

特立帕肽通过 Wnt3a/ β -catenin 通路 对高糖环境下成骨细胞分化的影响

谷营营 侯甜 秦雅芝 张妍 温国琛 毕文娟 董伟

摘要 目的 研究特立帕肽(TPTD)通过 Wnt3a/ β -catenin 通路对高糖环境下 MC3T3-E1 细胞向成骨分化的影响。方法 实验分为 5 组:低糖组、低糖+TPTD 组、高糖组、高糖+TPTD 组、高糖+TPTD+G244-LM 组。Calcein-AM 染色及 CCK-8 法检测细胞增殖活性,碱性磷酸酶(ALP)及茜素红 s 染色观察细胞矿化结节形成情况,免疫荧光检测分析肌动蛋白形成情况,Real-time PCR 检测 Wnt3a、 β -catenin、Tcf1、OPG、COL I mRNA 表达情况。结果 TPTD 对高糖条件下 MC3T3-E1 细胞的增殖活性无显著影响。低糖+TPTD 组细胞 ALP 染色区域、蛋白活性及茜素红 s 染色面积均高于其他四组($P < 0.05$),且高糖组低于低糖组($P < 0.05$),高糖+TPTD 组高于高糖组和高糖+TPTD+G244-LM 组($P < 0.05$)。低糖+TPTD 组细胞骨架最清晰;高糖组和高糖+TPTD+G244-LM 组细胞骨架清晰程度均低于高糖+TPTD 组。低糖+TPTD 组细胞 Wnt3a、 β -catenin、Tcf1、OPG、COL I mRNA 水平最高($P < 0.05$);低糖组各基因 mRNA 水平均高于高糖组($P < 0.05$);高糖+TPTD 组细胞各基因 mRNA 水平均高于高糖组和高糖+TPTD+G244-LM 组($P < 0.05$)。结论 高糖抑制成骨细胞分化,TPTD 通过调控 Wnt3a/ β -catenin 通路促进高糖环境下成骨细胞分化。

关键词 特立帕肽;成骨细胞;高糖;Wnt3a/ β -catenin

中图分类号 R 329.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1750-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.012

糖尿病性骨质疏松症(diabetic osteoporosis, DOP)是糖尿病常见并发症,其发病因素包括成骨细胞功能降低^[1]和糖基化终末产物积累^[2],目前临床上主要通过降糖药配合抗骨质疏松药进行治疗,尚无更具有针对性的治疗药物,临床治疗效果仍待提高。Wnt 信号通路是多种骨质疏松症发生发展的重

要通路,通过影响骨稳态平衡调控骨质疏松的发生^[3]。研究^[4]表明,Wnt/ β -catenin 信号通路可通过调节细胞胞质内 β -catenin 表达量影响成骨细胞增殖分化。高糖状态下 Wnt/ β -catenin 通路表达异常后会干预成骨细胞分化,影响 DOP 的骨形成及代谢^[5]。

特立帕肽(teriparatide, TPTD)与甲状旁腺激素[PTH(1-84)]的前 34 个氨基酸分子相同,是一种用于治疗重度骨质疏松症的促骨形成类首选药物,能够促进骨形成,提高骨量^[6]。临床上,TPTD 多用于绝经后重度骨质疏松症及伴发骨折的治疗,治疗效果理想^[7],但尚未发现其影响 DOP 的分子学及临床实验研究。该实验通过诱导 MC3T3-E1 细胞在高糖条件下成骨分化,同时加入 TPTD 及 Wnt3a 抑制剂,观察 TPTD 对高糖环境下成骨细胞分化的影响及 Wnt3a/ β -catenin 通路在其中的调控作用,以期为临床上 TPTD 成为 DOP 的潜在治疗药物提供细胞学理论研究基础。

1 材料与方法

1.1 细胞 小鼠 MC3T3-E1 细胞,为成骨细胞前体细胞,可诱导分化为成骨细胞(中科院上海细胞库)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和实验分组 实验分为 5 组:低糖组(5.5 mmol/L 葡萄糖)、低糖+TPTD 组(5.5 mmol/L 葡萄糖+10 nmol/L TPTD)、高糖组(16.5 mmol/L 葡萄糖)、高糖+TPTD 组(16.5 mmol/L 葡萄糖+10 nmol/L TPTD)、高糖+TPTD+G244-LM 组(16.5 mmol/L 葡萄糖+10 nmol/L TPTD+0.1 μ mol/L G244-LM)。MC3T3-E1 细胞培养至含 15% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,在细胞接种且贴壁后,更换为含有成骨诱导液(10 nmol/L 地塞米松溶液+50 μ mol/L 抗坏血酸溶液+10 mmol/L β -甘油磷酸钠溶液)的新鲜培养基,并按照分组加入 TPTD 溶液及 Wnt3a 抑制剂 G244-LM。

1.2.2 细胞增殖实验 5 组细胞于 96 孔板中培养

2022-07-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81600844);河北省高等学校科学技术研究项目(编号:QN2020438);河北省医学科学研究重点课题计划(编号:20180745);河北省省级科技计划项目(编号:H2017209114)

作者单位:华北理工大学口腔医学院,唐山 063210

作者简介:谷营营,女,硕士研究生;

董伟,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:970484328@qq.com

24、48、72 h 后,加入 CCK-8 溶液,37 °C 恒温培养 4 h 后,测定 490 nm 处的吸光度值,并按照数据绘制 5 组细胞的生长曲线图。5 组细胞培养 3 d 后,PBS 冲洗 3 次,加入钙黄绿素乙酰氧基甲酯(calcein acetoxyethyl ester,Calcein-AM)染色工作液,室温避光孵育 20 min,荧光显微镜观察细胞染色情况并进行细胞计数。

1.2.3 成骨分化检测 5 组细胞培养 7 d 后,4% 多聚甲醛溶液室温固定 15 min,NBT/BCIP 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)试剂避光染色 30 min,PBS 冲洗 3 次,观察各组细胞 ALP 染色情况。ALP 试剂盒检测各组细胞蛋白活性,酶标仪读取各组数据。5 组细胞培养 21 d 后,每孔加入 4% 多聚甲醛溶液于室温固定 15 min,1% 茜素红 S 染色 20 min,PBS 洗涤 3 次后观察钙化沉积情况。使用 Image J 软件分析茜素红阳性面积占总面积百分比。

1.2.4 免疫荧光分析 5 组细胞培养 5 d 后,4% 多聚甲醛固定 15 min,0.5% Triton X-100 溶液透化细胞 15 min,室温下加入 FITC-phalloidin 孵育 3 h 后,用 5 μg/ml DAPI 室温孵育 5 min 后,观察各组细胞肌动蛋白形成情况。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 分析 将各组细胞总 RNA 逆转录为 cDNA,SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 进行 Real-time PCR,PCR 产物用 StepOnePlus 实时 PCR 系统(美国赛默飞世尔科技公司)检测。选用 GAPDH 作为内参基因。反应程序:95 °C、1 min,95 °C、15 s,60 °C、15 s,72 °C、45 s,共 40 个循环。以 2^{-ΔΔCT}法分析测定基因表达水平,引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 目的基因引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
<i>Wnt3a</i>	F: TACTACGAGGCTCACCCAA R: ACCCATCTATGCCATGCGAG
<i>β-catenin</i>	F: GGTGCTGACTTTGCTTGCTT R: CCGCACGTATCCCGATAAAA
<i>Tcf1</i>	F: CTGCGGCTTACACCAAGTA R: AGACCGATAACCAGGTTGGA
<i>OPG</i>	F: AGGGCATACTTCTCTGTGCC R: GTAGGTGCCAGGAGCACATT
<i>COL 1</i>	F: CCCCTCAACCCGCTACTT R: ACAGTCCAAGAACCCATGTC
<i>GAPDH</i>	F: AGGCCGGTGCTGAGTATGTC R: TGCCTGCTTACCACCTTGT

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,5 组均数比较

应用单因素方差分析,两两比较行 Dunnett 多重比较检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TPTD 对高糖条件下 MC3T3-E1 细胞增殖活性的影响 应用 CCK-8 法测定 5 组细胞培养 24、48、72 h 后各组细胞增殖情况。结果显示,各组细胞增殖活性结果差异无统计学意义($F = 0.985, P > 0.05$)。见图 1、表 2。提示 TPTD 对高糖环境下各组细胞增殖活性无影响。

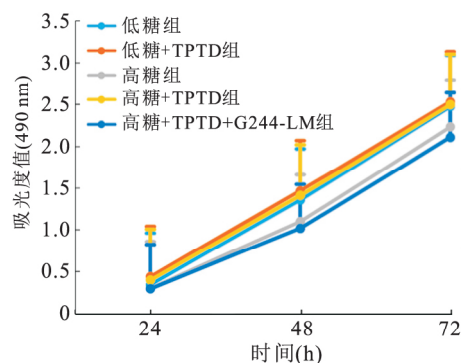


图 1 CCK-8 实验检测细胞培养 24、48、72 h 后各组细胞的生长增殖曲线

表 2 CCK-8 检测高糖环境下 MC3T3-E1 细胞增殖活性($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	24 h	48 h	72 h
低糖	0.36 ± 0.02	1.38 ± 0.03	2.47 ± 0.03
低糖 + TPTD	0.41 ± 0.01	1.42 ± 0.01	2.52 ± 0.02
高糖	0.35 ± 0.03	1.37 ± 0.02	2.23 ± 0.03
高糖 + TPTD	0.40 ± 0.02	1.40 ± 0.01	2.49 ± 0.01
高糖 + TPTD + G244-LM	0.36 ± 0.02	1.37 ± 0.03	2.10 ± 0.02
组间比较	$F = 0.985, P > 0.05$		

5 组细胞培养 3 d 后,进行 Calcein-AM 染色观察细胞增殖趋势。各组细胞计数结果分别为:低糖组(437.43 ± 37.19)个,低糖 + TPTD 组(494.13 ± 66.04)个,高糖组(401.20 ± 44.42)个,高糖 + TPTD 组(409.90 ± 79.08)个,高糖 + TPTD + G244-LM 组(342.06 ± 53.42)个。各组细胞计数结果差异无统计学意义($F = 2.742, P > 0.05$)。见图 2。提示各组细胞增殖趋势无明显差异。

2.2 TPTD 对高糖条件下成骨细胞分化的影响 5 组细胞培养 7 d 后,进行 ALP 染色及蛋白活性检测。ALP 染色结果显示:各组细胞都存在不同程度的成骨分化现象,其中,低糖 + TPTD 组细胞染色区域高于其他四组,细胞分化状态较好($P < 0.05$);高糖组

细胞分化较少,明显低于高糖 + TPTD 组和低糖组细胞的 分化结果 ($P < 0.05$); 高糖 + TPTD 组染色区域高于高糖组和高糖 + TPTD + G244-LM 组 ($P < 0.05$), 见图 3。蛋白定量检测结果 (U/g) 为: 低糖组 (0.508 ± 0.006), 低糖 + TPTD 组 (0.767 ± 0.026), 高糖组 (0.382 ± 0.019), 高糖 + TPTD 组 (0.449 ± 0.022), 高糖 + TPTD + G244-LM 组 (0.213 ± 0.008) ($F = 449.804, P < 0.05$)。结果提示高糖抑制成骨细胞 ALP 分化及蛋白活性, TPTD 促进成骨细胞 ALP 分化及蛋白活性; 高糖 + TPTD 组加入 *Wnt3a* 抑制剂后, 成骨细胞分化量减少, 蛋白活性降

低。

5 组细胞培养 21 d 后, 进行茜素红 s 染色。结果显示, 低糖组 ($16.82\% \pm 0.98\%$)、低糖 + TPTD 组 ($32.40\% \pm 1.09\%$)、高糖组 ($11.79\% \pm 1.28\%$)、高糖 + TPTD 组 ($19.26\% \pm 0.78\%$)、高糖 + TPTD + G244-LM 组 ($7.51\% \pm 1.15\%$) 各组细胞染色阳性区域比组间差异有统计学意义 ($F = 235.692, P < 0.05$)。见图 4。低糖 + TPTD 组细胞染色阳性区域比最高 ($P < 0.05$); 高糖组细胞染色阳性区域比低于低糖组 ($P < 0.05$), 高糖 + TPTD 组细胞染色阳性区域比高于高糖 + TPTD + G244-LM

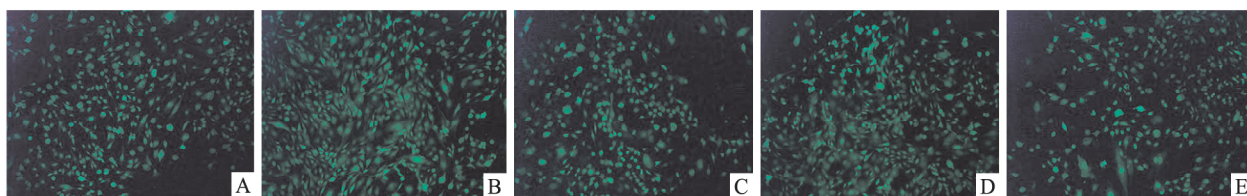


图 2 各组细胞培养 3 d 后 Calcein-AM 染色观察细胞增殖 Calcein-AM 染色 $\times 40$
A: 低糖组; B: 低糖 + TPTD 组; C: 高糖组; D: 高糖 + TPTD 组; E: 高糖 + TPTD + G244-LM 组

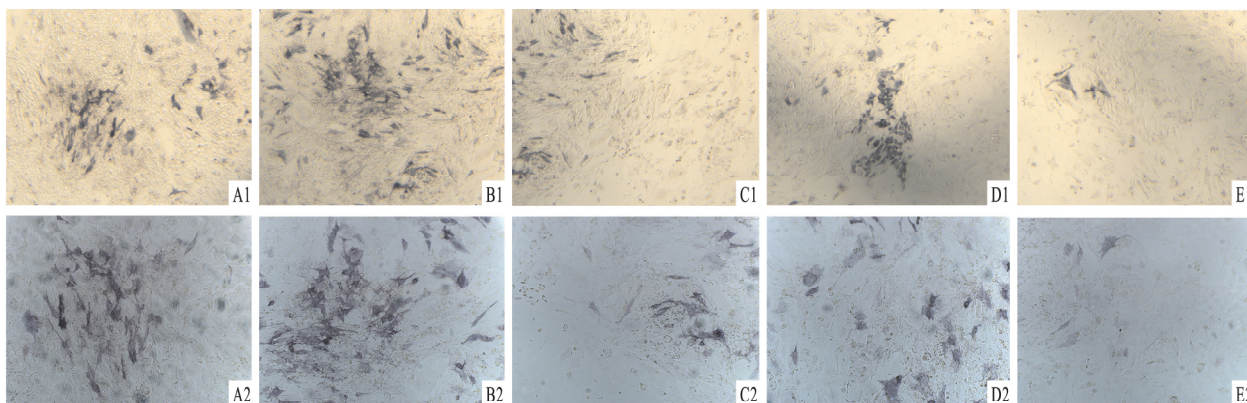


图 3 各组细胞培养 7 d 后 ALP 染色后观察
A: 低糖组; B: 低糖 + TPTD 组; C: 高糖组; D: 高糖 + TPTD 组; E: 高糖 + TPTD + G244-LM 组; 1: $\times 40$; 2: $\times 100$

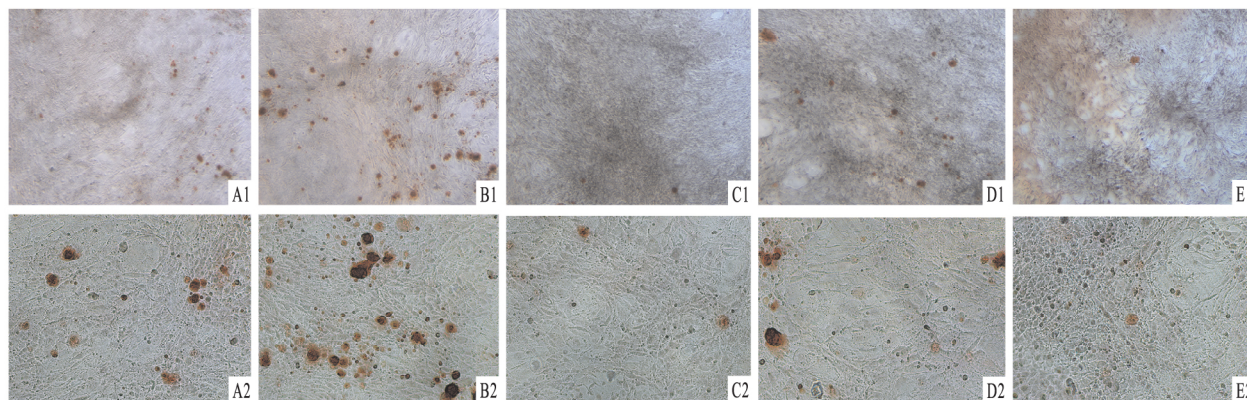


图 4 细胞培养 21 d 后进行茜素红 s 染色结果
A: 低糖组; B: 低糖 + TPTD 组; C: 高糖组; D: 高糖 + TPTD 组; E: 高糖 + TPTD + G244-LM 组; 1: $\times 40$; 2: $\times 100$

组($P < 0.05$)。以上结果表明:高糖抑制成骨细胞分化;TPTD的加入促进成骨细胞分化;在高糖+TPTD组加入 *Wnt3a* 抑制剂后,成骨细胞分化水平降低。

2.3 TPTD对高糖条件下成骨细胞肌动蛋白的影响 5组细胞培养5d后,免疫荧光染色结果显示,低糖+TPTD组细胞骨架最清晰;高糖组和高糖+TPTD+G244-LM组细胞骨架清晰程度均低于高糖+TPTD组。见图5。结果表明,高糖降低MC3T3-E1细胞细胞骨架清晰程度;TPTD的加入提高了细胞骨架清晰程度;*Wnt3a*抑制剂明显降低高糖+TPTD组细胞骨架清晰程度。

2.4 TPTD对高糖条件下成骨相关基因mRNA表达的影响 5组细胞进行Real-time PCR检测结果显示:低糖+TPTD组细胞 *Wnt3a*、 β -catenin、*Tcf1*、*OPG*、*COL I* mRNA水平最高;低糖组各基因mRNA水平均高于高糖组;高糖+TPTD组细胞各基因mRNA水平均高于高糖组和高糖+TPTD+G244-LM

组。见图6。结果表明,高糖抑制成骨细胞 *Wnt3a*、 β -catenin、*Tcf1*、*OPG*、*COL I* mRNA表达;加入TPTD后促进成骨细胞上述各基因mRNA表达;加入 *Wnt3a* 抑制剂后各基因mRNA表达均降低。

3 讨论

该研究表明高糖抑制成骨细胞分化,同时抑制Wnt/ β -catenin通路相关基因 *Wnt3a*、 β -catenin、*Tcf1*、*OPG*、*COL I* mRNA表达;TPTD可促进高糖环境下成骨细胞分化,提高上述各基因mRNA表达。

有研究^[8]通过检测糖尿病模型中细胞焦亡相关因子的表达,表明高血糖可通过细胞焦亡途径抑制成骨细胞的增殖和分化;同时研究ME3T3-E1细胞显示,高血糖可通过Caspase-1/GSDMD/IL-1 β 途径抑制成骨细胞增殖分化。Wu et al^[9]在糖尿病小鼠模型中发现,高血糖小鼠体内成骨分化相关基因ALP和Runx2蛋白的表达明显降低,成骨分化受到抑制。研究^[10]表明,高糖抑制MC3T3-E1细胞向成

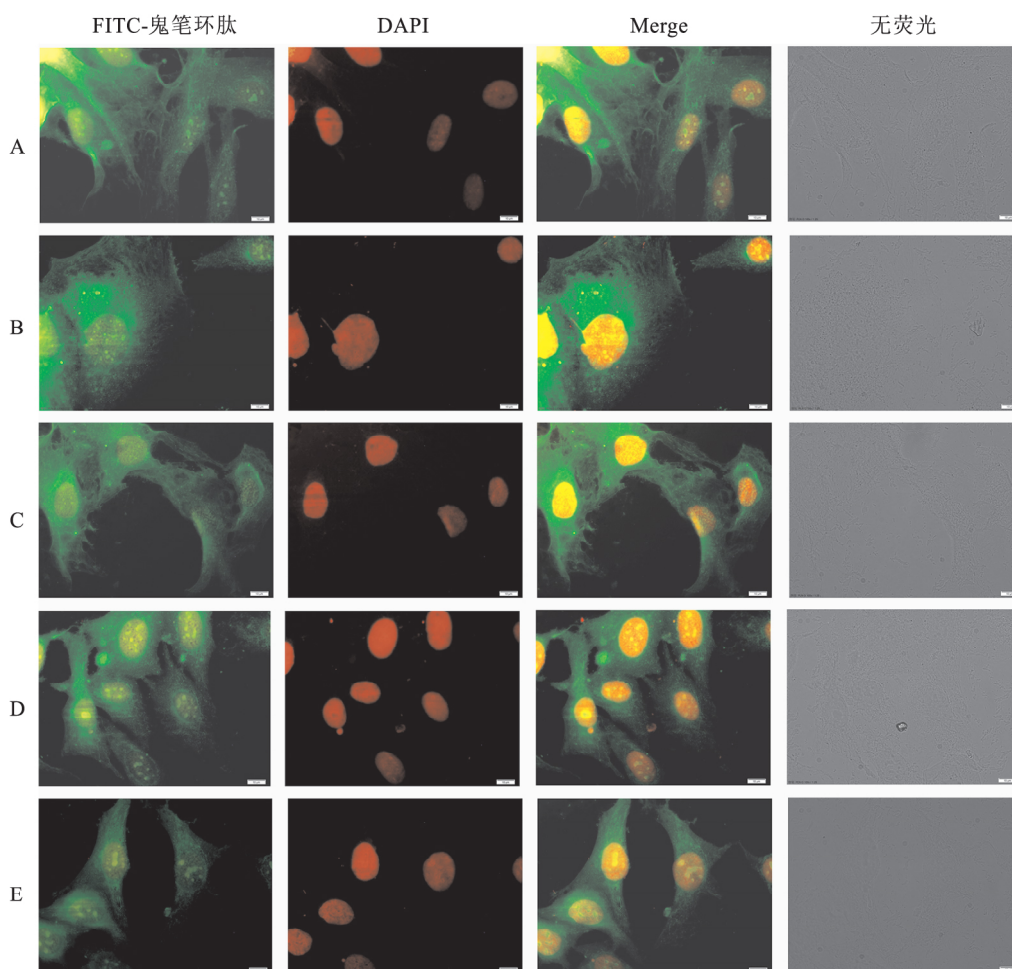


图5 5组细胞细胞骨架 FITC-phalloidin 染色及细胞核 DAPI 染色观察 $\times 400$

A: 低糖组; B: 低糖 + TPTD 组; C: 高糖组; D: 高糖 + TPTD 组; E: 高糖 + TPTD + G244-LM 组

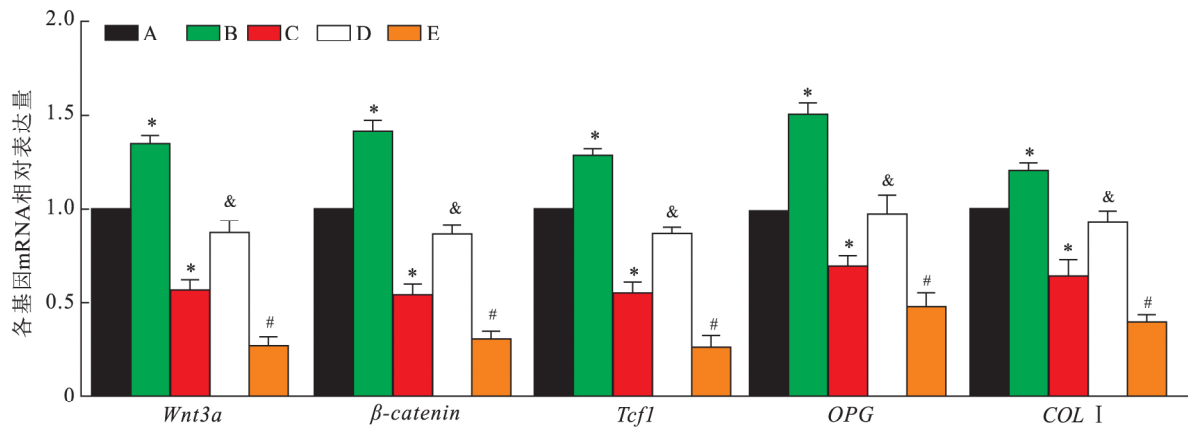


图6 5组细胞进行 Real-time PCR 分析结果

A: 低糖组; B: 低糖 + TPTD 组; C: 高糖组; D: 高糖 + TPTD 组; E: 高糖 + TPTD + G244-LM 组; 与低糖组比较: * $P < 0.05$; 与高糖组比较: & $P < 0.05$; 与高糖 + TPTD 组比较: # $P < 0.05$

骨分化,抑制成骨标志物 Runx2、COL I 表达。但目前高糖抑制成骨细胞分化的具体分子机制尚在研究。该实验通过高糖培养基与低糖培养基分别培养成骨细胞前体 MC3T3-E1 细胞,观察在高糖水平下成骨细胞增殖活性及分化矿化水平是否受到影响,结果显示,高糖水平下各组细胞增殖活性不具有统计学差异,但高糖会降低成骨细胞分化及矿化结节形成水平。Wnt/ β -catenin 通路在成骨微环境中起重要作用^[11],Wnt3a 是 Wnt/ β -catenin 通路的重要组成部分,通过调控 β -catenin 的表达量参与多项成骨分化相关研究。Deshmukh et al^[12] 研究表明,Wnt3a 可通过调控其下游 β -catenin 因子影响 Wnt3a/ β -catenin 通路下游靶基因,参与间充质细胞向成骨细胞和软骨细胞分化的平衡。Feng et al^[13] 研究发现,胰岛素生长因子-1 (IGF-1) 可通过 Wnt/ β -catenin 途径,经 Wnt3a、 β -catenin、cyclin D1、Runx2、OPN 等因子促进骨髓间充质干细胞增殖及骨质发生分化。那么,Wnt3a 是否可以通过干预 β -catenin 表达量在高糖环境下对成骨细胞发挥作用尚未可知。该实验通过加入 Wnt3a 抑制剂,探究了其是否参与了高糖环境下成骨细胞分化作用,结果显示抑制 Wnt3a 表达后 β -catenin 及其下游 Tcf1 表达量随之降低,成骨分化相关基因 OPG 及 COL I 表达亦受到抑制,说明 Wnt3a/ β -catenin 通路参与了高糖环境下成骨细胞分化过程。

研究^[14]表明,PTH(1-84) 可以通过与 Wnt 配体共用一个受体 β -catenin 信号发挥作用。小鼠体内 PTH(1-84) 受体过表达,会导致 Wnt/ β -catenin 通路下游基因表达增加,促进成骨细胞增殖,减少其凋亡^[15];但 TPTD 作为治疗骨质疏松症的 PTH(1-34)

的重组骨代谢药物,能否通过 Wnt/ β -catenin 通路参与 MC3T3-E1 细胞成骨分化过程尚未有明确报道。该实验通过在高糖环境下加入药物 TPTD 及 Wnt3a 抑制剂进行干预,观察 MC3T3-E1 细胞成骨分化及细胞骨架情况。ALP 染色及蛋白活性定量、茜素红 s 染色和免疫荧光实验结果显示,高糖 + TPTD 组细胞成骨分化水平及细胞骨架清晰度优于高糖组及高糖 + TPTD + Wnt3a 抑制剂组; Real-time PCR 结果显示高糖 + TPTD 组细胞 Wnt3a、 β -catenin、Tcf1、OPG、COL I 各基因 mRNA 表达量高于高糖组和高糖 + TPTD + Wnt3a 抑制剂组,提示 TPTD 可通过 Wnt3a/ β -catenin 通路调控成骨细胞分化。

综上所述,该研究表明,高糖降低成骨细胞分化水平及细胞骨架清晰度,抑制 Wnt3a 及其下游 β -catenin、Tcf1、OPG 及 COL I 表达;TPTD 可通过调控 Wnt3a/ β -catenin 信号通路促进高糖环境下 MC3T3-E1 细胞成骨分化,提高细胞骨架清晰度,提高上述通路相关基因表达。该研究为临床上 TPTD 成为 DOP 潜在治疗药物提供了理论基础,并说明 Wnt3a/ β -catenin 信号通路有潜力成为治疗 DOP 的新靶点。

参考文献

- [1] Qian C, Zhu C, Yu W, et al. High-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats impacts osteogenesis and Wnt signaling in bone marrow stromal cells [J]. PLoS One, 2015, 10 (8): e0136390.
- [2] Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus [J]. Osteoporos Int, 2010, 21 (2): 195-214.
- [3] Ma R, Wang L, Zhao B, et al. Diabetes perturbs bone microarchitecture and bone strength through regulation of Sema3A/IGF-1

- β -Catenin in rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(1): 55 – 66.
- [4] Jiang Z, Von den Hoff J W, Torensma R, et al. Wnt16 is involved in intramembranous ossification and suppresses osteoblast differentiation through the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(3): 384 – 92.
- [5] Zhu X Q, Jin Y, Liang J B, et al. Relationship between Wnt/ β -catenin signaling pathway and diabetic osteoporosis [J]. *J Med Res*, 2011, 40(8): 17 – 9.
- [6] Augustine M, Horwitz M J. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein analogs as therapies for osteoporosis [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2013, 11(4): 400 – 6.
- [7] Niimi R, Kono T, Nishihara A, et al. Usefulness of daily teriparatide treatment in elderly patients over 80 years of age [J]. *Osteoporos Int*, 2016, 27(5): 1869 – 74.
- [8] Yang L, Liu J, Shan Q, et al. High glucose inhibits proliferation and differentiation of osteoblast in alveolar bone by inducing pyroptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 522(2): 471 – 8.
- [9] Wu X, Zhang Y, Xing Y, et al. High-fat and high-glucose micro-environment decreases Runx2 and TAZ expression and inhibits bone regeneration in the mouse [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 55.
- [10] Wang W, Zhang X, Zheng J, et al. High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 338(1–2): 115 – 22.
- [11] 沈振国, 赵荣权, 欧琳琳, 等. 微环境下 Wnt/ β -catenin 通路参与牙周膜干细胞骨向分化机制的研究进展 [J]. *安徽医科大学学报* 2021, 56(3): 497 – 500.
- [12] Deshmukh V, Hu H, Barroga C, et al. A small-molecule inhibitor of the Wnt pathway (SM04690) as a potential disease modifying agent for the treatment of osteoarthritis of the knee [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(1): 18 – 27.
- [13] Feng J, Meng Z Q. Insulin growth factor-1 promotes the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(2): 891.
- [14] Wan M, Yang C, Li J, et al. Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6 [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(21): 2968 – 79.
- [15] O'Brien C A, Plotkin L I, Galli C, et al. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2942.

Effect of teriparatide on osteoblast differentiation in high glucose environment through Wnt3a/ β -catenin pathway

Gu Yingying, Hou Tian, Qin Yazhi, Zhang Yan, Wen Guochen, Bi Wenjuan, Dong Wei

(School of Stomatology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210)

Abstract Objective To investigate the effect of teriparatide (TPTD) on the generation of MC3T3-E1 cells towards osteogenic differentiation *via* the Wnt3a/ β -catenin pathway in a high-glucose environment. **Methods** The experiment was divided into five groups: low glucose group, low glucose + TPTD group, high glucose group, high glucose + TPTD group, high glucose + TPTD + Wnt3a inhibitor G244-LM group. Cell proliferation activity was detected by Calcein-AM and CCK-8 assay, cell mineralized nodule formation was observed by ALP and alizarin red staining, and actin formation was analyzed by immunofluorescence assay. Real-time PCR was performed to detect *Wnt3a*, *β -catenin*, *Tcf1*, *OPG* and *COL I* mRNA expression. **Results** TPTD had no significant effect on the proliferative activity of MC3T3-E1 cells under high glucose condition. The ALP staining area, protein activity and alizarin red staining area of the cells in the low glucose + TPTD group were higher than those in the other four groups ($P < 0.05$); the high glucose group was lower than the low glucose group ($P < 0.05$); the high glucose + TPTD group was higher than the high glucose group and the high glucose + TPTD + G244-LM group ($P < 0.05$). The cytoskeleton in the low glucose + TPTD group was the clearest; the cytoskeleton was less clear in both the high glucose and high glucose + TPTD + G244-LM groups than in the high glucose + TPTD group. Genes such as *Wnt3a*, *β -catenin*, *Tcf1*, *OPG* and *COL I* had the highest mRNA levels in the cells of the low glucose + TPTD group ($P < 0.05$); the mRNA levels of all genes were higher in the low glucose group than those in the high glucose group ($P < 0.05$); the mRNA levels of all genes in the cells of the high glucose + TPTD group were higher than those in the high glucose group and the high glucose + TPTD + G244-LM group ($P < 0.05$). **Conclusion** High glucose inhibited osteoblast differentiation, and TPTD promoted osteoblast differentiation in high glucose environment by regulating Wnt3a/ β -catenin pathway.

Key words teriparatide; osteoblasts; high glucose; Wnt3a/ β -catenin