

발 간 등 록 번 호

안내서-1050-03



건강기능식품 기능성 평가 가이드

(민원인 안내서)

잇몸 건강 관련

2026. 8.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭	건강기능식품 기능성 평가 가이드 (잇몸 건강 관련)	
아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.		
등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	☒ 예 ☐ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2026년 8월 일		
담당자 확 인(부서장) 한 규 홍		

이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 평가에 대하여 이해를 돕고자, 현재의 과학기술 수준에서 일반적인 사항과 시험방법 등이 제시된 참고자료이며, 질병에 관련된 내용이 포함되는 경우 기능성에 대한 전반적인 이해를 돕기 위한 것이지, 질병의 치료 및 예방을 목적으로 기능성을 설명하는 것은 아닙니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2026년 8월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구과로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4428

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-1050-01	2020.8.	제정
2	안내서-0150-02	2022.7.	개정 (시험 설계 시 고려사항 등 업데이트)
4	안내서-0150-03	2026.8.	개정 (기능성 내용 등 수정)

CONTENTS

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
※ 약어	3
 Ⅰ 서 론	4
 Ⅱ 일반적 사항	4
1. 치아의 구조 및 기능	4
2. 치주조직의 구조 및 기능	5
3. 잇몸약화 원인	6
4. 보건학적 중요성	12
 Ⅲ 기능성 시험 방법	13
1. 바이오마커의 선정	13
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	24
3. 시험 설계 시 고려사항	31
 Ⅳ 참고문헌	40

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

건강기능식품법률 제3조(정의) : 기능성이란 인체의 구조와 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

기능성 구분	기능성 내용	기능성을 가진 원료 또는 성분
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용	영양소
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능	기능성 원료
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능	

□ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

구분	기능성 내용	인정기준
질병발생 위험 감소 기능 ¹⁾	○○발생위험 감소에 도움을 줌	기반연구 자료를 통해 생리학적인 효과 또는 기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험 (RCT)에서 확보되어야 함 ※ 질병 관련 바이오마커의 확인
생리활성 기능 ²⁾	○○에 도움을 줄 수 있음	기반연구 자료를 통해 기능성 있는 생리학적인 효과 또는 기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 최소 1건 이상의 인체적용시험(RCT)에서 확보되어야 함(추측 제안기전과 관련한 바이오마커가 기반연구시험과 인체적용시험에서 일관성 있게 확인되어야 함) ※ 생리활성 관련 바이오마커의 확인

1) 제출된 기능성 자료가 질병의 발생 위험 감소를 나타내며, 확보된 과학적 근거 자료의 수준이 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)에 이를 수 있을 정도로 높을 경우 인정. 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)란 성분 또는 원료와 건강효과 간의 상관성이 새로운 과학에 의해 뒤집어지지 않을 정도의 수준으로 관련 분야의 전문가들에 의한 만장일치에 가까운 합의 수준을 말함

2) 제출된 기능성 자료가 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능향상 또는 건강유지개선을 나타내는 경우 인정

약 어

ALP	alkaline phosphatase
AST	Aspartate aminotransferase
BOP	bleeding on probing
CAL	Clinical attachment level
CAT	Catalase
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reactive protein
CTX	C-telopeptide
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
ECM	Extracellular matrix
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GI	gingival index
GPx	Glutathione peroxidase
HGF-1	Human gingival fibroblast
hs-CRP	high-sensitivity CRP
IL	interleukin
IL-1Ra	interleukin-1 receptor antagonist
LPS	lipopolysaccharide
MMP	matrix metalloproteinase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OPG	osteoprotegerin
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PD	probing pocket depth, probing depth
PDL	periodontal ligament
PDLC	periodontal ligament cell
PDLSC	periodontal ligament stem cell
PGE2	prostaglandin E2
PI	plaque index
RANKL	receptor activator of nuclear factor- κ B ligand
ROS	reactive oxygen species
SOD	Superoxide Dismutase
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	tumor necrosis factor
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase
VAS	visual analogue scale
8-OH-dG	8-oxo-2'-deoxyguanosine

I

서 론

이 가이드라인은 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품 안전처의 기능성(잇몸건강 관련) 평가 원칙 및 기준 등을 알림으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

II

일반적 사항

1. 치아의 구조 및 기능

잇몸으로부터 돌출된 치아 부분을 치관, 치은연 아랫부분을 치근이라고 한다. 치관은 인체에서 가장 단단한 물질인 법랑질(사기질)의 보호층으로 덮여있다. 표면이 매끈하여 외부의 모든 자극으로부터 치아를 보호한다. 법랑질은 마모되어 닳아지며 음식물에 있는 산이나 플라그에 있는 세균에 의해 손상된다. 법랑질 아래에는 단단한 상아질이 존재한다. 그 아래층의 치수강에는 작은 통로 등이 있어 상아질까지 이어지는 혈관과 신경이 존재하는데, 이 때문에 상아질은 온냉이나 통각에 반응한다. 치아와 잇몸 사이에는 치은열구라는 벌어진 틈이 있는데, 잇몸병이 발생 되는 원인 부위이다. 치아의 2/3는 치근으로 구성되어 있으며 각 치근은 치주 인대에 의해 턱뼈에 붙어 있다.

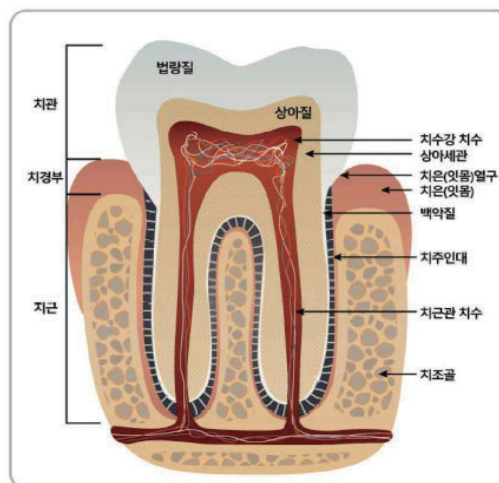


그림 1. 치주조직과 잇몸의 구조

2. 치주조직의 구조 및 기능

(가) 잇몸 (치은, Gingiva)

잇몸은 치아와 입안이 연결되는 경계부에 있는 연조직이다. 방사선, 병원체, 물리적 외상 등으로부터 내부 조직을 보호하는 상피조직(40%)과 그 아래층의 결합조직(60%)으로 구성되어 있다. 결합조직에서 세포 집단의 약 ⅔를 차지하는 섬유모세포는 콜라겐과 같은 세포외 기질을 합성하여 항상성 유지 및 복구에서 중심적인 역할을 한다.

잇몸은 치아의 목 부위를 단단히 밀봉하고 있어 음식물 찌꺼기나 플라그가 하부 조직과 치근으로 침투하는 것을 막아준다. 잇몸과 치아 사이에 음식물 찌꺼기와 세균이 쌓이게 되면 치은염이 생기고 치은염이 진행되면 치주염으로 발전하게 되고 심한 경우 발치에 이르게 된다.

(나) 치주인대 (periodontal ligament, PDL, 치근막)

치주인대는 백악질과 치조골을 연결시켜주는 연조직이며 잇몸으로 덮여있다. 주로 교원섬유(특히 콜라겐 I형)로 구성되며 섬유모세포는 혈관을 제외한 치주인대의 50%를 차지하고 있다.

치주인대는 치아에 가해지는 외부 압력을 감지하여 조절함으로써 치아와 잇몸을 보호한다. 치주인대는 끊임없이 새로운 세포와 섬유로 대체되며 항상성을 가지고 있어 치주인대 공간의 폭을 일정하게 유지한다. 치주인대세포에는 섬유모세포 이외에 줄기세포, 백악모세포, 골모세포 등이 존재하여 치주인대 뿐만 아니라 치조골이나 백악질의 항상성을 유지시킬 수 있다.

(다) 백악질 (Cementum)

백악질은 치아 뿌리의 표면을 덮고 있는 석회화된 결합 조직으로 백악모세포에 의해 지속적으로 형성된다.

치조골과 치아를 연결해주는 섬유인 치주인대가 치아에 붙을 수 있도록 접착제 같은 역할을 한다.

(라) 치조골 (Alveolar bone)

치조골은 흔히 잇몸뼈라고 하며 치아를 단단히 붙여주는 뼈이다.

치조골은 치아를 단단하게 잡아 흔들리지 않게 해주는 역할을 하는데, 치아가 발치되어 없으면 치조골도 점점 소실되어 줄어들게 된다.

3. 잇몸약화 원인

(1) 염증

잇몸은 각 치아의 하부를 둘러싸고 있는 턱뼈 일부분을 덮는 보호조직의 한 층이다. 건강한 잇몸은 치관 주위를 단단히 밀봉하여 세균 침입으로부터 조직을 보호한다. 잇몸이 손상되면 치아는 지지를 받지 못해 흔들리게 된다.

대부분의 성인은 잇몸 염증을 어느 정도 갖고 있다. 이를 치료하지 않고 계속 방치한다면 치아를 잃게 될 수 있다. 치아를 제대로 닦지 않으면 치아 표면에 플라그(plaque; 치태, biofilm)가 침착된다. 이 플라그를 제거하지 않으면 잇몸에 염증(치은염)이 생기게 된다. 이로 인해 잇몸이 정상적인 핑크빛 대신 빨갛게 붓고 칫솔질 할 때 쉽게 피가 난다.

더 심한 경우에는 치조골을 포함한 치주 조직에 염증(치주염)이 생길 수 있다. 이런 경우, 잇몸이 퇴축되어 치아뿌리가 노출되고 치아가 썩을 수도 있고, 치조골이 심하게 손상되어 치아가 빠질 수 있다.

(가) 잇몸염증 기전

① 활성산소

활성산소는 치주조직을 손상시켜 잇몸염증을 악화시키는 작용을 한다. 유해산소로 알려진 활성산소는 가장 안정한 형태인 삼중항산소($3O_2$)가 환원되면서, superoxide radical(O_2^-), 과산화수소(H_2O_2), 하이드록시기($-OH$), 지질 과산화물($ROOH$), 유리기(free radical: ROO^- , RO^-) 등의 과산화지질을 형성한다. 이러한 활성산소의 과산화지질이 정상적으로 소거되지 않았을 때, 유리기로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에 가해지면 이들 활성산소는 세포구성 성분인 인지질, 단백질, 당, DNA 등에 손상을 일으켜서 잇몸염증을 유발한다. 따라서, 항산화 작용을 통한 산화적 스트레스 억제효과를 측정하여 잇몸건강 개선의 작용 기전을 확인할 수 있다.

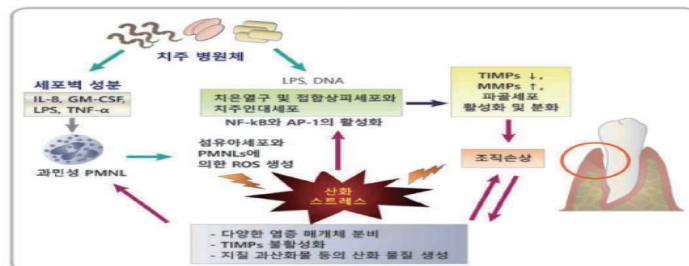


그림 2. 잇몸염증과 항산화

[출처 ; Periodontology 2000. 2007;43(1):160-232]

② 사이토카인

구강 세균 중 대표적인 치주질환 병원균(periodontal pathogens)에는 *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 등이 있는데, 이들 미생물이 형성하는 lipopolysaccharides(LPS) 내독소 혹은 대사산물은 조직과 면역세포에서부터 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 분비를 증가시킨다. 특히, IL-1 β 와 TNF- α 는 조직파괴에 관여하는 대표적인 싸이토카인으로, IL-1 β 는 염증 세포의 recruitment, 다형핵백혈구(polymorphonuclear leukocyte)의 priming/degranulation 활성화, prostaglandin과 같은 염증성 매개체와 matrix metalloproteinases (MMP)의 생성 증가, 콜라겐 합성 저해, T와 B 림프구 활성을 유발하며, TNF- α 는 세포 apoptosis, 골 흡수, MMP 분비, intercellular adhesion molecule (ICAM) 발현 및 IL-6 생성을 증가시킨다. 또한, IL-6는 파골세포 형성 및 골 흡수, T 림프구 분화를 촉진함으로써 조직 파괴 과정에 관여한다.

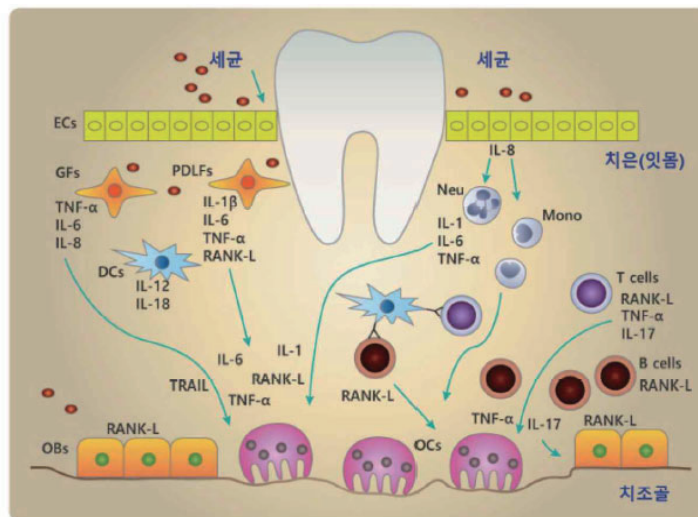


그림 3. 잇몸염증과 사이토카인

[출처 ; Journal of Immunology Research, 2013]

반대로, interleukin-4(IL-4), interleukin-10(IL-10), interleukin-1receptor antagonist (IL-1ra) 등의 비염증성 사이토카인과 tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)의 생산이 증가되면 건강한 치주 상태를 유지하게 된다.

③ 구강 세균

잇몸염증의 주요한 원인은 구강 내 세균으로, 특히 치태 내 존재하는 여러 세균군의 혼합 감염으로 인해 발생한다. 이들 세균이 유발한 치주조직의 면역 반응이 염증을 촉진하고 결국 잇몸염증으로 이어진다. 이러한 세균 중 특히 red complex에 속하는 *Porphyromonas gingivalis*가 잇몸염증의 가장 중요한 원인균으로 알려져 있다. 더 나아가 *P.gingivalis*는 치주질환자의 병소에서 그 수가 증가되며 치주질환이 진행됨에 따라 열구상피에 침투하는 *P.gingivalis*가 종종 발견된다. *P.gingivalis*는 숙주조직과 세포에 부착 또는 침투하는 과정에서 대사산물 또는 독소를 만들어 치주 조직에 직접 해를 미치기도 하지만 *P.gingivalis*와 반응하는 세포에서 생산되는 사이토카인(cytokine), 그리고 사이토카인에 반응하는 숙주세포에서 생산된 물질이 치주 조직을 더욱 파괴시킨다.

④ 치주조직 및 구조의 변화

치주질환은 질병의 진행시 치아 지지구조의 파괴와 변화를 일으키고, 치주조직이 파괴, 변성되면 치주조직의 기능에도 영향을 미쳐 저작활동에 장애가 될 수 있다. 치아의 구성 조직으로는 법랑질, 백악질, 상아질, 치수 등 4개의 조직으로 구성되어 있으며 이중 법랑질, 상아질, 백악질은 경조직에 속하고, 치수는 연조직에 해당된다.

⑦ 연조직

연조직은 치아 주위의 치은이 구강 내의 많은 병원성 미생물의 공격으로부터 하부의 다른 치주조직을 보호하듯이 하부의 골유착 부위를 보호한다. 치주질환자의 경우 일부 특정 세균에 의해 염증 반응 등이 유도되면 비활성형의 콜라게나제(collagenase)를 활성화시키거나 콜라게나제와 다른 매트릭스 메탈로프로테나제(MMPs)의 분비를 자극하는 등의 반응이 일어난다. 매트릭스 메탈로프로테나제는 다형핵백혈구, 대식세포, 치은섬유모세포, 골세포와 같은 다양한 세포로부터 분비되는 칼슘 및 아연 의존 펩티다제로 중성의 pH에서 작용하며, 기질로서는 다양한 세포외 기질을 이용한다. 이들 효소의 생성 기작을 살펴보면 박테로이드(*Bacteroids*), 악티노바실러스(*Actinobacillus*)와 같은 혐기성 그람 음성균의 세포벽 구성 성분인 지질다당류(LPS)와 같은 내독소에 의하여 직접 조직이 파괴되거나, 생체 면역계를 자극하여 면역계의 여러작용에 의하여 세포 외부로 분비된 활성산소, 프로스타글란딘(Prostaglandins), 인터루킨(Interleukins)과 같은 여러 종류의 사이토카인 등에 의해 잇몸 염증이 유발되고, 이들 염증매개체의 자극에 의하여 분비된 콜라게나제 및 세균으로부터 분비된 콜라게나제에 의하여 치주 조직의 기질인 콜라겐(collagen)이 분해되어 잇몸 퇴축이 일어나고, 계속 방치하게 되면 치주질환으로 진행된다. 이는 치주 조직의 질환뿐만 아니라 일상적인 치주 조직의 재생, 발달 등에 기여하여 이를 파괴하는 것으로 알려져 있으며 이러한

역할을 하는 효소 중 대표적인 것이 매트릭스 메탈로프로테나제-1(MMP-1)과 매트릭스 메탈로프로테나제-8(MMP-8)로서, 치주질환에서 세포 외 기질 분해 즉, 치주조직의 콜라겐을 분해하여 약화시키는 작용을 한다. 매트릭스 메탈로프로테나제-1은 교원조직(connective tissue)의 재생을 조절하고 염증성 치주질환이 있는 부위에 특히 높은 농도로 존재한다. 이러한 부위의 콜라겐 분해를 막기 위해 MMPs를 억제하는 것은 치주질환을 예방하는데 매우 중요하다.

반면에, TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase)는 MMP 활성을 조절하며, 4종의 TIMP가 알려져 있다. 이들 중 TIMP-1은 섬유모세포에서 유래된 MMP에 대해 강력한 억제 효과를 발휘하며, TIMP-2는 다형핵 백혈구에서 유래된 MMP에 강력한 억제 효과를 보인다. TIMP-1은 치은열구액과 치은조직 내에 존재하는 MMP에 대한 주된 억제제로써, 염증 부위에서의 치은열구액 내에 TIMP-1 단백질이 증가되어 있으며, 치주염 이환 치은 조직 내에 MMP-1과 TIMP-1 mRNA가 증가된다.

㉔ 경조직

경조직은 치아의 가장 바깥층으로 치관의 표면을 덮고 있는 법랑질, 법랑질 안쪽 노란 조직인 상아질과 치근(치아 뿌리)의 표면을 덮고 있는 백악질이 있다. 백악질은 치아를 치조골에 고정시키는 역할을 한다. 상아질은 법랑질보다는 부드럽고 탄력성이 있어서 법랑질을 지지하고 깨지는 것을 방지하는 역할을 한다. 법랑질은 치아를 온도(차가움, 뜨거움), 압력, 충격으로부터 보호하는 역할을 한다. 치아 경조직 손상은 치아 표면조직의 결손(Loss)을 말하는 것으로 보통 나이가 들어감에 따라 일어나는 정상적이고 생리적인 과정이다. 그러나 파괴의 정도가 심해 치아의 기능적, 심미적 장애를 일으키거나 지각과민 상태를 유발하면 병적인 상태로 간주한다.

뼈를 구성하는 주요한 비콜라겐 단백질인 오스테오칼신(osteocalcin)은 프로트롬빈 내에서 발견된 γ -카르복시글루탐산(Gla)을 포함하는 골격의 산성단백질로 골모세포(osteoblast)와 상아아세포(odontoblast)에서만 생성되며 혈장 내 오스테오칼신 농도는 골아세포의 활성을 반영한다고 보고 있다. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand(RANKL)은 파골세포의 TRAP 발현, 융합과 활성화를 유도하는 주요한 파골세포 분화유도인자이며 파골 세포 전구세포와 파골세포는 RANKL에 대한 수용체인 RANK를 발현한다. RANKL은 골모 세포 계열의 세포나 면역세포에서 생성되며, 파골전구세포와 파골세포에 발현되는 수용체인 RANK(Receptor activator of nuclear factor- κ B)를 자극함으로써 파골전구세포의 분화를 촉진하고 파골세포의 세포자연사(apoptosis)를 억제한다. 한편 RANKL은 수용성 수용체인 osteoprotegerin(OPG)과도 결합할 수 있으며, 이런 경우에는 RANKL-RANK의 결합이 억제되어 파골세포의 생성과 활성이 억제된다. Osteoprotegerin(OPG)은 골모세포가

분비하는 표면단백질이며 RANK에 경쟁적으로 반응하여 RANKL이 전파골세포와 결합하지 못하게 차단하여 파골세포 분화(osteoclastogenesis)를 억제한다.

(2) 노화

노화는 잇몸과 치주인대의 항상성 조절에 부정적인 영향을 미친다.

나이가 증가함에 따라 잇몸에서는 섬유모세포의 증식 및 이동, 콜라겐 리모델링, 잇몸의 상처 치유 능력은 감소한다. 또한, 잇몸의 두께가 감소하고 잇몸 퇴축이 시작되어 충치 발생이 증가한다.

치주인대에서는 치주인대세포와 치주인대줄기세포의 증식 능력이 일반적으로 저하되어 세포수가 감소한다. 치주인대세포의 활성 감소에 따라 콜라겐 생산 속도가 느려지면서 콜라겐 섬유의 질과 양이 감소한다. 이로 인해 치주인대의 밀도와 너비가 줄어들어 정상적인 교합력에서도 치아 손상, 치아 파절, 치아 상실의 위험이 증가한다.

또한, 노화는 단순히 세포 재생을 저하시킬 뿐만 아니라 염증을 유발하여 염증과 노화가 상호작용하며 잇몸 건강을 악화시킨다.

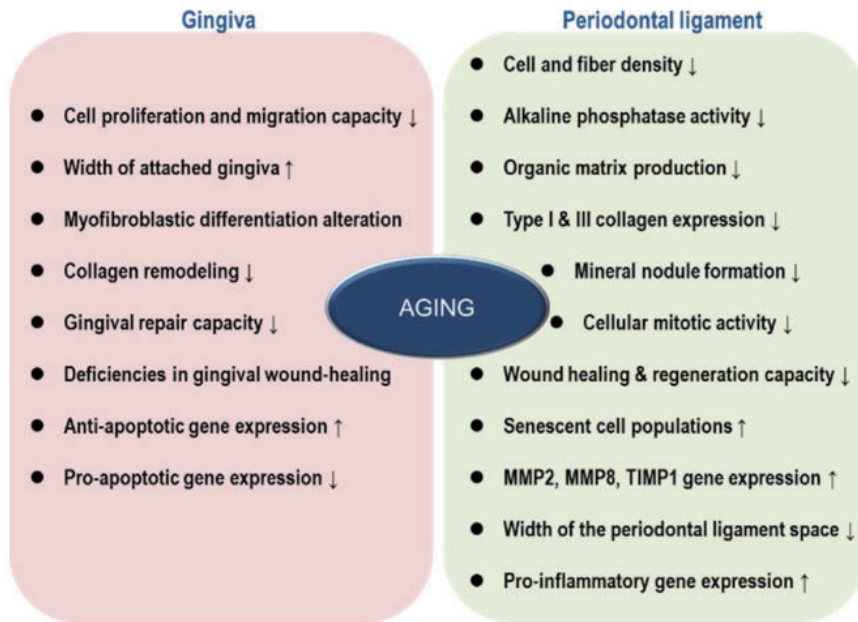


그림 4. 노화 중 치은 및 치주 인대의 생리적 및 생화학적 변화

[출처 ; Kim et al., Journal of personalized medicine, 1:11, 58, 2021]

[참고]

1. 치주질환

가. 치주질환의 분류

치주질환은 치은염, 치주염으로 크게 2가지로 나뉜다.

(1) 치은염(gingivitis)

치은염은 치은(잇몸)에 발생하는 염증성 질환으로 치주인대나 치조골의 손실은 동반되지 않는다. 주로 치아 표면에 붙은 치태(플라크)에 의해 발생되며 주요 증상으로는 잇몸의 붓기, 출혈, 경미한 통증 등이 있다. 치은염을 방치하면 치주염으로 진행될 수 있다.

(2) 치주염(periodontitis)

치주염은 치은, 치주인대, 치조골, 백악질을 파괴하는 염증성 질환이다. 주요 증상으로는 잇몸 출혈, 치주낭 형성, 치아 동요, 치아 이동, 구취 등이 있으며 진행이 되면 치아 상실로 이어질 수 있다. 치주염으로 인한 손상은 비가역적이지만 적절히 치료하고 구강위생을 철저히 하면 더 이상의 염증을 예방할 수 있다.



그림 5. 치주질환의 진행과정

[출처 ; 치아맨 구강건강 충치와 잇몸병, 2014]

4. 보건학적 중요성

잇몸 염증으로 인한 치주질환은 만성 질환이라 초기에는 증상이 잘 나타나지 않으나, 조기에 치료를 받지 않으면 잇몸에서 피가 나고 붓거나 붉는 증상, 치아가 시린 증상이 나타납니다. 치아를 지지하는 치조골이 손상되면 잇몸이 내려가고, 음식물도 예전에 비해 치아 사이에 많이 끼어 불편하며, 씹을 때 치아에 힘이 주어지지 않는 느낌이 듭니다. 심한 경우 치아를 뽑아야 되는 경우도 생기게 되므로 건강한 잇몸을 유지하는 것은 중요합니다.

즉, 건강한 잇몸은 치관 주위를 단단히 밀봉하여 세균의 침입으로부터 조직을 보호하는 역할을 하는데, 잇몸이 손상되면 치아는 지지받지 못해 흔들리게 되므로 구강 위생을 철저히 함으로써 잇몸 질환을 예방하는 것이 중요합니다.

Ⅲ 기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구 유형별 바이오마커

잇몸건강 기능성을 확인하기 위한 시험관시험, 동물시험 및 인체적용시험의 바이오마커는 아래의 표 1을 참고할 수 있다.

표 1. 잇몸건강 기능성 확인을 위한 바이오마커

구분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		in vitro	in vivo	Human
항산화	항산화 효소 활성(SOD, CAT, GPx 등)	○	○	○
	라디칼 소거능(DPPH, ORAC 등)	○	○	○
	DNA 손상(Comet assay, 8-OH-dG 등)	○	○	○
항염증	IL-1 β	○	○	○
	IL-6	○	○	○
	TNF- α	○	○	○
	hs-CRP	○	○	○
	Prostaglandins	○	○	○
항균	Red complex (<i>P.gingivalis</i> , <i>T.denticola</i> , <i>T.forsythia</i>)	○	○	○
	Orange complex (<i>C.gracilis</i> , <i>C.rectus</i> , <i>F.nucleatum</i> , <i>P.micra</i> , <i>P.intermedia</i> , <i>P.nigrescens</i>)	○	○	○
	Green complex (<i>A.actinomycetemcomitans</i> , <i>E.corrodens</i>)	○	○	○

구분		바이오마커	측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	Human
치주 조직 및 구조 변화	연조직	MMPs(MMP-3,8,9,13)	O	O	O
		TIMP(TIMP-1, TIMP-2)	O	O	O
		Type I Collagen	O	O	
	경조직	Osteocalcin		O	O
		RANKL	O	O	O
		Osteoprotegerin(OPG)		O	O
		C-telopeptide(CTX)		O	O
		Alkaline Phosphatase(ALP)		O	O
임상적 증상		치은지수 (GI, gingival index)		O	O
		치태지수 (PI, plaque index)		O	O
		탐침 시 출혈지수 (BOP, Bleeding on Probing)		O	O
		치주낭 깊이 (PD, probing depth)		O	O
		치은퇴축(GR, Gingival recession)			O
		임상부착수준 (CAL, clinical attachment level)		O	O
		VAS (Visual Analogue Scale)			O

나. 바이오마커 설명

(가) 항산화

활성산소는 세균의 LPS에 의해 자극받은 면역세포(호중구, 대식세포)에서 만들어지는 물질로 치주질환에서는 과도하게 생성되어 조직 손상을 유발할 수 있다. 따라서, 항산화 작용을 통한 산화적 스트레스 억제 효과를 측정하여 잇몸건강 개선의 작용기전을 확인할 수 있다.

① 항산화 효소 활성(SOD, CAT, GPx 등)

항산화효소는 과도한 ROS로부터 세포를 보호하는 역할을 하며, 치주조직의 산화·항산화 균형 상태를 간접적으로 평가하는 지표로 활용될 수 있다.

㉠ Superoxide Dismutase(SOD)

SOD는 superoxide radical($O_2^{\cdot-}$)로부터 H_2O_2 와 O_2 형성을 촉매하는 효소로 활성산소에 의한 세포 손상에 대응하는 첫 번째 방어 라인을 구성한다. 이 효소는 세포내에서 발생하는 산화스트레스를 줄이고, 세포 손상을 방지하여 잇몸 염증 등의 위험을 낮추는데 영향을 준다.

㉡ Catalase(CAT)

CAT는 과산화수소(H_2O_2)를 물(H_2O)과 산소(O_2)로 분해하는 항산화 효소이다. 이 효소는 세포 내에서 발생하는 과산화수소를 빠르게 분해하여 활성산소로 인한 세포손상을 억제하는데 도움을 준다.

㉢ Glutathione peroxidase(GPx)

GPx는 세포내에서 활성산소(과산화수소와 지질 과산화물 등)를 제거하는 항산화효소로, 글루타치온(GSH)을 이용해 과산화수소(H_2O_2)나 유기과산화물을 물과 무해한 형태로 환원시킨다. GPx는 세포막 손상을 막고, 산화 스트레스로부터 세포를 보호한다.

② 라디칼 소거능

㉠ DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

DPPH법은 안정적인 자유 라디칼인 DPPH를 이용하여 항산화 물질의 활성을 평가하는 방법이다.

㉡ ORAC(Oxygen radical absorbance capacity)

ORAC는 세포막에 손상을 주는 ROS의 소거능을 수치화하여 항산화 능력을 평가하는 방법이다. ORAC 수치가 높을수록 활성산소 흡수 능력(항산화능)이 높다는 뜻이다.

③ DNA 손상

㉓ Comet assay

개개의 세포 수준에서 DNA 손상을 눈으로 직접 확인할 수 있는 방법이다. 전기영동 후 EtBr로 염색하여 형광현미경으로 관찰하면, DNA 손상을 입은 세포는 tail이 나타나게 되고, tail의 길이 및 tail의 형광의 강도를 측정하여 DNA 손상을 정량화할 수 있다.

㉔ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)

DNA를 구성하는 염기 중 guanine 분자의 8번째 위치에 있는 수산화기의 산화가 일어나 8-OH-dG가 생성된다. 따라서 8-OH-dG의 정량적 측정은 활성 산화물에 의한 체내 DNA의 손상 정도를 평가하는 지표로 이용될 수 있다.

(나) 항염증

치주질환은 치태 내 미생물에 의해 야기된 치주 조직의 염증성 질환으로 치아 주위조직의 파괴와 부착소실을 특징으로 한다. 치주 파괴와 안정 사이의 균형은 여러 요소들에 의해 좌우되며 그 중 interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 염증성 사이토카인과 prostaglandin E2(PGE2), MMP의 생산이 증가되면 치주 파괴가 일어나고 interleukin-4(IL-4), interleukin-10(IL-10), interleukin-1 receptor antagonist(IL-1Ra) 등의 비염증성 사이토카인과 tissue inhibitors of matrix metalloproteinases(TIMPs)의 생산이 증가하면 염증성 환경을 조절하는 역할을 한다.

① IL-1 β

IL-1 β 는 염증 반응의 조절에 중요한 역할을 하며 치주부착 상실, 교원질의 파괴, 치조골 흡수 등 치주파괴와 직접적으로 관련이 있다. IL-1 β 는 치주질환을 가진 환자에서 그 양이 높게 나타나고 치주치료 후 현저히 감소한다.

② IL-6

IL-6는 다기능성 사이토카인으로 염증반응, 숙주 반응과 조직손상에 관련되며 IL-1, TNF- α 와 같은 염증성 자극에 반응하여 다량 분비된다. IL-6는 B 세포의 분화와 T 세포의 증식, 조절과 신경 분화를 자극하는 것으로 알려져 있다. 그리고 파골세포 분화를 촉진시켜 골 흡수와 골 생성의 방해에 관여하며, 치주질환 분야에서는 골 소실과 관련하여 주목을 받고 있다.

③ TNF- α

TNF- α 는 혈관내피세포의 부착 분자 발현을 유도하여 혈관 내 호중구, 단구와 림프구의 혈관 밖 이동을 유도하는 염증 유도 사이토카인으로 collagenase와 PGE₂의 생산을 상향 조절하고 단백분해효소 관련 기전을 통해 치주 조직의 부착손실을 야기하는 것으로 알려져 있다. TNF- α 는 파골세포 분화에도 관여한다.

④ hs-CRP

염증성 마커로 알려진 C-반응 단백질(C-reactive protein, CRP)은 주로 IL-6에 의하여 간에서 생산되는 급성기 단백질로서 알려져 있을 뿐만 아니라 혈청 농도는 염증 반응의 정도를 반영하는 주요 바이오마커로써 죽상경화증과 같은 심혈 질환의 예측에 사용되고 있다. 전통적인 CRP는 감염이나 염증성 질환의 선별검사로 이용되었으나 1990년대 이후에 측정 민감도가 우수한 high-sensitivity CRP (hs-CRP)가 개발되어 건강인에서 심혈관질환의 위험을 예측할 수 있게 되었고 2003년에 미국 질병통제예방센터/미국심장협회(Centers for Disease Control and Prevention/American Heart Association, CDC/AHA)에서는 hs-CRP를 심혈관 질환의 위험도 평가 및 예후를 추정하는 지표로 사용할 것을 권고하였다. 최근에는 치주질환이 심혈관계 질환의 위험요인으로 보고되고 있으며, 치주질환 치료 후에는 hs-CRP가 감소하는 것으로 알려져 있다.

⑤ Prostaglandin

Prostaglandin은 생체 내 다양한 조직에서 만들어지며 염증 반응 뿐만 아니라 혈액응고, 면역반응, 신장기능, 위장관 보호, 신경조직의 성장과 발달 및 골조직의 대사 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근에 치주질환 진행과 심도를 알 수 있는 중요한 표식자 중 하나로 여겨지고 있는데 치주질환 환자의 치은 열구액내 PGE₂ level은 치주질환이 없는 정상인에 비하여 현저히 높게 나타나며 염증성 치은 조직에서 그 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다.

(다) 항균

타액 내에는 약 500종 이상의 세균이 존재하는데 이들 대부분의 세균은 구강 상주균으로서 정상 구강점막에 항원을 제공하며 구강의 면역기능을 높이고 병원균의 침입 및 정착을 방해함으로써 구강의 항상성과 건강을 유지하는 중요한 역할을 한다. 그러나 이 중 특정 미생물군이 증식하면 구강 내 치주질환이 발생하게 된다. 치주질환을 예방하거나 치주질환의 진행을 억제하기 위해서는 치태, 즉 세균을 제거하는 것이 필수적이다. Dr. Socransky 등은 치주 질환을 일으키는 원인 세균들의 특징, 상호 연관성, 염색반응, 집락의 형태 및 색소의 생성

유무 및 임상적 지표 등을 기준으로 적색군(Red complex), 주황색군(Orange complex), 녹색군(Green complex), 황색군(Yellow complex), 자색군(Purple complex)의 5개 색깔별로 분류하였다. 이 중에서 적색군은 치주질환의 주된 원인균이며, *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*), *Treponema denticola*(*T. denticola*), 그리고 *Tannerella forsythia*(*T. forsythia*)로 이루어져 있고, 그 다음 주황색군이 두 번째로 중요한 원인균으로, 그리고 황색군, 녹색군, 자색군은 치주질환에 심각한 영향을 미치지 않는 군으로 분류하였다.

① Red complex

치주질환과 관련성이 있는 치은연하의 세균 중 *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*를 Red complex라 하였으며, 이 complex는 치주낭 깊이와 탐침 시 출혈과 같은 치주질환 지표와 강한 상관관계를 가진다고 알려져 있다.

② Orange complex

Orange complex에 해당하는 균주 그룹은 성인에서 발생하는 치주염의 주요 병인으로 알려져 있다. Orange complex에는 *Campylobacter gracilis*(*C. gracilis*), *Campylobacter rectus*(*C. rectus*), *Fusobacterium nucleatum*(*F. nucleatum*), *Parvimonas micra*(*P. micra*), *Prevotella intermedia*(*P. intermedia*), *Prevotella nigrescens*(*P. nigrescens*)로 분류된다.

③ Green complex

Green complex는 초기에 집락을 이루는 군으로 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(*A. actinomycetemcomitans*), *Eikenella corrodens*(*E. corrodens*)로 분류되고 있으며, orange complex와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

(라) 치주조직 및 구조변화

치주질환은 매우 흔한 질병이며, 질병의 진행 시 치아 지지구조의 파괴와 변화를 일으키고, 치주조직이 파괴, 변성되면 치주조직의 기능에도 영향을 미쳐 저작활동에 장애가 될 수 있다. 치아의 구성조직으로는 법랑질, 백악질, 상아질, 치수 등 4개의 조직으로 구성되어 있으며 이중 법랑질, 상아질, 백악질은 경조직에 속하고, 치수는 연조직에 해당된다.

① 연조직

연조직은 치아 주위의 치은이 구강 내의 많은 병원성 미생물의 공격으로부터 하부의 다른 치주조직을 보호하듯이 하부의 골유착 부위를 보호한다.

㉗ MMPs(MMP-3, 8, 9, 13)

MMP(Matrix metalloproteinase)효소는 치주 질환에 발생하는 잇몸의 결합조직을 파괴하는 효소이다. MMP계 효소는 아연을 함유한 endopeptidase로서 결합조직 및 기저막의 분해에 관여하는 효소의 군이다. 이 효소들은 Extracellular matrix (ECM)을 분해하는 효소로 현재까지 17가지 이상의 MMP가 알려져 있다. MMP계 효소는 collagenases(MMP-1, MMP-8, MMP-13)와 gelatinases(MMP-2, MMP-9), Stromelysins(MMP-3, MMP-10, MMP-11)와 membrane type MMP(MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17) 등으로 크게 나누어지며, Stromelysins와 collagenases는 류마티스 관절염이나 골관절염과 같이 조직분해와 관련된 질병에 관여되어 있고, gelatinases는 기저막 분해에 의한 혈관신생을 유도하여 암의 성장과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다. 치주질환 시 구강 내에는 MMP-8과 MMP-9의 분비량이 현저히 증가한다는 보고가 있으며, 질환의 염증이 치료되면 그 분비가 감소함이 알려져 있다. 최근에 알려진 MMP-13도 치주염에서 그 활성이 증가된다는 연구보고가 있다. 또한 MMP-3는 치주질환 뿐만 아니라, 류마티스 관절염과 골관절염을 포함한 다양한 염증성 질환과 관련된 결합조직의 파괴에 중요한 역할을 하며, MMP-1의 활성을 조절하여 병인과정이 시작되는 결정적인 요소를 제공할 것이라고 보고되고 있다.

㉘ TIMP(TIMP-1, TIMP-2)

TIMP(Tissue inhibitor of metalloproteinase)는 MMP 활성을 조절하며, 4종의 TIMP(TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4)가 알려져 있다.

이들 중 TIMP-1은 섬유모세포에서 유래된 MMP에 대해 강력한 억제 효과를 발휘한다. 치은열구액과 치은조직 내에 존재하는 MMP에 주된 억제제로써, 염증 부위에서의 치은열구액 내에 TIMP-1 단백질이 증가되어 있으며, 치주염 이환 치은 조직 내에 MMP-1과 TIMP-1 mRNA가 증가된다.

TIMP-2는 다형핵 백혈구에서 유래된 MMP에 강력한 억제 효과를 보인다. 염증 부위의 조직 재생과 안정화에 기여하여 치주 조직의 건강을 유지하고 치주염 진행을 억제하는데 효과적이다.

㉙ Type I Collagen

Type I Collagen은 치주인대와 잇몸을 구성하는 주요 단백질 중 하나로 치주 조직의 구조적 무결성과 세포 기능에 중요한 역할을 한다. Type I Collagen은 세포 외 기질(ECM)의 중요한 구성 요소로 치주인대세포와 같은 세포들이 부착하고 이동할 수 있는 기질을 제공한다. 치주인대세포와 치은섬유모세포는 Type I Collagen을 합성하고 그 생산이 증가하면 세포의

활성이 높아졌음을 나타낼 수 있다. 또한, Type I Collagen은 세포 신호 전달 경로와 상호 작용하여 세포의 증식과 분화를 촉진할 수 있다. 건강한 잇몸 조직에서 Type I collagen은 더 높은 발현을 보이는 경향이 있다.

② 경조직

경조직은 치아의 가장 바깥층으로 치관의 표면을 덮고 있는 법랑질, 법랑질 안쪽 노란 조직인 상아질과 치근(치아 뿌리)의 표면을 덮고 있는 백악질이 있다. 백악질은 치아를 치조골에 고정시키는 역할을 한다. 상아질은 법랑질보다는 부드럽고 탄력성이 있어서 법랑질을 지지하고 깨지는 것을 방지하는 역할을 한다. 법랑질은 치아를 온도(차가움, 뜨거움), 압력, 충격으로부터 보호하는 역할을 한다. 치아 경조직 손상은 치아 표면조직의 결손(Loss)을 파괴의 정도가 심해 치아의 기능적, 심미적 장애를 일으키거나 지각과민 상태를 유발하면 병적인 상태로 간주한다.

㉞ Osteocalcin

뼈를 구성하는 주요한 비콜라겐단백질인 오스테오칼신(osteocalcin)은 프로트롬빈 내에서 발견된 γ -카르복시글루탐산(Gla)을 포함하는 골격의 산성단백질로 골모세포(osteoblast)와 상아아세포(odontoblast)에서만 생성되며 혈장 내 오스테오칼신 농도는 골아세포의 활성을 반영한다고 보고 있다.

㉟ RANKL

Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand(RANKL)는 파골세포의 TRAP 발현, 융합과 활성화를 유도하는 주요한 파골세포 분화 유도인자이며 파골세포 전구세포와 파골세포는 RANKL에 대한 수용체인 RANK를 발현한다. RANKL은 골모세포 계열의 세포나 면역세포에서 생성되며, 파골전구세포와 파골세포에 발현되는 수용체인 RANK(Receptor activator of nuclear factor- κ B)를 자극함으로써 파골전구세포의 분화를 촉진하고 파골세포의 세포자연사(apoptosis)를 억제한다. 한편 RANKL은 수용성 수용체인 osteoprotegerin(OPG)과도 결합할 수 있으며, 이런 경우에는 RANKL-RANK의 결합이 억제되어 파골세포의 생성과 활성이 억제된다.

㊱ Osteoprotegerin(OPG)

Osteoprotegerin(OPG)는 골모세포가 분비하는 표면단백질이며 RANK에 경쟁적으로 반응하여 RANKL이 전파골세포와 결합하지 못하게 차단하여 파골세포 분화(osteoprotegenesis)를 억제한다.

㉔ C-telopeptide(CTX)

C-terminal telopeptide의 혈청 내 농도가 상승하는 것은 골소실률이 증가된 환자에게서 나타나는 증상으로 보고되고 있다. 골다공증이나 기타 뼈와 연관된 질환에 대해 골소실 길항 치료(bisphosphanate 또는 호르몬대체요법)에 대한 모니터링 방법으로 적합하다.

㉕ Alkaline phosphatase(ALP)

Alkaline phosphatase(ALP)는 골세포 활성의 지표로 알려져 있다.

(마) 임상적 증상

임상지표는 치주조직의 염증 상태와 조직 파괴 정도를 평가하는 데 중요한 역할을 하며, 기능성 평가에서도 보조적으로 활용될 수 있다. 그러나 각 지표는 검사자 간 편차·해부학적 조건·측정 재현성 등의 한계를 가지므로, 시험 설계 시 동일 검사자 측정 및 표준화가 필수적으로 수행되어야 한다.

① 치은지수(GI, gingival index)

치은조직에 염증이 발생되면 치은 출혈, 치은의 색조변화, 치은 부종 등과 같은 임상증상이 나타나며, 치은지수(Gingival Index, GI)는 이러한 점에 착안하여 치은염증을 평가하는 방법 중 하나이다. 치은염의 진행 정도를 종합적으로 평가하는데 Löe & Silness index를 이용한다. 치아를 4면(근심, 원심, 협측, 설측)으로 구분하여 0-3점으로 평점한 후 치아별 치은염 수를 기록한다.

② 치태지수(PI, plaque index)

치태(plaque)는 입 안 표면에서 자라나는 미생물막 또는 세균의 덩어리를 말하는데, 세균과 세균의 대사물질, 타액 등으로 구성된다. 식사 후 수분 내에 치아의 거의 모든 면을 덮게 되는데, 문제는 이 치태 내의 세균이다. 치태 내의 세균들은 독소를 분비하는데 이 산성 물질에 의하여 치아는 부식되어 충치가 되고, 치태 내의 세균들은 독소를 분비하여 잇몸에 염증을 일으키는데 치은염 또는 치주염이 된다. 치태지수는 치태의 두께 정도를 측정하는 방법으로 구강청결도를 의미하는 지수로 값이 높을수록 구강이 청결하지 못하여 잇몸건강이 나빠질 수 있다.

③ 탐침 시 출혈(BOP, Bleeding on Probing)

치주낭 깊이 측정 시 출혈이 나타난 것을 백분율로 표시하는 지수로, 치은조직의 염증 정도를 측정하는 방법이다. 잇몸건강이 개선될수록 치은출혈지수는 감소한다. 방문 시 마다 동일한 시험자가 시험하도록 하며, 일반적으로 각 치아당 6부위[협면(Buccal Surface)/설면(Lingual Surface)의 근심, 중앙, 원심]에서 탐침 후의 출혈여부를 확인한다.

④ 치주낭 깊이(PD, Probing depth)

치주질환 진단 시 가장 중요한 검사법은 치주탐침을 이용하여 치주낭 깊이(PD)를 측정하는 것이다. 치주낭 깊이(pocket depth)는 병리조직학적으로 치은변연에서 치은 상피가 부착하고 있는 치은 열구 기저부 하방까지의 깊이를 의미한다. 그러나 실제로 조직표본 없이는 그 평가가 불가능하다. 따라서 조직학적 개념의 치주낭 깊이(histopathologic pocket depth) 보다 치주탐침을 열구 내에 삽입하여 측정한 깊이를 평가하는 탐침치주낭 깊이(probing pocket depth 또는 probing depth)가 임상에서 널리 이용되고 있다. 즉 임상적으로 일정한 힘을 가해 치주탐침을 열구 내로 삽입하여 들어가는 깊이(탐침 깊이; probing depth)를 임상적 치주낭 깊이(clinical pocket depth)라고 하는데 질환 심도에 따라 깊이가 달라지며 열구 내 출혈 정도에 따라 치은의 염증상태를 동시에 평가할 수 있다. 잇몸질환이 진행될수록 치주낭 탐침깊이는 증가한다.

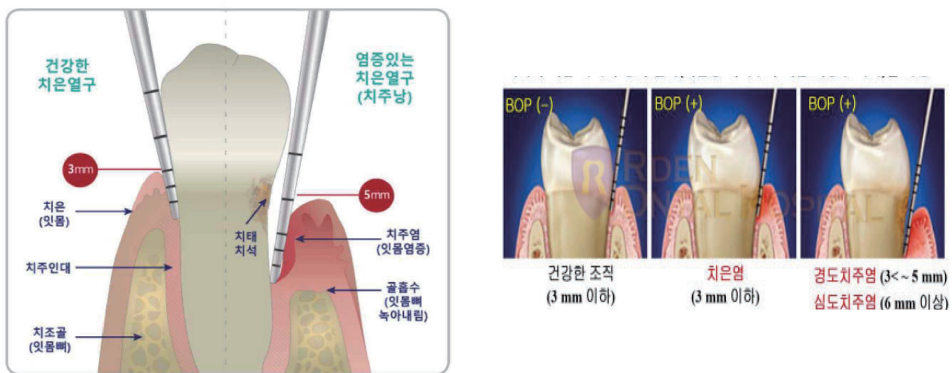


그림 6. 치주낭 탐침깊이

[출처 ; Dear Doctor, Inc., <http://rodendent.co.kr/subF01/907>]

⑤ 치은퇴축(GR, Gingival recession)

치은퇴축은 잇몸이 뿌리 쪽으로 이동하는 현상이다. 치은퇴축은 잇몸염증이나 치주염에 의해 주로 발생한다. 백악법랑경계로부터 치은 변연까지의 거리를 측정한다. 잇몸질환이 진행될수록 치은퇴축은 증가한다. 일반적으로 각 치아당 6부위[협면(Buccal Surface)/설면(Lingual Surface)의 근심, 중앙, 원심]에서 백악 법랑 경계(Cemento-enamel Junction, CEJ)로부터 치은 변연(Gingival Margin)까지의 거리를 각 치아의 면에서 측정하고, 방문시마다 동일한 시험자가 측정한다.

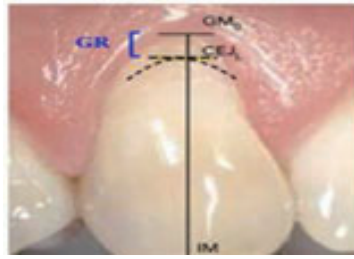


그림 7. 치은퇴축

[출처 ; Cairo et al. Int J Perio dentics Restorative Dent]

⑥ 임상부착수준(CAL, clinical attachment level)

임상부착수준이란 치아를 지지하는 구조물의 위치를 치주탐침을 사용하여 추정한 값을 의미하며 치아의 안정성과 치조골의 소실을 판단하는 기준으로 사용된다. 백악법랑 경계로부터 치주낭 기저부까지의 거리를 측정한다. 잇몸질환이 진행될수록 부착소실과 같은 치주조직의 파괴가 증가하여 임상부착수준이 증가한다. 임상부착수준(Clinical Attachment Level, CAL) 측정은 방문시마다 동일한 시험자가 측정하도록 하며 각 치아당 6부위[협면(Buccal Surface)/설면(Lingual Surface)의 근심, 중앙, 원심]에서 백악 법랑 경계(Cemento-enamel Junction, CEJ)를 기준으로 치주 조직의 부착이 있는 부위까지의 거리로 측정하고, 치주낭 깊이(PD)와 치은 퇴축량(GR)의 합으로 계산한다.

⑦ VAS(Visual Analogue Scale)

VAS는 시각적 아날로그 척도로서 주로 통증이나 불편감 등 주관적 증상을 수치로 표현할 때 사용되는 도구이다. 일반적으로 환자가 느끼는 통증, 불편감, 시림 등의 주관적 증상을 연속 선(0~10 cm, 또는 0~100 mm)로 표시하여 그 위치를 수치로 환산하여 평가한다. 객관적 검사(GI, PD, CAL등)과 함께 주관적 증상평가에 보조적으로 사용된다.

2. 주요 바이오마커의 측정 방법

(1) 산화적 스트레스 억제

(가) 항산화 효소 활성(SOD, CAT, GPx 등)

항산화 효소의 활성은 잇몸조직, 적혈구 및 혈액에서 상용화된 kit 및 spectrophotometer를 이용하여 측정할 수 있다.

(나) 라디칼 소거능

① DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

DPPH법은 안정한 free radical인 DPPH가 수소공여체(H-donor)와 반응하는 능력을 측정하는 것이다. DPPH는 가시선 영역에서 매우 강한 흡수를 보여주기 때문에 UV-Vis spectroscopy로 쉽게 측정할 수 있다.

② ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity)

ORAC는 세포막에 손상을 주는 ROS의 소거능을 수치화하여 항산화 능력을 평가하는 방법이다. 측정 결과를 표준 항산화제인 trolox(항산화제인 수용성 비타민 E 유사물질)와 비교하여 trolox equivalent(TE, trolox 당량: $\mu\text{mol TE/L}$)로 표시한다.

(다) DNA damage(Comet assay, 8-oxo-2'-deoxyguanosine 등)

① Comet assay

Gingival epithelial cells (GECs)와 같은 개개의 세포 수준에서 DNA 손상을 눈으로 직접 확인할 수 있는 방법이다. 전기영동 후 EtBr로 염색하여 형광현미경으로 관찰하면, DNA 손상을 입은 세포는 tail이 나타나게 되고, tail의 길이 및 tail의 형광의 강도를 측정하여 DNA 손상을 정량화 할 수 있다.

② 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)

치은열구액(Gingival crevicular fluid, GCF)에서 측정이 가능하다. DNA를 구성하는 염기 중 guanine 분자의 8번째 위치에 있는 수산화기의 산화가 일어나 8-oxodG가 생성된다. 따라서 8-oxodG의 정량적 측정은 활성 산화물에 의한 체내 DNA의 손상 정도를 평가하는 지표로서 이용될 수 있다. 효소면역법을 이용하여 측정할 수 있다(guanine의 C8이 산화되어 G가 T로 전환되는 것을 측정).

(2) 항염증

(가) IL-1 β

각 피험자의 구치부에 타액으로 인한 오염을 방지하기 위하여 cotton roll로 방습한 후 약 0.25N의 압력으로 micro pipette tip을 치은열구액 내로 삽입하여 치은열구액을 채취하여 상용화된 human IL-1 β enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit를 이용하여 치은열구액 내 IL-1 β 를 정량한다. 채취 시간은 식사 시간을 고려하여 일정하게 정해야 하며, 동일치아 부위에서 반복 채취하도록 한다. 또한, 타액 및 혈액에 오염된 시료는 폐기하도록 한다.

(나) IL-6

IL-6는 위의 IL-1 β 와 유사하게 치은열구액으로부터 상용화된 kit를 이용하여 측정할 수 있다.

(다) TNF- α

TNF- α 는 치은 섬유모세포주(Human gingival fibroblast; HGF-1)로부터 유리되는 양을 측정하거나(in vitro) 피험자의 타액이나 치은열구액으로부터 상용화된 kit를 이용하여 측정할 수 있다.

(라) hs-CRP

염증성 마커로 알려진 high-sensitivity CRP (hs-CRP)는 turbidimetric immunoassay 방법으로 정량할 수 있다.

(마) Prostaglandins

PGE₂는 치은 섬유모세포주 (Human gingival fibroblast; HGF-1)로부터 유리되는 양을 회수하거나(in vitro) 피험자의 타액이나 치은열구액으로부터 enzyme immunoassay kit를 이용하여 측정할 수 있다.

(3) 항균

시험물질의 구강세균에 대한 항균효과는 구강 내 타액 채취 후, real-time PCR에 의해 정량분석할 수 있다.

(가) 구강 내 미생물 검사

피험자로부터 자극성 타액을 채취하여 구강 내 미생물 변화를 관찰한다. 검체 채취는 5분 동안 파라핀 왁스를 씹게 하여 50cc 플라스틱 튜브에 자극성 타액을 받아 즉시 냉장보관한다.

(나) Real-time PCR에 의한 정량분석

DNA kit를 이용하여 genomic DNA를 추출한 후, 구강미생물의 정량분석을 위하여 Real-Time PCR Kit (Microis, Korea)를 이용하여 16s rDNA 단편을 증폭하고, 각각의 미생물 검출을 위해서는 functional gene(rgp, waa, gtf)으로부터 specific primer를 제작하여 약 200 bp 내외의 DNA 단편을 각각 증폭하여 정량분석한다.

(4) 치주조직 및 구조변화

(가) 연조직

① MMPs(MMP-3, 8, 9, 13)

MMP(Matrix metalloproteinase) 효소는 PCR을 이용하여 발현량을 조사하거나 ELISA 법으로 생성량을 측정할 수 있다.

㉓ PCR을 이용한 발현량 조사: 치은섬유모세포 또는 치주인대세포를 배양하거나 동물 또는 인체 치아조직으로부터 RNA 분리 후 각 MMPs별 oligonucleotide primer를 이용하여 cDNA를 증폭하여 발현량을 조사한다.

㉔ ELISA : 타액 또는 치은열구액으로부터 상용화된 Kit를 이용하여 측정한다.

② TIMP(TIMP-1, TIMP-2)

TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase)는 치은 섬유모세포주(Human gingival fibroblast; HGF-1)로부터 유리되는 양을 회수하거나 피험자의 타액이나 치은열구액으로부터 enzyme immunoassay kit를 이용하여 측정할 수 있다.

③ Type I Collagen 합성 능력

Type I Collagen 합성 능력은 치은섬유모세포, 치주인대세포의 배양액 또는 치주 조직 절편에 대해 qPCR(전사 수준), Western Blotting, ELISA kit, Picrosirius Red 염색 후 편광 현미경 관찰 등을 통해 확인할 수 있다.

(나) 경조직

① Osteocalcin

오스테오칼신(osteocalcin)은 혈액, 타액, 치은열구액으로부터 전기화학형 발광법(electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA)을 이용하여 측정할 수 있다.

② RANKL

치주인대세포로부터 유리되는 soluble RANKL의 양을 측정하거나 피험자의 타액, 치은열구액으로부터 enzyme immunoassay kit를 이용하여 측정할 수 있다. 또는 치주인대세포나 피험자 조직으로부터 RNA를 분리하여 RANKL의 발현량을 조사할 수도 있다.

③ Osteoprotegerin(OPG)

치주인대세포로부터 유리되는 OPG의 양을 측정하거나 피험자의 타액, 치은열구액으로부터 enzyme immunoassay kit를 이용하여 측정할 수 있다. 또는 치주인대세포나 피험자 조직으로부터 RNA를 분리하여 OPG의 발현량을 조사할 수도 있다.

④ C-Telopeptide(CTX)

CTX는 골흡수의 산물이 혈청과 소변으로 배출되는 양을 측정하는 골흡수 표지자 중 하나로 혈청이나 타액, 치은열구액으로부터 ELISA kit를 이용하여 측정할 수 있다.

⑤ Alkaline phosphatase(ALP)

ALP의 활성은 alkaline phosphatase substrate Kit(Bio-Rad, USA)와 같은 상용화된 kit를 이용하여 측정할 수 있다. p-nitrophenyl phosphate(pNPP)의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 것을 이용하여, 가수분해의 산물이 p-nitrophenol의 양을 측정함으로써 활성을 계산한다.

(5) 치주인대줄기세포 활성화

(가) Cluster of differentiation(CD73, CD90, CD105)

면역세포화학 분석 (Immunocytochemistry)을 통해 CD73, CD90, CD105에 대한 특이적인 항체를 사용하여 세포 표면에 발현된 단백질을 시각화하거나 유세포 분석 (Flow Cytometry)을 통해 CD73, CD90, CD105에 대한 항체로 염색한 후, 유세포 분석기를 사용하여 양성 세포의 비율을 측정하거나 qPCR을 통해 CD73, CD90, CD105의 mRNA 발현 수준을 측정하여 유전자 발현 변화를 확인하거나 Western Blotting을 통해 CD73, CD90, CD105 단백질의 발현 수준을 확인할 수 있다.

(6) 치주인대세포 활성화

(가) 세포 기능성(세포분열속도, 상처치유능력, 세포이동능력)

① 세포분열속도

치주인대세포에 대해 MTT assay, BrdU 표지법, Ki-67 항원 발현 분석 등을 통해 세포 수를 정량화하고 세포 증식 정도를 확인한다.

잇몸 노화 동물 모델에서 치아를 발거한 후 MTT 용액에 담가 치근면의 치주인대 세포 활성도를 측정하거나 3H-thymidine 표지법, H&E 염색, Ki-67 항체 염색 등을 통해 세포의 증식 정도를 평가한다.

② 상처치유능력

상처 부위의 세포를 정량화하기 위해 컴퓨터 보조 조직형태계측법을 사용하여 상처 치유 능력을 분석하거나 세포 단층에 3-4mm 너비의 상처를 표준화된 방식으로 만들고 JuLI™ Br와 같은 장비를 사용하여 시간에 따른 상처 폐쇄를 모니터링하고 치유율을 계산한다.

잇몸 노화 동물 모델의 치주 조직에 상처를 유발한 후 조직 치유 과정을 시간 경과에 따라 치유 과정, 세포의 이동, 증식, 조직 재생을 관찰한다.

③ 세포이동능력

치주인대세포를 Transwell Migration Assay를 통해 화학주성(chemotaxis)을 평가하거나 time-lapse 현미경 관찰을 통해 개별 세포의 이동 궤적, 누적 거리, 속도 등을 실시간으로 분석할 수 있다.

GFP나 다른 형광 단백질로 표지된 치주인대세포를 동물 모델에 이식하고 시간에 따른 이동을 관찰하거나 조직학적으로 분석하기 위해 시간에 따른 조직 절편을 제작하여 세포의 이동과 분포 변화를 관찰할 수 있다.

(나) 치주인대 밀도

치주인대 밀도는 잇몸 노화 또는 잇몸 염증 동물 모델에서 조직 슬라이드를 제작하여 H&E 염색을 통해 치주인대의 전반적인 구조와 세포 분포를 관찰하거나 Masson's trichrome 염색을 사용해 콜라겐 섬유의 분포와 밀도를 평가하거나 Picrosirius red 염색 후 편광 현미경을 통해 콜라겐 섬유의 배열과 밀도를 관찰할 수 있다. 이러한 방법들을 조합하여 사용함으로써 치주인대 조직의 밀도와 구조적 재생 상태를 종합적으로 평가할 수 있다.

(7) 임상적 증상

① 치은지수(GI, Gingival index)

Loe & Silness의 치은 지수를 이용하여 치은의 염증상태를 측정하는 방법이다. 각 치아의 치은연을 협면, 설면, 근심면, 원심면으로 나누고 치주 탐침을 이용하여 치은조직의 건강 상태만을 평가한다. 측정 범위는 0점(염증 없음), 1점(경도의 염증), 2점(중등도 염증), 3점(중증 염증)으로 분류되며, 치아 당 평균을 구한다.

② 치태지수(PI, Plaque index)

구강청결도를 의미하는 지수로서 치태의 두께에 따라 치태가 부착되어 있지 않은 상태는 0, 치아와 유리치은 변연에 부착된 치태로서 치주 탐침기로 치면을 긁어보아 확인할 수 없는 얇은 상태는 1, 치은낭과 치은변연을 따라 육안으로 확인될 수 있을 정도의 과량의 치태가 부착되어 있고 치간 사이에 치태가 없는 상태는 2, 치은변연에 많은 양의 치태가 침착되어 있고 치간 사이에도 치태가 채워져 있는 상태는 3으로 구분하여 표기한다.

③ 탐침 시 출혈(BOP, Bleeding on Probing)

치주 탐침(Marquis probe, Hu-Friedy, USA)을 이용하여 각 치아의 근, 원심면을 20g 이하의 압력으로 점합상피까지 치근단 방향으로 삽입한 후 20초 후 치은의 출혈 유무로 판정하였다. 각 치아의 협면(Buccal Surface)/설면(Lingual Surface)의 근심, 중앙, 원심의 출혈 여부를 확인하여 출혈 시 1점, 출혈이 없는 경우 0점으로 계산 한 후 치아 당 평균을 구한다.

④ 치주낭 탐침깊이(PD, Probing depth)

치주 탐침(Marquis probe, Hu-Friedy, USA)을 이용하여 치은변연부터 치주낭 또는 치은열구 기저부까지의 거리를 근심 협면, 협면 중앙부, 원심 협면, 원심 설면, 설면 중앙부, 근심 설면의 6부위를 측정한 후 치아 당 측정치의 평균을 구한다.

⑤ 치은퇴축(Gingival recession)

치은퇴축은 잇몸이 뿌리 쪽으로 이동하는 현상이다. 직경 0.5 mm의 William's 탐침을 이용하여 백악법랑경계부에서 치은변연부까지의 거리를 가장 가까운 mm값으로 측정한다.

⑥ 임상부착수준(CAL, Clinical attachment level)

백악법랑 경계로부터 치주낭 기저부까지의 거리를 측정한다.

⑦ 100mm VAS (Visual Analogue Scale)

VAS는 100mm선에 피험자의 현재 상태를 가장 잘 나타내는 곳에 피험자로 하여금 표시하게 하는 것으로 환자가 느끼는 주관적 통증의 정도를 나타내는 데 사용한다. 피험자의 지각 과민 완화에 대한 만족도를 0에서 100까지 수치화한다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관 시험

(1) 시험계

시험관 시험은 구강세균에 대한 항균시험, 세포주를 활용한 항염증 시험 등이 있다.

치주인대섬유모세포(human periodontal ligament fibroblasts), 치은상피세포(human gingival epithelial cell) 등에 구강세균 또는 H_2O_2 , LPS(Lipopolysaccharide)나 $TNF-\alpha$ 등으로 산화적 손상 및 염증을 유발하여 시험물질의 잇몸염증 개선 효과를 측정할 수 있다.

치주인대섬유모세포, 치은섬유모세포(Gingival fibroblasts) 등을 약 passage 10 이상의 장기간 계대 배양하여 복제 노화를 유도하거나 H_2O_2 나 UV 조사를 통해 산화 스트레스를 가해 조기 노화를 유도하여 시험물질의 잇몸노화 관련 세포 활성 유지 효과를 측정할 수 있다.

(2) 바이오마커

시험물질의 작용기전을 설명하기 위하여 예상되는 대사 경로에 위치하고 있는 유전자, 효소, 전사인자, 신호전달물질, 대사산물 등의 바이오마커에 대한 활성 및 그 발현 정도 등을 측정한다.

(3) 통계처리

시험결과는 시험물질 처리에 따른 변화 또는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

나. 동물시험

(1) 실험동물

① 잇몸 염증 모델

잇몸 염증을 유도한 동물모델(rat, mouse, dog, rabbit, pig 등)을 이용하여, 시험물질을 투여한 후 잇몸 염증과 관련된 바이오마커를 측정한다. 관찰하고자 하는 목적에 따라 다양한 모델을 사용하여 잇몸건강 개선에 대한 효과를 종합적으로 판단한다. 잇몸 염증 유도에 사용되는 동물모델의 예는 아래와 같다.

㉠ 결찰 유도 치주염 모델

6~7주령의 Sprague-Dawley rat과 같은 실험동물을 tiletamine/zolazepam 혼합액(Zoletil 50, Virbac Lab, Carroscedex, France)으로 전신 마취 후 하악 제 1 대구치에 멸균된 봉합사(3-0, nylon thread)로 결찰하여 잇몸 염증을 유발한다. 빠르고 일관된 질병 진행을 보이고 인간의 치주염과 유사한 병리학적 특징을 나타낸다.

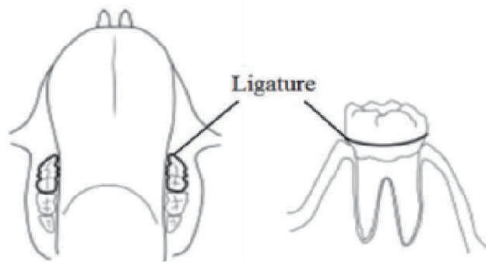


그림 8. 치주염 유발을 위한 시험디자인

[출처 ; Journal of Korean Medicine, 2018]

㉡ LPS 주입 모델

Porphyromonas gingivalis 유래 LPS를 일반적으로 mouse나 rat의 상악 제1대구치 주변 잇몸 조직에 주기적으로 주입하여 잇몸 염증을 유발한다. 보통 1-4주 동안 주 2-3회 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 농도의 LPS 용액을 주입한다. 비교적 간단하고 재현성이 높은 모델이다.

② 잇몸 노화 모델

잇몸 노화를 유도한 동물모델(rat, mouse, dog, primate 등)을 이용하여, 시험물질을 투여한 후 잇몸 노화와 관련된 바이오마커를 측정한다. 관찰하고자 하는 목적에 따라 다양한 모델을 사용하여 잇몸노화 관련 세포 활성 유지에 대한 효과를 종합적으로 판단한다. 잇몸 노화 유도에 사용되는 동물모델의 예는 아래와 같다.

㉓ 자연 노화 모델

주로 18~24개월 노년의 mouse나 rat가 사용된다. 자연적인 노화 과정을 관찰할 수 있어 실제 상황과 유사하고 장기간에 걸친 변화를 관찰할 수 있다. 하지만 시간이 오래 걸리고 비용이 많이 들고 개체 간 변이가 클 수 있다.

㉔ 가속 노화 모델

주로 H_2O_2 처리나 방사선 조사를 통해 산화 스트레스를 인위적으로 유도하여 노화 과정을 가속화한다. 자연적 노화 과정보다 빠르게 결과를 얻을 수 있다. 하지만 자연적 노화 과정과 완전히 동일하지 않을 수 있고 사용된 스트레스 유도 방법에 따라 결과가 달라질 수 있다.

(2) 바이오마커

실험동물을 대상으로 원료의 경구투여 또는 섭취에 의한 항산화, 항염증, 항균, 치주 조직 및 구조변화, 치주인대(줄기)세포의 활성 관련 지표 변화를 측정한다.

(3) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

다. 인체적용시험

(1) 시험 대상

(가) 시험대상자 선정 기준 (예시)

잇몸건강 기능성평가를 위한 인체적용시험의 시험대상자는 만성 치주염 환자를 대상으로 하는 의약품과는 다르게 잇몸건강에 대해 염려하는 자 또는 치은염 질환자로 치주염으로 진행이 가능한 자를 선정하는 것을 기본으로 한다. 단, 치은염의 개선을 확인하는 데 있어 경증의 치주염을 가진 자를 대상으로 인체적용시험을 수행할 수 있다.

○ 잇몸 건강

- 만 19세 이상 80세 미만의 성인 남녀
- BOP (Bleeding on probing, 출혈지수) site가 10% 이상이고, 탐침깊이(Probing Depth)가 3 mm 초과, 5 mm 이하인 치아가 1개 이상 있는 자
- 탐침 시 출혈이 있는 자
- 치은염 또는 경증 치주염 증상이 있는 자
- 현존 자연 치아 수가 20개 이상인 자
- * 치주염이 있는 자가 일부(윤리적으로 허용되는 범위) 포함될 경우 약물을 복용하거나 약물 처방이 필요한 자는 반드시 제외되어야 함

(나) 시험대상자 제외 기준 (예시)

○ 질병상태

- 시험 시작 1개월 이내에 스케일링 또는 6개월 이내에 치주 치료를 받은 자
- 구강 내 연조직에 심각한 병적 소견을 보이는 자
- 출혈성 병력이나 질환을 가진 자, 또는 이의 예방을 위해 항혈소판제제 또는 항응고제를 복용하고 있는 자
- 구강 내 즉시 치아우식증 치료를 받아야 할 대상 치아가 5개 이상 존재하는 자
- 수술이나 급성치료를 요하는 치주염 환자
- 외상성교합(Traumatic occlusion) 환자
- 과거 5년 이내에 암이 발현된 환자 또는 항암치료자
- 시험 기간 중 동반되는 치과질환에 의해 수술, 발치 등이 필요한 경우

- 조절되지 않는 고혈압 환자(140/90 mmHg 이상, 시험대상자 10분 안정 후 측정기준)
- 조절되지 않는 당뇨 환자(HbA1c > 7.0%)
- 임상적으로 유의한 심혈관계, 면역계, 감염성, 종양성 질환을 가진 자
- 정신분열증, 우울증, 약물중독, 알코올 중독 등의 정신질환자
- 생리적 상태
 - 임신부 및 수유부 또는 임신 계획이 있는 자
 - 출산 후 6개월 이내 여성
- 약물복용
 - 출혈성 병력이나 질환을 가진 환자, 또는 이의 예방을 위해 항혈소판제 또는 항응고제를 복용하고 있는 환자
 - 최근 1개월 이내 치주상태에 영향을 줄 수 있는 약물(phenytoin, calcium channel blocker, cyclosporine, cumadin, NSAIDs, aspirin 등)을 5일 이상 연속 복용한 자
 - 최근 1개월 이내에 항생제, 치주질환보조치료제를 복용한 경험이 있는 자
- 생활 습관
 - 알코올 섭취 [남자 ≥ 40 g/day, 여자 ≥ 20 g/day (WHO의 1일 알코올 섭취 기준에 따름)]
 - 과도한 흡연자 (≥ 20 개비/일)
- 기타
 - 시험물질에 대한 알레르기/부작용이 있는 자
 - 시험 시작 1개월 이내에 잇몸 건강과 관련된 건강기능식품을 복용한 자
 - 최근 3개월 내 다른 임상시험에 참가한 자
 - 연구자의 판단에 의해 해당 연구에 부적합하다고 판단되는 자

(2) 시험설계

시험디자인은 이중눈가림, 무작위배정, 위약대조연구(Randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 한다. 시험설계 시 대상자 선정·제외 기준을 명확히 하여 기관생명윤리위원회(IRB)에서 약물치료가 필요한 대상자가 시험에 포함되지 않도록 한다. 이때 기관명과 승인일이 기술되도록 한다.

대상자 수의 산출방법과 근거, 검정력 등은 기술되어야 하며, 이중눈가림이 이루어진 경우, 배정된 군에 대해 비밀이 유지된 대상(예: 연구대상자, 연구담당자, 결과분석자 등), 비밀유지

방법, 눈가림의 해제 등에 대해 기술하고 비뮴립 방법을 최소화하기 위한 방법(무작위배정)이 기술되어야 한다.

또한 평가지표에 영향을 미칠 수 있는 기저시점에서의 각 군 대상자들의 인구학적 특성, 기초특성(성별, 연령, 신체활동량, 흡연력, 약물 복용력, 식이 섭취량, 체중, 운동, 음주, 구강 위생습관 등)을 군간 차이로 기술한다.

초기 구강위생 상태는 시험 결과에 직접적인 영향을 미칠 수 있기 때문에 연구 시작 전 초기 구강위생교육을 통일화하고 연구 기간 중 스케일링 및 전문적 세정 금지하여 교란요인을 통제하여야 한다.

(3) 바이오마커

기능성 내용을 확인할 수 있는 잇몸건강 관련 바이오마커의 변화를 측정한다. 바이오마커는 기전별로 다양한 지표들이 포함되어 있기 때문에 연구 목적에 부합하는 추측기전을 선정하고, 관련된 바이오마커의 결과에 일관성이 나타나야 한다(Ⅲ. 기능성 시험방법 1. 가. 연구유형별 바이오마커 참고).

(4) 안전성 평가 지표

인체적용시험에서는 시험물질 섭취로 인한 안전성을 평가하기 위하여 일반적으로 활력징후, 심전도 검사, 혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 뇨 검사를 실시하며, 기능성 원료의 특성과 기능성 내용에 따라 안전성 평가항목이 추가 될 수 있다.

※ [참고] 안전성 검사 항목 (예시)

- 활력징후: 수축기 혈압, 이완기 혈압, 맥박 수, 체온 등
- 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets count
- 혈액화학적 검사: Total bilirubin, ALP, gamma-GT, ALT, AST, glucose, total protein, albumin, BUN, creatinine, creatine kinase(CK), LD(LDH), HbA1c
- 뇨 검사: Specific gravity, pH, WBC, nitrite, protein, glucose, ketone body, urobilinogen, bilirubin, occult blood

(5) 통계처리

인구학적 정보 및 기초 특성의 측정 지표에 대한 통계분석방법을 기술하고, 분석군(ITT,

FAS, PP)에 대해 명확하게 정의하여 주분석군 설정에 대한 설명이 계획서와 결과보고서에 기술되도록 한다. 또한, 기능성 평가지표에 대한 통계분석방법 및 중도탈락자 및 결측치 처리에 대한 통계분석방법을 명확히 한다. 연구 개시 후 측정 시기 및 방법의 변화가 있는 경우, 그 변경 사유를 기술하여야 하며, 층화 분석, 보정 분석 등이 제출된 경우, 사전 계획 여부가 기술되도록 한다. 이때, 각 군별 기능성 평가지표에 대한 분석결과에 사용된 통계분석 방법, 군간 통계적 유의성, 시험대상자 수, 평균, 표준편차 등이 확인될 수 있도록 하여야 하며 통계 분석방법의 변경이 있는 경우, 변경사항에 대해 기술하도록 한다.

1. 종속변수가 범주형일 경우

- 범주형 변수는 크게 명목 척도와 순위 척도로 구분할 수 있음
- 명목 척도: 성별, 흡연 여부, 음주 여부 등 연속되지 않으며 범주 간 서열이 존재하지 않는 범주형 척도
- 순위 척도: 질병의 병기(1기, 2기, 3기) 등 연속되지 않으나 범주 간 서열이 존재하는 범주형 척도
- 연속형 변수는 수치화된 변수로 연속성이 있으며, 평균, 표준편차 등 계산할 수 있는 변수임

1.1. Chi-square test

- 두 군 간의 차이를 비교할 때 사용

* 빈도가 5 미만인 항목이 있는 경우 Fisher's exact test 사용

1.2. McNemar's test

- 군내의 전후 차이를 비교할 때 사용

2. 종속변수가 연속형이고 비교군이 2개 일 경우

※ 연구 내 비교군이 2개(시험군, 대조군)일 경우 사용되는 분석 모델임.

2.1. Paired T-test: 군 내 전후 변화 차이를 비교할 때 사용

2.1.1. Wilcoxon's signed-ranks T-test

- 군 내의 전후 변화 차이 비교 시 변수의 분포가 정규분포*를 따르지 않는 경우 사용

2.2. independent T-test: 두 군간의 차이를 비교할 때 사용

2.2.1. Wilcoxon's rank sum T-test

-두 군간의 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포*를 따르지 않는 경우 사용

2.3. linear mixed effect model

-유효성 평가 지표의 측정 시점이 3회 이상일 경우 사용할 수 있음

* 방문 시점 간의 공분산 구조(covariance structure)를 결정하여 분석에 적용할 수 있는 모델이며, 효과의 크기(slope), linear function의 절편(intercept) 등의 방문 시점, 대상자 등에 따른 고정효과(fixed effect) 또는 무작위효과(random effect)의 여부를 결정하여 model안에 혼합(mixed effect)하여 적용할 수 있음

3. 종속변수가 연속형이면서 비교군이 3개 이상일 경우

※ 연구 내 비교군이 3개(대조군, 시험군1, 시험군2 등)일 경우 사용되는 분석 모델임

3.1. ANOVA(Analysis of variance): 군 간의 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포를 따르지 않는 경우 사용

3.2. Kruskal Wallis test: 군 간의 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규 분포를 따르지 않는 경우 사용

※ 변수 분포의 정규성 검정

- 정규성 검정 방법은 Kolmogorov-Smirnov test, Shapiro-Wilk test 등의 방법으로 검정할 수 있음. 일반적으로 p value가 0.05 미만일 경우, 정규분포를 따르지 않는 것으로 판단함. 그러나 현실에서 해당 기준에서 정규분포를 따르는 경우가 많지 않으므로, p value가 0.05 이상이라도 marginal한 p value를 확인하거나 Q-Q plot을 육안으로 확인하는 등 연구자가 자의적으로 정규분포를 따르는 것으로 판단할 수 있음
- 군 당 sample size가 30 이상인 경우, 중심극한정리를 이용하여 정규성을 가정하는 경우가 있음. 그러나 중심극한정리는 표본집단이 대표하는 모집단이 무한모집단이라는 가정하에 사용됨. 즉, 모집단에 대한 가정이 불확실한 경우 또는 유한모집단인 경우가 있으므로 군 당 sample size가 30 이상이라고 해도 정규성 검정이 필요할 수 있음. 또한 30명이라는 기준은 연구자가 임의적으로 설정한 것임을 고려하여 절대적인 기준이 되지 않을 수 있음

4. 교란변수 보정이 필요한 경우

- Randomized Clinical Trial(중재연구)은 randomization을 통해 대상자가 군에 배정되므로, 교란변수를 통제할 수 있는 설계의 연구임. 그러나 우연에 의해 baseline의 특성이 군 간 차이를 보이는 경우가 발생할 수 있음. 이럴 경우, 연구자는 해당 변수를 공변량(covariate)으로 model에 포함시켜 분석할 수 있음. 그러나 가능할 경우, randomization block으로 생성하여 randomization 단계에서 층화무작위배정 등으로 미리 불균형을 방지하는 것이 바람직할 수 있음

4.1. ANOCOVA

- 보정하고자 하는 변수를 모델 내 공변량(covariate)으로 추가 할 수 있음

4.2. linear mixed effect model

- 보정하고자 하는 변수를 모델 내 공변량(covariate)으로 추가 할 수 있음

(6) 기타 고려사항

- 공통 기초 특성 조사
 - 식이섭취 조사
 - 신체활동조사
- 잇몸 건강 특이적 기초 특성 조사 항목
 - 음주 및 흡연 습관
 - 구강 위생 습관(양치질, 치간칫솔 사용, 치실 사용, 가글 사용 등), 치과 방문 간격
 - HbA1c 변화율

IV

참고문헌

1. 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」, 식품의약품안전처 고시 제 2018-73호 2018.
2. 건강기능식품(개정판), 김미경, 권오란, 전향숙, 원혜숙, 김지연, 강병철, 제정환, 한재갑, 홍성화, 복혜숙, 김우선, 피재호, 박현용, 김현정, 교문사 2010.
3. 건강기능식품 기능성 평가 해설서, 식품의약품안전처 2008.
4. 권영혁, & 박준봉. (1996). 혈소판유래성장인자-BB 가 골간질세포와 치주인대세포의 성장에 미치는 연구. 대한치주과학회지, 26(4), 949-965.
5. 김광수, (2023). 임플란트 함부로 하지 말아야 할 이유, 도서출판 말
6. 김미정. 케토락트로메타민과 치자가수분해물이 함유된 Hydrogel 제의 피부투과 및 치주염완화효과. 치위생과학회지 2005, 5(3):113-117.
7. 김선규, 신미경, 어규식, 이진용, 홍정표, 전양현. P. gingivalis에 대한 피톤치드의 항균효과. 대한구강내과학회지 2007, 32(2):137-150.
8. 김선희, 권영혁, 이만섭, 박준봉, & 허익. (1998). Chitosan 이 치주인대, 두개관 및 치은섬유아세포의 성장에 미치는 영향. 대한치주과학회지: Vol, 28(1).
9. 김애옥, 최충호, 홍석진. 식초음료의 Candida albicans에 대한 성장억제 기전에 관한 연구. 한국융합학회논문지 2018, 9(12):137-143.
10. 김예진, 허웅, 최한석, 강기성, 황귀서. 백지윤, 구본암, 김현영. 두충 추출물의 잇몸상피세포 염증에 대한 항염증 효과. 생약학회지 2019, (3):185-190.
11. 김예황, 이정화. 스트레스, 수면시간 및 주관적 구강건강 상태가 치주질환에 미치는 영향. 보건의료산업학회지 2017, 11(4):169-178.
12. 김일신. 한국인 전반적 급진성 치주염 환자에서 발견된 TNF- α 유전자의 다변성. 디지털융복합연구 2016, 14(1):321-326.
13. 김재민, 황희진. 한국 성인의 비타민 D와 치주질환의 관계. 치위생과학회지 2018, 18(4):210-217.
14. 김지숙, 박준봉, 이만섭, 권영혁, 허익, & 임상철. (1997). 백서의 치주인대세포와 두개관세포의 혼합배양이석회화과정에 미치는 영향. 대한치주과학회지: Vol, 27(4).
15. 김지혜, 김기림, 진혜정, 임상옥, 송근배, 최연희. Polycan-Calcium Gluconate 복합제에 의한 염증인자의 감소 효과. 치위생과학회지 2014, 14(2):223-229.
16. 김천중 외 3인, 八味地黃丸 및 五倍子 추출물이 뼈모유사세포와 치주인대섬유모세포의 증식, Alkaline Phosphatase의 활성 및 단백질 합성능에 미치는 影響, 2003
17. 김태일, 최은정, 정종평, 한수부, 구영. 옥수수 불검화 추출물(Zea Mays L.)과 후박(Magnoliae cortex) 추출물 혼합물의 치주질환원인균에 대한 항균작용 및 치은섬유아세포 활성화도에 미치는 영향. 대한치주과학회지 2002, 32(1):249-255.

18. 김혜수, 이상우, 콩마니 시다래, 조수정. Streptococcus mutans에 대한 인도감나무 줄기 추출물의 항균활성 및 생물막 형성 억제 효과. 생명과학회지 2019, 29(1):90-96.
19. 나성윤, 권영혁, 박준봉, 허익, & 김성진. (2000). 행인 추출물이 고포도당 상태의 치은섬유아세포 및치주인대세포에 미치는 영향. 대한치주과학회지: Vol, 30(1).
20. 민대진, 이성원, 이성훈, 김승섭, 김찬호, 이준환, 배지현, 김한곤. 녹차추출물의 잇몸 질환 원인균에 대한 항염증 효능 연구. 대한화장품학회지 2011, 37(1):67-73.
21. 박성표, 정현주, 김영준, 김옥수. 치은 섬유모세포에서 Triclosan에 의한 ProstaglandinE2 합성 억제. 대한치주과학회지 2004, 34(2):345-356.
22. 박순남, 이동균, 임윤경, 김화숙, 조유진, 김동춘, 김생곤, 국중기. 차아우식증 및 치주질환 원인균에 대한 Carvacrol의 항균효과. 미생물학회지 2012, 48(1):52-56.
23. 박영미, 이영래, 박상훈, 이봉근, 박연주, 오홍근, 문대인, 손민우, 강양규, 김옥진, 이석련, 이충훈, 김민석, 이학용. 치주염증에 대한 마치현 및 금전초 에탄올 추출물의 억제 효과. J Physiol & Pathol Korean Med 2015, 29(1):46-50,
24. 박정환, 박동열, & 박상연. (1991). 미노사이클린이 치주인대세포의 부착과 전개에 미치는 효과. 대한구강생물학회지, 15(1), 29-38.
25. 박준혁, 이해수, 양응모, 한련초 추출물의 치주염 개선 효과에 관한 연구. 대한한의학회지 2018, 39(1):63-74.
26. 박지아. 치주염, 치주병원균 및 전신건강지표 간 연관성 : 병원기반 건강검진 수검자를 중심으로, 서울대학교 대학원 2019.
27. 박현경, 이민경, 전은숙, 유수빈, 김혜진. 발포비타민을 이용한 구강세정 및 섭취가 구강 내 치주질환 유발 세균 감소에 미치는 효과 비교. 한국치위생학회지 2019, 19(3):387-397.
28. 방선정, 김일신, 김옥수, 김영준, 정현주. 한국인 전반적 급진성 치주염 환자에서 IL-6 유전자 다변성에 관한 연구. 대한치주과학회지 2008, 38:579-588.
29. 백동현. 구강 질환 유발 미생물에 대한 항생작용을 갖는 천연물 추출물 검색. The Korean J Microbiol 2007, 43(3):227-231.
30. 백영란, 이재목. 만성 치주염 환자의 치은 조직에서 RANK 및 RANKL의 발현. J Periodontal Implant Sci 2007, 37(4):849-857.
31. 백한승, 강수경, 어규식, 전양현, 홍정표. 몰약, 라타니아, 카모밀레 등의 구강 내 병원균에 대한 항균작용. 대한구강내과학회지 2013, 38(4):299-312.
32. 보건복지부 한국건강증진개발원
33. 송영보, 이만섭, 권영혁, 박준봉, 허익, & 김성진. (1999). Aralia cortex 와 Phellodendron cortex 의 혼합 추출물이 치주조직세포 활성화에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 29(1), 15-30.
34. 시모지 이사오, (2010). 치주인대에 의한 재생치료, 군자출판사
35. 이동재, 한일민, 김우정, 조인식. 치주 질환 예방 및 치료용 소재로서 수종의 생약성분 추

- 출물에 관한 항균, 항염, 항산화 효능 연구. J Dent Hyg Sci 2010, 10(1):25-29.
36. 이상구, 서조영, & 박준봉. (1993). 치근면 구연산 도포가 치주인대세포의 부착과 전개에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 23(1), 0-0.
 37. 이석준. 구강건강행태와 고감도 C-반응성 단백질의 상관관계: 국민건강영양조사 제6기 (2015년)자료. J Health Info Stat 2018, 43(1):64-69.
 38. 이승희, 김민정. 치주염 원인균에 대한 천연 식물 추출물의 항균효과. 한국콘텐츠학회논문지 2019, 19(1):242-255.
 39. 인영미, 이상래, 권기성, & 이만섭. (1995). 치주인대세포와 치은 섬유아세포의 혼합배양이 석회화 결절형성에 미치는 영향. 경희치대논문집, 17(2), 765-776.
 40. 임종필. 화피의 충치균과 치주질환균에 대한 항균활성 및 항염효과. 동의생리병리학회지 2011, 25(4):635-640.
 41. 장종화, 박용덕, 류다영. Garlic extract 배합 치약의 치주질환 균주에 대한 항균 효과. 한국치위생학회지 2012, 12(3):631-640.
 42. 장종화. 마늘추출물 함유 치약이 치면세균막 감소 및 치은염 완화에 미치는 영향. 한국치위생교육학회지 2008, 8(2):67-76.
 43. 전국치주과학교수협의회, 치주과학(6판), (2015). 군자출판사
 44. 정성희, 어규식, 전양현, 홍정표. 피톤치드 처리 후 구강 내 잔존 *S. thermophilus*의 *P. gingivalis*에 대한 효과. 대한구강내과학회지 2009, 34(1):23-37.
 45. 정소영, 이천희, 안선하. 도라지 추출물의 구강미생물에 대한 항균효과. 보건의료산업학회지 2019, 13(2):135-142.
 46. 조판표, 최득철, 김영준. 백서 치주인대세포에서 Doxycycline에 의한 mRANKL 발현 억제. 대한치주과학회지 2006, 36(2):335-344.
 47. 조병도, 허익, 박준봉, 권영혁, & 이만섭. (1996). 혈소판유래성장인자와 상피성장인자가 치주인대세포와 골수세포의 성장에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 26(2), 491-510.
 48. 조성훈, 허익, 이상래, 이병일, & 권기성. (1995). 백서 치아 발거후 잔존 치주인대가 발치와의 치조골 재건에 미치는 영향. 경희치대논문집, 17(2), 777-796.
 49. 채규창, 어규식, 전양현, 홍정표. 인진쑥의 구강세균에 대한 항균작용. 대한구강내과학회지 2009, 34(2):169-177.
 50. 천세희, 정성화. 한국 성인에서 비타민 섭취와 치주염 유병간의 관련성. 치위생과학회지 2014, 14(4):468-476.
 51. 최병호, (2015). 임플란트 위험하다, (주)맥스교육(맥스미디어)
 52. 최성호, 윤정호, 이중석, 임현창, 김란영, 김민영, 김일신, 김지영, 김지우, 김희경, 문원숙, 복혜정, 이수옥, 이영수, 이해경, 정임희, 정혜란, (2016). 치주학, 의학교육
 53. 최영숙, 성정민. IT 시대에서의 자연추출물 사용으로 인한 구강환경 효과연구. 한국전자통신학회 논문지 2016, 11(7):701-706.
 54. 최종우, 이만섭, 권영혁, 박준봉, 허익, & 임상철. (1997). 혈소판유래 및 상피성장인자가

- 치주조직재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지: Vol, 27(3).
55. 허메이통, 김지현, 김영실, 박혜숙, 조은주. 무막줄기세포추출물의 H2O2에 의해 유도된 치주 세포의 염증 반응 보호 효과. 한국산학기술학회논문지 2019, 20(6):95-103.
 56. Adeli, F., Zabihi, E., Abedian, Z., Gharekhani, S., Pouramir, M., Khafri, S., & Ghasempour, M. (2016, Jul-Sep). Comparative in vitro study of the effectiveness of Green tea extract and common storage media on periodontal ligament fibroblast viability. *Eur J Dent*, 10(3), 408-412. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.184158>
 57. Albuquerque-Souza, E., Schulte, F., Chen, T., Hardt, M., Hasturk, H., Van Dyke, T. E., Holzhausen, M., & Kantarci, A. (2020). Maresin-1 and Resolvin E1 Promote Regenerative Properties of Periodontal Ligament Stem Cells Under Inflammatory Conditions. *Front Immunol*, 11, 585530. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585530>
 58. Almeida, T., Valverde, T., Martins-Junior, P., Ribeiro, H., Kitten, G., & Carvalhaes, L. (2015). Morphological and quantitative study of collagen fibers in healthy and diseased human gingival tissues. *Rom J Morphol Embryol*, 56(1), 33-40.
 59. Alvarez, R., Lee, H. L., Wang, C. Y., & Hong, C. (2015, Dec 18). Characterization of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from human periodontal ligament based on cell surface markers. *Int J Oral Sci*, 7(4), 213-219. <https://doi.org/10.1038/ijos.2015.42>
 60. Alves, L., Machado, V., Botelho, J., Mendes, J. J., Cabral, J. M. S., da Silva, C. L., & Carvalho, M. S. (2023, May 3). Enhanced Proliferative and Osteogenic Potential of Periodontal Ligament Stromal Cells. *Biomedicines*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051352>
 61. Ashworth, J. C., Mehr, M., Buxton, P. G., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2018, Nov 3). Optimising collagen scaffold architecture for enhanced periodontal ligament fibroblast migration. *J Mater Sci Mater Med*, 29(11), 166. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6175-9>
 62. Balli, U., Cetinkaya, B. O., Keles, G. C., Keles, Z. P., Guler, S., Sogut, M. U., & Erisgin, Z. (2016, Apr). Assessment of MMP-1, MMP-8 and TIMP-2 in experimental periodontitis treated with kaempferol. *J Periodontal Implant Sci*, 46(2), 84-95. <https://doi.org/10.5051/jpis.2016.46.2.84>
 63. Banlue, A., Kaewmuangmoon, J., Janebodin, K., & Tansriratanawong, K. (2024, Feb). Induction of Migration and Collagen Synthesis in Human Gingival Fibroblasts Using Periodontal Ligament Stem Cell Conditioned Medium. *Eur J Dent*, 18(1), 219-227. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1764422>
 64. Barnawi, B. M., Alrashidi, N. S., Albalawi, A. M., Alakeel, N. S., Hamed, J. T.,

- Barashid, A. A., Alduraibi, M. S., Alhussain, G. S., Alghadeer, J. Y., Alarifi, N. A., & Altalhi, A. M. (2023, Dec). Nutritional Modulation of Periodontal Diseases: A Narrative Review of Recent Evidence. *Cureus*, 15(12), e50200. <https://doi.org/10.7759/cureus.50200>
65. Barros, S. P., Williams, R., Offenbacher, S., & Morelli, T. (2016, Feb). Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol 2000*, 70(1), 53-64. <https://doi.org/10.1111/prd.12107>
 66. Beertsen, W. (1979). Remodelling of collagen fibers in the periodontal ligament and the supra-alveolar region. *The Angle Orthodontist*, 49(3), 218-224.
 67. Browne, S., Jha, A. K., Ameri, K., Marcus, S. G., Yeghiazarians, Y., & Healy, K. E. (2018). TGF-beta1/CD105 signaling controls vascular network formation within growth factor sequestering hyaluronic acid hydrogels. *PLoS One*, 13(3), e0194679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194679>
 68. Bunte, K., Hensel, A., & Beikler, T. (2019, Jan). Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. *Fitoterapia*, 132, 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.11.01>
 69. Carrouel, F., Viennot, S., Santamaria, J., Veber, P., & Bourgeois, D. (2016). Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults. *Front Microbiol*, 7, 840. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00840>
 70. Chandra, R. V., Srinivas, G., Reddy, A. A., Reddy, B. H., Reddy, C., Nagarajan, S., & Naveen, A. (2013, Jun). Locally delivered antioxidant gel as an adjunct to nonsurgical therapy improves measures of oxidative stress and periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci*, 43(3), 121-129. <https://doi.org/10.5051/jpis.2013.43.3.121>
 71. Chandran, A., Bhandary, R., Shenoy, N., & Shetty, U. A. (2021, Mar-Apr). Analysis of collagen fibers in human gingival tissues using picrosirius red stain under polarized microscope. *J Indian Soc Periodontol*, 25(2), 106-111. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_152_20
 72. Choi, Y.-S., & Seong, J.-M. (2016). Study on The Oral Health Effects of Natural Extracts Among the IT Age. *The Journal of the Korea institute of electronic communication sciences*, 11(7), 701-706. <https://doi.org/10.13067/jkiecs.2016.11.7.701>
 73. Cirano, F. R., Casarin, R. C., Ribeiro, F. V., Casati, M. Z., Pimentel, S. P., Taiete, T., & Bernardi, M. M. (2016, Nov 28). Effect of Resveratrol on periodontal pathogens during experimental periodontitis in rats. *Braz Oral Res*, 30(1), e128. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0128>

74. Connizzo, B. K., Sun, L., Lacin, N., Gendelman, A., Solomonov, I., Sagi, I., Grodzinsky, A. J., & Naveh, G. R. S. (2021, Feb). Nonuniformity in Periodontal Ligament: Mechanics and Matrix Composition. *J Dent Res*, 100(2), 179-186. <https://doi.org/10.1177/0022034520962455>
75. Cores Ziskoven, P., Nogueira, A. V. B., Eick, S., & Deschner, J. (2024, Oct 5). Apelin Counteracts the Effects of *Fusobacterium nucleatum* on the Migration of Periodontal Ligament Cells In Vitro. *Int J Mol Sci*, 25(19). <https://doi.org/10.3390/ijms251910729>
76. Delbaere, K., Close, J. C., Brodaty, H., Sachdev, P., & Lord, S. R. (2010, Aug 18). Determinants of disparities between perceived and physiological risk of falling among elderly people: cohort study. *BMJ*, 341, c4165. <https://doi.org/10.1136/bmj>.
77. DiSilvestro, R. A., DiSilvestro, D. J., & DiSilvestro, D. J. (2009, Aug). Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. *Phytother Res*, 23(8), 1123-1127. <https://doi.org/10.1002/ptr.2759>
78. Drury, J. L., & Chung, W. O. (2015, Mar). DNA methylation differentially regulates cytokine secretion in gingival epithelia in response to bacterial challenges. *Pathog Dis*, 73(2), 1-6. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu005>
79. Effects of mouth rinsing with foam vitamins and its intake on reduction in oral microorganisms. (2019). *Journal of Korean Society of Dental Hygiene*, 19(3). <https://doi.org/10.13065/jksdh.20190038>
80. Eltay, E. G., Gismalla, B. G., Mukhtar, M. M., & Awadelkarim, M. O. A. (2021, May). *Punica granatum* peel extract as adjunct irrigation to nonsurgical treatment of chronic gingivitis. *Complement Ther Clin Pract*, 43, 101383. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2021.101383>
81. Emmanuel Souza et al., Maresin-1 and Resolvin E1 Promote Regenerative Properties of Periodontal Ligament Stem Cells Under Inflammatory Conditions, 2020
82. Fang, W. L., Jiang, M. J., Gu, B. B., Wei, Y. M., Fan, S. N., Liao, W., Zheng, Y. Q., Liao, S. W., Xiong, Y., Li, Y., Xiao, S. H., & Liu, J. (2018, Oct 20). Tooth loss as a risk factor for dementia: systematic review and meta-analysis of 21 observational studies. *BMC Psychiatry*, 18(1), 345. <https://doi.org/10.1186/s12888-018-1927-0>
83. Franco, C., Patricia, H. R., Timo, S., Claudia, B., & Marcela, H. (2017, Feb 17). Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *Int J Mol Sci*, 18(2). <https://doi.org/10.3390/ijms18020440>

84. Fraser, D., Nguyen, T., & Benoit, D. S. W. (2021, Jun). Matrix Control of Periodontal Ligament Cell Activity Via Synthetic Hydrogel Scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 27(11-12), 733-747. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2020.0278>
85. Freire, J. M. O., Chaves, H. V., Teixeira, A. H., de Sousa, L. H. T., Pinto, I. R., Costa, J., de Sousa, N. A., Pereira, K. M. A., Girao, V. C. C., Ferreira, V. C. S., Dos Santos, J. E. A., Lima, M. A. S., Pimenta, A. T. A., Montenegro, R. C., de Moraes, M. E. A., Pinto, V. P. T., Filho, G. C., & Bezerra, M. M. (2019). Protective effect of *Platymiscium floribundum* Vog. in tree extract on periodontitis inflammation in rats. *PLoS One*, 14(11), e0223800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223800>
86. Gasner, N. S., & Schure, R. S. (20a23). Periodontal disease. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
87. Gay, I. C., Chen, S., & MacDougall, M. (2007, Aug). Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*, 10(3), 149-160. <https://doi.org/10.1111/j.1601-6343.2007.00399.x>
88. Ghaneialvar, H., Soltani, L., Rahmani, H. R., Lotfi, A. S., & Soleimani, M. (2018, Jan). Characterization and Classification of Mesenchymal Stem Cells in Several Species Using Surface Markers for Cell Therapy Purposes. *Indian J Clin Biochem*, 33(1), 46-52. <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0641-x>
89. Ghasempour, M., Moghadamnia, A. A., Abedian, Z., Amir, M. P., Feizi, F., & Gharekhani, S. (2015, Jan-Feb). In vitro viability of human periodontal ligament cells in green tea extract. *J Conserv Dent*, 18(1), 47-50. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.148894>
90. Global oral health status report (WHO, 2022)
91. Gonzalez-Serrano, J., Lopez-Pintor, R. M., Serrano, J., Torres, J., Hernandez, G., & Sanz, M. (2021, Oct). Short-term efficacy of a gel containing propolis extract, nanovitamin C and nanovitamin E on peri-implant mucositis: A double-blind, randomized, clinical trial. *J Periodontal Res*, 56(5), 897-906. <https://doi.org/10.1111/jre.12886>
92. Gonzalez-Serrano, J., Serrano, J., Sanz, M., Torres, J., Hernandez, G., & Lopez-Pintor, R. M. (2023, Feb). Efficacy and safety of a bioadhesive gel containing propolis extract, nanovitamin C and nanovitamin E on desquamative gingivitis: a double-blind, randomized, clinical trial. *Clin Oral Investig*, 27(2), 879-888. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04653-0>
93. Goswami, M., Chaitra, T., Chaudhary, S., Manuja, N., & Sinha, A. (2011, Jul). Strategies for periodontal ligament cell viability: An overview. *J Conserv*

- Dent, 14(3), 215-220. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.85789>
94. Grzesik, W. J., & Narayanan, A. S. (2002). Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(6), 474-484.
 95. Gurkan CG, Keles GC, Kurt S, Ciftci A, Ayas B, Guler S, Cetinkaya BO. Histopathological and biochemical evaluation of paeoniflorin administration in an experimental periodontitis model. *J Oral Sci* 2019, 61(4):554-557.
 96. Haffajee, A. D., Socranksy, S. S., Patel, M. R., & Song, X. (2008, Jun). Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, 23(3), 196-205. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x>
 97. Hajishengallis, G., Kajikawa, T., Hajishengallis, E., Maekawa, T., Reis, E. S., Mastellos, D. C., Yancopoulou, D., Hasturk, H., & Lambris, J. D. (2019). Complement-Dependent Mechanisms and Interventions in Periodontal Disease. *Front Immunol*, 10, 406. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00406>
 98. He, W., You, M., Wan, W., Xu, F., Li, F., & Li, A. (2018, Nov). Point-of-Care Periodontitis Testing: Biomarkers, Current Technologies, and Perspectives. *Trends Biotechnol*, 36(11), 1127-1144. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.013>
 99. Heasman, P. A., Ritchie, M., Asuni, A., Gavillet, E., Simonsen, J. L., & Nyvad, B. (2017, Mar). Gingival recession and root caries in the ageing population: a critical evaluation of treatments. *J Clin Periodontol*, 44 Suppl 18, S178-S193. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12676>
 100. Hudson, D. M., Garibov, M., Dixon, D. R., Popowics, T., & Eyre, D. R. (2017, Dec). Distinct post-translational features of type I collagen are conserved in mouse and human periodontal ligament. *J Periodontal Res*, 52(6), 1042-1049. <https://doi.org/10.1111/jre.12475>
 101. Imber, J. C., Roccuzzo, A., Stahli, A., Saulacic, N., Deschner, J., Sculean, A., & Bosshardt, D. D. (2021, Oct 9). Immunohistochemical Evaluation of Periodontal Regeneration Using a Porous Collagen Scaffold. *Int J Mol Sci*, 22(20). <https://doi.org/10.3390/ijms222010915>
 102. Jacob, S. (2012). Global prevalence of periodontitis: a literature review. *International Arab Journal of Dentistry (IAJD)*, 3(1), 26-30.
 103. Ji, S., Choi, Y. S., & Choi, Y. (2015, Oct). Bacterial invasion and persistence: critical events in the pathogenesis of periodontitis? *J Periodontal Res*, 50(5), 570-585. <https://doi.org/10.1111/jre.12248>
 104. Jia, L., Gu, W., Zhang, Y., Jiang, B., Qiao, X., & Wen, Y. (2018). Activated Yes-Associated Protein Accelerates Cell Cycle, Inhibits Apoptosis, and Delays

- Senescence in Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Int J Med Sci*, 15(11), 1241-1250. <https://doi.org/10.7150/ijms.25115>
105. Jiang, Y., Wang, X., Li, Y., Mu, S., Zhou, S., Liu, Y., & Zhang, B. (2016, May). GGsTOP increases migration of human periodontal ligament cells in vitro via reactive oxygen species pathway. *Mol Med Rep*, 13(5), 3813-3820. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5038>
 106. Jonkman, J. E., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adh Migr*, 8(5), 440-451. <https://doi.org/10.4161/cam.36224>
 107. Kaklamanos, E. G., Nassar, R., Kalfas, S., Al Halabi, M., Kowash, M., Hannawi, H., Hussein, I., Salami, A., Hassan, A., & Senok, A. C. (2019, Sep 8). A single-centre investigator-blinded randomised parallel group clinical trial to investigate the effect of probiotic strains *Streptococcus salivarius* M18 and *Lactobacillus acidophilus* on gingival health of paediatric patients undergoing treatment with fixed orthodontic appliances: study protocol. *BMJ Open*, 9(9), e030638. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-030638>
 108. Kaku, M., & Yamauchi, M. (2014, Oct). Mechano-regulation of collagen biosynthesis in periodontal ligament. *J Prosthodont Res*, 58(4), 193-207. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2014.08.003>
 109. Kaneko, K., Matsuda, S., Muraoka, R., Nakano, K., Iwasaki, T., Tomida, M., Tsujigiwa, H., Nagatsuka, H., & Kawakami, T. (2015). Histological Evaluation of Periodontal Ligament in Response to Orthodontic Mechanical Stress in Mice. *Int J Med Sci*, 12(9), 689-694. <https://doi.org/10.7150/ijms.12883>
 110. Kawamura, M., Yamamoto, T., Yamashiro, K., Kochi, S., Yoshihara-Hirata, C., Ideguchi, H., Aoyagi, H., Omori, K., & Takashiba, S. (2019, Feb). Induction of migration of periodontal ligament cells by selective regulation of integrin subunits. *J Cell Mol Med*, 23(2), 1211-1223. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14023>
 111. Khalifehzadeh S, HaghaniFar S, Jenabian N, Kazemi S, Hajiahmadi M. Clinical and radiographic evaluation of applying 1% metformin biofilm with plasma rich in growth factor (PRGF) for treatment of two-wall intrabony periodontal defects: A randomized clinical trial. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2019, 13(1):51-56.
 112. Kim, E., Jeon, I. S., Kim, J. W., Kim, J., Jung, H. S., & Lee, S. J. (2007, Sep). An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability.

- Oral Dis, 13(5), 495-499. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01328.x>
113. Kim, H. Y., Park, S. Y., & Choung, S. Y. (2018, Sep 5). Enhancing effects of myricetin on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via BMP-2/Smad and ERK/JNK/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Eur J Pharmacol*, 834, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.012>
 114. Kim, I.-S. (2016). Gene Polymorphism of TNF- α in Korean Generalized Aggressive Periodontitis. *Journal of Digital Convergence*, 14(1), 321-326. <https://doi.org/10.14400/jdc.2016.14.1.321>
 115. Kim, J., & Hwang, H.-j. (2018). Association of Periodontitis with Serum Vitamin D Level among Korean Adults. *Journal of Dental Hygiene Science*, 18(4), 210-217. <https://doi.org/10.17135/jdhs.2018.18.4.210>
 116. Kim, J.-H., Kim, A. R., Choi, Y. H., Lee, D.-E., Woo, G.-H., Bak, E.-J., & Yoo, Y.-J. (2017). TNF- α Inhibitor Reduces Odontoclast Formation in Diabetes Rats with Ligature-Induced Periodontitis. *International Journal of Oral Biology*, 42(3), 137-142. <https://doi.org/10.11620/ijob.2017.42.3.137>
 117. Kim, S. E., Kim, T. H., Park, S. A., Kim, W. T., Park, Y. W., Ahn, J. S., Jeong, M., Kim, M. Y., & Seo, K. (2017, Jun 30). Efficacy of horse chestnut leaf extract ALH-L1005 as a matrix metalloproteinase inhibitor in ligature-induced periodontitis in canine model. *J Vet Sci*, 18(2), 245-251. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.2.245>
 118. Kim, Y. G., Lee, S. M., Bae, S., Park, T., Kim, H., Jang, Y., Moon, K., Kim, H., Lee, K., Park, J., Byun, J. S., & Kim, D. Y. (2021, Jan 18). Effect of Aging on Homeostasis in the Soft Tissue of the Periodontium: A Narrative Review. *J Pers Med*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/jpm11010058>
 119. Kisselbach, L., Merges, M., Bossie, A., & Boyd, A. (2009, Jan). CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology*, 59(1), 31-44. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9190-3>
 120. Komada, T., Mitomo, K., Ikarashi, T., Shimono, M., Jung, H.-S., & Muramatsu, T. (2022). Periodontal Ligament Cells Are Involved in the Formation of Intracanal Cementum-Like Tissue After Regenerative Endodontic Procedures: A Mouse in situ Model. *Frontiers in Dental Medicine*, 3. <https://doi.org/10.3389/fdmed.2022.864406>
 121. Komatsu, K., Ideno, H., Shibata, T., Nakashima, K., & Nifuji, A. (2022). Platelet-derived growth factor-BB regenerates functional periodontal ligament in the tooth replantation. *Scientific Reports*, 12(1).

- <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06865-6>
122. Krieger, E., Hornikel, S., & Wehrbein, H. (2013). Age-related changes of fibroblast density in the human periodontal ligament. *Head & face medicine*, 9, 1-4.
 123. Kubra B, Andreas H, Thomas B. Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. *Fitoterapia* 2019, 132:30-39.
 124. Kumada, Y., & Zhang, S. (2010, Apr 22). Significant type I and type III collagen production from human periodontal ligament fibroblasts in 3D peptide scaffolds without extra growth factors. *PLoS One*, 5(4), e10305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010305>
 125. Kurnia, S., Firdaus, R., Harryadi, C., & Krismariono, A. (2022). Inhibitory effect of lemongrass extract (*Cymbopogon citratus*) in supragingival plaque bacterial growth for gingivitis patient: A research study. *Journal of International Oral Health*, 14(3). https://doi.org/10.4103/jioh.jioh_226_21
 126. Lackler, K. P., Cochran, D. L., Hoang, A. M., Takacs, V., & Oates, T. W. (2000, Feb). Development of an in vitro wound healing model for periodontal cells. *J Periodontol*, 71(2), 226-237. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.2.226>
 127. Lee, H. J., Kim, S. J., Park, Y. S., Ko, J., & Cho, H. J. (2019, Aug). Association between semi-solid yogurt intake and periodontitis in Korean adults. *J Periodontal Implant Sci*, 49(4), 206-214. <https://doi.org/10.5051/jpis.2019.49.4.206>
 128. Lee, J., Park, J. C., Jung, U. W., Choi, S. H., Cho, K. S., Park, Y. K., & Kim, C. S. (2014, Jun). Improvement in periodontal healing after periodontal surgery supported by nutritional supplement drinks. *J Periodontal Implant Sci*, 44(3), 109-117. <https://doi.org/10.5051/jpis.2014.44.3.109>
 129. Lee, K., & Kim, J. (2019, May 9). Dairy Food Consumption is Inversely Associated with the Prevalence of Periodontal Disease in Korean Adults. *Nutrients*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/nu11051035>
 130. Lee, S. J. (2018). Relationship of Oral Health-related Behaviors to High-sensitivity CRP: Data from the Sixth (2015) Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Health Informatics and Statistics*, 43(1), 64-69. <https://doi.org/10.21032/jhis.2018.43.1.64>
 131. Lee, S.-H., & Baek, D.-H. (2013). Antibacterial Activity of Hydrogen-rich Water Against Oral Bacteria. *International Journal of Oral Biology*, 38(2),

- 81-85. <https://doi.org/10.11620/ijob.2013.38.2.081>
132. Leira, Y., Iglesias-Rey, R., Gomez-Lado, N., Aguiar, P., Sobrino, T., D'Aiuto, F., Castillo, J., Blanco, J., & Campos, F. (2020, Apr). Periodontitis and vascular inflammatory biomarkers: an experimental in vivo study in rats. *Odontology*, 108(2), 202-212. <https://doi.org/10.1007/s10266-019-00461-3>
 133. Lemes RS, Alves CCF, Estevam EBB, Santiago MB, Martins CHG, Santos TCLD, Crotti AEM, Miranda MLD. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *An Acad Bras Cienc* 2018, 90(2):1285-1292.
 134. Li, L., Zhang, Q., Yang, D., Yang, S., Zhao, Y., Jiang, M., Wang, X., Zhao, L., Liu, Q., Lu, Z., Zhou, X., Gan, Y., & Wu, C. (2023). Tooth loss and the risk of cognitive decline and dementia: A meta-analysis of cohort studies. *Front Neurol*, 14, 1103052. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1103052>
 135. Lifshits, L. A., Rabin, M., Tohar, R., Netti, F., Gabay, M., Sova, M., Bar, D. Z., Weinberg, E., Adler-Abramovich, L., & Gal, M. (2023, May 24). Enhancement of Collagen-I Levels in Human Gingival Fibroblasts by Small Molecule Activation of HIF-1alpha. *J Agric Food Chem*, 71(20), 7829-7835. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c09059>
 136. Lim, W. H., Liu, B., Cheng, D., Williams, B. O., Mah, S. J., & Helms, J. A. (2014, Dec). Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament. *J Periodontal Res*, 49(6), 751-759. <https://doi.org/10.1111/jre.12158>
 137. Lim, W. H., Liu, B., Mah, S. J., Chen, S., & Helms, J. A. (2014, Oct). The molecular and cellular effects of ageing on the periodontal ligament. *J Clin Periodontol*, 41(10), 935-942. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12277>
 138. Liu, C., Mo, L., Niu, Y., Li, X., Zhou, X., & Xu, X. (2017). The Role of Reactive Oxygen Species and Autophagy in Periodontitis and Their Potential Linkage. *Front Physiol*, 8, 439. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00439>
 139. Liu, X., & Li, H. (2024). Global trends in research on aging associated with periodontitis from 2002 to 2023: a bibliometric analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 15, 1374027. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1374027>
 140. M González Begné et al., Clinical effect of a Mexican Sanguinaria extract (*Polygonum aviculare* L.) on gingivitis, 2001
 141. Marini, M. G., Greggi, S. L. A., Passanezi, E., & Sant'Ana, A. C. P. (2004). Gingival recession: prevalence, extension and severity in adults. *Journal of Applied Oral Science*, 12, 250-255.
 142. Martini, A. A. K., & Mahendra, A. N. (2019). Administration of 50% propolis

- ethanolic extract increases the number of gingivitis fibroblast in H2O2-induced rats INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND NANO-MEDICINE FROM NATURAL RESOURCES FOR BIOMEDICAL RESEARCH: 3rd Annual Scientific Meeting for Biomedical Sciences
143. Martini, D., Galli, C., Guareschi, C., Angelino, D., Bedogni, G., Biasini, B., Zavaroni, I., Pruneti, C., Ventura, M., Galli, D., Mirandola, P., Vitale, M., Dei Cas, A., Bonadonna, R. C., Passeri, G., & Del Rio, D. (2018). Claimed effects, outcome variables and methods of measurement for health claims on foods proposed under Regulation (EC) 1924/2006 in the area of oral health. *NFS Journal*, 10, 10-25. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2017.12.001>
 144. Mizukoshi, M., Kaku, M., Thant, L., Kitami, K., Arai, M., Saito, I., & Uoshima, K. (2021, May 7). In vivo cell proliferation analysis and cell-tracing reveal the global cellular dynamics of periodontal ligament cells under mechanical-loading. *Sci Rep*, 11(1), 9813. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89156-w>
 145. Muhammad, T., & Srivastava, S. (2022, Jan 4). Tooth loss and associated self-rated health and psychological and subjective wellbeing among community-dwelling older adults: A cross-sectional study in India. *BMC Public Health*, 22(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-12457-2>
 146. Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Matsuda Y, Sato K, Takahashi N, Nakajima T, Yamazaki K. Brazilian propolis mitigates impaired glucose and lipid metabolism in experimental periodontitis in mice. *BMC Complement Altern Med* 2016, 16(1):329.
 147. Nakamura, T., Yamashita, M., Ikegami, K., Suzuki, M., Yanagita, M., Kitagaki, J., Kitamura, M., & Murakami, S. (2021, Jan 14). Autophagy facilitates type I collagen synthesis in periodontal ligament cells. *Sci Rep*, 11(1), 1291. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80275-4>
 148. Nan, D. N., Everts, V., Ferreira, J. N., Trachoo, V., Osathanon, T., Klincumhom, N., & Pavasant, P. (2023, Jul 18). Alteration of extracellular matrix proteins in atrophic periodontal ligament of hypofunctional rat molars. *BDJ Open*, 9(1), 31. <https://doi.org/10.1038/s41405-023-00155-7>
 149. Nassiri, F., Cusimano, M. D., Scheithauer, B. W., Rotondo, F., Fazio, A., Yousef, G. M., ... & Lloyd, R. V. (2011). Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer research*, 31(6), 2283-2290.
 150. Nielsen SJ, Trak-Fellermeier MA, Joshipura K, Dye BA. Dietary Fiber Intake

- Is Inversely Associated with Periodontal Disease among US Adults. *J Nutr* 2016, 146(12):2530-2536.
151. Oyarzun, A., Arancibia, R., Hidalgo, R., Penafiel, C., Caceres, M., Gonzalez, M. J., Martinez, J., & Smith, P. C. (2010, May). Involvement of MT1-MMP and TIMP-2 in human periodontal disease. *Oral Dis*, 16(4), 388-395. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01651.x>
 152. Palaska, I., Papathanasiou, E., & Theoharides, T. C. (2013, Nov 15). Use of polyphenols in periodontal inflammation. *Eur J Pharmacol*, 720(1-3), 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.047>
 153. Pan, W., Wang, Q., & Chen, Q. (2019, Nov 5). The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci*, 11(3), 30. <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0064-z>
 154. Panduwawala, C. P., Zhan, X., Dissanayaka, W. L., Samaranayake, L. P., Jin, L., & Zhang, C. (2017). In vivo periodontal tissue regeneration by periodontal ligament stem cells and endothelial cells in three-dimensional cell sheet constructs. *Journal of Periodontal Research*, 52(3), 408-418.
 155. Park, J. H., Lee, H., & Yang, W. M. (2018). The effects of *Eclipta Prostrata* L.(*Ecliptae Herba*) on periodontitis rats. *Journal of Korean Medicine*, 39(1), 63-74. <https://doi.org/10.13048/jkm.18007>
 156. Park, S.-N., Lee, D.-K., Lim, Y.-K., Kim, H.-S., Cho, E.-G., Jin, D., Kim, S.-G., & Kook, J.-K. (2012). Antimicrobial Effect of Carvacrol against Cariogenic and Periodontopathic Bacteria. *The Korean Journal of Microbiology*, 48(1), 52-56. <https://doi.org/10.7845/kjm.2012.48.1.052>
 157. Perayil, J., Menon, K. S., Kurup, S., Thomas, A. E., Fenol, A., Vyloppillil, R., Bhaskar, A., & Megha, S. (2015, Jun). Influence of Vitamin D & Calcium Supplementation in the Management of Periodontitis. *J Clin Diagn Res*, 9(6), ZC35-38. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12292.6091>
 158. Peycheva, S., Apostolova, E., Gardjeva, P., Peychev, Z., Kokova, V., Angelov, A., Slavov, A., & Murdjeva, M. (2019). Effect of Bulgarian propolis on the oral microflora in adolescents with plaque-induced gingivitis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.001>
 159. Pham, H., Tonai, R., Wu, M., Birtolo, C., & Chen, M. (2018, May 30). CD73, CD90, CD105 and Cadherin-11 RT-PCR Screening for Mesenchymal Stem Cells from Cryopreserved Human Cord Tissue. *Int J Stem Cells*, 11(1), 26-38. <https://doi.org/10.15283/ijsc17015>

160. Pradeep, A. R., Agarwal, E., Bajaj, P., Naik, S. B., Shanbhag, N., & Uma, S. R. (2012, Sep). Clinical and microbiologic effects of commercially available gel and powder containing *Acacia arabica* on gingivitis. *Aust Dent J*, 57(3), 312-318. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2012.01714.x>
161. Prakash, J., Bhatnagar, V., Nath, S., Pulikkotil, S., & Prajapati, V. K. (2017). Effect of *Punica granatum* Extract Gel on Gingival Crevicular Fluid Levels of Interleukin-1 β , Interleukin-8 and CCL28 Levels: Randomised Controlled Clinical Trial. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2017/31035.10845>
162. Prueksakorn, A., Puasiri, S., Ruangsri, S., Makeudom, A., Sastraruji, T., Krisanaprakornkit, S., & Chailertvanitkul, P. (2016, Dec). The preservative effect of Thai propolis extract on the viability of human periodontal ligament cells. *Dent Traumatol*, 32(6), 495-501. <https://doi.org/10.1111/edt.12292>
163. Puhar, I., Kapudija, A., Kasaj, A., Willershausen, B., Zafiropoulos, G. G., Bosnjak, A., & Plancak, D. (2011, Jun). Efficacy of electrical neuromuscular stimulation in the treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Implant Sci*, 41(3), 117-122. <https://doi.org/10.5051/jpis.2011.41.3.117>
164. Qiu, J., Wang, X., Zhou, H., Zhang, C., Wang, Y., Huang, J., Liu, M., Yang, P., & Song, A. (2020, Feb 3). Enhancement of periodontal tissue regeneration by conditioned media from gingiva-derived or periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells: a comparative study in rats. *Stem Cell Res Ther*, 11(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1546-9>
165. Radermacher, C., Craveiro, R. B., Jahnen-Dechent, W., Beier, J. P., Bulow, A., Wolf, M., & Neuss, S. (2024, Oct 10). Impact of compression forces on different mesenchymal stem cell types regarding orthodontic indication. *Stem Cells Transl Med*, 13(10), 1028-1039. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szae057>
166. Radmand, F., Baseri, M., Farsadbakhsh, M., Azimi, A., Dizaj, S. M., & Sharifi, S. (2022). A Novel Perspective on Tissue Engineering Potentials of Periodontal Ligament Stem Cells. *The Open Dentistry Journal*, 16(1). <https://doi.org/10.2174/18742106-v16-e221006-2021-216>
167. Raj K. Verma, Sunethra Rajapakse, Archana Meka, Clayton Hamrick, Sheela Pola, Indraneel Bhattacharyya, Madhu Nair, Shannon M. Waller, Ikramuddin Aukhil, and Lakshmya Kesavalu. *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* Mixed Sanchez MC, Ribeiro-Vidal H, Esteban-Fernandez A, Bartolome B, Figuero E, Moreno-Arribas MV, Sanz M, Herrera D.

- Antimicrobial activity of red wine and oenological extracts against periodontal pathogens in a validated oral biofilm model. *BMC Complement Altern Med* 2019, 19(1):145.
168. Rajan, T. S., Giacoppo, S., Diomede, F., Ballerini, P., Paolantonio, M., Marchisio, M., Piattelli, A., Bramanti, P., Mazzon, E., & Trubiani, O. (2016, Dec 7). The secretome of periodontal ligament stem cells from MS patients protects against EAE. *Sci Rep*, 6, 38743. <https://doi.org/10.1038/srep38743>
 169. Ramos-Junior, E. S., Dawson, S., Ryan, W., Clinebell, B., Serrano-Lopez, R., Russell, M., Brumbaugh, R., Zhong, R., Goncalves Fernandes, J., Shaddox, L. M., Cutler, C. W., & Morandini, A. C. (2023). The protective role of CD73 in periodontitis: preventing hyper-inflammatory fibroblasts and driving osteoclast energy metabolism. *Front Oral Health*, 4, 1308657. <https://doi.org/10.3389/froh.2023.1308657>
 170. Rios, H. F., Ma, D., Xie, Y., Giannobile, W. V., Bonewald, L. F., Conway, S. J., & Feng, J. Q. (2008, Aug). Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice. *J Periodontol*, 79(8), 1480-1490. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070624>
 171. Sahingur, S. E., & Yeudall, W. A. (2015). Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. *Front Immunol*, 6, 214. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00214>
 172. Saintrain, M. V., & de Souza, E. H. (2012, Jun). Impact of tooth loss on the quality of life. *Gerodontology*, 29(2), e632-636. <https://doi.org/10.1111/j.1741-2358.2011.00535.x>
 173. Sanchez, M. C., Ribeiro-Vidal, H., Esteban-Fernandez, A., Bartolome, B., Figuero, E., Moreno-Arribas, M. V., Sanz, M., & Herrera, D. (2019, Jun 21). Antimicrobial activity of red wine and oenological extracts against periodontal pathogens in a validated oral biofilm model. *BMC Complement Altern Med*, 19(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2533-5>
 174. Sauzay, C., Voutetakis, K., Chatziioannou, A., Chevet, E., & Avril, T. (2019). CD90/Thy-1, a Cancer-Associated Cell Surface Signaling Molecule. *Front Cell Dev Biol*, 7, 66. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00066>
 175. Sha, A. M., & Garib, B. T. (2019). Antibacterial Effect of Curcumin against Clinically Isolated Porphyromonas gingivalis and Connective Tissue Reactions to Curcumin Gel in the Subcutaneous Tissue of Rats. *Biomed Res Int*, 2019, 6810936. <https://doi.org/10.1155/2019/6810936>
 176. Shetty, S., Thomas, B., Shetty, V., Bhandary, R., & Shetty, R. M. (2013, Oct).

- An in-vitro evaluation of the efficacy of garlic extract as an antimicrobial agent on periodontal pathogens: A microbiological study. *Ayu*, 34(4), 445-451. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.127732>
177. Shimono, M., Hashimoto, S., Yamada, S., Abiko, Y., & Inoue, T. (1998). Homeostasis and regeneration of the periodontal ligament. *Oral medicine & pathology*, 3(1), 1-12.
 178. Silva, M. A., Batista, A. U. D., Abreu, M. H. N. G., & Forte, F. D. S. (2020). Impact on the Quality of Life of Older Adults Who Use Inadequate Dental Prostheses: A Cross-Sectional Study. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 20. <https://doi.org/10.1590/pboci.2020.074>
 179. Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernandez, M., & Gamonal, J. (2015, May-Jun). Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci*, 23(3), 329-355. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140259>
 180. Silvana P. Barros, Ray Williams, Steven Offenbacher, Thiago Morelli. Gingival Crevicular as a Source of Biomarkers for Periodontitis. *HHS Public Access* 2016, 70(1): 53-64.
 181. Song, I. S., Han, Y. S., Lee, J.-H., Um, S., Kim, H. Y., & Seo, B. M. (2015). Periodontal Ligament Stem Cells for Periodontal Regeneration. *Current Oral Health Reports*, 2(4), 236-244. <https://doi.org/10.1007/s40496-015-0060-0>
 182. Song, Y., & Chung, J. (2023, Aug 8). Aging Aggravates Periodontal Inflammatory Responses and Alveolar Bone Resorption by Porphyromonas gingivalis Infection. *Curr Issues Mol Biol*, 45(8), 6593-6604. <https://doi.org/10.3390/cimb45080416>
 183. Sorsa, T., Tjaderhane, L., Konttinen, Y. T., Lauhio, A., Salo, T., Lee, H. M., Golub, L. M., Brown, D. L., & Mantyla, P. (2006). Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med*, 38(5), 306-321. <https://doi.org/10.1080/07853890600800103>
 184. Sowmya, S., Chennazhi, K. P., Arzate, H., Jayachandran, P., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2015, Oct). Periodontal Specific Differentiation of Dental Follicle Stem Cells into Osteoblast, Fibroblast, and Cementoblast. *Tissue Eng Part C Methods*, 21(10), 1044-1058. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2014.0603>
 185. Swain GP, Patel S, Gandhi J, Shah P. Development of Moxifloxacin Hydrochloride loaded in-situ gel for the treatment of periodontitis: In-vitro drug release study and antibacterial activity. *J Oral Biol Craniofac Res* 2019, 9(3):190-200.

186. Sweeting LA, Davis K, Cobb CM. Periodontal Treatment Protocol (PTP) for the general dental practice. *J Dent Hyg* 2008, 3:16-26.
187. Szasz, C., Pap, D., Szebeni, B., Bokrossy, P., Orfi, L., Szabo, A. J., Vannay, A., & Veres-Szekely, A. (2023, Dec 13). Optimization of Sirius Red-Based Microplate Assay to Investigate Collagen Production In Vitro. *Int J Mol Sci*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/ijms242417435>
188. Taba M Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic Biomarkers for Oral and Periodontal Diseases. *Dent Clin North Am* 2005, 49(3):551-571
189. Tabari, Z. A., Azadmehr, A., Tabrizi, M. A., Hamissi, J., & Ghaedi, F. B. (2013, Oct). Salivary soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in periodontal disease and health. *J Periodontal Implant Sci*, 43(5), 227-232. <https://doi.org/10.5051/jpis.2013.43.5.227>
190. Takahashi, K., Nango, H., Ushijima, M., Takashima, M., Nakamoto, M., Matsutomo, T., Jikihara, H., Arakawa, N., Maki, S., Yabuki, A., Endo, Y., & Yamato, O. (2023). Therapeutic effect of aged garlic extract on gingivitis in dogs. *Front Vet Sci*, 10, 1277272. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1277272>
191. Takaya, T., Mimura, H., Matsuda, S., Nakano, K., Tsujigiwa, H., Tomida, M., Okafuji, N., Fujii, T., & Kawakami, T. (2015). Cytological Kinetics of Periodontal Ligament in an Experimental Occlusal Trauma Model. *Int J Med Sci*, 12(7), 544-551. <https://doi.org/10.7150/ijms.12217>
192. Tan, K., Zhu, H., Zhang, J., Ouyang, W., Tang, J., Zhang, Y., Qiu, L., Liu, X., Ding, Z., & Deng, X. (2019). CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity. *Stem Cells Int*, 2019, 8717694. <https://doi.org/10.1155/2019/8717694>
193. Thant, L., Kaku, M., Kakihara, Y., Mizukoshi, M., Kitami, M., Arai, M., Kitami, K., Kobayashi, D., Yoshida, Y., Maeda, T., Saito, I., Uoshima, K., & Saeki, M. (2022). Extracellular Matrix-Oriented Proteomic Analysis of Periodontal Ligament Under Mechanical Stress. *Front Physiol*, 13, 899699. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.899699>
194. Tomokiyo, A., Wada, N., & Maeda, H. (2019, Aug 1). Periodontal Ligament Stem Cells: Regenerative Potency in Periodontium. *Stem Cells Dev*, 28(15), 974-985. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0031>
195. Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018, Jun). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S159-S172. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>

196. Trejo Iriarte, C. G., Ramírez Ramírez, O., Muñoz García, A., Verdín Terán, S. L., & Gómez Clavel, J. F. (2017). Isolation of periodontal ligament stem cells from extracted premolars. Simplified method. *Revista odontológica mexicana*, 21(1), 13-21.
197. Tsou, S. H., Hu, S. W., Yang, J. J., Yan, M., & Lin, Y. Y. (2019, Sep 16). Potential Oral Health Care Agent from Coffee Against Virulence Factor of Periodontitis. *Nutrients*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/nu11092235>
198. Varela-Lopez, A., Navarro-Hortal, M. D., Giampieri, F., Bullon, P., Battino, M., & Quiles, J. L. (2018, May 20). Nutraceuticals in Periodontal Health: A Systematic Review on the Role of Vitamins in Periodontal Health Maintenance. *Molecules*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/molecules23051226>
199. Villalobos, V., Garrido, M., Reyes, A., Fernandez, C., Diaz, C., Torres, V. A., Gonzalez, P. A., & Caceres, M. (2022). Aging envisage imbalance of the periodontium: A keystone in oral disease and systemic health. *Front Immunol*, 13, 1044334. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1044334>
200. Wang, Y., Andrukhov, O., & Rausch-Fan, X. (2017). Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis. *Front Physiol*, 8, 910. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00910>
201. Wang, Y., Fan, Q., Xu, Y., Zeng, F., Liu, X., Zhao, D., Zhang, L., & Bai, G. (2022, Aug 5). Effect of Eucommia water extract on gingivitis and periodontitis in experimental rats. *BMC Oral Health*, 22(1), 326. <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02353-5>
202. Weber, J., Scholz, K. J., Schenke, I. M., Pfab, F., Cieplik, F., Hiller, K. A., Buchalla, W., Sahm, C., Kirschneck, C., & Paddenberger-Schubert, E. (2024, Apr 25). Randomized controlled clinical trial on the efficacy of a novel antimicrobial chewing gum in reducing plaque and gingivitis in adolescent orthodontic patients. *Clin Oral Investig*, 28(5), 272. <https://doi.org/10.1007/s00784-024-05669-4>
203. Wen, S., Zheng, X., Yin, W., Liu, Y., Wang, R., Zhao, Y., Liu, Z., Li, C., Zeng, J., & Rong, M. (2024, Oct 31). Dental stem cell dynamics in periodontal ligament regeneration: from mechanism to application. *Stem Cell Res Ther*, 15(1), 389. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-04003-9>
204. Widen, C., Coleman, M., Criten, S., Karlgren-Andersson, P., Renvert, S., & Persson, G. R. (2015, May 11). Consumption of bilberries controls gingival inflammation. *Int J Mol Sci*, 16(5), 10665-10673. <https://doi.org/10.3390/ijms160510665>

205. Yadav SK, Khan G, Mishra B. Advances in patents related to intrapocket technology for the management of periodontitis. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2015, 9(2):129-145.
206. Yu, L., Zhou, C., Wei, Z., & Shi, Z. (2019, Nov). Effect of combined periodontal-orthodontic treatment on NOD-like receptor protein 3 and high mobility group box-1 expressions in patients with periodontitis and its clinical significance. *Medicine (Baltimore)*, 98(44), e17724. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017724>
207. Yuki, O., Furutani, C., Mizota, Y., Wakita, A., Mimura, S., Kihara, T., Ohara, M., Okada, Y., Okada, M., & Nikawa, H. (2019, Jul 29). Effect of bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* L8020 on periodontal disease in individuals with intellectual disability: a randomized clinical trial. *J Appl Oral Sci*, 27, e20180564. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0564>
208. Yunji Wang et al., Low-intensity pulsed ultrasound promotes periodontal ligament stem cell migration through TWIST1-mediated SDF-1 expression, 2018
209. Zhang, X., Han, N., Li, G., Yang, H., Cao, Y., Fan, Z., & Zhang, F. (2018, Jun 12). Local icariin application enhanced periodontal tissue regeneration and relieved local inflammation in a minipig model of periodontitis. *Int J Oral Sci*, 10(2), 19. <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0020-3>
210. Zhang, X., Yuan, X., Xu, Q., Arioka, M., Van Brunt, L. A., Shi, Y., Brunski, J., & Helms, J. A. (2019, Mar). Molecular Basis for Periodontal Ligament Adaptation to In Vivo Loading. *J Dent Res*, 98(3), 331-338. <https://doi.org/10.1177/0022034518817305>
211. Zhu, L., Tang, Z., Hu, R., Gu, M., & Yang, Y. (2023, Nov 2). Ageing and Inflammation: What Happens in Periodontium? *Bioengineering (Basel)*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/bioengineering10111274>

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서) - 잇몸 건강 관련 -

발 행 인 : 강석연

편 집 위 원 장 : 이순호

편 집 위 원 : 한규홍, 최원영, 박유경, 김미옥, 김효진, 이재황,
조혜진, 안정선, 홍예원, 양윤지, 김유경, 전해련,
김기옥, 최아영, 유수현, 손문정, 장시현, 김하정,
김민주

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2026년 8월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구과
(043-719-4428)

건강기능식품 기능성 평가 가이드 (민원인 안내서)

잇몸 건강 관련



【부패. 공익신고】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 국민신문고 > 부패.공익신고” 코너
- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고센터 > 부패.공익신고 상담” 코너