

Bisphosphonate가 흰쥐 치아 및 이틀뼈 성장에 미치는 영향

김현진, 김민석, 이미라, 정지연, 김원재, 김선현, 이은주

전남대학교 치의학전문대학원 치의학연구소

간추림 : Bisphosphonate는 뼈 조직 흡수를 억제하는 작용을 가지고 있으며, 교정적 치아 이동과 뼈조직 재생을 위한 여러 임상적 적용이 시도되고 있다. 본 연구는 bisphosphonate가 성장기 뼈 조직과 치아에 영향을 미친다는 전제 하에, 치아 맹출에 미치는 영향과 맹출 기전을 구명하고자 시도되었다.

출생 22일 흰쥐에서 대조군의 위, 아래 앞니 및 어금니는 모두 맹출되어 있었으나, bisphosphonate를 저농도 (0.5 mg/kg) 및 고농도 (2.5 mg/kg)로 10일간 투여후, 두 군 모두에서 모든 치아가 맹출되어 있지 않았다. Bisphosphonate 투여 대조군에서 첫째 및 둘째큰어금니의 법랑질모세포는 교두부를 포함하여 대부분 원주형의 분비기 형태를 보였으며, bisphosphonate에 의한 뚜렷한 변화 소견은 관찰되지 않았다. Bisphosphonate 투여군에서 법랑질 및 상아질 형성 과정에서 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았으나 치아 상방 이틀뼈는 대조군에 비하여 굵은 해면뼈 소견을 보였다.

대조군에서 아래턱 첫째큰어금니 상방 이틀뼈에 출현한 뼈파괴세포 수는 출생 3, 7, 10일 후에 각각 16.2 ± 3.9 , 30.5 ± 7.7 , 40.3 ± 2.1 개로 뼈파괴세포 수는 10일에서 최대 증가하였다 ($p < 0.05$). 저농도와 고농도의 bisphosphonate를 3일간 투여한 군에서 뼈파괴세포 수는 각각 21.5 ± 3.1 , 25.7 ± 2.3 개로 고농도 투여군에서 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.01$), 7일간 투여군에서도 41.5 ± 2.4 , 48.3 ± 7.0 개로 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.01$). 그러나 10일간 투여 군에서는 저농도 및 고농도 투여군에서 각각 28.3 ± 5.1 , 9.7 ± 9.6 개로 bisphosphonate 투여군에서 모두 현저하게 감소하였다 ($p < 0.01$). Bisphosphonate 투여 후 각 군에서 출현한 뼈파괴세포 크기는 대조군에서 $1081.6 \pm 299.8 \mu\text{m}^2$, 저농도군에서 $1017.3 \pm 514.9 \mu\text{m}^2$, 고농도군에서 $1282.2 \pm 123.8 \mu\text{m}^2$ 로 각 군 간에 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

이상의 결과는 bisphosphonate는 뼈파괴세포의 형성을 억제함으로써 치아 맹출을 억제하며, 치아 맹출에 뼈파괴세포의 작용이 필수적임을 시사하였다.

찾아보기 낱말 : bisphosphonate, 치아, 턱뼈, 발생

서 론

치아 맹출은 치아가 턱뼈내에서 기능적 위치로 이동하는 과정으로 치아 상방의 이틀뼈 흡수가 필수적이며, 이틀뼈 흡수에 뼈파괴세포가 주된 역할을

한다. 골화석증 (osteopetrosis)에서와 같이 뼈파괴세포 작용이 결핍되면 치아 맹출이 중단되거나 지연된다. 치아 맹출 과정은 대부분 유전적으로 결정되어 있으나 국소적 및 전신적 요인에 의하여 영향을 받는다.

Bisphosphonate는 강력하고 효과적인 뼈 흡수 억제제로써 골다공증이나 뼈조직 암의 전이 억제, 치아 이동, 치아 재식 및 임플란트 식립 등 다양한 영역에서 임상적 적용을 위한 연구가 진행되고 있다

*이 논문은 2004년도 전남대학교특별연구사업비 지원에 의하여 연구되었음.

교신저자: 김선현 (전남대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실)
전자우편: ksh@chonnam.ac.kr

(Ralston 등 1989, Boissier 등 2000, Levin 등 2001, Frenkel 등 2001). 세포 수준에서 bisphosphonate는 뼈파괴세포의 주름변연 소실 등 구조적 변화를 초래하여 뼈 흡수기능을 저하시키거나 큰포식세포나 뼈파괴세포의 세포사를 유도함으로써 뼈파괴세포수를 감소시킨다 (Hughes 등 1995, Ito 등 1999, Reszka 등 1999, Rogers 2000). 또한 bisphosphonate는 뼈파괴세포에 대한 직접적 영향 외에, 뼈파괴세포 전구세포의 증식과 순환을 억제하고 단핵구 융합을 억제함으로써 뼈파괴세포의 형성에 영향을 미친다 (Hughes 등 1989, Evans와 Braidman 1994).

치아는 치아가 형성되는 동안에 턱뼈 내에서 맹출성 이동과 비맹출성 이동을 한다. 형성기 치아가 이동하는 과정은 치아 주위 뼈 조직의 형성과 흡수가 필연적으로 따르게 된다. Bisphosphonate는 뼈파괴세포 및 뼈파괴세포 전구세포에 작용하여 상기 보고에서와 같이 뼈 조직 흡수를 억제하는 작용을 갖는 것으로 알려져 있어, bisphosphonate가 성장기 뼈 조직, 치배 형성 및 치아 맹출 과정에 어떠한 영향을 미치는 지를 구명함은, 향후 bisphosphonate가 임상적으로 다양한 영역에서 이용될 수 있다는 점을 고려할 때 의미 있는 연구라 생각된다.

치아 맹출을 유도하는 인자로는 치수 성장에 따른 치수내 혈관의 압력 상승, 치근 형성, 이틀뼈 성장, 치아 주위 혈관의 압력 변화, 치주인대의 수축력 및 치낭(dental follicle)의 작용 등이 제시되고 있다. 본 연구는 성장기 흰쥐에서 bisphosphonate의 이틀뼈 성장과 치아 맹출에 대한 영향과 기전을 밝히고자 시도되었다.

재료 및 방법

현재까지 임상적으로 이용되는 bisphosphonate 합성제제는 다양하며 P-O-P 기본 구조에 결사슬인 R¹과 R²를 변화시킴으로써 얻는다. 본 연구에 사용된 bisphosphonate는 결사슬에 nitrogen을 함유하고 있는 alendronate (MK-217[®], Merck, USA)로써 그 화학적 구조는 {(4-amino-hydroxybutylidene)bis-phosphonate}이다.

생후 1일 된 Sprague-Dawley계 흰쥐의 목 뒤 피하에 alendronate를 저농도(0.5 mg/kg)와 고농도(2.5 mg/kg)로 주사용 증류수에 희석하여 매일 1회, 3, 7일 및 10일간 각각 주사하였다. 대조군으로 실험군과 같은 모체에서 출산한 쥐를 이용하였으며 동일 부위에 생리식염수를 주사하였다. 10일간 주사한 흰쥐에서 출생 22일에 각 군 당 2마리를 에테르 마취 후 희생시켜, 앞니와 어금니의 맹출 상태를 육안으로 확인하고 사진 촬영을 하였다.

약물투여 3, 7일 및 10일에 에테르 마취하에 각 군 당 4마리씩 희생하여 위, 아래턱뼈를 포함하여 절제한 후 4% paraformaldehyde 용액에 24시간 동안 침윤 고정하였다. 이어 EDTA 용액 (pH 7.4, 4°C) 또는 5% nitric acid에서 약 1주에서 2달간 탈회후 탈수 과정을 거쳐 xylene에 투명한 후 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직으로부터 4 μm 내외의 시상 연속절편을 얻어 H-E 염색을 시행하였다.

Alendronate 및 식염수 투여 3, 7일 및 10일 군으로부터 얻은 연속절편 중 중심부 절편을 확인하여 아래턱 첫째어금니 교합면 상방의 이틀뼈와 치낭에 존재하는 뼈파괴세포 수와 세포 크기를 측정하였다. 먼저 치아의 근심면과 원심면을 닿는 수선을 긋고, 수선에 포함된 교합면 상방의 이틀뼈를 설정하였다. 뼈파괴세포의 크기 측정을 위하여 in situ image analysis system (Carl Zeiss Vision Co., LTD, Germany)

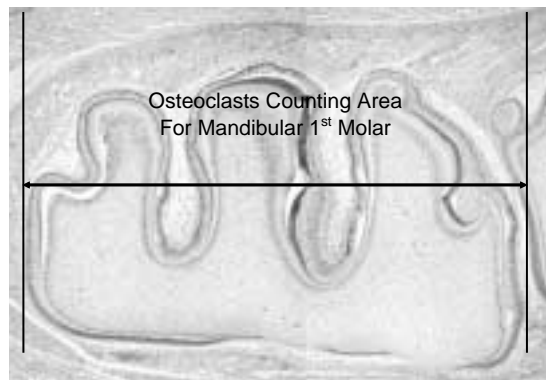


Fig. 1. Osteoclasts counting area for the mandibular 1st molar at postnatal day 3. The area is confined within the upper rectangular box.

을 이용하여 20개의 뼈파괴세포로부터 화상을 얻은 후, KS Lite 프로그램을 이용하여 면적을 측정하였으며 (Fig. 1) 얻어진 결과는 Student's *t* 검정을 시행, 분석하였다.

결 과

1. 육안적 관찰

각 군간의 alendronate 투여 3, 7, 10일 후 체중 차이는 뚜렷하지 않았으나, 고농도 투여 10일 군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 출생 22일 흰쥐에서 대조군의 앞니 및 큰어금니는 모두 맹출되어 있었으나 (2a, c), alendronate를 10일 투여군에서는 고농도 및 저농도 두 군 모두에서 모든 치아가 맹출되어 있지 않았다. 이틀뼈는 치아 미맹출에 따라 그 폭이 대조군에 비하여 감소되어 있었다 (Fig. 2b, d).

2. 광학현미경적 소견

3일 대조군에서 아래턱 첫째 및 둘째큰어금니가 형성되고 있었으며 셋째큰어금니 치배는 형성되어 있지 않았다. 첫째큰어금니는 경조직 형성기가 이미 시작되어 시멘트질법랑질경계까지 진행되어 치관부 경계를 뚜렷이 설정할 수 있었다. 법랑질모세포는 교두부를 포함하여 대부분 긴 원주형의 분비기 형태를 보였으며, 다근치 형성을 위한 상피격막 (epithelial diaphragm)이 형성되기 시작하였다. 둘째큰어금니는 첫째큰어금니에 비하여 발육 정도가 낮았다. 즉, 교두부 외형은 형성되어 있었으나 법랑질과 상아질 형성은 대부분 교두 주위에 머물러 있었다 (Fig. 3). 모든 어금니에서 alendronate에 의한 뚜렷한 변화 소견은 관찰되지 않았으나 다수의 뼈파괴세포가 존재하고 있었다 (Fig. 4).

10일 대조군에서 큰어금니는 모두 법랑질 및 상아질이 활발히 형성되고 있었으며, 특히 교두 주위 법랑질모세포는 법랑질 형성이 모두 끝나고 입방형 또는 납작한 형태의 보호기에 머물러 있었다 (Fig. 5). 10일 alendronate 투여군에서 법랑질 및 상아질

형성 과정에서 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았으며 대조군과 유사한 형성 소견을 보였다. 그러나 뼈파괴세포의 수가 현저히 감소되어 있었고, 치아 상방 이틀뼈는 대조군에 비하여 굵은 해면뼈 소견을 보였다 (Fig. 6).

3. 형태계측학적 소견

대조군에서 첫째큰어금니 상방 이틀뼈에 출현한 뼈파괴세포 수는 출생 3, 7, 10일 후에 각각 16.2 ± 3.9 , 30.5 ± 7.7 , 40.3 ± 2.1 개였고, 둘째큰어금니에서는 각각 13.2 ± 2.7 , 20.5 ± 8.5 , 39.3 ± 0.6 개였다. 즉, 큰어금니 모두에서 뼈파괴세포는 10일에서 최대로 증가하였고, 뼈파괴세포 수는 두 치아 간에 유사한 증가 유형을 보였으며 동일 시기에 뼈파괴세포 수의 차이는 뚜렷하지 않았다 (Fig. 7).

첫째큰어금니 상방에 출현한 이틀뼈의 뼈파괴세포 수는 3일군에서 alendronate 저농도와 고농도 투여군에서 각각 21.5 ± 3.1 , 25.7 ± 2.3 개로 고농도 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.01$), 7일군에는 41.5 ± 2.4 , 48.3 ± 7.0 개로 저농도 투여군 ($p < 0.05$)과 고농도 투여군 ($p < 0.01$)에서 모두 유의하게 증가하였다. 그러나 10일군에는 저농도와 고농도 투여군에서 각각 28.3 ± 5.1 , 9.7 ± 9.6 개로 모두 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다 ($p < 0.01$) (Fig. 8).

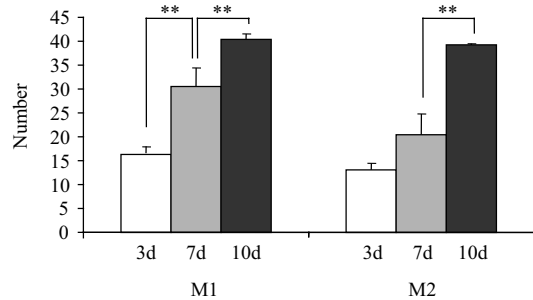


Fig. 7. The numbers of osteoclasts seen in the alveolar bone overlying the mandibular 1st and 2nd molars in the control group. The numbers significantly increased in a time dependent manner. The numbers are represented as mean \pm SE. M1 : mandibular 1st molar, M2 : mandibular 2nd molar, d : days, n = 4 in each group. **: $p < 0.01$.

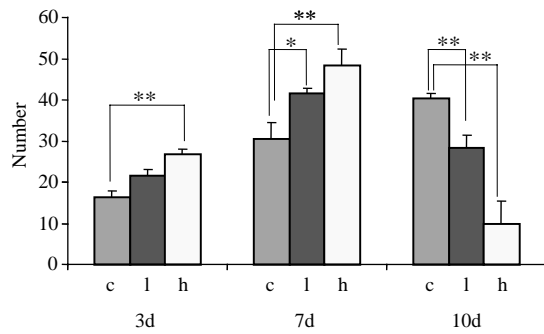


Fig. 8. The numbers of osteoclasts seen in the overlying alveolar bone occlusal to the mandibular 1st molar. The numbers are represented as mean±SE. Comparison was made between the control and the experimental groups at each day. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, d : day, c : control, l : 0.5 mg/kg alendronate, h : 2.5 mg/kg alendronate, $n = 4$ in each group.

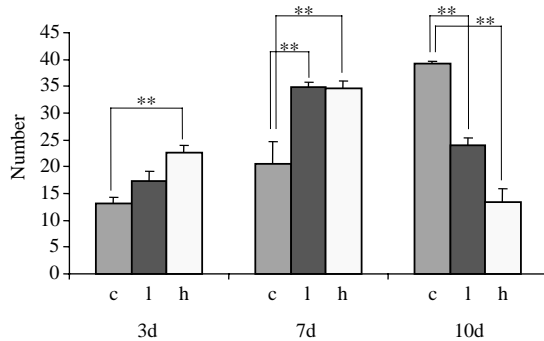


Fig. 9. The numbers of osteoclasts seen in the overlying alveolar bone occlusal to the mandibular 2nd molar. The numbers are represented as mean±SE. Comparison was made between the control and the experimental groups. *: $p < 0.01$, d : day, c : control, l : 0.5 mg/kg alendronate, h : 2.5 mg/kg alendronate, $n = 4$ in each group.

둘째큰어금니 상방 이틀뼈의 뼈파괴세포 수 변화는 첫째큰어금니에서와 유사하였다. 즉, 3일 저농도와 고농도 alendronate 투여군에서 각각 17.3 ± 3.6 , 22.7 ± 2.1 개로 고농도 투여군에서 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.01$), 7일 후에도 각각 34.8 ± 1.7 , 34.7 ± 2.1 개로 alendronate 투여군에서 모두 유의하게 증가하였다. 그러나 10일 후에는 저농도군과 고농도군에

서 24.0 ± 2.6 , 13.3 ± 4.7 개로 모두 유의하게 감소하였다 ($p < 0.01$) (Fig. 9).

뼈파괴세포 크기는 대조군에서 $1081.6 \pm 299.8 \mu\text{m}^2$, alendronate 투여 저농도군에서 $1017.3 \pm 514.9 \mu\text{m}^2$, 고농도군에서 $1282.2 \pm 123.8 \mu\text{m}^2$ 로 각 군 간에 유의한 차이가 없었다.

고 찰

본 연구는 bisphosphonate가 뼈파괴세포에 영향을 미치며, 따라서 궁극적으로 치아 맹출에 영향을 미칠 것이라는 전제 하에 치아 맹출 기전을 구명하고자 시도되었다. Bisphosphonate는 phosphoether 결합 구조(P-C-P backbone)를 가지고 있고, 생체에 존재하는 inorganic pyrophosphate가 형성하는 phosphoanhydride 결합 구조(P-O-P backbone)와 화학적으로 유사하여 뼈파괴세포에 의한 뼈 흡수를 억제한다 (Russel 등 1970). 나아가 phosphoether 결합 구조는 phosphoanhydride 결합 구조에 비하여 생체에 존재하는 pyrophosphatase 효소나 산성 조건 하에서도 쉽게 분해되지 않는다. 본 연구에 사용된 bisphosphonate는 alendronate로써 R²기에 nitrogen을 포함하고 있으며, 그 작용 기전으로 mevalonate로부터 farnesyl diphosphate와 geranylgeranyl diphosphate가 합성되는 과정을 억제한다. 이들 물질의 합성이 억제되면 prenylation의 장애를 초래하여 small GTPase 등, GTP binding protein 기능이 소실되게 되고, 궁극적으로 뼈파괴세포에 대한 다양한 작용, 즉 뼈파괴세포의 형성 억제, 뼈 흡수 기능 억제 및 고농도에서 뼈파괴세포 세포사 등이 나타나게 된다 (Evans 1994, Rogers 1996, Ito 등 1999, Reszka 등 1999, Halasy-Nagy 등 2001).

치낭은 치아형성기의 치아주위 결합조직으로 이틀뼈 흡수에 의한 치아 맹출로를 만드는 역할을 하며, 따라서 치아 맹출에 직, 간접적인 영향을 미치게 된다. 그러나 치낭의 어떠한 작용에 의하여 뼈 흡수가 조절되는지에 대하여는 아직도 확실하지 않다. 다만 치낭에 치아 맹출을 유도하는 인자가 전달되면 치낭내 세포가 단핵구를 유도하는 물질을 분비

하여 뼈파괴세포를 형성한다는 가정이 제기되고 있다(Wise와 Fan 1989, Cielinski 등 1994, Wise 1998). 즉, 흰쥐 치낭세포는 colony stimulating factor (CSF-1)과 monocyte chemoattractant factor (MCP-1)과 같은 cytokine을 분비하며 단핵구가 치낭 내에 가장 많이 모이는 출생 3일경에 최대로 발현된다. 또한 MCP-1의 발현은 EGF, TGF- β 1, IL-1 α 등 여러 물질에 의하여 조절된다(Wise와 Lin 1994, 1995, Que와 Wise 1998). 본 연구에서 뼈파괴세포 수는 출생 3, 7, 10일 중 10일에서 가장 많이 출현하였다. 상기 보고를 인용하면 3일에서 cytokine이 최대로 증가되었음은 3일 이후 그 효과, 즉 뼈파괴세포의 형성 및 출현이 왕성해짐을 의미한다. 본 연구의 3일에서 첫째 큰어금니에서 상피격막이 형성되기 시작하였으며 이는 치근 형성에 따라 맹출이 시작된 것으로 간주될 수 있다. 출생 후 10일 큰어금니 모두에서 교두 법랑질의 형성이 완료되어 법랑질모세포가 보호기에 머물러 있었으며 이는 치관부의 크기가 모두 결정되어 있음을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 단위 면적당 뼈파괴세포의 수를 산정하지 않고 교두 상방의 전체 뼈파괴세포 수를 세었기 때문에 3일에 비하여 10일에서 뼈파괴세포 수가 유의하게 증가되었으리라 판단된다.

생체에서 뼈파괴세포에 노출되는 bisphosphonate의 약리적 농도 범위는 확실하지 않으며, 또한 in vivo 상태와 유사한 in vitro 농도를 추정하기는 어렵다. 이는 bisphosphonate의 대사율을 결정하기 어렵고, bisphosphonate가 무기질과 결합하는 성질을 가지고 있어 bisphosphonate 일부가 뼈에 침착되기 때문이다. Pamidronate는 환자에서 정맥 투여 후 혈장 농도가 10^{-5} M에 달하며, 이 농도에서 뼈에 빨리 축적되며(Cheung 등 1994, Oiso 등 1994, Berenson 등 1997), alendronate 투여 후 뼈흡수 공간에서 높게는 10^{-3} M 농도로 축적된다(Sato 등 1991). 본 연구에서 투여한 alendronate 투여 농도는 매일 1 mg/kg와 2.5 mg/kg였다. 상기 농도는 흰쥐의 체중과 혈장의 비율을 고려하여 alendronate가 100% 혈장 내에 흡수됨을 전제로 할 때, 1회 투여시 상기 보고자의 농도에 달한다. 그러나 본 연구에서는 길게는 10일간 매일 투여하였기 때문에 3일 또는 10일 후의 뼈파괴세포

에 노출되는 alendronate 농도는 흡수율과 신장을 통한 배설 등을 고려하여 결정되어야 하리라 사료된다.

본 연구에서 0.5 mg/kg와 2.5 mg/kg 농도에서 투여 3일과 7일 후에 큰어금니에서 모두 뼈파괴세포 수가 예상하였던 바와 달리 오히려 증가하였다. 뼈파괴세포 수가 증가한 이유는 현재까지 알려진 bisphosphonate의 약리작용으로는 설명하기 힘들다. 다만 투여 초기에는 alendronate의 축적된 농도가 낮은 상태로 뼈파괴세포의 기능을 분자적 수준에서 억제하나, 단핵구 또는 뼈모세포 작용 등에 의한 뼈파괴세포의 형성을 억제하지 못한 것으로 사료된다. 따라서 투여 7일까지의 농도에서 alendronate는 이미 형성된 뼈파괴세포의 작용을 억제하나, 뼈파괴세포의 작용이 억제됨으로써 뼈 흡수가 지연되고 따라서 치아 맹출을 보상하기 위하여 상대적으로 저농도에서 뼈파괴세포의 수가 오히려 증가된 것으로 사료된다.

한편 뼈파괴세포 수는 3일과 7일에서는 감소하지 않았으나 10일째에는 큰어금니 모두에서 공히 유의하게 감소하였다. 이는 alendronate가 투여 10일 경에 혈중 농도가 유의하게 증가되었음을 의미하며, 높은 농도에서 뼈파괴세포 외에 뼈모세포, 종양세포, 골수세포 등 여러 종류의 세포에서 세포수의 감소를 초래한다는 보고와 일치한다(Hughes 등 1995, Shipman 1997, Aparicio 1998, Garcia-Moreno 등 1998, Ito 등 1999, Reszka 등 1999). 그러나 이와 같은 차이는 사용한 세포의 차이, bisphosphonate의 종류, 처리 시간 및 농도 등 추후 엄격히 통제된 상황에서 재해석되어야 하리라 사료된다. 또한 본 연구에서 뼈파괴세포의 크기는 투여군과 대조군 사이에 차이가 없었다. 이는 뼈파괴세포 자체가 단핵구의 융합에 의하여 형성되기 때문에 크기 차이에 큰 편차가 있기 때문으로 여겨진다.

종합적으로 bisphosphonate 제제는 뼈파괴세포에 작용하여 뼈파괴세포의 형성과 기능을 억제하는 영향을 미치며, 뼈파괴세포의 작용은 치아맹출 기전을 설명하는데 중요한 요소임을 알 수 있었다. 또한 bisphosphonate 제제는 치아 맹출에 영향을 미치므로 치아 맹출 중인 어린이에게 사용이 신중히 고려

되어야 한다.

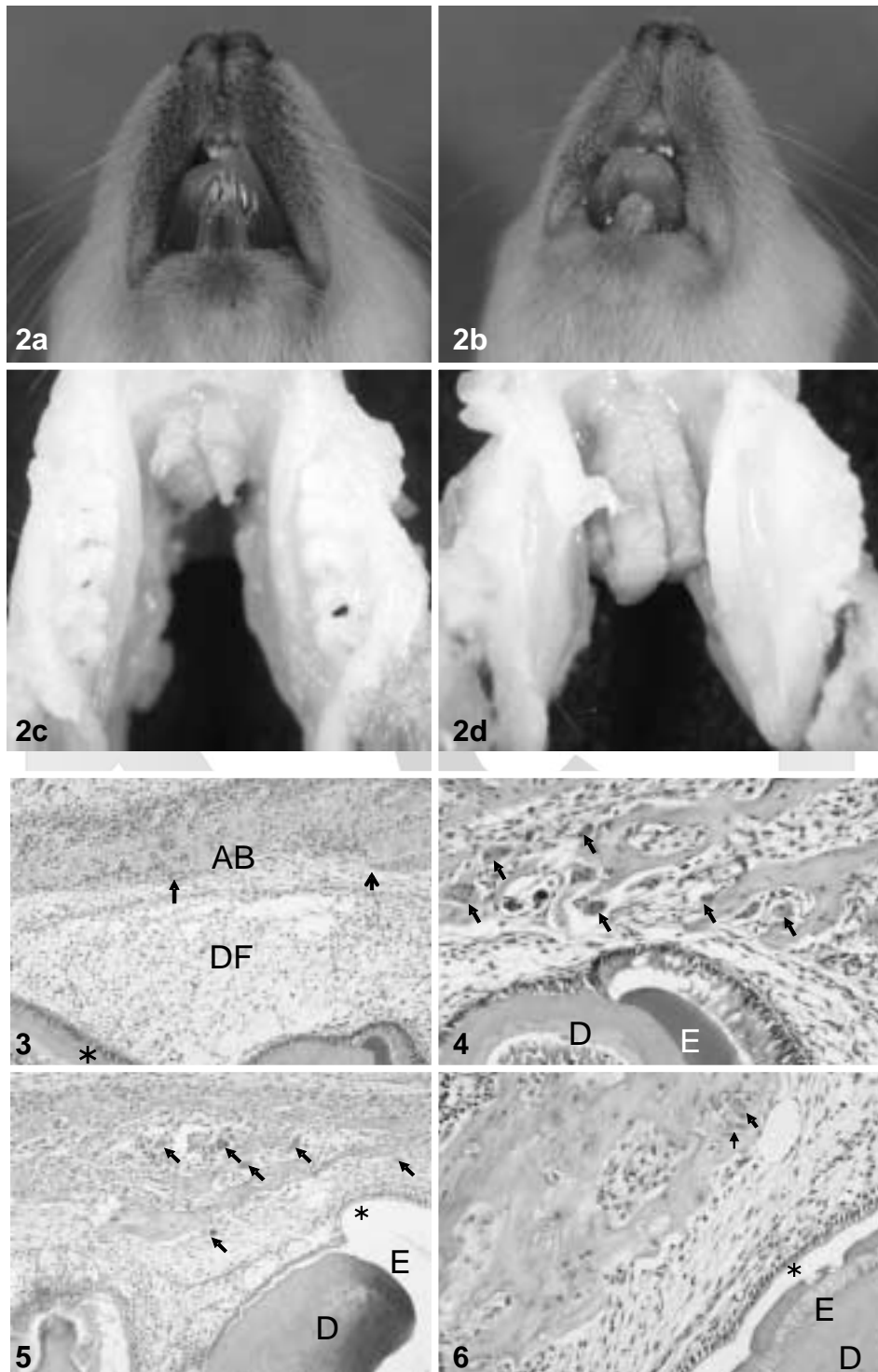
참 고 문 헌

- Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J, Lichtenstein A : In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia* 12 : 220-229, 1998.
- Berenson JR, Rosen L, Vescio R, Lau HS, Woo M, Sioufi A, Kowalski MO, Knight RD, Seaman JJ : Pharmacokinetics of pamidronate disodium in patients with normal or impaired renal function. *J Clin Pharmacol* 37 : 285-290, 1997.
- Boissier S, Perreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino F, Colombel M, Delmas P, Delaisse JM, Clezardin P : Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastasis. *Cancer Res* 60 : 2949-2954, 2000.
- Cheung WK, Brunner L, Schoenfeld S, Knight R, Seaman J, Brox A, Batist G, John V, Chan K : Pharmacokinetics of pamidronate disodium in cancer patients after single intravenous infusion of 30-, 60-, or 90-mg dose 4 or 24 hours. *Am J Ther* 1 : 228-235, 1994.
- Cielinski MJ, Jolie M, Wise GE, Ando DG, Marks SC Jr : Colony stimulating factor-1 (CSF-1) is a potent stimulator of tooth eruption in the rat. In: Davidovitch Z, ed. The biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants. Birmingham. AL: EBSCO Media 429-436, 1994.
- Evans, CE, Braidman, IP : Effects of two novel bisphosphonates on bone cells in vitro. *Bone Miner* 26 : 95-107, 1994.
- Frenkel SR, Jaffe WL, Valle CD, Jazrawi L, Maurer S, Baitner A, Wright K, Sala D, Hawkins M, Di Cesare PE : The effect of Alendronate (Fosamax™) and implant surface on bone integration and remodelling in a canine model. *Biomed Mater Res* 58 : 645-650, 2001.
- Halasy-Nagy JM, Rodan GA, Reszka AA : Inhibition of bone resorption by alendronate and resedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone* 29 : 553-559, 2001.
- Hughes DE, MacDonald BR, Russell RGG, Gowen M : Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest* 83 : 1930-1935, 1989.
- Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF : Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 10 : 1478-1487, 1995.
- Ito M, Amizuka N, Nakajima T, Ozawa H : Ultrastructural and cytochemical studies on cell death of osteoclasts induced by bisphosphonate treatment. *Bone* 25 : 447-452, 1999.
- Levin L, Bryson EC, Caplan D, Trope M : Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. *Dental Traumatology* 17 : 120-126, 2001.
- Oiso Y, Tomita A, Hasegawa H, Ariyoshi Y, Niinomi M, Yamamoto M, Takano T, Sakiyama N : Pamidronate treatment with tumor-associated hypercalcemia: pharmacological effects and pharmacokinetics. *Endocr J* 41 : 655-661, 1994.
- Que BG, Wise GE : Tooth eruption molecules enhance MCP-1 gene expression in the dental follicle of the rat. *Dev Dyn* 212 : 346-351, 1998.
- Ralston S, Patel U, Fraser W, Gallaacher S, Dryburgh F, Cowan R, Boyle I : Comparison of three intravenous bisphosphonates in cancer-associated hypercalcemia. *Lancet* 18 : 1180-1182, 1989.
- Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ, Rodan GA : Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of Mst1 kinase during apoptosis. *J Biol Chem* 274 : 34967-34973, 1999.
- Rogers MJ, Chilton KM, Coxon FP, Lawry J, Smith MO, Suri MO, Suri S, Russell RGG : Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism. *J Bone Miner Res* 11 : 1482-1481, 1996.
- Rogers MJ, Gordon S, Benfords HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC : Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88(Suppl. 12) : 291-2978, 2000.
- Russel RGG, Muhlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H : The influences of pyrophosphates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res* 6 : 183-196, 1970.
- Sato M, Grosser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD : Bisphosphonates action. Alendronate localization

- in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 88 : 2095–2105, 1991.
- Shipman CM, Rogers MF, Apperley JF, Russell GG, Croucher PI : Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Br J Haematol* 98 : 665–672, 1997.
- Wise GE : In vivo effect of IL-1 α on CSF-1 gene expression in the dental follicle of the rat molar. *Arch Oral Biol* 43 : 163–165, 1998.
- Wise GE, Fan W : Changes in the tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. *J Dent Res* 68 : 150–156, 1989.
- Wise GE, Lin F : Regulation and localization of colony-stimulating factor-1 mRNA in cultured rat dental follicle cells. *Arch Oral Biol* 39 : 621–627, 1994.
- Wise GE, Lin F : The molecular biology of initiation of tooth eruption. *J Dent Res* 74 : 303–306, 1995.
- Wise CE : In vivo effect of interleukin-1 α on colony stimulating factor-1 gene expression in the dental follicle of the rat molar. *Arch Oral Biol* 43 : 163–165, 1998.

Legend of Figures

- Fig. 2.** The central incisor (a) and the 1st and 2nd molars (c) are seen from the mandibles of control group at postnatal day 22. In contrast, any anterior (b) and posterior teeth (d) are not seen in alendronate (0.5 mg/kg) treated group at the same age.
- Fig. 3.** The mandibular 1st molar, its large dental follicle (DF) and overlying alveolar bone (AB) at postnatal day 3 in the control. A few osteoclasts (arrows) are seen in the alveolar bone. Thin layer of enamel was formed under the formative stage of ameloblasts (*). H-E stain, $\times 150$.
- Fig. 4.** The mandibular 1st molar, and its overlying alveolar bone after 2.5 mg/kg alendronate treatment at postnatal day 3. Many osteoclasts (arrows), some of which are detached from bone surface, are seen in the alveolar bone. H-E stain, $\times 300$.
- Fig. 5.** The mandibular 1st molar, and its overlying alveolar bone in the control group at postnatal day 10. Many osteoclasts (arrows) are seen in the alveolar bone. D : dentin, E : enamel, * : reduced enamel epithelium, H-E stain, $\times 300$.
- Fig. 6.** The mandibular 1st molar, and its overlying alveolar bone after 2.5 mg/kg alendronate treatment at postnatal day 10. A few osteoclasts (arrows) are engaged in the resorption of the thickened alveolar bone. E : enamel, D : dentin, * : reduced enamel epithelium. H-E stain, $\times 450$.



Abstract

Effects of Bisphosphonate on the Tooth and Alveolar Bone Growth in Rats

**Hyun-Jin Kim, Min-Seok Kim, Mi-Ra Lee, Ji-Yeon Jung,
Won-Jae Kim, Sun-Hun Kim, Eun-Ju Lee**

Dental Science Research Institute, School of Dentistry, Chonnam National University

Eruptive movement of the tooth germ accompanies the resorption and formation of the surrounding alveolar bone. Bisphosphonate has effects on osteoclasts to inhibit bone resorption, being currently used for the treatment of bone disease such as osteoporosis.

This study was conducted to elucidate effects of bisphosphonate on tooth eruption in growing rats. Alendronate, a derivative of bisphosphonate, was injected into newborn rats at the concentration of 0.5 mg/kg and 2.5 mg/kg for 3, 7 and 10 days.

The incisor and molar teeth normally erupted at postnatal 22 days in the saline-treated control group, whereas no teeth could not be seen in both groups of the alendronate treatment. No conspicuous histological changes could not be found in the teeth germs in the alendronate treated rats. The number of osteoclasts in both the first and the second molars was maximum on the postnatal day 10. The number of osteoclasts significantly increased by both 3 and 7 days of alendronate treatment ($p < 0.01$). But the number significantly decreased by 10 days of alendronate treatment in both concentrations ($p < 0.01$). The size of osteoclasts was not different between the control and alendronate groups.

Thus, these results suggest that bisphosphonate acts on osteoclast formation to inhibit bone resorption and subsequent tooth eruption.

Key words : Bisphosphonate, Tooth, Development