

## Inhibitory Effect of SPA0355, a Thiourea Analogue, on Inflammation and Alveolar Bone Loss in Rats with Ligature-Induced Periodontitis

Eun-Jung Bak<sup>1</sup>, Ji-Hye Kim<sup>2,3,4</sup>, Dong-Eun Lee<sup>2,3,4</sup>, Byung-Hyun Park<sup>5</sup>, Jae-Ha Ryu<sup>6</sup>,  
Jeong-Heon Cha<sup>1,2,3,4</sup>, Raok Jeon<sup>6†\*</sup>, and Yun-Jung Yoo<sup>2,3,4†\*</sup>

<sup>1</sup>Oral Cancer Research Institute, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, Korea

<sup>3</sup>Department of Oral Biology, Oral Science Research Center, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea

<sup>4</sup>Department of Applied Life Science, The Graduate School, Yonsei University, Seoul, Korea

<sup>5</sup>Department of Biochemistry, Chonbuk national University Medical School, Jeonju, Korea

<sup>6</sup>Research Center for Cell Fate Control, College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea

(received May 10, 2012 ; revised Jun 12, 2012 ; accepted Jun 19, 2012)

It has been documented that SPA0355 exerts anti-inflammatory effects via the inhibition of nuclear factor-kappaB activation. In present study, we investigated the inhibitory effects of SPA0355 on periodontitis in an animal model. Periodontitis was induced by ligation of the cervix of the 1st molar in the left mandible in rats. After ligation, the rats were randomly divided into four groups and topically applied with SPA0355 (0.5, 1, and 2%) or the vehicle alone once daily for 10 days. Body weight and food intake were measured daily throughout the experimental period. At day 10 post-ligation, the infiltration of inflammatory cells and distance of the cemento-enamel junction (CEJ) to the alveolar bone crest (ABC) in the distal area of ligatured tooth were estimated histopathologically. No changes in body weight or food intake were found between the control and SPA0355 groups. The degree of inflammation was decreased in all three SPA0355 application groups. A decrease CEJ-ABC distance was observed in the 0.5% and 1% SPA0355 groups. These results indicate that SPA0355 inhibits the infiltration of inflammatory cells and alveolar

bone resorption and suggests its potential as a therapeutic agent for periodontitis.

**Key words:** SPA0355, periodontitis, bone, inflammation

### 서 론

치주조직은 상피세포, 치은섬유세포, 치주인대세포 및 치조골로 이루어져 있으며, 치아를 지지하는 중요한 구조물이다. 치주염은 치태내 존재하는 세균이 원인이 되어 발생하며, 주변 치주조직의 세포 반응을 자극하여 치은 조직의 파괴와 치조골의 흡수까지 유발하게 된다[1-3]. 2010년 보건복지부에서 발표한 구강검진 통계자료[4]에 따르면 75세 이상에서 치주염 발생율이 20대(발생율 2.5%)에 비해 50배 이상 증가하는 것으로 나타나 고령화가 진행되고 있는 현대사회에서 치주염 예방의 중요성이 강조되고 있다.

치주염을 유발하는 원인균으로는 그람 음성인 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 및 *Treponema* 등이 있다[5]. 이들 세균이 생성하는 내독소, 외독소 및 효소의 직접적인 작용뿐만 아니라 이들에 의하여 생성되는 interleukin(IL)-1, IL-8 및 tumor necrosis factor  $\alpha$ (TNF $\alpha$ )와 같은 염증 유도 사이토카인들이 치주조직에서의 염증 유발과 파골세포의 형성을 유도하기 때문에[6], 치주염의 병인기전에 있어 이들의 중요성이 강조되어 왔다[7,8]. 따라서 치주염 치료제 및 예방제 및 치조골 흡수 억제 효과를 나타내는

†These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Yun-Jung Yoo, Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry, 134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea.

Tel: +82-2-2228-3060, Fax: +82-2-2227-7903

E-mail: yu618@yuhs.ac

Raok Jeon, Research Center for Cell Fate Control, College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, 52 Hyochoangwon-gil, Yongsan-gu, Seoul 140-742, Korea. Tel: +82-2-710-9571, Fax: +82-2-715-9571, E-mail: rjeon@sookmyung.ac.kr

약제 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[9-13].

Nuclear factor-kappaB(NF- $\kappa$ B)는 전사인자로 NF- $\kappa$ B1(p50), NF- $\kappa$ B2(p52), p65(RelA), RelB과 c-Rel의 5가지 종류가 있으며 이들은 homo 또는 heterodimers 형태로 세포질내에 존재한다[14]. NF- $\kappa$ B 활성화와 치주염과의 관련성을 제시하는 연구논문들이 다수 보고되어 왔는데, Sugita 등은 *P. gingivalis*의 내독소를 호중구에 처리하였을 때 NF- $\kappa$ B의 매개에 의해 IL-8의 발현이 증가한다고 보고하였다[15]. 또 다른 연구에서는 치주질환의 조직내에 다량 함유되어 있는 그람 음성 세균의 내독소, IL-1 및 TNF에 의해 NF- $\kappa$ B의 활성화가 유도되는 것으로 보고되었다[16]. 또한 치주염 환자의 치주조직에서의 NF- $\kappa$ B(p50/p65)의 발현이 건강한 치주조직과 비교하여 증가하는 것이 확인되었다[17].

SPA0355는 thiourea analogue 계의 합성 화합물로, 내독소로 자극한 대식세포주 Raw264.7에서 NF- $\kappa$ B 억제제로 작용함이 밝혀진 물질이다[18]. 최근에는 SPA0355가 관절염을 유발한 동물모델에서 NF- $\kappa$ B 경로를 차단하여 염증 반응과 조직 파괴를 감소시키는 결과도 보고되었다[19]. 따라서 본 연구에서는 NF- $\kappa$ B 억제능을 가진 SPA0355가 치실을 묶어 치주염을 유발한 동물모델에서 치주조직의 염증 반응 및 치조골 흡수를 억제하는 효과를 나타내는지 평가하였다.

## 재료 및 방법

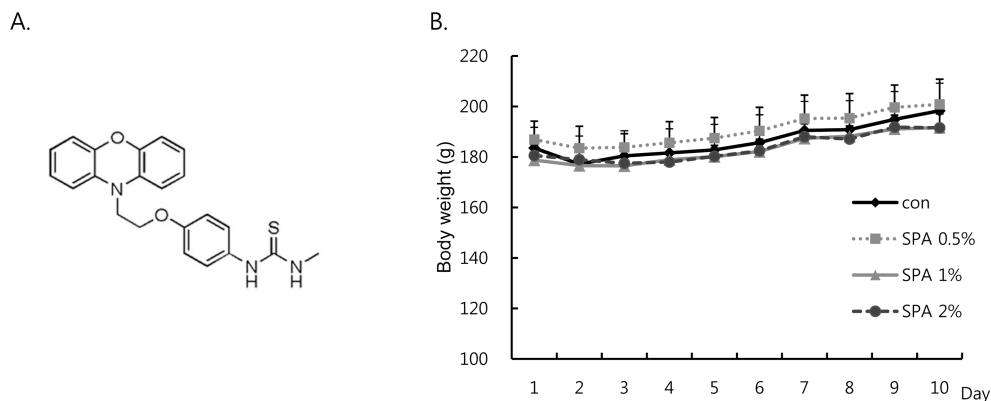
### SPA0355 합성

SPA0355의 합성은 기존에 보고된 방법을 통하여 합성하였다[18]. 페녹사진을 염기 조건 하에 *N*-hydroxyethylation시킨 후 생성된 알코올 화합물을 mesylate로 전환하였다. *p*-nitrophenol을 얻어진 mesylate 화합물과 염기 조건 하에서 알킬화시켜 나이트로 화합물을 얻고, 이를 아민으로 환원시켰다. 얻어진 아민 화합물을 methyl isothio-

cyanate와 반응시킨 후 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하여 연노랑색 고체의 최종화합물 SPA0355를 합성하였다(Fig. 1A). SPA0355의 구조와 순도는  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, FT-IR, HRMS를 통해 확인하였으며, 분석 스펙트럼의 결과는 다음과 같다. IR(neat, cm $^{-1}$ ) 3387, 3211, 1540, 1508, 1490, 1464, 1376, 1273, 1042;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl $_3$ ) d 7.78(brs, 1H), 7.07(d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.85(d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.76(td, 2H, J = 7.6, 1.6 Hz), 6.64(td, 2H, J = 7.6, 1.6 Hz), 6.59-6.00(m, 4H), 5.83(br s, 1H), 4.17(t, 2H, J = 6.4 Hz), 3.94(t, 2H, J = 6.4 Hz), 3.06(s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR(100 MHz, CDCl $_3$ ) d 182.3, 158.0, 145.0, 133.2, 129.2, 128.1, 123.8, 121.6, 116.1, 115.8, 111.9, 64.3, 44.0, 32.3; MS(FAB) m/z 392.14 [M+H] $^+$ ; HRMS(FAB) Calculated for C $_{22}$ H $_{22}$ N $_3$ O $_2$ S [M+H] $^+$  392.1433, Found 392.1400.

### 쥐에서 치주염 유발 및 SPA0355 적용

6주령 숫컷 쥐(오리엔트바이오, 성남)를 도입하여 일주일동안 순화과정을 거쳤다. 동물은 사료와 음수를 자유롭게 급이하였고, 온도(22°C)와 빛(12시간 주기)이 조절되는 공간에서 사육하였다. 순화과정을 거친 후, 모든 쥐에서 치주염을 유발하였다. 줄레틴과 케타민을 1:2 비율 (1.5  $\mu$ l/체중 1g)로 섞어 복강내 주사하여 마취를 유도하였다. 왼쪽 하악의 첫번째 대구치 치경부 주위를 치실(Oral-B, Ireland)로 돌렸고, 매듭은 첫번째 대구치의 앞쪽으로 위치하도록 결찰하였다[11]. 치주염을 유발한 쥐는 vehicle (40% transcitol, 40% PBS 및 20% DMSO)만을 적용하는 대조군 및 0.5%, 1%, 2% SPA0355 적용군, 4군으로 나누어 사육하였다(각 군당 6마리씩). 첫번째 대구치의 치은조직 주변에 SPA0355용액이 잘 흡수될 수 있도록, 각 군에 따라 vehicle 또는 농도별 SPA0355를 매일 1회 치은열구 주변에 적용하였다. SPA0355가 치주조직에 대해 영향을 미치는지 평가하기 위해 치주염을 유발하지 않은 오른쪽 하악 첫번째 대구치에도 vehicle 또



**Fig. 1.** The chemical structure of SPA0355 (A). Changes of body weight in rats with ligature-induced periodontitis during experimental period (6 animals per each group). (B). Data are presented as the mean  $\pm$  S.D.

는 농도별 SPA0355를 매일 같은 방법으로 적용하였다. 치주염을 유발한 날부터 국소 적용하여 10일째에 모든 쥐는 희생하였다. 실험기간동안 매일 쥐의 체중과 사료소비량을 측정하였다. 사료소비량은 전날 공급한 사료의 무게에서 다음날 남아있는 사료의 무게를 측정하여 뺀 값으로 계산하였다. 모든 동물실험은 연세대학교 실험동물윤리위원회의 승인(2011-0265)을 받고, 정한 절차에 따라 진행하였다.

### 병리조직학적 평가

희생한 쥐의 양쪽 하악을 적출하였고 10% 중성 포르말린에서 2일간 고정된 다음 10% EDTA 용액에서 2달 동안 탈회하였다. 탈회가 끝난 하악을 파라핀에 포매한 후 4 µm 두께로 잘라 조직 절편을 제작하였다. 첫번째 대구치의 근심과 원심 치근의 치수가 가장 잘 보이는 절편을 선택하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시하였다. 염증세포 침윤 정도를 파악하기 위해 첫번째 대구치의 원심 접합상피 하방부위를 200배 배율에서 광학현미경상에서 관찰하였고, 치조골 흡수 평가를 위해 치실을 묶은 첫번째 대구치의 원심부위를 선택하여 100배 배율에서 조직사진을 찍은 뒤 cementoenamel junction(CEJ)에서 alveolar bone crest(ABC)까지의 거리를 이미지 프로그램(Image Pro® plus, Media Cybernetics, USA) 을 통해 측정하였다.

### 통계학적 평가

SPSS 12.0 statistical package program(SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 모든 통계평가에 사용하였고, unpaired *t*-test로 군간의 통계학적 차이를 평가하였다. P 값이 0.05 이하일 때 통계학적 유의차가 나는 것으로 간주하였다.

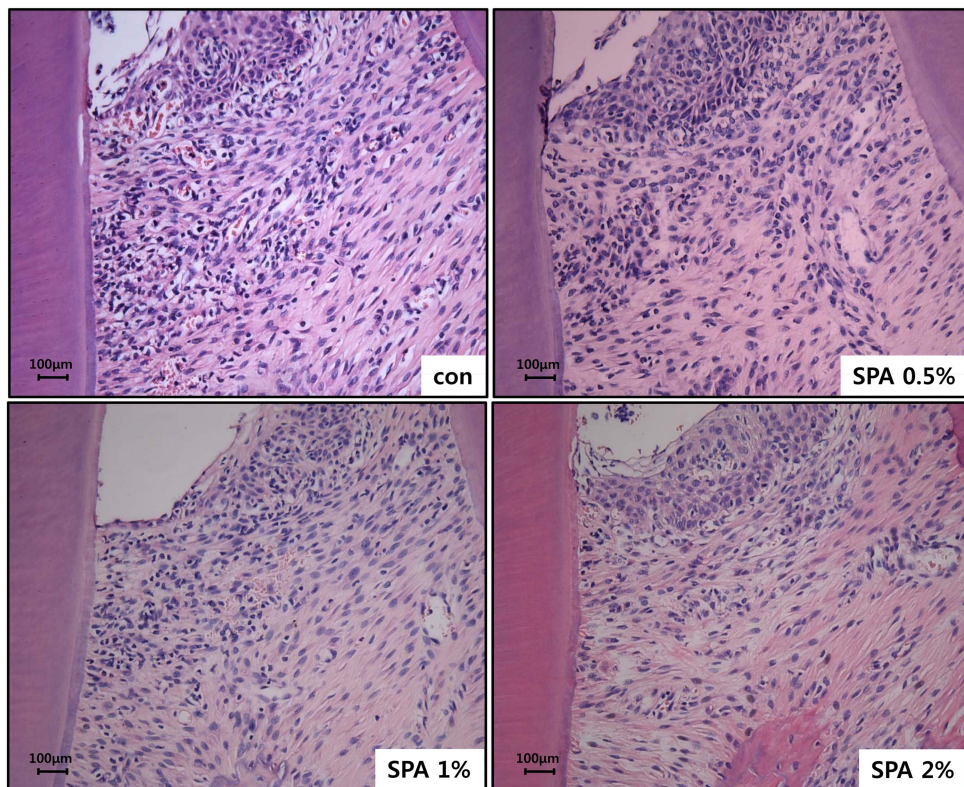
## 결 과

### SPA0355 적용에 의한 육안적 변화 관찰

SPA0355의 국소적 도포가 실험동물의 육안적 변화에 영향을 주는지 평가하기 위해 실험기간동안 매일 쥐의 체중과 사료소비량을 측정하였다. 왼쪽 첫번째 대구치를 묶고 SPA0355의 국소적 도포를 실시하는 10일 동안 vehicle 적용 대조군과 각 농도에 따른 SPA0355 적용군, 4군 모두 체중 및 체중 증가율의 차이는 거의 없었다(Fig. 1B). 사료소비량 또한 4군 사이의 유의적인 변화는 관찰되지 않았다(결과 제시하지 않음).

### SPA0355가 염증세포 침윤에 미치는 영향

SPA0355가 치주염의 염증세포 침윤에 미치는 영향을 평가하기 위해 첫번째 대구치의 원심 상피세포 하방부위를 선택하여 관찰하였다(Fig. 2). Vehicle 적용 대조군은



**Fig. 2.** Infiltration of inflammatory cells in distal area of ligatured first molar in rats. After ligation of first molar, SPA0355 was locally applied every day. At day 10, rats were sacrificed and infiltration of inflammatory cells in distal area of first molar under junctional epithelium was observed (magnification  $\times 200$ ).

치주염을 유발한 왼쪽 첫번째 대구치 상피세포 하방부위에서 호중구를 비롯한 대식구, 림프구 등의 염증세포 침윤이 뚜렷하게 관찰되었으나 0.5%, 1%, 2% SPA0355 적용군들의 염증세포 침윤정도는 대조군에 비해 농도의존적으로 호전되는 양상을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 반대로 치주염을 유발하지 않은 오른쪽 상피세포 하방부위에서는 염증세포 침윤이 거의 관찰되지 않았으며, 각 군의 염증세포 침윤 정도 차이도 없었다(결과 제시하지 않음).

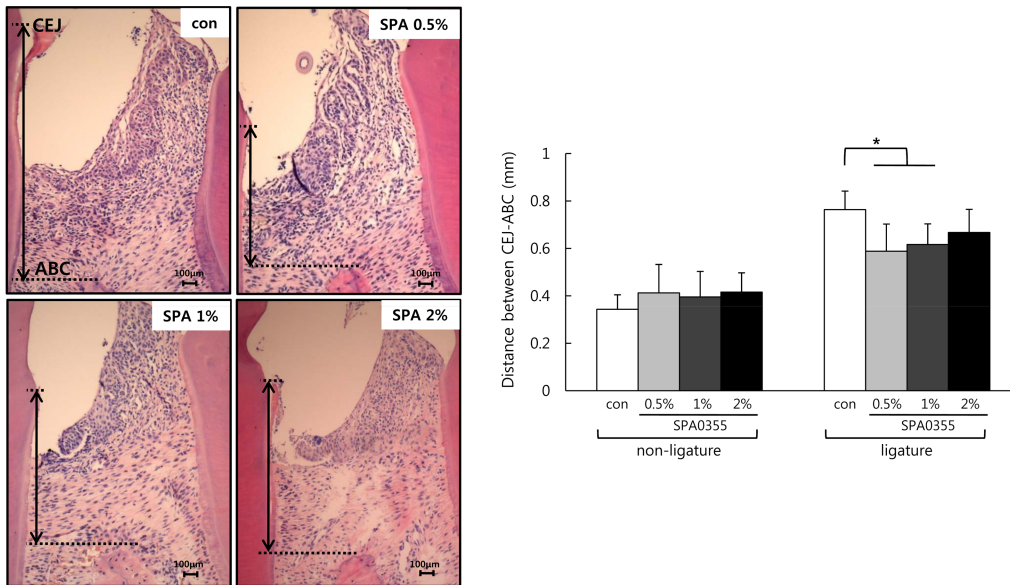
**SPA0355가 치주염에 의해 유도된 치조골 흡수에 미치는 영향**

치조골 흡수에 대한 SPA0355의 효과를 평가하기 위해 치실로 치주염을 유발하고 10일 후에 쥐를 희생하여 첫번째 대구치 원심의 CEJ-ABC 길이를 측정하였다(Fig. 3A). 치주염을 유발한 왼쪽 첫번째 대구치의 CEJ-ABC 길이의 측정 결과(Fig. 3B), vehicle 적용 대조군이 가장 길었고( $0.76 \pm 0.06$  mm), 그에 비해 SPA0355 적용군들의 CEJ-ABC 길이는 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 0.5%와 1%에서는 CEJ-ABC 길이가 유의적으로 감소하였으나(각각  $0.59 \pm 0.12$  mm,  $0.62 \pm 0.11$  mm), 2%에서는 통계학적 유의적인 차는 나타나지 않았다( $0.67 \pm 0.08$  mm). 또한 선택한 SPA0355의 농도가 정상 쥐의 치주조직에서 치조골 소실에 영향을 미치지 확인하기 위하여 치주염을 유발하지 않은 오른쪽 첫번째 대구치 주변에도 vehicle과 각 농도의 SPA0355를 적용하고 CEJ-ABC 길이를 측정된 결과, vehicle 적용 대조군과 SPA0355 적용군들은 모두 비슷한 길이를 나타내었다.

**고 찰**

치주질환의 병인기전의 연구 및 새로운 치료·예방제의 개발을 위해 동물모델들이 사용되어져 왔다[20,21]. 동물모델에서 실을 묶어 치태형성을 유발한 경우, 형성된 치태에 치주염 관련 세균들이 확인되었고[22], 호중구, 림프구 등을 포함한 염증세포 및 파골세포 등이 출현하여 결국에는 확연한 치조골 흡수까지 나타나는 것으로 보고되어[23,24] 실을 이용한 치주염 동물모델이 유용한 것으로 받아들여 지고 있다[25-27]. 본 연구에서도 치실로 묶은 왼쪽 첫번째 대구치 주변이 묶지 않은 오른쪽에 비해 염증세포의 침윤과 CEJ-ABC 길이가 뚜렷하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과들은 본 연구에서 사용한 치실을 이용한 치주염 동물모델이 치주염에 의한 염증 및 치조골 흡수를 평가하는데 적합하다는 것을 증명하는 것이다.

본 연구에서는 치주염을 유발한 쥐에서 SPA0355가 나타내는 억제효과를 평가하기 위해 3가지에 주목하여 실험을 진행하였다. 먼저 SPA0355가 쥐에 미치는 생리적인 변화, 두번째는 염증 반응에 대한 억제 효과, 마지막으로 치조골 흡수에 대한 억제 효과에 대하여 평가하였다. 치주염 유발 후 10일 동안 매일 1회 SPA0355를 국소적 도포한 경우 각 군간의 체중 증가율 및 사료소비율의 변화는 없었다. 체중 증가율과 사료소비량의 변화는 실험동물의 생리적인 건강상태를 육안적으로 판단할 수 있는 근거가 되는데, 이러한 결과는 10일 동안 매일 실시한 SPA0355의 국소적 도포가 쥐에게 식욕저하 및 체



**Fig. 3.** Alveolar bone resorption of distal area of ligatured tooth in rats. After ligation of first molar, SPA0355 was locally applied every day. At day 10, rats were sacrificed. Alveolar bone level in distal area of first molar was examined via the light microscopy (magnification  $\times 100$ ) (A). Loss of alveolar bone in distal area of first molar was estimated by measuring distance from cemento-enamel junction (CEJ) to alveolar bone crest (ABC) (6 animals per each group) and data are represented with mean  $\pm$  S.D. (B). \* indicates a significant difference at  $P < 0.05$ .

중감소를 유발하는 스트레스 요인으로 작용하지 않았다는 것을 제시한다.

치주조직에서의 SPA0355의 염증 억제효과를 평가하기 위해 실험으로 묶은 부위와 위치적으로 가까운 상피세포 하방의 염증세포 침윤 정도를 관찰한 결과, 모든 농도의 SPA0355 적용에 의해 염증세포 침윤 정도가 감소한 것을 확인하였다. 치주염에 의한 치주조직 파괴는 세균의 직접적인 작용 뿐만 아니라 염증 및 면역반응에 의해 유도되기 때문에[28] SPA0355 적용군에서 염증세포 침윤이 감소하였다는 결과는 SPA0355가 치조골의 흡수에도 영향을 줄 가능성이 있다는 것을 시사한다.

다음으로 첫번째 대구치 원심의 CEJ-ABC 길이를 측정하여 SPA0355가 나타내는 치조골 흡수에 대한 효과를 평가한 결과, 0.5%와 1%의 SPA0355 적용군의 CEJ-ABC 길이가 대조군에 비해 유의적으로 감소하여 치조골 흡수가 억제되는 것이 확인되었다. 부가적으로 실험을 묶지 않은 오른쪽 상피세포 하방에서의 염증세포 침윤 및 CEJ-ABC 길이는 vehicle 적용군 및 SPA0355 적용군 사이에 차이가 없는 것으로 나타나 본 실험에서 사용한 농도의 SPA0355는 정상 조직에 염증 및 치조골 흡수의 병리적 영향을 나타내지 않음을 확인하였다.

SPA0355가 관절염 동물모델에서 관절 조직의 염증 및 조직의 파괴를 억제하였는데, 이 과정에 염증 유도 인자인 IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 와 파골세포 분화 유도인자인 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)의 발현 억제가 관여하는 것이 밝혀졌다[19]. 이러한 결과로 미루어 보아 치주염 동물모델에서 나타난 SPA0355의 염증 및 치조골 흡수 억제 효과에 염증 유도 사이토카인과 파골세포 분화 유도인자들의 발현 감소가 관여되어 있을 가능성이 있는 것으로 사료되며, 앞으로 이에 대한 연구가 필요한 것으로 생각된다. 또한 2% SPA0355는 염증세포 침윤은 감소하는 경향이 관찰되었지만 CEJ-ABC 길이는 vehicle 적용군에 비해 유의적으로는 감소하지 않아 향후 SPA0355의 적정 농도를 검색하기 위해 본 연구에서 설정한 0.5% 농도보다 더 낮은 농도에서의 SPA0355의 치주염 억제효과와 농도의존적인 억제효과를 나타내는지 여부를 검증해 봐야 할 것으로 여겨진다.

본 연구를 통해 처음으로 SPA0355가 치주염 동물모델에서 치은염 및 치조골 흡수를 억제할 수 있음을 확인하였고 이러한 결과는 SPA0355가 치주염 치료제로 활용될 가능성이 있음을 시사한다.

## 감사의 글

본 연구는 연세대학교 치과대학 2011년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음(6-2011-0030).

## 참 고 문 헌

- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74:391-401.
- Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol 2000*. 2006;42:7-12.
- Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect*. 2000;2:1599-607.
- 보건복지부. 2010 국민건강보건의실태조사. 2010.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005;38:135-87.
- Kwon YM, Kim SW, Ko SY. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  on the nitric oxide production and osteoclast generation in the culture of mouse bone marrow cells. *Int J Oral Biol*. 2006;31:67-72.
- Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011;3.
- Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*. 2003;82:82-90.
- Bak EJ, Park HG, Kim M, Kim SW, Kim S, Choi SH, Cha JH, Yoo YJ. The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: a pilot study. *J Periodontol*. 2010;81:412-9.
- Cai X, Li C, Du G, Cao Z. Protective effects of baicalin on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2008;43:14-21.
- Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E, Dattola F, Rotondo F, Britti D, De Majo M, Genovese T, Cuzzocrea S. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. *J Dent Res*. 2004;83:343-8.
- Luan Q, Desta T, Chehab L, Sanders VJ, Plattner J, Graves DT. Inhibition of experimental periodontitis by a topical boron-based antimicrobial. *J Dent Res*. 2008;87:148-52.
- Seto H, Toba Y, Takada Y, Kawakami H, Ohba H, Hama H, Horibe M, Nagata T. Milk basic protein increases alveolar bone formation in rat experimental periodontitis. *J Periodontal Res*. 2007;42:85-9.
- Urban MB, Schreck R, Baeuerle PA. NF-kappa B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO J*. 1991;10:1817-25.
- Sugita N, Kimura A, Matsuki Y, Yamamoto T, Yoshie H, Hara K. Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Inflammation*. 1998;22:253-67.
- Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2007;43:294-315.
- Ambili R, Santhi WS, Janam P, Nandakumar K, Pillai MR. Expression of activated transcription factor nuclear factor-kappaB in periodontally diseased tissues. *J Periodontol*. 2005;76:1148-53.
- Cheon Y, Gim H, Jang H, Ryu J, Jeon R. Synthesis of heterocyte-linked thioureas and their inhibitory activities

- of NO production in LPS activated macrophages. Bull Korean Chem Soc. 2010;31:27-30.
19. Lee YR, Hwang JK, Lee HS, Cheon YJ, Ryu JH, Lee SI, Kwak HB, Lee SM, Kim JS, Park JW, Jeon R, Park BH. SPA0355, a thiourea analogue, inhibits inflammatory responses and joint destruction in fibroblast-like synoviocytes and mice with collagen-induced arthritis. Br J Pharmacol. 2011;164:794-806.
  20. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. Infect Immun. 1999;67:2804-9.
  21. Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C, Jr. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. Life Sci. 2009;84:745-54.
  22. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. Arch Oral Biol. 2010;55:142-7.
  23. Mandalunis PM, Costa OR, Ubios AM. Dynamics of bone loss in experimental periodontitis. Acta Odontol Latinoam. 1998;11:27-35.
  24. Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. J Periodontal Res. 1966;1:193-204.
  25. Choi HJ, Cho HK, Soh YJ. Protective effect of HP08-0106 on ligature-induced periodontitis in rats. Int J Oral Biol. 2011;36:187-94.
  26. Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfi A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabo C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. Br J Pharmacol. 1998;123:353-60.
  27. Napimoga MH, Benatti BB, Lima FO, Alves PM, Campos AC, Pena-Dos-Santos DR, Severino FP, Cunha FQ, Guimaraes FS. Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. Int Immunopharmacol. 2009;9:216-22.
  28. Ishikawa I. Host responses in periodontal diseases: a pre-view. Periodontol 2000. 2007;43:9-13.