

# Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2와 Alendronate 조합에 따른 MC3T3-E1의 세포의 Alkaline Phosphatase 활성도 및 생존력

최혜정, 이상민\*  
경북도립대학교 응급구조과

## Effect of Incorporating Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Alendronate on Alkaline Phosphatase Activity and Cell Viability in MC3T3-E1 Cells

Hye-Jung Choi, Sang-Min Lee\*

Department of Emergency Medical Technology, Gyeongbuk Provincial College

**요약** 뼈 조직 재생을 위한 1차 성장 인자인 재조합 인간 뼈 형태 형성 단백질-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)와 파골세포 전구체 세포를 억제하여 뼈 흡수를 감소시키는 alendronate (ALN)를 조합하여 농도에 따른 전조골세포에서 조골세포로의 분화 정도를 비교하고자 하였다. 전조골세포주인 MC3T3-E1 세포를 3, 7 또는 10일 동안 분화시키면서 rhBMP-2는 50, 75, 100 ng/mL의 농도로, ALN는 1과 5  $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 처리하여 Cell Counting Kit-8 분석 및 alkaline phosphatase activity(ALP)를 확인하였다. rhBMP-2와 ALN의 조합에서 적용한 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다. 100 ng/mL의 rhBMP-2 처리 후 5  $\mu\text{mol/L}$  또는 1  $\mu\text{mol/L}$ 의 ALN 처리군에서 대조군에 비해 전조골세포에서 조골세포로의 분화 정도를 나타내는 ALP 활성이 유의하게 증가하였으나, rhBMP-2 처리군에 비해 감소하였다. 75 ng/mL의 rhBMP-2 처리 후 1  $\mu\text{mol/L}$ 의 ALN 처리군에서 ALP의 활성은 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, rhBMP-2 처리군에 비해 증가하였다. 50 ng/mL의 rhBMP-2 처리 후 1  $\mu\text{mol/L}$ 의 ALN 처리군에서 ALP의 활성은 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나, 50 ng/mL의 rhBMP-2 처리군에 비해 감소하였다. 이 결과는 rhBMP-2 처리 후 ALN(rhBMP-2/ALN) 처리군 또는 ALN 처리 후 rhBMP-2(ALN/rhBMP-2) 처리군에서 rhBMP-2가 주요 인자임에도 불구하고 단지 약물의 농도에 의존하기보다 약물의 특정 농도와 rhBMP-2/ALN 또는 ALN/rhBMP-2 조합의 상호작용에 의해 약물의 효능이 최대화될 수 있다는 것을 의미한다.

**Abstract** This study investigated the effect of incorporating recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2, bone tissue regeneration growth factor) plus alendronate (ALN), which reduces bone resorption by inhibiting osteoclast precursor cells, on MC3T3-E1 cells (a preosteoblast cell line). MC3T3-E1 cells were cultured with 50, 75, or 100 ng/mL of rhBMP-2 or 1-5  $\mu\text{mol/L}$  of ALN for three, seven, or ten days. Cell Counting Kit-8 assays were performed, and alkaline phosphatase (ALP) activities were measured. No evidence of cytotoxicity was observed when cells were treated with rhBMP-2 or ALN, regardless of the concentrations used. ALP activity was significantly increased when cells were treated with 100 ng/mL of rhBMP-2, and then 5 or 1  $\mu\text{mol/L}$  of ALN versus non-treated controls, but these activities were lower than in cells treated with 100 ng/mL of rhBMP-2. ALP activity was significantly increased in cells treated with 75 ng/mL of rhBMP-2 followed by 1  $\mu\text{mol/L}$  of ALN than in non-treated controls. ALP activity was lower after treating cells with 50 ng/mL of rhBMP-2 followed by 1  $\mu\text{mol/L}$  of ALN than in 50 ng/mL rhBMP-2 treated cells but higher after treating cells with 1  $\mu\text{mol/L}$  of ALN followed by 50 ng/mL of rhBMP-2. Although rhBMP-2 is the main osteogenic differentiation factor, these findings suggest that the specific concentrations used and orders of treatment (e.g., ALN followed by rhBMP-2 or rhBMP-2 followed by ALN) markedly influence the rate of osteogenic differentiation.

**Keywords** : Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2, Alendronate, Alkaline Phosphatase Activity, Cell Viability, MC3T3-E1 Cells

\*Corresponding Author : Sang-Min Lee(Gyeongbuk Provincial College)  
email: goldfish333@daum.net

Received June 5, 2023  
Accepted August 10, 2023

Revised June 30, 2023  
Published August 31, 2023

## 1. 서론

일반적인 뼈의 재형성 과정은 새로운 뼈로 전환되는 증식, 분화 및 세포의 기질의 석회화 유도 등의 단계로 주기적으로 진행된다[1]. 이러한 뼈 조직의 완전성과 기능은 뼈를 형성하는 조골세포와 뼈를 흡수하는 파골세포 사이의 균형으로 유지된다[1]. 그러나, 외상 또는 종양 절제 등에 의한 뼈의 손상으로 일어나는 뼈의 회복은 혈종 형성과 염증 반응, 섬유 연결성 가골 형성, 뼈화 과정 및 뼈의 재형성의 4단계를 거친다[2]. 뼈 손상으로 인한 뼈화 과정에서 뼈 형태 형성 단백질(bone morphogenetic proteins, BMP)은 세포의 분화 및 증식을 촉진시킨다[3]. BMP-2는 BMP의 20개 이상의 하위 그룹 중 최초로 특화된 물질로 미국 식품의약국(Food Drug Administration, FDA)에서는 재조합 인간 BMP-2(recombinant human BMP-2, rhBMP-2)로 승인하여 많은 관련 연구가 보고되고 있다[4]. BMP-2는 새로운 뼈가 형성될 때 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)에서 조골세포로 분화될 때 관여하는 주요 인자이며[5], I형 및 II형 세린/트레오닌 키나제 수용체에 결합하여 Smad 및 비-Smad 신호 경로를 활성화하여 runt-related transcription factor 2(Runx2) 및 osterix와 같은 뼈 형성 유전자를 활성화시킨다[6]. 또한, BMP-2는 파골세포 전구체 세포를 파골세포로의 분화를 촉진하며, BMP-2를 억제시키면 파골세포의 분화를 감소시켜 MSC 분화, 뼈 형성 및 파골세포 형성에 주요 역할을 한다[7,8]. 그러나 rhBMP-2는 FDA의 승인을 받은 약물로 임상에서 사용되고 있음에도 불구하고 이소성 뼈화[9], 뼈용해[10], 신경학적 결손(척수병증, 신경근병증) 증가 또는 암 등의 합병증이 발생한다고 한다[11]. 알렌드로네이트(alendronate, ALN)는 비스포스포네이트(bisphosphonate) 중 가장 강력한 질소 함유 약물이며, 파골세포의 세포 사멸을 유도하고 mevalonate 경로의 핵심 효소인 farnesyl diphosphate synthase의 억제함으로써 파골세포의 활성을 감소시켜 과도한 뼈 흡수를 억제하는 약물이다[12]. 현재 폐경기 후 골다공증 및 악성 종양으로 인한 고칼슘혈증 등에 사용되고 있을 뿐만 아니라[13], 골다공증[14], 류마티스성 관절염[15], 골형성 부진[16], 골이형성증[17], 및 골관절염[18] 등의 치료제로 사용되고 있다. 그러나, ALN가 안전하게 널리 사용되고 있음에도 불구하고 ALN는 상부 위장관 장애[19], 확산성 골격근 통증[20] 및 턱의 골괴사[21] 등과 같은 부작용이 발생한다고 한다. 이와 같은 연구 결과는 생체 내 약물의 효능 또

는 독성작용은 약물의 흡수, 분포, 대사 및 배설 뿐만 아니라 투여 용량 및 투여 기간에 영향을 받는다는 보고[22]와 일치함을 알 수 있었다.

한편, 임상에서 뼈 형성에 관여하는 다양한 약물 또는 물질을 여러 방식으로 조합하여 뼈 손상 시 뼈 유도 속도를 높여 뼈 회복 정도를 향상하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. In vivo 실험에서 두개골 결손된 쥐 대상 BMP-2 적용 후 ALN를 처리한 경우 골재생 효과가 향상되었다[23]. Li 등의 연구[24]에서 쥐의 대퇴골 결손 모델에 BMP-2와 BMP-7을 순차적으로 투여한 경우 각 단일 약물에 비해 뼈 형성이 향상되었다. In vitro 실험에서 BMP-2와 섬유아세포 성장 인자-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)의 병행 적용 결과 MSC의 분화를 촉진하였다[25]. BMP-2 처리 후 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)를 적용한 쥐 MSC에서 조골세포로의 분화가 촉진되었다[26]. Kim 등의 연구[27]에서도 7일 동안 rhBMP-2 처리 후 3일 동안 ALN를 적용한 조건에서 전조골세포주인 MC3T3-E1 세포에서 조골세포로의 분화가 향상되었다. 임상 연구에서 약물의 투여농도는 최소화하면서 약물의 효능을 최대화하기 위한 연구 결과는 뼈 손상 시 뼈 회복의 중요한 과제로서 약물의 조합 방식 및 약물의 농도 변화를 통해 약물의 효능 또는 독성작용에 따른 다양한 연구는 필요하다. 이 전의 다양한 약물의 농도로 조합 방식을 달리하는 연구 결과들을 통해 rhBMP-2 처리 후 ALN(rhBMP-2/ALN) 처리군 및 ALN 처리 후 rhBMP-2(ALN/rhBMP-2) 처리군에서 다양한 농도로 조합을 달리 한 조골세포의 분화 정도에 관한 연구는 미흡하다고 생각된다. 따라서, 이 논문의 핵심은 뼈 조직 재생을 위한 1차 성장 인자인 rhBMP-2와 파골세포 전구체 세포를 억제하여 뼈 흡수를 감소시키는 ALN를 조합하여 농도에 따른 전조골세포에서 조골세포로의 분화 정도를 비교하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 Cell culture and differentiation

본 연구에서 사용한 MC3T3-E1은 전조골세포이며, American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 배양액은  $\alpha$ -minimum essential medium(without ascorbic acid, Gibco, Grand Island, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS,

Gibco, Grand Island, USA), 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 2-3일 간격으로 교환해주며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

전조골세포인 MC3T3-E1 세포에서 조골세포로 분화를 유도하기 위해 배양액(분화 배지)에 50 µg/mL ascorbic acid(Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 mmol/L b-glycerophosphate(Sigma, USA)를 첨가하였다. rhBMP-2(Sigma, USA)는 50, 75, 및 100 ng/mL의 농도로 처리하였고, ALN(Sigma, USA)는 1-5 µmol/L의 농도로 처리하였다.

## 2.2 Cell viability assay

MC3T3-E1 세포는 96 well plate에 5 × 10<sup>3</sup> cells/well 분주한 후 24시간 동안 growth media에서 키웠다. 그 후 growth media를 제거하고, MC3T3-E1 세포는 rhBMP-2 또는 ALN가 첨가된 분화 배지에서 3, 7 또는 10일 동안 분화시켰다. 분화를 시킨 후 세포 생존력은 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Dojindo, Rockville, MD, USA)을 이용하여 평가하였다. 각 well의 흡광도는 Victor 3 1420 multilabel counter(Perkin Elmer, Shelton, CT, USA)를 사용하여 측정하였다.

## 2.3 ALP assay

MC3T3-E1 세포는 24 well plate에 2 × 10<sup>4</sup> cells/well 분주한 후 24시간 동안 growth media에서 키웠다. 그 후 growth media를 제거하고, MC3T3-E1 세포는 rhBMP-2 또는 ALN가 첨가된 분화 배지에서 3, 7 또는 10일 동안 분화시켰다. 분화를 시킨 후 ALP colorimetric assay kit(BioVision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 세포의 분화 정도를 평가하였다. 각 well의 흡광도는 Victor 3 1420 multilabel counter(Perkin Elmer, Shelton, CT, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정값을 단백질 농도로 보정하기 위해 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하였다.

## 2.4 Statistical analysis

세포의 생존력 및 ALP 활성도 실험은 3회 반복하여 시행하였다. 자료는 평균과 표준편차로 표기하였고, 유의성 검증은 IBM SPSS ver. 18.0 software package program을 이용하여 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

## 3. 결과

### 3.1 MC3T3-E1 세포에서 100 ng/mL의 rhBMP-2와 5 µmol/L의 ALN의 조합에 따른 영향

MC3T3-E1 세포에 조합 조건 또는 처리 기간에 따른 100 ng/mL의 rhBMP-2와 5 µmol/L의 ALN가 미치는 영향을 확인하기 위해 대조군(1)과 실험군은 100 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군(2), 5 µmol/L의 ALN의 10일 처리군(3), 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 5 µmol/L의 ALN의 3일 처리군(4) 및 5 µmol/L의 ALN의 3일 처리 후 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군(5)으로 비교하였다(Fig. 1).

MC3T3-E1 세포의 생존력은 대조군에 비해 5 µmol/L의 ALN의 3일 처리 후 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군에서 19% 유의하게 증가하였다. 나머지 실험군은 대조군에 비해 MC3T3-E1 세포의 생존력에서 유의한 차이가 나타나지 않았다. ALP의 활성도는 대조군에 비해 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 5 µmol/L의 ALN의 3일 처리군은 약 1.9배 유의하게 증가하였으나, 5 µmol/L의 ALN의 3일 처리 후 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군은 약 18.9% 유의하게 감소하였다. 그러나, 100 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군 비해 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 5 µmol/L의 ALN의 3일 처리군에서 ALP의 활성도는 19.1% 감소하였고, 5 µmol/L의 ALN의 3일 처리 후 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군은 유의하게 64.8% 감소하였다.

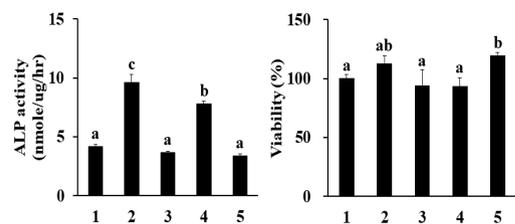


Fig. 1. Alkaline phosphatase(ALP) activity and viability in osteoblast cells(MC3T3-E1) following treatment with 100 ng/mL of recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2) and 5 µmol/L of alendronate. 1: control, 2: 100 ng/mL of rhBMP-2 for 10 days, 3: 5 µmol/L of alendronate for 10 days, 4: 100 ng/mL of rhBMP-2 for 7 days and 5 µmol/L of alendronate for the next 3 days, 5: 5 µmol/L alendronate for 3 days and 100 ng/mL rhBMP-2 for the next 7 days. All experiments were repeated three times. Values are mean ± SD, different superscripts in the figures indicate a significant difference( $p < 0.05$ ).

### 3.2 MC3T3-E1 세포에서 100 ng/mL의 rhBMP-2와 1 μmol/L의 ALN의 조합에 따른 영향

MC3T3-E1 세포에 조합 조건 또는 처리 기간에 따른 100 ng/mL의 rhBMP-2와 1 μmol/L의 ALN가 미치는 영향을 확인하기 위해 대조군(1)과 실험군은 100 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군(2), 1 μmol/L의 ALN의 10일 처리군(3), 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리군(4), 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리 후 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군(5)으로 비교하였다(Fig. 2).

MC3T3-E1 세포의 생존력은 대조군과 각 실험군 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. ALP의 활성도는 대조군에 비해 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리군에서 4.0배 유의하게 증가하였고, 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리 후 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군에서도 4.2배 유의하게 증가하였다. 그러나 100 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군에 비해 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리군에서 ALP의 활성도는 25.2% 유의하게 감소하였고, 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리 후 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군에서 22.0% 유의하게 감소하였다.

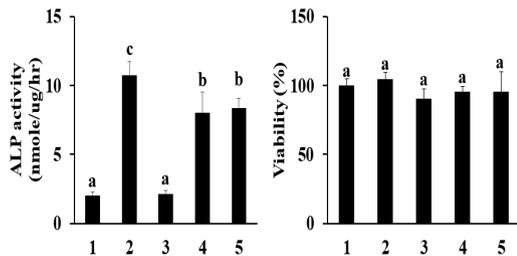


Fig. 2. Alkaline phosphatase(ALP) activity and viability in osteoblast cells(MC3T3-E1) following treatment with 100 ng/mL of recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2) and 1 μmol/L of alendronate. 1: control, 2: 100 ng/mL of rhBMP-2 for 10 days, 3: 1 μmol/L of alendronate for 10 days, 4: 100 ng/mL of rhBMP-2 for 7 days and 1 μmol/L of alendronate for the next 3 days, 5: 1 μmol/L alendronate for 3 days and 100 ng/mL rhBMP-2 for the next 7 days. All experiments were repeated three times. Values are mean ± SD, different superscripts in the figures indicate a significant difference( $p < 0.05$ ).

### 3.3 MC3T3-E1 세포에서 75 ng/mL의 rhBMP-2와 1 μmol/L의 ALN의 조합에 따른 영향

MC3T3-E1 세포에 조합 조건 또는 처리 기간에 따른 75 ng/mL의 rhBMP-2와 1 μmol/L의 ALN가 미치는 영향을 확인하기 위해 대조군(1)과 실험군은 75 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군(2), 1 μmol/L의 ALN의 10일 처리군(3), 75 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리군(4), 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리 후 75 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군(5)으로 비교하였다(Fig. 3).

MC3T3-E1 세포의 생존력은 Fig. 3의 각 실험군 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. ALP의 활성도는 대조군에 비해 75 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리군에서 4.4배 유의하게 증가하였고, 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리 후 75 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군에서도 3.7배 유의하게 증가하였다. 75 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군에 비해 75 ng/mL의 rhBMP-2의 처리 후 1 μmol/L의 ALN의 처리군에서 ALP의 활성도는 9.6% 증가하였으나, 1 μmol/L의 ALN의 3일 처리 후 75 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군에서 7.9% 감소하였다.

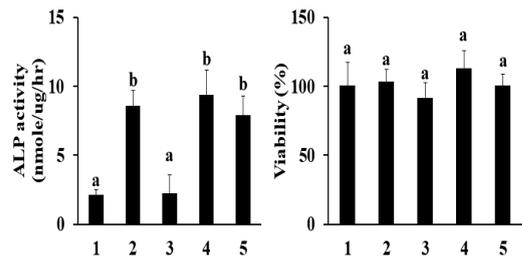


Fig. 3. Alkaline phosphatase(ALP) activity and viability in osteoblast cells(MC3T3-E1) following treatment with 75 ng/mL of recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2) and 1 μmol/L of alendronate. 1: control, 2: 75 ng/mL of rhBMP-2 for 10 days, 3: 1 μmol/L of alendronate for 10 days, 4: 75 ng/mL of rhBMP-2 for 7 days and 1 μmol/L of alendronate for the next 3 days, 5: 1 μmol/L alendronate for 3 days and 75 ng/mL rhBMP-2 for the next 7 days. All experiments were repeated three times. Values are mean ± SD, different superscripts in the figures indicate a significant difference( $p < 0.05$ ).

### 3.4 MC3T3-E1 세포에서 50 ng/mL의 rhBMP-2와 1 $\mu$ mol/L의 ALN의 조합에 따른 영향

MC3T3-E1 세포에 조합 조건 또는 처리 기간에 따른 50 ng/mL의 rhBMP-2와 1  $\mu$ mol/L의 ALN가 미치는 영향을 확인하기 위해 대조군(1)과 실험군은 50 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군(2), 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 10일 처리군(3), 50 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리군(4), 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리 후 50 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군(5)으로 비교하였다(Fig. 4).

MC3T3-E1 세포의 생존력은 Fig. 4의 각 실험군 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. ALP의 활성도는 대조군에 비해 50 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리군에서 2.8배 유의하게 증가하였고, 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리 후 50 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군에서도 3.6배 유의하게 증가하였다. 그러나 50 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군에 비해 rhBMP-2의 7일 처리 후 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리군에서 ALP의 활성도는 15.1% 감소하였고, 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리 후 50 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군에서 7.6% 증가하였다.

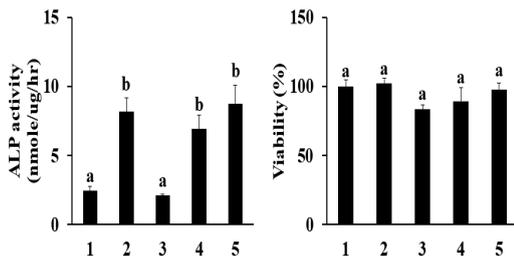


Fig. 4. Alkaline phosphatase(ALP) activity and viability in osteoblast cells(MC3T3-E1) following treatment with 50 ng/mL of recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2) and 1  $\mu$ mol/L of alendronate. 1: control, 2: 50 ng/mL of rhBMP-2 for 10 days, 3: 1  $\mu$ mol/L of alendronate for 10 days, 4: 50 ng/mL of rhBMP-2 for 7 days and 1  $\mu$ mol/L of alendronate for the next 3 days, 5: 1  $\mu$ mol/L alendronate for 3 days and 50 ng/mL rhBMP-2 for the next 7 days. All experiments were repeated three times. Values are mean  $\pm$  SD, different superscripts in the figures indicate significant difference( $p < 0.05$ ).

## 4. 고찰

BMP-2는 뼈 형성 유전자를 활성화하여 조골세포를 분화시키는 물질로, 퇴행성 요추 디스크 환자의 전방 요추 체간 유합 시술에서 자가 이식 뼈의 대체 물질로 사용되었다[28]. 그러나, 이들 환자에게 BMP-2 투여시 파골세포를 활성화하여 골용해 결손[29] 및 이소성 골화와 같은 부작용이 나타났다는 보고[10]가 있다. ALN는 장기간의 안정성과 효능이 입증된 비스포스네이트의 대표적인 약물로서 파골세포의 세포 사멸을 유도하고 파골세포의 활성을 감소시켜 과도한 뼈 흡수를 억제하는 약물이다. 따라서, ALN 투여 시 척추 압박골절 성형 수술 환자 대상 척추 재골절의 발생률이 감소하였고[9], 엉덩관절 골절 수술 후 환자에서 골밀도 감소의 예방 효과가 나타났다[30] 그러나, ALN를 1년 이상 복용 시 위장관 장애가 나타났고, 장기간 비스포스네이트를 사용한 환자의 경우 비정형 대퇴골 골절의 위험률 증가[31] 및 비정상적인 피로 골절의 환자 경우 뼈 형성 부족 및 뼈 유합의 지연됨이 확인되었다[32]. 이와 같이 rhBMP-2 또는 ALN는 처방 약물로 비교적 안정적으로 사용되고 있음에도 불구하고, rhBMP-2 또는 ALN의 사용으로 인한 이들 약물의 효능과 부작용은 함께 존재한다. 따라서, rhBMP-2 또는 ALN을 처방 약물로 좀더 효과적으로 사용하기 위해 이들 약물의 적절한 조합과 농도를 확인하는 다양한 연구는 약물의 부작용을 최소화하고 약물의 효능을 최대화할 수 있는 중요 과제라고 생각된다.

최근, 뼈 형성에 관여하는 다양한 인자를 여러 방식으로 병행 투여 또는 투여 농도를 달리하여 뼈 손상 시 뼈 유도 속도를 높여 뼈 회복정도를 향상시키기 위한 생체 내에 약리학적 효능을 확인하는 연구들이 활발히 진행되고 있다[23-26]. 또한, 약물 대사는 투여 기간이 길어질수록 생체 내 조직의 손상에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며[31], 동일한 약물을 간격을 달리하여 투여한 경우 효능 또는 독성이 달리 나타난다는 보고[17]와 약물을 급성으로 반복 투여시 물질의 대사율이 증가된 경우도 보고[33]된 바가 있어 약물의 투여조건 또는 조합에 따른 조직의 회복 또는 손상의 정도 및 양상이 다르게 나타날 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 rhBMP-2/ALN 처리군 또는 ALN/rhBMP-2 처리군에서 3일, 7일 또는 10일 동안 전조골세포주인 MC3T3-E1 세포에 rhBMP-2는 50, 75, 및 100 ng/mL의 농도 및 ALN는 1 및 5  $\mu$ mol/L의 농도를 변화시키면서 세포 생존력을 평가하고 ALP 활성도를 확인하여 MC3T3-E1 세포의

분화 정도에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

rhBMP-2/ALN 또는 ALN/rhBMP-2의 3일 또는 7일 처리군 그리고 rhBMP-2 또는 ALN의 10일 처리군에서 MC3T3-E1 세포의 생존력은 각 실험군과 대조군 사이에 유의한 차이가 나타나지 않았다. ALP의 활성도는 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 5  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리군은 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나, 100 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군에 비해 감소하였다. 5  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리 후 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군은 100 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군에 비해 유의하게 감소하였다. 100 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군에 비해 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리군에서 ALP의 활성도는 유의하게 감소하였고, 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리 후 100 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군은 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 뼈 형성에 관여하는 주요 인자 또는 약물로서 rhBMP-2/ALN 처리군 또는 ALN/ rhBMP-2 처리군은 MC3T3-E1 세포에서 조골세포로의 분화를 가속화할 것으로 생각되었으나, 100 ng/mL의 rhBMP-2와 5  $\mu$ mol/L의 ALN 농도에서 rhBMP-2/ALN 또는 ALN/rhBMP-2의 3일 또는 7일 처리군은 rhBMP-2의 10일 처리군 비해 조골세포 분화 정도가 감소하였다. ALP의 활성도는 75 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군에 비해 75 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리군에서 증가하는 경향이 나타났으나, 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리 후 75 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군에서는 감소하는 경향이 나타났다. 이러한 결과는 75 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리가 75 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리에 비해 조골세포의 분화를 증가시켰다는 것을 의미하며, rhBMP-2와 ALN 사이에 어떠한 상호작용에 의한 것인지를 확인하기 위하여 관련 기전에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. 또한, Jung에 의하면 턱 골괴사 환자의 턱뼈 재생에서 rhBMP-2와 부갑상샘 호르몬 투여군이 rhBMP-2 단독 투여군에 비해 골재생비가 유의하게 높았다[34]. 골다공증 여성 환자 대상 여성호르몬과 ALN의 병합치료가 여성호르몬 단독 치료군에 비해 허리 골밀도가 증가되었다[35]. 이러한 연구 결과를 기반으로 뼈 분화 또는 뼈 형성에 관여하는 다양한 인자, 약물의 병합 또는 조합 조건에 따른 농도를 달리한 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

rhBMP-2/ALN 처리군 또는 ALN/rhBMP-2 처리군

에서 50 ng/mL의 rhBMP-2와 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일, 7일 또는 10일 동안 투여한 경우 ALP의 활성도는 50 ng/mL의 rhBMP-2의 10일 처리군에 비해 50 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리군에서는 감소하는 경향이 나타났다. Kim 등 [27]은 rhBMP-2를 10일 단독 처리에 비해 50 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 5  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 동안 처리한 조건에서 유의하게 조골세포로의 분화도가 높아졌다고 하였으나, 본 실험의 결과와는 상이하게 나타났다. 이러한 결과는 50ng/mL의 rhBMP-2를 먼저 처리하는 경우에는 1  $\mu$ mol/L의 ALN는 약물의 상호작용에 영향을 끼치기에는 적은 농도임을 확인할 수 있었다. 또한, 1  $\mu$ mol/L의 ALN를 3일 처리 후 50 ng/mL의 rhBMP-2를 7일 처리군에서는 증가하는 경향이 나타난 결과는 50 ng/mL의 rhBMP-2 10일 처리군에 비해 5  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리 후 50 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리군에서 유의하게 분화도가 높아졌다는 김 등의 결과[27]와 유사하게 나타났다. 이러한 결과를 통해 ALN는 장기간 사용해야 하는 약물이므로 추후 1과 5  $\mu$ mol/L 사이의 ALN 농도를 변화시켜 조골세포 분화도를 확인하는 것은 의미가 있을 것으로 생각된다. 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리 후 적용한 rhBMP의 농도 조건 중 가장 낮은 50 ng/mL에서 조골세포의 분화 정도가 증가하였다. 즉, 조골세포 분화에서 rhBMP-2는 주요 인자임에도 불구하고 ALN 처리 후 rhBMP-2 농도 변화에 따라 조골세포의 분화에 영향을 미칠 수도 있다는 것은 약물들의 농도 및 조합에 따라 약물의 효능 정도는 달리 나타날 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 뼈 대사 관련 인자 또는 약물의 투여 조건, 투여 기간 또는 조합 방식에 따른 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다. 또한, rhBMP-2/ALN 처리군 또는 ALN/rhBMP-2 처리군에서 75 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 후 또는 50 ng/mL의 rhBMP-2의 7일 처리 전에 1  $\mu$ mol/L의 ALN의 3일 처리가 조골세포의 분화에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 ALN를 저농도로 단기간 처리 시 조골세포의 분화를 유도하지만, 고농도로 장기간 처리 시 분화를 감소시킨다는 연구[33] 결과와 일치하였다.

따라서, 본 연구에서는 전조골세포의 분화에 관여하는 rhBMP-2와 골 흡수 억제제인 ALN를 다양한 농도로 조합한 실험군은 대조군에 비해 조골세포의 분화 정도를 증가시키지만, 일부 다양한 농도로 조합한 실험군에서는 rhBMP-2 처리군 보다 낮게 나타났다. 이 결과들은

rhBMP-2/ALN 처리군 또는 ALN/rhBMP-2 처리군에서는 rhBMP-2가 주요 인자임에도 불구하고 단지 약물 농도에 의존하기보다 특정 농도의 rhBMP-2/ALN 또는 ALN/rhBMP-2 처리 조건의 상호작용에 의해 약물의 효능이 최대화될 수 있다는 것을 시사하고 있으며, 앞으로 다양한 인자를 활용하여 병용 또는 조합 방식을 달리 한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## References

- [1] G. Chen, C. X. Deng, and Y. P. Li, "TGF- $\beta$  and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation", *International Journal of Biological Sciences*, vol.8, no.2, pp. 272-288, Jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijbs.2929>
- [2] M. Pfeiffenberger, A. Damerou, A. Lang, F. Buttgerit, P. Hoff, and T. Gaber, "Fracture Healing Research—Shift towards In Vitro Modeling?", *Biomedicines*, vol.9, no.7, p.748, Jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070748>
- [3] A. R. G. Susperregui, F. Viñals, P. W. M. Ho, M. J. Gillespie, T. Martin, and F. Ventura, "BMP-2 regulation of PTHrP and osteoclastogenic factors during osteoblast differentiation of C2C12 cells", *Journal of Cellular Physiology*, vol.216, no.1, pp.144-152, Jul. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.21389>
- [4] D. P. Halloran, H. W. Durbano, and A. Nohe, "Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis", *Journal of Developmental Biology*, vol.8, no.3, p.19, Sep. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jdb8030019>
- [5] M. Bruderer, R. G. Richards, M. Alini, and M. J. Stoddart, "Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis", *European Cells & Materials*, vol.28, pp.269-286, Oct. 2014. DOI: <https://doi.org/10.22203/ecm.v028a19>
- [6] K. M. Sinha and X. Zhou, "Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation", *Journal of Cellular Biochemistry*, vol.114, no.5, pp.975-984, May 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.24439>
- [7] E. D. Jensen, L. Pham, C. J. Billington, K. Espe, A. E Carlson *et al.*, "Bone morphogenetic protein 2 directly enhances differentiation of murine osteoclast precursors", *Journal of Cellular Biochemistry*, p.n/a, Jan. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.22462>
- [8] L. Pham, K. Beyer, E. D. Jensen, J. S. Rodriguez, J. Davydova *et al.*, "Bone morphogenetic protein 2 signaling in osteoclasts is negatively regulated by the BMP antagonist, twisted gastrulation", *Journal of Cellular Biochemistry*, vol.112, no.3, pp.793-803, Mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.23003>
- [9] S. Suliman, Z. Xing, X. Wu, Y. Xue, T. O. Pedersen *et al.*, "Release and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 are affected by scaffold binding techniques in vitro and in vivo", *Journal of Controlled Release*, vol.197, pp.148-157, Jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.003>
- [10] N. E. Epstein, "Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery: The evidence continues to mount", *Surgical Neurology International*, vol.4, no.6, p.343, Jul. 2013. DOI: <https://doi.org/10.4103/2152-7806.114813>
- [11] C. Tannoury and H. S. An, "Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery", *The Spine Journal*, vol.14, no.3, pp.552-559, Mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.08.060>
- [12] H. Cohen, "Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw: patient care considerations: overview for the orthopaedic nursing healthcare professional", *Orthopaedic Nursing*, May 2010. DOI: <https://doi.org/10.1097/nor.0b013e3181dcd2a2>
- [13] S. G. Silverman, N. B. Watts, P. D. Delmas, J. L. Lange, and R. S. Lindsay, "Effectiveness of bisphosphonates on nonvertebral and hip fractures in the first year of therapy: The risedronate and alendronate (REAL) cohort study", *Osteoporosis International*, vol.18, no.1, pp.25-34, Jan. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00198-006-0274-z>
- [14] P. J. J. Prinsloo and D. J. Hosking, "Alendronate sodium in the management of osteoporosis", *Therapeutics and Clinical Risk Management*, vol.2, no.3, pp.235-249, Jan. 2006. DOI: <https://doi.org/10.2147/tcrm.2006.2.3.235>
- [15] T. E. Ciarelli, D. P. Fyhrie, and A. M. Parfitt, "Effects of vertebral bone fragility and bone formation rate on the mineralization levels of cancellous bone from white females", *Bone*, vol.32, no.3, pp.311-315, Mar. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(02\)00975-4](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(02)00975-4)
- [16] T. Mashiba, T. Hirano, C. F. Turner, M. R. Forwood, C. F. Johnston, and D. C. Burr, "Suppressed Bone Turnover by Bisphosphonates Increases Microdamage Accumulation and Reduces Some Biomechanical Properties in Dog Rib", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol.15, no.4, pp.613-620, Feb. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.4.613>
- [17] T. Mashiba, C. W. Turner, T. Hirano, M. R. Forwood, C. F. Johnston, and D. M. Burr, "Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles", *Bone*, vol.28, no.5, pp.524-531, May 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(01\)00414-8](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(01)00414-8)

- [18] T. Hirano, C. W. Turner, M. R. Forwood, C. F. Johnston, and D. C. Burr, "Does suppression of bone turnover impair mechanical properties by allowing microdamage accumulation?", *Bone*, vol.27, no.1, pp.13-20, Jul. 2000.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(00\)00284-2](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(00)00284-2)
- [19] P. D. Papapetrou, "Bisphosphonate-associated adverse events", *Hormones*, vol.8, no.2, pp.96-110, Apr. 2009.  
DOI: <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1226>
- [20] N. Ozaras and A. Rezvani, "Diffuse skeletal pain after administration of alendronate", *Indian Journal of Pharmacology*, vol.42, no.4, p.245, Jul. 2010.  
DOI: <https://doi.org/10.4103/0253-7613.68435>
- [21] F. Paiva-Fonseca, M. D. Martins, R. Della-Coletta, P. A. Vargas, and M. A. Lopes, "Alendronate-associated osteonecrosis of the jaws: A review of the main topics", *Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, pp.e106-e111, Mar. 2014.  
DOI: <https://doi.org/10.4317/medoral.19094>
- [22] S. Raymond, H. Yang, and M. E. Anderson, Pharmacokinetics. In "Introduction to Biochemical Toxicology", London-Appleton & Lange, 1994, pp. 49-73.
- [23] D. Lee, M. Wufuer, I. Kim, T. H. Choi, B. J. Kim *et al.* "Sequential dual-drug delivery of BMP-2 and alendronate from hydroxyapatite-collagen scaffolds for enhanced boneregeneration", *Scientific Reports*, vol.11, no.1, Jan. 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80608-3>
- [24] X. Li, W. Yi, A. Jin, Y. Duan, and S. Min, "Effects of sequentially released BMP-2 and BMP-7 from PELA microcapsule-based scaffolds on the bone regeneration" *American journal of translational research*, 7(8), pp.1417-1428. 2015.
- [25] S. Gromolak, A. Krawczenko, A. Antończyk, K. Buczak, Z. Kielbowicz, and A. Klimczak, "Biological Characteristics and Osteogenic Differentiation of Ovine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Stimulated with FGF-2 and BMP-2", *International Journal of Molecular Sciences*, vol.21, no.24, p.9726, Dec. 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21249726>
- [26] Q. Ren, M. Cai, K. Zhang, W. Ren, Z. Su *et al.*, "Effects of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) release from polylactide-poly(ethyleneglycol)-polylactide(PELA) microcapsule-based scaffolds on bone", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol.51, no.2, Jan. 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.1590/1414-431x20176520>
- [27] S. H. Kim, H. J. Choi, D. S. Yoon, and C. N. Son, "Serial administration of rhBMP-2 and alendronate enhances the differentiation of osteoblasts", *International Journal of Rheumatic Diseases*, vol.24, no.10, pp.1266-1272, Jul. 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/1756-185x.14189>
- [28] A. W. James, G. LaChaud, J. Shen, G. Asatrian, V. Nguyen *et al.*, "A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2", *Tissue Engineering PartB-reviews*, vol.22, no.4, pp.284-297, Apr. 2016.  
DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0357>
- [29] J. M. McClellan, D. S. Mulconrey, R. A. Forbes, and N. Fullmer, "Vertebral Bone Resorption After Transforaminal Lumbar Interbody Fusion With Bone Morphogenetic Protein (rhBMP-2)", *Journal of Spinal Disorders & Techniques*, vol.19, no.7, pp.483-486, Oct. 2006.  
DOI: <https://doi.org/10.1097/01.bsd.0000211231.83716.4b>
- [30] R. S. Lindsay, N. B. Watts, J. L. Lange, P. D. Delmas, and S. G. Silverman, "Effectiveness of risedronate and alendronate on nonvertebral fractures: an observational study through 2 years of therapy", *Osteoporosis International*, vol.24, no.8, pp.2345-2352, Apr. 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00198-013-2332-7>
- [31] H. G. Bone, D. Hosking, J. P. Devogelaer, J. R. Tucci, R. D. Emkey *et al.*, "Ten Years' Experience with Alendronate for Osteoporosis in Postmenopausal Women", *The New England Journal of Medicine*, vol.350, no.12, pp.1189-1199, Mar. 2004.  
DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmoa030897>
- [32] C. V. Odvina, J. E. Zerwekh, D. C. Rao, N. M. Maalouf, F. A. Gottschalk, and C. Y. C. Pak, "Severely Suppressed Bone Turnover: A Potential Complication of Alendronate Therapy", *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol.90, no.3, pp.1294-1301, Mar. 2005.  
DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0952>
- [33] M. H. Jung, T. H. Lee, H. Y. Kim, W. K. Eo, H. Jung *et al.*, "ALP Activity and Percentage of Viable Cells in C2C12 and MC3T3-E1 Cells according to Alendronate Concentration and Treatment Time", *Osteoporosis*, 7(1), pp.15-21. 2009.
- [34] J. Jung, H. Y. Yoo, G. T. Kim, J. W. Lee, Y. A. Lee *et al.*, "Short-Term Teriparatide and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Regenerative Approach to Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Preliminary Study", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol.32, no.12, pp.2445-2452, Dec. 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/jbmr.3237>
- [35] P. D. Miller, N. B. Watts, A. A. Licata, S. T. Harris, H. K. Genant *et al.*, "Cyclical Etidronate in the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis", *The American Journal of Medicine*, vol.103, no.6, pp.468-476, Dec. 1997.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(97\)00278-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(97)00278-7)

최 혜 정(Hye-Jung Choi)

[정회원]



- 2003년 2월 : 계명대학교 대학원  
공중보건학과 (보건학석사)
- 2008년 8월 : 계명대학교 대학원  
의학과 생화학 전공 (의학박사)
- 2019년 3월 ~ 현재 : 경북도립대  
학교 응급구조과 초빙교수

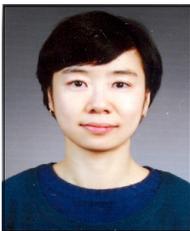
〈관심분야〉

의약학, 생리활성

---

이 상 민(Sang-Min Lee)

[정회원]



- 1999년 2월 : 계명대학교 대학원  
공중보건학과 (보건학석사)
- 2003년 2월 : 계명대학교 대학원  
공중보건학과 (보건학박사)
- 2011년 3월 ~ 현재 : 경북도립대  
학교 응급구조과 부교수

〈관심분야〉

병태생리학, 독성학, 의약학