

骨样细胞 MLO-Y4 与成骨样细胞 MC3T3-E1 生物学特性的比较

瓮媛媛 续惠云 安龙 商澎*

(西北工业大学生命科学院, 特殊环境生物物理学研究所, 空间生物实验模拟技术
国防重点学科实验室, 西安 710072)

摘要 分别采用倒置显微镜观察法、细胞计数法、RT-PCR 法、磷酸对硝基苯酚法(PNPP 法)和 ELISA 法来比较小鼠骨样细胞 MLO-Y4 与小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 的细胞形态、增殖、相关基因的表达和分泌功能的差异。结果显示 MC3T3-E1 细胞呈长梭形, 具有少量短的突触; 而 MLO-Y4 细胞呈星状或树枝状且具有很多长的突触。MC3T3-E1 细胞的增殖能力强于 MLO-Y4 细胞, 两者的倍增时间分别是 18 h 和 20 h。MC3T3-E1 细胞中原癌基因 *c-fos* 和骨桥蛋白基因 *OPN* mRNA 的表达明显高于 MLO-Y4 细胞, 而骨钙素基因 *OC* mRNA 的表达则是 MC3T3-E1 细胞远低于 MLO-Y4 细胞, 白细胞分化抗原 44 基因 *CD44* mRNA 在两种细胞中的表达差异不明显。ALP 的分泌在 MC3T3-E1 细胞中高于 MLO-Y4 细胞, NO 的分泌在两种细胞中没有显著性差异, M-CSF 在 MLO-Y4 细胞中的分泌较高。由此可见骨样细胞 MLO-Y4 与成骨样细胞 MC3T3-E1 在形态、ALP 和 M-CSF 分泌及 *c-fos*、*OPN* 和 *OC* mRNA 表达方面差异明显。

关键词 骨样细胞 MLO-Y4; 成骨样细胞 MC3T3-E1; 细胞形态; 细胞功能

骨组织细胞包括骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、骨衬细胞和它们的前体细胞等。其中成骨细胞起源于骨髓基质间充质干细胞, 约为骨细胞数量的十分之一, 执行骨形成的功能^[1]。而骨细胞是由成骨细胞分化而来的, 是骨组织结构中含量最为丰富的细胞, 占骨组织细胞总数的 95%^[2], 是骨组织机械应力感受的主要细胞^[3,4]。在骨组织工程的许多研究中, 目前用成骨细胞进行的较多, 可能是因为成骨细胞有成熟的细胞系, 而骨细胞被深埋在矿物质化的组织内, 人们无法取得理想纯度和数量的骨细胞进行研究。但是随着 1997 年小鼠骨样细胞系 MLO-Y4 的建立^[5,6], 关于骨细胞功能的研究越来越受到重视。骨细胞与成骨细胞作为骨组织细胞中分化水平不同的两种细胞, 在很多方面都有差异, 在骨科学研究的各个领域应考虑这些差异, 从而选择更为合适的细胞种类。本文选取研究中最常用的骨样细胞 MLO-Y4 和成骨样细胞 MC3T3-E1, 对其细胞形态、增殖、分泌及相关基因的表达进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠骨样细胞 MLO-Y4 (美国德克萨斯大学

Bonewald 教授馈赠), 小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 (中国科学院上海细胞库), MEM 培养基和 Trizol (美国 Invitrogen 公司), 胎牛和小牛血清(中国杭州四季青生物工程材料有限公司), 倒置荧光显微镜(德国 Laica 公司), Model680 酶标仪和 Bio-Tek Synergy HT 多功能酶标仪(美国 Bio-Rad 公司), RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司), 小鼠 M-CSF 和 NO 的 ELISA 试剂盒(美国 UNIONHONEST#ALD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MLO-Y4 和 MC3T3-E1 细胞均在 37 °C, 5% CO₂ 条件下进行培养。MLO-Y4 细胞用含 5% 胎牛血清和 5% 小牛血清的 MEM 培养基培养, MC3T3-E1 细胞用含 10% 小牛血清的 MEM 培养基培养。

1.2.2 细胞形态观察 将贴壁 24 h 的 MLO-Y4 和 MC3T3-E1 细胞在倒置荧光显微镜下进行观察拍照。

1.2.3 细胞增殖检测 选取对数生长期的 MLO-Y4 和 MC3T3-E1 细胞各 200 μl 接种于 96 孔板, 2×10⁴ 个细胞/孔, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 72 h, 每 12 h

收稿日期: 2010-01-19 接受日期: 2010-03-23

国家自然科学基金资助项目(No.30700152)

* 通讯作者。Tel: 029-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

取细胞进行细胞计数, 共设三个复孔。

1.2.4 相关基因表达检测 将贴壁生长 24 h 的 MLO-Y4 和 MC3T3-E1 细胞用 Tizol 裂解后转移至离心管中, 提取细胞总 RNA, 用紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和浓度。跟据试剂盒提供的方法进行 RT-PCR, 检测 mRNA 的表达情况。PCR 引物用 Primer premier 5.0 设计, 骨钙素基因(*OC*)、白细胞分化抗原 44 基因(*CD44*)、骨桥蛋白基因(*OPN*)和原癌基因(*c-fos*)和 18S 的引物序列如表 1 所示。

1.2.5 碱性磷酸酶(ALP)检测 选取对数生长期的 MLO-Y4 和 MC3T3-E1 细胞各 200 μ l 接种于 96 孔板, 2×10^4 个细胞/孔, 37°C , 5% CO_2 条件下培养 72 h, 每 12 h 取细胞培养上清液采用磷酸对硝基苯酚法(PNPP 法)进行操作, 共设三个复孔。具体步骤如下: 取 20 μ l 细胞培养上清液放入 96 孔板的微孔, 加底物反应液(PNPP-DEA 溶液); 37°C 水浴 10 min, 加 90 μ l 终止液(0.1 mol/L NaOH)终止反应; 405 nm 检测 A 值。调零为 90 μ l 底物反应液加 90 μ l 终止液, 样品 A 值在 ALP 标准曲线上读取酶活性值(μ l/L), PNPP 浓度梯度 5、10、20、40 μ mol/L 相当于 ALP 20、40、80、160 μ l/L。然后用酶标仪检测培养上清液中 ALP 的

分泌值(A_{405})。

1.2.6 一氧化氮(NO)和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)检测 MLO-Y4 细胞和 MC3T3-E1 细胞连续培养 72 h。分别在 12 h、24 h、48 h、72 h 时间点收集细胞培养上清液, 按照 M-CSF 和 NO 的 ELISA 试剂盒说明书方法进行操作, 然后用多功能酶标仪检测培养上清液中 M-CSF 和 NO 的分泌值(A_{450})。

1.2.7 统计处理 使用统计学软件 Graphpad Prism5.0 处理数据, 采用 *t* 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性, 具有统计学意义($P < 0.05$ 标记为 *, $P < 0.01$ 标记为 **, $P < 0.001$ 标记为 ***)。

2 结果

2.1 细胞形态

镜下观察, MLO-Y4 细胞是星状或树枝状的细胞, 表面有 2~16 个突触与周围细胞相联系。MC3T3-E1 细胞为梭形、锥形或立方体, 其中梭形居多。表面有 2~4 个短的突触与相邻细胞联系。由图 1 可见, MLO-Y4 细胞的突触比 MC3T3-E1 细胞的突触长且粗。MC3T3-E1 细胞比 MLO-Y4 细胞体积大, 但 MLO-Y4 细胞更加立体。

Table 1 RT-PCR primers sequence

	Sequence (5' to 3')	Sequence (3' to 5')	Augmentation length
<i>CD44</i>	GGATTTCATCCCAACGCTAT	ACTCGCCCTTCTTGCTGT	216 bp
<i>OPN</i>	TTCACCTCCAATCGTCCCTAC	TGCCCTTCCGTTGTTGTC	235 bp
<i>OC</i>	TTCTGCTCACTCTGCTGACCCT	GTTCACCTTATTGCCCTCCTG	122 bp
<i>c-fos</i>	CAGCGAGCAACTGAGAAGACT	CGGCGTTGAAACCCGAGAA	164 bp
18S	AATCAGGGTTCGATTCCGGA	CCAAGATCCAACCTACGAGCT	257 bp

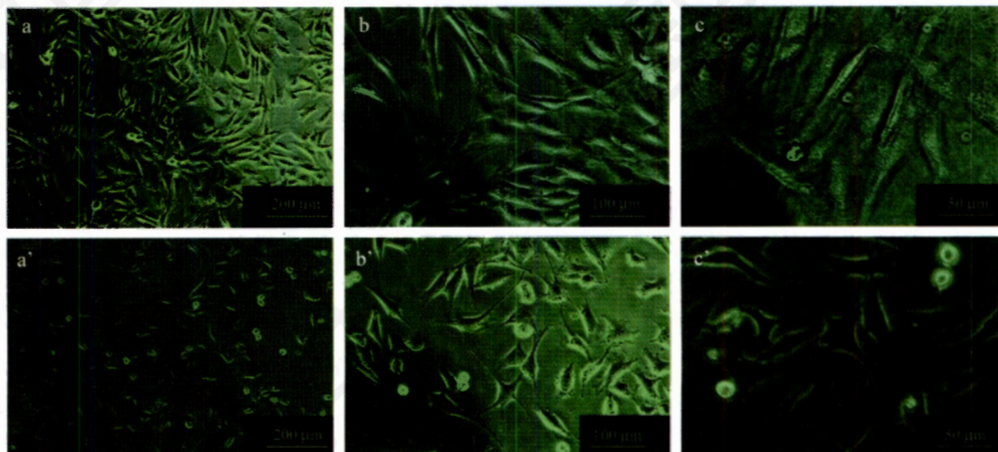


Fig.1 Cell morphology of MC3T3-E1 and MLO-Y4

a, b, c: osteoblast-like cell MC3T3-E1 (100x, 200x, 400x); a', b', c': osteocyte-like cell MLO-Y4 (100x, 200x, 400x).

2.2 细胞增殖

MC3T3-E1 细胞与 MLO-Y4 细胞增殖情况如图 2 所见, MC3T3-E1 细胞的增殖要比 MLO-Y4 细胞更快, 但经过统计学分析, 二者的差异没有显著性。按照公式 $T_D = t[\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$ 计算两种细胞的倍增时间 T_D , 其中 T_D 为倍增时间, t 代表培养时间, N_0 及 N_t 代表接种时及培养 t 小时后的细胞数, MC3T3-E1 细胞的倍增时间是 18 h, MLO-Y4 细胞的倍增时间是 20 h。

2.3 mRNA 表达

如图 3 所示, *c-fos* 和 *OPN* mRNA 的表达都是

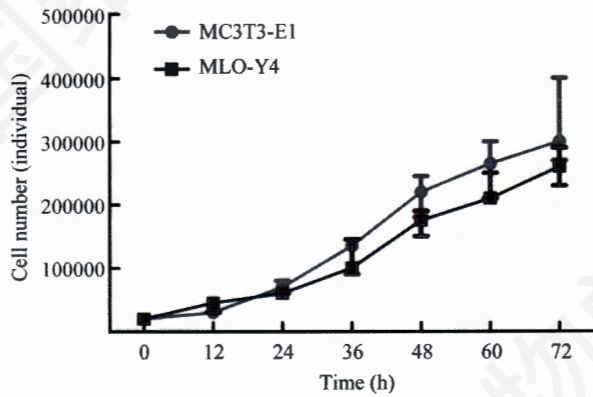


Fig.2 Cell proliferation of MC3T3-E1 and MLO-Y4

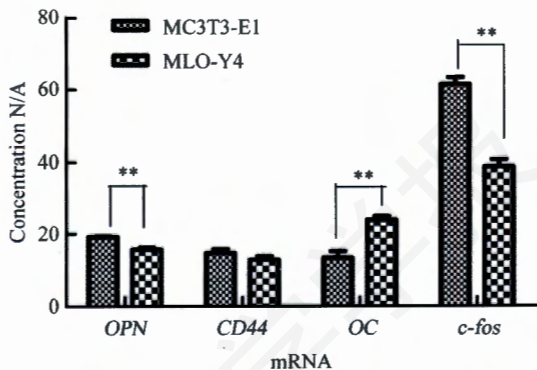
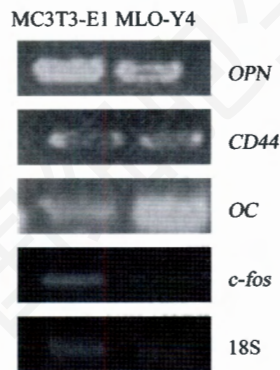


Fig.3 mRNA expression of OC, CD44, OPN and c-fos

MC3T3-E1 细胞明显高于 MLO-Y4 细胞 (** $P < 0.01$), *OC* mRNA 的表达则是 MC3T3-E1 细胞远低于 MLO-Y4 细胞 (** $P < 0.01$), *CD44* mRNA 的表达在两种细胞中差异不明显。

2.4 ALP 的检测

ALP 在 MC3T3-E1 细胞中的分泌显著高于其在 MLO-Y4 细胞中的分泌 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。在 MLO-Y4 细胞中其分泌是随时间逐渐增加的(图 4)。

2.5 NO 分泌

两种细胞中 NO 的分泌, 其差异没有显著性, 在 MLO-Y4 细胞中随时间的增加, NO 的分泌逐渐减少(图 5)。

2.6 M-CSF 分泌

在培养 48 h 之前, 两种细胞中 M-CSF 的分泌都是随时间逐渐增加的, 且 MLO-Y4 细胞的分泌要高于 MC3T3-E1 细胞。培养到 72 h 时, M-CSF 在 MLO-Y4 细胞中的分泌下降到比 MC3T3-E1 细胞更低的水平, 如图 6 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

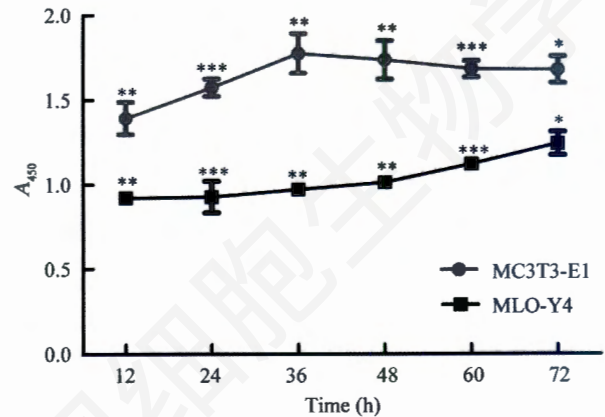


Fig.4 Secretion of ALP

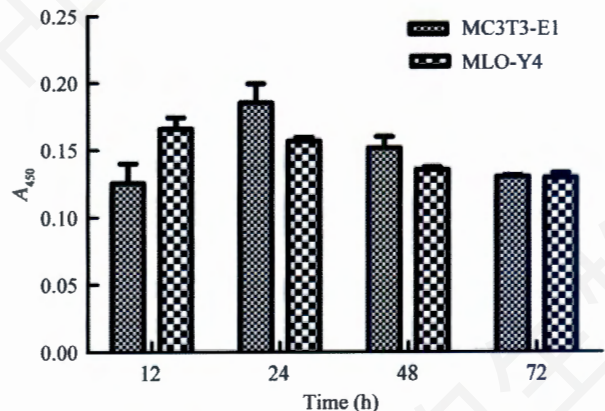
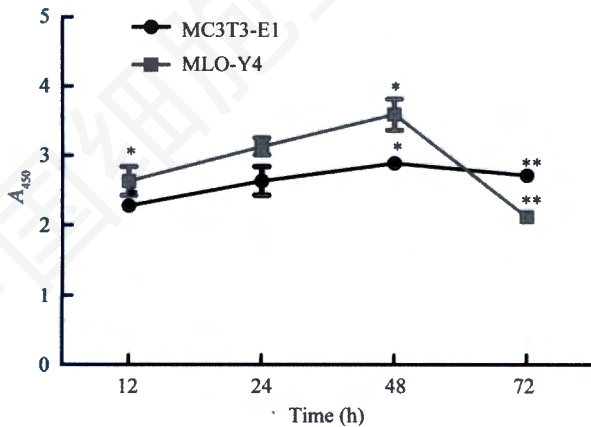


Fig.5 Secretion of NO

Table 2 The comparison of biological characteristics between osteocyte-like cell MLO-Y4 and osteoblast-like cell MC3T3-E1

	Cell morphology	Cell proliferation	mRNA expression				Secretion of cytokine		
			<i>CD44</i>	<i>OPN</i>	<i>OC</i>	<i>c-fos</i>	ALP	NO	M-CSF
MC3T3-E1	Spindle-shaped with few short dendrites	Faster	No	High	Low	High	High	No	Low
MLO-Y4	Star-shaped or dendrite-shaped with more dendrites	Slower	significant difference	Low	High	High	Low	significant difference	High

**Fig. 6 Secretion of M-CSF**

2.7 骨样细胞 MLO-Y4 与成骨样细胞 MC3T3-E1 生物学特性的比较

骨样细胞 MLO-Y4 与成骨样细胞 MC3T3-E1 在形态、ALP 和 M-CSF 分泌及 *c-fos*、*OPN* 和 *OC* mRNA 表达方面差异明显。实验结果总结归纳如表 2 所示。

3 讨论

成骨细胞取材容易,增殖能力强,在体内执行骨形成功能。成骨细胞的组织相容性好,植入体内后能适应体内环境,保持良好的生物学特性且不引起排异,是构建组织工程化活性骨的理想功能细胞^[8]。此外,对于临床骨折和骨质疏松和空间骨丢失机制等的研究也多选用成骨细胞,如:研究发现模拟空间失重环境不仅对成骨细胞骨架、增殖和凋亡等功能产生了很大影响^[9-12]。但随着骨样细胞系的建立,关于骨组织力学方面的研究,越来越多的人选择骨样细胞系作为研究对象。

在成骨细胞向骨细胞的分化过程中,细胞的体积不断减少,成熟的骨细胞体积减少 70%^[13]。骨细胞丢失了部分细胞器但却获得了很多长突触^[14]。这些含有细胞浆的突触将骨细胞与其他骨细胞以及成骨细胞和破骨细胞联系在一起,并成为骨细胞在形态学方面一个显著的特征。从我们的实验结果也可以看

出,骨样细胞 MLO-Y4 比成骨样细胞 MC3T3-E1 体积小,突触多。这种形态学上的差异有利于骨细胞增强对机械刺激的敏感性。

细胞的增殖是细胞生命进化过程中所获得的基本属性,要了解一种细胞,首先要观察其增殖的能力。我们的实验结果显示,成骨样细胞 MC3T3-E1 比骨样细胞 MLO-Y4 的增殖能力要强。成骨样细胞 MC3T3-E1 的倍增时间是 18 h,骨样细胞 MLO-Y4 的倍增时间是 20 h。不同于生长在骨基质表面的成骨细胞,骨细胞被深埋在矿化的骨基质中,它的增殖相对缓慢一些。

在骨细胞中表达的一些基因,在成骨细胞中也有所表达。我们选择 *c-fos*、*OPN*、*OC* 和 *CD44* 这四种基因来比较它们在骨样细胞 MLO-Y4 和成骨样细胞 MC3T3-E1 中的表达情况。*c-fos* 具有调节骨组织细胞生长的功能^[15]。*OPN* 在骨基质中被发现,并且在矿化前沿和骨细胞内浓度很高^[16,17]。*OC* 存在于骨细胞的粗面内质网和高尔基体内^[18,19],且在成骨细胞和其前体细胞以及类骨质细胞中都有表达^[20,21]。*CD44* 主要在骨细胞和破骨细胞中表达,介导细胞与细胞外基质间的相互作用^[22,23]。实验结果显示,MC3T3-E1 细胞中 *c-fos* 和 *OPN* mRNA 的表达明显高于 MLO-Y4 细胞,而 *OC* mRNA 的表达则是 MC3T3-E1 细胞低于 MLO-Y4 细胞,*CD44* mRNA 在两种细胞中的表达差异不明显。这与骨样细胞 MLO-Y4 和成骨样细胞 MC3T3-E1 的功能差异有关。*OC* 对骨的形成有负调节作用^[24],那么执行成骨功能的 MC3T3-E1 细胞中 *OC* mRNA 表达相应要低。*OPN* 对骨细胞的形成有重要作用,骨细胞正是起源于成骨细胞,MC3T3-E1 细胞中 *OPN* mRNA 的表达高于骨样细胞 MLO-Y4。*c-fos* 是一个快速反应基因,其特征为静止的细胞在受到外界丝裂原的刺激时能快速瞬间表达^[25,26]。*c-fos* 参与细胞增殖的调控过程,研究表明,在无 *c-fos* 存在的条件下,细胞生长缓慢或受到抑制^[27]。作为增殖能力强于骨样细胞 MLO-Y4 的成骨样细胞 MC3T3-E1,其 *c-fos* mRNA 表达要高一些。*CD44*

mRNA 在两种细胞中表达差异不明显, 表明 CD44 可能并不能作为骨细胞的标志性分子。

据报道, ALP 的表达在成骨细胞中很高, 在骨细胞中很少, 而且由成骨细胞向骨细胞分化的过程中, ALP 的分泌逐步降低^[28,29]。我们检测了骨样细胞 MLO-Y4 和成骨样细胞 MC3T3-E1 中 ALP 的分泌。实验表明, 在 MC3T3-E1 细胞中 ALP 的分泌远高于 MLO-Y4 细胞, 且在 36 h 之后随时间而减少。ALP 的高分泌通常是用来衡量成骨细胞特性的标志性指标。由于成骨细胞是一种很活跃的分泌细胞, ALP 分泌后期的减少可能与基质钙化有关。

从成骨分化的角度来讲, ALP 是成骨细胞的早期标志酶, 在成骨过程中水解磷酸酯, 为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸, 有利于成骨, 可标志成骨分化的开始。从成骨细胞前体一直到矿化基质形成均有 ALP 的表达, 且会随时间的推移表达降低。这与我们的实验结果也是相符合的。而 OPN 和 OC 是成骨分化的晚期指标, 它们表达增加的时间较晚, 至成骨分化晚期才达到最高。在骨的发育过程中 OPN 被成骨细胞大量表达, 其作用是招募破骨细胞到损伤部位进行骨吸收, 是成骨细胞执行成骨功能的标志性指标之一。而骨细胞的主要功能是应力感受且作为成骨细胞发源而来的细胞其 OPN 的表达少于成骨细胞是合理而且符合成骨分化进程的一种现象。OC 是成骨细胞特异性合成和分泌的一种非胶原蛋白, 在钙离子存在的条件下, 与羟基磷灰石结合并稳定其构象, 是向成熟骨细胞分化的最具特征性的标志物。OC 是反映成骨细胞在体外分化为成熟骨细胞及基质钙化的重要指标。在成骨细胞分化后期表达大量的 OC 调节其向骨细胞分化, 而在成熟骨细胞阶段 OC 的表达处于高峰期, 这也解释了本文实验结果中 OC 在骨样细胞 MLO-Y4 中的表达多于其在成骨样细胞 MC3T3-E1 中的表达。

NO 是一个活跃的小分子, 可作为第二信使参与很多机体的反应^[30]。NO 对骨骼细胞有多种作用, 具有抑制骨吸收促进骨形成的功能^[31]。相关研究证明流体剪切力可以刺激骨细胞产生很高水平的 NO^[32,34], 可见 NO 在骨细胞应答机械刺激的过程中也是一个比较敏感的因子。我们的实验结果显示, NO 在两种细胞中的分泌没有显著性差异。可能与 NO 更多的是作为响应外界信号的分子这一特性有关, 在受到一定的力或者化学信号后才会发生改变, 而在常规培养条件下以基线值存在。M-CSF 可以在成纤维细胞、

成骨细胞及内皮细胞中合成, 对骨细胞的形成具有重要作用。MC3T3-E1 和 MLO-Y4 细胞中均能检测到 M-CSF 的分泌, 且在培养 48h 之前, MLO-Y4 细胞的分泌要高于 MC3T3-E1 细胞, 两种细胞中 M-CSF 的分泌都随时间逐渐增加。这可能与骨细胞作为骨组织中重要的感受器这一功能有关, 骨细胞通过这些分泌因子的作用, 调节成骨细胞和破骨细胞的功能。研究表明, 在没有促骨因子的条件下, 骨细胞会分泌大量的 M-CSF, 诱导破骨细胞的形成来增加骨吸收^[35]。

由于骨细胞建立细胞系的技术难题, 在骨组织科学的研究中, 很多研究者会选择拥有成熟细胞系的成骨细胞, 而忽略了骨细胞与成骨细胞很多生物学特性的差异给科学研究带来的不同结果。随着骨细胞系的建立和发展, 人们对骨细胞的了解越来越多。骨样细胞 MLO-Y4 和成骨样细胞 MC3T3-E1 细胞成为研究者较常用的细胞系, 通过对两种细胞的细胞形态、增殖、分泌及相关基因的表达进行比较研究, 我们可以把握细胞特征, 了解细胞功能, 将其更好的应用于骨组织科学不同方面的研究中去。

特别感谢美国德克萨斯大学 Bonewald 教授惠赠骨样细胞系 MLO-Y4 以供研究。感谢西北大学特殊环境生物物理学研究所蹇爱荣副教授、张维技术员、孟芮、高翔等同学的大力支持和帮助。

参考文献(References)

- 1 Jande SS, Belanger LF. The life cycle of the osteocyte. *J Clin Invest* 1973; 94(7): 281-305.
- 2 Parfitt AM. The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption-bone flow theory. *Clin Orthop Relat Res* 1977; (127): 236-47.
- 3 Bonewald LF. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bonekey Osteovision* 2006; 3(10): 7-15.
- 4 Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 1993; 53(Suppl 1): S102-107.
- 5 Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res* 1997; 12(12): 2014-23.
- 6 Bonewald LF. Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Metab* 1999; 17(1): 61-5.
- 7 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版社, 2005, 198.
- 8 田三德, 张宏, 杨辉. 我国成骨细胞研究、应用现状和发展前景. *陕西科技大学学报* 2005; 23(1): 91-94.
- 9 蹇爱荣, 张维, 瓮媛媛, 杨鹏飞, 王哲, 商澎. 强磁重力环境对成骨细胞增殖、形态及其主要元素含量的影响. *第四军医大学学报* 2008; 29(19): 1729-32.
- 10 续惠云, 安龙, 王哲, 曹建平, 商澎. 模拟失重对人成

- 骨样细胞凋亡的影响。细胞生物学杂志 2008; 30(5): 651-4.
- 11 Qian AR, Zhang W, Weng YY, Tian ZC, Di SM, Yang PF, *et al.* Gravitational environment produced by a superconducting magnet affects osteoblast morphology and functions. *Acta Astronautica* 2008; 63(7-10): 929-46.
 - 12 Qian AR, Di SM, Gao X, Zhang W, Tian ZC, Li JB, *et al.* cDNA microarray reveals the alterations of cytoskeleton-related genes in osteoblast magneto-gravitational environment. *Acta Biochim Biophys Sin* 2009; 41(7): 561-77.
 - 13 Marotti G, Zallone AZ, Ledda M. Number, size and arrangement of osteoblasts in osteons at different stages of formation. *Calcif Tissue Res* 1976; 21(1): 96-101.
 - 14 Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone* 1990; 11(6): 401-6.
 - 15 冀群升, 章静波. *c-fos* 原癌基因的研究进展. 医学分子生物学杂志 1994; 4(2): 152-56.
 - 16 Hultenby K, Reinholt FP, Oldberg A, Heinegard D. Ultrastructural immunolocalization of osteopontin in metaphyseal and cortical bone. *Matrix* 1991; 11(3): 206-13.
 - 17 Mark MP, Butler WT, Prince CW, Finkelman RD, Ruch JV. Developmental expression of 44kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone gamma-carboxyglutamic acid(Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation* 1988; 37(2): 123-36.
 - 18 Ohat T, Mori M, Ogawa K, Matsuyama T, Ishii S. Immunocytochemical localization of BGP in human bones in various developmental stages and pathological conditions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1989; 415(5): 459-66.
 - 19 Boivin G, Morel G, Lian JB, Anthoine-Terrier C, Dubois PM, Meunier PJ. Localization of endogenous osteocalcin in neonatal rat bone and its absence in articular cartilage: effect of warfarin treatment. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990; 417(6): 505-12.
 - 20 Jundt G, Berghauer KH, Termine JD, Schulz A. Osteonectin—a differentiation marker of bone cells. *Cell Tissue Res* 1987; 248(2): 409-15.
 - 21 Chen J, McCulloch CA, Sodek J. Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin. *Arch Oral Biol* 1993; 38(3): 241-9.
 - 22 Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P, *et al.* Participation in normal immune response of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 1992; 257(31): 682-85.
 - 23 Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res*, 1994 ; 9(1): 39-44.
 - 24 Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382(1): 448-52.
 - 25 Ransone LJ, Verma LM. Nuclear proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6(1): 539-57.
 - 26 Gurman A, Wasyluk B. Nuclear targets for transcription regulation by onco-genes. *Trends Genetics* 1991; 7(2): 49-54.
 - 27 Okuno H, Suzuki T, Yoshida T, Hashimoto Y, Curran T, Iba H. Inhibition of *jun* transformation by a mutated *fos* gene: design of an anti-oncogene. *Oncogene* 1991; 6(9): 1491-97.
 - 28 Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighton CT. Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 346(1): 85-103.
 - 29 Buder SP, Caplan AI. Osteogenic cell lineage analysis is facilitated by organ cultures of embryonic chick periosteum. *Dev Biol* 1990; 141(2): 319-29.
 - 30 Mikuni TY, Kakai Y, Satoyoshi M, Kawano E, Suzuki Y, Kawase T, *et al.* Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. *Bone Miner Res* 1995; 10(2): 231-42.
 - 31 Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41(1): 203-36.
 - 32 Fan X, Roy E, Zhu L, Murphy TC, Ackert-Bicknell C, Hart CM, *et al.* Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 2004; 145(2): 751-9.
 - 33 Klein-Nulend J, Vander Plas A, Semeins CM, Ajubi NE, Frangos JA, Nijweide PJ, *et al.* Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress *in vitro*. *FASEB J* 1995; 9(5): 441-5.
 - 34 Zaman G, Pitsillides AA, Rawlinson SC, Suswillo RF, Mosley JR, Cheng MZ, *et al.* Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J Bone Miner Res* 1999; 14(7): 1123-31.
 - 35 Zhao S, Zhang YK, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. MLO-Y4 Osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; 17(11): 2068-79.

The Comparison of Biological Characteristics between Osteocyte-like Cell MLO-Y4 and Osteoblast-like Cell MC3T3-E1

Yuan-Yuan Weng, Hui-Yun Xu, Long An, Peng Shang*

(Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Faculty of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract To compare the biological characteristics of osteocyte-like cell MLO-Y4 and osteoblast-like cell MC3T3-E1 from cell morphology, cell proliferation, cell secretion and gene expression with different methods: Cell morphology was observed by inverted microscope. Cell counting assay was used to detect cell proliferation. RT-PCR was used to detect mRNA expression of *OC*, *CD44*, *OPN* and *c-fos*. Secretion of ALP was measured by PNPP. Secretion of M-CSF and NO were measured by ELISA. The results tell us: osteocyte-like cell MLO-Y4 and osteoblast-like cell MC3T3-E1 showed obvious difference in cell morphology, MC3T3-E1 cells were spindle-shaped with few short dendrites, however, MLO-Y4 cells were star-shaped or dendrite-shaped with more dendrites. The doubling time of MC3T3-E1 cells was 18 h, while that of MLO-Y4 cells was 20 h. RT-PCR showed the expression of *c-fos* and *OPN* were higher and the expression of *OC* was lower in MC3T3-E1 cells than in MLO-Y4 cells, and there was not significant difference of CD44 expression between the two kinds of cells. ALP secretion was higher and M-CSF secretion was lower in MC3T3-E1 cells than that in MLO-Y4 cells. There is not significant difference of NO secretion between the two kinds of cells. It can be seen that there were significant differences in cell morphology, ALP and M-CSF secretion, expression of *c-fos*, *OPN* and *OC* between MLO-Y4 cells and MC3T3-E1 cells. In bone research MLO-Y4 cells and MC3T3-E1 cells are often used. According to their different biological characteristics, researchers could choose appropriate cell types to in their study.

Key words osteocyte-like cell MLO-Y4; osteoblast-like cell MC3T3-E1; cell morphology; cell functions

Received: January 19, 2010 Accepted: March 23, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30700152)

*Corresponding author. Tel: 86-29-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn