

한국인 전반적 급진성 치주염 환자에서 발견된 TNF- α 유전자의 다변성

김일신

호남대학교 보건과학대학 치위생학과

Gene Polymorphism of TNF- α in Korean Generalized Aggressive Periodontitis

Il-Shin Kim

Dept. of Dental Hygiene, Health Science College, Honam University

요 약 치주질환은 치아주위 조직에 발현된 염증성 질환이다. 전염증성 사이토카인인 TNF- α 는 국소적인 염증이나 전반적인 염증과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구의 목적은 한국인에서 TNF 유전자 다형성과 전반적 급진성 치주염 간의 관계를 알아보고자 하였다. 연구대상은 실험군이 60명, 대조군이 81명 이었다. 협측에서 DNA를 채취하여 각 제한효소를 이용한 PCR-RFLP에 의해 TNF- α -308과 -238을 측정하였다. 급진성 치주염 환자에서 TNF- α -308 유전자형은 A/A 3.2%, A/G 38.7% 그리고 G/G 82.35%가 나타났으며 대조군에서는 각 9.1%, 45.5%, 45.5%로 유의한 차이를 보이는 결과이다. TNF- α -238의 대립유전자 2의 빈도는 실험군에서 67.6%, 대조군에서 72.2%로 유의한 차이를 보였다. 이러한 결과에 따르면 TNF- α -308과 -238의 유전자다변성은 한국인의 급진성치주염과 연관이 있을 것으로 생각된다.

주제어 : 사이토카인, 급진성 치주염, 유전자형, TNF- α , 일체배형

Abstract The aim of this study was to evaluate the association between TNF polymorphism and generalized aggressive periodontitis (GAP) in Korean subjects. The study population consisted of 60 subjects with GAP and 81 reference group. Genomic DNA was extracted from the buccal swabs and the polymorphisms of TNF- α -308, -238 promoter genes, TNF- β +252 and TNFR 2+587 were determined by PCR-RFLP using restriction enzymes. The genotype distribution in the GAP were 3.2%, 38.7%, and 82.35% for A/A, A/G and G/G genotypes of TNF- α -308. At the position of TNF- α -238, the genotype distribution in the GAP were 25.5% and 74.5% for A/G and G/G genotypes. Allele A frequency of TNF- α -238 were 67.6% in GAP and 72.2% in reference group. According to these findings, the polymorphism at TNF- α -308 and -238 may be associated with GAP in Korean.

Key Words : Cytokines, Periodontitis, Polymorphism, TNF- α , Single nucleotide

1. 서론

치주질환은 치태 내의 병원성 미생물(특히 그람음성 혐기성세균)과 숙주 면역계 간의 반응에서 유리되는 사이토카인이나 matrix metallo- proteinase(MMP)가 결합 조직과 골 대사에 영향을 미쳐 치주조직 내 염증과 골조직 상실을 동반하는 임상적 양상이 나타나는 질환이다.

TNF- α 는 collagenase와 PGE2의 생산을 상향조절하고 단백질분해효소 관련기전을 통해 치주조직의 부착손실을 야기하는 것으로 알려져 있다. TNF- α 유전자는 MHC gene cluster 내에 있는 6번 염색체상에 위치하는데 이 유전자의 다변성이 염증의 위험인자와 심도요인이라고 제시하는 연구들이 있다[1,2,3]. 또한 TNF- α 의 세포표면수용체인 TNFR-2 유전자는 Chromosome 1p36에 존재하며 exon 4에 +511-512(GC/CG), exon 6에 +587(T/G), exon9에 +694(G/A)가 존재하며 promotor region에 -1413(A/C), -1120(G/C), VNTR에 다변성이 보고되어 있다. 이 부분의 다변성은 RA에서 TNF- α 항체치료를 대한 반응에 관계하고 TNF- α signal transduction, IL-6 생성을 증가시킨다고 알려져 있다[4].

이러한 선염증성 사이토카인은 치주조직의 주성분인 교원질의 주된 분해효소인 MMPs를 생산하는 숙주세포를 자극하게 된다. Brett등[5]은 여러 염증성 사이토카인 후보유전자중 IL-1B +3954, IL1-A-889는 급진성치주염과 연관되며 IL-6 -174은 모든 치주염과 관련된다고 보고한 바 있다.

이와 같이 치주질환과 여러 후보유전자의 관련성이 보고되어 있고 다양한 인종과 민족들 간에 유전형의 분포가 다르게 관찰되고 있다. 따라서 유전적 소인과 연관되어 민족 내에서 이러한 후보 유전자들의 유전형 분포를 파악하는 것이 필요한데 현재까지 한국인 인구집단의 치주질환과 관련된 사이토카인 등 여러 유전자들의 다변성에 대한 연구보고는 그 수가 적다. 또한 디지털 기술을 기반으로 새로운 형태의 제품과 서비스를 생성하는 디지털 융복합이 화두되는 때에 이를 접목한 치료방법의 다양화가 요구되고 있다.

이번 연구에서는 한국인 급진성 치주염 환자를 대상으로 염증성 사이토카인인 TNF- α 유전자의 다변성이 치주질환의 유형과 관련되는지 알아보았으며 향후 치주질환 관리 과정에 유전적 소인에 대한 정보로 활용할 기

본 자료를 얻고자 하였다.

2. 연구내용, 범위 및 방법

2.1 연구대상

실험군은 치주질환 치료를 위해 C대학교병원 치주과를 내원한 환자 중 전신질환의 병력이 없는 급진성 치주염으로 진단된 비흡연 환자들을 대상으로 하였다. 진단은 치과 과거력을 청취하고 임상검사를 시행하고 방사선검사를 하여 이뤄졌다.

전반적 급진성 치주염(generalized aggressive periodontitis, GAP)의 진단 기준은 1999년 미국 치주과학회에서 채택한 분류체계에 근거하였다[6]. 즉 치주 원인균에 대한 숙주 반응에 기여하는 전신질환이 없으며, 연령은 보통 30세 이전에 발병되지만 더 높을 수 있으며, 제 1대구치와 전치를 제외한 최소 3개 이상의 치아에서 5 mm 이상의 치간부 부착상실과 치주낭이 있고 방사선적 골소실이 치근장 1/3이상 관찰되는 경우이다. 반면 대조군은 전남대학교병원 치주과에 치석제거술을 목적으로 내원한 사람 중 연령이 30세 이상이며 임상검사 시에 치주질환으로 발견된 치아가 없고 치주적으로 건강하고, 치주적 원인에 의한 임상적 부착상실이 4 mm 이상인 부위가 없는 경우를 포함하였다. 대조군 또한 전신적으로 건강하며 흡연하지 않는 경우 선정되었다.

2.2 임상 검사

제 3 대구치를 제외한 각 치아에서 협설면의 근원심 및 중앙부를 포함한 여섯 부위를 대상으로 치주낭 깊이와 치은퇴축을 측정하였다.

치주낭 깊이는 유리치는 변연부에서 치주낭 기저부까지 Williams probe (23W, Hu-Friedy, USA)를 사용하여 1 mm 단위로 측정하였다. 동일한 기구로 백악법랑경계부에서 유리치은변연까지 치은퇴축을 측정하였고 치은퇴축은 양의 값, 치은부중은 음의 값으로 표시하였다.

임상적 부착수준은 백악법랑경계부로부터 치주낭 기저부까지의 거리로 치주낭 깊이와 치은퇴축 양의 합으로 나타내었다.

2.3 표본 수집과 DNA 추출

각 대상자에서, 구강세정 후 멸균된 foam tipped

applicator (Hardwood product company, USA)를 이용하여 협점막 탈락상피를 채취하여 -20°C 에 저장하였다. 채취된 협점막상피 표본에 50 mM NaOH 200 μl 을 첨가하여 5분간 95°C 로 가열하고, 20 μl Tris buffer(pH 8.0)로 중화시켜 genomic DNA를 얻었다.

2.4 유전자 다변성 검사

각 유전자의 다변성을 검사하기 위해 얻어진 DNA에 해당 primer를 첨가하여 일정조건의 PCR로 증폭시킨 후 관련된 제한 효소를 사용하여 분해하였다<Table 1>. PCR 및 제한효소 분해산물은 2~3% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색한 후 자외선 하에서 밴드를 확인하였다. SNP가 존재하는 경우 대립유전자 유형에 따라 밴드가 상이하게 나타난다.

2.4.1 TNF- α 유전자 다변성 검사

제한효소는 -308 부위에는 Nco I (Bioneer, Korea), -238 부위에는 Hap II (Takara, JP)가 사용되었다[21]. 분해산물은 3% agarose gel에 적용하여 전기영동하였으며, ethidium bromide로 염색한 후 자외선 하에서 밴드를 확인하였다.

제한효소 분해산물은 -308 부위에서 G 대립유전자(대립유전자 1)가 존재하는 경우에는 97+20 bp 밴드들, A 대립유전자(대립유전자 2)가 존재하는 경우 117 bp로 나타난다.

-238 부위는 A 대립유전자(대립유전자 2)가 존재하는 경우에는 126 bp, G 대립유전자(대립유전자 1)가 존재하는 경우 104 +22bp로 분해되어 나타나게 된다 [Fig. 1].

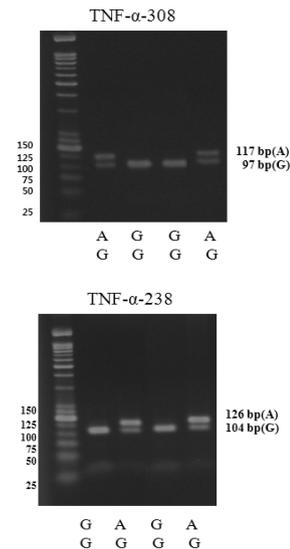
2.5 통계분석

각 환자군의 임상 및 유전자분석 자료는 SPSS를 사용하여 분석하였다. 각 그룹별 임상지수 측정치의 평균과 표준편차, 각 promoter 유전형의 분포는 기술통계를 이용하여 분석하였다. 실험군과 대조군에서의 유전형과 대립유전자 분포율의 차이를 Chi-square test나 Fisher's exact test를 사용하여 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

각 검사부위에서 대립유전자 2를 포함하는 유전자형을 가지고 있는 개체를 대립유전자 2 보인자(carrier)라고 하였다. 대립유전자 2의 빈도는 전체 대상 대립유전자 수에 대한 대립유전자 2의 비율로서 계산하였다.

<Table 1> The primer sequence와 PCR condition for candidate gene

site	primer sequences	Restriction enzyme and size
(-308G/A)	5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' 5'-ACA CTC CCC ATC CTC CCG GCT-3 35 cycles: 94°C , 2 min 60°C , 1 mi	NcoI 117bp(A) / 97+20bp(G)
(-238G/A)	5'- CCC AGA AGA CCC CCC TCG GAA CC-3' 5'- ACC TTC TGT CTC GGT TTC TTC TCC ATC GC-3' 10 cycles: 94°C 15 sec, 64°C 1 min	Hap II 126 bp(A) / 22 +104 bp(G)



[Fig. 1] The results of agarose gel electrophoresis (3%) at position -308 and -238 of TNF- α gene promoter region after PCR and restriction enzyme digestion.

3. 연구결과

3.1 임상 평가

최종적으로 실험군에 포함된 환자는 60명 (평균연령 40.5 ± 6.5 세)이었고, 대조군에는 81명 (평균연령 41.6 ± 12.8)이 포함되었다. 평균 탐침 깊이는 실험군에서 4.0 ± 1.1 mm, 대조군에서 2.4 ± 0.3 mm이었으며 평균 임상적 부착 상실은 실험군에서 4.2 ± 1.0 mm, 대조군에서 2.4 ± 0.3 mm이었다<Table 2>.

<Table 2> Demographic and clinical data of the study population

	GAP*	Reference
Number	60	81
Age (yrs, mean \pm SD)	40.5 \pm 6.5	41.6 \pm 12.8
Gender (Male/Female)	35/25	37/44
Probing depth (mm, mean \pm SD)	4.0 \pm 1.1	2.4 \pm 0.3
Clinical attachment loss (mm, mean \pm SD)	4.2 \pm 1.0	2.4 \pm 0.3

GAP*: generalized aggressive periodontitis

3.2 대립유전자와 유전자형 분석

TNF- α -308의 유전자형의 분포는 실험군에서 A/A는 3.2%, A/G는 38.7%, G/G는 82.35%였으며, 대조군에서는 각각 9.1%, 45.5%, 45.5%였다. -238은 실험군에서 A/A가 4.3%, A/G가 25.5%, G/G는 74.5%이며 대조군에서는 각각 6.3%, 12.5%, 81.3%였다<Table 3>. 대립유전자 2 (A)의 빈도는 실험군에서 -308은 67.6%, -238은 3.5%로 대조군의 72.2%, 10.7%에 비해 낮게 나타났다<Table 4>.

<Table 3> Distribution of genotypes of TNF- α polymorphisms in the GAP and reference groups (%)

	GAP	Reference	p-value
TNF- α -308			
A/A	3.2	9.1	0.046*
A/G	38.7	45.5	
G/G	82.35	45.5	
TNF- α -238			
A/A	4.3	6.3	0.642
A/G	25.5	12.5	
G/G	74.5	81.3	

* Statistically significant at p<0.05 by χ^2 test compared to the control group.

<Table 4> Distribution of TNF- α allele 2 frequency in the GAP and reference groups (%)

	GAP	Reference	p-value
TNF- α -308			
Allele A frequency	67.6	72.2	0.572
TNF- α -238			
Allele A frequency	3.5	10.7	0.038*

* Statistically significant at p<0.05 by χ^2 test compared to the control group.

4. 고찰

사이토카인은 관절염이나 치주염과 같은 만성 염증성 질환의 개시와 진행에 관련이 있는 조절성 단백질로 최근에는 치주질환의 개시와 진행, 그리고 치료결과의 예측에서 사이토카인 유전자의 역할과 관련한 연구가 주목 받고 있다[7,8].

TNF- α 는 감염 및 세포치사에 관여하는 신호전달을 촉진하는 사이토카인으로서, 많은 유전적 다형성이 보고 되고 있다. 특히 TNF- α -308 위치의 구아닌에서 아데노신으로의 염기가 바뀌게 되는 경우 TNF- α 의 분비가 증가된다고 알려져 있다[9,10].

치주염과 기능적 유전자의 다변성 간 관련성에 대한 연구는 1997년 Korman 등[11]이 보고한 이래 1999년 이후 계속 증가되고 있다. TNF- α 와 β 유전자 다변성과 치주질환과의 관련성은 체코와 브라질, 일본에서 연구되었으며, 국내에서는 B형 간염과 관련하여 Kim 등은 TNF- α -308(G/A) -1031(T/C), -863(C/A)이 항체형성에 연관된다고 보고한 바 있다[12]. 또한 TNF- α 의 세포표면수용기인 TNFR-2 유전자 다변성중 일본인에서는 +587(T/G) 부위에서만 다변성이 보고되었고 자가면역질환 및 백인의 류마티스 질환(RA) 등과 관련된다고 알려져 있다[13,14]. 일본인에서 +587 G allele은 만성치주염 심도에 기여하는 것으로 보고되었으며, 그간 국내 치주염 관련 연구는 전무하였다.

이번 연구에서 TNF- α 유전자 promoter 부위의 다변성이 일반적인 만성 치주염에 비하여 진행속도와 범위 등이 심한 급진성 치주염의 위험요인으로 관련되는지 조사하였다. TNF- α -308의 A/A, A/G, G/G의 유전자형 비율이 각각 3.2%, 38.7%, 82.35%로 나타났다. TNF- α -308의 대립유전자는 그룹간의 비슷한 차이가 보였다. 이는 인도에서 당뇨를 동반한 치주염환자와 대조군을 비교한 결과[15]와 상이한 것으로 당뇨가 치주염 발현 및 진행에 있어 어떠한 영향을 미칠 것으로 생각해 볼 수 있다.

이번 연구 결과와 유사하게 TNF- α -308 G/A AA 유전자형은 아시아인과 백인을 대상으로 한 연구에서[16] 급진성 치주염의 위험인자라는 것이 보고되었다. 또한 급진성 치주염에서의 유전자형이 유의하게 증가하였음을 보고하였다.

TNF -238 G/A 유전자형은 아시아인과 백인을 대상

으로 한 연구 결과와 유사하게 치주염과 유의한 관련이 없음이 관찰되었다. 그러나 대립유전자 2(A)의 빈도는 실험군에서 대조군보다 유의하게 낮게 나타났다.

이와 같이 치주질환과 여러 후보유전자의 관련성이 다양한 인종과 민족들 간에 다르게 관찰되고 있다. 따라서 유전적 소인과 연관되어 민족 내에서 이러한 후보 유전자들의 유전형 분포에 대한 정보가 필요하다. 그러나 한국인 인구집단에서 치주질환과 관련된 사이토카인 등 여러 기능적 유전자들의 다변성 분포에 대한 연구보고는 그 수가 적어 매우 한정되어 있다고 볼 수 있다. 그러므로, Interleukin이나 Matrix Metalloproteinase 와 같은 다른 사이토카인들, 치주질환과 관련한 기능적 유전자들의 다변성, 일체배형과 치주질환의 다양한 임상적 양상과의 관련성에 대한 연구가 더 큰 표본에서 시행되어야 할 것이다.

REFERENCES

- [1] Franca R, Rebora P, Athanasakis E, Favretto D, Verzegnassi F, Basso G, Tommasini A, Valsecchi MG, Decorti G, Rabusin M, "TNF- α SNP rs1800629 and risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: relation to immunophenotype", *Pharmacogenomics*, Vol. 15, No. 5, pp.619-627, 2014
- [2] Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, Patriotic C, Jenkins NA, Copeland NG, Kollias G, Tsichlis PN., "TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway", *Cell*, Vol. 103, No. 7, pp.1071-1083, 2000
- [3] Lange U, Teichmann J, Stracke H, "Correlation between plasma TNF-alpha, IGF-1, biochemical markers of bone metabolism, markers of inflammation/disease activity, and clinical manifestations in ankylosing spondylitis", *Eur J Med Res*, Vol. 29, No.12, pp.507-511, 2000
- [4] Fabris M, Tolusso B, Di Poi E, Assaloni R, Sinigaglia L, Ferraccioli G., "Tumor necrosis factor-alpha receptor II polymorphism in patients from southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis", *J Rheumatol*, Vol. 29, No. 9, pp.1847-1850, 2002
- [5] Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D' Aiuto F, Tonetti M. "Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis", *J Dent Res*, Vol. 84, No.12, pp.1149-1153, 2005
- [6] Armitage GC, "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions", *Ann Periodontol*, Vol. 4, No. 1, pp.1-6, 1999
- [7] Masada M. P, Persson R, Kenney JS, "Measurement of interleukin-1 α and -1 β in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease", *J periodont Res*, Vol. 25, pp.156-163, 1990
- [8] Takashiba S, Naruishi K, "Gene polymorphism in periodontal health and disease", *Periodontol* 2000, Vol. 40, pp.94-106, 2006
- [9] Wilson AG, JA Symons TL McDowell, HO McDevitt, GW Duff, "Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation", *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 94, pp.3195-3199, 1997
- [10] Rudwaleit M, Siegert S, Yin Z, Eick J, "Low T cell production of TNF- α and IFN in ankylosing spondylitis: its relation to HLAB27 and influence of the TNF- α -308 gene polymorphism", *Ann rheum Dis*, pp.36-42, 2001
- [11] Kornman KS Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW., "The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease", *J Clin Periodontol*, Vol. 24, No. 1, pp.72-77, 1997
- [12] Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, Park BL, Shin HD, "Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection", *Hum Mol Genet*, Vol. 12, No. 19, pp.2541-2546, 2003
- [13] Komata T1, Tsuchiya N, Matsushita M, Hagiwara K, Tokunaga K., "Association of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus",

- Tissue Antigens., Vol. 53, No. 6, pp.527-533, 1999
- [14] Tsuchiya N, Komata T, Matsushita M, Ohashi J, Tokunaga K, “New single nucleotide polymorphisms in the coding region of human TNFR2: association with systemic lupus erythematosus”, Genes Immun., Vol. 1, No. 8, pp.501-503, 2000
- [15] Nitin Sharma, Rosamma Joseph, R Arun, R Chandni K, Lekshmy Srinivas, Moinak Banerjee, “Cytokine gene polymorphism (interleukin-1 β +3954, Interleukin-6 [-597/-174] and tumor necrosis factor- α -308) in chronic periodontitis with and without type 2 diabetes mellitus”, Indian J Dent Res., Vol. 25, No. 3, pp.375-380, 2014
- [16] Ding C, Ji X, Chen X, Xu Y, Zhong L., “TNF- α gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility”, J Clin Periodontol, Vol. 41, No. 8, pp.748-759, 2014

김 일 신(Kim, Il Shin)



- 2008년 8월 : 전남대학교 치의학과 (치의학석사)
- 2013년 2월 : 전남대학교 치의학과 (치의학박사)
- 2014년 3월 ~ 현재 : 호남대학교 치위생학과 교수
- 관심분야 : 치주학, 골재생
- E-Mail : kiis310@honam.ac.kr