

The Effects of Sex Hormones on the Expression of ODF/OPG in Human Gingival Fibroblast and Periodontal Ligament Cell at Serum Concentration During Pregnancy

Ji-Yearn Shin¹, Dong-Heon Baek^{2,3}, and Soo-Boo Han¹

¹Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Korea

²Dept. of Oral Microbiology & Immunology, ³Dental Research Institute, College of Dentistry, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received September 22, 2005 ; Accepted September 28, 2005)

Periodontitis is a chronic infectious disease that leads to the destruction, one of the major cause of tooth loss in human. Osteoclast Differentiation Factor(ODF), also called as Receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL), a surface-associated ligand on bone marrow stromal cells and osteoblasts, activates its cognate receptor RANK on osteoclast progenitor cells, which leads to differentiation of these mononucleated precursor cells. Osteoprotegerin(OPG), a decoy receptor, is released from stromal cells and osteoblasts to inhibit the interaction between RANKL and RANK. The experiment for the effect of pregnancy on gingival health showed greater gingival inflammation and edema during pregnancy, despite similar plaque index. There should be many factors affecting the periodontal health in pregnancy. In this experiment, we examined the direct effects of sex hormones(estrogen and progesterone) on the ODF/OPG expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells at the serum concentration of pregnancy. The ratio was high in the 1st trimester of pregnancy by estrogen and in the late 2nd trimester by progesterone. Therefore, the local periodontal destruction might be accelerated by these hormonal effect on the periodontal cells.

Keywords: OPG, ODF, Pregnancy, Gingival fibroblast, Periodontal ligament cell, Estrogen, Progesterone

*Corresponding author: Dong-Heon Baek, DDS, Ph.D., Department of Oral Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Dankook University, Anseo-Dong, Cheonan, 330-714, Choongnam, Korea, Tel:+82-41-550-1997, E-mail: micro94@dku.edu

서 론

치주염은 만성 감염에 대한 염증반응과 숙주의 면역반응의 결과로 나타나는 감염성 질환이다(Clark and Loe, 1993). 치주염의 발생에는 다양한 요인이 작용하며, 치주염과 치은염을 구분하는 가장 중요한 특징으로는 치조골의 파괴를 야기하는 것이라 할 수 있으며, 이로 인해 치아의 상실을 초래하기도 한다(Brown *et al.*, 1990; Eklund and Burt, 1994). 최근의 연구에 의하면 치주질환과 같은 만성 구강 감염이 조산등을 야기할 수 있다고 알려져 있다(Offenbacher *et al.*, 1996; Jeffcoat *et al.*, 2001).

Osteoprotegerin(OPG/OCIF/TR1)는 TNF 수용체 군에 속하는 것으로, 조골세포와 기저세포(stromal cells)에서 분비하는 decoy receptor로서 파골세포의 분화에 있어서 RANK/RANKL의 상호작용을 방해하여 파골세포의 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다(Simonet *et al.*, 1997; Tsuda *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1998). Osteoclast Differentiation Factor(ODF/RANKL/TRANSC/OPGL)는 골수기저세포(bone marrow stromal cells)와 조골세포에서 분비하는 인자로서, 파골세포의 표면에 있는 RANK와 결합하여 분화를 촉진하는 역할을 한다(Yasuda *et al.*, 1998; Lacey *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1997). 치주조직에서의 RANKL의 발현은 주로 치아의 맹출이나 교정력에 의한 치아의 이동시에 잘 나타나는 것으로 알려져 있으며(Fukushima *et al.*, 2003; Lossdorfer *et al.*, 2002; Oshiro *et al.*, 2002), 치주염과 같은 경우에도 증가하는 것으로 알려져 있다(Liu *et al.*, 2003; Mogi *et al.*, 2004).

치은에는 에스트로젠, 프로게스테론과 안드로젠의 수용

체가 존재함이 밝혀져서 치은이 성호르몬의 표적 기관임을 암시하였으나 그 작용기전은 아직 확실하지 않다(Vittek *et al.*, 1982). Styrt와 Sugarman은 임신이나 에스트로겐의 복용과 월경이 세균, 기생충 및 바이러스 감염의 빈도와 강도를 증가시키며, 고농도의 에스트로겐의 존재는 특정 감염에 대한 민감도를 높인다고 보고하였으며(Styrt and Sugarman, 1991), 임신기, 사춘기 그리고 월경 주기에 따라 치은염의 악화를 가져오고, 특히 여성 호르몬의 농도가 높은 임신 기간 중에는 치아 동요도와 치주낭 깊이가 증가되는 것 등을 그 예로 들 수 있다(Rateitschak, 1967).

임신기간 중에는 이미 존재하던 치은염이 더 심해지는 경향이 있으며, O'Neil의 생체의 환경에서 행한 연구에 의하면, 임신 중에는 산모의 T세포의 반응성이 저하되었으며(O'Neil, 1979), 이러한 세포면역체계의 약화가 치태에 대한 치은조직의 반응을 변화시키는데 기여할 것으로 생각된다. Loza 등은 에스트로겐은 cytokine의 생성을 감소시켜서 조골세포의 활성을 증가시키나, 폐경기 여성에서는 에스트로겐의 감소로 cytokine의 생성이 증가되어 파골세포의 활성이 증가되고 따라서 골다공증 및 치조골 흡수를 증가시키는 것 같다고 했다(Loza *et al.*, 1996).

본 실험에서는 여성 호르몬 중에서 에스트로겐과 프로게스테론을 각각 임신기의 농도로 처리하여 치주조직의 치은섬유아세포와 치주인대세포의 OPG와 ODF의 발현에 미치는 직접적인 영향을 확인하고자 한다.

실험재료 및 방법

세포배양

건강한 사람의 치은으로부터 치은 섬유아세포를 추출하여 10% 송아지혈청을 첨가한 α -MEM 배양액을 사용하여 37°C 배양기에서 5% CO₂ 존재 하에서 배양하였다. 8세대 계대배양한 치은 섬유아세포를 35 mm² 배양접시에 1 × 10⁴ 개씩 분주하여 4개의 군으로 나누어 Table 1에서와 같이 각각 임신기에서의 프로게스테론(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 농도와 에스트로겐(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 농도에서 4개의 농도를 선택하여 실험군으로 하고, 아무런 처리도 하지 않은 대조군으로 나누었다(O'Neil, 1979; Tulchinsky *et al.*, 1972). 또, 동일한 방법으로 건강한 사람으로부터 발치한 치아로부터 치주인대세포를 추출하고, 3세대 계대배양하여 동일한 방법과 조건으로 실험군과 대조군을 나누어 실험하였다. 배양액 상층액은 ELISA법을 이용하여 OPG의 분비량을 측정하였고, 세포에서 총 RNA를 추출하여 RT-PCR법을 사용하여 ODF의 발현량을 측정하였다.

총 RNA 추출

치은섬유아세포와 치주인대세포 각각의 총 RNA를 RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)와 TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA)를 이용하여 제조사의 지시대로 추출하였다. 간단히 기술하면, 각 세포를 10 ml의 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 후, TRI reagent 용액을 넣어 10분간 섞어주고 나서, TRI reagent 1 ml당 200 μ l의 chloroform을 넣어 주었다. 혼합액을 잘 흔들어서 섞어준 후, 13,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액에 동량의 isopropanol을 넣고 -20°C에서 최소 1시간 동안 총 RNA를 침전시키고 4°C에서 15분간 13,000 rpm으로 원심 분리하여 총 RNA pellet을 얻었다. RNA pellet을 75% ethanol로 세척하고 공기 중에서 말린 후, DEPC 처리한 증류수에 녹여 사용하였다. 얻어진 총 RNA의 양을 spectrophotometer를 사용하여 측정하였고, 총 RNA의 온전성을 확인하기 위해 1.2% agarose-formaldehyde 겔 상에서 전기영동하여 ethidium bromide 용액으로 염색하여 확인하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

총 RNA를 주형으로 하여 2.5 μ M의 무작위 9개의 염기 프라이머, 1 mM의 dNTPs, 1 unit의 RNase inhibitor, 5 mM의 MgCl₂와 5 units의 avian myeloblastosis virus 역전사효소 XL을 AMV-RT 완충액(TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan)에 넣어 50 μ l가 되도록 섞어 역전사반응을 시행하였다. 역전사반응은 30°C에서 10분, 50°C에서 30분, 99°C에서 5분을 진행한 후, 5°C에서 5분을 진행하였다.

반응액 7 μ l와 각각 40 pmol의 순방향, 역방향 프라이머, 2.5 mM의 MgCl₂ 그리고 5 unit의 Taq polymerase (Takara Ex taq)를 최종 부피가 100 μ l가 되도록 1x PCR 완충액에 혼합하였다. 실험에 사용된 각 프라이머의 염기 서열은 Table 2와 같다. 연쇄중합반응의 조건은 50°C에서 2분간 반응한 후, 95°C에서 10분간 반응시키고, 95°C, 15초와 60°C 1분의 반응을 40회 반복한 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 15초, 95°C에서 15초간 반응시켜, 비특이적 증폭이 일어나지 않도록 하였다. 반응 산물은 1% 아가로스 겔 상에서 전기영동하여 확인하였다. 또한 LAS-1000plus (Fujifilm, Valhalla, NY, USA)을 이용하여 ODF의 발현량을 측정하고, 대조군에 대한 상대 발현량을 측정 하였다.

hOPG ELISA

hOPG ELISA plate는 the capture antibody(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 실험실에서 제작하여 실험하였다. 100 ml의 시료 혹은 표준용액을 사용하여 실험하였고, biotinylated detection antibody

Table 1. The Concentration of Estrogen and Progesterone of Experimental Group(Tulchinsky *et al.*, 1972)

A. Estrogen	
	Pregnancy (ng/ml)
EP1	2.0
EP2	4.0
EP3	8.0
EP4	16.0
B. Progesterone	
	Pregnancy (ng/ml)
PP1	25.0
PP2	50.0
PP3	100.0
PP4	200.0

EP: Estrogen in Pregnancy
PP: Progesterone in Pregnancy

Table 2. Oligonucleotides sequences used in PCR reaction of ODF

Name	Sequence
hODF forward	5'-GGITCCCATAAAGTGAGTCTG-3'
hODF reverse	5'-TTAAAAGCCCCAAAGTATGTT-3'
GAPDH forward	5'-TGAGAACGGGAAGCTTGTCA-3'
GAPDH reverse	5'-GGAAGGCCATGCCAGTGA-3'

(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 검출하였다. 4회 세척한 후, 30분 이내에 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 hOPG의 분비량을 확인하고, 대조군에 대한 상대값을 구하여 상대 분비량을 확인하였다.

실험결과 및 고찰

사람의 치은 섬유아 세포에 에스트로젠을 임신기의 농도로 처리한 결과, OPG와 ODF 모두 처리하지 않은 대조군보다 상대 발현량이 증가하였다(Figure 1). 하지만, OPG와 ODF의 대조군에 대한 상대 발현량(ODF/OPG)은 8 ng/ml의 농도에서만 1.57배로 ODF의 발현이 훨씬 많아서 골대사의 측면에서 볼 때 파골세포의 활성이 증가할 것으로 기대된다.

또한, 동일하게 임신기 농도의 프로게스테론을 치은 섬유아세포에 처리하였을 경우, 특이하게 증가하는 양상을 보이지는 않았으나, 고농도로 처리하였을 경우, ODF의 발현량이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2).

치주인대 세포에 임신기 농도의 에스트로젠을 처리한 경우, ODF의 발현량은 농도 의존적으로 증가함을 볼 수 있으나, OPG의 경우는 특별히 증가하지는 않았다(Figure 3). 또한 ODF와 OPG의 상대 발현량은 농도 의존적으로 ODF의 발현량이 많아짐을 보였으며, 이로 미루어볼 때, 에스트로젠의 농도가 높아질수록 파골세포의 활성이 우세한 방향으로 진행될 것으로 기대된다.

반면에, 치주인대세포에 임신기 농도의 프로게스테론을 처리한 경우는 전체 농도 범위에서 ODF와 OPG의 상대 발현량(ODF/OPG)이 1 이하로 OPG가 더 많이 분비되는 것으로 확인되어, 파골세포 활성의 억제로 나타날 것으로 기대된다(Figure 4).

이번 실험에서는 각각의 독립적인 효과에서는 에스트로

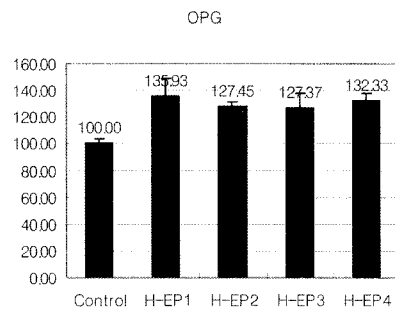
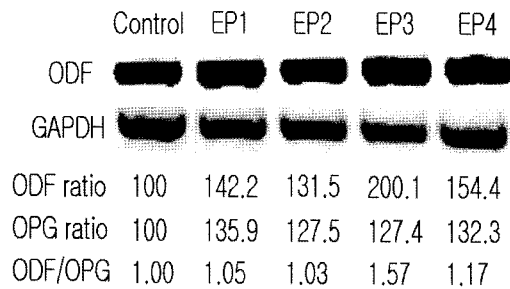


Fig. 1. Relative expression level of OPG and ODF in human gingival fibroblast treated with serum concentration of estrogen during pregnancy.

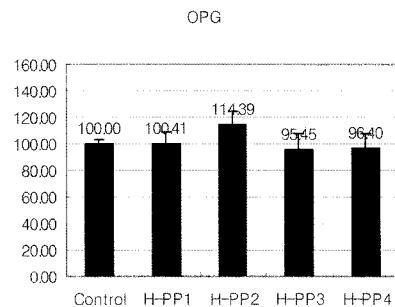
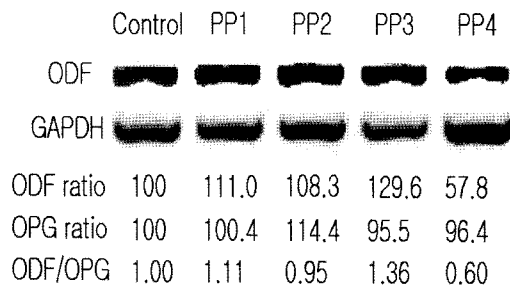


Fig. 2. Relative expression level of OPG and ODF in human gingival fibroblast treated with serum concentration of progesterone during pregnancy.

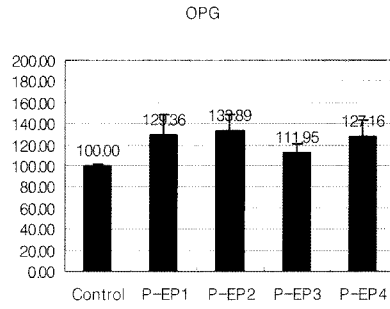
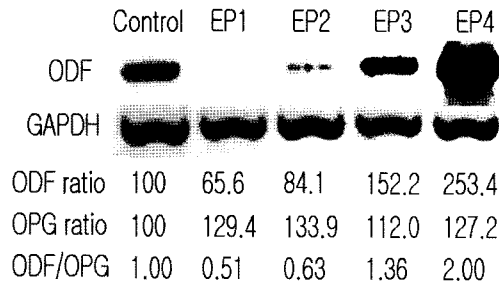


Fig. 3. Relative expression level of OPG and ODF in human periodontal ligament cell treated with serum concentration of estrogen during pregnancy.

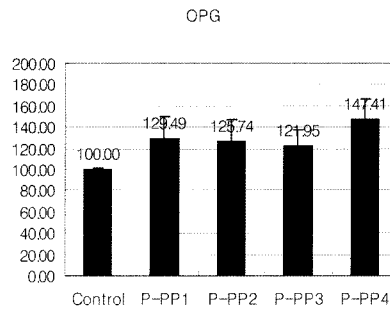
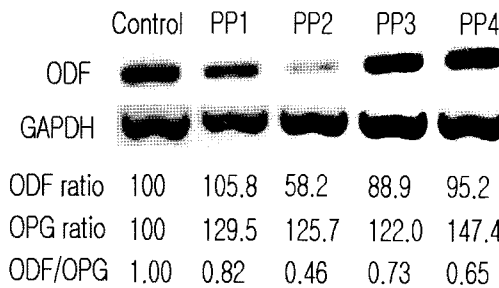


Fig. 4. Relative expression level of OPG and ODF in human periodontal ligament cell treated with pregnant serum concentration of progesterone.

겐에서는 치은섬유아세포는 전반적으로 ODF의 발현이 상당히 증가하였으나, 그에 따른 OPG의 발현도 많이 증가하여 ODF/OPG의 비율은 1-1.5정도를 나타내었다. 반면 치주인대세포에 대한 영향에서는 농도가 증가할수록 ODF의 발현이 상당히 증가하여 고농도에서는 ODF/OPG의 비율이 2까지 나타남을 확인할 수 있었다. 이로 미루어볼 때, ODF/OPG의 비율이 증가하여 국소적인 파골세포의 분화를 촉진할 것으로 사료된다. 그러나 일반적인 에스트로겐의 효과는 폐경기의 여성에서의 호르몬 치료에서 보듯이 골대사에서 골질의 유지에 중요하다고 알려져 있다(Norderyd *et al.*, 1993, Reinhardt *et al.*, 1999). 그러나 현재 알려진 임신기에서의 에스트로겐의 농도와 ODF/OPG 상대 발현비율을 비교하면, 주로 임신 초기에 비율이 증가하는 것으로 나타났으며, 중기 이후에는 큰 영향이 없는 것으로 나타났다(Figure 5).

반면, 프로게스테론의 경우는 알려진 임신기의 혈중 농도 그래프와 비교하면 치은섬유아세포에서는 고농도에서, 치주인대세포에서 중진농도에서만 ODF의 발현량을 감소시켰을 뿐, 전반적으로 큰 영향은 없었으며, 전체적인 ODF/OPG비율은 1 이하로 나타나 대체로 파골세포의 분화를 낮추는 역할을 할 것으로 기대된다(Figure 6).

이전에 알려진 바로는 건강한 구강조직을 가진 사람에서 ODF/OPG의 비율은 대략 0.79로 조사되었으며, 치주염을 가진 사람에서는 1 이상으로 증가함을 나타냈다(Liu *et al.*, 2003). 또한 중등도의 치주염을 가진 사람에서

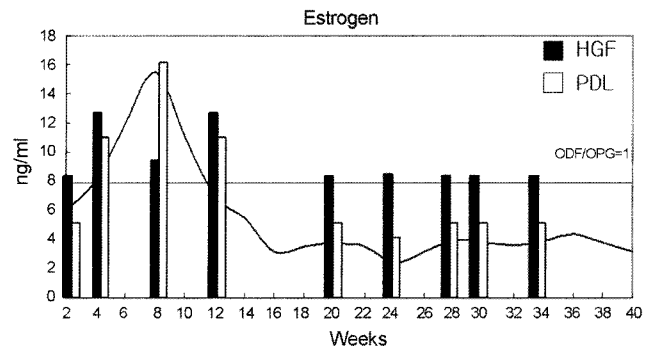


Fig. 5. The ratio of ODF/OPG compared with the serum concentration of Estrogen during pregnancy.

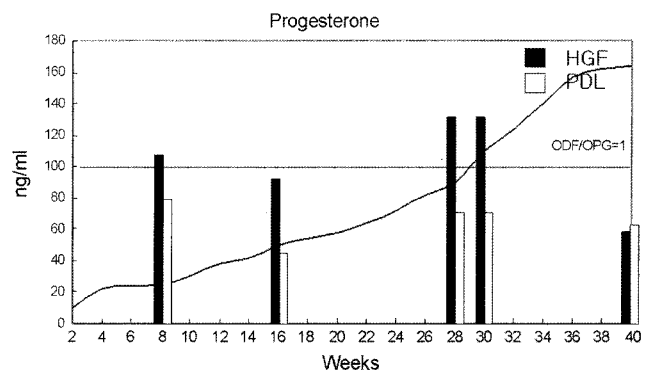


Fig. 6. The ratio of ODF/OPG compared with the serum concentration of Progesterone during pregnancy.

OPG와 ODF 모두 건강하거나 혹은 고도의 치주염을 가진 사람보다 낮게 발현되는 것으로 나타나 중등도의 치주염에서 국소적 골 파괴가 활발하게 일어남을 알 수 있다 (Mogi *et al.*, 2004). 이번 실험에서는 전반적으로 OPG, ODF 모두 대조군보다 발현이 증가된 것으로 나타났으며, 치주인대세포에 프로게스테론을 처리한 군과 치주인대세포에 저농도의 에스트로겐을 처리한 군에서만 ODF의 발현이 다소 감소한 것으로 나타났다.

일반적으로 에스트로겐의 경우, 정상적인 성인 여성의 생리주기에서는 배란일 전에는 100 pg/ml 이하의 농도를 유지하다가 서서히 증가하여 배란일 직전에 350 pg/ml 까지 상승하였다가 감소하여 100-240 pg/ml의 농도를 유지한다고 알려져 있다(O'Neil, 1979; Tulchinsky *et al.*, 1972). 프로게스테론도 배란일 전에는 2 ng/ml 이하의 농도를 유지하다가 배란일을 전후로 상승을 하여 배란일 이후에 10 ng/ml 까지 이른 후 다시 2 ng/ml이하로 감소한다고 알려져 있다. 이러한 혈중 농도는 임신을 하면서 급격하게 증가하는 것으로 알려져 있으며, 이번 실험에서 사용한 각 호르몬의 최저치는 정상적인 생리주기상의 농도보다 월등히 많은 양으로 생리주기에 따른 ODF/OPG 분비에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 정리하면, 에스트로겐에 있어서는 치은 섬유아세포와 치주인대세포 모두 임신 초기에 ODF/OPG의 비율을 증가시키는 것으로 나타나 임신 초기의 국소적 치주질환에 관여할 것으로 사료된다. 반면 프로게스테론에 있어서는 치은 섬유아세포에서만 임신 중기 말에서 비율을 증가시키는 것으로 나타났다. 임신기의 구강 건강에 영향을 미치는 요소는 다양하지만, 이번 실험은 각 여성호르몬이 치주조직을 구성하는 중요한 세포인 치은 섬유아세포와 치주인대세포에서의 OPG와 ODF의 발현에 미치는 직접적인 영향을 확인한 것으로 에스트로겐은 임신 초기, 프로게스테론은 임신 중기 말에 국소적인 치주질환과 관련이 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

This study has been supported by a grant R05-2002-000-00235-0 from Korea Science and Engineering Foundation.

참고문헌

Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D. and Galibert, L.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**:175-179, 1997.

- Brown, L.J., Oliver, R.C. and Loe, H.: Evaluating periodontal status of US employed adults. *J Am Dent Assoc.* **121**:226-232, 1990.
- Clark, W.H. and Löe, H.: Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontol.* **2000** 2:72-82, 1993.
- Eklund, S.A. and Burt, B.A.: Risk factors for total tooth loss in the United States; longitudinal analysis of national data. *J Public Health Dent.* **54**:5-14, 1994.
- Fukushima, H., Kajiya, H., Takada, K., Okamoto F. and Okabe, K.: Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological non-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci.* **111**:346-352, 2003.
- Jeffcoat, M.K., Geurs, N.C., Reddy, M.S., Cliver, S.P., Goldener, R.L. and Hauth, J.C.: Periodontal infection and preterm birth; Results of a prospective study. *J Am Dent Assoc.* **132**:875-880, 2001.
- Kwon, B.S., Wang, S., Udagawa, N., Haridas, V., Lee, Z.H., Kim, K.K., Oh, K.O., Greene, J., Li, Y., Su, J., Gentz, R., Aggarwal, B.B. and Ni, J.: TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J.* **12**:845-854, 1998.
- Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. and Boyle, W.J.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* **93**:165-176, 1998.
- Liu, D., Xu, J.K., Figliomeni, L., Huang, L., Pavlos, N.J., Rogers, M., Tan, A., Price, P. and Zheng, M.H.: Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med.* **11**:17-21, 2003.
- Lossdorfer, S., Gotz, W. and Jager, A.: Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor κ B(RANK) and its ligand(RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int.* **71**:45-52, 2002.
- Loza, J.C., Carpio, L.C. and Dziak, R.: Osteoporosis and its relationship to oral bone loss. *Curr Opin Periodontol.* **3**:27-33, 1996.
- Mogi, M., Ootogoto, J., Ota, N. and Togari, A.: Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res.* **83**:166-169, 2004.
- Offenbacher, S., Katz, V., Fertik, G., Collins, J., Boyd, D., Maynor, G., McKaig, R. and Beck, J.: Periodontal infection as a possible risk factor for preterm bow birth weight. *J Periodontol.* **67**:1103-1113, 1996.
- O'Neil, TCA.: Maternal T-Lymphocyte response and gingivitis in pregnancy. *J Periodont.* **50**:178-184, 1979.
- O'Neil, TCA.: Plasma female sex hormone levels and gingivitis in pregnancy. *J Periodont.* **50**:279-282, 1979.
- Oshiro, T., Shiotani, A., Shibasaki, T and Sasaki T.: Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice.

- Anat Rec. **266**:218-225, 2002.
- Rateitschak, K.H.: Tooth mobility changes during pregnancy. *J Peridont Res.* **2**:199-206, 1967.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. and Boyle, W.J.: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* **89**:309-319, 1997.
- Styrt, B. and Sugarman, B.: Estrogens and infection. *Rev Infect Dis.* **13**:1139-1150, 1991.
- Tan, K.B., Harrop, J., Reddy, M., Young, P., Terrett, J., Emery, J., Moore, G. and Truneh, A.: Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene.* **204**:35-46, 1997.
- Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T. and Higashio, K.: Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **234**:137-142, 1997.
- Tulchinsky, D., Hobel, C.J., Yeager, E. and Marshall, J.R.: Plasma estrone, estradiol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* **112**(8):1095-1100, 1972.
- Vitek, J., Hernandez, M.R., Wennk, E.J., Rappaport, S.C. and Southren, A.L.: Specific estrogen receptors in human gingiva. *J Clin Endocrinol Metab.* **54**:608-612, 1982.
- Vitek, J., Munnangi, P.R., Gordon, G.G., Rappaport, S. and Southren, A.L.: Progesterone receptors in human gingiva. *IRCS Med Sci.* **10**:381-384, 1982.
- Wong, B.R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlicki, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F.S. 3rd., Frankel, W.N., Lee, S.Y. and Choi, Y.: TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem.* **272**:25190-25194, 1997.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. and Suda, T.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:3597-3602, 1998.