간 동안 혼성화시켰다.

#### 2.4.2.2 Metaphase FISH

1, 2, 4번 염색체 probe 2 µl와 WCP 혼성화 완충액 7 µl 그리고 증류수 1 µl를 섞어 만든 혼성화 혼합물을 어두운 상태에서 73 ± 1°C에서 5분간 변성시킨 후, 혼성화시키기 전까지 45-50°C의 slide warmer에 놓아두었다. 준비된 염색체 슬라이드에 혼성화 혼합물 10 µl를 점적한 후 22 mm × 50 mm cover glass를 덮고 그 가장자리에 rubber cement를 적용한 다음 충분히 혼성화되도록 습윤상자에 넣어 37°C의 배양기에서 14-16시간 방치하였다.

#### 2.4.3 세척

슬라이드를 꺼내 Rubber cement를 조심스럽게 제거하고 슬라이드를 72°C의 0.4 × SSC (Amresco) 용액에 5분간 담궈둔 후 꺼내어, 0.5% NP-40 (Vysis) 50 µl를 넣은 2× SSC 용액에 담가 2분간 세척하였다. 그 다음, slide를 말리고 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Vysis)로 대조 염색(counterstain)한 후, -20°C에서 보관하였다.

#### 2.4.4 관찰 및 사진 촬영

형광 현미경(NIKON, Tokyo, Japan)을 이용하여 triple band filter인 DAPI/FICT/Texas Red (D/F/IXRD, Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT)로 Spectrum Orange 및 Spectrum Green을 관찰하였고, UV-2A filter (NIKON, DM400)로 DAPI를 관찰하였다.

### 2.5 평가 기준

#### 2.5.1 소핵 및 이수성 분석

Fenech[19]와 Sgura 등[20]의 분류기준에 따라 소핵과 이수성을 분석하였다. 세포질 분열이 차단되어 두 개의 핵을 지닌 세포(Binucleated (BN) 세포)를 100개 관찰하였으며 소핵은 본 핵의 1/3이하의 크기로 본 핵과 구분되는 것만을 분석 대상으로 하였다. 이수성의 평가는 소핵 내에 보이는 signal도 포함하여 각각 4개의 1번 염색체 (orange) signal과 4번 염색체 (green) signal이 보이는 BN 세포를 대상으로 하였다. 즉 정상인 BN 세포는 하나의 딸핵 안에 2개의 signal과 또 다른

말핵 안에 2개의 signal (2+2)을 가지고 있는 반면, 염색체 불분리현상(non-disjunction)으로 인한 이수성의 BN 세포는 말핵 내에 0~4개까지의 signal (0+4, 1+3)을, 염색체 분실(chromosome loss)로 인한 이수성의 BN 세포는 각 말핵 내에 0~3개의 signal 과 소핵 내에 1~4개의 다양한 signal 수를 나타내며는데 각각의 경우를 분석하여 기록하였다.

2.5.2 염색체의 재배열 분석

염색체 재배열 분석은 Tucker 등[21]에 의해 제안된 Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology (PAINT) system에 근거하여 분류하였다. 즉 염색체 이상의 유형을 먼저 기입한 후 괄호 안에 동원체의 포함 및 painting 여부에 따라 A, a, B, b 등의 알파벳을 표기하였다.

2.6 통계분석

SPSS 10.0 통계패키지(SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용하여 분석하였다. BLM에 의해 유발된 소핵과 이수성 및 염색체 재배열빈도의 양-반응 분석은 Kendall  $\tau$  값을 가지고 분석했으며 BLM에 전처리된 또는 처리되지 않은 세포의 전자기장 노출그룹과 비노출 그룹 간의 차이는 Mann - Whitney 비모수 분석을 통해 분석하였다.

3. 결과와 논의

본 연구에서는 사람 섬유아세포에 0, 0.2와 1  $\mu\text{g/ml}$  농도의 BLM을 3시간 전처리하고 0.8 mT의 극저주파 전자기장을 세포 배양 시간 동안 노출시킨 후 소핵, 1번과 4번 염색체의 이수성 및 상호전좌와 삼입 등을 포함한 염색체 재배열 빈도를 분석하였다. 극저주파 전자기장이 단독으로 염색체 손상을 유도하는지 여부를 확인하기 위해 BLM을 처리하지 않은 세포의 전자기장 노출 그룹과 비노출 그룹을 비교 분석한 결과, 0.8 mT의 극저주파 전자기장은 사람 섬유아세포에 소핵(33%

vs 31%) (표 1), 이수성(6% vs 7%) (표 2) 및 상호 전좌를 포함한 염색체 재배열의 빈도(9% vs 9%) (표 3)를 증가시키지 않았다( $p>0.05$ ). 다른 연구에서도 극저주파 전자기장이 사람의 림프구에 염색체 이상, 자매염색분체교환 및 소핵과 같은 염색체 손상을 유발하지 않았음을 관찰하여[22, 23] 본 연구와 유사한 결과를 보고하였다. 그러나 최근 몇몇 연구자들은 극저주파 전자기장 자체도 자매염색분체교환이나 염색체 이상 등 유전독성을 나타낸다고 보고하였으며[4, 24] Winker 등[5]과 Ivancsits 등[6]도 50 Hz의 극저주파 전자기장을 주기적으로 중단하고 노출(intermittent exposure)하면 단독적으로 염색체에 손상을 줄 수 있다고 보고하여 전자기장이 생체에 미치는 영향을 명확하게 정의하기에는 논란이 많다.

한편, 극저주파 전자기장의 에너지는 매우 작아서 그 자체로는 유전독성을 나타내지 않지만 BLM에 의해 유발된 염색체 손상 정도를 극저주파 전자기장이 증진시키는 지 확인하기 위해 0, 0.2와 1  $\mu\text{g/ml}$  농도의 BLM을 전처리하고 0.8 mT의 극저주파 전자기장을 노출시킨 후 분석한 결과, BIM 농도에 따른 소핵, 이수성 그리고 염색체 재배열의 빈도는 전자기장 노출 그룹과 비노출 그룹 모두에서 통계적으로 유의하게 증가하여 양 반응 관계를 보여주었다( $p<0.05$ ). 1  $\mu\text{g/ml}$  농도의 BLM에 의해 유발된 소핵과 이수성의 빈도는 전자기장에 의해서 73% 에서 159%으로(표 1) 14%에서 28%으로(표 2) 유의하게 증가하였으며 상호전좌와 삼입을 포함한 염색체 재배열과 염색체 이상의 빈도는 전자기장에 의해 30%에서 36%, 21%에서 24%으로(표 3) 증가하는 양상을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다.

발암원에 의해 유전적 손상을 받은 세포는 염색체의 절단이 일어나거나 세포 분열 후기 또는 말기에서 방추사나 kinetochore 단백질의 결함으로 염색체의 불분리와 염색체 분실에 의해 두 말핵 내에 동일한 수의 염색체를 가지지 못하게 되는 이수성을 지니게 되고 그 결과 생성된 소핵 내에는 염색체의 절편 또는 염색체 전체가 포함된다[25, 26]. 표 1과 2에서, BLM에 의한 소핵, 1번과 4번 염색체의 불분리 현상으로 인한

Table 1. The Increment of Micronuclei Frequency by ELF-EMF Exposure in the Bleomycin-Treated Human Fibroblasts.

Exposure of EMF	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	No. of BN <sup>a</sup> cells	No. of MNCB <sup>b</sup>	No. of MNI <sup>c</sup>			Total No. of MN
				+1	+2	+3	
Sham	control	1,000	29	27	2	0	31
	0.2	1,000	33	29	4	0	37
	1	1,000	63	54	8	1	73*
ELF-EMF <sup>d</sup>	control	1,000	32	31	1	0	33
	0.2	1,000	43	39	3	1	48
	1	1,000	129	103	22	4	159*†

<sup>a</sup> Binucleated (BN).

<sup>b</sup> Micronucleated cytokinesis-blocked (MNCB).

<sup>c</sup> Micronuclei (MN).

<sup>d</sup> Extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMF).

\* Significant increase with bleomycin dose by Kendall's  $\tau$  calculated on cell bases ( $p<0.05$ ).

† Significant difference from the Sham exposed data determined by Mann-Whitney test on the significance level of  $p<0.05$ .

**Table 2.** The Increment in Aneuploidy in Chromosome 1 and 4 by ELF-EMF Exposure in the Bleomycin-Treated Human Fibroblasts.

Exposure of EMF	Dose (µg/ml)	No. of BN <sup>a</sup> cells	Normal cells <sup>b</sup>	Aneuploid BN cells		Total aneuploidy
				Non-disjunction	Chromosome loss	
Sham	control	1,000	991	6	1	7
	0.2	1,000	988	7	2	9
	1	1,000	984	11	3	14*
ELF-EMF <sup>c</sup>	control	1,000	994	5	1	6
	0.2	1,000	988	9	3	12
	1	1,000	972	22	6	28*†

<sup>a</sup> Binucleated.

<sup>b</sup> 2 signals in each daughter nuclei.

<sup>c</sup> Aneuploidy without signals in micronuclei. This includes 3+1 (3 signals in one daughter nuclei and 1 signal in another daughter nuclei) and 4+0 (4 signals in one daughter nuclei only).

<sup>d</sup> Aneuploidy with signals in micronuclei. This includes 2+1+1 (2 signals in one daughter nuclei and 1 signal in another daughter nuclei plus a micronuclei with positive signal), 1+1+2 (signal in each daughter nuclei plus micronucleus with 2 positive signals) and 2+0+2 (2 signals in one daughter nuclei plus micronucleus with 2 positive signals).

<sup>e</sup> Extremely low-frequency electromagnetic fields.

\* Significant increase with bleomycin dose by Kendall's  $\tau$  calculated on cell bases (p<0.05).

† Significant difference from the Sham exposed data determined by Mann-Whitney test on the significance level of p<0.05.

**Table 3.** The Frequency of Dicentrics, Insertions, Translocation and Number of Color Junctions Induced by Co-exposure to ELF-EMF and Bleomycin in Human Fibroblasts.

Exposure of EMF	Dose (µg/ml)	No. of cells scored	No. of cell equivalents	dicentric	insertion	Reciprocal	One-way	total translocation	color junctions	cells with junctions	total aberrant cells
Sham	control	100	34.4	0	1	2	3	5	9	6	6
	0.2	100	34.4	0	3	4	4	8	18	11	12
	1	100	34.4	3	3	9*	6*	15*	30*	18*	21*
EMF	control	100	34.4	0	1	2	3	5	9	6	6
	0.2	100	34.4	1	5	5	5	10	21	13	15
	1	100	34.4	2	5	10*	6*	16*	36*	19*	24*

\* Significant increase with bleomycin dose by Kendall's  $\tau$  calculated on cell bases (p<0.05).

이수성 및 염색체 분실로 인한 이수성은 모두 증가되었으며 극저주파 전자기장의 노출은 이들의 빈도를 유의하게 증가시켰다. Ding 등[27]은 CHO 세포에 1 Gy의 X-선을 조사하고 5 mT의 전자기장을 노출시켰을 때 염색체 전체를 포함한 소핵의 빈도가 X-선만 조사된 그룹보다 유의하게 증가하였음을 보고하였으며 McLean 등[28]의 동물 연구에서도 2 mT의 극저주파 전자기장이 DMBA의 발암성을 증폭시킨다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보여주었다. 또한 사람 림프구에 0.8 mT의 극저주파 전자기장과 B(a)P 또는 BLM을 함께 처리하여 분석한 본 연구자의 기존 연구에서도 극저주파 전자기장이 발암과정에서 조증진제로서 작용한다고 보고하여[11,12] 본 연구 결과와 일관성을 보여주고 있다. 그러나 F344 래트(rat)에 전자기장과 N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU)를 함께 처리한 Mandeville 등[29]과 Chung 등[30]의 연구에서는 전자기장이 조증진제로서 작용하지 않는다는 상반된 결과를 보고하였다.

이상에서 언급한 바와 같이 극저주파 전자기장의 영향은 연구자에 따라 달리 나타나는 것으로 보고되고 있으며 이는 실험에 이용된 세포의 종류나 실험조건, 즉 극저주파 전자기장의 효과를 보기 위한 실험에서 발암원 또는 자기장의 노출순서 및 시간에 따라 차이가 나는 것으로 알려져 있다[31].

일반적으로 발암과정을 개시단계-촉진단계-진행단계로 설명할 때 극저주파 전자기장이 암 유발 과정에 관여한다면 촉진단계 또는 진행단계에서의 효과를 증진(enhance)제로 작용하는 비유전독성 발암기전으로 작용한다는 가정이 가능하지만 발암과정은 매우 복잡하며 이 과정을 증진시키는 요인과 기전에 대해서는 일부분만이 알려져 있을 뿐이다. Juutilainen 등[9]은 co-carcinogenesis라는 개념을 이용하여 극저주파 전자기장의 발암증진 효과를 설명하였으며 세포가 유전독성물질에 의해 DNA가 손상되고 회복되어 다시 증식하는 전 과정에 극저주파 전자기장이 같이 작용할 수 있다고

보고하였다. 전자기장이 미치는 영향과 효과에 대한 기전은 아직까지 명확하게 알려진 것이 없으나 몇몇 연구에서는 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)가 극저주파 전자기장의 효과를 증대하는 것으로 보고한바 있다[32-34]. Wolf등 [24]도 HL-60 세포주와 섬유아세포를 이용한 그들의 연구에서 단시간의 극저주파 전자기장 노출은 활성산소를 유발함으로써 세포분열과 성장을 증식시킨다고 보고하였다. 또한 장시간의 전자기장 노출은 활성산소에 의한 DNA 손상이 세포내 축적되어 S기의 세포수가 증가하고 세포주기의 진행을 지연한다고 보고하였다. Gridland등 [35] 역시 사람 섬유아세포가 20에서 200  $\mu$ T의 극저주파 전자기장에 노출되었을 때 세포주기의 G1기가 지연됨을 관찰함으로써 극저주파 전자기장이 특정 세포주기에 관여한다고 보고하였다. 세포 주기의 지연은 염색체 불안정성[36-38]과 세포 분열시 오류 및 결함[39] 유도함으로써 이수성과 염색체 재배열 형성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에 이는 본 연구 결과에서 극저주파 전자기장이 BLM에 의한 소핵, 이수성 및 염색체 재배열 빈도를 증가시킨 것에 대한 설명이 될 수 있다. 그러나, 극저주파 전자기장의 유전독성에 대해서 결론을 내리기에는 아직도 많은 연구가 필요하며 명확한 생물학적 기전에 대해서도 차후 연구가 더욱 필요하다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 극저주파 전자기장이 단독적으로 소핵, 이수성 및 염색체 재배열과 같은 염색체 손상을 유도하는지 여부와 BLM에 의해 유발된 염색체 손상 빈도를 증진시키는지 확인하기 위해 사람 섬유아세포에 0, 0.2와 1  $\mu$ g/ml 농도의 BLM을 3시간 전처리 한 뒤 0.8 mT 세기의 극저주파 전자기장을 노출시킨 후 소핵, 1번과 4번 염색체의 이수성 및 상호전좌와 삽입 등을 포함한 염색체 재배열 빈도를 분석하였다. BLM의 농도에 따라 소핵, 이수성 및 염색체 재배열의 빈도가 유의하게 증가하였으며(p<0.05), 0.8 mT 세기의 전자기장은 사람 섬유아세포에 직접적인 손상을 유도하지 않았으나 극저주파 전자기장의 노출은 BLM에 의해 유발된 소핵과 이수성의 빈도를 유의하게 증가시켰다(p<0.05). 따라서 0.8 mT의 극저주파 전자기장은 사람 섬유아세포에 단독으로 유전독성을 일으키지 않지만, BLM에 의한 유전독성을 증가시킴으로써 조증진제(co-promotor)로 작용할 수 있다는 것을 보여준다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국 학술진흥재단의 지원으로 수행되었습니다(E00111).

#### 참고문헌

1. Wertheimer N, Lepper E. Childhood cancer in relation to indicators of magnetic fields from current sources. *Am. J. Epidemiol.* 1979;109:273-284.
2. Miller AB, To T, Agnew DA, Wall C, Green LM. Leukemia following occupational exposure to 60 Hz electric and magnetic fields among Ontario electric utility workers. *Am. J. Epidemiol.* 1996;144:150-160.
3. Savitz DA, Loomis DP. Magnetic field exposure in relation

- to leukemia and brain cancer mortality among electric utility workers. *Am. J. Epidemiol.* 1995;141:123-134.
4. Nordenson I, Mild KH, Järventaus H, Hirvonen A, Sandström M, Wilén J, Blix N, Norppa H. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of train engine drivers. *Bioelectromagnetics* 2001;22:306-315.
5. Winker R, Ivancsits S, Pilger A, Adlkofer F, Rudiger HW. Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Mutat. Res.* 2005;585:43-49.
6. Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Jahn O, Rüdiger HW. Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat. Res.* 2005;583:184-188.
7. Washburn EP, Orza MJ, Berlin J, Nicholson WJ, Todd AC, Frumkin H, Chalmers C. Residential proximity to electricity transmission and distribution equipment and risk of childhood leukemia, childhood lymphoma, and childhood nervous system tumors: Systematic review, evaluation, and meta-analysis. *Cancer Causes Control* 1994;5:299-309.
8. Kheifets LI, Afifi AA, Buffler PA, Zhang ZW. Occupational electric and magnetic field exposure and brain cancer: a meta-analysis. *J. Occup. Environ. Med.* 1995;37:1327-1341.
9. Juutilainen J, Lang S, Rytomaa T. Possible cocarcinogenic effects of ELF electromagnetic fields may require repeated long-term interaction with known carcinogenic factors. *Bioelectromagnetics* 2000;21:122-128.
10. Walleczek J, Shiu EC, Hahn GM. Increase in radiation-induced HPRT gene mutation frequency after nonthermal exposure to nonionizing 60 Hz electromagnetic fields. *Radiat. Res.* 1999;151:489-497.
11. Cho YH, Chung HW. The effect of extremely low frequency electromagnetic field (ELF-EMF) on the frequency of micronuclei and sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by benzo(a)pyrene. *Toxicol. Lett.* 2003;143:37-44.
12. Cho YH, Jeon HK, and Chung HW. Effects of Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields on Delayed Chromosomal Instability Induced by Bleomycin in Normal Human Fibroblast Cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 2007;70:1252-1258.
13. Loescher W, Mevissen M. Animal studies on the role of 50/60 Hz magnetic fields in carcinogenesis. *Life Sci.* 1994;54:1531-1543.
14. Mevissen M, Häußler M, Lerchl A, Löscher W. Acceleration of mammary tumorigenesis by exposure of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-100 $\mu$ T magnetic field: Replication study. *J. Toxicol. Environ. Health A* 1998;53:401-418.
15. Miyakoshi J, Yamagishi N, Ohtsu S, Mohri K, Takebe H. Increase in hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene mutations by exposure to high-density 50-Hz magnetic fields. *Mutat Res.* 1996;349:109-114.
16. Simko M, Dopp E, Kriehuber R. Absence of synergistic effects on micronucleus formation after exposure to electromagnetic fields and asbestos fibers in vitro. *Toxicol. Lett.* 1999;108:47-53.
17. Stronati L, Testa A, Villani P, Marino C, Lovisolo GA, Conti D, Russo F, Fresegna AM, Cordelli E. Absence of Genotoxicity in human blood cells exposed to 50Hz magnetic fields as assessed by comet assay, chromosome aberration, micronucleus and sister chromatid exchange analysis. *Bioelectromagnetics* 2004;25:41-48.
18. Testa A, Cordilli E, Stronati L, Lovisolo GA, Fresegna AM, Conti D, Villani P. Evaluation of genotoxic effect of low level 50Hz magnetic fields on human blood cells using different cytogenetic assays. *Bioelectromagnetics* 2004;25:613-619.

19. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 2000;455:81-95.
20. Sgura A, Antocchia A, Ramirez MJ, Marcos R, Tanzarella C, Degrassi F. Micronuclei, centromere-positive micronuclei and chromosome nondisjunction in cytokinesis blocked human lymphocytes following mitomycin C or vincristine treatment. *Mutat. Res.* 1997;392:97-107.
21. Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, Bauchinger M, Blakey D, Cornforth MN, Littlefield LG, Natarajan AT, Shasserre C. A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet.* 1995;68:211-221.
22. Cohen MM, Kunska A, Astemborski JA, McCulloch D. The effect of low-level 60-Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells. II. Sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutat. Res.* 1986;172:177-184.
23. Antonopoulos A, Yang B, Stamm A, Heller WD, Obe G. Cytological effects of 50 Hz electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 1995;346:151-157.
24. Wolf FI, Torsello A, Tedesco B, Fasanella S, Boninsegna A, D'Ascenzo M, Grass IC, Azzena GB, Cittadini A. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: Possible involvement of a redox mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1743:120-129.
25. Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 1976;41:321-332.
26. Vig BK, Sweargin SE. Sequence of centromere separation: Kinetochores formation in induced lagards and micronuclei. *Mutatgenesis* 1986;1:461-465.
27. Ding GR, Nakahara T, Miyakoshi J. Induction of kinetochores-positive and kinetochores-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. *Mutagenesis* 2003;18:439-443.
28. McLean JR, Thansandote A, Lecuyer D, Goddard M, Tryphmas L, Scaiano JC, Johnson F. A 60 Hz magnetic field increases the incidence of squamous cell carcinomas in mice previously exposed to chemical carcinogens. *Cancer Lett.* 1995;92:121-125.
29. Mandeville R, Franco E, Sidrac-Ghali S, Paris-Nadon L, Rocheleau N, Mercier G, Désy M, Devaux C, Gaboury L. Evaluation of the potential promoting effect of 60 Hz magnetic fields on N-ethyl-N-nitrosourea induced neurogenic tumors in female F344 rats. *Bioelectromagnetics* 2000;21:84-93.
30. Chung MK, Kim YB, Ha CS, Myung SH. Lack of a co-promotion effect of 60 Hz rotating magnetic fields on N-ethyl-N-nitrosourea induced neurogenic tumors in F344 rats. *Bioelectromagnetics* 2008;29:539-548.
31. Yaguchi H, Yoshida M, Ejima Y, Miyakoshi J. Effect of high-density extremely low frequency magnetic field on sister chromatid exchanges in mouse m5S cells. *Mutat. Res.* 1999;440:189-194.
32. Katsir G, Parola AH. Enhanced proliferation caused by a low frequency weak magnetic field in chick embryo fibroblasts is suppressed by radical scavengers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;252:753-756.
33. Lacy-Hulbert A, Metcalfe JC, Hesketh R. Biological responses to electromagnetic fields. *FASEB J.* 1998;12:395-420.
34. Fernie KJ, Reynolds SJ. The effects of electromagnetic fields from power lines on avian reproductive biology and physiology: A review. *J. Toxicol. Environ. Health B* 2005;8:127-140.
35. Cridland NA, Haylock RG, Saunders RD. 50 Hz magnetic field exposure alters onset of S-phase in normal human fibroblasts. *Bioelectromagnetics* 1999;20:446-452.
36. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* 2005;5:773-785.
37. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998;392:300-303.
38. Fojer F, Draviam VM, Sorger PK. Studying chromosome instability in the mouse. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;26: In press.
39. Takahashi T, Haruki N, Nomoto S, Masuda A, Saji S, Osada H, Takahashi T. Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and p55CDC, in human lung cancers. *Oncogene* 1999;18:4295-4300.

## The Effect of Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields on the Chromosomal Instability in Bleomycin Treated Fibroblast Cells

Yoon Hee Cho, Yang Jee Kim, Joong Won Lee, Gye Eun Kim and Hai Won Chung  
School of Public Health, Seoul National University

**Abstract** - In order to determine the effect of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) on the frequency of micronuclei (MN), aneuploidy and chromosomal rearrangement induced by bleomycin (BLM) in human fibroblast cells, a 60 Hz ELF-EMF of 0.8 mT field strength was applied either alone or with BLM throughout the culture period and a micronucleus-centromere assay was performed. Our results indicate that the frequencies of MN, aneuploidy and chromosomal rearrangement induced by BLM increased in a dose-dependent manner. The exposure of cells to 0.8 mT ELF-EMF followed by BLM exposure for 3 hours led to significant increases in the frequencies of MN and aneuploidy compared to BLM treatment for 3 hours alone ( $p < 0.05$ ), but no significant difference was observed between field exposed and sham exposed control cells. The obtained results suggest that low density ELF-EMF could act as an enhancer of the initiation process of BLM rather than as an initiator of mutagenic effects in human fibroblast.

**Keywords** : Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields, Bleomycin, Micronuclei, Aneuploidy, Chromosomal Rearrangement