

17 β -雌二醇对体外培养人成骨细胞 CTGF 和 PAIP-1 基因表达的作用

翟木绪 彭依群 隋国良 王敏 廖二元

摘要: 目的 观察结缔组织生长因子(CTGF)和多聚腺苷酸结合蛋白相互作用蛋白-1(PAIP-1)mRNA在体外培养的人成骨细胞增殖分化不同阶段的表达,研究17 β -雌二醇(E₂)对成骨细胞CTGF和PAIP-1 mRNA表达的作用,探讨雌激素对骨组织保护作用的新机制。方法 用改良的钙-钴法ALP染色, van Gieson法I型胶原染色,0.1%茜素红矿化结节染色,半定量RT-PCR检测成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OC)和I型胶原mRNA的表达,半定量RT-PCR和Northern blot方法检测成骨细胞CTGF和PAIP-1 mRNA表达。结果 半定量RT-PCR和组织化学染色的结果均表明,成骨细胞接种培养后0~11 d为细胞增殖阶段,7~15 d为骨基质成熟阶段,15 d后为骨基质矿化阶段;在成骨细胞培养的不同阶段,均检测到CTGF和PAIP-1 mRNA的表达,E₂可显著下调成骨细胞CTGF mRNA的表达,呈时间剂量依赖关系(P<0.01),但对PAIP-1 mRNA表达无明显作用。结论 E₂时间剂量依赖性下调成骨细胞CTGF mRNA的表达,但对PAIP-1 mRNA表达无明显影响。

关键词: 雌二醇; 结缔组织生长因子; 多聚腺苷酸结合蛋白相互作用蛋白-1; 成骨细胞

Effects of 17beta-estradiol on expression of CTGF and PAIP-1 in human osteoblasts *in vitro* ZHAI Muxu, SUI Guoliang, SUI Guoliang, et al. Institute of Metabolism and Endocrinology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: Objective To observe the expression of connective tissue growth factor(CTGF) and polyadenylate-binding protein interacting protein 1(PAIP-1) mRNA during human osteoblast proliferation and differentiation, investigate the effects of 17beta-estradiol on expression of CTGF and PAIP-1, and try to provide new mechanisms of estrogens on bone tissues. **Methods** The expression of type 1 collagen, alkaline phosphatase and osteocalcin was determined by semiquantitative RT-PCR. Cultured cells were stained with van Gieson procedure and modified Gomori's assay. Mineralized matrix staining was performed with 0.1% Alizarin red. The expressions of CTGF and PAIP-1 mRNA was examined through semiquantitative RT-PCR and Northern blotting. **Results** By the combination of molecular and histochemical approaches, three stages of human osteoblast proliferation and differentiation can be defined as follows: cell proliferation(days 0-11), matrix maturation(day 7-15) and mineralization(days 15-). CTGF mRNA and PAIP-1 mRNA were all detected during three stages. RT-PCR and Northern blot showed that 17beta-estradiol downregulated the expression of CTGF mRNA, but had no effects on PAIP-1 mRNA. **Conclusions** 17beta-estradiol can downregulate the expression of CTGF mRNA in human osteoblasts, but has no effects on the expression of PAIP-1 mRNA.

Key words: Estrogen; Connective tissue growth factor; Polyadenylate-binding protein interacting protein 1; Human osteoblasts

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是CCN家族中的一员,是一种多功能的生

长因子,参与了体内多种生理和病理过程,尤其在TGF- β 依赖性纤维化途径中发挥重要作用。在生理状态下,CTGF可调节细胞外基质形成以及蛋白水解酶和蛋白酶抑制剂的合成。有研究表明,CTGF作为一种重要的效应分子之一,在软骨细胞和成骨细胞的增殖分化方面发挥重要作用;多聚腺苷酸结合蛋

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970374),国家“九五”攻关基金资助项目(969060505)

作者单位:410011长沙,中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所

通讯作者:廖二元,Email:eyliao2003@21cn.com

白相互作用蛋白-1 (polyadenylate-binding protein interacting protein 1, PAIP-1) 是一种翻译调节因子, 在 poly (A) 结合蛋白 (polyadenylate-binding protein, PABP) 介导的翻译过程中发挥调控作用^[1-3]。雌激素缺乏与妇女绝经后骨质疏松的发生有关, 但其发病机制尚未阐明^[4]。目前国内外尚无研究资料表明 CTGF、PAIP-1 参与了雌激素介导的骨代谢调控作用。本研究的目的旨在探讨 17 β 雌二醇 E₂ 对体外培养人成骨细胞 CTGF 和 PAIP-1 mRNA 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料: 雌二醇、无酚红 MEM 培养基、胰酶, EDTA、抗坏血酸、牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Sigma 公司, 焦碳酸二乙酯 (DEPC)、Trizol 购自 Invitrogen 公司, 胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司, 雌激素受体拮抗剂 (ICI182780) 购自英国 Tocris Cookson 公司, 逆转录试剂盒购自 Promega 公司, Taq 酶、琼脂糖、溴化乙锭购自上海生工公司, ϕ X174-Hinc II digest DNA Marker 购自 Takara 公司, α -³²P-dCTP 购自北京亚辉生物制品公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

正常人成骨细胞培养: 按 Gerhon 和 Termine^[5] 介绍的方法并作适当修改。外科手术取正常成人髂骨松质骨, 剔除周围结缔组织, 剪成 2 mm³ 大小碎粒, PBS 冲洗振荡 3 次, 加入 1 mg/ml IV 型胶原酶 37℃ 震荡消化, 待松质骨变白并呈蜂窝状, 加入 20% FBS MEM 终止消化, 10% FBS MEM 洗涤 3 次, 待洗液中不含细胞时, 将骨片贴于 25 cm² 培养瓶, 加入 MEM 培养液 (含 15% FBS、抗坏血酸 50 μ g/ml), 37℃, 5% CO₂ 培养。2 d 后换液, 以后每 3 d 换液一次。培养约 15 d 后, 可见细胞游出, 约 25 d 达汇片, 用 0.25% 胰酶-EDTA 消化, 按 5 \times 10⁵ 细胞/25cm² 培养瓶接种。

1.2.2 细胞干预实验

人成骨细胞接种于 25 cm² 培养瓶, 10% FBS 无酚红 MEM 培养液培养, 于第 2 天换 0.1% BSA 无酚红 MEM 培养液培养 24 h, 分别用不同浓度 E₂ 干预, 分为 6 组: ① E₂ 0 mol/L; ② E₂ 10⁻¹⁰ mol/L; ③ E₂ 10⁻⁸ mol/L; ④ E₂ 10⁻⁶ mol/L; ⑤ E₂ 10⁻⁸ mol/L + 雌激素受体拮抗剂 ICI182 780 10⁻⁷ mol/L; ⑥ E₂ 10⁻⁶ mol/L + 雌激素受体拮抗剂 ICI182 780 10⁻⁷ mol/L, 24h 后提取总 RNA。另外, 10⁻⁸ mol/L E₂ 干预的时间梯度组在作用

0、2、4、6、12、24 和 48h 后分别提取总 RNA。

1.2.3 1 型胶原染色: Van Gieson 氏苦味酸复红染色法。人成骨细胞按 1 \times 10⁵ 细胞/孔接种于放有玻片的 6 孔培养板中, 于培养第 6、12、18 天取出玻片, -20℃ 丙酮固定, 流水冲洗, 蒸馏水冲洗, Weigert 铁苏木素液染 5 min, 流水冲洗, 1% 盐酸酒精分色迅速, 流水冲洗, van Gieson 苦味酸复红染液染 5 min, 95% 乙醇分化、脱水, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片。

1.2.4 矿化结节染色: 于第 15 天取接种于置玻片的 6 孔培养板中成骨细胞, 90% 乙醇固定 10 min, 0.1% 茜素红染色 1 min。

1.2.5 ALP 染色: 改良钙-钴法 (Gomori 法)。将成骨细胞接种于置玻片的 6 孔培养板中, 于培养第 6、12、18 天取出细胞片, PBS 冲洗, 4℃ 冷丙酮固定, 加入孵育液 (含 0.5% β -磷酸甘油钠、0.5% 巴比妥钠、0.9% 氯化钙、0.04% 硫酸镁), 37℃ 孵育 6h, 2% 硝酸钴作用 5 min, 1% 硫化胺处理 1 min, 乙醇脱水。另设阴性对照, 孵育液中不含 β -磷酸甘油钠。

1.2.6 半定量 RT-PCR 检测成骨细胞 1 型胶原、ALP、OC、CTGF 和 PAIP-1 mRNA 的表达

1.2.6.1 用 Trizol 法 (Invitrogen 公司) 按说明书抽提总 RNA。 在 Gene Amp 2400 PCR 扩增仪上行半定量 RT-PCR。首先取总 RNA 2.0ug, 用逆转录试剂盒 (Promega 公司), 按说明书合成 cDNA, 再取 cDNA 行 PCR 扩增。扩增体系: cDNA 50ng, 25mM MgCl₂ 2 μ l, 100ng/ μ l 引物各 0.7 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, Taq 酶 1U, 加去离子水至终体积 25 μ l。CTGF、PAIP-1 和 OC 扩增条件: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 30 S, 56℃ 30 S, 72℃ 30 S, 最后 72℃ 延伸 7 min, 循环 25 个。1 型胶原和 ALP 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 50 S, 58℃ 30 S, 72℃ 45 S, 最后 72℃ 延伸 7 min, 循环 25 个。同时以 β -actin 基因作为内对照。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统测定光密度, 分别计算各基因与 β -actin 基因的光密度比值。

1.2.6.2 引物设计

用 PCR Designer 软件设计, 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

引物序列如下:

	正向	反向
β -actin	5'-CTC OGC CTT TGC CGA TCC -3'	5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAC TC-3'
CTGF	5'-CCA AGG ACC AAA CCG TCG T-3'	5'-TAC TCC ACA GAA TTT ACC TCG-3'
PAIP-1	5'-TTT GGA AGA TGC TTG GAA GG -3'	5'-CTG CAG TCA AAG GAA CAC CA-3'
1 型胶原	5'-AGC AGC ATC ACC CTT AGC AG-3'	5'-CTG CTC CTG ATG GCA AAA CT-3'
ALP	5'-ACC TCG TTG ACA GCT GGA AG-3'	5'-GTG AAG ACG TCG GAA TGG TC-3'
OC	5'-TGA GAG CCC TCA CAC TCC TC-3'	5'-TCA GCC AAC TCG TCA CAGTC-3'

1.2.7 Northern blot 检测人成骨细胞 PAIP-1 和 CTGF mRNA 的表达

参照分子克隆实验指南进行操作^[6]。分别取对照组和实验组总 RNA 20 μ g, 1.2% 甲醛琼脂糖变性胶电泳, 转尼龙膜, 将纯化回收的用 α -³²P-dCTP 标记 cDNA 探针 (β -actin 为内对照), 68 $^{\circ}$ C 杂交, 2 \times SSC/0.05% SDS 洗膜 15min \times 2 次, 0.5 \times SSC/0.5% SDS 50 $^{\circ}$ C 洗膜 15min \times 2 次, 用 Typhoon 2000 Imagequant 5.1 成像分析系统扫描图像, 并行条带光密度检测。

1.3 统计学处理

各实验独立重复 3 次以上, 重复性好。所选图



图 1 成骨细胞 I 型胶原染色 (van Gieson 法 $\times 200$)

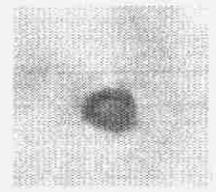


图 2 0.1% 茜素红矿化结节染色 $\times 200$

2.3 ALP 染色 (图 3)

成骨细胞培养 5 d 后 ALP 染色呈阴性, 7 d 后部分细胞 ALP 染色转为阳性, 胞浆内可见黑色的细小

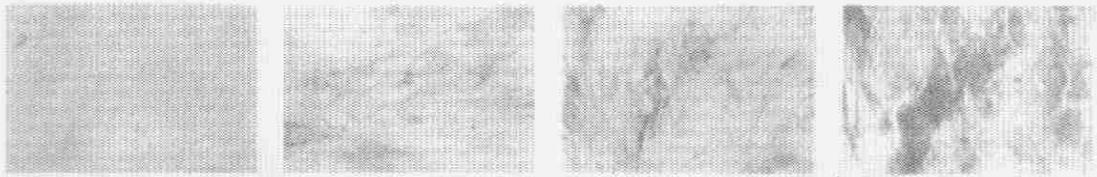


图 3 成骨细胞 ALP 染色 (改良钙-钙法)

2.4 I 型胶原、ALP 和 OC mRNA 成骨细胞培养的不同时期的表达 (图 4)

半定量 RT-PCR 结果显示: 成骨细胞接种培养后第 1 天即观察到 I 型胶原 mRNA 表达, 至第 11 天达最高峰, 后逐渐下降, ALP mRNA 的表达于第 7 天开始逐渐升高, 至第 17 天达峰值, 其后其表达水平无明显下调, 在整个培养期内 OC 的表达逐渐上调, 至 17 d 达峰值, 其后迅速下调。

2.5 CTGF 和 PAIP-1 mRNA 在成骨细胞培养不同时期的表达 (图 5)

首先直接以总 RNA 为模板行 PCR, 电泳未见 PAIP-1 特异产物, 证实所抽提的总 RNA 中不含痕量基因组 DNA 污染。再行半定量 RT-PCR 结果显示: 成骨细胞接种培养后第 1 天即观察到 CTGF mRNA 的表达, 但表达水平较低, 至第 5 天达峰值, 其后迅

速下调, 至基质成熟期其表达水平逐渐上调, 并维持至矿化期; 成骨细胞增殖期和矿化期 PAIP-1 mRNA 表达水平均较低, 而在基质成熟期其表达水平相对较高。

2 结果

2.1 I 型胶原染色 (图 1)

Van Gieson 染色显示, 成骨细胞接种培养后第 6 天细胞层胶原染色呈淡红色, 12 天后细胞层染色转红, 18 天后细胞变得极为致密, 细胞轮廓欠清, 胶原染色深红。

2.2 矿化结节染色 (图 2)

人成骨细胞培养 15 d 后可见橘红色的矿化结节形成。

颗粒, 12 d 后 ALP 阳性细胞比例明显增多, 至 18 d 几乎所有细胞 ALP 染色均成阳性, 细胞轮廓显示不清。

速下调, 至基质成熟期其表达水平逐渐上调, 并维持至矿化期; 成骨细胞增殖期和矿化期 PAIP-1 mRNA 表达水平均较低, 而在基质成熟期其表达水平相对较高。

2.6 17 β -E₂ 对成骨细胞 CTGF 基因表达的影响 (图 6, 7)

2.6.1 半定量 RT-PCR 的结果显示: 10⁻¹⁰、10⁻⁸ 和 10⁻⁶ E₂ 均明显下调成骨细胞 CTGF mRNA 的表达 (P < 0.01), 但 10⁻⁷ ICI182 780 + E₂ 干预组与同浓度 E₂ 干预组比较差异无显著性 (P > 0.05); 10⁻⁸ 作用 12 ~ 24h E₂ 下调作用最明显 (P < 0.01)。

2.6.2 Northern blot 结果显示: 10⁻¹⁰、10⁻⁸ 和 10⁻⁶ E₂ 均明显下调成骨细胞 CTGF mRNA 的表达 (P < 0.01), 且呈明显时间和剂量依赖关系, 10⁻⁸ 17 β -E₂ 作用 6 ~ 24 h 达最大抑制效果 (P < 0.01)。

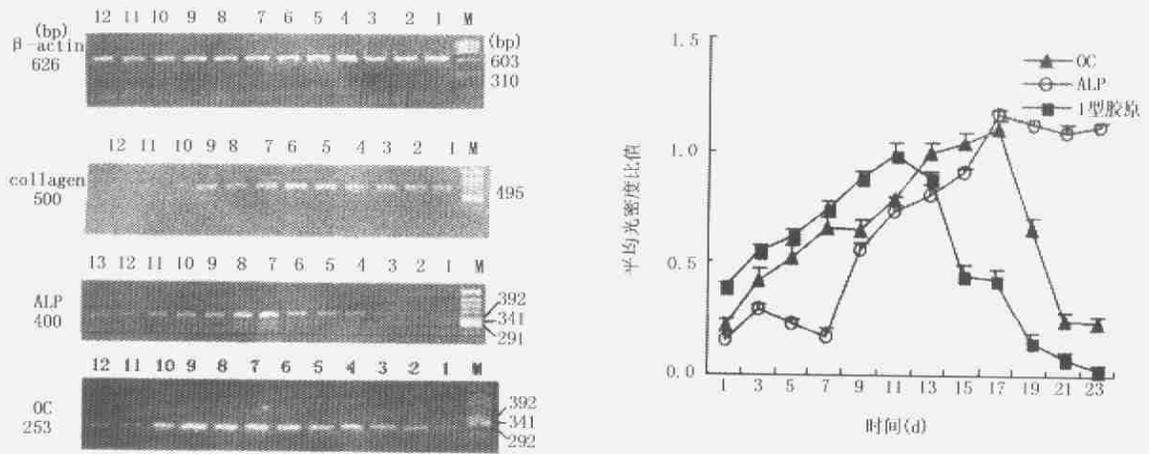


图4 成骨细胞I型胶原、ALP和OC mRNA表达量随培养时间的变化

图中M为分子量标准 DG-2000 或 ϕ X174-HincII DNA Marker, 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12泳道分别表示成骨细胞培养后第1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23天抽提总RNA的RT-PCR产物

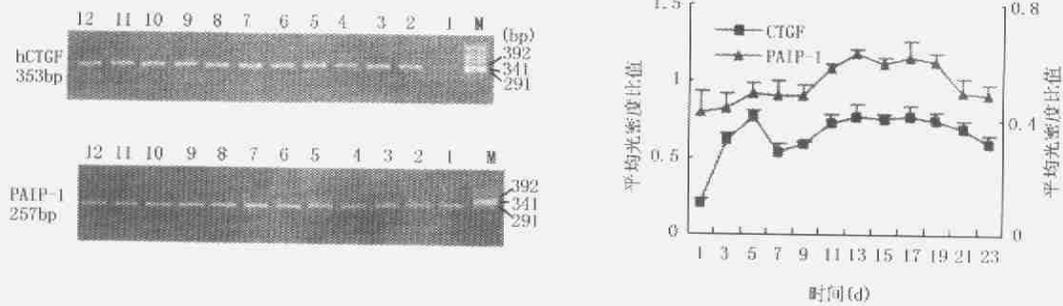


图5 人成骨细胞CTGF mRNA表达量随培养时间的变化

图中M为分子量标准 ϕ X174-HincII DNA Marker, 第1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12泳道分别表示成骨细胞培养后第1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23天抽提总RNA的RT-PCR产物;右图左侧纵坐标值代表CTGF/ β -actin平均光密度比较比值,右图右侧纵坐标值代表PAIP-1/ β -actin平均光密度比值

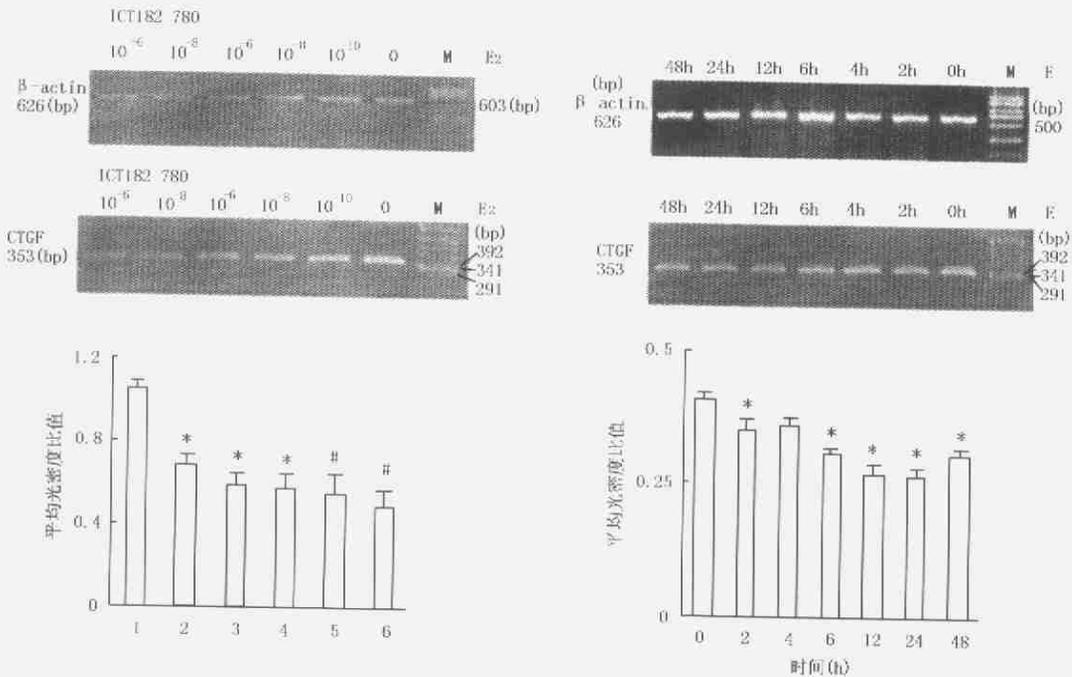


图6 E_2 对人成骨细胞CTGF mRNA表达的影响(RT-PCR)

注:与对照组比较 $P < 0.01$;与同浓度 E_2 组比较 $P > 0.05$;1,2,3,4,5,6分别表示对照组、不同浓度 E_2 (10^{-10} 、 10^{-8} 、 10^{-6})干预组和不同浓度 E_2 (10^{-8} 、 10^{-6}) + 10^{-7} ICH82 780组;平均光密度比值为CTGF光密度/ β -actin平均光密度

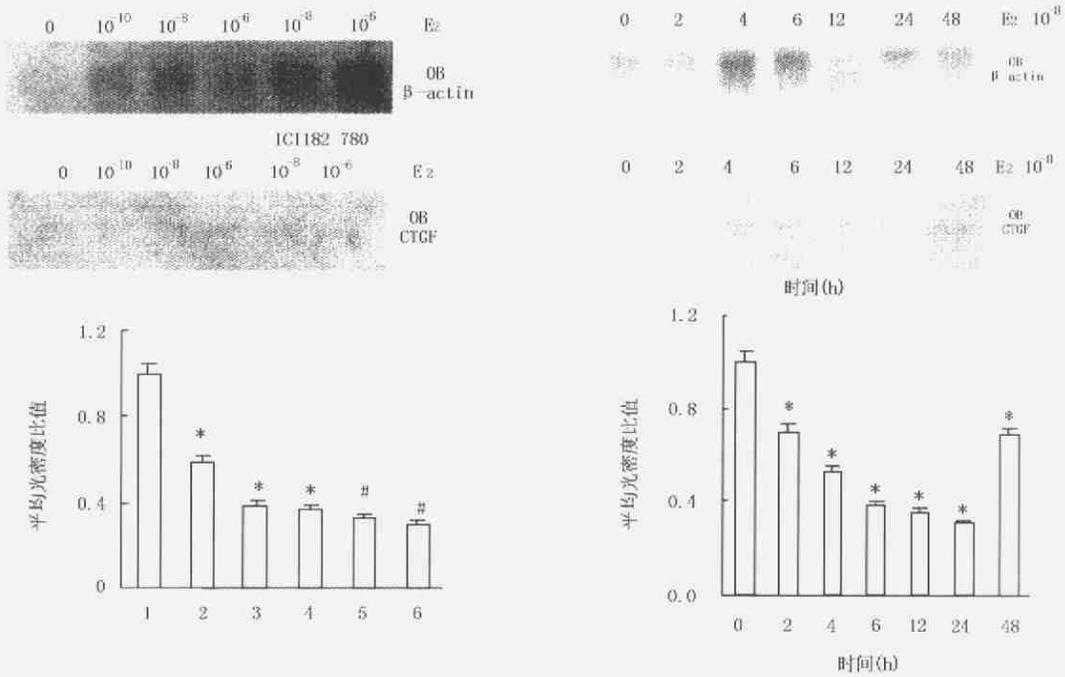


图7 E₂对成骨细胞CTGF mRNA表达的影响(Northern blot)

注:与对照组比较 $P < 0.01$;与同浓度E₂组比较 $^* P > 0.05$;1,2,3,4,5,6分别表示对照组、不同浓度E₂(10⁻¹⁰、10⁻⁸、10⁻⁶)干预组和不同浓度E₂(10⁻⁸、10⁻⁶) + 10⁻⁷ICI182 780组;平均光密度比值为干预组经β-actin校正平均光密度比值/对照组经β-actin校正平均光密度比值

2.7 17β-E₂对成骨细胞PAIP-1基因表达的影响(图8)
半定量RT-PCR和Northern blot结果显示:与对

照组比较,E₂对人成骨细胞PAIP-1 mRNA的表达无明显影响($P > 0.05$)。

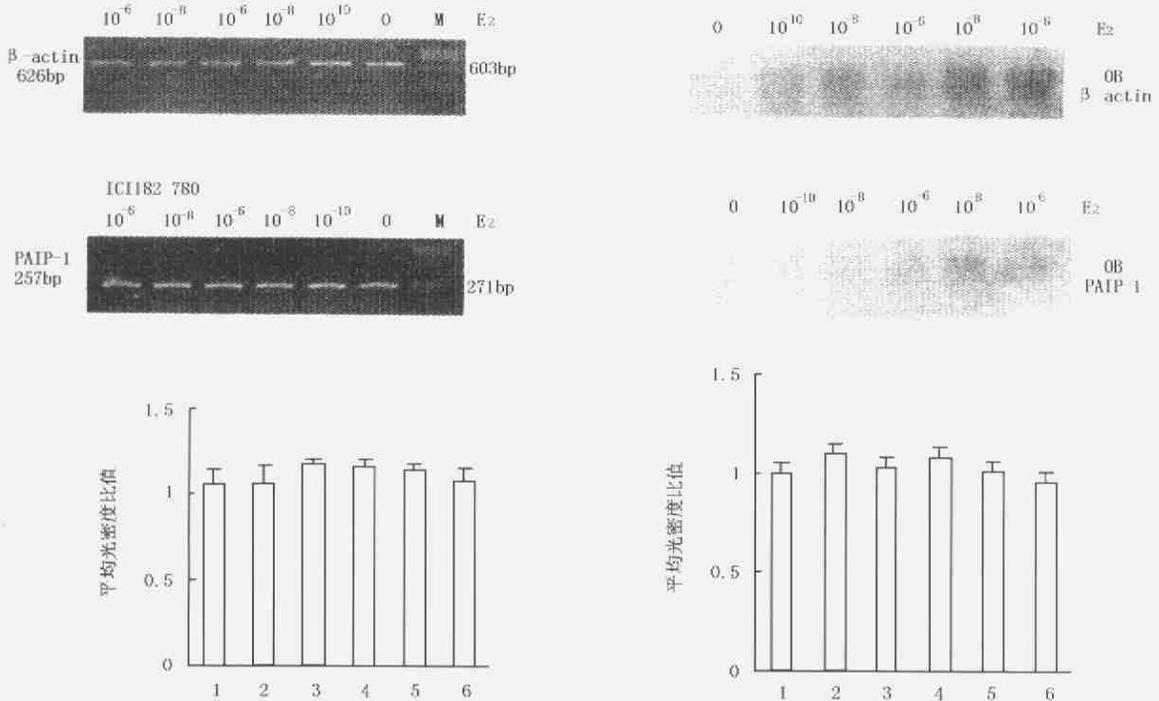


图8 E₂对成骨细胞PAIP-1 mRNA表达的影响(左:RT-PCR;右:Northern blot)

注:图中1,2,3,4,5,6分别表示对照组、不同浓度E₂(10⁻¹⁰、10⁻⁸、10⁻⁶)干预组和不同浓度E₂(10⁻⁸、10⁻⁶) + 10⁻⁷ICI182 780组;平均光密度比值为β-actin校正干预组光密度比值/β-actin校正对照组光密度比值

3 讨论

体外培养的成骨细胞可由增殖活跃的前成骨细胞分化成成熟的成骨细胞^[7,8]。采用组织化学、生物化学、分子生物学以及超微结构观察等方法,可将培养成骨细胞的体外分化过程分为3个阶段:细胞增殖阶段,基质成熟阶段和基质矿化阶段。在这3个不同的阶段,成骨细胞的基因呈时序表达,因此,成骨细胞的基因表达与其增殖分化过程是相对应的^[9,10]。我们采用组织化学和分子生物学方法确定体外培养成骨细胞增殖分化的不同阶段。人成骨细胞接种培养后0~7 d汇片,1型胶原mRNA表达于第11天达高峰,ALP的表达于第7天开始明显上调,至第17天达峰值,在整个培养期内OC的表达水平逐渐上调,至17天达峰值,其后迅速下调。van Gieson染色显示,人成骨细胞接种培养后6 d细胞层胶原染色呈淡红色,未见明显骨结节形成,12 d后细胞层染色转红,可见骨结节形成,18 d后细胞变得极为致密,细胞轮廓欠清,胶原染色深红。细胞培养5 d后ALP染色呈阴性,7 d后部分细胞ALP染色转为阳性,胞浆内可见黑色的细小颗粒,12 d后ALP阳性细胞比例明显增多,至18 d几乎所有细胞ALP染色均成阳性,可见融合成块状的黑色颗粒掩盖胞核,细胞轮廓显示不清。细胞培养15 d后可见橘红色的矿化结节形成。根据上述指标的变化,本研究确定人成骨细胞分化过程的3个阶段:细胞接种培养后0~11 d为增殖阶段,7~15 d为基质成熟阶段,15天后为基质矿化阶段,这与文献报道基本一致^[9,10]。

半定量RT-PCR结果显示:在人成骨细胞整个培养期内均检测到CTGF和PAIP-1 mRNA表达,细胞接种培养后第1天即观察到CTGF mRNA的表达,但表达水平较低,至第5天达高峰,其后迅速下调,至基质成熟期其表达水平逐渐上调,并维持至矿化期。这与Safadi等^[11]的研究结论不甚一致。Safadi等对体外培养的新生鼠成骨细胞的研究发现,CTGF mRNA表达呈双峰模式(第2天和第14天),其原因考虑与细胞来源的种属差异或所采用的研究方法不同有关。此外,在成骨细胞增殖期和矿化期PAIP-1 mRNA表达水平均较低,而在基质成熟期其表达水平相对较高。

CTGF是一种肥大带软骨细胞特异性的基因表达产物,属于CCN家族中的成员,是一种多功能的生长因子,可促进间叶细胞增殖、分化、胞外基质形

成,在软骨细胞和成骨细胞的增殖分化方面发挥重要作用。Kumar等^[12]研究发现,重组人CTGF-L蛋白可促进成骨细胞的黏附,抑制纤维蛋白原与整合素受体结合,并抑制大鼠Ros 17/2.8细胞OC的合成,提示CTGF-L在调节细胞增殖/分化方面发挥重要作用。Xu等^[13]对原代培养成骨细胞的研究发现,在细胞活跃增殖阶段CTGF表达水平最高,随着增殖活性的下降CTGF表达逐渐降低,也提示CTGF可能参与了成骨细胞增殖/分化过程的调节。而Nishida等^[14]研究则表明,rCTGF仅轻度促进SaOS-2细胞和MC3T3-E1细胞的增殖,相反,rCTGF却能明显上调骨基质蛋白如1型胶原、骨桥素和OC mRNA的表达以及ALP mRNA的表达并增强ALP活性,rCTGF或BMP-2干预MC3T3-E1细胞可产生矿化的骨结节。上述研究提示,rCTGF主要促进成骨细胞的分化而不是增殖。因此,有关CTGF对成骨细胞增殖/分化方面的作用尚存在争议,有待进一步研究。我们采用半定量RT-PCR和Northern blot方法,均观察到E₂可明显下调CTGF mRNA的表达,且呈明显时间和剂量依赖性,于6~24 h达最大抑制效应。Fukui等^[15]研究发现IL-1和TNF- α 可促进软骨细胞BMP-2合成,推测雌激素可能通过IL-1和TNF- α 影响BMP-2的合成,进而下调CTGF的表达。分子水平的研究发现CTGF基因结构中存在2个cis作用调节元件,一个位于启动子区的软骨细胞特异转录增强域,一个位于3'非翻译区结构锚抑制cis作用元件^[16],并未发现CTGF基因结构中存在雌激素反应序列或类似结构。应用雌激素受体拮抗剂阻断ER后,并未解除17 β -E₂对CTGF mRNA表达的下调作用,表明雌激素下调CTGF表达并非通过核受体途径。对软骨细胞研究发现,在软骨细胞成熟期,视黄醇信号通路和p42/p44丝裂原激活的蛋白激酶可促进CTGF的表达,而p38MAPK则抑制其表达^[16],在成骨细胞雌激素是否通过上述信号转导途径,尚需进一步研究。

PAIP-1是一种翻译调节因子,与人eIF4G的中心区域具有序列同源性,在PABP介导的翻译过程中发挥调控作用。PABP是一种真核细胞中普遍存在的含量丰富的胞浆蛋白,与mRNA相结合的PABP和5'加帽结构相结合的真核细胞起始因子(eIF4F)复合物中的eIF4G相互作用,促进mRNA再循环以加快核糖体的利用进而促进翻译。体内外研究均证实,PAIP-1可通过促进PABP介导翻译过程,从而在

(下转第37页)

- fat and lean body composition compartments on femoral bone mineral density in premenopausal women. *Am J Epidemiol*, 1992, 163:257-265.
- [10] Madsen KL, Adams WC, van Loan MD. Effects of physical activity, body weight and composition, and muscular strength on bone density in young women. *Med Sci Sports Exerc*, 1998, 30:114-120.
- [11] Gutin B, Peterson M, Galsworthy T, et al. A screening and counseling program for prevention of osteoporosis. *Osteoporosis Int* Sep, 2: 252-256.
- [12] Kaastad TS, Huiskes R, Nordal L, et al. Effects of hormonal conditions and drugs on both muscle and bone strength can be assessed in a rat test. *Bone*, 2000, 26:355-360.
- [13] Kaastad TS, Reikeras O, Narum S, et al. Training increases *in vivo* fracture strength in osteoporotic bone. Protection by muscle contraction examined in rat tibiae. *Acta Orthop Scand*, 1996, 67:371-376.
- [14] Felson DT, Zhang YQ, Hannan MT, et al. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone Miner Res*, 1993, 8:567-573.
- [15] Stone K, Bauer DC. Hormonal predictors of bone loss in elderly women: a prospective study. the study of osteoporotic fractures research group. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:1167-1174.
- [16] Wu F, Ames R, Clearwater J, et al. Prospective 10-year study of the determinants of bone density and bone loss in normal postmenopausal women, including the effect of hormone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002, 56:703-711.
- [17] Reid IR, Ames RW, Evans MC, et al. Determinants of the rate of bone loss in normal postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79:950-954.