ORIGINAL ARTICLE

Cytological Study on the Cause of the Osteoporotic Side Effects of Adefovir Dipivoxil

Ho Park

Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea

아데포비어의 부작용인 골다공증 원인 규명을 위한 세포학적 연구

박 호

원광보건대학교 임상병리학과

ARTICLE INFOReceived May 8, 2019
Revised May 29, 2019
Accepted June 11, 2019**Key words**Adefovir dipivoxil
Hypertrophy
Osteogenic differentiation
Osteoporosis
TGF- β **ABSTRACT**

Osteoporosis is a disease that increases the risk of fractures by inducing a decrease in bone strength by the changes in hormones and a decrease in minerals. Recent reports have indicated that the long-term administration of Adefovir dipivoxil (ADV), which is used as a treatment for the hepatitis virus and AIDS, may have osteoporotic side effects. On the other hand, there are few studies on the cytopathic correlation of these causes. In this study, the biological relevance of ADV was evaluated using osteoblast hFOB1.19 and vascular endothelial cell HUVEC. First, the cells were treated with ADV at different concentrations, and DAPI and crystal violet staining were performed for morphological analysis of each cell and nucleus. A CCK-8 assay, real-time PCR, alkaline phosphatase (ALP) staining, and activity was performed to evaluate the drug effects on cell proliferation, gene expression, and osteoblast differentiation. As a result, ADV induced cell hypertrophy in hFOB1.19 cells and HUVEC cells. Furthermore, ADV not only inhibited cell proliferation and TGF- β expression but was also involved in osteoblast differentiation. Overall, these results provide basic data to help better understand the mechanism of ADV-induced osteoporosis and its clinical implications.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

골다공증(Osteoporosis)은 골밀도 감소와 뼈의 미세구조적 이상을 특징으로, 뼈의 골절 위험성이 증가하게 되는 골격계 질환으로 규정할 수 있다. 골다공증을 유발하는 요인으로는 폐경 이후의 에스트로젠 부족과 난소 제거가 뼈의 무기질 밀도의 감소를 유도하고, 유전적인 요인과 생활습관 및 영양, 이와 더불어

어, 당뇨병, 만성 신부전증과 항암제 및 글루코코르티코이드 등에 의한 약물 부작용에 의해서도 골다공증을 유발하는 상관관계가 높은 것으로 알려져 있다[1-5].

최근 임상적 관점에서, Adefovir dipivoxil (ADV)의 장기적 약물 복용이 골다공증 부작용을 유발할 수 있다는 관련성이 보고되고 있다[6, 7]. ADV는 일인산 아데노신(AMP, adenosine monophosphate) 유사체로서, 세포성 키나아제(cellular kinase)에 의해 활성화 대사 산물인 이인산 아데노신(ADP, adefovir diphosphate)로 인산화되고, 인산화된 ADP가 삼인산 데옥시 아데노신(dATP, deoxyadenosine triphosphate)과 경쟁 반응함으로써, 바이러스 DNA에 결합한 후 DNA chain termi-

* Corresponding author: Ho Park
Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University,
514 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea
E-mail: bacoya@naver.com
* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3528-5643>

nation을 유도한다[8-10].

ADV의 경쟁반응 작용기전은 B형 감염 바이러스(HBV, hepatitis B viruses) DNA 중합 효소(reverse transcriptase)를 효율적으로 억제 유도하는 방법으로, 간염바이러스와 에이즈(AIDS, acquired immune deficiency syndrome)와 같은 치료제로 사용된다. 뿐만 아니라, 최근 임상의 적용에는 헤르페스바이러스(herpesviruses), 레트로바이러스(retroviruses), 헤파드나바이러스(hepadnaviruses)등을 억제하는 약물로 이용할 수 있음을 보고하고 있다[11-14].

이와 더불어 ADV에 대한 임상적 소견으로, 혈청 크레아티닌(serum creatinine, SCr) 상승과 혈청 인(serum phosphorus)의 감소를 특징으로 하여, 심각한 저인산염혈증이 스트레스 골절을 유발할 수 있음이 보고되었다. 특히 ADV의 유사 약물로 테노포비어(tenofovir)를 사용하는데, 이 약물은 판코니 증후군(fanconi syndrome)을 유발한다. 판코니 증후군은 근위세뇨관장애(proximal tubular dysfunction)를 일으켜 인산염, 포도당, 중탄산염 등의 배출을 증가시키고, 결과적으로 골밀도(bone density) 저하, 골연화증(osteomalacia), 전해질 불균형(electrolyte imbalance) 등을 유발하는 것으로 보고되고 있다[15, 16].

HBV, AIDS와 헤르페스(HSV, herpes simplex viruses) 등의 질환을 억제 및 치료하기 위해서는 ADV의 장기적인 약물 복용이 필수이지만, 장기적 약물복용에 의한 부작용에 대해 골세포 모델을 이용한 세포학적 수준에서의 생물학적 연구와 메커니즘 연구가 부족한 실정이다. 본 연구에서는, ADV의 복용에 따른 골다공증 유발 원인을 규명하기 위한 연구 모델로서 골과 관련된 세포주 hFOB1.19 (human fetal osteoblastic cells)와 골세포의 항상성 유지를 위한 혈관세포 모델로서 HUVECs (human umbilical vein endothelial cells)을 이용하여 세포의 형태학적 특성, 세포의 성장능, 골분화능에 미치는 ADV의 효과를 세포학적으로 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에서 사용한 Adefovir dipivoxil (ADV)는 시그마알드리치(Sigma-aldrich, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 제품의 정보에 따라 0.1 M NaOH에 5 mg/mL로 녹인 후 -20°C 에 보관하여 이용하였다.

2. 세포배양

hFOB1.19 (ATCC[®] CRL-11372TM)과 불멸화 인간 제대혈 유래의 혈관내피세포(immortalized HUVECs)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구매하였다. hFOB1.19 세포주는 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco)에 10% FBS (Gibco, CA, USA)를 첨가한 배지에 antibiotics (Gibco)를 첨가하여 배양하였으며, HUVEC 세포주는 DMEM에 10% FBS, antibiotics를 첨가한 배지를 이용하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

3. 세포성장에 대한 분석

hFOB1.19와 HUVECs을 96 well dish에 5×10^2 cells/well이 되게 부착시키고, 24시간 동안 배양하였다. 이 후 ADV를 각 well에 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하고 각 24시간, 48시간 그리고 72시간 배양한 후 각 시점에서 CCK-8을 이용하여 각각의 세포 성장률을 조사하였다.

4. 세포 형태와 핵 모양 관찰

배양한 세포를 96 well dish에 5×10^2 cells/well이 되게 부착시키고, 24시간 배양시킨 후 ADV를 각 10 $\mu\text{g/mL}$ 과 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 24시간 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 10% 중성 완충 포르말린(10% neutral buffered formaldehyde, BioGnost, Zagreb, Croatia)으로 10분간 실온에서 고정시키고 PBS로 세척한 다음 0.1% crystal violet solution (Sigma-aldrich)으로 세포를 염색하였으며, 이후 증류수로 잔여 염색약을 세정하고 현미경(DM IL LED Fluo; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 세포의 형태를 관찰하였다. 또한 세포핵의 형태를 관찰하기 위하여 농도별 ADV를 처리한 세포를 24시간 배양 후 PBS로 세척 후 0.1% triton-X 100 (Sigma-aldrich)을 1분 처리 하였다. 이후 PBS로 세척하고 1 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33258을 세포에 처리하여 핵을 염색한 다음 형광현미경(DM IL LED Fluo)으로 이미지를 관찰하였다. 다음으로 핵 모양의 크기변화를 측정하기 위하여 이미지 J 프로그램을 이용하여 각 실험군당 20개씩 무작위 선택에 의하여 다이아미터로 핵 사이즈의 직경을 측정하였다.

5. 골모세포 분화를 위한 ALP (alkaline phosphatase)

염색과 활성도 측정

배양한 FOB1.19 세포주를 96 well dish에 1×10^4

cells/well이 되게 부착시키고 24시간 동안 배양하였다. 배양한 배지는 제거한 다음 PBS로 세척하였다. 이후 골모세포분화 유도물질(OM, osteogenic induction media, 10 mM b-glycerophosphate, 50 µg/mL ascorbic acid, and 100 nM dexamethasone)을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 그룹으로 나누고, 이들에 ADV를 각 10 µg/mL과 50 µg/mL의 농도로 처리한 다음 7일 후에 ALP 염색을 시행하였다. 염색의 시행은 배양액을 제거하고 PBS로 세척 후 10% formaldehyde로 실온에서 1분 동안 고정하였다. 다음 PBS로 세정한 다음, ALP solution (Sigma-aldrich)을 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 20분간 항온 처리한 후 염색된 세포의 분화능을 현미경(DM IL LED Fluo)으로 확인하였다. ALP 활성 측정을 위하여, 골분화 유도물질을 처리한 다음 7일 후 PBS용액으로 세척한 다음 Triton X-100 (Sigma-aldrich)로 세포용해액을 얻었다. (pH 9.5)와 1 mM MgCl₂가 섞여진 용액에 15 mM p-nitrophenyl phosphate substrate (Sigma-aldrich)가 포함된 용액과 세포용해액을 1:1로 섞어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 플레이트 판독기(SpectraMax M3; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 405 nm에서 측정하였다.

6. TGF-β의 발현을 평가(real-time PCR)

TGF-β 유전자 발현 측정을 위하여 정량 실시간 PCR을 수행하였다. 이를 위해 세포를 6-well 세포 배양 접시에 접종하고 ADV를 처리한 뒤 2일째 RNA 추출 키트(Hybrid-R; GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)을 이용하여 total RNA를 추출한 뒤 1 µg의 RNA를 이용하여 cDNA를 키트(Maxime RT; Intron, Daejeon, Korea)를 이용하여 합성하였다. PCR은 Taqman universal PCR 마스터 믹스와 TGF-β (Hs00998133_m1)를 특이 적으로 표적으로 하는 Taqman 프로브 세트를 이용하였다. 모든 Taqman PCR 분석은 StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster city, CA) 실시간 PCR 시스템을 이용하였으며, 18S rRNA (Hs99999901_s1)의 내부 표준 유전자를 공동으로 증폭 분석한 다음 대조군 샘플에 대한 상대적인 발현을 나타내었다.

7. 통계분석

통계처리를 위하여 모든 실험은 3회 이상의 독립적 반복 실험을 수행하였으며, 결과값은 평균과 표준편차를 계산하여 그래프로 나타내었다. 각 실험의 유의성 검정은 대조군과 비교하여 ANOVA student t-test 후 $P < 0.05$ 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 판독하였다.

결 과

1. ADV가 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

ADV가 세포 형태에 미치는 영향을 평가하기 위해 각 세포에 10 µg/mL과 50 µg/mL의 농도로 처리하고 세포의 형태를 crystal violet으로 염색하여 평가하였다. ADV 처리에 따라 hFOB1.19 세포에서는 뚜렷한 형태학적 변화는 관찰되지 않았다. 특히적으로 HUVEC 세포는 ADV 처리에 의해 세포의 크기 비율이 농도 의존적으로 증대되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 1A). 또한 Hoechst를 이용한 핵 염색 관찰에서 hFOB1.19 세포와 HUVEC 세포의 핵 크기가 대조군에 비해 증가된 것을 확

Figure 1. Evaluation of morphological changes of HUVECs and hFOB1.19 cells after ADV treatment. (A) After the treatment of ADV at a concentrations of 0, 10, and 50 µg/mL, morphological changes of cells and nuclear sizes were evaluated by crystal violet (A) and Hoechst 33258 staining (B), respectively. Bar=100 µm. Quantitative analysis of the nuclear diameter of hFOB1.19 (C) and HUVECs (D) were measured from the Hoechst33258 stained images using an Image J program (<https://imagej.nih.gov/ij>). Cell morphology and nuclear diameter increased by ADV treatment in dose-dependent manner in hFOB1.19 and HUVECs.

인할 수 있다(Figure 1B, 1C, 1D).

2. ADV가 세포 증식에 미치는 영향

ADV가 각각의 세포 증식에 어떠한 영향을 미치는지 평가하기 위해 각 세포에 10 $\mu\text{g/mL}$ 과 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고 세포의 증식률을 24시간, 48시간, 72시간에서 평가하였다. hFOB1.19와 HUVEC 세포에 대한 ADV 처리 후 세포의 성장은 24시간에서 뚜렷한 세포의 증식 및 억제 현상이 관찰되지 않았다. 하지만 48시간에서 hFOB1.19와 HUVEC세포의 증식률이 다소 감소하는 경향을 보이긴 했으나 통계적으로 유의하지 않았다. 특히 ADV 약물에 대한 HUVEC 세포의 성장을 평가에서는 배양 72시간 후 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 뚜렷한 억제현상을 보였다(Figure 2).

3. ADV 처리에 의한 TGF- β 발현 분석

ADV에 의한 비대현상 및 세포 증식률에 미치는 영향과 관련하여 hFOB1.19와 HUVEC 세포에 10 $\mu\text{g/mL}$ 과 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고 48 시간에서 TGF- β 의 발현율을 분석하였다.

hFOB1.19에서 TGF- β 의 발현은 Control에 비해 약간 증가하였으나, 유의성에 있어 큰 변화는 없었다(Figure 3A). 하지만 HUVEC는 Control에 비해 TGF- β 의 발현율이 유의성 있게 상승하였으며 특히 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 2 배 이상의 발현 증가를 확인할 수 있다(Figure 3B).

4. ADV처리에 의한 ALP 발현 분석

ADV가 골분화능에 미치는 영향과 관련하여 골모세포인 hFOB1.19를 이용하여 10 $\mu\text{g/mL}$ 과 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 7일 동안 처리하고 ALP 염색능과 ALP 활성도를 분석하였다. 골모

세포에 분화유도제와 함께ADV를 농도별로 처리한 결과, 골모세포의 골분화능이 형태학적으로 감소하였을 뿐만 아니라, ADV의 농도별 처리에 의해ALP 활성도가 농도의존적으로 감소하는 효과를 확인할 수 있다(Figure 4A, 4B).

고 찰

골다공증은 골밀도 저하에 의해 유발되는 질병으로서, 최근 임상학적 보고에 의하면, ADV 장기복용에 의한 골다공증 부작용 유발이 보고되고 있다. 하지만 이와 관련된 세포학적 연구가 미흡하다. 이에 본 연구에서는 골 관련 세포 및 혈관세포를 이용하여 ADV 약물과 골다공증 유발 부작용에 미치는 생물학적 연관성을 조사하였다.

hFOB1.19와 HUVEC 세포에서 ADV 처리에 의한 형태학적 관계를 조사하였다. 본 연구의 결과에서는 특이적으로 hFOB1.19 세포와 HUVEC 세포의 크기 비율이 농도 의존적으로 증대 되었음을 확인할 수 있었다(Figure 1). 세포의 비대현상(hypertrophy)은 세포의 분화 및 분열의 제한 뿐만 아니라 세포자멸사(apoptosis)와 관련된 생리적인 현상의 발현을 억제하는 작용 기전이 연관되어 있다고 보고하고 있다[17-19].

최근 연구보고에 의하면 ADV가 C/EBP β isoform의 LIP을 표적 함으로서, 세포 신호에서 중요한 TGF- β 매개 활성을 약화시키거나 지연시킨다고 보고하였다[20, 21]. 또한 세포내 TGF- β 신호전달은 세포의 비대현상과 연관되어 있으며[22, 23], 특히 글루코코르티코이드에 의한 mouse embryonic fibroblasts와 kidney epithelial-like 세포의 비대현상의 경우에 TGF- β 가 필수적으로 관여하고 있다고 보고하고 있으며[24], 본 연구의 결과에서도 농도의존적으로 TGF- β 발현이 감소를 확인할

Figure 2. Evaluation of the effects of ADV on cellular proliferations. HUVECs and hFOB1.19 cells were treated with ADV at a concentration of 0, 10, and 50 $\mu\text{g/mL}$. The proliferation and growth rates of the cells were evaluated by CCK-8 assays after 0, 24, 48, and 72 hr of incubations. When treat with 50 $\mu\text{g/mL}$ of ADV, cell proliferation was significantly inhibited in HUVECs. Values are expressed as means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ compared with the control group (0 $\mu\text{g/mL}$ of ADV).

Figure 3. TGF- β expression of hFOB1.19 and HUVECs by ADV treatment. hFOB1.19 cells (A) and HUVECs (B) were treated with ADV at a concentration of 0, 10, and 50 μ g/mL. The mRNA expression of TGF- β were evaluated by real-time PCR after 72 hr of incubations. The real time PCR data showed that TGF- β expression was significantly reduced by ADV treatment in HUVECs. Values are expressed as means $\pm$ SD. * P <0.05 compared with the control group (0 μ g/mL of ADV).

수 있었다(Figure 3). 따라서 보고된 선행 연구결과들은 ADV 처리에 의한 hFOB1.19와 HUVEC 세포의 비대현상이 TGF- β 신호전달 기전과 연관되어 있음을 생각할 수 있다. 이와 더불어 임상학적 관점에서 ADV는 신장세포내 신독성을 나타내고[25], 이러한 독성학적 현상이 골모세포 및 골항상성 유지 세포의 반응 옵션으로서, 세포의 분열을 통제하고 세포의 크기 변화를 유발한 것이라 생각할 수 있다. 특히 Zhang 등 연구보고에 따르면, ADV 이외의 레트로바이러스 억제제인 tenofovir와 같은 약물 모두 일정 농도 이상에서 세포에 독성을 보이며 특히 tenofovir보다 ADV가 더 높은 세포의 성장 억제를 보인다고 보고하고 있다[26]. 이에 본 연구에서 비대현상이 세포의 증식률(proliferation)과의 관련성을 확인하였다. 그 결과 50 μ g/mL 농도에서 72시간 배양 후 실험에 이용된 hFOB1.19와 HUVEC 세포의 성장이 전반적으로 감소하는 경향을 확인할 수 있었다(Figure 2). ADV는 HSC (hepatic stellate cell) 세포에서

Figure 4. Effects of ADV treatment on osteoblast differentiation. hFOB1.19 cells were treated with ADV and differentiation level was evaluated ALP staining (A) and ALP activity assay (B) after 7 days of incubation with or without osteogenic media (OM). The ALP staining and activity results showed that OM induced osteoblast differentiation reduced by ADV treatment in hFOB1.19. Bar=500 μ m. Values are expressed as means $\pm$ SD. * P <0.05 compared with the control group (0 μ g/mL of ADV). Abbreviation: NS, not significant difference.

c/EBP β 발현을 억제하여 extracellular membrane (ECM) 단백질 발현을 조절하고 세포의 증식과 세포자멸사를 조절할 수 있다고 보고된바 있다[20, 26]. 비록 본 연구에서는 세포성장에 대한 정확한 신호전달기전에 관한 연구를 수행하지 않았으나, 본 연구에서 TGF- β 의 발현 감소를 확인함으로써(Figure 3), ADV에 의한 세포 증식의 억제가 TGF- β 단백질 등이 관여되어 세포성장이 억제될 수 있는 가능성을 제시했다고 생각할 수 있다.

골다공증과 관련된 골의 항상성 유지는 골모세포의 증식과 분화(재생) 그리고 조직으로의 세포 이동과 영양 공급을 위해 중요하다[27, 28]. 본 연구의 결과에 의하면 ADV는 골모세포와 혈관내피세포의 비대현상을 유도하였을 뿐만 아니라, 이들 세포의 성장을 억제하였다. 이러한 결과는 ADV가 산소와 영양을 담당, 공급하는 세포의 항상성을 억제함으로써, 혈관 항상성 유지 및 골 항상성에 영향을 주어 골다공증을 유발하는 것이라 생각할 수 있다. 따라서 골분화 초기 마커인 ALP를 이용하여 골 분화에 미치는 영향을 평가하였다(Figure 4). 본 연구결과에서,

골분화 유도 인자에 의한 ADV 50 µg/mL 농도에서 골분화 유도 능력에 대해 형태학적 차이를 확인할 수 있었으며, 활성도 분석을 통해서도 이를 검증할 수 있었다. 특히 항바이러스제는 성숙한 세포로의 분화과정에 영향을 미칠 수 있음이 보고 되어 있으며[29, 30], 이러한 선행연구들의 보고와 본 연구의 결과는 골다공증 유발 세포의 성장 및 분열에 대한 영향이 골모세포 분화능력 과정에 기여했을 것으로 생각된다. 그러므로 골모세포 수준에서 ADV가 직접적으로 골세포로의 분화 과정에 관여하고 있음을 유추해 볼 수 있다. 결론적으로, 본 연구에서는 ADV 약물이 골모세포와 혈관내피세포의 TGF-β의 발현을 억제하여 핵의 크기 증가와 세포형태의 비대증을 유발하며, 세포의 증식억제 및 골모세포 분화능에 영향을 줌으로서 골다공증을 유발할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이러한 결과는 항바이러스제로서 ADV대한 골다공증 발병을 이해하기 위한 기초 연구 및 이를 이용한 임상영역에 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

골다공증은 호르몬의 변화와 무기질 감소에 의해 골밀도의 감소를 유발하여 골절의 위험을 높이는 질환이다. 최근 보고에 의하면, 간염바이러스 및 에이즈 치료제로 사용되고 있는 Adefovir dipivoxil (ADV)의 장기적 복용에서 골다공증 부작용이 유발할 수 있음이 보고 되고 있다. 이에 대한 연구수행을 위해 골모세포주 hFOB1.19와 혈관내피세포 HUVEC을 이용하여 ADV에 대한 생물학적 연관성을 평가하였다. 우선적으로 ADV를 농도별로 처리한 후 각 세포와 핵의 형태학적 분석을 위해 DAPI와 crystal violet 염색을 시행하였다. 또한 세포 증식에 대한 약물 효과를 평가하기 위하여 CCK-8분석과 골모세포에 대한 분화유도 및 억제 효과를 확인하기 위하여, ALP 염색을 진행하였다. 그 결과, ADV는 hFOB1.19 세포와 HUVEC 세포에서 농도 의존적으로 세포의 비대 현상을 유발하였고, 세포의 증식이 억제되었다. 이러한 원인들을 규명하기 위해 TGF-β발현을 조사하였을 뿐만 아니라 이러한 발현 감소에 의한 생물학적 영향이 골모세포로부터 골세포로의 분화 과정에 관여하고 있음을 확인할 수 있었다. 결론적으로, 본 연구에서는 ADV 약물이 골모세포와 혈관내피세포의 TGF-β의 발현을 억제하여 핵의 크기 증가와 세포형태의 비대증을 유발하며, 세포의 증식억제 및 골모세포 분화능에 영향을 줌으로서 골다공증을 유발할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이러한 결과는 ADV 복용에 따른 골다공증 발병 원인을 이해하기 위한 기초 연구 및 이를 이용한 임상영역에 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgements: This paper was supported by Wonkwang Health Science University in 2019.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Park H, Professor.

REFERENCES

- McKenna MJ, Frame B. Hormonal influences on osteoporosis. *Am J Med.* 1987;82:61-67.
- Kurra S, Siris E. Diabetes and bone health: the relationship between diabetes and osteoporosis-associated fractures. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011;27:430-435.
- Schipper LG, Fleuren HW, van den Bergh JP, Meinardi JR, Veldman BA, Kramers C. Treatment of osteoporosis in renal insufficiency. *Clin Rheumatol.* 2015;34:1341-1345.
- Drake MT. Osteoporosis and Cancer. *Curr Osteoporosis Rep.* 2013;11:163-170.
- Canalis E, Delany AM. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:73-81.
- Kwon SY, Ahn SY, Ko SY, Jang YM, Choi YH, Kim BK, et al. A case of osteomalacia related to adefovir in a patient with chronic hepatitis B. *Korean J Gastroenterol.* 2010;56:117-120.
- Jeong HY, Lee JM, Lee TH, Lee JY, Kim HB, Heo MH, et al. Two cases of hypophosphatemic osteomalacia after long-term low dose adefovir therapy in chronic hepatitis B and literature review. *J Bone Metab.* 2014;21:76-83.
- Kramata P, Votruba I, Otová B, Holý A. Different inhibitory potencies of acyclic phosphonomethoxyalkyl nucleotide analogs toward DNA polymerases alpha, delta and epsilon. *Mol Pharmacol.* 1996;49:1005-1011.
- Romaniuk PJ, Eckstein F. A study of the mechanism of T4 DNA polymerase with diastereomeric phosphorothioate analogues of deoxyadenosine triphosphate. *J Biol Chem.* 1982;257:7684-7688.
- Nakashima K, Nakashima H, Shimoyama M. Deoxyadenosine triphosphate acting as an energy-transferring molecule in adenosine deaminase inhibited human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1094:257-262.
- Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 2003;348:808-816.
- ADHOC International Steering Committee. A randomized placebo-controlled trial of adefovir dipivoxil in advanced HIV infection: the ADHOC trial. *HIV Med.* 2002;3:229-238.
- Fisher EJ, Chaloner K, Cohn DL, Grant LB, Alston B, Brosgart CL, et al. The safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients with advanced HIV disease: a randomized, placebo-controlled trial. *AIDS.* 2001;15:1695-1700.
- Kahn J, Lagakos S, Wulfsohn M, Cherrington D, Miller M, Cherrington J, et al. Efficacy and safety of adefovir dipivoxil with antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1999;282:2305-2312.
- Eguchi H, Tsuruta M, Tani J, Kuwahara R, Hiromatsu Y.

- Hypophosphatemic osteomalacia due to drug-induced Fanconi's syndrome associated with adefovir dipivoxil treatment for hepatitis B. *Intern Med.* 2014;53:233-237.
16. Girgis CM, Wong T, Ngu MC, Emmett L, Archer KA, Chen RC, et al. Hypophosphataemic osteomalacia in patients on adefovir dipivoxil. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45:468-473.
 17. Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng CX. TGF- β /Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol.* 2001;153:35-46.
 18. Owens GK, Geisterfer AA, Yang YW, Komoriya A. Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1988;107:771-780.
 19. Zhuang H, Wang W, Tahernia AD, Levitz CL, Luchetti WT, Brighton CT. Mechanical strain-induced proliferation of osteoblastic cells parallels increased TGF- β 1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;229:449-453.
 20. Liu Z, Li C, Kang N, Malhi H, Shah VH, Maiers JL. Transforming growth factor β (TGF β) cross-talk with the unfolded protein response is critical for hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem.* 2019;294:3137-3151.
 21. Boström P, Mann N, Wu J, Quintero PA, Plovie ER, Panáková D, Gupta RK, et al. C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell.* 2010;143:1072-1083.
 22. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, et al. C/EBP β promotes transition from Proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57^{Kip2}. *PLoS One.* 2009;4:E4543.
 23. Zou J, Li H, Chen X, Zeng S, Ye J, Zhou C, et al. C/EBP β knock-down protects cardiomyocytes from hypertrophy via inhibition of p65-NF κ B. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;390:18-25.
 24. Wu L, Derynck R. Essential role of TGF- β signaling in glucose-induced cell hypertrophy. *Dev Cell.* 2009;17:35-48.
 25. Izzedine H, Launay-Vacher V, Deray G. Antiviral drug-induced nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis.* 2005;45:804-817.
 26. Zhang X, Wang R, Piotrowski M, Zhang H, Leach KL. Intracellular concentrations determine the cytotoxicity of adefovir, cidofovir and tenofovir. *Toxicol In Vitro.* 2015;29:251-258.
 27. Balogh E, Paragh G, Jeney V. Influence of iron on bone homeostasis. *Pharmaceuticals.* 2018;11:E107.
 28. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* 2016;4:16009.
 29. Jones E, Mazirka P, McNurlan MA, Darras F, Gelato MC, Caso G. Highly active antiretroviral therapy dysregulates proliferation and differentiation of human pre-adipocytes. *World J Virol.* 2017;6:53-58.
 30. Xu P, Wang Y, Qin Z, Qiu L, Zhang M, Huang Y, et al. Combined medication of antiretroviral drugs tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and raltegravir reduces neural progenitor cell proliferation in vivo and in vitro. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2017;12:682-692.