

여성 호르몬의 변화가 치은 섬유아세포와 치주인대세포의 교원질 분해 효소의 활성화에 미치는 영향

신지연 · 이철우 · 한수부

서울대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치은의 결합조직은 건조중량의 50% 이상이 교원질로 구성되며, 골은 유기질의 90% 이상이 교원질로 구성되어있다. 이러한 결합조직의 점진적인 상실은 일차적으로는 치태에 의한 염증성 치주질환에 의한 것이고, 따라서 최근에 이러한 교원질의 상실에 영향을 미치는 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

구강 점막은 생식기 점막과 발생학적 기원이 같고, 또한 여성 호르몬에 대한 수용체가 존재하는 것으로 알려져 있으므로, 치은 조직은 여성 호르몬의 변화에 대해 반응을 보일 것으로 추측된다. El Attar 등¹⁾은 생체의 환경(*in vitro*)에서 정상 치은, 염증 치은에서 에스트로겐과 프로게스테론 모두 대사가 일어남을 관찰했으며, Formicola 등^{2,3)}은 자궁을 적출한 백서의 피하에 ³H-estradiol과 ³H-progesterone을 주입했을 때, 자궁보다 치은 조직에 더 다량이 축적됨을 관찰했고, 이는 치은에도 에스트로겐과 프로게스테론의 수용체가 존재함을 의미한다고 하였다. 치은에는 에스트로겐, 프로게스테론과 안드로겐의 수용체가 존재함이 밝혀져서 치은이 성호르몬의 표적 기관임을 암시하였으나 그 작용기전은 아직 확실하지 않다^{4,5)}. Styr와 Sugarman⁶⁾은 임신이나 에스트로겐의 복용과 월경이 세균, 기생충 및 바이러스 감염의 빈도와 강도를 증가시키며, 고농도의 에스트로겐의 존

재는 특정 감염에 대한 민감도를 높인다고 보고하였으며, 임신기, 사춘기 그리고 월경 주기에 따라 치은 염의 악화를 가져오고, 특히 여성 호르몬의 농도가 높은 임신 기간 중에는 치아 동요도와 치주낭 깊이가 증가되는 것 등을 그 예로 들 수 있다⁷⁾.

여성 호르몬이 치주 조직에 영향을 미치는 기전을 규명하려는 노력이 예전부터 있어왔으나, 확실한 기전은 아직 밝혀져 있지 않다. 치은 대식세포의 활성화(염색(vital staining)을 통한 동물 실험 결과, Lindhe 등^{8,9)}은 여성 호르몬이 치은 혈관 투과도의 증가를 가져오므로, 동물에 주입시 에스트로겐과 프로게스테론은 치은 열구액의 유출량을 증가시킨다고 했다. 이는 여성에서 임신 기간 중에 호르몬성 피임약을 복용하게 되면 월경 주기별로 치은 열구액의 유출량에 변화를 초래하는 것 같다. 임신기간 중에는 이미 존재하던 치은염이 더 심해지는 경향이 있으며, O'Neil¹⁰⁾의 생체의 환경에서 행한 연구에 의하면, 임신 중에는 산모의 T세포의 반응성이 저하되었으며, 이러한 세포면역체계의 악화가 치태에 대한 치은조직의 반응을 변화시키는데 기여할 것으로 생각된다. Raber-Durlacher 등^{11,12)}은 임신 기간 중과 출산 후, 각각 치은염을 유발시켜서 면역조직학적 분석을 하였는데, 그 결과, Th-1 세포가 증가하는 것을 보았고, Th-1 세포는 HLA class II antigen bearing cell(B cell, Macrophage)에 대해 세포독성을 보이므로 면역 반

음이 감소하여 임신성 치은염을 유발하는 것 같다고 보고하였다. Miyagi 등¹³⁾은 사람의 말초단핵세포에서 프로게스테론, 에스트라디올, 테스토스테론이 PGE₂의 생산을 조절하며, 따라서 성호르몬은 PGE₂를 매개로 해서 치은 염증을 조절한다고 하였다. Lapp 등¹⁴⁾은 프로게스테론이 사람의 치은 섬유아세포의 IL-6 생성을 감소시키며, 특히 임신 중에는 프로게스테론의 함량이 높으므로 IL-6 생성을 감소시켜서, 치은 조직이 세균에 대한 저항력이 떨어져 국소적 염증이 생기는 것으로 보았다. Loza 등¹⁵⁾은 에스트로겐은 cytokine의 생산을 감소시켜서 조골세포의 활성을 증가시키나, 폐경기 여성에서는 에스트로겐의 감소로 cytokine의 생성이 증가되어 파골세포의 활성이 증가되고 따라서 골다공증 및 치조골 흡수를 증가시키는 것 같다고 했다. 또한 glucocorticoids는 조골세포의 유전자발현에 많은 영향을 미치는데, 그 예로 제1형 교원질의 감소와 간질 교원질분해효소의 증가를 야기하기도 한다¹⁶⁾. 세포의 기질은 기저막 교원질, fibronectin, laminin, 그리고 proteoglycan core protein등이며, 이러한 세포외기질을 파괴하는 단백질분해효소들을 MMP라고 한다. 이런 효소는 대개 잠복성 형태로 분비되고, 후에 활성화되어 작용을 하게 된다¹⁷⁾. 치주조직에서 이런 MMP 유전자의 발현을 조절하는 cytokine에는 IL-1¹⁸⁾, TNF- α ¹⁹⁾ 그리고 TGF- α ²⁰⁾가 있다. 사람의 조골세포도 골친화성(osteotropic) 호르몬과 cytokine에 반응하여 교원질과 matrix metalloproteinase(MMP)를 분비한다^{21,22)}.

이상의 논문고찰을 통해, 여성 호르몬이 치주 조직에 영향을 끼치는 기전은 크게 분류하여보면 임신기 여성의 경우 구강 위생 불량으로 인한 국소적 인자 축적, 여성 호르몬에 의한 치은 혈관 투과도 증가, 치은 연하 세균 균주의 변화, 여성 호르몬 변화에 따른 숙주의 면역 반응 변화의 4가지로 분류할 수 있을 것이다. 최근에는 숙주 면역 반응의 변화에 중점을 두어 연구를 하는 추세이나 아직 확실하게는 밝혀져 있지 않다.

교원질은 치주 조직의 대부분을 구성하며 교원질 분해 효소는 교원질을 선택적으로 파괴하는 효소로서 치주 조직의 파괴에 주된 작용을 한다. 따라서 교

원질분해효소가 cytokine과 더불어 여성 호르몬의 변화에 따른 치은의 염증 반응, 혈관 반응에 관여하고^{23,24)}, 에스트로겐과 프로게스테론에 대한 수용체가 치은에 존재함이 알려져 있으므로, 이러한 여성 호르몬이 치은의 섬유아세포와 치주인대세포에 직접적인 영향을 미치는지를 확인하기 위하여, 이 실험에서는 건강한 치은의 섬유아세포에 에스트로겐과 프로게스테론을 임신 기간 중과 월경주기와 농도를 유사하게 맞추어 각각 처리하여 배양한 후, 교원질 분해 효소의 활성 변화를 관찰하는 것을 목적으로 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 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 35mm² 배양접시에 1×10⁴개씩 분주하여 4개의 군으로 나누어 Table 1에서와 같이 각각 월경 주기에서의 프로게스테론(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 농도(0-16ng/ml)와 에스트로겐(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 농도(0-240 pg/ml) 그리고, 임신기에서의 프로게스테론 농도(0-200 ng/ml)와 에스트로겐 농도(0-16 ng/ml)의 실험 군으로 하고, 아무런 처리도 하지 않은 대조군으로 나누었다²⁵⁻²⁷⁾. 또, 동일한 방법으로 건강한 사람으로부터 발치한 치아로부터 치주인대세포를 추출하고, 3세대 계대배양하여 동일한 방법과 조건으로 실험군과 대조군을 나누어 실험하였다.

2. 교원질의 준비와 교원질분해효소 활성검사에 사용될 검사판의 준비

송아지 피부로부터 얻은 acid soluble collagen (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 1.4 mg/ml의 농도로 0.2 % acetic acid에 녹인 후, 동량의 중화완충액(100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0.04 %

Table 1. The Concentration of Estrogen and Prohesterone of Experimental Group

A. Estrogen

	Pregnancy(ng/ml)		Menstruation(pg/ml)
EP1	2.0	EM1	30.0
EP2	4.0	EM2	60.0
EP3	8.0	EM3	120.0
EP4	16.0	EM4	140.0

B. Progesterone

	Pregnancy(ng/ml)		Menstruation(ng/ml)
PP1	25.0	PM1	0.5
PP2	50.0	PM2	1.0
PP3	100.0	PM3	2.0
PP4	200.0	PM4	4.0
		PM5	8.0
		PM6	16.0

EP : Estrogen in Pregnancy

EM : Estrogen in Menstruation

PP : Progesterone in Pregnancy

PM : Progesterone in Menstruation

(w/v) NaN_3 , pH 7.8)을 가하여 최종 교원질의 농도가 700 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 희석하였다. 이렇게 희석된 교원질 용액 50 μl (3.5 $\mu\text{g/ml}$)를 96 well plate (Nalge Nunc International, New York, USA)에 가한 후, 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40 시간(습한 환경에서 16 시간, 건조한 환경에서 24 시간) 배양하여 젤이 되고 마르도록 하여 교원질을 얇게 도포 하였다. 그런 후, 이 wells 을 reagent grade water로 씻어내고, 효소활성 검사 전에 실온에서 말렸다.

3. 교원질분해효소의 활성 검사

적당한 농도의 각 호르몬을 첨가하기 전에 혈청을 넣지 않은 αMEM 배양액으로 2회 세척하고, 혈청이 포함되어 있지 않은 상태로 24시간 동안 배양한 후, 적당한 농도의 호르몬을 함유한 혈청이 포함되어 있지 않은 배양액으로 36 시간동안 배양한 후, 배양액만을 수거하여 활성검사에 사용하였다. 동일한 조건으로 3 회 실험을 시행하였으며, 호르몬을 첨가하지 않은 배양액을 사용하여 배양한 배양액을 공시험액

으로 하였다. 측정하고자 하는 시료 50 μl 를 교원질이 도포된 well에 가하고, 교원질분해효소 활성검사 완충액(50 mM Tris · HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 0.02 % Sodium azide)을 첨가하여 총부피가 250 μl 가 되도록 한 후, 덮개를 덮고 35 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 배양한 후, 효소용액을 버리고, 교원질분해효소 활성검사 완충액으로 두 번, 다시 reagent grade water로 두 번 씻은 후, 100 μl 의 염색액(0.25 % (w/v) Coomassie blue R-250(Bio-Rad, California, USA), 10 % (v/v) CH_3COOH , 50 % (v/v) CH_3OH)을 가하고 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 25 분간 염색한 후, 염색액을 버리고, reagent grade

water로 세 번 씻은 후, 상온에서 말렸다. 이 96 well plate를 Titertek Multiskan automatic spectrophotometer(Flow Laboratories, Sydney, Australia)로 590 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

II. 실험결과

치는 섬유아세포에 대한 에스트로겐의 영향은 임

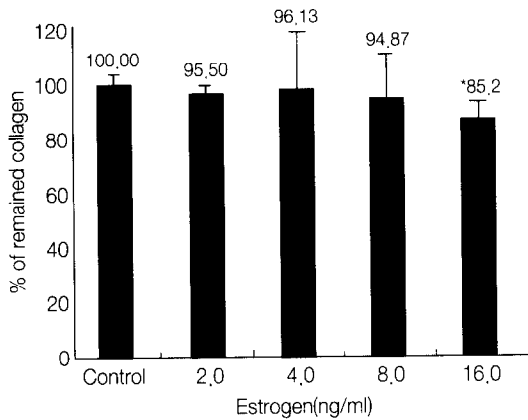


Figure 1. The effect of estrogen at the concentrations of pregnancy on the collagenase activity of gingival fibroblast.

* : Significantly different from the control(P <0.05)

신기 농도 처리군에서는 임신 말기에 해당하는 고농도로 처리한 군에서 유의한 수준의 교원질분해효소의 활성이 증가함을 나타냈으나(Figure 1), 월경주기 농도 처리군에서는 통계적으로 유의한 활성의 증가를 볼 수 없었다(Figure 2). 치은 섬유아세포에 대한 프로게스테론의 영향은 임신기 농도 처리군에서는 모든 농도에서 유의한 활성의 증가를 나타냈으며(Figure 3), 월경주기 농도 처리군에서는 저농도와 고농도에서, 즉 월경직전과 월경기 농도에서 유의한 활

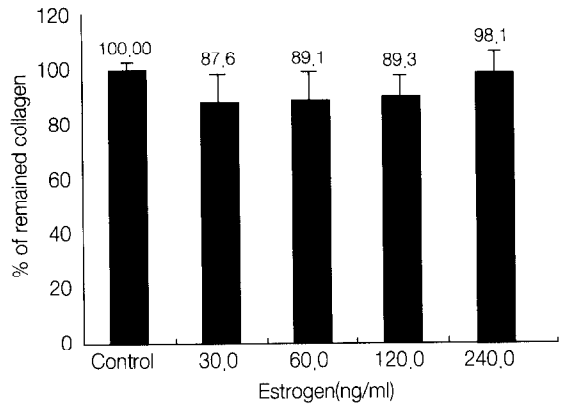


Figure 2. The effect of estrogen at the concentrations during the menstrual cycle on the collagenase activity of gingival fibroblast.

성의 증가를 나타냈다(Figure 4).

치주인대세포에 대한 에스트로겐의 영향은 임신기 농도처리군에서는 치은섬유아세포에서와는 달리 임신 초기에 해당하는 저농도로 처리한 군에서 유의한 수준의 교원질분해효소의 활성이 증가함을 나타냈으나(Figure 5), 월경주기 농도처리군에서는 유의한 활성의 증가를 볼 수 없었다(Figure 6). 치은 섬유아세포에 대한 프로게스테론의 영향은 임신기 농도 처리군에서는 유의한 활성의 증가를 볼 수 없었으며

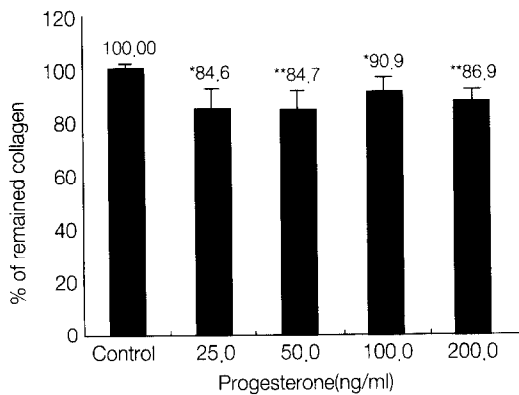


Figure 3. The effect of progesterone at the concentrations of pregnancy on the collagenase activity of gingival fibroblast.

* : Significantly different from the control (P <0.05)

** : Significantly different from the control (P <0.02)

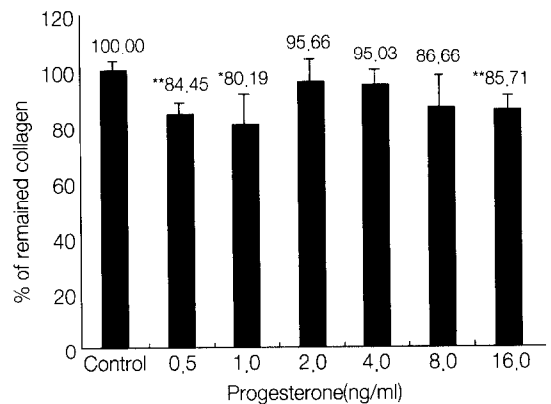


Figure 4. The effect of progesterone at the concentrations of menstrual cycle on the collagenase activity of gingival fibroblast.

* : Significantly different from the control(P <0.05)

** : Significantly different from the control(P <0.02)

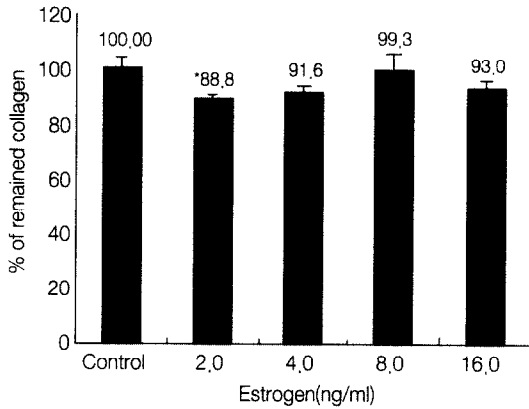


Figure 5. The effect of estrogen at the concentrations of pregnancy on the collagenase activity of periodontal ligament cells.
* : Significantly different from the control (P < 0.05)

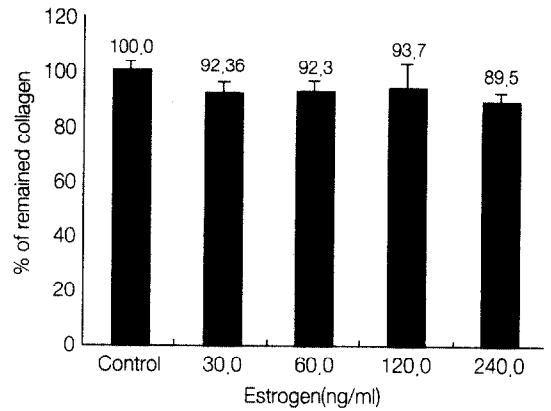


Figure 6. The effect of estrogen at the concentrations during menstrual cycle on the collagenase activity of periodontal ligament cells.

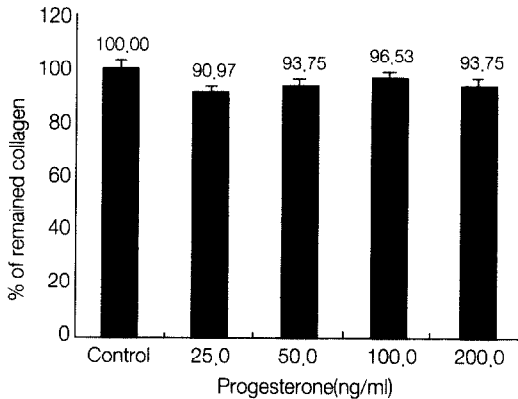


Figure 7. The effect of progesterone at the concentrations of pregnancy on the collagenase activity of periodontal ligament cells.

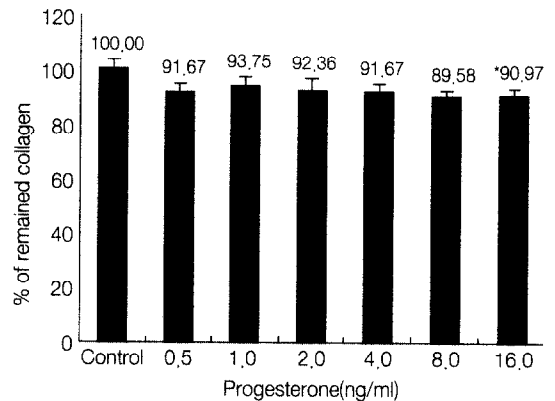


Figure 8. The effect of progesterone at the concentrations of menstrual cycle on the collagenase activity of periodontal ligament cells.
* : Significantly different from the control (P < 0.05)

(Figure 7), 월경주기 농도처리군에서는 고농도, 즉 월경직전 농도에서 유의한 활성의 증가를 나타냈다 (Figure 8).

IV. 고찰

에스트로겐과 프로게스테론에 의한 교원질분해효소의 활성조절에 관한 연구는 여성의 자궁 조직에서의 배란, 월경, 임신 및 출산과 관계되어 주로 연구되

어지고 있다²⁴⁻³⁰). 에스트로겐은 중층편평상피의 세포 분화에 영향을 끼쳐서 질 점막의 각화를 일으키며, 섬유성 교원질의 합성과 유지에도 관여하는 것으로 알려져 있고, 프로게스테론은 상반된 효과를 보여 혈관 투과도를 증가시키고, 치은 열구 내에 다형핵 백혈구와 PGE₂의 증가를 가져오는 것으로 알려져 있다³¹). What³²)은 에스트로겐과 프로게스테론이 배양된 대식세포에서의 교원질분해효소 생성을 조절하는데 영향을 미친다고 하였고, Saito 등³³)은 사람의

자궁에서 교원질분해효소의 생성이 에스트로겐의 조절을 받는다고 하였다. 프로그스테론이 교원질분해효소에 미치는 영향에 대한 보고는 여러 논문에서 상이하게 나타난다. 쥐의 출산 후 자궁 적출물이나 배양한 평활근 세포 그리고 토끼와 guinea pig의 자궁 경부 섬유아세포와 복막의 대식세포는 교원질분해효소의 활성화가 억제되거나, 합성이 방해되었으며, 사람의 myometrium의 평활근 세포에서는 영향이 없었고, enkephaline과 생체활성 펩티드에 작용하는 사람의 endometrium의 stroma 세포에서는 자극하는 것으로 나타났다³⁴. Tyree 등³⁵은 자궁적출물의 배양액에서 잠복성 교원질분해효소가 있음을 보고하였으며, 프로그스테론이 이 비활성의 효소가 활성형의 효소로 전환되는 것을 억제한다고 하였다. Brian 등³⁶과 Wilcox 등³⁷은 serotonin(5-hydroxytryptamine(5-HT))을 serotonin이 결핍된 배양액에 넣었을 때 교원질의 mRNA의 발현이 6-8배 증가하였으며 이러한 증가는 5-HT₂ receptor antagonist에 의하여 차단되었고, 5-HT가 결핍된 배양액에 phorbol ester(PMA)를 넣어주면 동일하게 5-HT의 작용을 재현함을 보였으며, 반면 프로그스테론 유사체를 넣어주면 교원질의 mRNA의 발현이 감소함을 보고하였다.

배란 중에 일어나는 여포벽의 약화는 기저막과 이의 주요한 구성성분인 제4형 교원질의 분해에 의하여, 단백질 분해는 배란 중의 여포의 파괴와 기저막의 파괴에 관련이 있다. Puistola 등³⁸은 배란 전에 사람의 여포액에서 제4형 교원질분해효소의 활성이 증가함을 보고하였으며, 이 효소는 granulosa cell에서 분비되고³⁹, 에스트로겐이 이 세포에서의 MMP-2 효소의 양을 조절한다고 하였다⁴⁰. 따라서 이는 배란 중에도 교원질분해효소가 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다고 하겠다.

이번 실험에서 에스트로겐에 의한 영향은 치은 섬유아세포에 대해서는 임신 말기의 고농도(16ng/ml)에서만 나타났으며, 치주인대세포에 대해서는 임신 초기에 해당하는 저농도(2ng/ml)에서만 나타났고 월경기의 낮은 농도에서는 영향이 없었다. 즉, 에스트로겐에 의한 영향은 월경기에는 거의 무시할 수준이며, 임신초기와 말기의 농도에서 교원질분해효소

의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. El-Ashiry 등⁴¹은 임신 초기에서는 gonadotropin의 과잉생산에 의해, 임신 말기에서는 에스트로겐과 프로그스테론 농도가 높은 것이 원인인 것으로 보았으나, 이 실험에서는 이 시기에 에스트로겐이 교원질분해효소의 활성을 증가시키는 것으로 나타나, 교원질분해효소가 관여할 가능성을 보였다. 프로그스테론은 에스트로겐과는 달리 임신 초기 농도에서 말기 농도에 걸쳐 전반적으로 치은섬유아세포에서는 교원질분해효소의 활성이 증가하였으나, 치주인대세포에서는 별다른 유의성이 없었다. 이러한 결과는 프로그스테론이 임신기의 치은섬유아세포의 교원질분해효소의 활성에 영향을 미치는 것으로 보이며 이는 또한 프로그스테론 제제의 경구피임약을 복용하는 여성의 치은염 악화와도 관계가 있는 듯하다.

월경 주기에 따른 여성 호르몬을 처리한 군에서는 에스트로겐에 의한 차이는 유의한 차이가 없었으나, 프로그스테론 농도가 가장 낮은 기간인 월경기간과 프로그스테론 농도가 가장 높은 시기인 월경 시작 직전의 농도에서 치주인대세포와 치은 섬유아세포 모두 교원질분해효소의 활성이 유의성있게 증가해 흥미로운 결과를 보였다. 월경 주기에 따른 치은염의 변화에 대한 연구는 양상이 다양하게 나타나며, 월경기간에는 치은 삼출액이 증가하여 염증 반응이 크게 나타난다고 한다⁴².

Anuradha 등⁴³의 연구에 의하면, 에스트로겐에 의한 쥐의 교원질분해효소 활성의 증가는 교원질분해효소 유전자의 발현조절에 의한 것이라고 한다. 이번 실험에서는 프로그스테론이 교원질분해효소의 활성을 증가시키는 것으로 나타났는데, 이러한 현상이 에스트로겐에서와 같이 유전자의 발현조절에 의한 것인지에 대한 심화된 연구가 필요할 것으로 생각된다.

일반적으로 치주질환에는 다형핵백혈구의 교원질분해효소가 치은 섬유아세포의 교원질분해효소보다 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있으나⁴⁴⁻⁴⁶, 치은에 상주하는 세포는 치은 섬유아세포이고, 치은에는 여성호르몬에 대한 수용기가 존재하는 것으로 알려져 있어, 치은 섬유아세포에 대한 영향을 실험하였다.

또한 치은 섬유아세포의 교원질분해효소는 다형핵 백혈구의 교원질분해효소보다 자극에 대해 반응이 미약한 것으로 알려져, 동일한 실험을 다형핵백혈구에서 시행하면 그 영향이 좀 더 크게 나타날 것으로 생각된다.

결론적으로, 이 실험에서는 프로게스테론이 교원질분해효소의 활성을 증가시키는 것으로 나타났는데, 이러한 치은섬유아세포에 대한 프로게스테론의 직접적인 영향이 에스트로겐에서와 같이 유전자의 발현조절에 의한 것인지에 대한 심화된 연구가 필요할 것으로 생각되고, northern blot analysis 등을 통하여 정확한 기전을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

대표적인 여성호르몬인 에스트로겐과 프로게스테론이 건강한 여성의 임신기와 월경주기 농도에서 사람의 치은 섬유아세포와 치주인대세포 교원질분해효소의 활성에 어떤 영향을 주는가를 관찰하기 위해 spectrophotometric analysis를 시행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치은 섬유아세포에서 에스트로겐이 교원질분해효소에 미치는 영향은 비교적 미약하였다.
2. 치은 섬유아세포에 대한 프로게스테론의 영향은 월경주기에서의 저농도와 고농도에서 유의성있게 활성을 증가시켰으며, 임신기에서는 전반적으로 유의성있게 활성을 증가시켰다 ($P < 0.02$).
3. 치주인대세포에 대한 영향은 임신기의 저농도의 에스트로겐 농도와 월경기의 고농도의 프로게스테론에서 유의성있게 교원질분해효소의 활성을 증가시켰다 ($P < 0.05$).

결론적으로, 이 실험에서는 프로게스테론이 교원질분해효소의 활성을 증가시키는 것으로 나타났는데, 이러한 치은섬유아세포에 대한 프로게스테론의 직접적인 영향이 에스트로겐에서와 같이 유전자의 발현조절에 의한 것인지에 대하여 보다 심도 깊은

연구가 필요할 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. El Attar T.M., Roth G.D., and Hugoson A.: Comparative metabolism of $4\text{-}^{14}\text{C}$ progesterone in normal and chronically inflamed human gingival tissue. *J. Periodont. Res.*, 8:79-85, 1973.
2. Formicola A.J., Weatherfold T., and Grupe H. Jr.: The uptake of ^3H - estradiol by the oral tissues of rats. *J. Periodont. Res.*, 5:269-275, 1970.
3. El Attar T.M.: Metabolism of pro- gesterone- 7α ^3H in vitro in human gingiva with periodontitis. *J. Periodont.*, 42:721-725, 1971.
4. Vittek 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.
5. Vittek 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.
6. Styr B., and Sugarman B.: Estrogens and infection. *Rev. Infect. Dis.*, 13: 1139- 1150, 1991.
7. Rateitschak K.H.: Tooth mobility changes during pregnancy. *J. Peridont. Res.*, 2: 199-206, 1967.
8. Lindhe J., Attstrom R., and Bjorn A.L.: Influence of sex hormones on gingival exudation in dogs with chronic gingivi- tis. *J. Periodont. Res.*, 3:279-283, 1968.
9. Lindhe J., Attstrom R., and Bjorn A.L.: The influence of progesterone on gingival exudation during menstrual cycles. A longitudinal study. *J. Periodont. Res.*, 4:97-102, 1969.
10. O'Neil TCA.: Maternal T-Lymphocyte response and gingivitis in pregnancy. *J. Periodont.*, 50:178-184, 1979.
11. Raber-Durlacher J.E., Zeijlemaker W.P.,

- Meinesz A.A.P., and Abraham-Inpijn L.: CD4 to CD8 ratio and in vitro lymphoproliferative responses during experimental gingivitis in pregnancy and postpartum. *J. Periodont.*, 62:663-667, 1991.
12. Raber-Durlacher J.E., Leene W., Palmer-Bouva C.C.R., Raber J., and Abraham-Inpijn.: Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: Immunohistochemical aspects. *J. Periodont.*, 64:211-218, 1993.
 13. Miyagi M., Morishita M., and Iwamoto Y.: Effects of sex hormones on production of prostaglandin E2 by human peripheral monocytes. *J. Periodont.*, 64(11): 1075-1078, 1993.
 14. Lapp C.A., Thomas M.E., and Lewis J.B.: Modulation by progesterone of Interleukin-6 production by gingival fibroblasts. *J. Periodontol.*, 66:279-284, 1995.
 15. Loza J.C., Carpio L.C., and Dziak R.: Osteoporosis and its relationship to oral bone loss. *Curr. Opin. Periodontol.*, 3:27-33, 1996.
 16. Delany A.M., Dong Y., and Canalis E.: Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J. Cell. Biochem.*, 56(3): 295-302, 1994.
 17. Birkedal-Hansen H.: Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J. Periodontol.*, 64:474-484, 1993.
 18. Richards D., and Rutherford R.B.: Interleukin-1 regulation of procollagenase mRNA and protein in periodontal fibroblasts in vitro. *J. Periodont. Res.*, 25:222-229, 1990.
 19. Uitto V.-J., Larjava H., Heino J., and Sorsa T.: A protease from *Bacteroides gingivalis* degrades cell surface and matrix glycoproteins of cultured gingival fibroblasts and induces secretion of collagenase and plasminogen activator. *Infect. Immun.*, 57:213-218, 1989.
 20. Birkedal-Hansen H., Wells B.R., Lin H.-Y., Caufield P.W., and Taylor R.E.: Activation of keratinocyte-mediated collagen(type I) breakdown by suspected human periodontopathogen: Evidence of a novel mechanism of connective tissue breakdown. *J. Periodont. Res.*, 19:645-650, 1984.
 21. Meikle M.C., Bord S., Hembry R.M., Compston J., Croucher P.I., and Reynolds J.J.: Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J. Cell. Sci.*, 103(Pt 4):1093-1099, 1992.
 22. Meikle M.C., Bord S., Hembry R.M., and Reynolds J.J.: The synthesis of collagenase, gelatinase-A(72 kDa) and -B(95 kDa), and TIMP-1 and -2 by human osteoblasts from normal and arthritic bone. *Bone*, 17(3):255-260, 1995.
 23. Soorlyamoorthy M. and Gower D.B.: Hormonal influences on gingival tissue : relationship to periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 16:201-208, 1989.
 24. Sutcliffe P. A.: longitudinal study of gingivitis and puberty. *J. Periodont. Res.*, 7:52-58, 1972.
 25. O'Neil TCA.: Plasma female sex hormone levels and gingivitis in pregnancy. *J. Periodont.*, 50:279-282, 1979.
 26. McLachlan R.I., Robertson D.M., Healy D.L., Burger H.G., and de Kretser D.M.: Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 5(5): 954-961, 1987.
 27. 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.
 28. Loe H.: Periodontal changes in pregnancy. *J. Periodont.*, 36:209-217, 1965.
 29. Loe H., and Silness J.: Periodontal disease in

- pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta. Odont. Scand.*, 21:532-551, 1963.
30. Levitz M., and Young B.K.: Estrogens in pregnancy. *Vitam. Horm.*, 35:109-147, 1977.
 31. Amar S., and Chung K.M.; Influence of hormonal variation on the periodontium in women. *Periodontology 2000*, 6:79-87, 1994.
 32. Wahl L.M. : Hormonal regulation of macrophage collagenase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74(2):838-845, 1977.
 33. Saito Y., Takahashi S., and Maki M.: In vitro effect of some free estrogens or estrogen precursors on collagenase activity of uterine cervix. *Acta. Obstet. Gynaecol. Jpn.*, 33(6):827-832, 1981.
 34. Marbaix E., Donnez J., Courtoy P.J., and Eeckhout Y.; Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89(24):11789-11793, 1992.
 35. Tyree B., Halme J., and Jeffrey J.J.: Latent and active forms of collagenase in rat uterine explant cultures: regulation of conversion by progestational steroids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 202(1):314-317, 1980.
 36. Brian D., Wilcox, Laura Rydelek- Fitzgerald, and John J.J.: Regulation of collagenase gene expression by serotonin and progesterone in rat uterine smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 267(29):20752-20757, 1992.
 37. Wilcox B.D., Rydelek-Fitzgerald L., and Jeffrey J.J.: Regulation of collagenase gene expression by serotonin and progesterone in rat uterine smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 267(29):20752-20757, 1992.
 38. Puistola U., Salo T., Martikainen H., and Rönberg L.: Type IV collagenolytic activity in human preovulatory follicular fluid. *Fertil. Steril.*, 45:578-580, 1986.
 39. Puistola U., Rönberg L., Martikainen H., and Turpeenniemi-Hujanen T.: The human embryo produces basement membrane collagen(type IV collagen)- degrading activity. *Hum. Reprod.*, 4:309-311, 1989.
 40. Puistola U., Westerlund A., Kauppila A., and Turpeenniemi-Hujanen T.: Regulation of 72-kd type IV collagenase-matrix metalloproteinase-2 by estradiol and gonadotropin-releasing hormone agonist in human granulosa-lutein cells. *Fertil. Steril.*, 64(1):81-87, 1995.
 41. El-Ashiry G.M., el-Kafrawy A.H., and Nasr M.F., Younis N.: Effects of oral contraceptives on the gingiva. *J. Periodontol.*, 42(5):273-275, 1971.
 42. Holm-Pedersen P., and Løe H.: Flow of gingival exudate as related to menstruation and pregnancy. *J. Periodont. Res.*, 2(1):13-20, 1967.
 43. Anuradha P., and Thampan R.V.: Hormonal regulation of rat uterine collagenase; *Arch. Biochem. Biophys.*, 303(1):81-89, 1993.
 44. Gangbar S., Overall C.M., McCulloch A.G., and Sodek J.: Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples: Correlation with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 25:257-267, 1990.
 45. Lee W., Aitken S., Kulkarni G., et al.: Collagenase activity in recurrent periodontitis; Relationship to disease progression and doxycycline therapy. *J. Periodont. Res.*, 26:479-485, 1991.
 46. Villela B., Cogen R.B., Bartolucci A.A., and Birkedal-Hansen H.: Collagenolytic activity in crevicular fluid from patients with chronic adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and gingivitis, and from healthy control subjects. *J. Periodont. Res.*, 22:381-389, 1987.

In Vitro Effects of Female Sex Hormones on Collagenase Activity of Gingival Fibroblast and Periodontal Ligament Fibroblast

Ji-Yearn Shin, Chul-Woo Lee, Soo-Boo Han

Department of Periodontology, School of Dentistry, Seoul National University

Many factors may affect periodontal changes during the physiologic conditions of woman (e.g. puberty, menstrual cycle, pregnancy, menopause). Recently many research has focused on the immunological changes of host, but the exact mechanism is not clear. Collagen is a major constituent of periodontium, and collagenase specifically digests the collagen and plays a role in destruction of periodontal tissue. So, I suppose that it participates with the cytokines in the inflammation of gingiva and vascular response during the changes of female sex hormones. Because there are some evidences of the existence of the receptors of estrogen and progesterone in the gingiva, it may be a target tissue of female sex hormones. In this experiment, gingival fibroblast and periodontal ligament cell were cultured in the presence of various concentrations of estrogen or progesterone corresponding to the menstrual cycle and pregnancy. Collagenase activity of the supernatant of culture media was determined by Spectrophotometric collagenase assay. The enzyme activity was calculated by the % decrease of the coated collagen.

1. The estrogen at both concentrations had no effect on the activity of collagenase of the gingival fibroblast.
2. The progesterone had some effect on the collagenase activity of the gingival fibroblast at low and high concentration of menstrual cycle, and elevated the enzyme activity at all range of pregnancy concentrations.
3. In periodontal ligament cells, estrogen elevated the enzyme activity at the early pregnancy concentration and progesterone elevated at the concentration just before menstruation.

In this experiment, progesterone elevated the collagenase activity of gingival fibroblast and periodontal ligament cells. But the mechanism of the up-regulation of the enzyme activity was not confirmed. The more experiments of direct effect of progesterone on gingival at the molecular level (e.g. northern blot analysis) can reveal the exact mechanism.

Key words : Spectrophotometric collagenase assay, Estrogen, Progesterone, Collagenase, Menstruation, Pregnancy