

递增负荷跑台运动抑制骨质疏松小鼠miR-214表达进而促进骨生成的作用研究

郭健民¹ 周绪昌¹ 陈熙^{1,2} 张苗¹ 李慧¹ 邹军^{1*}

(¹上海体育学院运动科学学院运动人体科学系, 上海 200438; ²温州医科大学体育科学学院, 温州 325035)

摘要 适宜的运动可促进骨生成, 抑制骨吸收, 提高机体的骨密度和骨强度, 进而起到防治骨质疏松的作用, 但到目前为止运动防治骨质疏松的作用机制尚未完全明确。miR-214已被证明参与调控骨代谢, 然而其是否参与运动防治骨质疏松的过程, 尚缺乏相关的探究。该研究采用去卵巢手术建立骨质疏松小鼠模型, 24只12周龄雌性C57BL/6小鼠, 随机分为四组: 去卵巢组(OVX, $n=6$)、去卵巢+运动组(OVX+EX, $n=6$)、假手术组(SHAM, $n=6$)和假手术+运动组(SHAM+EX, $n=6$), 术后4周进行为期9周的跑台运动干预, 最后一次干预结束48 h后取材。进行骨密度(bone mineral density, BMD)、microCT、骨生物力学以及成熟miR-214、 β 连环蛋白(β -catenin)、激活转录因子4(activated transcription factor 4, ATF4)、runt相关转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx2)表达的检测。该研究证实, 去除卵巢后小鼠的BMD和骨强度均下降, miR-214的表达显著增加, Runx2的表达显著降低。同时其下游靶基因 β -catenin和ATF4的蛋白表达也均显著减少。而跑台运动则可以部分逆转上述现象, 显著增加去卵巢(ovariectomized, OVX)小鼠和SHAM小鼠的BMD和骨强度, 抑制miR-214的表达。该研究提示跑台运动可显著抑制miR-214的表达, 同时使miR-214下游靶基因ATF4和 β -catenin的蛋白表达增加, 进而提高骨质疏松小鼠的BMD和骨强度, 部分逆转雌激素丢失导致的骨质流失。

关键词 骨质疏松; 骨密度; miR-214; β 连环蛋白; 激活转录因子4

Incremental Load Treadmill Exercise Promotes Bone Formation by Inhibiting miR-214 Expression in Osteoporosis Mice

GUO Jianmin¹, ZHOU Xuchang¹, CHEN Xi^{1,2}, ZHANG Miao¹, LI Hui¹, ZOU Jun^{1*}

(¹Department of Kinesiology, School of Sport science, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China;

²School of Sports Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract Accumulating evidence showed that appropriate exercise can promote bone formation and inhibit bone resorption to increase bone density and bone strength, thus playing a role in the prevention and treatment of osteoporosis. However, the specific mechanism has not been fully understood. miR-214 has been shown to be involved in the regulation of bone metabolism. However, whether miR-214 mediates the process of preventing and treating osteoporosis has not been revealed. In this study, the osteoporosis mouse model was established by ovariectomy. Twelve-week-old female C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: ovariectomized group

收稿日期: 2019-07-15 接受日期: 2019-09-29

国家自然科学基金(批准号: 81572242)和上海市人类运动能力开发与保障重点实验室(上海体育学院)(批准号: 11DZ2261100)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-51253287, E-mail: zoujun777@126.com

Received: July 15, 2019 Accepted: September 29, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81572242) and Shanghai Key Laboratory of Human Sport Competence Development and Maintenance (Shanghai University of Sport) (Grant No.11DZ2261100)

*Corresponding author. Tel: +86-21-51253287, E-mail: zoujun777@126.com

网络出版时间: 2019-12-11 11:13:18

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1113.026.html>

(OVX, $n=6$), ovariectomized+exercise group (OVX+EX, $n=6$), sham operation group (SHAM, $n=6$) and sham operation+exercise group (SHAM+EX, $n=6$). The two exercise groups were performed 9 weeks of treadmill running exercise after four weeks of operation. All the mice were sacrificed 48 h after the end of the last intervention. The results showed that both bone density and bone strength decreased after ovariectomy in mice. The expression of miR-214 was significantly increased, while the expression of Runx2, β -catenin, and ATF4 were significantly decreased in OVX mice when compared to the SHAM mice. And treadmill exercise can increase the bone mineral density (BMD) and bone strength of the OVX and SHAM mice. We also found that treadmill exercise can significantly inhibit the expression of miR-214 in OVX mice, and the protein expression of its downstream target genes ATF4 and β -catenin were significantly increased. In conclusion, exercise may increase bone formation in osteoporotic mice and partially reverse the estrogen defect induced bone loss by inhibiting the expression of miR-214.

Keywords osteoporosis; bone mineral density; miR-214; β -catenin; ATF4

骨质疏松是一种以骨量丢失和骨组织微结构破坏为特征的骨代谢疾病。骨质疏松患者机体的骨质量和强度通常受到影响, 骨折风险大大增加^[1]。骨折会影响骨骼肌肉系统, 引起慢性疼痛, 降低患者的生活质量^[2]。骨质疏松已经成为老年人群中最常见的疾病之一, 尤其是绝经后的女性。根据国际骨质疏松症基金委的估计, 世界上已有大约2亿骨质疏松患者^[3]。因此骨质疏松的预防和治疗已成为全球亟待解决的公共健康问题。适宜的运动可以增加骨形成减少骨吸收, 改善老年人群的骨强度^[4]。尽管有大量的研究表明, 运动可以通过机械应力、细胞因子、骨代谢信号通路等影响骨代谢, 但目前运动防治骨质疏松的作用机制尚未完全明确^[5]。已往研究表明, miR-214可通过调控骨代谢的关键因子抑制骨形成, 同时其在骨质疏松患者和骨质疏松动物模型中均出现高表达的现象^[6-7], 由此我们推测, miR-214可能参与运动预防和治疗骨质疏松。因此本研究通过去卵巢手术建立骨质疏松小鼠模型, 并对其进行递增负荷跑台运动干预, 观察运动对骨质疏松小鼠骨骼和miR-214表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

mRNA逆转录试剂盒(Code No.RR037A, TaKaRa)、microRNA逆转录试剂盒(Code No.638315, Clontech)、microRNA定量试剂盒(Code No.RR820A, TaKaRa)、RNAiso Plus(Code No.9108, TaKaRa)等购自宝生物工程有限公司; BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; SYBR green购自Roche公司; ATF4抗体购自Abcam公司; β -actin抗体购

自上海威奥生物科技有限公司; β -catenin抗体购自上海泊湾生物科技有限公司; 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 小鼠饲养与跑台干预

24只雌性SPF级C57BL/6小鼠购自常州卡文斯实验动物有限公司, 饲养于上海体育学院SPF级动物屏障内, 所有涉及的小鼠实验均得到上海体育学院科学研究伦理委员会的批准。白天和黑夜12 h交替, 温度(22±2) °C, 湿度40%~70%, 每周换一次垫料, 每3天加一次水和饲料, 每周周一称重。

小鼠饲养至12周时, 称重并根据体重随机分为去卵巢组(OVX)、去卵巢加运动组(OVX+EX)、假手术组(SHAM)和假手术加运动组(SHAM+EX), 每组6只, 小鼠按照20 μ L/g体重腹腔注射阿弗丁麻醉, 剃掉下背部长毛, 使用75%的乙醇进行消毒, 之后于身长下三分之一, 脊柱旁开1 cm处开口剪掉卵巢, SHAM小鼠在相同的部位剪口, 剪除与卵巢同等大小的脂肪, 之后用缝合针缝合伤口, 并用碘伏消毒。

通过查阅文献并结合我们前期的研究^[8], 在手术后4周对运动组小鼠进行为期9周的跑台运动干预, 每周训练5天, 休息2天。第一周为跑台预适应, 速度为6 m/min、坡度25°、时间为30 min, 第二周起, 跑台组小鼠进行5 min的热身运动(速度为6 m/min、坡度25°)和55 min的正式训练(速度为8 m/min、坡度25°), 正式训练的速度每周增加1 m/min。

1.3 BMD与骨生物力学检测

如我们之前的研究所示^[9], 小鼠左侧股骨于4 °C生理盐水中自然解冻, 显微镜下观察以确定股骨表面的完整性, 并在双能X线下检测骨密度(bone mineral density, BMD)。检测完BMD后, 将股骨置于万

能材料试验机的支架上,使探头下降并与股骨接触,压力值控制1 N以下,之后探头以1 mm/min的速度压断股骨,压断后继续下降2 mm后停止。使用游标卡尺测量股骨断面的最小直径,录入到软件中,计算出骨弯曲强度、最大载荷、弹性模量3个指标。

1.4 microCT检测

每组取3只小鼠右侧股骨,使用SKYSCAN 1172仪器,在9 μm 的分辨率和20~100 KV的条件下进行扫描,扫描之后选取170张片子作为ROI,利用相关软件进行三维重塑和分析,得到BV/TV、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp四项数据。

1.5 Western blot检测

将胫骨剪成小块后放入到1.5 mL的EP管中,并加入100 μL 蛋白裂解液(RIPA裂解液和PMSF按100:1比例混匀),用匀浆机将骨头打碎,置于冰上裂解30 min。之后使用4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机以12 000 r/min的转速离心15 min,上清液即为总蛋白。使用BCA试剂盒检测蛋白浓度并进行调平。将样本与SDS-PAGE上样缓冲液(5 \times)按4:1混合,在100 $^{\circ}\text{C}$ 下煮沸10 min。使用10%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白,以250 mA恒流转膜100 min,封闭、敷一抗、敷二抗后使用ECL发光液显影,使用ImageJ软件对条带灰度值进行分析。

1.6 RT-PCR检测

使用Trizol提取胫骨总RNA,测定浓度后分别按照mRNA和microRNA逆转录试剂盒说明书进行逆转录,之后进行荧光定量扩增,以检测成熟miR-214和Runx2的表达(miR-214下游引物为逆转录试剂盒提供,引物序列见表1),采用两步法进行扩增,以U6和 β -actin为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因的相对表达量。

1.7 数据分析

所有结果用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用SPSS 20.0软件进行分析处理。使用双因素方差分析确定主效应和交互效应,之后采用单因素方差分析,用LSD法进行组间两两比较,以 $P<0.05$ 表示结果具有显著差异。

2 结果

2.1 跑台运动对各组小鼠体重的影响

由表2可以看出,各组小鼠的体重均逐渐增加,其中OVX组小鼠体重增加明显。在第6周时OVX组小鼠的体重开始与OVX+EX组和SHAM小鼠出现显著差异,该现象持续到运动干预结束。此外SHAM组小鼠体重在9周跑台训练过程中未与SHAM+EX组小鼠出现显著差异。

表1 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

| 引物 Primer | 序列(5'→3') Sequence (5'→3') |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Forward primer for miR-214 | ACA GCA GGC ACA GAC AGG C |
| Forward primer for U6 | CTC GCT TCG GCA GCA CA |
| Reverse primer for U6 | AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT |
| Forward primer for Runx2 | GGT GAA CCT CTT GCC TCG TC |
| Reverse primer for Runx2 | AGT CCG AAC TTC CTG TGC T |
| Forward primer for β -actin | CAG CCT TCC TTC TTG GGT ATG |
| Reverse primer for β -actin | AGC TCA GTA ACA GTC CGC CT |

表2 各组小鼠的周体重/g

Table 2 The weekly weight of mice /g

| 周 Weeks | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| OVX | 22.65 \pm 1.61 | 22.90 \pm 1.70 | 23.30 \pm 2.19 | 23.72 \pm 2.02 | 24.32 \pm 2.43 | 24.77 \pm 2.97 | 25.95 \pm 2.55 | 26.35 \pm 3.32 | 27.73 \pm 2.98 |
| OVX+EX | 22.03 \pm 1.98 | 21.82 \pm 1.64 | 22.65 \pm 1.39 | 22.67 \pm 2.04 | 23.11 \pm 1.82 | 23.57 \pm 1.75* | 23.58 \pm 1.98* | 23.53 \pm 1.88** | 24.08 \pm 1.85** |
| SHAM | 22.12 \pm 0.63 | 22.22 \pm 0.56 | 22.53 \pm 1.05 | 23.67 \pm 1.64 | 23.73 \pm 1.58 | 23.03 \pm 1.11* | 24.07 \pm 1.48 | 24.80 \pm 2.11* | 24.41 \pm 2.21** |
| SHAM+EX | 21.87 \pm 0.78 | 22.07 \pm 1.01 | 21.87 \pm 1.13 | 23.01 \pm 1.02 | 23.06 \pm 0.76 | 23.29 \pm 1.33 | 23.54 \pm 1.44 | 24.39 \pm 1.09 | 23.95 \pm 1.08 |

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与OVX组相比。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with OVX.

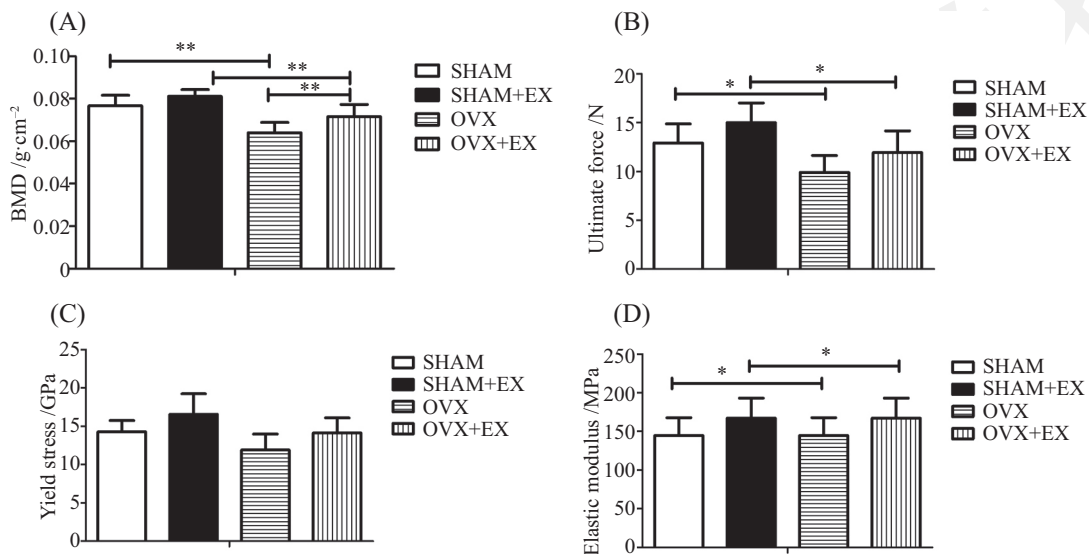
2.2 跑台运动增加骨质疏松小鼠的骨密度和骨生物力学指标

去卵巢后小鼠的BMD较SHAM组显著降低。经过9周的跑台运动后,OVX组小鼠BMD出现显著上调(图1A),表明跑台运动可以提高骨质疏松小鼠的BMD。去卵巢后小鼠的最大载荷、弯曲强度较SHAM组小鼠显著降低,弹性模量也出现下降趋势但无显著差异。此外经过跑台运动干预后OVX和

SHAM小鼠最大载荷、弯曲强度、弹性模量也都出现上升的趋势,但无显著差异(图1B~图1D)。

2.3 microCT指标

由图2结果可知,小鼠在去除卵巢后其骨量、骨小梁数量显著降低,骨小梁分离度显著增加,这提示骨质疏松造模的成功。运动干预后去卵巢小鼠的骨量显著增加,同时去卵巢小鼠骨小梁的数量出现上升趋势,骨小梁分离度出现下降趋势,但无显著差

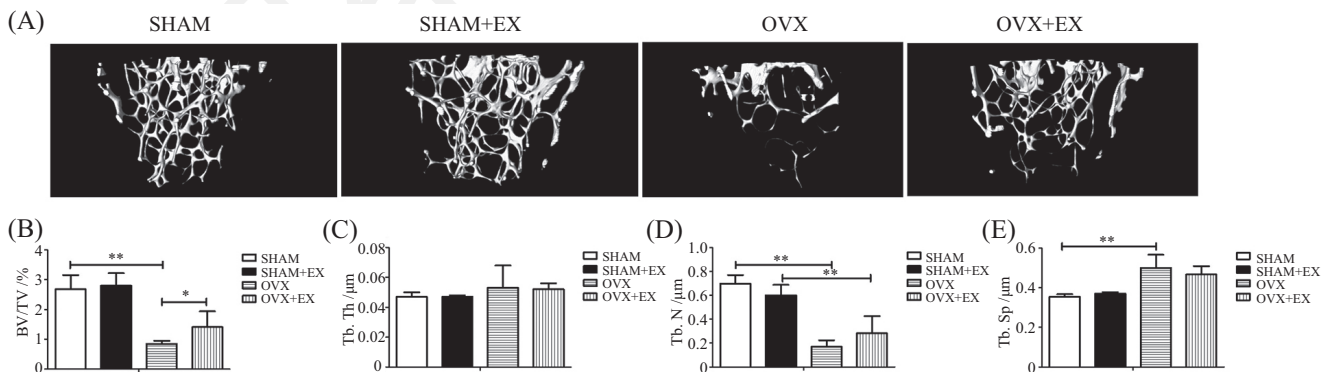


A: 各组小鼠BMD的变化; B: 运动对各组小鼠骨最大强度的影响; C: 运动对各组小鼠骨弯曲强度的影响; D: 运动对各组小鼠骨弹性模量的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: bone mineral density(BMD) of mice in each group; B: effect of exercise on the bone ultimate force; C: effect of exercise on bone yield stress; D: effect of exercise on bone elastic modulus. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图1 小鼠BMD、最大载荷、弹性模量和弯曲强度的变化

Fig.1 The BMD, ultimate force, elastic modulus and yield stress of mice

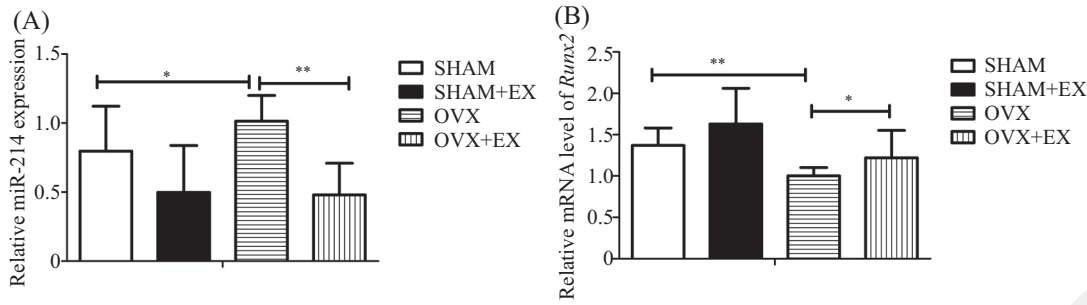


A: 小鼠股骨microCT 3D重构代表图; B: 各组小鼠骨小梁体积百分比; C: 各组小鼠骨小梁厚度; D: 各组小鼠骨小梁数量; E: 运动对各组小鼠骨小梁分离度的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: representative microCT images show three-dimensional trabecular architecture in mouse femur; B: trabecular bone mass of mouse in different groups; C: trabecular thickness of mouse in different groups; D: trabecular number of mouse in different groups; E: effect of exercise on the trabecular separation of mouse in different groups. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图2 microCT检测结果

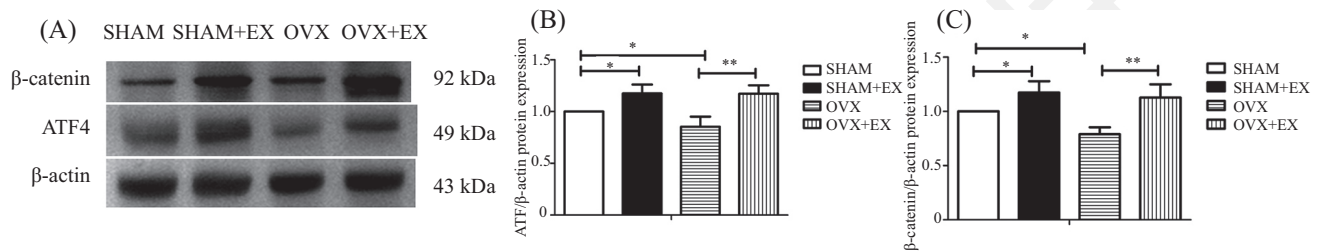
Fig.2 The results of microCT



A: RT-PCR检测运动对小鼠骨miR-214相对表达量的影响; B: 运动对小鼠骨*Runx2* mRNA相对表达量的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
A: RT-PCR analysis for relative expression of the miR-214 in mice bone; B: effect of exercise on the relative expression of *Runx2* in the bone of mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图3 运动对小鼠骨miR-214表达的影响

Fig.3 Effect of exercise on the expression of miR-214 in bone of mice



A: 小鼠胫骨总蛋白β-catenin和ATF4 Western blot代表图; B、C: 跑台运动干预后小鼠骨ATF4和β-catenin蛋白表达水平的变化, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: representative images of Western blot for total β-catenin and ATF4 from tibia; B,C: effect of exercise on the expression of protein ATF4 and β-catenin in bone of mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图4 跑台运动对小鼠骨相关蛋白表达水平的影响

Fig.4 The expression of bone related proteins in mice after exercise

异。

2.4 跑台运动对骨质疏松小鼠miR-214和*Runx2*表达的影响

如图3所示, 去除卵巢后小鼠胫骨miR-214的表达显著增加, *Runx2* mRNA的表达水平显著降低, 经过9周的跑台运动运动后OVX和SHAM组小鼠miR-214的表达显著降低, OVX小鼠*Runx2* mRNA表达水平显著增加。

2.5 跑台运动促进骨质疏松小鼠ATF4和β-catenin蛋白的表达

如图4所示, 去卵巢后小鼠胫骨β-catenin和ATF4蛋白的表达较SHAM组小鼠均显著降低, 为期9周的跑台运动可显著增加OVX和SHAM小鼠β-catenin和ATF4蛋白的表达。

3 讨论

机体骨骼健康的维持得益于骨形成和骨吸收的动态平衡, 当平衡被破坏时将导致骨骼疾病的发生^[10]。绝经后的女性由于雌激素减少, 破骨细胞活性增强,

骨吸收增加, 严重时将导致骨质疏松的发生^[11]。因此在基础研究中, 常通过去卵巢手术建立骨质疏松动物模型, 在去除卵巢后小鼠的BMD、骨量和骨强度均显著下降, 骨小梁分离度显著增加, 这表明本研究中骨质疏松造模成功。在经过为期9周的跑台运动干预后, OVX和SHAM小鼠的BMD显著提高, 且骨强度也出现明显的改善, 这与我们之前的研究一致^[12]。

近期研究表明, microRNAs在骨代谢中具有重要的调控作用^[13], 其中miR-214可以通过靶向作用于成骨细胞相关的基因进而调控成骨细胞功能, 也可通过靶向作用于磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)调控破骨细胞功能。此外, miR-214表达失调与骨质疏松、骨肉瘤、多发性骨髓瘤等骨疾病存在一定的关联^[14]。本研究发现, 在骨质疏松小鼠中miR-214的表达显著增加, 这与Wang等^[15]的研究结果一致。经过跑台运动干预后骨质疏松小鼠miR-214的表达显著降低, 这说明, 运动有可能是通过抑制miR-214的表达发挥防治骨质疏松的作用。此外SHAM组小鼠在跑台运动后

miR-214出现下降趋势,但没有显著差异,可能是由于在机体正常的情况下miR-214的表达相对较少,而此时运动能通过其他的途径如细胞因子、信号通路等对骨代谢产生影响造成的。

已有研究表明, β -catenin和ATF4都是miR-214的靶基因^[16],miR-214可抑制 β -catenin和ATF4的表达,因此我们进一步检测了 β -catenin和ATF4的蛋白质表达,发现 β -catenin和ATF4的蛋白表达量在经过跑台运动之后均出现显著增多。 β -catenin是Wnt信号通路的核心因子,在成骨细胞和骨髓间充质干细胞的分化增殖中均发挥关键的调控作用。Wnt/ β -catenin信号通路的下调会导致小鼠骨量减少^[17]。本研究结果显示,进行跑台运动后骨质疏松小鼠中miR-214表达减少, β -catenin表达增加,而 β -catenin已被证明是miR-214的靶基因,这为进一步明确运动防治骨质疏松的作用机制提供了新的思路,即运动抑制miR-214的表达,进而减少其对下游靶基因 β -catenin的抑制,使骨生成增加。有研究指出,破骨细胞来源的外泌体miR-214可被转运至成骨细胞,进而调控成骨细胞的功能活性^[18],但在本研究中由于检测的是胫骨总RNA中miR-214的表达,因此不能确定运动作用的具体细胞,这需要进一步的研究。此外,ATF4也是重要的成骨分化调控因子,可通过调控其下游的靶标Runx2、ALP、Coll α 等成骨分化标志物影响骨生成^[7]。在经过跑台运动干预后骨质疏松小鼠ATF4蛋白的表达量显著增加,这可能是由于运动降低了miR-214的表达,进而减少了miR-214对ATF4的抑制作用。ATF4表达增加后使成骨分化增加,骨生成增多。

运动防治骨质疏松的作用已经得到广泛的认可,但是其作用机制尚不完全明确。本研究为进一步明确运动防治骨质疏松的机制提供了新的理论基础,即运动可能通过抑制内源性miR-214的表达,减少其对下游靶基因ATF4和 β -catenin的抑制,进而使骨生成增加。

参考文献 (References)

- 1 Bluc D, Alarkawi D, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR. Risk of subsequent fractures and mortality in elderly women and men with fragility fractures with and without osteoporotic bone density: the Dubbo Osteoporosis epidemiology study. *J Bone Miner Res* 2015; 30(4): 637-46.
- 2 Chen X, Li L, Guo J, Zhang L, Yuan Y, Chen B, *et al.* Treadmill running exercise prevents senile osteoporosis and upregulates the Wnt signaling pathway in SAMP6 mice. *Oncotarget* 2016; 7(44): 71072-86.
- 3 Tabatabaei-Malazy O, Salari P, Khashayar P, Larjani B. New horizons in treatment of osteoporosis. *Daru* 2017; 25(1): 2.
- 4 Moreira LD, Oliveira ML, Lirani-Galvao AP, Marin-Mio RV, Santos RN, Lazaretti-Castro M. Physical exercise and osteoporosis: effects of different types of exercises on bone and physical function of postmenopausal women. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014; 58(5): 514-22.
- 5 Ma D, Wu L, He Z. Effects of walking on the preservation of bone mineral density in perimenopausal and postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Menopause* 2013; 20(11): 1216-26.
- 6 Yuan Y, Chen X, Zhang L, Wu J, Guo J, Zou D, *et al.* The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis. *Prog Biophys Mol Biol* 2016; 122(2): 122-30.
- 7 Cao F, Zhan J, Chen X, Zhang K, Lai R, Feng Z. miR-214 promotes periodontal ligament stem cell osteoblastic differentiation by modulating Wnt/betacatenin signaling. *Mol Med Rep* 2017; 16(6): 9301-8.
- 8 Li L, Chen X, Lü S, Dong M, Zhang L, Tu J, *et al.* Influence of exercise on bone remodeling-related hormones and cytokines in ovariectomized rats: a model of postmenopausal osteoporosis. *PLoS One* 2014; 9(11): e112845.
- 9 Li KC, Chang YH, Yeh CL, Hu YC. Healing of osteoporotic bone defects by baculovirus-engineered bone marrow-derived MSCs expressing MicroRNA sponges. *Biomaterials* 2016; 74: 155-66.
- 10 Li D, Liu J, Guo B, Liang C, Dang L, Lu C, *et al.* Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. *Nat Commun* 2016; 7: 10872.
- 11 Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14(6): 753-60.
- 12 Zhang L, Chen X, Wu J, Yuan Y, Guo J, Biswas S, *et al.* The effects of different intensities of exercise and active vitamin D on mouse bone mass and bone strength. *J Bone Miner Metab* 2017; 35(3): 265-77.
- 13 Miyamoto T. Mechanism underlying post-menopausal osteoporosis: HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency. *Keio J Med* 2015; 64(3): 44-7.
- 14 Passos-Soares JD, Vianna MIP, Gomes IS, Cruz SS, Barreto ML, Adan LF, *et al.* Association between osteoporosis treatment and severe periodontitis in postmenopausal women. *Menopause* 2017; 24(7): 789-95.
- 15 Wang X, Guo B, Li Q, Peng J, Yang Z, Wang A, *et al.* miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med* 2013; 19(1): 93-100.
- 16 Yuan Y, Zhang LL, Tong XY, Zhang M, Zhao YL, Guo JM, *et al.* Mechanical stress regulates bone metabolism through microRNAs. *J Cell Physiol* 2017; 232(6): 1239-45.
- 17 Sun YQ, Kuek V, Liu YH, Tickner J, Yuan Y, Chen LL, *et al.* MiR-214 is an important regulator of the musculoskeletal metabolism and disease. *J Cell Physiol* 2019; 234(1): 231-45.
- 18 Yang L, Ge D, Cao X, Ge Y, Chen H, Wang W, *et al.* MiR-214 attenuates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via targeting FGFR1. *Cell Physiol Biochem* 2016; 38(2): 809-20.