Inhibitory effect of pomegranate extract powder on periodontitis in rat

Joong-Hwa Kim^{1†}, Kyung-Hyun Lee^{2†}, Se-Jin Sung³, Kyung-Min Kang³, Yun-Kyong Lim^{4,5}, Joong-Ki Kook^{6,7}, Won-Pyo Lee⁸, Byung-Ock Kim⁹, and Sang-Joun Yu^{9*}

¹Doctor of Dental Clinic, Yedam Dental Hospital, Mokpo, Republic of Korea

²Postdoc Research Assistant, Department of Periodontology, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Republic of Korea

³Resident, Department of Periodontology, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Republic of Korea

⁴Curator, Korean Collection for Oral Microbiology, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Republic of Korea

⁵Master's Student, Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Republic of Korea

⁶Director, Korean Collection for Oral Microbiology, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Republic of Korea

⁷Professor, Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Republic of Korea

⁸Assistant Professor, Department of Periodontology, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Republic of Korea

⁹Professor, Department of Periodontology, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Republic of Korea

This study aimed to investigate the effect of pomegranate extract (PE) on the progression of periodontal disease in an experimental rat model of periodontitis. Periodontitis was induced in rats by placing a 5-0 black silk ligature and injecting a lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* into the gingiva. Distilled water (DW) or PE solution was orally administered daily, and the animals were sacrificed after 3 weeks. Tissue specimens of the periodontitis model were analyzed using an enzyme-linked immunosorbent assay kit and by micro-computed tomography (CT) imaging. The expression levels of cyclo-oxygenase (COX)-1 and COX-2 were significantly reduced in ligation (Lig)+PE 22 µg/mL and Lig+PE 44 µg/mL groups, but there was no statistically significant difference in matrix metalloproteinase (MMP)-8 levels. Furthermore, micro-CT imaging demonstrated that alveolar bone resorption was inhibited in Lig+PE 22 µg/mL and Lig+PE 44 µg/mL groups compared with that in the Lig+DW group. These results demonstrate that PE has an inhibitory effect on the progression of alveolar bone loss caused by periodontal inflammation by reducing the expression levels of COX-1 and COX-2 in the process of periodontal disease.

Key Words: Enzyme-linked immunosorbent assay, Periodontitis, Pomegranate, Prostaglandin-endoperoxide synthases, X-ray microtomography

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

치주질환은 치아를 둘러싸고 있는 지지조직의 소실을 일으키는 흔한 감염성 질환이다. 치아 지지조직의 소실은 치아의 상설로 이어지고, 이러한 파괴과정은 세균성 치태 산물과 환자의 염

증 및 면역 작용에 의해 일어난다. 스케일링과 치근활택술은 치주 병원균을 완전히 제거하는데 충분하지 않다. 이러한 이유로, 다양한 약물들(소독제, 비스테로이드성 항염증제, 그리고 항생제)이 세균들의 완전한 제거를 위해서 추가적으로 적용된다. 하지만 이러한 약물들이 전신적으로 고용량 사용되었을 경우에는

Received February 13, 2020; **Revised** [1] February 26, 2020; [2] February 28, 2020; **Accepted** March 2, 2020

***Corresponding author:** Sang-Joun Yu, Department of Periodontology, School of Dentistry, Chosun University, 309 Pilmun-daero, Dong-gu, Gwangju 61452, Republic of Korea.

Tel: +82-62-220-3850, **Fax:** +82-62-224-4664, **E-mail:** sjyu78@chosun.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

Copyright © 2020, Oral Biology Research Institute

항생제 저항균과 약물 상호간의 부작용 발생과 같은 합병증이 나타날 수 있다. 이런 단점을 보완하기 위해 국소적 약물 전달법이 발달하였고, 전신적 약물 사용의 위험성과 합병증을 예방하기 위해 자연물에서 얻을 수 있는 천연약물의 개발이 필요하다.

석류 추출물(pomegranate extract, PE)은 상당한 의학적 가치를 가진 허브추출물 중의 하나이다[1]. 석류에서 추출된 폴리페놀은 항세균작용[2], 항산화작용[3], 항염작용[4], 항증식작용[5], 그리고 DNA 치료작용을 나타내며 이러한 다양한 작용들은 PE가 기존의 전신적 약물의 대체약물로서 사용될 수 있는 가능성을 높여준다. 또한 심혈관 질환, 당뇨, 설사, 이질, 천식, 기관지염, 기침, 출혈 질환, 발열, 염증, 후천성 면역 결핍 증후군, 소화 불량, 궤양, 타박상, 염증, 구강 병변, 피부 병변, 남성의 불임, 질염, 발기 부전, 알츠하이머병, 비만, 신생아 저산소성 허혈성 뇌 손상 등의 치료에도 널리 사용되었다[6-9].

석류씨 오일은 다양한 염증 매개체 생산에 관여하는 cyclooxygenase (COX)나 lipoxygenase 효소를 억제하며, 석류 열매 추출물은 matrix metalloproteinases (MMPs) 발현과 interleukin 1 beta (IL-1 β) 유도 조직 파괴에 광범위한 억제 효과를 가지고 있다[7,10]. 또한 구강내 발생할 수 있는 염증 과정과 관련하여, 석류산의 주요 성분인 푸닉산(punic acid)는 프로스타글란딘(prostaglandin) 생산을 억제하는 우수한 항염증 화합물이다. 이러한 항염증 효과는 석류의 대식세포와 T 및 B 림프구에 대한 면역 조절 작용 때문일 수 있다[11].

석류 구강 세정제는 chlorhexidine 구강 세정제(79%)에 비해 치태 형성 세균을 84%까지 억제하였으며[12], chlorhexidine 구강 세정제와 비교할 때 *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* 및 *Lactobacillus casei*에 대해 더 많은 억제 효과가 있음을 확인하였다[7]. 또한 석류 구강 세정제는 혐기성 치주 병원균인 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*의 성장을 억제하며 chlorhexidine 구강 세정제보다 치은 및 출혈 점수의 감소를 가져온다는 사실이 입증되었다[13]. 이러한 석류의 항균 효과는 석류의 가당성 타닌, punicalagin 및 갈산(gallic acid)과 같은 폴리페놀 때문이며 이러한 특정 구성요소는 세균의 세포막에 작용하여 세균의 세포벽의 파괴 증가 및 세균의 치아 표면을 부착을 방지한다[6].

최근에 활용되고 있는 프로바이오틱 세균(probiotic bacteria)은 구강 생물막(oral biofilm) 내의 치주 병원균의 수를 감소시킬 뿐만 아니라 상피 방어기능을 강화시킴으로써 감염에 대한 저항성을 증가시켜 치주염 치료에 도움을 줄 수 있다. 석류에 함유되어 있는 punicalagin은 프로바이오틱 세균, 특히 *Bifidobacterium* 종과 *Lactobacillus* 종을 증가시키는 것으로 보고되었다[14].

본 연구에서는 쥐의 치주질환 발생 모델에서 석류 추출물 분말(Pomegranate Extract Powder; GNC, Pittsburgh, PA, USA)이 치주질환의 진행에 어떠한 영향을 나타내는지에 대해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법, 방사선학적 평가법을 통해 평가하고자 한다.

대상 및 방법

세균 배양 및 lipopolysaccharide 추출

본 연구에서 사용된 *P. gingivalis* KCOM 2804 균주는 한국 구강미생물자원(Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다. *P. gingivalis* KCOM 2804 균주는 Tryptic soy broth (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5 mg/mL hemin 및 2 μ g/mL vitamin K₁가 포함된 배지에 접종하여 37°C anaerobic chamber (Bactron I; Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)와 혐기성 조건(10% H₂, 5% CO₂, 85% N₂)에서 배양하였다. *P. gingivalis* KCOM 2804 균주에서 lipopolysaccharide (LPS) 추출을 위하여 LPS extraction kit (iNtRon, Seongnam, Korea)를 사용하였으며 동봉된 프로토콜에 따라 시행하였다. 추출된 LPS는 *P. gingivalis* LPS (pgLPS)라고 하였으며 동결 건조하여 무게를 측정한 후 농도를 구하여 사용하였다.

백서 치아 실-결찰 치주질환 유도 모델

총 40마리의 수컷 백서(Wistar rats; 6주, 180-230 g)를 이용하였으며 모든 실험은 조선대학교 동물실험윤리심의위원회(Chosun University Institutional Animal Care and Use Committee)의 심의를 거쳐 진행하였다(CIACUC2018-A0007). 실험은 총 4개 그룹으로 진행되었고, 각 그룹당 10마리의 수컷 백서들을 무작위적으로 배당하였으며 실험 그룹은 아래와 같다.

1) Non-ligation (Lig) 그룹(non-periodontitis model): 매일 분말의 용매인 물 0.5 mL/kg을 사료와 함께 먹인 음성 대조군.

2) Lig+distilled water (DW) 그룹(periodontitis model): 5-0의 실-결찰(silk-ligature; 직경 0.5-0.6 mm)을 상악 제2대구치의 치경부에 고정시킨 후 협설측 치은 내에 인산완충생리 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 희석된 1 μ g/mL pGLPS를 주사기를 이용하여 매주 1회씩 주입하였으며 매일 물 1 mL을 경구용 주사침(oral zonde)을 이용하여 투여한 실험군.

3) Lig+PE 22 μ g/mL 그룹(periodontitis model): Lig+DW 그룹처럼 결찰한 뒤 pGLPS를 주입한 후 매일 22 μ g의 PE 분말

을 1 mL의 물에 타서 경구용 주사침을 이용하여 투여한 실험군.

4) Lig+PE 44 μ g/mL 그룹(periodontitis model): Lig+DW 그룹처럼 결찰한 뒤 pgLPS를 주입한 후 매일 44 μ g의 PE 분말을 1 mL의 물에 타서 경구용 주사침을 이용하여 투여한 실험군.

술 전 1 mg/kg의 xylazine hydrochloride으로 전신마취 시킨 후 실험을 시행하였으며 실험은 3주 동안 시행하였다. 실험 마지막 날인 3주째에는 마취 후 이산화탄소(CO₂) 가스 흡입을 통해 동물들을 희생시켰다. 치은조직을 우측 상악 제2대구치의 주위에서 채득한 후 특정 염증 사이토카인 및 MMPs의 발현 분석을 위해 -80°C에서 보관하였다. 우측 상악 제2대구치와 좌측 상악 제2대구치의 주위에서 채득한 치아를 포함한 골조직편을 10% formaldehyde로 고정하고 미세 컴퓨터 단층촬영(micro-computed tomography [CT]) 검사를 위해 준비하였다.

항염 효능 평가(ELISA 분석)

모든 대조군과 실험군 백서에서 채취한 치은조직에서 염증성 사이토카인들인 MMP-8, COX-1 및 COX-2 발현 변화를 측

정하기 위하여 ELISA kit (MyBioSource, San Diego, CA, USA)를 이용하였다. ELISA kit 실험 진행을 위해 보관된 치은조직은 PBS와 함께 균질화 시킨 후 원심분리를 이용하여 상층액을 분리하였다. 이 실험에서는 상층액을 사용하였으며 제조사의 지시에 따라 분석을 시행하였다. 결과는 제조사의 공식에 따라 혈액 내에 존재하는 각각 단백질들의 질량(ng/mL)으로 나타났다.

Micro-CT imaging

채득한 골조직편을 90 kVp의 acceleration potential, 88 μ A의 beam current의 조건에서 2분 동안 Quantum GX micro-CT Imaging System (PerkinElmer, Hopkinton, MA, USA)을 이용하여 촬영하였다. 치아주위와 치조골 주위의 3차원적 구조물들을 모든 방향과 모든 폭경에서 평가하기 위하여 software programs (OnDemand3D, Cybermed, Seoul, Korea)을 통해 재건하고 형태화한 후 분석하였다. 평가항목은 백악법랑경계(cemento-enamel junction, CEJ), 치근면(root surface), 그리고 치조골정(alveolar bone crest, ABC)이었고, 이 구조물들 사

Fig. 1. Expression of inflammatory cytokines in gingival tissues following PE administration. (A) The expression of MMP-8 was lower in the Lig+PE 22 μ g/mL and Lig+PE 44 μ g/mL groups than the Lig+DW group. (B) The expression of COX-1 was decreased in the experimental group taking PE compared to the periodontitis induction experimental group. (C) In the Lig+PE 22 μ g/mL and Lig+PE 44 μ g/mL groups, the COX-2 was expressed lower than non-Lig and Lig+DW groups. PE, pomegranate extract; MMP, matrix metalloproteinase; Lig, ligation; DW, distilled water; COX, cyclo-oxygenase. *Statistically significant difference by Mann-Whitney U-test ($p < 0.05$).

이의 관계를 선으로 그려서 평가하였다. 치조골 흡수량 평가를 위하여 CEJ와 ABCs의 관상면 사이의 거리를 한 치아당 총 6부위에서 측정하였다. 즉 상악 좌, 우측 제2대구치의 근심 협측, 원심 협측, 협측 중앙, 근심 구개측, 원심 구개측, 그리고 구개측 중앙에서 측정하였다.

통계분석

대조군과 실험군의 실험수치는 평균±표준편차로 표시하였고, 집단간의 통계적 유의 수준의 차이가 있는지를 검증하기 위해 SPSS 통계프로그램 ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 비모수검정법인 Mann-Whitney U-test를 실시하였다. 분석 결과 95% 신뢰수준에서 유의 확률이 0.05 (유의수준 5%) 미만 ($p<0.05$)일 때 두 집단 간의 유의미한 차이가 있다고 해석하였다.

결 과

PE의 치은조직 내 염증관련 사이토카인에 대한 반응 결과

MMP-8의 발현은 Lig+PE 22 µg/mL 그룹과 Lig+PE 44 µg/mL 그룹에서 치주질환 유도 실험군인 Lig+DW 그룹보다 더 낮

았으며 Lig+PE 44 µg/mL 그룹의 MMP-8의 발현이 가장 낮게 나타났다. 하지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 1A, Table 1). COX-1의 발현은 Lig+PE 22 µg/mL 그룹과 Lig+PE 44 µg/mL 그룹에서 정상 실험군인 non-Lig 그룹과 Lig+DW 그룹보다 낮았다. 이중에 Lig+PE 44 µg/mL 그룹에서 Lig+DW 그룹보다 통계적으로 유의하게 낮은 COX-1이 발현됨을 확인하였다(Fig. 1B, Table 2). COX-2의 발현 관찰 결과, Lig+PE 22 µg/mL 그룹과 Lig+PE 44 µg/mL 그룹에서 non-Lig 그룹과 Lig+DW 그룹보다 낮게 발현되었다. 특히 Lig+PE 22 µg/mL 그룹과 Lig+PE 44 µg/mL 그룹은 non-Lig 그룹과 Lig+DW 그룹보다 통계적으로 유의하게 낮은 발현을 보였다(Fig. 1C, Table 3).

Micro-CT를 이용한 치조골 소실 억제능 평가 결과

석류 복합물을 복용하는 것과 상관없이 치조골의 소실은 발생하였으나 치주질환 유도 실험군인 Lig+DW 그룹에 비해 Lig+PE 22 µg/mL 그룹과 Lig+PE 44 µg/mL 그룹에서 통계적으로 유의한 치조골 흡수 억제가 관찰되었다($p<0.001$, $p=0.004$). 그러나 Lig+PE 22 µg/mL 그룹과 Lig+PE 44 µg/mL 그룹 사이의 치조골 흡수량은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.502$) (Fig. 2, 3).

Table 1. Expression of MMP-8 in gingival tissue following PE administration

Group	Concentration of MMP-8 in the gingiva tissue				
	Mean±SD	p-value			
		Non-Lig	Lig+DW	PE 22 µg/mL	PE 44 µg/mL
Non-Lig	5.957±2.401	-	-	-	-
Lig+DW	6.765±3.490	0.696	-	-	-
Lig+PE 22 µg/mL	6.210±3.014	0.897	0.739	-	-
Lig+PE 44 µg/mL	5.308±2.163	0.274	0.190	0.393	-

MMP, matrix metalloproteinase; PE, pomegranate extract; SD, standard deviation; Lig, ligation; DW, distilled water; -, not available.

Table 2. Expression of COX-1 in gingival tissue following PE administration

Group	Concentration of COX-1 in the gingiva tissue				
	Mean±SD	p-value			
		Non-Lig	Lig+DW	PE 22 µg/mL	PE 44 µg/mL
Non-Lig	4.529±2.418	-	-	-	-
Lig+DW	5.025±2.482	0.897	-	-	-
Lig+PE 22 µg/mL	3.742±1.543	0.315	0.063	-	-
Lig+PE 44 µg/mL	2.945±1.129	0.068	0.005*	0.19	-

COX, cyclo-oxygenase; PE, pomegranate extract; SD, standard deviation; Lig, ligation; DW, distilled water; -, not available.

*Statistically significant difference by Mann-Whitney U-test ($p<0.05$).

Table 3. Expression of COX-2 in gingival tissue following PE administration

Group	Concentration of COX-2 in the gingiva tissue				
	Mean±SD	p-value			
		Non-Lig	Lig+DW	PE 22 µg/mL	PE 44 µg/mL
Non-Lig	0.202±0.101	-	-	-	-
Lig+DW	0.225±0.198	0.633	-	-	-
Lig+PE 22 µg/mL	0.057±0.027	<0.001*	0.004*	-	-
Lig+PE 44 µg/mL	0.063±0.034	0.001*	0.043*	0.23	-

COX, cyclo-oxygenase; PE, pomegranate extract; SD, standard deviation; Lig, ligation; DW, distilled water; -, not available.

*Statistically significant difference by Mann-Whitney U-test ($p < 0.05$).

Fig. 2. Evaluation of alveolar bone loss using micro-computed tomography. The Lig+DW group showed significant alveolar bone loss compared to the non-Lig group, and the alveolar bone loss in Lig+PE 22 µg/mL and Lig+PE 44 µg/mL groups was reduced compared to the Lig+DW group. Lig, ligation; DW, distilled water; PE, pomegranate extract.

Fig. 3. Alveolar bone resorption evaluation. Compared to Lig+DW group, statistically significant inhibition of alveolar bone resorption was observed in the Lig+PE 22 µg/mL and Lig+PE 44 µg/mL groups. CEJ, cemento-enamel junction; CT, computed tomography; Lig, ligation; DW, distilled water; PE, pomegranate extract. *Statistically significant difference by Mann-Whitney U-test ($p < 0.05$).

고찰

이 연구는 쥐의 상악 구치부에 black silk의 결찰을 통해 발생하는 실험적 치주질환 모델을 이용하였다. de Molon 등[15]은 결찰을 통해 발생시키는 치주질환 모델에서 발생하는 치주 염증 단계를 2주 이내에 발생하는 초기 급성 염증 단계와 2-3주 이내 발생하는 만성 염증 단계로 나누었다. 초기 급성 염증단계에서는 치조골의 소실 및 염증 증가가 관찰되었고, 전염증성 사이토카인들인 IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α , receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, 그리고 osteoprotegerin이 1주 내에서 증가되었다고 하였다. 반면에 만성 염증단계에서는 치조골의 소실이나 염증의 증가, 전염증성 사이토카인의 증가가 관찰되지 않았다고 하였다. 본 연구에서도 black silk 결찰은 3주 간 이루어졌으며 치주질환군에서 치조골의 유의한 골 소실과 염증성 사이토카인인 COX-1, COX-2의 증가가 관찰되

었다.

MMP-8은 MMP family중에 collagenase 계열에 속한다. MMP-8은 치주질환에서 외세포성 기질을 분해하는 세포간의 주된 collagenase로 보고되었다[16]. MMP-8은 주로 만성치주염에서의 주로 관찰되는 collagenase이며 치은열구액과 타액의 MMP-8의 양은 치주질환이 진행되는 동안 증가되고, 치주치료 후에 감소된다[16-18]. 본 연구에서는 MMP-8 발현이 치주질환 유도 실험군인 Lig+DW 그룹에서 통계적으로 유의하게 증가되지 않았지만, Lig+PE 22 $\mu\text{g/mL}$ 그룹과 Lig+PE 44 $\mu\text{g/mL}$ 그룹에서 Lig+DW 그룹에 비해 더 낮게 발현됨을 확인하였다. MMP-8의 발현은 Lig+PE 44 $\mu\text{g/mL}$ 그룹에서 가장 낮게 나타났다. 다른 군과 서로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 초기 염증 단계가 2주 간 진행되고, 2주 후에 만성 염증 단계로 진행됨에 따라 3주 간의 관찰 기간이 MMP-8이 발현되기에 짧은 기간이었기 때문으로 생각한다.

프로스타글란딘은 아라키돈산(arachidonic acid)에 대한 COX의 활성화에 의해 생산된다. 최근 연구에 의하면 COX의 중요한 2가지 isoform인 COX-1과 COX-2가 존재한다[19]. COX-1은 정상 생리학적 기능들을 위해 필요한 프로스타글란딘의 생산과 관련이 있고, COX-2는 염증반응 동안에 급격히 발현되며 국소 혈류, 혈관 투과성, 세포 이동, 그리고 염증과정의 통증 발현을 증가시키는 것과 관련된 프로스타글란딘의 다양한 형태의 생산과 관련이 있다[20-22]. Pouliot 등[23]은 치주질환 환자의 치은열구액에서 증가된 프로스타글란딘 E2, 그리고 증가된 COX-2의 발현을 관찰했다. 또한 Queiroz-Junior 등[24]은 COX-1과 COX-2가 쥐의 치주질환의 초기 단계에 관여한다고 보고하였다. 이 연구에서 MMP-8, COX-1, COX-2 등 3종의 염증성 사이토카인의 치주조직에서의 발현을 평가하였다. Lig+DW 그룹과 non-Lig 그룹 사이에서의 염증성 사이토카인의 통계적으로 유의한 증가는 관찰되지 않았지만, PE 복용 후 치주조직내의 COX-1 발현은 Lig+PE 44 $\mu\text{g/mL}$ 그룹에서 Lig+DW 그룹에 비해 통계적으로 유의하게 감소되었다. COX-2의 발현은 Lig+PE 22 $\mu\text{g/mL}$ 그룹과 Lig+PE 44 $\mu\text{g/mL}$ 그룹에서 non-Lig 그룹과 Lig+DW 그룹에 비해 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다. 이 결과는 PE가 치은조직 내의 COX-1, COX-2의 발현을 억제한다는 것을 의미한다.

치주염은 치조골의 소실이 특징적이며 다양한 방법들이 치주염의 치조골 소실량을 측정하는데 사용되었다. 예를 들면, 형태측정학적 방법, 방사선학적 방법, 그리고 조직학적 방법들이 있다[25-28]. 하지만 이런 방법들은 단지 선형 그리고 2차원적인 정보만을 제공하기 때문에 치주감염동안 발생할 수 있는 골내병소의 변화를 3차원적으로 측정할 수 없다. 이 연구에서는 micro-CT를 사용하여 기존의 방법보다 더 세밀한 측정이 가능

하도록 하였다[29-33]. 고화질 micro-CT 분석법은 3차원적인 치조골 모델을 만들 수 있도록 하고 상당히 세밀하고 비침습적으로 정보를 분석할 수 있게 해준다[34]. 본 연구에서 치조골 소실은 치주질환 유도 실험군에서 정상 실험군에 비해 통계적으로 유의한 골소실을 보였으나 Lig+PE 22 $\mu\text{g/mL}$ 그룹과 Lig+PE 44 $\mu\text{g/mL}$ 그룹에서는 치주질환군에 비해 통계적으로 유의하게 적은 골소실이 관찰된다. 이는 PE의 복용이 초기 급성 염증시기에 치조골 소실을 억제함으로써 나타나는 결과이며 PE가 치주질환에서 치조골 소실을 방지하는 역할을 할 수 있다는 가능성을 보여준다.

이상의 결과에서 보듯 PE가 치주질환 진행과정에 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킴으로써 치주조직 염증에 의한 치조골 파괴의 진행을 억제하는 기능이 있으며, 치주질환 예방 및 치료제로써 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각한다. 그러나 본 연구는 술 후 3주까지만 관찰한 한계가 있어 향후 장기적 관찰을 통해 만성 염증에 대한 석류 추출의 영향을 평가하기 위한 연구가 필요하리라 생각한다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This paper was supported by research fund from Chosun University in 2016.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

ORCID

Joong-Hwa Kim

<https://orcid.org/0000-0002-5310-7667>

Kyung-Hyun Lee

<https://orcid.org/0000-0001-7714-6743>

Se-Jin Sung

<https://orcid.org/0000-0001-8785-2836>

Kyung-Min Kang

<https://orcid.org/0000-0002-5098-5261>

Yun-Kyong Lim

<https://orcid.org/0000-0002-6215-8204>

Joong-Ki Kook

<https://orcid.org/0000-0003-2628-2870>

Won-Pyo Lee

<https://orcid.org/0000-0003-1911-3454>

Byung-Ock Kim

<https://orcid.org/0000-0001-8952-617X>

Sang-Joun Yu

<https://orcid.org/0000-0001-8818-549X>

REFERENCES

1. Rajan S, Ravi J, Suresh A, Guru S. Hidden secrets of 'Punica granatum' use and its effects on oral health: a short review. *J Orophac Res* 2013;3:38-41. doi: 10.5005/jp-journals-10026-1061.
2. Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, de Araújo CR, Higino JS. In vitro antibacterial and antiadherence effect of the extract of the *Punica granatum* Linn. Upon dental biofilm microorganisms. *Rev Bras Farmacogn* 2006;16:88-93. doi: 10.1590/S0102-695X2006000100016.
3. Masaud IA, Rohin M, Baig AA, Mohamad N. Potential of therapeutic antioxidant compounds from pomegranate as anti-cancer agent. *J Chem Pharm Res* 2014;6:427-433.
4. Dahham SS, Ali MN, Tabassum H, Khan M. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). *American-Eurasian J Agric Environ Sci* 2010;9:273-281.
5. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* 2005;16:360-367. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.01.006.
6. Abdollahzadeh Sh, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of punica granatum peel extracts against oral pathogens. *J Dent (Tehran)* 2011;8:1-6.
7. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev* 2008;13:128-144.
8. Prakash CVS, Prakash I. Bioactive chemical constituents from pomegranate (*Punica granatum*) juice, seed and peel - a review. *Int J Res Chem Environ* 2011;1:1-18.
9. Miguel MG, Neves MA, Antunes MD. Pomegranate (*Punica granatum* L.): a medicinal plant with myriad biological properties - a short review. *J Med Plant Res* 2010;4:2836-2847. doi: 10.5897/JMPR.
10. Arun N, Singh D. *Punica granatum*: a review on pharmacological and therapeutic properties. *Int J Pharm Sci Res* 2012;3:1240-1245. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.
11. Gracious Ross R, Selvasubramanian S, Jayasundar S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits--a preliminary study. *J Ethnopharmacol* 2001;78:85-87. doi: 10.1016/S0378-8741(01)00287-2.
12. Kote S, Nagesh L. Effect of pomegranate juice on dental plaque microorganisms (streptococci and lactobacilli). *Anc Sci Life* 2011;31:49-51.
13. Bhadbhade SJ, Acharya AB, Rodrigues SV, Thakur SL. The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. *Quintessence Int* 2011;42:29-36.
14. Bialonska D, Ramnani P, Kasimsetty SG, Muntha KR, Gibson GR, Ferreira D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *Int J Food Microbiol* 2010;140:175-182. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.038.
15. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech* 2018;81:1412-1421. doi: 10.1002/jemt.23101.
16. Tüter G, Kurtiş B, Serdar M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Periodontol* 2002;73:487-493. doi: 10.1902/jop.2002.73.5.487.
17. Marcaccini AM, Novaes AB Jr, Meschiari CA, Souza SL, Palitoto DB, Sorgi CA, Faccioli LH, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. *Clin Chim Acta* 2009;409:117-122. doi: 10.1016/j.cca.2009.09.012.
18. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuairi LR, de Sousa TS, Taba M Jr, Teofilo JM, Jacob-Ferreira AL, Tanus-Santos JE, Novaes AB Jr, Gerlach RF. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2010;37:180-190. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01512.x.
19. Mitchell JA, Warner TD. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:75-86. doi: 10.1038/nrd1929.
20. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271:33157-33160. doi: 10.1074/jbc.271.52.33157.
21. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97.
22. de Menezes GB, dos Reis WG, Santos JM, Duarte ID, de Francischi JN. Inhibition of prostaglandin F(2alpha) by selective cyclooxygenase 2 inhibitors accounts for reduced rat leukocyte migration. *Inflammation* 2005;29:163-169. doi: 10.1007/s10753-006-9013-z.
23. Pouliot M, Clish CB, Petasis NA, Van Dyke TE, Serhan CN. Lipoxin A(4) analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry*

- 2000;39:4761-4768. doi: 10.1021/bi992551b.
24. Queiroz-Junior CM, Pacheco CM, Maltos KL, Caliri MV, Duarte ID, Francischi JN. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. *J Periodontol Res* 2009;44:153-160. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01069.x.
25. Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA, Sallum AW. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontol Res* 2001;36:361-366. doi: 10.1034/j.1600-0765.2001.360603.x.
26. Bosco AF, Bonfante S, de Almeida JM, Luize DS, Nagata MJ, Garcia VG. A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. *J Periodontol* 2007;78:527-532. doi: 10.1902/jop.2007.060149.
27. Benatti BB, César-Neto JB, Gonçalves PF, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking affects the self-healing capacity of periodontal tissues. A histological study in the rat. *Eur J Oral Sci* 2005;113:400-403. doi: 10.1111/j.1600-0722.2005.00240.x.
28. Hausmann E. Radiographic and digital imaging in periodontal practice. *J Periodontol* 2000;71:497-503. doi: 10.1902/jop.2000.71.3.497.
29. Boyd SK, Davison P, Müller R, Gasser JA. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography. *Bone* 2006;39:854-862. doi: 10.1016/j.bone.2006.04.017.
30. Balto K, Müller R, Carrington DC, Dobeck J, Stashenko P. Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. *J Dent Res* 2000;79:35-40. doi: 10.1177/00220345000790010401.
31. Barou O, Valentin D, Vico L, Tirode C, Barbier A, Alexandre C, Lafage-Proust MH. High-resolution three-dimensional micro-computed tomography detects bone loss and changes in trabecular architecture early: comparison with DEXA and bone histomorphometry in a rat model of disuse osteoporosis. *Invest Radiol* 2002;37:40-46. doi: 10.1097/00004424-200201000-00008.
32. Cortet B, Chappard D, Boutry N, Dubois P, Cotten A, Marchandise X. Relationship between computed tomographic image analysis and histomorphometry for micro-architectural characterization of human calcaneus. *Calcif Tissue Int* 2004;75:23-31. doi: 10.1007/s00223-004-0086-0.
33. Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Huysmans MC, Leeuwen MB, Raghoobar GM, Bos RR, Stegenga B. A comparison of micro-CT, microradiography and histomorphometry in bone research. *Arch Oral Biol* 2008;53:558-566. doi: 10.1016/j.archoralbio.2007.11.011.
34. Park CH, Abramson ZR, Taba M Jr, Jin Q, Chang J, Kreider JM, Goldstein SA, Giannobile WV. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol* 2007;78:273-281. doi: 10.1902/jop.2007.060252.