

## 극 저주파 전자기장이 N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine과 Sulfadimethoxine에 의해 유발된 갑상샘 암에 미치는 영향

중앙대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>병리학교실, <sup>2</sup>영상의학교실

이수환<sup>1</sup> · 박용진<sup>1</sup> · 박언섭<sup>1</sup> · 김용석 · 최유신 · 김범규 · 박성준 · 정세민<sup>2</sup>

### Effects of Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields on Thyroid Carcinogenesis Induced by N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and Sulfadimethoxine

Soo Hwan Lee, M.D.<sup>1</sup>, Young Jin Park, M.D.<sup>1</sup>, Eon Sub Park, M.D.<sup>1</sup>, Young Seok Kim, M.D., Yoo Shin Choi, M.D., Beom Gyu Kim, M.D., Sung Jun Park, M.D., Se Min Chong, M.D.<sup>2</sup>

Departments of Surgery, <sup>1</sup>Pathology, <sup>2</sup>Radiology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

**Purpose:** Long-term exposure to extremely low-frequency (60 Hz) electromagnetic fields (ELF-EMF) raises the questions of the induction of biological effects including tumorigenesis. One mechanism through which ELF-EMF could influence neoplastic development is the imbalance of cellular proliferation and cell apoptosis. The present study investigated the effect of ELF-EMF on chemically-induced thyroid carcinogenesis in a rat.

**Methods:** We examined cellular proliferation index measured by anti-Ki-67 antigen, apoptosis, apoptosis related proteins such as caspase 3 and p53, and cell cycle-related proteins (cyclin D1 and p21<sup>WAF1/Cip1</sup>). Forty Male F344 rats received a subcutaneous N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN, 2,800 mg/kg) injection, and 1 week later were allowed free access to drinking water containing sulfadimethoxine (0.1%) for 12 weeks. Twenty rats were exposed by ELF-EMF. During the carcinogenesis, sequential histological changes from hyperplasia, adenoma, and ultimately to overt carcinomas were noted.

**Results:** The exposure group of ELF-EMF, significantly increases the number size of carcinomas. Also, the proliferative and apoptotic indices were significantly increased in the ELF-EMF exposure group than in the control group. The caspase 3 protein expression did not show any significant changes between ELF-EMF group and control group. The p53 protein was not detected in both ELF-EMF exposure and control group. Among the cell cycle related proteins, cyclin D1, not p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, was significantly increased in adenomas and carcinomas in ELF-EMF exposure group compared with the control group.

**Conclusion:** Exposure of ELF-EMF effects on chemically-induced rat thyroid carcinogenesis as results of altered increase of cellular proliferation, apoptosis, and cyclin D1 expression. (J Korean Surg Soc 2009;77:161-169)

**Key Words:** Extremely low frequency magnetic field, Thyroid carcinogenesis, N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN), Apoptosis, Cell cycle-related proteins

**중심 단어:** 극 저주파 전자기장, 갑상샘 발암, N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN), 세포자멸사, 세포주기 관련 단백질

책임저자: 박성준, 서울시 동작구 흑석동 224-1

☎ 156-755, 중앙대학교병원 외과

Tel: 02-6299-1545, Fax: 02-824-7869

E-mail: kimb0526@paran.com

접수일 : 2009년 2월 8일, 게재승인일 : 2009년 7월 2일

## 서론

갑상샘 암은 내분비암중 가장 흔한 암으로 최근 들어 발

생물이 급격히 증가하고 있다. 이러한 암 발생의 증가는 경부초음파의 기술적 향상에 의한 조기 진단 뿐만 아니라, 발암물질, 방사선을 포함한 환경유해 및 내분비교란물질에의 노출 등 그 원인이 다양하다.

극저주파 전자기장은 변압기, 일반 가전기기 등 교류전류가 흐르는 곳에서 흔히 발생되며 주파수가 일반적으로 300 Hz 이하이고, 인체에 다양한 생체반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.(1) 종양유발과 관련되어서는 실험동물에서 지속적인 극저주파 전자기장의 노출이 DNA 손상과 염색체 이상 등 유전적 독성을 유발시킴이 보고되었다.(2) 인체에서는 1996년 미국 National Institute of Environmental Health Sciences에서 성인에서의 만성 림프성 백혈병과 소아 백혈병과의 관련성을 발표하였고, 전력선에서 발생하는 자기장에 지속적으로 노출된 철도근로자에서 백혈병 유병률이 높다는 연구보고도 있다.(3) 또한 Cho 등(4)은 실험동물에 benzopyrene과 vinblastin을 투입하고 동시에 극저주파 전자기장에 노출시키면 돌연변이가 발생된다고 하였다. 그렇지만 극저주파 자기장의 종양발생에 대한 효과는 아직까지 일관된 결과가 없고 더구나 갑상샘 암에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다.

최근 *N*-bis(hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)을 흰쥐 피하에 투여 후 항균제인 Sulfadimethoxine (SDM)을 음용시키는 2단계 갑상샘 발암모델이 확립된 이후 짧은 기간에 갑상샘 종양의 유발 및 억제효과를 판별할 수 있게 되었다. DHPN에 의한 발암기전은 대사산물인 alkylating agent로 갑상샘 소포세포의 DNA 손상에 따른 유전적 돌연변이를 일으키는 개시제로 작용하며, SDM은 갑상샘 내에서 과산화효소의 작용을 억제해 갑상샘 호르몬 생성을 억제시켜 뇌하수체와 갑상샘의 역피드백기전을 통하여 갑상샘 종양을 유발시키는 촉진제로 작용한다.(5) 이러한 2단계 갑상샘 발암모델은 인체에서 발생하는 갑상샘의 증식성 결절, 소포샘종의 발생에 이어 인체에서 발생하는 소포암과 형태학적으로 유사한 병변이 초래되어 이상적 모델로 이용되고 있다.

본 연구에서는 DHPN과 SDM에 의해 유도된 흰쥐의 갑상샘암종의 형태변화를 관찰한 다음, 극저주파 전자기장의 지속적 노출이 갑상샘 암종의 발생 및 진행과정에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 극저주파 전자기장의 노출이 종양형성과 관련 있는 세포증식능(Ki-67)과 세포자멸사, 세포주기조절인자(cyclin D1, p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p53), 세포자멸사 관련인자(caspase 3, p53)에 어떠한 변화를 초래하는지 알아보고자 하였다.

## 방 법

### 1) 실험동물

실험동물은 생후 5주된 수컷 F344 랫드(Samataco Bio, Korea) 40마리를 실험에 사용하였다. 실험동물은 1주 동안 적응시킨 후 대조군 20마리, 실험군 20마리로 나눈 다음 사육 케이지에 5마리씩 넣어 사육하였다. 고형사료(Samyang Feed Co, Korea)와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 2) 극저주파 전자기장 발생장치

극저주파 전자기장은 3개의 Helmholtz 코일을 지면과 평행하게 배치하여 수직적인 전자기장 조사를 할 수 있도록 고안하였다. 고안된 극저주파 전자기장 발생 장치는 내부의 간섭현상을 최대한 방지하기 금속이 없는 나무 목재로 제작하였다(Fig. 1). 이 발생 장치에서는 입력 전압에 따라 극저주파 주파수인 60 Hz 자기장 최대 20 G를 방출하였다.

### 3) 시험물질 및 투여방법

(1) 동물실험: 시험에 사용한 DHPN (Nacalai tesque Inc. Kyoto, Japan) 2,800 mg/kg을 1회 피하 투여 후 1주일이 경과한 다음 음용수에 SDM (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)을 0.1% 농도로 12주간 공급하였다. DHPN과 SDM의 투여 용량은 이전의 연구결과들로부터 갑상샘 암을 유발할 수 있는 용량으로 설정하였다.(6) 실험군은 극저주파 전자기장 노출 장치에 실험시작과 종료 시까지 노출(60 Hz, 15



Fig. 1. In vivo extremely low frequency electromagnetic fields generator.

G)시키고 대조군은 자기장 노출 없이 동일 조건에서 사육하였다.

(2) 병리조직검사: 시험물질을 12주간 투여한 후 부검하여 갑상샘을 적출한 후 무게를 측정하고 10% 중성포르말린 용액에 고정 후 통상적인 방법으로 파라핀으로 포매 후 5  $\mu$ m 두께의 조직표본을 만들어 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 갑상샘의 형태적 기준은 Boorman 등(7)의 판정 기준에 따라 갑상샘 소포 증식증, 소포샘종, 그리고 소포샘 암으로 분류한 다음 화상분석기(Spot insight V4.1, USA)를 이용하여 각각 병변의 수를 측정하였다.

(3) 면역조직화학 염색: 파라핀 포매조직을 통상적인 방법으로 알코올로 함수과정을 거쳐 감추어진 항원을 노출시키기 위해 citric acid 완충액에 넣고 고압극초단파(750 W)에서 20분간 처리한 다음 실온에서 30분간 식힌 후 Tris 용액으로 세척하고 avidin-biotin complex 방법을 이용하여 일련의 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 일차항체로 세포증식능은 생쥐 단클론 Ki-67 (Novocastra, Newcastle, UK, 1 : 1,000), cyclin D1 (Neomarkers, Fremont, USA, 1 : 100), p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (Santa Cruz, UK, 1 : 100), p53 (Neomarker, Fremont, CA, USA, clon, MS-104, 1 : 100), 그리고 caspase 3 (Abcam, Cambridge, MA, USA, rabbit polyclonal, ab4051-500, 1 : 100)를 실온에서 2시간 반응시켰다. 발색제는 3-amino-9-ethyl carbazol (AEC)로 염색하고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 글리세린으로 봉입한 다음 현미경으로 관찰하였다. 면역조직화학 염색의 음성대조군은 갑상샘 조직에서 일차항체를 처리하지 않은 것을 이용하였다. 염색의 판정은 실험군과 대조군의 갑상샘에서 관찰된 증식증, 샘종, 그리고 샘암종을 구성하는 세포에서 Ki-67, cyclin D1, p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p53 항체는 음성 대조군에 비해 병변세포의 핵에, 그리고 caspase 3 항체는 세포질에 갈색으로 진하게 염색된 것을 양성으로 판독하였으며 각 병변 당 4부위에서 관찰하여 백분율(%)을 구하였다.

(4) Apoptotic index: HE 슬라이드를 이용하여 apoptosis를 관찰하였으며 저배율상 apoptosis가 가장 활발한 부위를 선택한 후 400배 시야에서 apoptosis 수를 세고 백분율을 구하였다(apoptotic index, AI). H&E 염색에서 진한 호산성 세포질을 갖는 작고 진한 핵 절편을 apoptosis로 정의하였다.

#### 4) 통계학적 분석

실험적 갑상샘 암의 발생과정에서 극저주파 자기장 노출군과 비노출군에서 출현하는 갑상샘의 증식증, 샘종, 그리

고 암의 발생빈도는 Windows용 SPSS (version 12.0) 통계 프로그램을 이용하여 ANOVA test와 Chi-square검정을 실시하여, P값이 0.05 이하일 때를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

## 결 과

### 1) 갑상샘의 무게 변화

부검 시 DHPN과 SDM을 12주간 투여 후 극저주파 전자기장 노출군과 비노출군에서 육안적으로 갑상샘은 양쪽 모두 증대되어 기관지와 주변의 결합조직을 압박하고 있었다. 장기 중량 측정결과 자기장 노출군은  $0.37 \pm 0.10$  g이었고 비노출군에서는  $0.28 \pm 0.03$  g으로 노출군에서 비노출군보다 갑상샘 무게가 증가하는 양상을 보였으나 통계적 유의성은 없었다( $P > 0.05$ ).

### 2) 병리조직학적 소견(Table 1)

DHPN과 SDM을 12주 병행투여 후에 관찰한 소견은 극저주파 전자기장 노출군에서 상대적으로 갑상샘 소포 증식증(Fig. 2A)과 샘종(Fig. 2B)의 발생빈도가 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 그렇지만 갑상샘 암(Fig. 2C)은 자기장 노출군이 비노출군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다( $P = 0.012$ ).

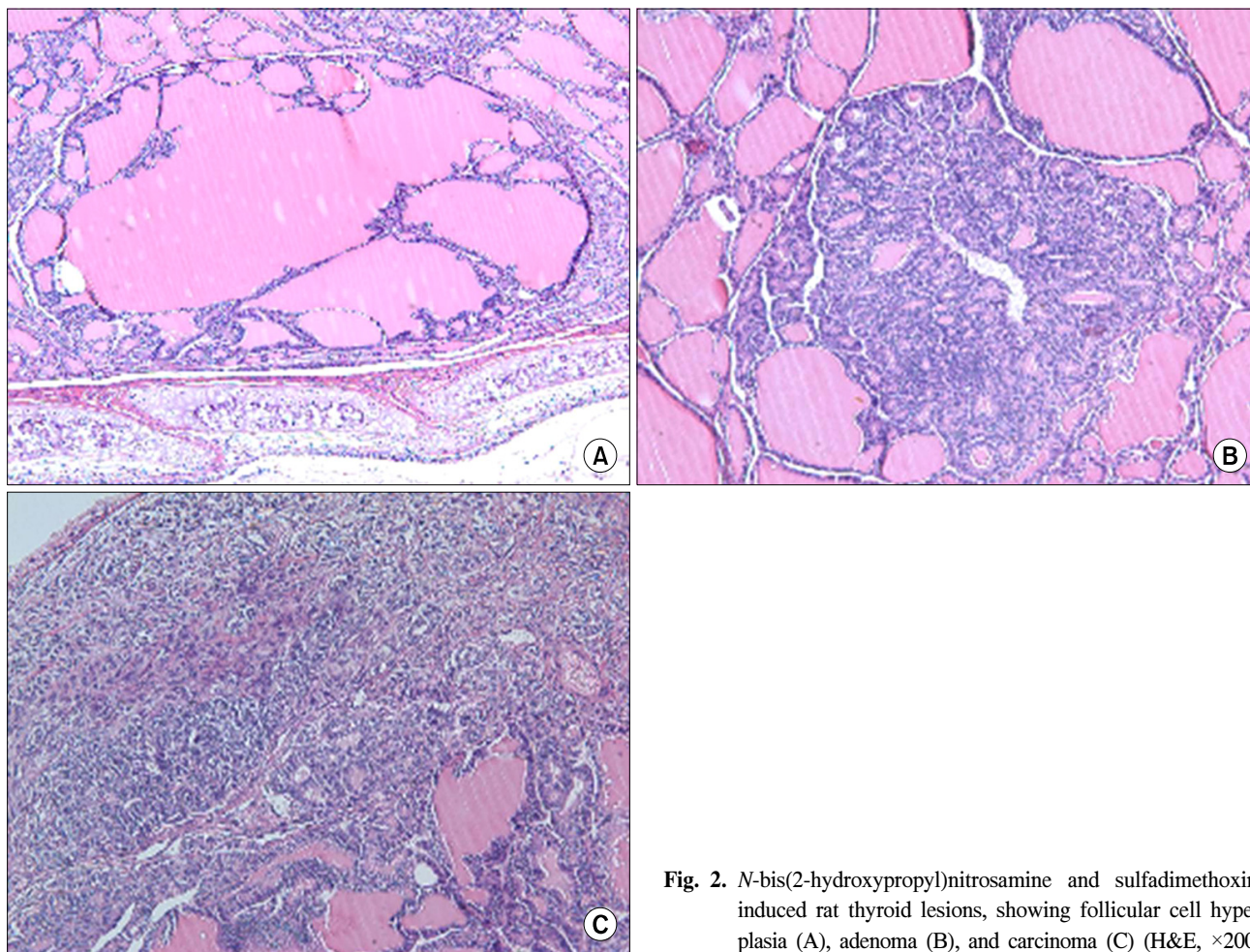
### 3) 세포증식능과 세포자멸사(Table 2)

DHPN과 SDM을 12주 병행투여 후 극저주파 전자기장 노출 실험군과 비노출시킨 대조군에서 관찰된 갑상샘 병변의 세포증식능 빈도는 갑상샘 소포 증식증과 샘종에서 실험군이 대조군에 비해 경미하게 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다( $P > 0.05$ ). 그렇지만 암종의 경우 실험군  $7.64 \pm 5.16\%$ , 대조군  $3.89 \pm 3.33\%$ 로 나타나 통계적으로

**Table 1.** Thyroid lesions in rat after 12 weeks treated with *N*-bis(hydroxypropyl)nitrosamine and sulfadimethoxine

	Control	ELF exposure*	P-value
No. of rats	20	20	
Tumor multiplicity/rat			
Hyperplasia	$0.70 \pm 0.92$	$1.37 \pm 1.41$	0.068
Adenoma	$2.25 \pm 1.77$	$2.47 \pm 1.52$	0.647
Carcinoma	$0.45 \pm 0.60$	$1.13 \pm 1.12$	0.012

\*ELF exposure = extremely low frequency exposure; Values are mean  $\pm$  SD.



**Fig. 2.** *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and sulfadimethoxine induced rat thyroid lesions, showing follicular cell hyperplasia (A), adenoma (B), and carcinoma (C) (H&E,  $\times 200$ ).

**Table 2.** Ki-67 and apoptotic labeling index of the rat thyroid lesions

	Control	ELF exposure*	P-value
Ki-67 index (%)			
Hyperplasia	0.12 $\pm$ 0.22	0.14 $\pm$ 0.29	0.76
Adenoma	0.28 $\pm$ 0.35	0.36 $\pm$ 0.59	0.31
Carcinoma	3.89 $\pm$ 3.33	7.64 $\pm$ 5.16	0.04
Apoptotic index (%)			
Hyperplasia	0.06 $\pm$ 0.23	0.10 $\pm$ 0.29	0.61
Adenoma	0.18 $\pm$ 0.38	0.12 $\pm$ 0.32	0.38
Carcinoma	1.54 $\pm$ 0.66	0.89 $\pm$ 0.78	0.01

\*ELF exposure = extremely low frequency exposure; Values are mean $\pm$ SD.

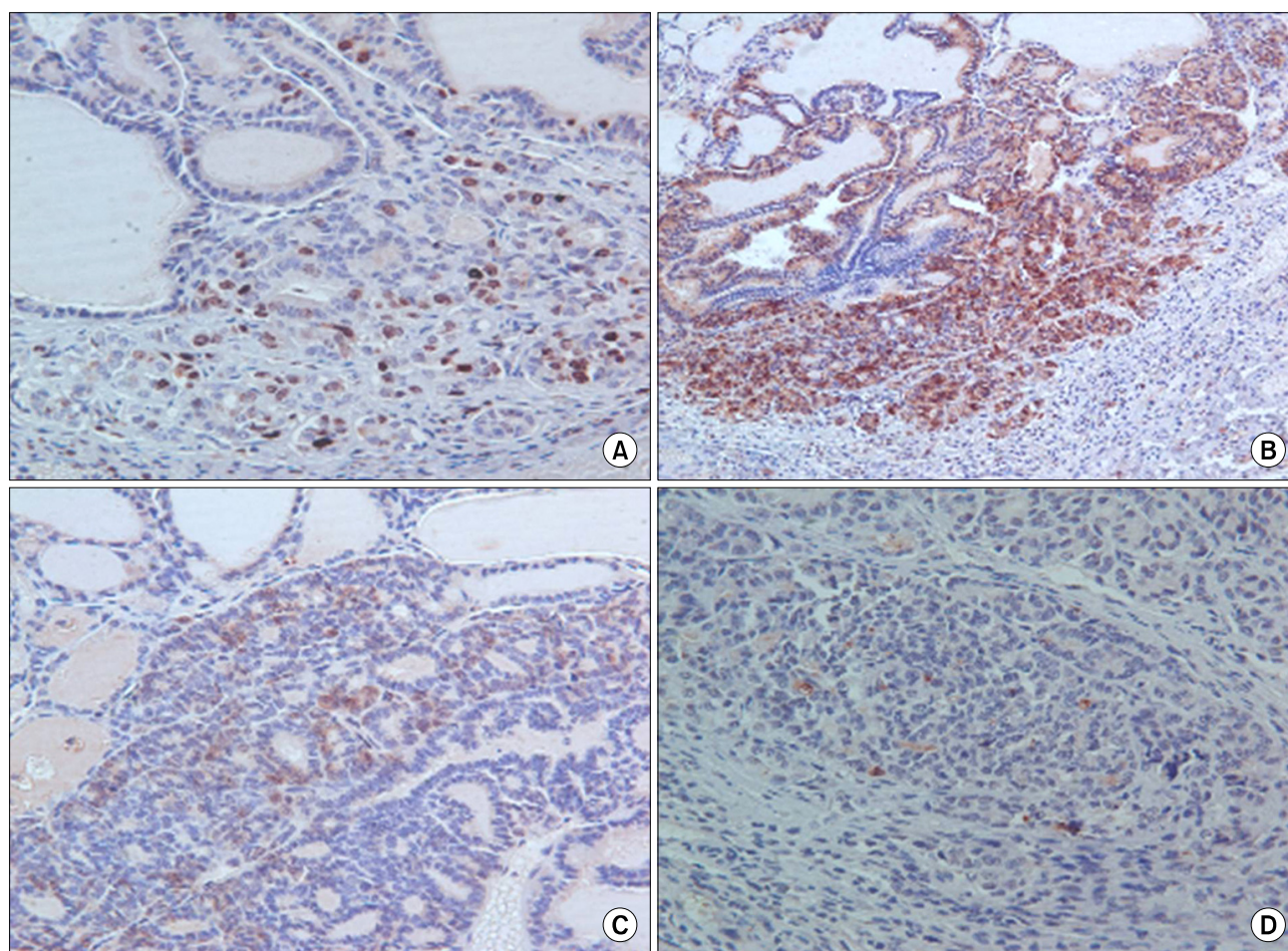
유의하게 증가하였다( $P=0.045$ , Fig. 3A). Apoptosis 빈도도 세포증식능과 유사하게 갑상샘 소포 증식증과 샘종 두 군 사이에 유의한 차이가 없었으나 갑상샘 암에서는 실험군 1.54 $\pm$ 0.66%, 대조군 0.89 $\pm$ 0.78%로 나타나 실험군에서 통계

적으로 유의하게 증가하였다( $P=0.014$ ).

#### 4) 면역조직화학염색에 의한 Cyclin D1, p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p53, 그리고 caspase 3 발현양상

DHPN과 SDM을 12주 병행투여 후 극저주파 전자기장 노출 실험군과 비노출시킨 대조군에서 관찰된 면역조직염색 소견은 Table 3과 4에 표시하였다. 갑상샘 병변에서 cyclin D1 발현율은 갑상샘 소포 증식증에서는 실험군에서 3.46 $\pm$ 2.31%, 대조군에서 2.29 $\pm$ 1.20%로 발현율의 차이는 없었다. 그렇지만 갑상샘종에서는 실험군 18.53 $\pm$ 4.19%, 대조군에서는 11.60 $\pm$ 3.87%로 샘종에서 증가하는 경향을 보였다( $P=0.013$ ). 또한 암의 경우 실험군과 대조군에서 각각 53.80 $\pm$ 11.04%와 37.78 $\pm$ 11.63%로 통계적으로 유의하게 증가하였다( $P<0.001$ , Fig. 3B). p21<sup>WAF1/Cip1</sup> 단백질은 갑상샘 소포 증식증에서는 실험군과 대조군 모두 거의 발현되지 않았다. 샘종의 경우 발현율이 증가하였으나 실험군과 대





**Fig. 3.** Immunohistochemical reactivity of Ki-67 (A), p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (B), cyclin D1 (C), and caspase 3 (D) expression (ABC, ×200).

**Table 3.** Cyclin D1 and p21<sup>WAF1/Cip1</sup> protein labeling index of the rat thyroid lesions

	Control	ELF exposure*	P-value
Cyclin D1 index (%)			
Hyperplasia	2.29±1.20	3.46±2.31	0.075
Adenoma	11.60±3.87	18.53±4.19	0.013
Carcinoma	37.78±11.63	53.80±11.04	0.001
p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> index (%)			
Hyperplasia	0.14±0.53	0.31±0.84	0.476
Adenoma	15.83±6.87	17.72±8.19	0.196
Carcinoma	41.66±17.67	48.71±12.95	0.062

\*ELF exposure = extremely low frequency exposure; Values are mean±SD.

**Table 4.** Caspase 3 and p53 protein labeling index of the rat thyroid lesions

	Control	ELF exposure*	P-value
Caspase 3 index (%)			
Hyperplasia	0.06±0.23	0.17±0.37	0.253
Adenoma	0.81±0.95	0.65±0.81	0.353
Carcinoma	2.94±2.35	1.33±1.58	0.06
p53 index (%)			
Hyperplasia	—	—	—
Adenoma	—	—	—
Carcinoma	—	—	—

\*ELF exposure = extremely low frequency exposure; Values are mean±SD.

조군 사이에 유의한 차이는 없었다. 또한 암에서도 실험군 48.71±12.95%, 대조군에서 41.66±17.67%로 암에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다( $P>0.05$ , Fig. 3C). p53 단백질은 DHPN과 SDM을 이용한 갑상샘암 발생

과정에서 관찰되는 소포 증식증, 샘종, 그리고 암 모두에서 발현되지 않았다. Caspase 3 단백질의 경우 실험군의 갑상샘 소포 증식증과 샘종에서 각각 0.17±0.37%, 0.06±0.23%, 그리고 대조군에서는 0.65±0.81%와 0.81±0.95%로 유의한

차이가 없었다( $P>0.05$ ). 그렇지만 갑상샘 암의 경우 실험군에서  $1.33\pm 1.58$ , 대조군에서는 오히려  $2.94\pm 1.65$ 로 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다( $P>0.05$ , Fig. 3D).

## 고 찰

화학적 발암물질에 의한 세포의 암화 과정은 일반적으로 개시(initiation), 촉진(promotion) 및 진행(progression) 등의 다단계로 구분된다. 개시단계는 발암원에 의해 세포의 DNA가 손상 혹은 변형되어 암세포의 유전형질을 갖는 세포로 변환되는 세포 내 과정으로 점차 촉진단계를 통해 활동성이 큰 암세포로 전환되고, 2차적인 유전적 변화에 의한 전개과정을 통해 형질 전환된 세포만이 증식되어 악성종양으로 진행된다.(8) 악성종양의 발달에 극저주파 전자기장의 역할은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않은 실정이다. 그렇지만 송전선 주변에서 발생하는 극저주파 전자기장의 지속적 노출이 백혈병과 뇌종양 발달의 위험요소와 관련되어 있고,(9) 또한 IARC (International Agency for Research on Cancer)에서 극저주파 전자기장을 암을 유발할 수 있는 가능성이 있는 물질, 즉 Class 2B로 분류한 점으로 미루어 종양유발에 극저주파 전자기장이 어느 정도 관련이 있으리라 추측된다.(10) 현재까지 극저주파 자기장의 노출에 의한 생물학적 영향은 세포막의 분자구조나 이온채널의 변형을 통한 세포 내 신호전달체계 이상을 초래한다고 보고되어 있다.(11) 따라서 극저주파 전자기장 노출이 지속적일 경우 세포의 변화가 있을 수 있고, 여기에 발암원에 동시 노출될 경우 세포의 이상변화를 일으킬 개연성은 충분히 있다.

본 연구는 극저주파 전자기장의 지속적 노출이 화학적 발암원에 의해 유도된 갑상샘암 발생단계에서 어떠한 역할을 하는지 알아보고자 하였다. 연구 결과 DHPN과 SDM을 12주 병행투여 후에 관찰한 소견은 극저주파 전자기장 노출군에서 상대적으로 비노출군에 비해 갑상샘 소포 증식증과 샘종의 발생빈도가 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 그렇지만 갑상샘 암종은 극저주파 전자기장 노출군이 비노출군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다. 또한 조직학적으로도 극저주파 전자기장 노출군의 암종이 비노출군에 비해 세포들의 분화도가 좋지 않았고 피사소견도 빈번하였다. 이러한 소견은 극저주파 전자기장의 지속적 노출이 화학적 발암원에 의한 갑상샘 암 발생과정의 촉진 및 전개단계에서 주 역할을 한다고 생각한다. 이러

한 결과는 쥐의 피부종양 발달 실험에서 단지 종양 개시자로 처리 시 극저주파 전자기장의 노출 그룹과 비노출군에서 어떠한 종양도 발생하지 않았으며, 종양 개시자와 충분한 종양 촉진자를 투여할 경우 극저주파 전자기장 노출군이 비노출군에 비해 피부 종양의 발생이 통계적으로 유의하게 증가한 결과와도 일치한다.(12) 또한 이론적으로 저주파 전자기장이 DNA에 직접적인 손상을 야기할 정도로 충분한 양의 에너지를 갖고 있지 못하다는 점에서 본 실험에서 나타난 결과와 같이 지속적 극저주파 전자기장의 노출이 갑상샘암 발생과정에서 종양발생의 개시단계 보다는 촉진 및 전개 단계에 영향을 미치는 것으로 생각한다.(13)

일반적으로 종양의 형성에 가장 기본적인 요소로 세포의 증식과 세포자멸사의 수적인 불균형이 필수적이다. 세포증식에 관여하는 대표적 인자인 Ki-67 항원은 비 히스톤 핵단백질로 세포주기의 휴지기인 G0와 초기 G1기를 제외한 모든 세포주기에서 발현되어 증식세포의 특징적인 표지자가 될 수 있고, 후향적으로 파라핀 포매조직으로도 측정이 가능하기 때문에 널리 사용되고 있다.(14) 본 실험에서 DHPN과 SDM을 12주 병행투여 후 극저주파 전자기장 노출 실험군과 비노출군인 대조군에서 관찰된 갑상샘 병변의 세포증식능 빈도는 갑상샘 소포 증식증과 샘종에서 실험군이 대조군에 비해 경미하게 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 그렇지만 암종의 경우 실험군  $7.94\pm 4.16\%$ , 대조군  $3.89\pm 3.33\%$ 로 나타나 통계적으로 유의하게 증가하였다( $P=0.045$ ). 이러한 연구결과는 인체 백혈병 암세포와 정상 섬유아세포에 50 Hz에 72시간 노출하였을 경우 산화환원 반응에 기인한 NF-kappa B와 연관되어 있는 p65-p50 단백질의 유도에 의한 세포증식지수의 증가와 관련 있다는 Wolf 등(15)의 연구와 부분적으로 일치하였다. 그러나 누드 생쥐에 인체 대장암세포주를 접종 후 50 Hz 전자기장에 매일 70분간 4주 연속 노출 시 종양세포의 증식능과 유사분열지수가 감소하였다는 상반된 보고와 인체 유방암 세포주나 정상 상피 세포주에 60 Hz 전자기장에 72시간 노출하였을 경우 세포증식은 변화가 없다는 보고도 있다.(16,17) 따라서 세포증식에 대한 전자기장의 효과는 세포의 유형마다 다르게 작용하며, 본 연구에서는 극저주파 자기장노출은 갑상샘암 발생과정에서 발암원에 의해 변형된 세포에서 분열을 촉진하는 종양촉진자로서의 역할이 있는 것으로 추측된다.

종양형성에 세포자멸사의 역할은 발암원에 의해 손상된 DNA를 가진 변형세포가 세포자멸사에 의해 제거되지 않은 비정상적인 세포의 수명의 연장에 의해 종양이 발생하는

것으로 보고되어 있다. 세포자멸사를 조직에서 정량적으로 검색하는 방법으로는 H&E 염색을 이용하는 경우와 TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 방법이 일반적으로 널리 사용되고 있다. TUNEL 방법은 비교적 민감도가 높은 방법으로 알려져 있으나 괴사병소나 염증세포에서 비특이적인 반응을 보일 수 있는 단점이 있다. 따라서 형태적 소견에 숙련된 경우에는 H&E 염색만으로도 세포자멸사를 충분히 검색할 수 있다.(18) 본 실험에서 세포자멸사 확인을 위해 TUNEL 방법으로 시도하였으나 괴사부위 등에서 비특이적 반응이 나타나 형태적 관찰로만 확인하였다. 세포자멸사 지수는 갑상샘암 발생과정에서 전자기장에 지속적으로 노출시킨 군에서 비노출군보다 통계적으로 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 생쥐에게 60 Hz 전자기장에 8주간 노출 시 고환 생식세포에서 내분비적인 환경의 교란과 시상하부-뇌하수체-생식기 축의 억제로 인해 세포자멸사가 증가하는 Lee 등(19)의 결과와 일치하였다. 전자기장 노출과 세포자멸사에 대한 기전은 세포 내 이온평형, 특히 미토콘드리아 내 칼슘의 증가에 의한 미토콘드리아나 cytochrome c 분비 촉진에 의한 protease 활성화에 의해 세포자멸사가 촉진된다고 알려져 있다.(20) 그렇지만 인체 유방암 세포주에서 60 Hz 자기장에 24시간 노출시켰을 경우 세포자멸사의 변화는 관찰되지 않았고 유방암 세포주인 MCF-7에 타목시펜을 처리한 후에 노출시켰을 때는 세포자멸사가 감소되었다는 상반된 보고도 있다.(21,22) 따라서 전자기장과 세포자멸사에 대한 연구는 추가적인 검증이 필요할 것으로 생각한다. Caspase-3는 세포자멸사의 과정에 가장 직접적으로 작용하여 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그 기전으로 미토콘드리아 막 단백질인 bcl-2가 미토콘드리아의 투과성을 변화시켜 cytochrome c와 세포자멸사 유발인자의 분비를 막아 세포자멸사를 억제하는데 세포자멸사 유발인자가 분비되면 비활성화된 caspase-3를 활성화시켜 세포자멸사를 진행시킨다.(23) 본 연구에서 caspase-3의 세포표지지수는 갑상샘 증식증, 샘종, 그리고 암으로 진행할수록 증가한다는 것을 알 수 있어 갑상샘 암의 발생과 진행에 이들이 관여함을 알 수 있다. 그렇지만 극저주파 전자기장 비노출군의 암에서 노출군보다 caspase-3의 발현이 통계적으로 유의하게 증가하였고( $P=0.050$ ), 또한 암에서 caspase-3 세포표지지수가 세포자멸사지수 보다 높게 나왔는데 그 이유는 본 실험에 사용된 caspase-3는 활성화 되기 전의 pro-caspase-3 분자에도 반응하였기 때문으로 생각한다. 따라서 caspase-3 활성화가 세포자멸사의 유발에는 중요

한 역할을 하나 상관관계가 뚜렷하지 않아 caspase-3 이외의 다른 경로와 과정이 동시에 작용한다고 추측된다. p53은 종양억제 유전자로 세포주기와 세포자멸사를 조절하는 대표적인 유전자이다. 유전자 산물인 p53 단백질은 손상된 세포 DNA의 정상으로의 복구와 경우에 따라 손상이 심한 경우 계획된 세포자멸사를 유도함으로써 변이세포의 반복적인 복제에 의한 종양발생을 억제시킨다. 그러나 돌연변이형 p53은 이러한 정상기능을 상실하여 종양형성을 촉진시키는 역할을 하게 되고, 세포 내에 축적되어 세포의 변형을 초래한다. 실제로 갑상샘 선종과 암을 비롯한 인체의 여러 암에서 50% 이상의 발현을 보이는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서 극저주파 전자기장 노출군과 비노출군 모두에서 DHPN과 SDM에 유도된 흰쥐 갑상샘암종 발생과정에서 변이형 p53 단백질발현은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 DHPN에 의한 흰쥐의 갑상샘암종에서 p53의 유전적 변이는 없고, 또한 유방암 세포주 HBL-100에 60 Hz 전자기장을 노출시켰을 경우에도 p53유전자의 이상발현은 관찰되지 않았다는 Loberg 등(17)의 결과와 일치하였다. 따라서 전자기장은 p53 유전자 돌연변이와 연관성이 없다고 생각한다.

세포 주기의 조절의 손상은 제어되지 않는 세포의 증식을 야기하며 이는 악성종양의 특징이다. 세포주기에 관여하는 cyclin 계열 단백질 중에서 cyclin D1은 세포주기 조절에 있어서 감시관문으로 알려진 G1-S기 이행에 관여하여 세포 분열을 촉진시키는 것으로 알려져 있어 종양형성에 중요한 역할을 한다. 갑상샘 종양의 경우 cyclin D1은 갑상샘 샘종에 비해 암에서 현저한 발현 증가를 보이며,(24) 암종 중에서도 침윤 정도에 따라 발현이 증가한다고 보고되어 있다.(25) 본 연구에서는 갑상샘 증식증, 샘종, 그리고 암종에서 각각 2.3%, 11.6%, 37.8%로 종양의 진행과정에 cyclin D1이 관여한다는 것을 알 수 있었다. 또한 침윤성 암에서 전자기장 노출군에서 비노출군에 비해 cyclin D1 발현이 통계적으로 유의하게 증가하였다. 그렇지만 Lange 등(26)은 인체의 양수세포에 전자기장 50 Hz 노출시킨 후 세포주기인자를 관찰한 결과 cyclin D1 발현이 감소되었다고 상반된 결과를 보였고, 그 밖에 문헌상 보고된 것은 없다. 따라서 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다. p21은 정상 섬유모세포에서 cyclin-cdk-PCNA-p21 복합체로 존재하며 세포주기 진행을 억제하며, 종양에 있어서도 p21은 종양세포의 증식을 억제하는 기능을 보유하고 있어서 유전자의 돌연변이가 일어나게 되면 종양형성 억제 역할이 소실되어 종양형성에 영향을 미치게 된다.(27) 인체 갑상샘 병변에서 p21 발

현은 증식증과 샘종에서 거의 발현되지 않고 암에서는 30.1%에서 발현됨이 보고되어 있다.(28) 본 실험에서 대조군에서 갑상샘 여포암 발생과정에서 p21<sup>WAF1/Cip1</sup> 발현은 증식증에서는 거의 발현되지 않았으나, 샘종과 암에서는 발현율이 증가하였다. 자기장 노출군에서는 p21<sup>WAF1/Cip1</sup> 발현이 증가하는 경향을 보였지만 통계적 유의성은 없었다. 이는 극저주파 전자기장이 세포주기에 관해해서 p21에는 변화를 주지 않는 것으로 생각되었다. 이와 관련된 연구보고는 전자기장 노출에 생체 세포에서 p21 단백질변화는 인체 양수세포에 50 Hz자기장을 노출시켰을 경우 p21<sup>WAF1/Cip1</sup> 발현이 초기에 증가하였다는 연구와는 달리 60 Hz 노출 시 인체 유선 상피세포에서 p21<sup>WAF1/Cip1</sup> 전사인자의 변화가 없었다는 상반된 보고가 있다.(29) 또한 배아 줄기세포를 50 Hz에 노출 시 p21<sup>WAF1/Cip1</sup> mRNA 발현이 p53 결핍이 있는 경우에는 증가하였으나 야생형 p53인 경우에는 변화가 없다는 연구보고도 있다.(30) 이처럼 연구자에 따라 세포주기 관련 단백질발현이 서로 상반된 결과로 미루어 전자기장의 효과는 표적세포에 따라 다양성이 있을 것으로 추측되며 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, DHPN과 SDM으로 유도된 갑상샘암종 발생 과정에서 지속적 극저주파 전자기장 노출은 암에서 세포증식지수(Ki-67)와 apoptosis 표지지수를 증가시켰고, 세포주기조절 단백질 중 cyclin D1 단백질 발현을 증가시켜 갑상샘 암의 발생을 증가시키는 경향을 보인다고 생각한다.

## REFERENCES

- 1) Adey WR. Tissue interactions with nonionizing electromagnetic fields. *Physiol Rev* 1981;61:435-514.
- 2) McCann J, Dietrich F, Rafferty C. The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutat Res* 1998;411: 45-86.
- 3) Minder CE, Pfluger DH. Leukemia, brain tumors, and exposure to extremely low frequency electromagnetic fields in Swiss railway employees. *Am J Epidemiol* 2001;153:825-35.
- 4) Cho YH, Chung HW. The effect of extremely low frequency electromagnetic fields (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.
- 5) Imai T, Onose J, Hasumura M, Ueda M, Takizawa T, Hirose M. Sequential analysis of development of invasive thyroid follicular cell carcinomas in inflamed capsular regions of rats treated with sulfadimethoxine after *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiation. *Toxicol Pathol* 2004;32:229-36.
- 6) Shimo T, Mitsumori K, Onodera H, Takahashi M, Ueno Y, Katayama J, et al. Effect of rat thyroid proliferative lesion development by intermittent treatment with sulfadimethoxine. *Cancer Lett* 1995;96:209-18.
- 7) Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA, Mackenzie WF. *Pathology of the Fischer Rat*. 1st ed. San Diego: Academic Press; 1990. p.524-39.
- 8) Pitot HC, Sirica AE. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1980;605: 191-215.
- 9) National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). Assessment of Health Effects from Exposure to Power-line Frequency Electric and Magnetic Fields: Working Group Report. Research Triangle Park, NC: NIH publication No. 98-3981.
- 10) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-Ionizing Radiation, Part 1: Static and Extremely Low-Frequency (ELF) Electric and Magnetic Fields. Lyon, France: IARC Press; 2002. p.429.
- 11) Gobba F, Malagoli D, Ottaviani E. Effects of 50 Hz magnetic fields on fMLP-induced shape changes in invertebrate immunocytes: The role of calcium ion channels. *Bioelectromagnetics* 2003;24:277-82.
- 12) Stuchly MA, McLean JR, Burnett R, Goddard M, Lecuyer DW, Mitchel RE. Modification of tumor promotion in the mouse skin by exposure to an alternating magnetic field. *Cancer Lett* 1992;65:1-7.
- 13) Yokus B, Cakir DU, Akdag MZ, Sert C, Mete N. Oxidative DNA damage in rats exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. *Free Radic Res* 2005;39:317-23.
- 14) Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990;17:489-503.
- 15) Wolf FI, Torsello A, Tedesco B, Fasanella S, Boninsegna A, D'Ascenzo M, et al. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2005;1743:120-9.
- 16) Tofani S, Cintonino M, Barone D, Berardelli M, De Santi MM, Ferrara A, et al. Increased mouse survival, tumor growth inhibition and decreased immunoreactive p53 after exposure to magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2002;23:230-8.
- 17) Loberg LI, Engdahl WR, Gauger JR, McCormick DL. Cell viability and growth in a battery of human breast cancer cell lines exposed to 60 Hz magnetic fields. *Radiat Res* 2000;153: 725-8.
- 18) Biscotti CV, Hart WR. Apoptotic bodies: a consistent morphologic feature of endocervical adenocarcinoma in situ. *Am J Surg Pathol* 1998;22:434-9.
- 19) Lee JS, Ahn SS, Jung KC, Kim YW, Lee SK. Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. *Asian J Androl* 2004;6:29-34.
- 20) Sheikh MS, Huang Y. TRAIL death receptors, Bcl-2 protein family, and endoplasmic reticulum calcium pool. *Vitam Horm*



- 2004;67:169-88.
- 21) Ding GR, Nakahara T, Tian FR, Guo Y, Miyakoshi J. Transient suppression of X-ray-induced apoptosis by exposure to power frequency magnetic fields in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:953-7.
- 22) Harland J, Engstrom S, Liburdy R. Evidence for a slow time-scale of interaction for magnetic fields inhibiting tamoxifen's antiproliferative action in human breast cancer cells. *Cell Biochem Biophys* 1999;31:295-306.
- 23) Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-6.
- 24) Goto A, Sakamoto A, Machinami R. An immunohistochemical analysis of cyclin D1, p53, and p21waf1/cip1 proteins in tumors originating from the follicular epithelium of the thyroid gland. *Pathol Res Pract* 2001;197:217-22.
- 25) Zou M, Shi Y, Farid NR, al-Sedairy ST. Inverse association between cyclin D1 overexpression and retinoblastoma gene mutation in thyroid carcinomas. *Endocrine* 1998;8:61-4.
- 26) Lange S, Viergutz T, Simko M. Modifications in cell cycle kinetics and in expression of G1 phase-regulating proteins in human amniotic cells after exposure to electromagnetic fields and ionizing radiation. *Cell Prolif* 2004;37:337-49.
- 27) Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 1993;4:897-906.
- 28) Ito Y, Kobayashi T, Takeda T, Komoike Y, Wakasugi E, Tamaki Y, et al. Expression of p21 (WAF1/CIP1) protein in clinical thyroid tissues. *Br J Cancer* 1996;74:1269-74.
- 29) Lange S, Richard D, Viergutz T, Kriehuber R, Weiss DG, Simko M. Alterations in the cell cycle and in the protein level of cyclin D1, p21CIP1, and p16INK4a after exposure to 50 Hz MF in human cells. *Radiat Environ Biophys* 2002;41:131-7.
- 30) Czyz J, Nikolova T, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM. Non-thermal effects of power-line magnetic fields (50 Hz) on gene expression levels of pluripotent embryonic stem cells-the role of tumour suppressor p53. *Mutat Res* 2004;557:63-74.