

2型糖尿病大鼠骨折愈合障碍与体内晚期糖基化终末产物的变化

刘振东¹, 刘亚江¹, 高敏伟¹, 黄祖发², 廖小军¹, 石磊¹(中南大学湘雅三医院, ¹骨科, ²普外科, 湖南省长沙市 410013)

文章亮点:

近年来大量的研究表明, 持续高血糖引起体内多种蛋白质非酶糖基化及由此形成的晚期糖基化终末产物在糖尿病慢性并发症的发病机制中起重要作用。实验的特点在于建立了2型糖尿病大鼠骨折模型, 证实了骨组织中晚期糖基化终末产物水平增高可能是导致2型糖尿病骨折愈合障碍的原因。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 2型糖尿病; 骨折愈合; 牵引成骨术; 骨钙素; 晚期糖基化终末产物; 湖南省自然科学基金

主题词:

糖尿病; 模型; 动物; 骨折愈合; 胫骨骨折; 骨钙素; 糖基化终产物; 高级

基金资助:

湖南省自然科学基金项目(05FJ3066), 项目名称: 2型糖尿病对骨再生与修复的影响

摘要

背景:近年来, 晚期糖基化终末产物在骨组织领域的作用日益受到重视, 而糖代谢紊乱是引起晚期糖基化终末产物增加的主要原因之一。

目的:观察2型糖尿病大鼠体内晚期糖基化终末产物表达的变化, 并探讨其与糖尿病骨折愈合障碍的关系。

方法:30只SD大鼠随机均分为2组, 实验组制备2型糖尿病模型, 对照组正常饲养。糖尿病模型制备成功后, 所有大鼠建立左胫骨骨折牵引成骨模型, 胫骨延长0.3 mm/d, 持续14 d。

结果与结论:牵引结束后, X射线摄片显示实验组糖尿病模型大鼠骨折断端之间牵引骨痂形成较对照组明显减少; 骨痂组织学检查表现为微骨柱排列紊乱, 初始基质前沿浅染。ELISA法检测实验组血清和双侧骨痂组织中晚期糖基化终末产物水平较对照组明显升高($P < 0.01$), 骨钙素明显降低($P < 0.01$)。提示2型糖尿病大鼠骨折牵引骨痂生成障碍, 而骨组织中晚期糖基化终末产物水平增高可能是导致2型糖尿病骨折愈合障碍的原因。

刘振东, 刘亚江, 高敏伟, 黄祖发, 廖小军, 石磊. 2型糖尿病大鼠骨折愈合障碍与体内晚期糖基化终末产物的变化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(20):3122-3126.

Impaired fracture healing and change of advanced glycation end products *in vivo* in type 2 diabetes rats

Liu Zhen-dong¹, Liu Ya-jiang¹, Gao Min-wei¹, Huang Zu-fa², Liao Xiao-jun¹, Shi Lei¹ (¹Department of Orthopedics, ²Department of General Surgery, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Increasing attention has been paid on the role of advanced glycation end products in bone tissue. Glucose metabolic disorder is one of the main reasons for the increase of advanced glycation end products.

OBJECTIVE: To observe the change of advanced glycation end products expressed in type 2 diabetes rats, and to investigate the relationship between impaired fracture healing and change of advanced glycation end products expression *in vivo*.

METHODS: Thirty Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into two groups: control group (normal feeding) and experimental group (high fat and sucrosium diet feeding to establish type 2 diabetes model). After diabetes models were established, the model of distraction osteogenesis in the left tibiae of all the rats was produced. Distraction was given 0.3 mm per day and continued for 14 days.

RESULTS AND CONCLUSION: After the traction was complete, callus formation in distraction gap was obviously reduced in experimental group compared with control group by X-ray examination. The array of microcolumn formation was disordered and the area of primary matrix front was catachromasis by histology examination. The enzyme-linked immunosorbent assay results showed that, the level of advanced glycation end products was obviously elevated ($P < 0.01$) while osteocalcin was obviously reduced ($P < 0.01$) in experimental group in comparison with control group. The formation of distraction callus was impaired in the process of fracture healing and blood of type 2 diabetes rats. The increase of advanced glycation end products may be one of the reasons that cause impaired fracture healing in diabetic rats.

刘振东, 男, 1959年生, 湖南省长沙市人, 博士, 中南大学湘雅医学院毕业, 副教授, 主要从事骨科创伤研究。

通讯作者: 黄祖发, 中南大学湘雅三医院普外科, 湖南省长沙市 410013

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.20.002
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)20-03122-05

稿件接受: 2014-02-19

Liu Zhen-dong, M.D., Associate professor, Department of Orthopedics, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China

Corresponding author: Huang Zu-fa, Department of General Surgery, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China

Accepted: 2014-02-19

Subject headings: diabetes mellitus; model, animals; fracture healing; tibial fracture; osteocalcin; advanced glycation end products

Funding: the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 05FJ3066

Liu ZD, Liu YJ, Gao MW, Huang ZF, Liao XJ, Shi L. Impaired fracture healing and change of advanced glycation end products in vivo in type 2 diabetes rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(20):3122-3126.

0 引言 Introduction

糖尿病可导致全身多系统病变,对骨组织的常见影响包括骨质疏松、骨量减少,这些常导致骨折风险率增加和骨折延迟愈合等^[1-4]。人们早已认识到糖尿病患者骨折延迟愈合的情况,实验中也观察到糖尿病大鼠骨折愈合过程中,愈合早期生成的骨痂内细胞增殖降低,胶原合成及含量减少,晚期生物力学特性降低^[5],具体机制尚不清楚。在骨折愈合过程中,成骨细胞和破骨细胞的数量及活性具有重要作用。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化。晚期糖基化终末产物(advanced-glycation end products, AGEs)是糖的醛基或酮基与蛋白质等自由氨基之间发生的一系列非酶糖化反应,最终生成的一类物质。血清和组织中晚期糖基化终末产物水平与糖尿病慢性并发症的程度明显相关。对于骨骼系统而言,晚期糖基化终末产物通过对成骨细胞和破骨细胞的影响包括:①在成骨细胞的不同发育阶段可以调节成骨细胞的增殖和分化,晚期糖基化终末产物在胶原蛋白上的形成改变了胶原蛋白的某些生理功能,从而间接影响成骨细胞的功能^[6]。②通过与其多种细胞表面受体结合,刺激该细胞合成和释放多种细胞因子如白细胞介素1、白细胞介素6等促使破骨细胞的前体细胞转化为破骨细胞并诱导其分化为成熟的破骨细胞引起骨吸收,或者这些细胞因子直接作用于破骨细胞引起骨吸收^[7]。骨钙素的化学本质为蛋白质,它来源于骨组织,由成骨细胞合成并分泌到骨中,是骨组织中非胶原性蛋白的主要成分。其作用是调节和维持骨钙。

实验通过建立2型糖尿病大鼠模型,测定血清骨钙素水平,观察2型糖尿病骨折愈合情况并探讨晚期糖基化终末产物的变化与糖尿病骨折愈合障碍的关系。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2008年11月至2009年5月在中南大学湘雅医学院完成。

材料:

实验动物: 30只6周龄健康雄性SD大鼠,体质量180-200 g,由中南大学湘雅三医院动物实验室提供,每笼5只,每日清扫2次以保持室内干净。实验室保持安静通风,室温20-25℃,湿度50%-60%,12 h的光照周期。所用饲料为中南大学湘雅三医院动物实验室提供,饮用水为自来水。实验中对动物的处置符合科技部《关于善待实验动物的指导性意见》中的要求^[8]。

实验用主要试剂及仪器: 链脲佐菌素(美国Sigma公司),晚期糖基化终末产物检测试剂盒、骨钙素检测试剂盒(美国ADL公司),7170全自动生化分析仪(日本日立公司),大鼠肢体延长外固定架(长沙天恒仪器制造厂),富士DHF-155H II型X射线机(日本富士公司),MagNA Lyser全自动组织匀浆仪(罗氏诊断产品(上海)有限公司),2×Taq PCR MasterMix(TIANGEN BIOTECH有限公司)。

方法:

干预分组: 30只SD大鼠随机均分对照组和实验组,对照组给予普通饲料、实验组给予高糖高脂饲料喂养。喂养8周后,实验组一次性腹腔注射链脲佐菌素30 mg/kg,对照组腹腔注射等量枸橼酸盐缓冲液;给药2周后,将空腹血糖大于16.7 mmol/L者纳入实验组继续实验。

胫骨牵引成骨模型的制作及标本的获取: 在6%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉下,所有大鼠接受左胫骨结节水平低能横行截骨、安置延长外固定架。方法为左胫骨远近端交叉穿克氏钢针,安置肢体延长外固定架。于胫骨结节水平截骨处,用直径0.8 mm克氏针垂直胫骨干钻孔数个,然后无菌剪刀剪断胫骨干。第2天起开始2次/d共0.3 mm延长胫骨(0.15 mm/次),延长持续14 d,第15天停止延长并用断头法处死动物,收集血标本,置入乙醇中消毒5 min后取出,以无菌棉垫拭干,置于手术台上,收集延长的左胫骨,无菌收集双侧股骨。

指标检测:

血清学检查: 动物处死时获取血液标本,离心后取上清血清,检测血糖、总胆固醇、三酰甘油、胰岛素。

X射线检查: 将收集到的两组大鼠左胫骨由富士FCR-500R型X射线机摄片,观察牵引间隙内骨痂生成的情况。

组织学检查: 左胫骨于体积分数为10%甲醛内固定7 d,Gooding-Seward液内脱钙1周,石蜡包埋切片,苏木精-伊红染色,光镜下观察牵引骨痂内微骨柱及初始基质前沿形成情况。

ELISA法检测血清、骨组织中骨钙素及晚期糖基化终末产物的水平: ①分离、获取骨组织,匀浆机处理骨组织:超净工作台内自膝关节处离断双侧股骨,剔除多余组织,冰冷的生理盐水中漂洗去血污,将骨痂组织剪碎后用4℃生理盐水反复冲洗,迅速置液氮中保存,将液氮中保存的骨痂组织取出置室温下5 min,再放入液氮中,复取出置室温下5 min,如此反复5-8次,后取出骨痂组织放入变性液(异硫氰酸胍4 mmol/L,乙醇0.125 mmol/L,巯基乙醇0.125 mmol/L,0.5%十二烷基磺酸钠,柠檬酸钠

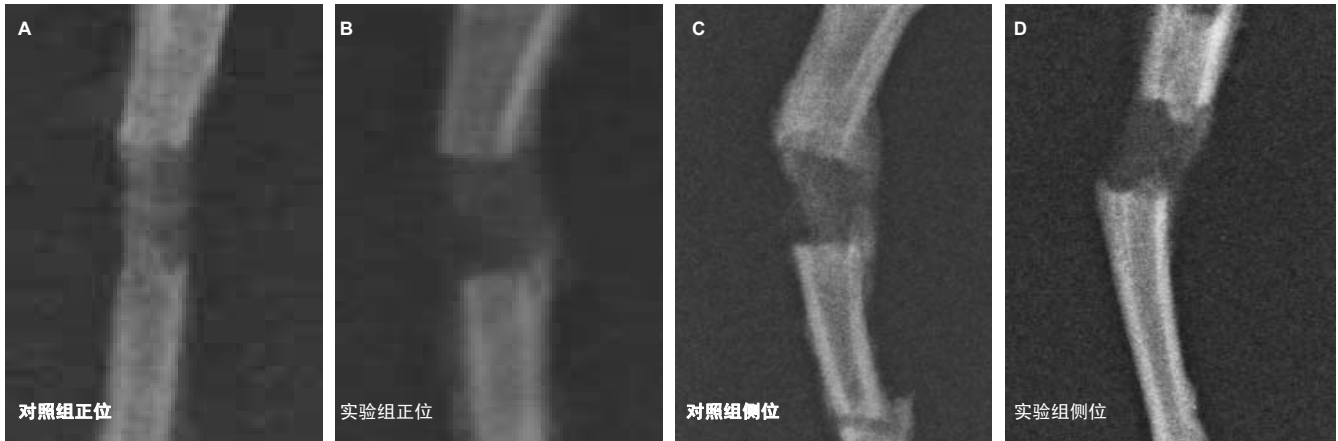


图 1 两组大鼠左胫骨牵引 2 周后骨折间隙牵引骨痂生成情况

Figure 1 Callus formation in distraction gap at 2 weeks after the left tibial bone traction

图注: 实验组糖尿病模型大鼠左胫骨骨折牵引 2 周后间隙内骨痂生成明显少于对照组正常大鼠。

表 1 实验结束时两组大鼠血清空腹血糖、总胆固醇、三酰甘油及空腹胰岛素的水平

Table 1 Comparison of fasting blood glucose, total cholesterol, triacylglycerol and fasting insulin of rats in two groups ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

项目	对照组	实验组	<i>P</i>
血糖(mmol/L)	5.35±1.17	21.18±2.21	< 0.01
总胆固醇(mmol/L)	1.97±0.28	3.22±0.37	< 0.01
三酰甘油(mmol/L)	1.26±0.23	2.39±0.49	< 0.01
空腹胰岛素(mIU/L)	4.75±0.39	4.61±0.52	> 0.05

表注: 实验组糖尿病模型大鼠血清空腹血糖、总胆固醇、三酰甘油水平高于对照组正常大鼠, 保证了实验组大鼠左胫骨的愈合过程处于 2 型糖尿病影响下。

26 mmol/L, pH 4.0), 放入离心管中, 用超声粉碎机进行粉碎^[9]。以 1:9 加入匀浆介质(pH 7.4, 0.01 mol/L Tris-HCl, 0.000 1 mol/L EDTA-2Na, 0.01 mol/L 蔗糖 0.8% 的氯化钠溶液), 用组织捣碎机 10 000-15 000 r/min 上下研磨制成 10% 组织匀浆(匀浆时间 10 s/次, 间隙 30 s, 连续 8-10 次, 在冰水中进行)。将制备好的 10% 匀浆用普通离心机或低温低速离心机 3 000 r/min 离心 15 min, 取适量上清液进行各种测定^[10-11]。②ELISA 试剂盒分别测定骨钙素及晚期糖基化终末产物。

主要观察指标: ①X 射线检查: 观察两组大鼠牵引间隙内骨痂生成的情况。②组织学检查: 观察牵引骨痂内微骨柱及初始基质前沿形成情况及骨折两端髓腔内脂肪细胞分布。③ELISA 检测实验结束时两组大鼠血清及骨痂组织中晚期糖基化终末产物及骨钙素水平, 及骨折愈合情况。

统计学分析: 由作者采用 SPSS 12.0 软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入 SD 大鼠 30 只, 均进入结果分析, 无脱落。

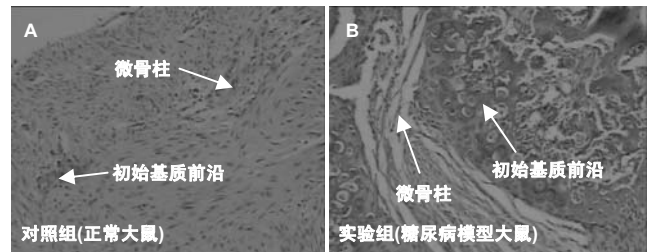


图 2 两组大鼠左胫骨骨折牵引 2 周后牵引间隙内骨痂微骨柱和初始基质前沿的情况(苏木精-伊红染色, ×40)

Figure 2 Callus microcolumn and primary matrix front in distraction gap at 2 weeks after the left tibial bone traction (hematoxylin-eosin staining, ×40)

图注: 与对照组比, 实验组微骨柱排列紊乱, 初始基质前沿浅染, 证实牵引间隙内骨痂形成障碍。

2.2 实验结束时两组大鼠血清空腹血糖、总胆固醇、三酰甘油、空腹胰岛素的水平 实验结束时, 实验组血清空腹血糖、总胆固醇和三酰甘油水平高于对照组($P < 0.01$); 空腹胰岛素与对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$) (表 1)。实验组左胫骨牵引成骨期间各个指标无明显变化, 确保实验组大鼠左胫骨的愈合过程处于 2 型糖尿病影响下。

2.3 两组大鼠左胫骨骨折牵引 2 周后间隙内骨痂生成情况 X 射线显示实验组牵引间隙内骨痂生成较对照组明显减少 (图 1)。

2.4 组织学检查 实验组牵引骨痂较对照组的微骨柱排列紊乱, 初始基质前沿浅染 (图 2)。两种检查都显示实验组较对照组牵引间隙内骨痂形成障碍。

2.5 牵引 2 周后血清及骨组织中骨钙素的表达 ELISA 试剂盒测定血清及骨组织中骨钙素, 根据样品的吸光度值在吸光度-浓度曲线上查找对应的浓度 (图 3), 结果显示, 实验组血清及骨组织中骨钙素水平较对照组明显降低, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$, 表 2)。

2.6 两组大鼠牵引 2 周后血清及骨组织中晚期糖基化终末产物水平的测定 根据样品的 A 值在曲线上查找对应的浓度 (图 4), 结果显示, 实验组血清及骨组织中骨晚期糖基

表 2 两组大鼠血清及骨组织中骨钙素的表达

Table 2 Osteocalcin expression in the serum and blood of rats ($\bar{x}\pm s, n=15, \text{mg/mol}$)

组别	血清	骨组织
对照组	9.21±2.33	9.64±1.78
实验组	1.15±0.52	1.58±0.47
P	< 0.01	< 0.01

表注: 实验组糖尿病模型大鼠血清及骨组织中骨钙素水平较对照组正常大鼠明显降低。

表 3 两组大鼠血清及骨组织中晚期糖基化终末产物的表达水平

Table 3 Expression of advanced glycation end products in the serum and blood of rats ($\bar{x}\pm s, n=15, \text{mg/mol}$)

组别	血清	骨组织
对照组	38.95±7.67	53.26±16.54
实验组	152.62±15.64	159.74±17.79
P	< 0.01	< 0.01

表注: 实验组糖尿病模型大鼠血清及骨组织中晚期糖基化终末产物水平较对照组正常大鼠明显增加。

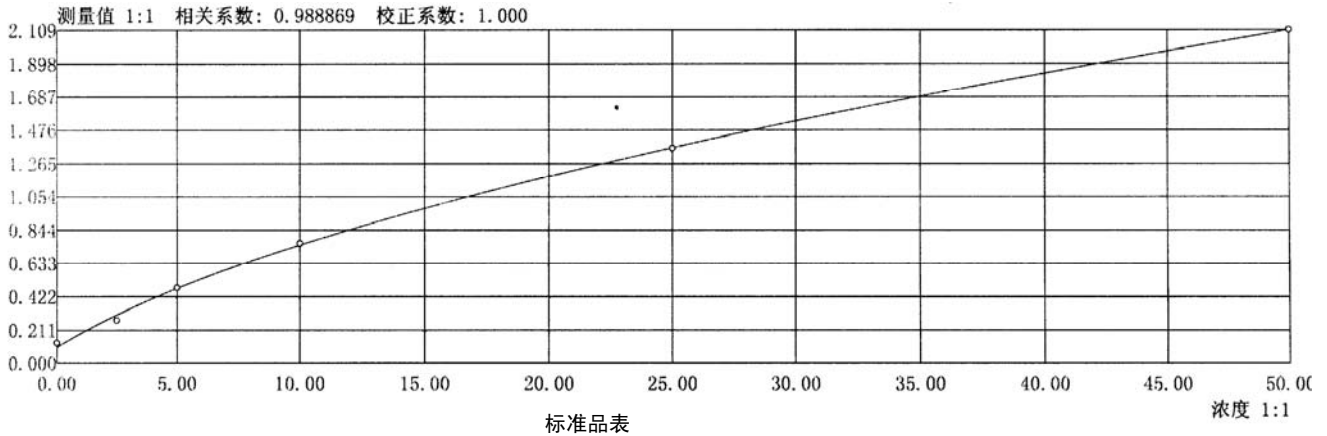


图 3 骨钙素吸光度-浓度曲线图
Figure 3 Curve of osteocalcin absorbance-concentration

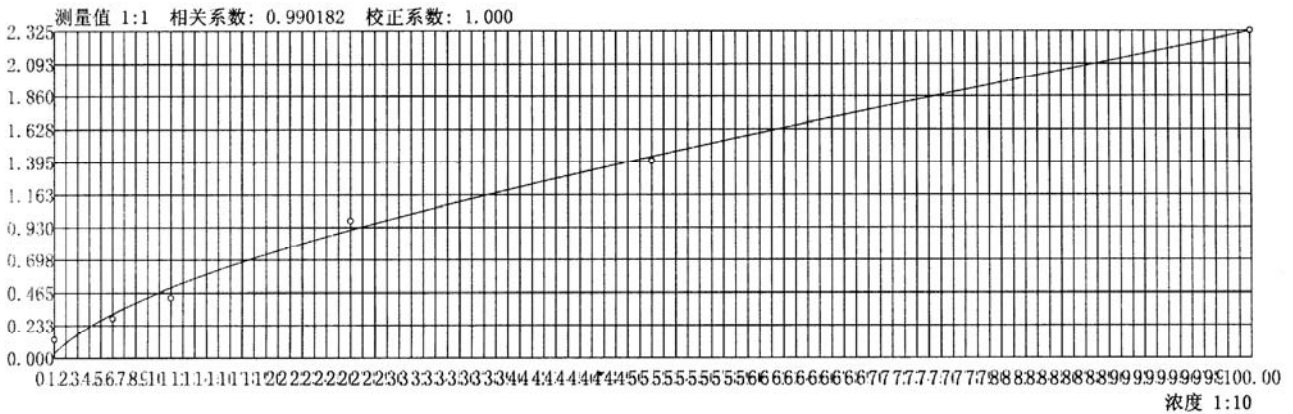


图 4 晚期糖基化终末产物吸光度-浓度曲线图
Figure 4 Curve of advanced glycation end product absorbance-concentration

化终末产物水平较对照组明显增加, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$, 表3)。

3 讨论 Discussion

大鼠糖尿病模型与人类2型糖尿病代谢紊乱特点相似, 且血清及骨组织中晚期糖基化终末产物的水平发生变化。近年大量研究表明, 持续高血糖引起体内多种蛋白质非酶糖基化及由此形成的晚期糖基化终末产物在糖尿病慢性并发症的发病机制中起重要作用。李健等^[12]观察到糖尿病组大鼠血清晚期糖基化终末产物水平显著高于正常对照组,

而作者这次研究发现实验组大鼠血清和骨组织中晚期糖基化终末产物水平均升高。

2型糖尿病大鼠骨折牵引骨痂生成障碍, 成骨指标下降: 牵引成骨术是产生大量骨的一种可行方法, 可以研究各种病理情况或不同遗传背景条件下(如增龄、糖尿病)骨形成过程。Liu等^[13]通过免疫组织化学发现ZDF大鼠(2型糖尿病大鼠)牵引骨痂FIZ和PMF区内增殖细胞核抗原表达阳性细胞数较正常大鼠明显减少。实验观察到实验组大鼠胫骨牵引骨折14 d后, X射线检查显示牵引间隙内骨痂生成较对照组明显减少, 组织学检查牵引骨痂内微骨柱与对照组相比较排列紊乱, 基

质钙化不良; 初始基质前沿浅染, 表示处于增殖、分化期的成骨细胞减少, 骨痂形成能力减弱。实验还测定了牵引14 d后实验组血清中的骨钙素, 骨钙素大部分存在于骨基质中, 是骨基质中主要的非胶原蛋白, 完全来自成骨细胞, 其血清水平能反映骨形成、骨转化情况, 作为成骨的主要指标, 实验发现实验组血清骨钙素比对照组显著下降。

晚期糖基化终末产物的增加可能是2型糖尿病骨折愈合障碍的原因: 近年来, 晚期糖基化终末产物在骨组织领域的作用日益受到重视。糖代谢紊乱及年龄的增加是引起晚期糖基化终末产物增加的2个主要原因^[14]。很多研究证实, 骨质疏松患者体内晚期糖基化终末产物水平增加明显。Hein等^[15]利用骨组织活检标本进行的研究证实了这一点, 他们将8例骨质疏松患者的髂骨嵴样本进行组织形态学测定, 同时将晚期糖基化终末产物咪唑酮和羧甲基赖氨酸进行免疫组织化学染色, 结果在所有的骨样本中均发现有晚期糖基化终末产物的大量存在。说明晚期糖基化终末产物对于骨组织具有一定的作用。本实验发现, 实验组大鼠血清及骨组织中晚期糖基化终末产物的水平比对照组显著升高。晚期糖基化终末产物对于骨组织的影响可分为对成骨细胞及破骨细胞两方面。

有作者在晚期糖基化终末产物修饰 I 型胶原的成骨细胞培养液中, 发现骨钙素和 I 型胶原的合成显著减少, 指出糖基化修饰后的骨胶原能够调节发育阶段成骨细胞的增殖分化^[16]。研究证明, 晚期糖基化终末产物的升高可导致骨吸收相对增加, 骨形成作用降低, 从而导致骨量丢失。总之, 晚期糖基化终末产物对骨组织的影响可归纳为: 抑制成骨细胞增殖, 延迟其分化, 使成骨细胞数量减少, 活性降低; 激活破骨细胞引起骨吸收; 通过合成和释放细胞因子成熟破骨细胞, 增加骨吸收。推测可能是实验中糖尿病大鼠骨折愈合障碍的原因。

综上所述, 2型糖尿病骨折愈合障碍可能是其代谢紊乱导致血清及骨痂组织中晚期糖基化终末产物的水平增加, 致骨痂生成障碍, 成骨指标下降所致, 这为临床人工预防和治疗2型糖尿病骨折愈合障碍提供了新的思路。

作者贡献: 实验设计、评估为第一作者, 实施为第二、三作者, 所有作者共同起草, 由第一作者审校并对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 动物的饲养及处理, 符合科技部《关于善待实验动物的指导性意见》中的要求。

学术术语: 骨钙素-成骨细胞合成并分泌的, 比较稳定, 不受骨吸收因素的影响。骨钙素大部分存在于骨基质中, 是骨基质中主要的非胶原蛋白。骨钙素值随年龄的变化以及骨更新率的变

化而不同, 其血清水平能反映骨形成、骨转化情况。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Hui SL, Epstein S, Johnston CC Jr. A prospective study of bone mass in patients with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60(1):74-80.
- [2] Piepkorn B, Kann P, Forst T, et al. Bone mineral density and bone metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metab Res.* 1997; 29(11):584-591.
- [3] Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, et al. Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):32-38.
- [4] Bouillon R, Bex M, Van Herck E, et al. Influence of age, sex and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(4): 1194-1202.
- [5] Beam HA, Parsons JR, Lin SS. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. *J Orthop Res.* 2002;20(6):1210-1216.
- [6] 孔德娟, 李恩, 陈永春, 等. 晚期糖基化终末产物对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 1999, 5(3):29-32.
- [7] 孔德娟. 高级糖化终末产物与骨质疏松[J]. *国外医学:老年医学分册*, 1999, 20(2):57-60.
- [8] The Ministry of Science and Technology of the Peoples Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.
- [9] 李丁, 苏海川, 赵锦荣, 等. 骨组织总RNA的提取[J]. *第四军医大学学报*, 1999, 20(12):1056.
- [10] 茂欣, 权金星, 朱任之, 等. 一种从骨组织提取RNA的新方法的研究[J]. *兰州大学学报自然科学版*, 2000, 36(5):22.
- [11] 孙磊, 王利群, 韩一生, 等. 老年与青年人股骨头松质骨的比较[J]. *中国矫形外科杂志*, 1999, 6(12):919-921.
- [12] 李健, 郭洪敏, 聂志奎, 等. 2型糖尿病大鼠血清AGEs与骨代谢相关性分析[J]. *济宁医学院学报*, 2008, 31(1):15-18.
- [13] Liu Z, Aronson J, Wahl EC, et al. A novel rat model for the study of deficits in bone formation in type-2 diabetes. *Acta Orthopaedica*, 2007; 78(1):46-55.
- [14] Spencer CP, Godsland IF, Cooper AJ, et al. Effects of oral and transdermal 17beta-estradiol with cyclical oral norethindrone acetate on insulin sensitivity, secretion, and elimination in postmenopausal women. *Metabolism.* 2000;49(6):742-747.
- [15] Hein G, Weiss C, Lehmann G. Advanced glycation end product modification of bone proteins and bone remodelling: hypothesis and preliminary immunohistochemical findings. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(1):101-104.
- [16] Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, et al. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res.* 2007;22(9): 1317-1328.