

일부 자원 여성에서 모발염색 후 림프구의 DNA손상과 관련 요인

조진아^{1,3)}, 오은하^{1,2)}, 설동근²⁾, 이은일^{1,2)}

고려대학교 대학원 보건학 협동과정¹⁾, 고려대학교 의과대학 예방의학교실 및 의과학연구원 환경의학연구소²⁾, 경북대학교³⁾

DNA Damage in Lymphocytes after Hair Dyeing and Related Factors among Women Volunteers

Jin A Cho^{1,3)}, Eunha Oh^{1,2)}, Donggeun Sul^{1,2)}, Eunil Lee^{1,2)}

Graduate Studies of Public Health, Graduate School, Korea University¹⁾;
Department of Preventive Medicine, School of Medicine and Institute for Environmental Health,
Medical Science Research Center, Korea University²⁾; Department of Cosmetology, Kyungbuk University³⁾

Objectives : To evaluate the DNA damage by hair dyeing in human lymphocytes.

Methods : Comet assays were carried out to evaluate the DNA damage in lymphocytes by hair dyeing. Twenty subjects were selected from women volunteers whose age ranged from 55 to 67 year old. All subjects had no smoking history. Blood samples were collected before and 6 hours after hair dyeing. DNA damage was evaluated by means of the tail moments, which were quantified by a KOMET 4.0 image analysis system.

Results : The tail moments before hair dyeing showed no significant differences among subjects except for the high frequency group. The mean values of the tail moments in subjects with low and high frequencies of hair dyeing were 1.39 and 1.77, respectively ($p < 0.05$). The tail moments after hair dyeing increased significantly. The mean values of tail moments in subjects before and after hair dyeing were 1.45 and 1.79, respectively ($p < 0.01$).

However, the difference levels of DNA damage in lymphocytes before and after hair dyeing were found to be slightly lower in both the dietary supplement taking group and high frequency group.

Conclusions : The high frequency group appears to have a higher level of DNA damage than the low frequency group before hair dyeing. DNA damage in lymphocytes was found to be significantly higher in the volunteers after hair dyeing. In this study, the related factors such as high frequency and taking dietary supplements appear to reduce DNA damage in lymphocytes after hair dyeing.

Korean J Prev Med 2002;35(4):275-281

Key Words: Hair dyes, Comet assay(single cell gel electrophoresis assay), DNA damage

서론

두발 염색은 최근 몇 년 사이에 패션의 일부로서, 세계적으로 급격히 증가하고 있으며, 우리나라도 예외가 아닌 실정이다. 국내에서 주로 두발염색을 위해 사용되는 염모제는 영구적 염모제로서 유기합성 염모제, 즉 산화형 염모제이다. 산화형 염모제는 제1제와 제2제로 구성되어 있는데, 제1제에는 염료 중간체인 디아민계 화합물과 알칼리제가 함께 들어있고, 제2제는 산화제로 구성되어 있다. 염료중간체는 산화제와 혼합되면 염료로 바뀌면서 색을 나타낸다. 염모제는 여러 종류의 디아민계통의 물질이 각각의 색을 나

타내기 위해 사용되고 있다. 두발 염색을 위해서는 암모니아 등을 사용하여 모발을 확장시키고, 과산화수소등의 산화제로 멜라닌 색소를 파괴하는 역할을 한다.

모발 염색을 위해 사용되는 화학물질들 중 암모니아 및 산화제 등은 강한 자극성을 갖고 있으며, 염모제에 사용되는 디아민계통의 물질들은 변이원성이거나 발암성이 있을 것이라는 연구보고가 계속 되었다 [1-3]. 1975년 Ames 등 [1]에 의해 당시 산화형 염모제의 89%가 변이원성을 가지고 있다고 보고된 이후, Kirkland와 Venitt [4]는 염모제 중에서 널리 사용되는 2-nitro-*p*-phenylenediamine과 4-nitro-*o*-phenylenediamine

이 염색체 이상(aberration)을 가져오는 세포독성이 있음을 보고하였고, Palmer 등 [5]도 *m*-phenylenediamine, 2-nitro-*p*-phenylenediamine, 4-nitro-*o*-phenylenediamine 등이 변이원성이 있다고 보고하였다. 이런 결과들은 주로 세포 실험 등 시험관내 실험 결과이고, 실험동물에서도 발암성이 있는 것으로 보고된 염모제는 4-methoxy-*m*-phenylenediamine, 4-chloro-*m*-phenylenediamine, 2,4-toluenediamine, 2-nitro-*p*-phenylenediamine 등이다 [6].

이러한 염모제들은 사람의 피부를 통해 흡수되어진 후 소변을 통해 배출되어 검출된다는 연구보고도 최근까지 계속 이뤄지고 있다 [7-9]. 따라서 염모제의 사용으로 실제 사람에서 암이 발생하는지

에 대한 역학적인 연구가 수행되고 있으나, 염모제 사용과 암 발생 여부는 일치된 결과를 보이지 못하고 있다. 염모제 사용에 의한 백혈병 및 비호지킨림프종 위험 증가 [10]와 미용사의 난소암 발생 위험 증가 [11]가 연구 보고된 반면, 비호지킨스 림프종을 비롯한 조혈계 종양과 염모제 사용이 연관성이 없다는 보고도 있다 [12].

모발 염색에 의해 유전독성 영향이 나타나는 지에 대한 연구도 시도되어, 1981년 Kirkland 등 [13]은 14명의 자원자에게 염색 전후 자매염색체 교환(sister-chromatid exchange) 빈도 검사 결과를 비교하여 6명은 증가, 8명은 감소한 결과를 보여 모발 염색에 의해 유전독성 영향이 나타나지 않았다고 보고하였다. 1983년 Turanitz 등 [14]도 10명의 모발 염색자와 대조군을 비교하여 자매염색체 교환 빈도가 증가되지 않았다고 보고하였고, Hofer 등 [15]은 염색체 이상(chromosome aberration) 빈도를 조사하여 모발 염색군과 대조군에 차이가 없음을 보고하였다. 또한 1997년 Sardas 등 [16]은 모발 염색을 하는 15명의 남성이 발사를 조사하여 자매염색체 교환, comet assay(단세포 전기영동법), Ames 검사등에서 대조군과 차이가 없음을 보고하였다.

그러나 2001년 염색제를 정기적으로 사용하는 여성에게서 방광암 발생률이 2.1배 증가하고, 10년이상 미용사로 일한 경우 5배 이상 증가한다는 연구보고가 이뤄졌고 [17], 그밖에도 모발 염색이 신홍반루푸스 발생 증가 및 척수형성이상 증가와도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다 [18,19]. 따라서 염모제 사용과 암 또는 유전손상 증가에 대한 연구가 계속적으로 필요한 실정이다.

Comet assay는 DNA손상 물질에 직업적으로 노출되는 사람들의 생물학적 모니터링 방법으로 빠르고 적절한 방법이라고 평가되고 있다 [20]. Comet assay는 처음 Ostling과 Johanson [21]에 의해 각각의 세포수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 도입된 단세포

포 겔 전기영동법(microgel electrophoresis) 방법으로, Singh 등 [22]에 의해 더 민감한 방법으로 개발되었다. 형광현미경하에서 DNA 손상정도가 혜성 같이 나타나므로 comet assay라고 불리우는 이 방법은 적은 세포 수 (~10,000 cells)로도 실험이 가능하고 하루만에 결과를 얻을 수 있으며, 비교적 저렴한 실험 비용이 소요된다. 또한 Betti 등 [23]은 흡연에 의한 유전독성을 나타내는데 자매염색체 교환 빈도 검사보다 comet assay가 예민한 지표라고 보고하였다. 이와 같은 장점들로 comet assay가 광범위하게 사용됨에 따라 OECD 지침을 설정하기 위해 실험 방법의 표준화를 시도하여 실험 지침이 제안되기도 하였다 [24]. 그러나 Sardas 등 [16]이 사용하였던 comet assay는 세포 사진을 육안으로 확인하여 DNA손상을 측정하여, image program을 사용하는 최근의 방법들과는 차이가 있어, 최근의 방법을 적용하여 다시 연구할 필요성이 대두되었다.

따라서 이 연구는 모발 염색에 의한 사람의 유전독성을 평가하기 위해 첫째로 사람을 대상으로 실험적인 방법을 적용하여, 모발 염색 전 후 DNA손상을 새로운 comet assay 방법을 이용하여 조사하고, 둘째로 이들에 대한 일반적 특성 및 모발 염색 관련 경력을 조사하여 모발 염색에 의한 DNA손상에 영향을 주는 지를 조사하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구 대상 및 기간

흡연에 의한 영향을 배제하고, 모발 염색에 협조적인 자원자를 구하기 위해 55세에서 67세 사이의 흡연력이 없는 여성을 대상으로 한 연구자의 모친의 친구들 중에서 자원자를 모집하였다. 자원자는 모두 서울 강북지역에 살고 있었으며, 모발 염색 실험 전 1주일 이상 모발 염색을 하지 않도록 하였다. 2001년 7월 13일 3인을 대상으로 우선적으로 연구를 실시하여, 연구 진행과 결과에 무리가 없는지 확인한 후 나머지 17명에 대한 연구를

2001년 8월 13일에 실시하였다. 실험 전에 실험내용과 방법을 전화통화를 통해 설명하였고, 실험 전 날 안정을 취하도록 권고하였다.

2. 연구 방법

1) 설문 조사

사전에 설문내용에 대하여 교육을 받은 2명의 면접조사원이 조사 당일, 혈액 채취 전 면접 설문 조사를 실시하였다. 설문내용은 대상자의 일반적 특성인 연령, 학력, 결혼 유무 등과 평소 염색 경력, 즉 염색 시작 년도, 연평균 염색회수, 염색장소, 염모제 도포시간 및 방치시간, 주로 쓰는 염모제 제품명 등을 조사하였다. 기타 DNA손상에 영향을 미칠 수 있는 음주, 즐기는 음식, 약품 복용 등도 함께 조사하였다.

2) 시술자 교육 및 염모제 선택

염색 시술은 피시술자의 모발의 길이, 두께, 굵기, 모발의 손상정도에 따라 약간의 시술방법이 다르다. 또, 시술자에 따라 서로 근소한 차이를 보이므로 시술 전 사전 교육을 통해 동일한 시술 방법이 적용되도록 하였고, 가열처리를 가능한 모두 적용하도록 하였다. 염색 시술자는 모두 3명으로 10년 이상의 모발 염색 및 미용 경력을 갖고 있는 전문가들이었다. 시술자 3명이 근무하는 각각의 미용실 3군데에서 염색 시술을 하여, 자원자들이 편한 곳을 선택하게 하였고, 미용실은 모두 강북에 위치하였다.

염모제는 새치머리 염색용으로 시중에서 손쉽게 구입할 수 있는 외국A회사의 수입완제품을 선택하여, 모두에게 동일한 제품을 사용하였다. A회사의 "Natural Brown" 색깔을 내는 염모제는 모발에 염색시 검정색에 가까웠고, 제품에 표시된 성분은 레소르신, 파라페닐레디아민, m-아미노페놀, 염산 2,4-디아미노페옥시에탄올 등이었다.

3) 단세포전기영동 실험

단세포 전기영동법(comet assay)은 Singh 등 [22]의 방법을 일부 변형하여

사용하였다. 혈액은 염색시술 직전과 염색 시술 6시간 후 두 번 채취하였다. 2명의 임상병리사가 시술 전 혈액을 상완 정맥에서 2ml을 채취하여 실험에 사용하였다. 혈액은 채혈 후 냉장 보관하여 즉시 실험실로 운반하였으며, Ficol-Paque (Amersham Pharmacia, Sweden)를 이용하여 림프구를 분리하였다. 모든 실험은 전기영동 전까지 채혈 당일 날에 이루어졌다.

분리된 림프구는 1% low melting point 아가로오즈(LMP agarose)에 섞어 이미 1% normal melting point agarose가 도포된 슬라이드(fully frosted slide, Fisher Scientific)에 도포하여 coverglass를 씌워 약 10분간 건조하였다. Coverglass를 벗긴 후 0.5% LMP agarose를 도포하고 다시 coverglass를 씌워 말린 후, coverglass를 제거한 채 pH 10인 lysis buffer [2.5 M NaCl (Shinyo, Japan), 100 mM EDTA (Amresco, USA), 10 mM Tris (Gibco BRL, USA, pH 10.0), 1% Triton X-100 (Amresco, USA)]에 넣어 4℃에 1시간 30분 동안 담갔다 꺼내서 pH 13의 unwinding buffer [1 mM EDTA (Amresco, USA), 300 mM NaOH (Sigma, USA)]에 20분간 담근다. Lysis와 unwinding 시에는 슬라이드를 넣은 coplan jar를 알루미늄호일로 감싸 빛에 노출되지 않도록 하였다.

슬라이드를 전기영동장치 (Sub Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems, BioRad)에 틈이 생기지 않도록 배열하고 25 V, 300 mA로 고정하여 unwinding buffer와 같은 buffer를 사용하여 20분간 전기영동을 하였다. 전기영동 후 alkali와 detergent를 제거하기 위해 neutralization buffer [400 mM Tris-HCl (Gibco BRL, USA, pH 7.4)에 5분씩 세 번 washing하였다. 직접 결과 관찰을 하지 않을 슬라이드는 에탄올 (absolute ethanol, Sigma)로 5분간 고정한 후 추후 관찰하였다. 실험은 추가적인 DNA 손상을 막기 위하여 황색등 아래서 실시하였다.

슬라이드는 각 조사대상자에 대하여 두 개씩 작성하여, 각각 50개 이상, 총 100개 이상의 세포를 관찰하였다. 슬라이드 관찰직전에 ethidium bromide (10 µg/ml) 50 µl로 형광염색하여 515-560 nm의 excitation filter와 590 nm barrier filter를 이용하여 형광 현미경 하에서 관독하였다. 각 세포의 DNA 손상 정도는 image analysis software (Komet 4.0, Kinetic Imaging, UK)을 이용하여 olive tail moment (tail moment) 값을 측정하였다. Tail moment값은 DNA손상을 나타내는 꼬리의 길이에 꼬리에 분포된 DNA%를 곱한 값이다.

4) 통계분석

염색시술 전, 후 tail moment 값의 비교는 연구대상수가 작아 비모수통계방법인 Wilcoxon signed rank test를 사용하였고, 연령 등의 일반 특성 및 평소 두발 염색에 관련한 행동들 (염색회수, 염색칼라, 염색기간)에 따른 tail moment 값의 비교는 Wilcoxon rank-sum test나 크루

스칼-왈리스 (Kruskal-Wallis' test) 검정 방법을 이용하였다. 통계프로그램은 SAS windows version 6.12를 사용하였다.

연구결과

1. 조사대상자의 특성 및 두발 염색 관련 변수에 따른 tail moment 값

조사 대상자는 20명으로 모두 여성이고, 비흡연자였다. 연령은 55-59세 이자가 11명(55%), 60-67세 이상이 9명(45.0%)이었다 (Table 1). 전체 대상자들 중 7명(35%)은 칼슘 및 철분제, 비타민제 등을 주기적으로 복용하였고 있었고, 염색 후 어지러움 등 증상을 호소하는 경우는 3명(15%) 있었다.

대상자들의 일반적 특성에 따라 염색 전 tail moment 값에 차이가 있는 지 비교한 결과, 60세 미만 군의 tail moment 값이 1.439로 60세 이상 군의 1.458에 비해 약간 낮았고, 음주 군이 1.553으로 비음주군 1.429에 비해 약간 높았으나

Table 1. Effects of related factors in the tail moments of lymphocytes before hair dyeing

Related factors		Number of subjects	Tail moments (Mean ± S.D.)	p-value
Age (years old)	55-59	11 (55%)	1.439±0.20	0.879 [†]
	60-67	9 (45%)	1.458±0.23	
Alcohol drinking	Yes	3 (15%)	1.553±0.29	0.791 [†]
	No	17 (85%)	1.429±0.19	
Regular exercise	Yes	13 (65%)	1.386±0.17	0.132 [†]
	No	7 (35%)	1.561±0.23	
Taking dietary supplements*	Yes	4 (23.5%)	1.468±0.05	0.157 [†]
	No	13 (76.5%)	1.368±0.16	
Symptoms complained	Yes	3 (15%)	1.543±0.33	0.560 [†]
	No	17 (85%)	1.431±0.19	
Usage duration	≥ 10 yrs.	7 (35%)	1.41 ± 0.24	0.499 [†]
	0 - 9 yrs.	13 (65%)	1.46 ± 0.19	
Frequency per month	≥ 2	3 (15%)	1.77 ± 0.22	0.0171 [†]
	0 - 1	17 (85%)	1.39 ± 0.15	
Dye color	Black	2 (10%)	1.53 ± 0.51	0.62 [†]
	Dark brown	3 (15%)	1.55 ± 0.17	
	Light brown	13 (65%)	1.43 ± 0.19	
	None	2 (10%)	1.36 ± 0.07	

* Three persons were excluded among subjects who had taken dietary supplements because they were high frequency group of hair dyeing. (more than twice per month).

† p-value calculated by Wilcoxon rank sum test

‡ p-value calculated by Kruskal-Wallis test

통계적으로 유의하지 않았다 ($p>0.1$). 규칙적으로 운동하는 경우에 1.386으로 그렇지 않은 경우인 1.561보다 낮았으나 통계적으로 유의하지는 않았다 ($p>0.05$). 증상을 호소하는 경우 그렇지 않은 경우보다 높은 수치를 보였으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다 ($p>0.1$). 비타민 등을 주기적으로 복용하는 경우에 도리어 tail moment 값이 1.596으로 높았으나, 이들 중에는 월 2회 이상 모발 염색을 하여 수치가 높은 3명이 모두 들어 있어서 이들을 제외하고 분석하였다. 주기적으로 비타민등을 복용하는 경우와 그렇지 않은 경우 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ($p>0.1$).

두발 염색 관련 변수로 조사된 것은 사용기간, 월평균 사용횟수, 주로 사용하는 염모제 색 등이었다. 염모제를 10년 이상 사용한 경우가 7명(35%), 10년 미만 사용한 경우가 13명(65%)으로 tail moment 값의 유의한 차이가 없었다 (Table 1). 그러나 월 2회 이상 사용하는 경우는 1.77, 월 1회 이하로 사용하는 경우는 1.39로 tail moment 값이 통계적으로 유의한 차이가 있었다 ($p<0.01$). 평소 자주 사용하는 염모제는 연한 갈색을 가장 많이 사용하였고(65%), 염모제의 색에 따른 tail moment 값의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

2. 두발 염색 전후 DNA손상 변화

자원자 20명에 대하여 염색 전후 tail moment 값을 비교한 결과 15명은 tail moment 값이 증가하였고, 5명은 감소하였다 (Table 2). 염색 전후의 tail moment 값의 평균은 각각 1.45, 1.79로 통계적으로 유의한 차이가 있었다 ($p<0.01$). 두발 염색 전후 tail moment 값의 차이는 각각의 연령군에서 유사한 값을 보였고, 또한 각각의 연령군에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($p<0.1$) (Table 3). 그러나 음주 여부에 따라서는 비음주군에서만, 운동여부에 따라서는 운동군에서만, 약물복용여부에 따라서는 비타민 등을 주기적으로 복용하지 않는 군에서만, 증상 여부에 따라서는 증상을 호

Table 2. The difference of tail moments before and after hair dyeing

Number	AGE (years old)	Difference of tail moments	Tail moment before hair dyeing	Tail moments after hair dyeing
1	58	1.18	1.42	2.6
2	52	1.11	1.31	2.42
3	49	0.78	1.36	2.14
4	62	0.65	1.14	1.79
5	60	0.63	1.68	2.31
6	64	0.56	1.41	1.97
7	67	0.46	1.45	1.91
8	52	0.45	1.31	1.76
9	56	0.45	1.23	1.68
10	60	0.31	1.47	1.78
11	63	0.29	1.17	1.46
12	66	0.23	1.51	1.74
13	54	0.11	1.45	1.56
14	61	0.11	1.41	1.52
15	59	0.09	1.51	1.6
16	57	-0.02	1.5	1.48
17	49	-0.08	1.9	1.82
18	57	-0.08	1.24	1.16
19	59	-0.20	1.6	1.4
20	63	-0.22	1.89	1.67
Mean±SD	58.4±5.2	0.34±0.40 (p*=0.0008)	1.45±0.20	1.79±0.36

* p-value calculated by Wilcoxon's signed rank test

Table 3. Effects of related factors in the tail moments of lymphocytes after hair dyeing

Related factors	Number of subjects	Difference of tail moments(Mean±S.D.)	p-value [†]	
Age	55-59	11(55%)	0.35 ± 0.49	0.065
(years old)	60-67	9(45%)	0.34 ± 0.28	0.012
Alcohol drinking	Yes	3(15%)	0.22 ± 0.51	0.75
	No	17(85%)	0.36 ± 0.39	0.001
Regular exercise	Yes	13(65%)	0.37 ± 0.37	0.005
	No	7(35%)	0.28 ± 0.47	0.156
Taking dietary supplements*	Yes	4(23.5%)	0.07 ± 0.06	0.250
	No	13(76.5%)	0.51 ± 0.39	0.001
Symptoms complained	Yes	3(15%)	0.11 ± 0.34	0.75
	No	17(85%)	0.38 ± 0.40	0.001
Usage duration	≥ 10 yrs.	7	0.37 ± 0.26	0.031
	0 - 9 yrs.	13	0.33 ± 0.47	0.037
Frequency per month	≥ 2	3	-0.023 ± 0.23	1.00
	0 - 1	17	0.41 ± 0.39	0.0005
Dyecolor	Black	2	0.04 ± 0.36	1.0
	Dark brown	3	0.40 ± 0.53	0.5
	Light brown	13	0.33 ± 0.35	0.003
	None	2	0.61 ± 0.71	0.5

* Three persons were excluded among subjects who had taken dietary supplements because they were high frequency group of hair dyeing. (more than twice per month).

† p-value calculated by Wilcoxon's signed rank test

소하지 않는 경우에만 tail moment 값의 변화차이가 통계적으로 유의하였다.

염모제를 사용한 기간에 따라서는 두 군 모두 tail moment 값의 차이가 통계적

으로 유의하였지만, 염모제 사용 횟수에 따라서는 다른 결과를 보였다 (Table 3).

월 2회 이상 사용하는 경우 tail moment 값의 차이는 음수가 나왔으며, 월 1회 미

만 사용하는 경우에만 그 차이가 통계적으로 유의하였다. 평소 사용하는 염모제 색에 따라서는 연한 갈색을 사용하는 경우에만 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

고 찰

염모제에 의한 암 발생에 관한 역학 조사 결과에 대하여 지속적인 논란이 있으며, Correa 등 [25]은 모발염색과 림프종, 다발골수종의 발생에 관한 연구 문헌들을 meta분석한 결과 모발염색과 이런 암종 발생 증가와의 관련을 결정하기에는 아직 충분한 연구가 되지 않았다고 보고하였다. 따라서 변이원성을 보는 시험관 연구와 발암 위험 증가를 조사하는 역학 연구의 중간 단계로서 사람에서의 유전독성을 평가하는 연구를 통해 염모제의 건강영향을 평가하는 방법들이 시도되었다.

자매염색체 교환 빈도를 검사한 Kirland 등 [13], Turanitz 등 [14]은 모발염색에 의한 자매염색체 교환 증가를 밝히지 못했고, Hofer 등 [15]도 모발염색에 의한 염색체 이상 빈도 증가가 나타나지 않았다고 보고하였다. 최근 자매염색체 교환 빈도를 보는 것보다 유전독성을 나타내는 데 더 예민한 검사로서 comet assay가 추천되고 있다. 따라서 1997년 Sardas 등 [16]은 모발염색을 하는 15명의 남성 이발사를 대상으로 예민한 지표로 보고된 comet assay를 적용하였지만, 남성 이발사와 대조군 사이에 DNA손상의 차이를 발견하지 못하였다.

이 연구에서는 Sardas 등 [16]의 결과와 달리 모발염색 전 후 DNA손상이 통계적으로 유의하게 증가되었다 (Table 2,3). Sardas의 연구와 이 연구 결과의 차이는 여러 가지 요인에서 기인하고 있다고 생각한다. Sardas의 연구는 모발염색을 수행하는 이발사와 대조군을 비교한 것이고, 이 연구는 모발염색 전후를 비교한 것이며, 또한 Sardas의 연구 대상자는 흡연자를 포함한 남성 이발사들이었고, 우리 연구는 모두 비흡연자인 여성

이었다.

Sardas의 연구대상자들이었던 남성 이발사들은 염모제에 계속적으로 노출되기 때문에 대조군과 DNA손상의 차이가 두드러지지 않을 수도 있다. DNA손상 물질의 계속적인 노출은 다른 DNA손상 물질에 의한 손상을 억제하는 효과가 있기 때문이다. Oesch 등 [26]의 연구에서 흡연이 DNA손상을 증가시키지만, 동시에 다른 DNA손상물질에 의한 DNA손상은 보호하는 효과가 있다고 보고하였다. 그 이유는 흡연자들의 체내에 glutathione이 증가되어 있기 때문이라고 하였다. 흡연의 경우 DNA손상 물질이 노출되어 DNA손상을 일으키지만 다른 DNA손상 물질에 의한 추가 손상은 예방하는 효과가 있음을 고려할 때, 염모제와 흡연에 계속적으로 동시에 노출되고 있는 경우에 도리어 염모제 단독의 노출인 경우에 비해 DNA손상이 적게 나타날 가능성이 있다.

이런 경향은 이 연구결과에서도 나타났다. 평상시 모발염색 습관에 따른 DNA손상의 차이는 매달 두 번 이상 염색을 하느냐, 그렇지 않느냐에 따라 차이를 보여 염모제를 많이 사용하는 경우 높은 수치를 보였지만, 모발염색 전 후의 차이를 볼 때는 염모제를 많이 사용하는 사람들이 DNA손상 증가를 나타내지 않았다. 이런 결과는 비흡연자인 여성들이 염모제에 의한 DNA손상에 더 예민하다는 것을 보여주고 있다. 즉, DNA손상 물질에 노출되는 경우 항산화작용이 증가하여 DNA추가 손상을 억제할 수 있음을 시사하고 있는 것이다.

모발염색 기간이나 평상시 사용하는 염모제의 색에 따른 영향을 찾을 수 없었다. 모발염색 기간은 연령의 영향을 함께 갖고 있고, 얼마나 오래 전에 시작했는가 보다는 최근 얼마나 자주 하느냐에 더 달려있기 때문에 영향이 나타나지 않은 것으로 생각한다. DNA손상은 가역적임을 고려할 때 최근의 노출이 더 영향을 미칠 수 있을 것이다.

이 연구와 Sardas의 연구와의 또 다른 중요한 차이는 DNA손상 평가 방법의 차

이다. Sardas는 세포 사진을 찍어 핵의 꼬리부분(DNA손상 부위)의 길이를 자료 재어서 DNA손상을 측정하였고, 우리 연구는 image program을 사용하여 평가하였다. Sardas의 연구결과에서 꼬리의 길이가 재어지지 않아 "0"으로 처리한 경우가 노출군 13명 중 6명, 비노출군 13명 중 5명이었지만, 우리 연구 결과는 tail moment 값이 0이 나온 경우는 없었다. 이것은 image program에 의한 값이 직접 꼬리의 길이를 재는 것보다 예민한 방법이라는 것을 나타내준다. 우리 연구에서 DNA손상을 나타내는 지표로는 Olive 등 [27]이 제시한 꼬리의 길이와 DNA%를 곱한 tail moment를 사용하였다. 우리 연구진이 여러 가지 tail parameter중에서 tail moment 값을 사용하는 것은 농약 또는 벤젠 노출에 대한 우리 선행 연구에서 노출에 따른 차이를 잘 나타내었기 때문이다 [28,29]

이 연구에서 모발염색과 DNA손상이 유의한 관련이 나온 또 다른 이유는 염모제를 검은 색으로 통일해서 적용했기 때문이다. 검은 색 계통의 염모제는 *p*-phenylenediamine이 주성분인데, 그 유도체에 따라 변이원성이 다르지만 염색체 이상에서 양-반응 관계를 보인다고 보고되었으며 [3], 모발염색 과정처럼 과산화수소와 같은 산화제에 의해 산화될 경우에는 동물실험에서 암이 발현됨이 보고되고 있다 [30]. 역학조사에서도 유사한 결과가 보고되었는데, Thun 등 [31]은 검은 색 계통의 염모제를 오랜 기간 사용할 경우 비호지킨림프종과 다발골수종의 발생위험이 증가한다고 보고하였고, 미국 암협회에서 수행한 여성 5만7천명에 대한 대형 전향성 연구에서도 어두운 색의 염모제를 사용하는 것이 비호지킨림프종이나 다발골수종의 발생을 약간 증가시키는 것으로 보인다고 보고하였다 [32]. 즉, 염모제에 의한 암 발생에 대하여는 아직 논란이 많지만 검은 색 계통의 염모제의 경우 그 위험성이 일반 염모제에 비해 비교적 뚜렷하다고 밝혀져 있다. 따라서 검은색의 염모제로 염색한 후 DNA손상이 증가되는 이 연구결과는 기

존의 역학연구 및 동물실험 연구 결과와 부합되는 결과이다.

이 연구 대상자들이 평소에 사용하는 염모제의 색깔에 따른 변화도 이런 결과를 일부 뒷받침한다. 평소 염모제를 어두운 색을 쓰는 경우, 밝은 색을 쓰는 경우보다 tail moment 값이 크고, 평소 모발 염색을 하지 않는 경우 가장 낮은 값을 보였다 (Table 1). 그러나 대상자 중에 평소에 검은 색 계통의 염모제를 사용하는 사람이 2명에 불과했고, 통계적인 유의성도 보이지 않아, 향후 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

모발 염색을 하는 경우 Wolfram과 Maibach는 1%이상은 흡수되지 않는 것이라고, 원숭이와 사람을 대상으로 한 연구결과를 보고하였다 [33]. 그러나 사람과 쥐의 피부에 직접 적용한 Yourik와 Bronaugh의 연구결과에서는 5-10%의 흡수가 이루어졌다 [9]. 이것은 염모제의 일부가 두발 피부와 접촉할 경우는 흡수율이 증가될 가능성이 있음을 보여주고 있다. 비록 적은 양이 흡수된다고 하더라도 변이원성 및 발암가능성을 갖고 있는 p-phenylenediamine 등에 의해 DNA손상이 오는 것은 가능한 기전이라고 판단된다.

DNA손상은 연령이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보이고, 식이, 운동 등에도 영향을 받는다 [20]. 이 연구에서 모발 염색 전에 연령, 음주, 규칙적인 운동 등은 DNA손상 수치에 차이를 보이지 않았다 (Table 1). 그러나 모발 염색 이후 tail moment 값의 증가에서는 다른 양상을 보였다. 즉, 전체적으로 모발 염색 이후 tail moment 값이 유의하게 증가하는데 반해, 음주군, 비운동군, 비타민 비복용군, 증상호소군들에서 tail moment 값의 증가가 통계적으로 유의하지 않았다. 대상자의 수가 작기 때문에 통계적으로 유의하지 않게 나온 것에 대한 의미를 부여하기 힘들지만, 비타민 등 항산화제등을 복용하고 있는 군에서 염색 이후 tail moment 값 증가의 0.07(p=0.25)로 매우 작은 값을 나타낸 것은 비교적 대상자 수도 다른 경우에 비해 많은 것을 고려할

때 주목할 만한 결과라고 생각한다. 비타민 C등의 항산화제 복용은 DNA손상을 감소시킨다는 다른 연구보고들이 이미 많다 [34,35]. 평상시에 항산화제의 복용이 모발 염색 등에서 DNA손상을 예방하는지에 대하여는 계속적인 연구가 필요하다.

이 연구 결과에 나타난 tail moment 값의 크기들은 같은 실험방법을 적용한 우리 실험실의 Sul 등의 연구 [29]에서의 대조군들의 값과 비교할 때 모두 크지 않았고, 대조군의 90 percentile 값 1.9 이하였다. 비록 이 대조군은 남성들이고 연령층도 30-40대로 이 연구의 연령층보다 낮지만, 남성과 여성의 tail moment 값의 차이가 없고, 연령에 따라 tail moment 값이 증가되는 것을 고려할 때, 우리 연구 대상자들의 tail moment 값이 모두 정상 수준 내에 있으며, 염모제 노출에 의한 손상의 증가도 크지 않다는 것을 알 수 있다. 모발 염색 이후에 tail moment 값이 1.9을 초과한 경우는 전체 20명 중 6명에 불과하였다. 따라서 모발 염색에 의한 DNA손상은 통계적으로 유의한 결과를 보였지만 그 손상의 크기는 크지 않았다.

이 연구는 비교적 연령이 높은 여성 비흡연자만을 대상으로 하였고, 염모제도 검은 색 계통의 염모제를 일률적으로 사용하여, 염모제에 의한 DNA손상의 증가되었다는 결과를 보였다. 비록 DNA손상이 일시적인 것이고, 가역적인 것이지만 장기적인 사용에 의한 영향에 대하여 주의할 필요성이 있음을 보여주었다. 그러나 연구의 대상에 속하지 못한 남성 흡연자, 젊은 층 등 다양한 대상에서 어떤 결과가 나올 것인지에 대하여는 향후 연구가 필요한 실정이다. 또한 다양한 모발 염색이 유행하고 있는 현실에서 검은색 계통이 아닌 염모제에 의한 영향에 대하여도 추후 연구가 필요하다.

결론

이 연구는 모발 염색에 의한 사람의 유전독성을 평가하고 관련된 요인들의 영

향을 조사하기 위한 것이다. 55세에서 67세 사이의 흡연력이 없는 20명의 여성 자원자를 대상으로 모발 염색 전후 DNA손상을 단세포 전기영동법을 사용하여 평가하였고, 설문지를 통해 관련 변수들을 조사하여 DNA손상에 미치는 영향을 평가하였다. 모발 염색에 사용한 염모제는 검정색에 가까운 외국산 염모제였으며 숙련된 미용사들에 동일한 방법으로 염색하였다. 단세포 전기영동법은 Singh의 방법을 변형하여 사용하였고, 혈액은 염색시술 직전과 시술 후 6시간 후에 채취하여, 형광 현미경 하에서 혈액 림프구의 tail moment 값을 image analysis system(Komet 4.0)을 사용하여 평가하였다. 대상자들의 일반적 특성에 따라 염색 전 tail moment 값의 차이는 유의하지 않았고, 한달에 두 번 이상 모발 염색을 하는 경우 그렇지 않은 경우보다 통계적으로 유의하게 tail moment 값이 높았다 (1.77 vs 1.39). 두발 염색 전후 tail moment 값은 1.45, 1.79로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 대상자들의 일반적 특성과 염색 관련 특성에 따른 두발 염색 전후 tail moment 값의 증가는 음주군, 비운동군, 비타민 등 복용군, 증상호소군, 한달 2회 이상 염색을 하는 군 등을 제외하고는 통계적으로 유의하였다. 따라서 일부 50, 60대 여성 자원자이지만, 사람에서 실제 모발 염색에 의하여 DNA손상이 증가되었다는 연구 결과를 최초로 보고하며, 평소 모발 염색을 월 2회 이상 하는 경우나 항산화제 복용을 할 경우, 모발 염색에 의한 DNA손상 증가가 다른 경우보다 낮게 나타나, 기존의 연구결과와 부합되는 결과를 보였다. 향후 젊은 층과 어린이들을 포함한 다양한 연령층 및 다양한 염모제에서 DNA 손상을 평가하기 위해서는 연구 대상자의 규모와 연령층을 다양화 한 대규모 연구가 요구된다.

참고문헌

1. Ames BN, Kammen H.O, Yamasaki E, Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of a mutagenic ingredients, *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 6: 2423-

- 2427
2. Milman HA, Peterson C. Apparent correlation between structure and carcinogenicity of phenylenediamines and related compounds. *Environ Health Perspect* 1984; 56: 261-273
 3. Chung K, Murdock CA, Stevens Jr SE, Li YS, Wei C, Huang T, Chou MW. Mutagenicity and toxicity studies of p-phenylenediamine and its derivatives. *Toxicol Lett* 1995; 81: 23-32
 4. Kirkland D.J, Venitt S. Cytotoxicity of hair colorant constituents: chromosome damage induced by two nitro phenylenediamines in cultured chinese hamster cells. *Mutat Res* 1976; 40: 47-56
 5. Palmer KA, Denunzio A, Green S. The mutagenic assay of some hair dye components using thymidine kinase locus of L 5178 mouse lymphoma cells. *J Environ Pathol Toxicol* 1978; 1(1): 87-91
 6. US FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Hair dye products. Available from : URL:<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/cos-hdye.html>
 7. Kiese M, Rauscher E. The absorption of p-toluenediamine through human skin in hair dyeing. *Toxicol Appl Pharmacol* 1968; 13(3): 325-331
 8. Maibach HI, Leaffer MA, Skinner WA. Percutaneous penetration following use of hair dyes. *Arch Dermatol* 1975; 111: 1444-1445
 9. Yourick JJ, Bronaugh RL. Percutaneous penetration and metabolism of 2-nitro-p-phenylenediamine in human and fuzzy rat skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 166: 13-23
 10. Cantor KP, Blair A, Everett G, VanLier S, Burmeister L, Dick FR, Gibson RW, Schuman L. Hair dye use and risk of leukemia and lymphoma. *Am J Public Health* 1988; 78(5): 570-571
 11. Boffetta P, Andersen A, Lynge E, Barlow L, Pukkala E. Employment as hairdresser and risk of ovarian cancer and non-Hodgkin's lymphomas among women. *J Occup Med* 1994; 36(1): 61-65
 12. Grodstein F, Hennekens CH, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ. A prospective study of permanent hair dye use and hematopoietic cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(19): 1466-70
 13. Kirkland D.J, Honeycombe J.R, Lawlerb S.D, Venitt S, Crofton-Sleigh C. Sister-chromatid exchange before and after hair dyeing. *Mutat Res* 1981; 90: 279-286
 14. Turanitz K, Kovac R, Tuschl H, Palvicek EP. Investigations on the effect of repeated hair dyeing on sister chromatid exchanges. *Food Chem Toxicol* 1983; 21: 791-793
 15. Hofer H, Bornatowicz N, Reindl E. Analysis of human chromosomes after repeated hair dyeing. *Food Chem Toxicol* 1983; 21: 785-789
 16. Sardas S, Aygun N, Karakaya AE. Genotoxicity studies on professional hair colorists exposed to oxidation hair dyes. *Mutat Res* 1997; 394: 153-161
 17. Gago-Dominguez M, Castelao JE, Yuan JM, Yu MC, Ross RK. Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. *Int J Cancer* 2001; 91(4): 575-579
 18. Cooper GS, Doley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS. Smoking and use of hair treatments in relation to risk of developing systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001; 28(12): 2653-2656
 19. Nagata C, Shimizu H, Hirashima K, Kakishita E, Fujimura K, Niho Y, Karasawa M, Oguma S, Yoshida Y. Hair dye use and occupational exposure to organic solvents as risk factors for myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 1999; 23(1): 57-62
 20. Moller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H. The comet assay as a rapid test in bio-monitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(10): 1005-1015
 21. Ostling O, Johanson KJ. Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 291-356
 22. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191
 23. Betti C, Davini T, Giannesi L, Loprieno N, Barale R. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat Res* 1995; 343: 201-207
 24. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35(3): 206-221
 25. Correa A, Jackson L, Mohan A, Perry H, Helzlsouer K. Use of hair dyes, hematopoietic neoplasms, and lymphomas: a literature review II. Lymphomas and multiple myeloma. *Cancer Invest* 2000; 18(5): 467-79
 26. Oesch F, Hengstler JG, Fuchs J. Cigarette smoking protects mononuclear blood cells of carcinogen exposed workers from additional work exposure-induced DNA single strand breaks. *Mutat Res* 1994; 321(3): 175-185
 27. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiation Res* 1990; 122(1): 86-94
 28. Lee YK, Lee DY, Lee E, Lee DB, Ryu JC, Kim HJ, Sul D. Evaluation of DNA damage in pesticide sprayers using single cell gel electrophoresis. *Environ Mutagens & Carcinogens* 2001; 21(2): 128-134 (Korean)
 29. Sul D, Lee D, IM H, Oh E, Kim J, Lee E. Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. *Toxicol Letters* 2002; 134: 87-95
 30. Rojanapo W, Kupradinun P, Tepsuwan A, Chutimataewin S, Tanyakaset M. Carcinogenicity of an oxidation product of p-phenylenediamine. *Carcinogenesis* 1986; 7(12): 1997-2002
 31. Thun MJ, Altekruze SF, Namboodiri MM, Calle EE, Myers DG, Heath CW Jr. Hair dye use and risk of fatal cancers in U.S. women. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(3): 210-215
 32. Altekruze SF, Henley SJ, Thun MJ. Deaths from hematopoietic and other cancers in relation to permanent hair dye use in a large prospective study (United States). *Cancer Causes Control* 1999; 10(6): 617-625
 33. Wolfram LJ, Maibach HI. Percutaneous penetration of hair dyes. *Arch Dermatol Res* 1985; 277: 235-241
 34. Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1998; 67(6): 1210-1218
 35. Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 1996; 56(6): 1291-1295