

Bisphosphonate가 무릎관절 연골판 뼈 형성에 미치는 영향

이은주, 김현진, 이계혁, 김민석, 박하옥, 김원재, 김선현
전남대학교 치과대학 치의학연구소

간추림 : Bisphosphonate는 뼈 흡수를 억제하는 작용을 가지며 그 기전을 밝히는 연구가 시도되고 있다. 연골 흡수는 연골파괴세포(chondroclast)에 의하며 연골파괴세포는 뼈파괴세포(osteoclast)와 같은 분화 및 운명을 겪게 되므로 bisphosphonate가 연골 흡수 및 발육 과정에 영향을 미칠 것으로 가정된다. 뼈끝연골판(epiphyseal plate)은 긴 뼈의 길이 성장에 중요한 역할을 하며 뚜렷한 연골세포층을 형성하고 있고, 뼈발생중심이 출현하기 때문에 뼈의 성장을 연구하는데 좋은 모델이 되고 있다. 본 연구는 성장기 흰쥐 뼈끝연골판에서 bisphosphonate 제제인 alendronate가 연골 흡수 및 골화 과정에 미치는 영향을 구명하고자 시도되었다.

생후 10일간 약물투여한 군에서 정강뼈 몸쪽뼈끝부위와 넙다리뼈 먼쪽뼈끝부에 출현한 이차뼈발생중심의 크기는 실험군에서 대조군에 비하여 유의하게 작았다($p < 0.01$). 이차뼈발생중심에 출현한 뼈파괴세포 또는 연골파괴세포 수는 정강뼈와 넙다리뼈 모두에서 alendronate 투여군에서 유의하게 감소되어 있었으며($p < 0.01$), 뼈파괴세포의 평균 크기는 큰 편차로 인하여 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 뼈끝연골판의 증식연골세포층 두께는 정강뼈와 넙다리뼈에서 모두 대조군과 유의한 차이가 없었으나($p > 0.05$) 비대연골세포층 두께는 정강뼈와 넙다리뼈 모두 alendronate 투여에 의하여 유의하게 증가되어 있었다($p < 0.01$). 연골이 흡수되어 뼈로 대체되는 부위, 즉 석회화 경계면에 출현하는 연골파괴세포 수 또한 alendronate 투여에 의하여 유의하게 감소되었다($p < 0.01$). 이상의 결과는 bisphosphonate는 연골파괴세포 작용 억제를 통하여 연골 흡수를 억제하는 작용을 가짐을 시사하며, 연골기질에 미치는 작용 등에 대하여 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

찾아보기 낱말 : bisphosphonate, 연골판, 뼈 발생중심

서론

Bisphosphonate는 생체에 존재하는 inorganic pyrophosphate와 유사한 화학적 구조를 갖는 합성유도체로써, phosphoanhydride 결합을 형성하는 inorganic pyrophosphate와는 달리 phosphoether 결합에 의하여 탄소 원자에 연결되어 있기 때문에 pyrophosphatase나 산성 조건 하에서도 쉽게 가수분해 되지 않으며, 생체에서 광물질 침착을 억제하는 작용을 갖

는다(Russel 등 1970). Bisphosphonate의 이와 같은 성질을 응용하여 뼈조직 대사장애, 치과영역에서 치아 이동, 뼈 대사 장애의 일종인 골다공증이나 뼈조직 암전이 억제 치료, 과도한 뼈파괴세포 작용에 의한 질환 치료 등 다양한 영역에서 임상적 적용을 위한 연구가 시도되고 있다(Ralston 등 1989, Boissier 등 2000).

Bisphosphonate는 뼈파괴세포 형성과 분화 과정에 관여하여 뼈파괴세포 수를 감소시키며 고농도에서 뼈파괴세포에 직접 작용하여 세포사멸을 유도하기도 한다(Hiroi-Furuya 1999, Halasy-Nagy 등 2001). 최근 bisphosphonate가 연골 흡수를 억제하는 작용을 갖는다는 보고 이후(Lehmann 등 2002) 연골

*이 논문은 2002년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

교신저자: 김선현(전남대학교 치과대학 치의학연구소)
전자우편: ksh@chonnam.ac.kr

흡수과정에서 bisphosphonate의 작용 기전을 밝히는 연구가 시도되고 있다. 연골은 뼈와 달리 흡수와 생성이 활발하지 않다. 그러나 과도한 외상이나 관절염과 같은 병적인 상태에서는 흡수가 일어난다. 연골 흡수는 주로 연골파괴세포에 의하며 연골파괴세포는 뼈파괴세포와 같은 분화 및 운명을 겪게 되므로 bisphosphonate가 연골 발육 과정에 영향을 미칠 것으로 가정된다.

긴뼈 발육 과정에서 일차뼈발생중심(primary ossification center)의 출현에 의하여 뼈몸통이 형성되고 이어 이차뼈발생중심(secondary ossification center)이 출현하여 뼈끝이 형성된다. 연골관(cartilage canal)은 연골 골화 과정에서 혈관 침입에 의하여 형성되며, 뼈모세포를 제공하는 중요한 매개 인자가 된다. 뼈발생중심 상하에서 뼈발생이 진행됨에 따라 일시적으로 남게 되는 연골 부위를 뼈끝연골판(epiphyseal plate)이라 한다. 뼈끝연골판에는 연골세포가 여러 층으로 출현하고 따라서 뼈끝연골판은 bisphosphonate가 연골 흡수 및 골화 과정에 미치는 영향을 구명하는 데 좋은 모델이 될 수 있다. 본 연구에서는 긴뼈 뼈발생중심의 골성장과 연골 흡수 과정에 bisphosphonate가 미치는 영향을 구명하고자 시도되었다.

재료 및 방법

1. Bisphosphonate 투여

생후 1일된 15마리의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대상으로 alendronate {(4-amino-hydroxybutylidene)bis-phosphonate} (MK-217®, Merck, USA)를 매일 1회, 1 mg/kg 농도로 10일간 목 뒤 피부밑조직에 주사하였다. 대조군으로 실험군과 같은 나이의 15마리를 이용하였으며 동일 부위에 생리식염수를 10일간 매일 주사하였다.

2. 광학현미경 관찰 및 형태 계측

약물투여 10일 후 에테르(ether) 마취를 유도하고 희생하여 정강뼈와 넓다리뼈를 포함한 무릎관절부

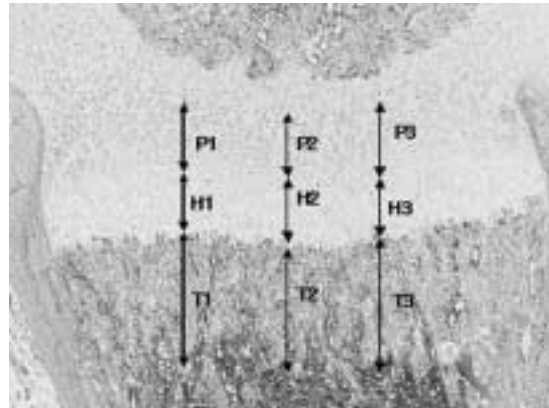


Fig. 1. Measurements of thickness of the proliferating (P), and hypertrophied cartilage layers (H) and trabecular bone length (T) from the proximal tibia at 10 days. Anterior (1), middle (2) and posterior (3) length and thickness were measured and averaged in each layer.

를 절취하여 10% 중성 완충 포르말린 용액에 24시간 동안 고정하였다. 이어 EDTA 용액 (pH 7.4, 4°C)에 탈회하고 알콜 탈수 과정을 거쳐 xylene에 투명한 후 파라핀 속에 포매하였다. 포매된 조직에서 4 μm 내외의 시상 연속절편을 제작 후 무릎관절부위의 정중시상단면 표본을 얻어 hematoxylin-eosin 염색을 시행하고 광학현미경으로 관찰하였다.

정중 시상 연속절편 중 최대 단면적을 갖는 표본을 대상으로 정강뼈 몸쪽뼈끝부위와 넓다리뼈 먼쪽뼈끝부의 뼈끝연골판 바로 밑 부위와 이차뼈발생중심부 중앙 부위를 200배 사진 촬영한 후, 뼈끝연골판 밑에 접하고 있는 연골파괴세포 수 및 이차뼈발생중심에 출현한 뼈파괴세포 수와 크기를 측정하였다. 또한 정강뼈와 넓다리뼈의 이차뼈발생중심을 50배 저배율 촬영 후 크기를 in situ image analysis system (Carl Zeiss Vision Co., LTD, Germany)을 이용하여 화상을 얻은 후, KS Lite 프로그램을 이용하여 이차뼈발생중심 및 뼈끝연골판 크기를 각각 측정하였다. 뼈끝연골판 크기는 증식연골세포대와 비대연골세포대의 두께를 전, 중간, 후로 구분하여 3곳에서 측정하였으며 3곳의 평균치를 구하였다. 위에서 얻어진 결과는 t-검정을 시행, 분석하였다(Fig. 1).

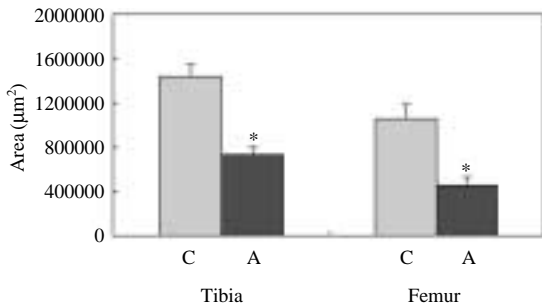


Fig. 2. Cross sectional area of cartilage canal in the proximal epiphysis of the tibia and distal epiphysis of the femur at 10 days of alendronate administration. The areas of the control group (C) are significantly larger than those in alendronate group (A) in both the femur and the tibia ($p < 0.01$). The data represent mean \pm SD from $n = 4$ in each group.

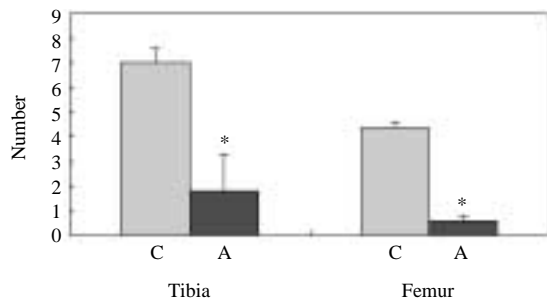


Fig. 3. Number of chondroclasts in the cartilage canal in the proximal epiphysis of the tibia and the distal epiphysis of the femur at 10 days of alendronate administration. Chondroclasts are significantly decreased by the administration ($P < 0.01$). The data represent mean \pm SD from $n = 4$ in each group. A : alendronate group, C : control group

결 과

대조군과 실험군에서 체중 차이는 없었다.

정강뼈 위쪽 뼈끝에 출현한 연골관의 크기는 대조군에서 $1,438,047 \pm 280,213 \mu\text{m}^2$, 실험군에서 $737,230 \pm 139,387 \mu\text{m}^2$ 로 유의한 차이를 보였다. 또한 넙다리뼈 아래쪽 뼈끝부위에 출현한 연골관의 크기는 대조군에서 $1,054,606 \pm 325,473 \mu\text{m}^2$, 실험군에서 $460,694 \pm 168,969 \mu\text{m}^2$ 로 정강뼈에서와 같이 유의한 차이를 보였다(Fig. 2) (Photo 1a, b).

200배 사진에서 연골관에 출현한 뼈파괴세포 또는 연골파괴세포 수는 정강뼈 대조군에서 7.0 ± 1.4 개, alendronate 투여군에서 1.8 ± 1.1 개 였으며, 넙다리뼈의 대조군에서는 4.4 ± 0.5 개, alendronate 투여군에서 0.6 ± 0.5 개로 두 군 간에 유의한 차이를 보였다($p < 0.01$) (Fig. 3) (Photo 2a, b).

연골관에 출현한 뼈파괴세포의 크기는 정강뼈 대조군에서 $830 \pm 54 \mu\text{m}^2$, 실험군에서 $687 \pm 104 \mu\text{m}^2$ 이었고, 넙다리뼈 대조군에서 $630 \pm 68 \mu\text{m}^2$, 실험군에서 $946 \pm 250 \mu\text{m}^2$ 으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

넙다리뼈와 정강뼈 뼈끝연골관의 예비연골세포층은 이차뼈발생중심의 출현에 의하여 대부분 뼈로 대체됨으로써 비대연골세포층과 증식연골세포층이 대

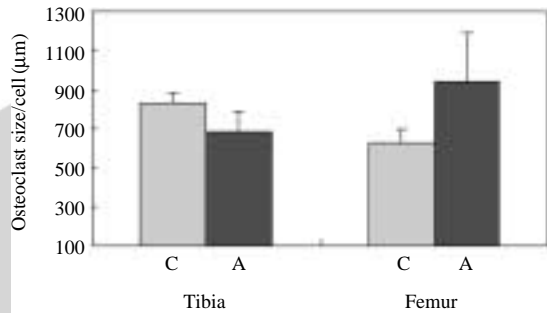


Fig. 4. Osteoclast size in control and alendronate groups. No significant difference is seen in both the femur and the tibia. The data represent mean \pm SD from $n = 30$ in each group. A : alendronate group, C : control group

부분을 형성하고 있었다. 증식연골세포층 두께는 정강뼈 대조군에서 $428.4 \pm 87.6 \mu\text{m}$, 실험군에서 $458.3 \pm 61.3 \mu\text{m}$ 로 유의한 차이가 없었으며($p > 0.05$), 또한 넙다리뼈의 대조군에서 $389.3 \pm 63.0 \mu\text{m}$, 실험군에서 $454.7 \pm 75.7 \mu\text{m}$ 로 두 군 간에 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$) (Fig. 5) (Photo 3a, b).

비대연골세포층 두께는 정강뼈 대조군에서 $325.0 \pm 38.9 \mu\text{m}$, 실험군에서 $458.3 \pm 61.3 \mu\text{m}$ 로 alendronate 투여에 의하여 유의하게 증가되어 있었으며($p < 0.01$), 또한 넙다리뼈의 대조군에서 $328.4 \pm 52.2 \mu\text{m}$, 실험군에서 $517.3 \pm 138.0 \mu\text{m}$ 로 정강뼈에서와

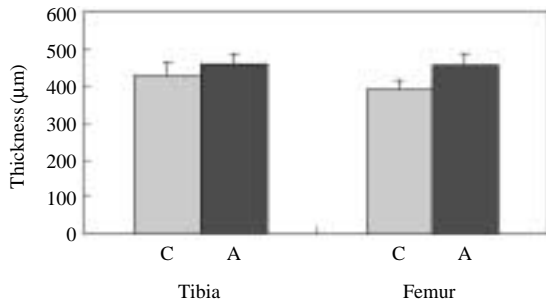


Fig. 5. Thickness of proliferating cartilage layer in the epiphyseal plate in the proximal epiphysis of the tibia and distal epiphysis of the femur at 10 days of alendronate administration. The thickness was not significantly changed by alendronate administration ($P > 0.05$). The data represent mean \pm SD from $n = 4$ in each group.

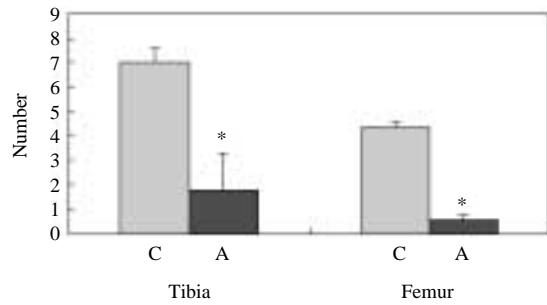


Fig. 7. Number of chondroclasts in the cartilage canal in the proximal epiphysis of the tibia and the distal epiphysis of the femur at 10 days of alendronate administration. The chondroclasts are significantly decreased by alendronate administration ($P < 0.01$). The data represent mean \pm SD from $n = 4$ in each group. A : alendronate group, C : control group

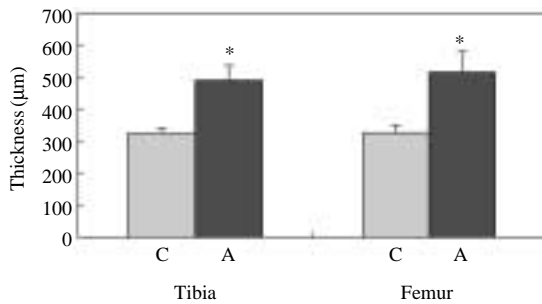


Fig. 6. Thickness of hypertrophied cartilage layer in the epiphyseal plate in the proximal epiphysis of the tibia and distal epiphysis of the femur at 10 days of alendronate administration. The thickness significantly increased by alendronate administration ($P < 0.01$). The data represent mean \pm SD from $n = 4$ in each group.

유사한 결과를 보였다 ($p < 0.01$) (Fig. 6) (Photo 3a, b).

비대연골기질이 흡수되고 해면뼈로 대체되는 부위 (mineralizing front)에 출현하는 연골파괴세포 수는 정강뼈 대조군에서 5.3 ± 1.0 개, 실험군에서 1.8 ± 0.8 개로 alendronate 투여에 의하여 유의하게 감소되었다 ($p < 0.01$). 또한 넙다리뼈 대조군에서 5.3 ± 1.3 개, alendronate 투여군에서 0.4 ± 0.5 개로 정강뼈에서와 같이 유의하게 감소하였다 ($p < 0.01$) (Fig. 7) (Photo 4a, b).

고찰

Bisphosphonate가 연골 흡수에 미치는 영향에 대한 연구 결과는 드물다. 본 연구는 생체 뼈끝연골판을 대상으로 하여 bisphosphonate 연골흡수 억제작용을 구명하고자 시도되었다. Bisphosphonate를 이용한 그간 많은 연구들은 뼈파괴세포를 대상으로 뼈 흡수작용을 억제하는 효과에 초점을 맞추어 왔다. Shibata 등(1997)은 하악과두연골 흡수 과정에서 뼈파괴세포가 bone collar를 흡수한 후 돌기를 내어 연골기질과 광화기질을 흡수한다고 보고 하였다. 또한 뼈파괴세포는 생성 과정과 세포 기원의 관점에서 연골파괴세포와 동일한 성격을 갖는다. 따라서 연골 흡수과정에서 연골파괴세포가 bisphosphonate의 영향을 받을 것으로 가정된다. 연골 흡수 과정은 관절염 등 질환에서 흔히 볼 수 있고 따라서 bisphosphonate가 이 과정 중에 작용하는 양상을 관찰함은 매우 의미 있는 일이다.

bisphosphonate의 역가는 OH기를 유지한 상태에서 NH_2 를 추가하여 R^2 결사슬 길이를 늘려 뼈에 대한 친화력을 높임으로써 향상된다. 예컨대, etidronate는 $\text{R}^1 = \text{OH}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$ 기를 가지나 pamidronate는 $\text{R}^2 = \text{C}_3\text{H}_7\text{NH}_2$ 를 보유하여 etidronate에 비하여 1000배

역가를 갖는다(Shinoda 등 1986, Schenk 등 1986). bisphosphonate는 2가 금속 이온과 결합할 수 있고 금속 이온과 친화력은 두 개의 side chain을 이용함으로써 더욱 증가된다(Papapoulos 등 1989, Van der Pluijin 등 1992). 본 연구에 사용한 alendronate는 nitrogen을 함유하고 있는 제2세대 약물로 mevalonate pathway에 관여하는 farnesyl pyrophosphate synthase를 억제함으로써 여러 약효를 갖는다. ^3H -alendronate를 사용한 연구에 의하면 alendronate는 뼈 형성면 보다는 뼈 흡수면에서 다량 발견된다(Sato 등 1991, Azuma 등 1995, Masarachia 등 1996). 이는 alendronate가 뼈파괴세포가 작용하는 부위에 영향을 미치며 뼈파괴세포에 직, 간접적인 영향을 미침을 의미한다.

본 연구에서는 alendronate가 뼈 성장에 미치는 영향을 구명하기 위하여 뼈끝연골판을 이용하였다. 뼈끝연골판은 연골의 뼈 발생 및 성장 과정을 겪게 되므로 뼈의 성장과 약물 작용 등을 구명하는데 이용될 수 있는 좋은 모델이 된다(Hunziker 1994, Cancedda 등 1995, van der Eerden 등 2000). 본 연구에서 alendronate에 의한 이차뼈발생중심의 크기와 석회화 경계면에 출현한 뼈파괴세포 수는 대조군에 비하여 크게 감소하였다. Bisphosphonate가 뼈파괴세포 전구세포에 작용하여 전구세포가 뼈파괴세포로 전환되는 것을 억제하는지에 대하여는 많은 논란이 있어 왔다. Boonekamp 등(1986, 1987)은 pamidronate가 10^{-6} M 이하의 낮은 농도에서 전구세포의 분화와 뼈파괴세포 형성을 억제한 반면, clonidronate는 뼈파괴세포 전구세포에 영향을 미치지 않는다 하였다. Hughes 등(1989)은 사람 골수에서 얻은 세포를 대상으로 한 실험에서 pamidronate가 etidronate 보다 강력하게 뼈파괴세포 형성을 억제한다고 보고한 반면, Flanagan과 Chambers (1991), Owens 등(1997)은 bisphosphonate는 뼈파괴세포 형성에는 영향을 미치지 않는다고 주장하였다. 또한 van Beek 등(1997)은 alendronate가 생쥐의 골수에서 성숙한 뼈파괴세포에 의한 뼈 흡수를 억제하나 뼈파괴세포가 전구세포로부터 형성되는 것을 억제하지 않는다고 주장한 바 있다. 이와 같이 여러 보고자들의 의견이 다름을 고려하면 bisphosphonate가 뼈파괴세포

형성에 미치는 영향은 bisphosphonate의 뼈속 미세 환경에서의 농도에 따라 다른 것으로 사료된다. 본 연구에서는 alendronate를 1 mg/kg 농도로 10일간 매일 주사한 결과이므로 alendronate가 뼈 흡수 부위에 축적되어 hydroxyapatite를 흡수하는 과정에서 뼈파괴세포에 직접 영향을 미칠 수 있고, 고농도의 alendronate가 뼈파괴세포 전구세포에 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단된다.

뼈의 성장 과정에서 뼈파괴세포나 연골파괴세포 작용이 필수적이다(Hayman 등 1996, Takahi 등 2002). 뼈끝연골판은 긴뼈 성장에 관여하는 성장판으로 작용하기 때문에 성장판 연골의 지나친 조기 흡수와 만존은 뼈 성장에 바람직하지 않다. 따라서 연골파괴세포의 작용 억제에 의한 성장기 연골의 형태변화를 억제함이 궁극적으로 연골의 성장에 바람직한 결과를 초래한다 할 수 없고, 다만 비정상적으로 연골 흡수를 유발하는 질환에서 임상적으로 이용하는 방향으로 추구되어야 하리라 사료된다(Muehleman 등 2002).

본 연구에서 이차뼈발생중심의 크기는 alendronate 투여 후 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다. 또한 비대연골세포층의 두께는 대조군에 비하여 증가되는 소견을 보였다. 이는 alendronate가 연골 흡수를 방지하는 작용을 갖는 것을 의미한다. 연골의 비대화는 MMP, TIMP 등 기질 흡수 및 생성에 관여하는 효소에 의하여 아교섬유가 파괴됨으로써 이루어진다(Dean 등 1989). Lehmann 등(2002)은 bisphosphonate가 연골의 2형 아교섬유의 파괴를 감소시킨다고 보고한 바 있어, 향후 bisphosphonate가 이들 효소의 분비에 미치는 영향을 구명함은 bisphosphonate의 연골 질환을 적용함에 앞서 앞으로 더욱 구명해야 할 과제이다.

참 고 문 헌

- Azuma Y, Sato H, Oue Y, Okabe K, Ohta T, Tschimoto M et al. : Alendronate distributed on bone surfaces inhibits osteoclastic bone resorption in vitro and in experimental hypercalcemia. Bone 16 : 235-245, 1995.
- Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magonetto 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.
- Boonekamp PM, van der Wee-pals LJA, van Wijk-van Lennep MLL, Thesing CW, Bijvoet OLM : Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralised matrix. *Bone Miner* 1 : 27–39, 1986.
- Boonekamp PM, Lowik CWGM, van der Wee-Pals LJA, van Wijk-van Lennep MLL, Bijvoet OLM : Enhancement of the inhibitory action of APD on the transformation of osteoclast precursors into resorbing cells after dimethylation of the amino group. *Bone Miner* 2 : 29–42, 1987.
- Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P : Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 159 : 265–358, 1995.
- Dean DD, Muniz OE, Howell DS : Association of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) with hypertrophic cell enlargement in the growth plate. *Matrix* 9 : 366–375, 1989.
- Flanagan AM, Chambers TJ : Inhibition of bone resorption by bisphosphonates : interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. *Calcif Tissue Int* 49 : 407–415, 1991.
- Halasy-Nagy JM, Rodan GA, Reszka AA : Inhibition of bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone* 29 : 553–559, 2001.
- Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Cox TM : Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* 122 : 3151–3162, 1996.
- Hiroi-Furuya E, Kameda T, Hiura K, Mano H, Miyazawa K, Nakamura Y et al. : Etidronate (EHDP) inhibits osteoclastic bone resorption, promotes apoptosis and disrupts actin rings in isolate-mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int* 64 : 219–223, 1999.
- Hughes De, McDonald 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.
- Hunziker EB : Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech* 28 : 505–519, 1994.
- Lehmann HJ, Mouritzen U, Christgau S, Clos PA, Christiansen C : Effect of bisphosphonates on cartilage turnover assessed with a newly developed assay for collagen type II degradation products. *Ann Rheum Dis* 61 : 530–533, 2002.
- Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA : Comparison of the distribution of ^3H -alendronate and ^3H -etidronate in rat and mouse bones. *Bone* 16 : 235–245, 1996.
- Muehleman C, Green J, Williams JM, Kuettner KE, Thonart EJ-MA, Sumner DR : The effect of bone remodelling inhibition by zoledronic acid in an animal model of cartilage matrix damage. *Osteoarthritis and Cartilage* 10 : 226–233, 2002.
- Owens JM, Fuller K, Chambers TJ : Osteoclast activation : potent inhibition by the bisphosphonate alendronate through a nonresorptive mechanism. *J Cell Physiol* 172 : 79–86, 1997.
- Papapoulos Se, Hoekman K, Lowik CW, Vermeij P, Bijvoet OLM : Application of an in vitro model and a clinical protocol in the assessment of the potency of a new bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 4 : 775–781, 1989.
- Ralston S, Patel U, Fraser W, Gallaacher S, Dryburgh F, Cowan R, Boyle I : Comparison of three intravenous bisphosphonates in cancer-associated hypercalcemia. *Lancet*, November 18 : 1180–1182, 1989.
- Russell RGG, Muhlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H : The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomized rats. *Calcif Tissue Res* 6 : 183–196, 1970.
- Sato M, Grasser W, Endo N, Akins Rm Simmons H, Thompson DD et al. : Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 88 : 2095–2105, 1991.
- Schenk R, Egli P, Fleisch H, Rosini S : Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int* 38 : 342–349, 1986.
- Shibata S, Suzuki S, Yamashita Y : An ultrastructural study of cartilage resorption at the site of initial endochondral bone formation in the fetal mouse mandibular condyle. *J Anat* 191 : 65–76, 1997.
- Shinoda H, Adamek G, Felix R, Fleisch H, Schenk R, Hagan P : Structure-activity relationships of various bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 35 : 302–304, 1986.

- Takahi K, Hashimoto J, Hayashida K, Shi K, Takano H, Tsuboi H, Matsui Y, Nakase T, Tomita T, Ochi T, Yoshikawa H : Early closure of growth plate causes poor growth of long bones in collagen-induced arthritis rats. *J Musculoskel Neuron Interact* 2 : 344-351, 2002.
- van Beek Er, Lowik CWGM, Papapoulos SE : Effect of alendronate treatment on the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in mice. *Bone* 20 : 335-340, 1997.
- van der Eerden BC, Karperien M, Gevers EF, Lowik CW, Wit JM : Expression of Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein, and their receptors in the postnatal growth plate of the rat: evidence for a locally acting growth restraining feedback loop after birth. *J Bone Miner Res* 15 : 1045-1055, 2000.
- van der Pluijm G, Binderup L, Bramm E, van der Wee-Pals L, DeGroot H, Binderup E et al. : Disodium 1-hydroxy-3-(1-pyrrolidinyl)-propylidene-1, 1-bisphosphonate (EB-1053) is a potent inhibitor of bone resorption in vitro and in vivo. *J Bone Mine Res* 7 : 981-986, 1992.

Explanations of Photographs

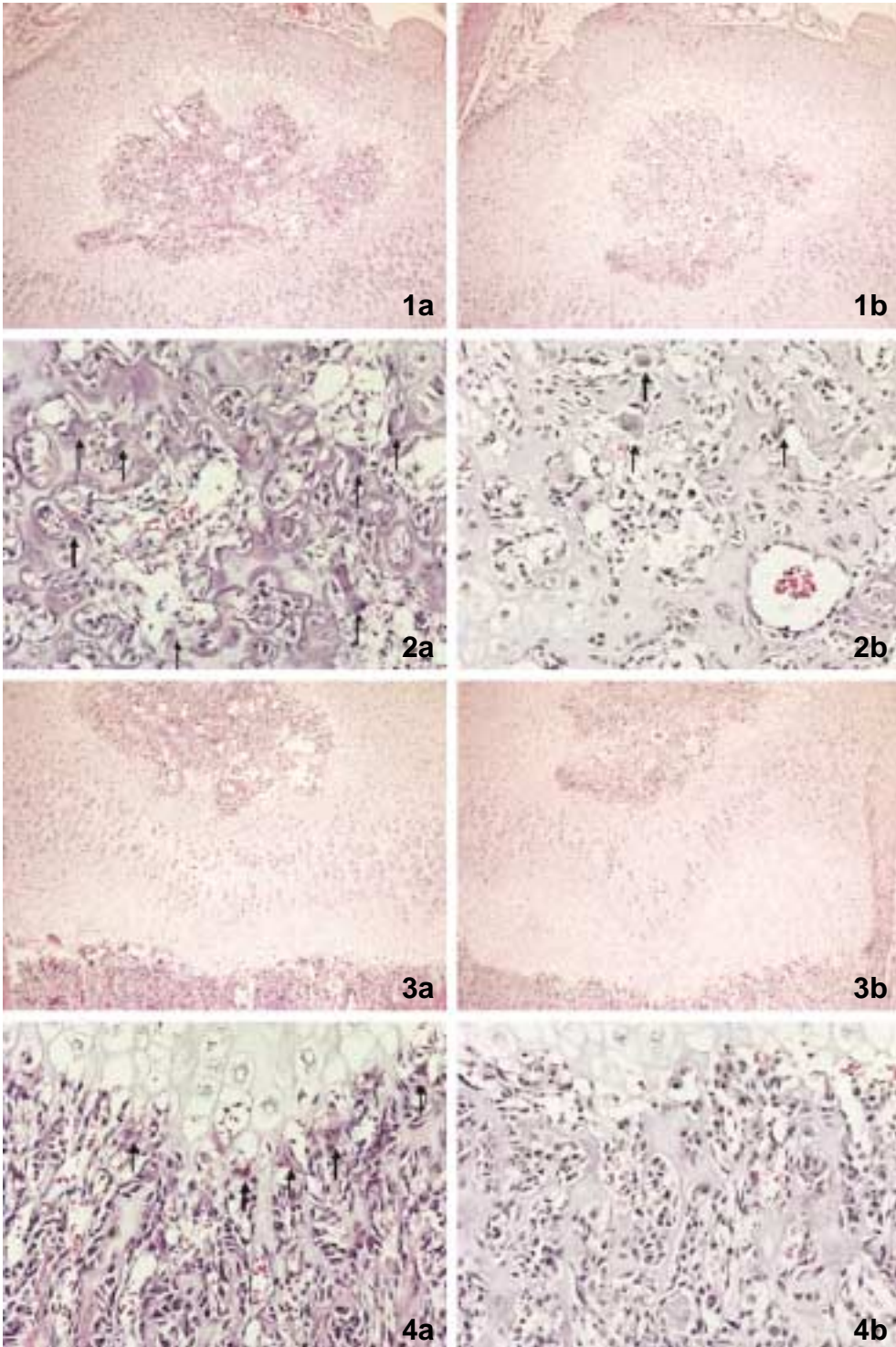
The developing proximal tibia at postnatal 10 days. a : control, b : alendronate treated

Photo 1a. The developing secondary ossification center of the proximal epiphysis. b : The secondary ossification center is smaller than that shown in 1a.

Photo 2a. Chondroclasts and osteoclasts (arrows) in the developing secondary ossification center. b : A few chondroclasts or osteoclasts are seen in the ossification center (arrows).

Photo 3a. An epiphyseal plate remaining between diaphysis and epiphysis. b : The roughly same thickness of proliferating cartilage zone and increased thickness of hypertrophied cartilage zone are noted, comparing to those in the control group.

Photo 4a. Many chondroclasts resorbing an epiphyseal cartilage (arrows) are seen. b : Few chondroclasts are seen.



Abstract

Effects of Bisphosphonate on the Ossification of Growth Plate of the Knee Joint in Rats

Eun-Joo Lee, Hyun-Jin Kim, Gae-Hyuk Lee, Min-Seok Kim,
Ha-Ok Park, Won-Jae Kim, Sunhun Kim

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

Bisphosphonates inhibit bone resorption by affecting osteoclastic function and formation of osteoclasts from their precursor cells. Chondroclasts have the same origin and differentiation as osteoclasts. Thus, it is hypothesized that bisphosphonate can affect on cartilage metabolism. This study was aimed to elucidate effects of alendronate, a nitrogen containing bisphosphonate, on cartilage development in the tibial proximal and femoral distal epiphyseal plates in rats. Alendronate (1 mg/kg) was subcutaneously administered in growing rat pups for 10 days. Several parameters such as the number and size of chondroclasts, involved in cartilage resorption, size of secondary ossification center and thickness of cartilage cell layers were measured and analysed by histomorphometry.

The size of the secondary ossification centers in the tibial proximal and femoral distal epiphysis was smaller in the alendronate treated group ($p < 0.01$). The number of osteoclasts in the both the ossification centers and chondroclasts beneath the epiphyseal plates was significantly decreased by alendronate treatment ($p < 0.01$). The size of chondroclasts was not significantly changed ($p > 0.05$). The thickness of proliferating cartilage layer was not changed, but by contrast, hypertrophied cartilage layer was increased in thickness by alendronate treatment.

These findings suggest that bisphosphonates can affect cartilage cell metabolism in a chondroprotective way.

Key words : Bisphosphonate, Ossification, Growth plate