

Carbonic Anhydrase Inhibitors가 Lipopolysaccharide에 의해 유도된 골흡수에 미치는 영향

박양호¹⁾ · 차경석²⁾

I. 서 론

교정치료시 치아의 압박을 받는 부위에서는 치조와의 표면과 골수강에 파골세포가 나타나서 치조골을 흡수하게 되고, 장력을 받는 부위에서는 조골세포가 나타나 신생골을 첨가시키면서 치아는 이동된다. 교정력에 의한 치아이동 기전을 규명할 목적으로 광학현미경을 이용한 조직학적 연구가 시행되어 왔으며¹⁻⁸⁾ 아울러 치주조직의 반응에 관한 전자현미경적 연구를 통하여 Rygh와 Reitan⁹⁾, Rygh¹⁰⁻¹³⁾는 백서 및 교정환자를 대상으로 압박측 혈관, 세포 및 교원섬유의 변화를 관찰하였고, Kurihara¹⁴⁾는 백서치아의 압박측에서 골흡수가 일어나는 부위에 나타나는 조섬유세포, 내피세포 및 미분화 세포의 미세구조에 관하여 보고하였다.

특히 요즈음 골흡수 및 골형성의 생화학적 기전을 규명하고, 이를 임상에 이용하려는 연구가 활발한데^{15,16)} 치아의 이동은 궁극적으로 골개조의 과정에 관여하는 세포의 활성화에 의존하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 그러

나 과도한 교정력 및 여러요인으로 인해 정상적인 골개조현상이 일어나지 않고 원하지 않는 치조골파괴가 일어날 수 있는데 치조골의 파괴에 관하여는 많은 연구들이 진행되어 왔으나^{18,19)} 아직까지 정확한 원인물질이 밝혀져 있지 않은 상태이며 prostaglandin E₂ 및 파골세포 활성화인자(Osteoclast activating factor)를 비롯하여 lipopolysaccharide(LPS) 등도 작용하리라 추측된다²⁰⁻²²⁾.

이중 LPS는 polysaccharide, phospholipid 및 소량의 단백질이 주성분으로 되어 있으며²³⁾, 출혈성피사, 혈소판 응집, 대식세포 출혈유도 및 보체(complement)활성화 등 다양한 생물학적 변화와 함께 세포와 조직의 파괴를 일으키는 물질로 알려져 있다²⁴⁻²⁶⁾.

LPS가 골조직에 미치는 영향은 많이 보고되고 있으나 아직까지 정확한 원인은 규명되지 못하고 있다. 그러나 LPS가 골조직 배양시 ⁴⁵Ca 유리를 촉진시킨다는 보고와²⁸⁻³⁰⁾ 용해소체효소 유리에도 영향을 미친다는 보고가 있다^{31,32)}. 또한 LPS는 교원분해효소의 작용을 증가시키며, 부갑상선호르몬, prostaglandin E₂ 및 파골세포 활성화인자 등 다른 골조직 흡수촉진 유도물질의 작용을 상승시키는 효과를 가지고 있다고 보고된 바 있다³³⁾.

골흡수기전을 세포수준에서 관찰하면 많은

접수일 : 1994년 1월 1일

¹⁾ : 단국대학교 치과대학 교정학교실, 전공의

²⁾ : 단국대학교 치과대학 교정학교실, 부교수

인자들이 관여하며 세포내 cAMP의 증가^{34,35)}, 용해소체효소의 유리 증가^{36~38)} 및 carbonic anhydrase의 작용에 의해 생성된 탄산 등의 acidic microenvironment들이 중요한 역할을 담당하고 있다^{39~42)}. 이러한 carbonic anhydrase는 골조직에도 존재하며^{43,44)} 골조직세포중 주로 파골세포에만 존재하고⁴⁵⁾, 골흡수 촉진 물질인 부갑상선 호르몬 투여시 carbonic anhydrase는 골조직에도 존재하며^{43,44)} 골흡수 과정에서 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.

본 실험은 선행들에 의해 연구된 골흡수 촉진 물질중 LPS를 택하여 골조직의 장기배양시 LPS가 골흡수에 미치는 영향과 LPS에 의한 골흡수에 미치는 carbonic anhydrase inhibitors의 영향을 평가하고자 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1) 골조직의 장기배양(organ culture)

LPS가 골조직의 골흡수에 미치는 영향을 평가하기 위하여 임신 17일째의 백서에 200 μ Ci의 $^{45}\text{CaCl}_2$ (New England Nuclear)를 피하 주사하여 골조직을 표지시킨 다음 태령 19일째의 백서태자 척골(ulnae)과 요골(radii)을 무균적으로 적출하여 60mm organ culture dish(Falcon, U. S. A.)내의 membrane filter(Millipore, pore size 0.45 μ m, U. S. A.)위에 옮겨 장기배양을 시행하였다.

적출한 골조직은 1mg/ml의 BSA가 첨가된 BGJb 배양액에서 24시간 전 배양한 다음 대조군은 신선한 BGJb 배양액으로, 실험군은 1 μ g/ml의 LPS가 첨가된 배양액으로 교환하여 72시간동안 배양하였다. 배양액내로의 ^{45}Ca 유리량은 배양 24, 48 및 72시간 후 일정량의 배양액을 취하여 liquid scintillation counter(Beckman, LS 5000TA)로 측정하였다. 골흡수율은 배양액내로의 ^{45}Ca release유리량의 비율로 관찰하였다.

2) B. Gingivalis로부터 LPS의 추출

BHI(Brain Heart Infusion)에 접종하여 배양한 균체를 동결건조시킨 후 Westphal 등⁴⁶⁾의 방법에 따라 LPS를 추출하였다. 즉, 균체 20mg을 증류수에 분산시킨 후 동일한 양의 90% (W/W) phenol(Merck, Germany)과 혼합하여 68 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 교반하면서 반응시킨 다음 반응액을 냉각시키고 5 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3000xg로 30분간 원침하였다. 원침 후 수용액 부분을 취하고 같은 방법으로 2회 반복하여 수용액 부분을 수집하였으며 수집된 용액은 72시간 동안 투석한 다음 동결건조하여 LPS를 분리, 추출하였다.

2) LPS에 의한 골흡수에 미치는 carbonic anhydrase inhibitors의 영향

임신 17일째의 백서에 200 μ Ci $^{45}\text{CaCl}_2$ 를 피하 주사하여 골조직을 표지시킨 후 태령 19일째의 백서태자 척골과 요골을 무균적으로 적출하여 위와 동일한 방법으로 장기배양을 시행하였다. 24시간 전배양 후 대조군 10 μ g/ml의 LPS가 첨가된 배양액으로 교환하였으며, 실험군은 10 μ g/ml의 LPS와 1mM 및 10mM의 sulfanilamide(Sigma, U. S. A.), 0.1mM 및 1mM의 dichlorphenamide(Sigma, U. S. A.)가 복합 첨가된 배양액으로 교환하여 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양중 24시간, 48시간 및 72시간 후에 일정량의 배양액을 취하여 배양액내로 유리된 ^{45}Ca 의 양을 측정하였으며 골조직내에 표지된 ^{45}Ca 의 총량을 산출한 후 각 시간대에 유리된 ^{45}Ca 유리량의 비율을 관찰하여 LPS에 의한 골흡수에 미치는 세종류의 carbonic anhydrase inhibitors의 영향을 평가하였다.

III. 실험결과

골조직 장기 배양시 골흡수에 미치는 LPS의 영향은 Table 1., Table 2, Fig. 1 및

Fig. 2와 같으며 배양액내에 1 μ g/ml의 LPS를 첨가하여 배양한 경우 배양 48시간 및 72시간에 칼슘유리가 증가되었고 배양액내에 10 μ g/ml의 LPS를 첨가하여 배양한 경우 72시간에 칼슘유리가 증가되었다. LPS에 의해 유도된 골흡수에 미치는 carbonic anhydrase inhibitors의 영향을 평가하기 위하여 배양액내에 LPS와 sulfanilamide를 복합첨가한 경우의 결과는 Table 3, Table 4 및 Fig. 3과

같으며 1mM의 sulfanilamide를 복합첨가한 경우 유의한 변화가 관찰되지 않았으나 10 mM을 복합첨가한 경우 배양 48시간 및 72시간에 LPS에 의해 유도된 골흡수가 유의하게 억제됨을 관찰할 수 있었고 배양액내에 LPS와 dichlorphenamide를 단독 혹은 복합 첨가한 경우는 Table 5, Table 6 및 Fig. 4와 같으며 0.1mM의 dichlorphenamide를 복합첨가한 경우 유의한 변화가 관찰되지 않았고,

Table 1. Ratios of ⁴⁵Ca-release induced by LPS(1 μ g/ml) from the fetal rat ulnae and radii compared to paired control

Group	ratio (experimental/control)		
	24hr	48hr	72hr
control	1.00-0.09	1.00-0.08	1.00-0.07
experimental	1.15-0.19	1.45-0.12*	1.44-0.09**

* P<0.05, compared to paired control.

** P<0.01, compared to paired control.

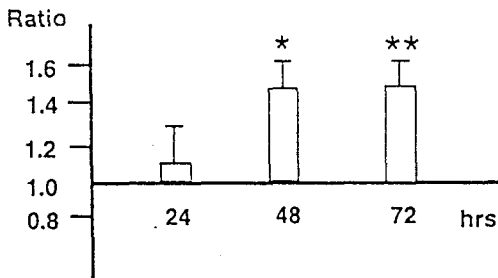


Fig. 1. Effect of LPS(1 μ g/ml) on the ⁴⁵Ca-release from the fetal rat ulnae and radii in organ culture(Ratio).

Table 3. Effect of sulfanilamide(SA, 1mM)on the LPS-induced bone resorption in the organ culture

Group	ratio of ⁴⁵ Ca release form the bone		
	24hr	48hr	72hr
LPS 10 μ g/ml	1.00-0.07	1.00-0.04	1.00-0.06
LPS+SA 1mM	0.91-0.07	1.03-0.06	1.03-0.06

Table 2. Ratios of ⁴⁵Ca-release induced by LPS(10 μ g/ml) from the fetal rat uinae and radii compared to paired control

Group	ratio (experimental/control)		
	24hr	48hr	72hr
control	1.00-0.13	1.00-0.12	1.00-0.08
experimental	0.87-0.10	1.25-0.09	1.29-0.05*

* P<0.05, compared to paired control.

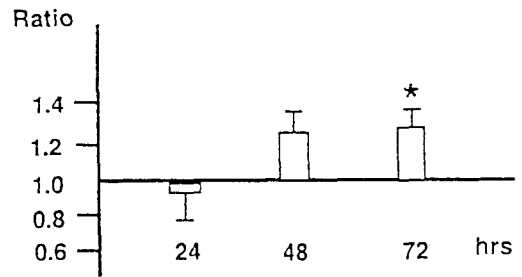


Fig. 2. Effect of LPS(10 μ g/ml) on the ⁴⁵Ca-release from the fetal rat ulnae and radii in organ culture(Ratio).

Table 4. Effect of sulfanilamide(SA, 10mM)on the LPS-induced bone resorption in the organ culture

Group	ratio of ⁴⁵ Ca release form the bone		
	24hr	48hr	72hr
LPS 10 μ g/ml	1.00-0.17	1.00-0.14	1.00-0.13
LPS+SA 10mM	0.77-0.04	0.66-0.04*	0.71-0.06*

* P<0.05, compared to paired control.

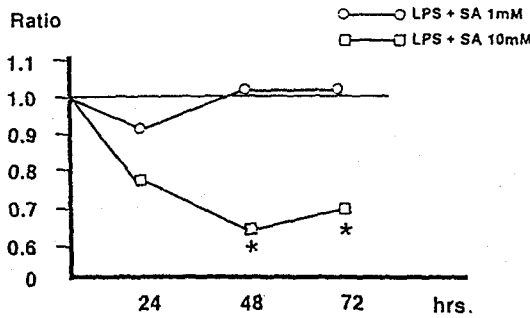


Fig. 3. Effect of sulfanilamide on the LPS-induced ⁴⁵Ca-release from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture.

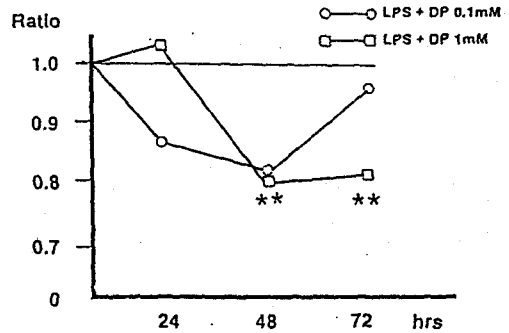


Fig. 4. Effect of dichlorphenamide on the LPS-induced ⁴⁵Ca-release from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture.

Table 5. Effect of dichlorphenamide(DP, 0.1mM)on the LPS-induced bone resorption in the organ culture

Group	ratio of ⁴⁵ Ca release form the bone		
	24hr	48hr	72hr
LPS 10 ^μ g/ml	1.00-0.03	1.00-0.06	1.00-0.04
LPS+DP 0.1mM	0.88-0.04	0.83-0.07	0.93-0.04

Table 6 Effect of dichlorphenamide(DP, 1mM)on the LPS-induced bone resorption in the organ culture

Group	ratio of ⁴⁵ Ca release form the bone		
	24hr	48hr	72hr
LPS 10 ^μ g/ml	1.00-0.09	1.00-0.03	1.00-0.05
LPS+DP 1mM	1.04-0.10	0.81-0.04**	0.83-0.04**

** P<0.01, compared to paried control.

Table 7. Effect of acetazolamide (AZ, 0.1mM)on the LPS-induced bone resorption in the organ culture

Group	ratio of ⁴⁵ Ca release form the bone		
	24hr	48hr	72hr
LPS 10 ^μ g/ml	1.00-0.02	1.00-0.03	1.00-0.08
LPS+AZ 1mM	1.03-0.04	1.05-0.10	0.91-0.04

Table 8 Effect of dichlorphenamide(DP, 5mM)on the LPS-induced bone resorption in the organ culture

Group	ratio of ⁴⁵ Ca release form the bone		
	24hr	48hr	72hr
LPS 10 ^μ g/ml	1.00-0.01	1.00-0.03	1.00-0.03
LPS+DP 5mM	1.04-0.09	0.93-0.09	0.75-0.06**

** P<0.01, compared to paried control.

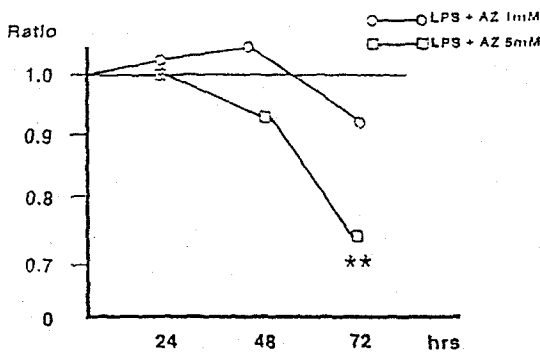


Fig. 5. Effect of acetazolamide on the LPS-induced ⁴⁵Ca-release from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture.

1mM을 복합첨가한 경우 배양 48시간 및 72시간에 LPS에 의해 유도된 골흡수가 유의하게 억제됨을 관찰할 수 있었다.

배양액내에 LPS와 acetazolamide를 단독 혹은 복합첨가한 경우는 Table 7, Table 8 및 Fig. 5와 같으며 1mM의 acetazolamide를 복합첨가한 경우 유의한 변화가 관찰되지 않았고 5mM을 복합첨가한 경우 배양 72시간에 LPS에 의해 유도된 골흡수가 유의하게 억제되었다.

IV. 총괄 및 고안

교정적 치아이동시 즉 교정력에 의한 기계적 자극이 치주조직에 손상을 가하면 세포막으로부터 prostaglandin의 합성과 분비가 유도되어 세포내 cyclic AMP와 Ca^{++} 이 증가됨으로써 파골세포의 활성도가 높아지고 이에 따라 골흡수가 야기되어 치아이동이 이루어진다⁴⁷⁾.

이러한 골흡수는 골조직의 유기성분 및 무기성분의 세포외 분해과정이며 이들 분해효소 및 유기산의 세포외로의 유리가 선행되어야 한다^{36,48)}.

골조직 흡수의 원인 물질이 현재까지 정확히 알려져 있지는 않으나 prostaglandin 및 파골세포 활성인자등과 전신적 호르몬으로서 부갑상선 호르몬이 관련되어 있는 것으로 생각되는데 lipopolysaccharide도 이에 작용하리라 추측되고 있다²⁰⁻²²⁾.

골흡수 기전으로 carbonic anhydrase에 의해 생성된 탄산등의 acidic한 microenvironment들이 중요한 역할을 담당하는데 carbonic anhydrase는 호흡시에 적혈구에서 이산화탄소의 섭취 및 유리에 관여하며 여러 분비기관에서 수소이온과 중탄산 이온의 생성 및 분비에 관여하는 효소로 알려져 있고⁴⁹⁾ 골조직에도 존재하며^{43,44,50)} carbonic anhydrase에 의해 생성된 탄산이 무기성분의 분해에 관여할 것이라 보고되고 있다^{39,51,52)}. 여러 골흡수 촉진물질의 공통작용기전에 carbonic anhydrase가 관여한다는 보고로는 골조직 배양시 carbonic anhydrase inhibitors가 골흡수 촉진물질인 부갑상선 호르몬, 1, 25-dihydroxy Vitamin D₃, prostaglandin E₂ 및 dibutyryl cAMP 등에 의한 골흡수를 억제하였고^{39,40,53)} 생체내 실험으로는 carbonic anhydrase inhibitors에 의해 부갑상선 호르몬에 의한 혈중 Ca이온의 증가가 억제되며^{51,54)} Kenny⁵⁵⁾는 전신적으로 carbonic anhydrase inhibitors인 acetazolamide를 투여한 경우 무용성 위축(disuse atrophy)이 부분적으로 회복되었다고 보고한바

있다.

본 실험에서는 골흡수 촉진물질로 알려진 LPS를 택하여 LPS에 의한 골흡수 영향을 평가하기 위하여 골조직 장기 배양시 배양액내에 1 μ g/ml의 LPS를 첨가, 배양한 경우 배양 48시간 및 72시간에 골흡수 촉진효과를 관찰할 수 있었고 배양액내에 10 μ g/ml의 LPS를 첨가 배양한 경우에는 배양 72시간에 골흡수가 증가됨으로 미루어 in vitro에서 LPS에 의한 골흡수 정도를 관찰하였는데 이는 골조직 배양시 ⁴⁵Ca의 유리를 증가시켰다는 보고^{21,28-30)} 및 용해소체효소의 유리를 증가시켰다는 보고^{31,32)}와 일치되는 결과라고 사료된다.

본 실험에서는 배양액내에 LPS의 농도를 달리하였으나 거의 유사한 결과가 관찰되었고 특히 1 μ g/ml의 농도에서 최대한의 효과를 나타내었다고 추측된다. Carbonic anhydrase에 의한 acidic한 microenvironment가 골흡수 과정을 유도함을 알아보기 위하여 세종류의 carbonic anhydrase inhibitors를 사용하여 LPS에 의해 유도된 골흡수에 미치는 영향을 관찰하였다. 골조직 장기배양시 배양액내에 LPS와 1mM 및 10mM의 sulfanilamide를 단독 혹은 복합첨가하여 배양한 경우, 1mM의 경우 유의한 변화가 관찰되지 않았고 10mM을 복합첨가한 경우 배양 48시간 및 72시간에 LPS에 의한 골흡수가 유의하게 억제되었다. 골조직 장기 배양시 배양액내에 LPS와 0.1mM 및 1mM의 dichlorphenamide를 단독 혹은 복합첨가 배양한 경우 0.1mM의 경우 유의한 변화가 없었고, 1mM의 경우 배양 48시간 및 72시간에 LPS에 의해 유도된 골흡수가 억제됨을 나타내었다. 골조직 장기 배양시 배양액내에 LPS에 1mM 및 5mM의 acetazolamide를 단독 혹은 복합첨가 배양한 경우 1mM에는 유의한 변화가 나타나지 않았고, 5mM을 복합첨가한 경우 배양 72시간에 LPS에 의한 골흡수가 유의하게 억제됨을 관찰할 수 있었다.

본 연구는 carbonic anhydrase inhibitors작

용을 가지는 약물을 사용하여 LPS에 의해 유도된 골흡수가 화학구조는 전혀 다르나 carbonic anhydrase inhibitors라는 공통점을 가진 sulfanilamide, dichlorphenamide 및 acetazolamide에 의해 모두 억제됨을 관찰할 수 있어 골흡수과정중에 carbonic anhydrase가 관여한다고 추측되며 이러한 효소의 작용에 의해 형성된 acidic한 microenviroment가 골흡수에 중요한 역할을 하리라 사료된다.

V. 결 론

골흡수 기전을 연구하기 위하여 골조직 장기 배양시 LPS가 골흡수에 미치는 영향과 LPS에 의해 유도된 골흡수에 미치는 세종류의 carbonic anhydrase inhibitors의 영향을 관찰하였다.

임신 17일째의 백서에 $200\mu\text{Ci}$ 의 $^{45}\text{CaCl}_2$ 를 피하주사한 후 태령 19일째의 백서태자 척골과 요골을 무균적으로 적출하여 장기배양을 시행하였으며 배양시 배양액내에 $1\mu\text{g/ml}$ 및 $10\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 첨가하여 배양한 후 골흡수정도를 측정하였고 LPS에 의해 유도된 골흡수를 억제하는 carbonic anhydrase inhibitors의 영향을 관찰하기 위하여 배양액내에 LPS와 1mM 및 10mM 의 sulfanilamide, 0mM 및 1mM 의 dichlorphenamide, 1mM 및 10mM 의 sulfanilamide, 0.1mM 및 1mM 의 dichlorphenamide, 1mM 및 5mM 의 acetazolamide를 단독 혹은 복합첨가하여 배양한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 골조직 장기배양시 배양액내에 $1\mu\text{g/ml}$ 및 $10\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 첨가, 배양한 경우 $1\mu\text{g/ml}$ 첨가시 배양 48시간 및 72시간에 유의성 있는 골흡수 축진을 나타냈고, $10\mu\text{g/ml}$ 첨가시 배양 72시간에 유의한 골흡수 효과를 나타냈다.

2. 골조직 장기배양시 배양액내에 $10\mu\text{g/ml}$ 의 LPS와 $1\mu\text{g/ml}$ 의 sulfanilamide를 단독 혹은 복합첨가하여 배양한 경우 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으나, 10mM 의 sulfani-

lamide를 첨가 배양한 경우 LPS에 의해 유도된 골흡수가 48시간 및 72시간에 유의하게 억제됨을 관찰할 수 있었다.

3. 골조직 장기 배양시 배양액내에 LPS와 0.1mM 의 dichlorphenamide를 단독 혹은 복합 첨가 배양한 경우 각 시간마다 ^{45}Ca 유리가 모두 감소했으나 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았으며, 1mM 의 dichlorphenamide를 첨가 배양한 경우 LPS에 의해 유도된 골흡수가 48시간 및 72시간에 유의하게 억제되었다.

4. 배양액내에 LPS와 1mM 의 acetazolamide를 단독 혹은 복합첨가한 경우 유의한 변화가 관찰되지는 않았으나, 5mM 의 acetazolamide를 첨가배양한 경우 LPS에 의해 유도된 골흡수가 72시간에 억제되었다.

REFERENCES

- Schwarz, A. M. : Tissue changes incidental to orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod.* 18 : 331~352, 1932.
- Oppenheim, A. : A possibility for physiologic orthodontic movement. *Am. J. Orthod. Oral surg.* 30 : 277~328, 1944.
- Gottlieb, B. : Some orthodontic problems in histologic illumination. *Am. J. Orthod.* 32 : 113, 1946.
- Macaptan, L. C., Weinman, J. P. and Brodie, A. G. B. : Early tissue change followin tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 24 : 79~95, 1954.
- Waldo, C. M. and Rothblatt, J. M. : Histologic Response to tooth movement in the laboratory rat : procedure and preliminary observation. *J. Den. Res.* 33 : 481~486, 1954.
- Zaki, A. E. and Van Hyusen, G. : Histology of the periodontum following tooth movement. *J. Den. Res.* 42 : 1373~1379, 1963.
- Azuma, M. : Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experimental tooth movement. *Tokyo Med. Dent. Univ.* 17 : 149~178, 170.
- 유영규, 이인환 : 백서의 실험적 치아이동에 따른 치주 조직의 조직학적 연구, *대치교지*, 19 : 145, 1981.
- Rygh, P. and Reitan, K. : Ultrastructural changes in the periodontal ligament incident to orthodontic tooth movement. *Eur. Ortho. Soc Trans.* 48 : 393~405, 1972.
- Rygh, P. : Ultrastructural vascular changes in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic movement. *Scand. Dent. Res.* 80 : 307~321, 1972.

11. Rygh, P : Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar priondontium incident to orthodontic movement. *acta Odont. Scand.* 30 : 575~593, 1972.
12. Rygh, P. : Ultrastructural changes in pressure zones of human periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odont. Scand.* 31 : 109~122, 1973.
13. Rygh, P. : Periodontal responses to orthodontic forces in "malocclusion and the priondontium. Monograph No. 15, craniofacial series." ed. by McNamara, J. A. and Ribbens, K. A. 17~42, 1983.
14. Kurihara, S. : An electronic microscopic observation of cell found in bone resorption area incident to experimental tooth movement. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 24 : 103~123, 1977.
15. Davidovitch, Z. : Electric currents, bone remodeling, and orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod.* 77 : 14~31 ; 1980.
16. Yamasaki, K. : Clinical application of prostaglandin E₁ upon orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod.* 85 : 508~518, 1984.
17. Roberts, W. E., Goodwin, W. C. and Heiner, S. R. : Cellular response to orthodontic force. *Dent. Clin. North. Am.* 25 : 3~17, 1981.
18. Scherp. H. W. : Discussion of bacterial factors in periodontal disease. *J. Dent. Res.* 41 : 327~330, 1962.
19. Horton, J. E., Raisz, L. G., Simmons, H. A., Oppenheim, J. J. and Mergenhagen, S. E. : Bone resorbing activity in supernatant fluid from human peripheral blood leukocytes. *science* 177 : 793~794, 1972.
20. Rizzo, A. A. and Mergenhagen, S. E. : Histologic effects of endotoxin injected into rabbit oral mucosa. *Arch. Oral Biol.* 9 : 659~670, 1964.
21. Hausmann, E., Raisz, L. G. and Miller, W. A : Endotoxin stimulation of bone resorption in tissue culture. *science* 158 : 862, 1970.
22. Klein, D. C., and Raisz, L. G. : Prostaglandin : Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 86 : 1436~1439, 1970.
23. FMorrison, D. C., Cuncal Jr., J. L. and Goodman, S. A. : In vitro biological activities of endotoxin. In *Bacterial Endotoxin*. 81~98, Alan R. Liss, Inc. 1985.
24. Wahl, L. M., Wahl, S. M., Mergenhagen, S. E. and G. R. MARTIN : Collagenase production by endotoxin-activated macrophages. *proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71 : 3589, 1974.
25. Morrison, D. C. and Vlevitch, R. J. : The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am. J. Pathol.* 93 : 527, 1978.
26. Bradley S. G : Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial endotoxins, *Annu. Rev. Microbiol.* 33 : 67, 1979.
27. Hausmann, E : Endotoxin : stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science* 168 : 862, 1970.
28. Hausmann, E : Effects of lipopolysaccharide on bone resorption in tissue culture. *Calcif. Tissue Res.* 9 : 272, 1972.
29. Hausmann, E : Potential pathways for bone resorption in human periodontal disease. *J. Periodontol.* 45 : 338, 1974.
30. Hausmann, E : Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid. *J. Dent. Res.* 54 : 94, 1975.
31. Kiley, P. and Jolt, S. C : Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y-4 and N-27. *Infection and Immunity* 30 : 862, 1980.
32. Raisz, L. G., Alander, C., Eilon, G., Whitehead, S. P., and Nuki, K. : Effects of two bacterial products, muramyl dipeptide and endotoxin, on bone resorption in organ culture. *Calcif. Tissue Int.* 34 : 365, 1982.
33. Raisz, L. G., Nuki, K., Cynthia B. Alander and Craig, R. G. : Interactions between bacterial endotoxin and other stimulators of bone resorption in organ culture. *J. Periodon Res.* 16 : 1, 1981.
34. Peck, W. A., Burks, J. K., Wilkins, J., Rodan, S. B. and Rodan, G. A. : Evidence for preferential effects of parathyroid hormone, calcitonin and adenosine on bone and periosteum. *Endocrinology* 100 : 1357~1364, 1977.
35. Heersche, J. N. M., Herboer, M. P. M. and B. NG. : Hormone-specific suppression of adenosine 3', 5'-monophosphate responses in bone in vitro during prolonged incubation with parathyroid hormone, prostaglandin E, and calcitonin. *Endocrinology* 103 : 33~340, 1978.
36. Vaes, G. : On the mechanism of bone resorption. The action of parathyroid hormone on the excretion and synthesis of lysosomal enzymes and on the extracellular release of acid by cells. *J. Cells Biol.* 39 : 676~697, 1968.
37. Raisz, L. G. : Mechanism of bone resorption. In *Handbook of Physiology*. Vol. VII, Section 7, edited by Aurbach, G. D., 117~136, American Physiology Society, Washington D. C., 1976.
38. Reynolds, J. J. : Skeletal tissue in culture. In *the biochemistry and physiology of bone*. edited by Bourne, G. M. 69~126, Academic Press, New York. 1972.
39. Hall, G. E. and Kenny, A. D. : Bone resorption induced by parathyroid hormone and dibutyryl cyclic AMP : Role of carbonic anhydrase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238 : 778~782. 1986.
40. Hall, G. E., and Kenny, A. D. : Role of carbonic anhydrase

- in bone resorption induced by 1.25 dihydroxyvitamin D3 in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 37 : 134~142, 1985.
41. Hall, G. E., and Kenny, A. D. : Parathyroid hormone increases carbonic anhydrase activity in cultured mouse calvaria. *Calcif. Tissue Int.* 35 : 682, 1983.
 42. Hall, G. E., and Kenny, A. D. : Carbonic anhydrases and 1.25-dihydroxychole calciferol induced bone resorption. *Calcif. Tissue Int.* 36 : 461, 1984.
 43. Gay, C. V. and Mueller, W. J. : Carbonic anhydrase and osteoclasts : Localization by labeled inhibitor autoradiography. *Science* 183 : 432~434, 1974.
 44. Anderson, R. E., Schraer, H. and Gay, C. V. : Ultrastructural immunocytochemical localization in normal and calcitonin treated chick osteoclasts. *Anat. Rec.* 204 : 9~20, 1982.
 - 45.
 46. Westphal, O. and Jann, K. : Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol water and further application of the procedures. *Carbohydr. chem.* 5 : 83, 1965.
 47. Yamasaki, K. : The role of cyclic AMP, calcium and prostaglandins in the induction of osteoclastic bone resorption associated with experimental tooth movement. *J. Dent. Res.* 62(8) : 877~881, 1983.
 48. Vaes, G., and P. Jacques : Studies on bone enzymes : Distribution of acid hydrolases, alkaline phenyl phosphatase, cytochrome oxidase and catalase in subcellular fraction of bone tissue homogenates. *Biochem. J.* 97 : 389, 1965a.
 49. Maren, T. H. : Carbonic anhydrase : Chemistry, Physiology and inhibition. *Physiol. Res.* 47 : 595~781, 1967.
 50. Hall, G. E. and Kenny, A. K. : Role of Carbonic anhydrase in bone resorption : Effect of acetazolamide on basal and parathyroid hormone induced bone metabolism. *Calcif. Tissue Int.* 40 : 212~218, 1987.
 51. Waite, L. C., Volkert, W. A. and Kenny, A. D. : Inhibition of bone resorption by acetazolamide in the rat. *Endocrinology.* 87 : 1129~1139, 1970.
 52. Martin, C. and Jennings, J. : Carbonic anhydrase and bone remodeling : Sulfanilamide inhibition of bone resorption in organ culture. *Science.* 176 : 1031~1033, 1972.
 53. Raisz, L. G., Simmons, H. A., Thompson, W. J., Shepard, K. L., Anderson, P. S. and Rodan, G. A. : Effects of a potent carbonic anhydrase inhibitor on bone resorption in organ culture. *Endocrinology.* 122 : 1083~1086, 1988.
 54. Waite, L. D. : Carbonic anhydrase inhibitors, parathyroid hormone and calcium metabolism. *Endocrinology.* 91 : 1160~1165, 1972.
 55. Kenny, A. D. : Role of carbonic anhydrase on bone : Partial inhibition of disuse atrophy of bone by parenteral acetazolamide. *Calcif. Tissue Int.* 37 : 126~133, 1985.

—ABSTRACT—

EFFECTS OF CARBONIC ANHYDRASE INHIBITORS ON THE LPS-INDUCED BONE RESORPTION IN VITRO

Yang-Ho Park, D.D.S., Kyung-Suk Cha, D.D.S., M.S., Ph.D.

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Dan Kook University

To study bone resorption mechanism, effect of LPS on the ^{45}Ca release from fetal rat ulnae and radii, and effects of carbonic anhydrase inhibitors on the LPS-induced bone resorption in organ culture were studied.

Ulnae and radii were removed from 19 day old fetal rats, prelabelled by subcutaneous injection of $200\mu\text{Ci } ^{45}\text{CaCl}_2$ into their mother on the 17th day of gestation. Radioactivities of ^{45}Ca released into media were determined after 24, 48 and 72 hours. Effects of LPS and carbonic anhydrase inhibitors were observed by the ratio of % release of ^{45}Ca between paired control and experimental group. The observed results were as follows :

1. LPS($1\mu\text{g/ml}$) supplemented in media for 72hours increased the ^{45}Ca release significantly after 48 and 72 hours of culture and LPS($10\mu\text{g/ml}$) increased the ^{45}Ca release significantly after 72 hours of culture.
2. LPS-induced ^{45}Ca release was not inhibited significantly by 1mM sulfanilamide but inhibited significantly by 10mM sulfanilamide after 48 and 72 hours of culture.
3. LPS-induced ^{45}Ca release was not inhibited significantly by 0.1mM dichlorphenamide but inhibited significantly by 1mM dichlorphenamide after 48 and 72 hours of culture.
4. LPS-induced ^{45}Ca release was not inhibited significantly by 1mM acetazolamide but inhibited significantly by 5mM acetazolamide after 72 hours of culture.

KOREA J. ORTHOD 1994 ; 24(1) : 115-123.

Key words : Carbonic Arhydrase Inhibitor, Bone resorption